

# 生物技術

## 台灣原生蘭科種原收集

台灣原生蘭科種原收集包含台灣風蘭 (*Thrix. formosanum*) 於宜蘭縣太平鄉、北橫、棲蘭山、恆春、牡丹鄉、高雄縣美濃鎮、南橫、屏東山地門及蘭嶼等地，共收集 31 份；溪頭風蘭 (*Thrix. saruwatarii*) 於花蓮縣鯉魚潭、秀林鄉及南投縣杉林溪、溪頭等地，共收集 40 份；金唇風蘭 (*Thrix. fantasticum*) 於花蓮縣秀林鄉及屏東縣里龍山，共收集 20 份；厚葉風蘭 (*Thrix. sublatum*) 於南橫及台東縣大武，共收集 6 份；懸垂風蘭 (*Thrix. pedulicaule*) 於高雄縣甲仙鄉及屏東縣恆春鎮、山地門，共收集 10 份；異色瓣風蘭 (*Thrix. eximium*) 於屏東縣里龍山收集 19 份；新竹風蘭 (*Thrix. laurisilvaticum*) 於新竹縣尖石鄉收集 2 份；台灣香蘭 (*Haraella retrocalla*) 於北橫及阿里山，共收集 60 份；秋赤箭 (*G. autumnalis*) 於北插天山收集 1 份；八代赤箭 (*G. confusa*) 於大雪山收集 1 份及冬赤箭 (*G. hiemalis*) 於南投縣溪頭收集 3 份種原。

## 蘭科植物組織培養之研究

### 一、利用液體培養或短暫浸漬系統於蝴蝶蘭種苗生產之研究

本研究之目的在探討應用液體培養或短暫浸漬系統於蝴蝶蘭種苗生產之研究，試驗如下：

#### (一) 短暫浸漬系統打氣時間對蝴蝶蘭實生苗生育之影響

試驗材料為 *Dtps. Han-Ben's Girl* × *Dtps. Sogo Golden*，2007 年 2 月 28 日人工異花授粉，7 月 31 日無菌播種。試驗方法為取帶 1-2 片大小的蝴蝶蘭實生苗植株培養於短暫浸漬系統培養瓶中，每個培養瓶的液體培養基體積為 300 ml，每個培養瓶培養實生苗的密度為 50 株，每次浸漬時間維持 5 分鐘。3 種定時器打氣時間，分別為處理 A-C，對照組 1-不打氣之固體培養基，為短暫浸漬系統培養瓶；對照組 2-不打氣之固體培養基，培養盒為傳統蘭花瓶，每個蘭花瓶培養基為 100 ml，每瓶培養 25 株。共 5 處理，2 重複，每重複 2 瓶，

採 CRD 設計。於培養 3 個月後每支瓶苗選 10 株調查結果，顯示以短暫浸漬系統液體培養處理 B 於葉幅、葉數、葉面積、根數、平均根長、地上部鮮重、根鮮重、地上部乾重及根乾重等方面均最佳。

## (二) 短暫浸漬系統浸漬時間對蝴蝶蘭實生苗生育之影響

試驗材料為 *Dtps.* I-Hsin New Girl × *Dtps.* Jiuhbao Red Rose，2007 年 3 月 23 日人工異花授粉，8 月 28 日無菌播種。試驗方法為取上述帶 2-3 片葉、葉幅 3-5 cm 大小的蝴蝶蘭實生苗植株培養於短暫浸漬系統培養瓶中，每個培養瓶的液體培養基體積為 300 ml，每個培養瓶培養實生苗的密度 30 株，每 4 小時打氣 1 次，2 種定時器浸漬時間處理，對照組 1-不打氣及浸漬之固體培養基，為短暫浸漬系統培養瓶，對照組 2-不打氣及浸漬之固體培養基，培養盒為傳統蘭花瓶，每個蘭花瓶培養基為 100 ml，每瓶培養 15 株。共 4 處理，2 重複，每重複 2 瓶，採 CRD 設計。於培養 1.5 個月後進行植株生育調查，結果顯示以短暫浸漬系統液體培養處理 B 於株高、葉幅、葉面積、平均根長、地上部鮮重及地上部乾重等方面最佳。

## (三) 液體培養轉速、培養液體積及培養基添加活性炭及 tryptone 對蝴蝶蘭分生苗增殖之影響

試驗材料為 *Dtps.* Leopard Prince 及 *Phal.* Fortune Saltzman 等 2 個品種。培植體為取株高 2-5 cm，帶 1 片葉鞘及 2 片葉片的分生苗，切除 1/2-2/3 的葉片後置入培養基內，每個培養瓶內置放 5 個培植體。參試下列 3 種試驗，培養 2 個月後調查培植體存活率、芽團鮮重、增殖大芽數（長度大於 1.5 cm）及增殖總芽數等，並換算存活率 × 增殖總芽數為實際增殖數。

1. 液體培養轉速試驗：*Dtps.* Leopard Prince 轉速處理為 A-E 等 5 種處理，3 重複，每重複 4 瓶。*Phal.* Fortune Saltzman 轉速處理為 A-D 等 4 種處理，3 重複，每重複 4 瓶。培養 2 個月後，調查結果顯示，*Dtps.* Leopard Prince 品種，以 E 的存活率、芽團鮮重、增殖大芽數及實際增殖數最高，*Phal.* Fortune Saltzman 品種則以處理 B 的增殖總芽數及實際增殖數最高。
2. 培養液體積試驗：二個品種均採相同處理，處理為 A-D 等 4 種處理，轉速為 60rpm，3 重複，每重複 4 瓶。培養 2 個月後，調查試驗結果顯示，*Dtps.* Leopard Prince 品種，以處理 A 的增殖總芽數及實際增殖數最高，*Phal.* Fortune Saltzman 品種則以處理 B 的芽團鮮重、增殖總芽數及實際增殖數最高。

3. 培養基添加活性炭及 tryptone 試驗：二個品種均採相同處理，處理為 A-C 等 3 種處理，對照組 1 為液體培養，對照組 2 為固體培養基。培養 2 個月後調查結果顯示，*Dtps. Leopard Prince* 品種試驗部份，以對照組 1 的增殖總芽數及實際增殖數最高，而 *Phal. Fortune Saltzman* 品種試驗部份則以對照組 2 的存活率、增殖大芽數及實際增殖數最高。

#### (四) 固、液體培養培植體切割處理對蝴蝶蘭分生苗增殖之影響

試驗材料為 *phal. Tai-Lin Angel 'V31'*。試驗方法為取帶 1 片葉鞘及 2 片葉子，莖長 0.5 公分以上，株高 2-5 公分的植株進行試驗，培植體切割 5 種處理方式，為 A-E。以 125 ml 三角瓶裝 25 ml 培養基，每瓶置放 5 個培植體。液體培養轉速處理為 60 rpm，3 重複，每重複 2 瓶。固體培養 3 重複，每重複 2 瓶。培養 2 個月後調查結果顯示切割處理液體培養以 E 處理最佳，存活率、芽團鮮重、增殖大芽數及實際增殖數均為最高。但切割處理固體培養以處理 D 最佳，其增殖總芽數及實際增殖數是對照組的一倍。

## 二、黃根節蘭原球體誘導體胚及癒合組織

為建立黃根節蘭癒合組織大量繁殖系統，利用黃根節蘭原球體誘導體胚及癒合組織。材料為黃根節蘭無菌播種發芽的黃綠色原球體，播種配方為 132 及 133，進行以下試驗：

#### (一) auxin 種類及組合 auxin 及 cytokinins 對黃根節蘭原球體誘導體胚及癒合組織之影響：

以 1/2MS 為基本鹽類參試添加 auxin 種類及組合 auxin 及 cytokinins，共 12 個處理。採 CRD 設計，於 132 配方發育的原球體為材料，3 重複，每重複 2 個培養皿；於 133 配方發育的原球體為材料，2 重複，每重複 2 個培養皿，每個培養皿有 4 個原球體。暗培養 4 個月後調查體胚及癒合組織誘導情形。結果顯示，於 132 配方發育的原球體繼代於 149 配方的培養基下，體胚誘導率最高，為 13.9%；於 133 培養基發育的原球體繼代於 139 配方的培養基下，癒合組織誘導率最高，為 81.3%。

#### (二) 組合 2,4-D 及 TDZ 對黃節蘭原球體誘導體胚及癒合組織之影響：

以 MS 為基本鹽類參試添加 2,4-D 組合 TDZ 等 8 種處理，採 CRD 設計，於 132 配方發育的原球體為材料，2 重複，每重複 2 個培養皿；於 133 配方發育的原球體為材料，3 重複，每重複 2 個培養皿，每個培養皿均放 4 個原球體。

暗培養 4 個月後調查體胚及癒合組織誘導情形。結果顯示，133 配方發育之原球體繼代培養後，體胚誘導率及癒合組織誘導率較於 132 配方發育之原球體高，於 96C2 配方體胚誘導率最高，為 20.8%；於 96C3 配方的癒合組織誘導率最高，為 50%。

### (三) 蔗糖濃度對黃根節蘭原球體誘導體胚及癒合組織之影響：

以 MS 為基本鹽類，參試添加蔗糖濃度等 3 種處理，採 CRD 設計，於 132 配方發育的原球體為材料，2 重複，每重複 2 個培養皿；於 133 配方發育的原球體為材料，3 重複，每重複 2 個培養皿，每個培養皿均放 4 個原球體。暗培養 4 個月後調查體胚及癒合組織誘導情形。結果顯示，提高蔗糖濃度有助於體胚誘導率；但卻降低癒合組織誘導率。

## 三、黃根節蘭癒合組織繼代培養

取上述誘導的黃根節蘭癒合組織，每個月繼代培養一次，於培養 1 年後，將對照組、體胚及癒合組織移至 3 g l<sup>-1</sup> 花寶 1 號添加 50 g l<sup>-1</sup> 馬鈴薯、15 g l<sup>-1</sup> 蔗糖的培養基下繼代培養。再經培養 3 個月後，觀察及紀錄生育情形。結果顯示對照組的原球體已形成植株，體胚可發育成小苗。癒合組織經繼代培養至目前已得到 207 個癒合組織系。

## 四、植物荷爾蒙對黃根節蘭癒合組織誘導不定芽之影響

取上述經誘導 1 年後的黃根節蘭癒合組織，探討植物荷爾蒙對黃根節蘭癒合組織誘導不定芽之影響。以基本培養基 1/2MS 為基本鹽類，參試添加組合 auxin 及 cytokinins 等 16 種處理。每個月繼代培養一次，3 個月後調查癒合組織誘導不定芽的情形，結果顯示多數癒合組織呈現部份褐化，僅於 97C26 配方下癒合組織呈現為鬆軟綠色。

## 五、培養基組成分對台灣風蘭繼代培養植株生育之影響

本研究旨在為探討台灣風蘭繼代培養最適培養基組成分。以 3 g l<sup>-1</sup> 花寶 1 號為基本鹽類，參試添加有機添加物共 6 種處理 (A-F)。採 CRD 設計，每支蘭花瓶培養 25 株，2 重複、每重複 2 支蘭花瓶。培養 4.5 個月後，植株生育調查結果顯示，台灣風蘭繼代培養添加有機添加物處理 D 於株高、葉長及平均單株增重等方面表現均為最佳。

## 六、培養基組成分與密度對厚葉風蘭繼代培養植株生育之影響

本研究旨在為探討厚葉風蘭繼代培養最適培養基組成分及培養密度。以  $3\text{ g l}^{-1}$  花寶 1 號為基本鹽類，參試添加有機添加物共 10 種處理 (A-J)，採 CRD 設計，密度為每支蘭花瓶培養 100 個突出或扇形結構的小苗，2 重複、每重複 2 支蘭花瓶。培養 6 個月後，植株生育調查結果顯示，株高等所有調查項目於處理間均有顯著性差異，以添加有機添加物處理 I 於葉幅、葉面積、根數及平均單株增重等方面表現均為最佳。

另以  $3\text{ g l}^{-1}$  花寶 1 號為基本鹽類，161 配方為基本培養基，參試 3 種密度處理 (A-C)，3 重複、每重複 3 支蘭花瓶，探討繼代培養之適宜密度。培養 6 個月後，生育調查結果顯示 3 種密度處理在株高、葉幅、總葉片數及葉面積方面均無顯著性差異，於根數、平均根長及平均單株增重方面處理間差異達顯著性水準，其中以處理 A 於株高、葉面積、平均根長及平均單株增重等方面表現最佳。

## 七、冬赤箭屬種子發芽之研究

於 2008 年 1 月自南投縣溪頭採集 2 個成熟冬赤箭莢果進行播種試驗，以瞭解適合冬赤箭種子發芽之培養基配方。試驗以 1/2MS 為基本鹽類，分別添加植物荷爾蒙 auxin、cytokine 組合共 8 個處理 (H1-H8)；有機添加物共 9 個處理 (O1-O9)；複合含氮物質 6 個處理 (N1-N6)，以 1/2MS 為對照組，每處理 3 重複，採 CRD 設計。2008 年 1 月 30 日播種，置於  $25^{\circ}\text{C}$  暗培養，結果顯示在培養 3 個月時已觀察到冬赤箭種子吸水膨大。6 月 30 日調查發芽率結果，以 H2 處理發芽率 7.71% 及 H7 處理發芽率 7.67% 顯著高於其他處理，顯示不同植物荷爾蒙處理對於冬赤箭發芽有不同程度影響。複合含氮物質中對於冬赤箭發芽率介於 1.05%–3.27%，低於其他處理。有機添加物 O4 處理之發芽率 9.7% 為所有處理中最高。

## 八、高赤箭分生芽誘導之研究

本試驗旨在探討提高高赤箭分生芽增殖倍數之適宜培養基配方。以高赤箭營養繁殖莖為試驗材料，試驗以 1/2MS 為基本鹽類，分別添加植物荷爾蒙 8 個處理 (H1-H8)；活性炭 3 個處理 (C1-C8)；有機添加物 9 個處理 (O1-O9)；複合含氮物質 6 個處理 (N1-N6)，以 1/2MS 為對照組，每處理 3 重複，採 CRD 設計，調查分生芽數、褐化芽數及營養繁殖莖數。結果顯示各植物荷爾蒙處理之總芽數

介於 9.3–11.8 個，處理間差異不顯著，而分生芽數均比對照組少，添加 TDZ 的處理中褐化較嚴重，而且添加植物荷爾蒙會抑制營養繁殖莖形成。複合含氮物質處理中，N4 及 N6 處理會促進營養繁殖莖生成，而分生芽數處理間差異不顯著。有機添加物方面，以 O6 處理產生 15.6 個分生芽數為最多，O7 處理則營養繁殖莖生成數最多。添加活性炭處理不會增加分生芽數，但可以有效降低褐化芽數。

## 風蘭屬種原 ITS 親緣關係分子鑑定

本計畫旨在進行台灣原生風鈴蘭屬 6 個種原 ITS 定序及親緣關係分析，以期瞭解風鈴蘭種間之親緣關係，引子設計參考 NCBI 資料庫所發表的蘭科 (*Eulophia guineensis*, *Oncidium hastilabium*, *Cyrtochilum aurantiacum*, *Bifrenaria longicornis*, *Scaphyglottis coriacea*) 18S、5.8S 及 26S 核糖體核酸序列，比對排列出保留性較高的區域設計出 ORITS I (AACTGCAGGAGAAGTCGTAACAAGG) 及 ORITS II (AGA ATTCGTAAGTTTCTTCTCCTCCG) 兩條引子，進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，並將 PCR 產物選殖及定序。6 個台灣風鈴蘭屬的原生種其 PCR 產物經電泳分析後皆呈現長約 670 bp 單一條帶，逐一定序後得知溪頭風蘭為 679 bp、新竹風蘭為 681 bp、懸垂風蘭為 685 bp、金唇風蘭為 670 bp、台灣風蘭為 680 bp、異色瓣為 693 bp，長度介於 670–693 bp 之間，其中 ITS 區域有 283 個多型性，佔此區 40%；根據 ITS 序列比較此 6 種原生風蘭 ITS 序列，其親緣關係顯示溪頭風蘭和新竹風蘭為一群，而懸垂風蘭、金唇風蘭及台灣風蘭較相近。配合其外表型的分類上可相輔相乘，應用此分子標誌探討其相關親緣的演化距離，並作為雜交育種上初步鑑別工具。

## 基因轉殖延長黃根節蘭花期之研究

本研究目的在探討黃根節蘭以花粉管法轉殖 ACC 合成酶反義基因以延長花期之效應，試驗如下：

### 一、黃根節蘭擬轉殖植株溫室栽培管理：

於 2003 年轉殖 ACC 合成酶反義基因之黃根節蘭經無菌播種及繼代培養，第一批於 2004 年 9 月定植 1,000 株於溫室，第二批於 2005 年 5 月定植 4,000 株於溫室，於 2008 年 3–4 月間開花，第一批有 81 株開花，第二批有 27 株開花。

於 2004 年轉殖 ACC 合成酶反義基因之黃根節蘭經無菌播種後再經抗生素篩選 2,719 株，2008 年均未開花。

## 二、黃根節蘭擬轉殖植株花期調查：

為了解黃根節蘭擬轉殖植株的花期，栽培於溫室之黃根節蘭擬轉殖植株，於 2003 年轉殖 ACC 合成酶反義基因之黃根節蘭經無菌播種及繼代培養，栽培至 2008 年 3-4 月間有部份擬轉殖植株開花，調查開花表現情形。以蒐集自山區原生地之黃根節蘭 9 株為對照組，分別調查第一批擬轉殖植株 67 株及第二批擬轉殖植株 24 株。結果顯示第一批、第二批擬轉殖植株及對照組的平均花朵數分別為 8.5、7.2 及 10.8 朵花，以對照組最多朵。花朵平均壽命方面，第 1 朵花分別為 16.1、16.9 及 13.4 天，第一批及第二批擬轉殖植株均較對照組長；但最後 1 朵花的平均壽命分別為 15.3、15.5 及 19.8 天，卻均較對照組短。花期方面，最短花期分別為 14.5、16 及 20.5 天，以對照組最長；最長花期分別為 31、29 及 27.5 天，以對照組最短；平均花期則分別為 22.4、21 及 25.6 天，以對照組最長；顯示擬轉殖植株的花期較分散，而對照組的花期較集中。

## 竹炭在蝴蝶蘭栽培之應用研究

本試驗旨在於水苔中添加不同種類及比例之竹炭，以改善水草酸化情況，提高蝴蝶蘭生長速率與品質。參試蝴蝶蘭品種為 *Phal. Dragon's Gold*（黃花）、*Phal. I-Hsin Cream*（白花）、*Dtps. Sogo Smith*（紅花），試驗處理為 100%水苔、水苔添加 10%綠竹竹炭、水苔添加 20%綠竹竹炭及水苔添加 10%桂竹竹炭、水苔添加 20%桂竹竹炭共計 5 種處理，採 CRD 設計，3 重複，每重複 15 株，試驗於 2007 年 7 月移植於 2.5 寸盆，2008 年 2 月移植至 3.5 寸盆，移植同時添加竹炭處理，於 2007 年 8 月、11 月及 2008 年 6 月底調查。

試驗結果 *Phal. Dragon's Gold* 的栽培介質 pH 值顯著高於其他 2 個品種，顯示栽培的蝴蝶蘭種類可能影響介質酸化程度。水苔添加 20%綠竹炭及桂竹炭的處理，其 pH 值顯著高於其他處理。園藝性狀方面，*Phal. I-Hsin Cream* 栽培 12 個月後，水苔添加桂竹炭及綠竹炭處理，在葉片數、葉鮮重及莖直徑上均顯著低於未添加處理，顯示添加竹炭不利於蝴蝶蘭 *Phal. I-Hsin Cream* 生長。*Phal. Dragon's Gold* 栽培 12 個月時，葉片厚度及莖直徑在添加桂竹炭及綠竹炭 4 個處理都高於

100%水苔。*Phal. Sogo Smith* 栽培 12 個月後，在根葉重、葉乾重及葉面積 3 項目中，以水苔添加 10%綠竹炭及水苔添加 20%綠竹炭顯著高於其他處理。綜合試驗結果，水苔中添加 20%綠竹炭及 20%桂竹炭長時間栽培後，會較顯著的提高 pH 值及 EC 值，在短時間內對於蝴蝶蘭的生長不顯著，而在栽培 12 個月後，除 *Phal. I-Hsin Cream* 之外，其他 2 品種在水苔添加竹炭處理之園藝性狀優於 100%水苔處理，顯示品種間對水苔添加竹炭的反應不一致。

## 栽培介質對台灣風蘭桌上型盆花生長之研究

為了解栽培介質對台灣風蘭桌上型盆花生長之影響，取帶 4-6 片葉的台灣風蘭實生苗植株，利用 270 ml 之玻璃心型瓶種植，參試栽培介質共 8 種處理(A-H)，5 重複，每重複 4 株。生長箱的日間溫度為  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，夜間溫度為  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照 13 小時，相對濕度為 80%。分別於栽培 1、3、5 個月後調查植株生育情形。

試驗結果顯示，不同栽培介質於處理間均有顯著性差異，以栽培介質 H 與 A 對台灣風蘭之生育表現最佳，栽培 1 個月後分別有 90 及 80%生育佳的植株，栽培 3 個月後，分別有 85%及 75%，栽培 5 個月後，則分別有 40%及 35%生育佳的植株。