

台灣蝴蝶蘭生物技術

陳文輝

國立高雄大學生命科學系

摘要

貳、蝴蝶蘭生物技術之研究

蝴蝶蘭花形優美花期長，可出售盆花及切花，市場潛力大，目前已成為台糖公司多角化經營中一項重要花卉作物，蝴蝶蘭品種改良因而列為糖研所一項重要研就工作。並於民國77年4月1日成立園藝系，積極從事品種改良工作，除應用傳統雜交育種技術培育市場急需品種外，亦應用生物技術幫助傳統雜交育種，以加速蝴蝶蘭品種改良工作。其中包括播種技術的改良、分生繁殖技術的建立、染色體核型分析、染色體倍加技術之建立、蝴蝶蘭原生質體分離、融合及培養、同功異構、DNA增幅指紋及基因轉殖等生物技術的研究。逐將各項研究成果簡述如下：

一、播種技術之改良

一般使用的培養基對不同品種的反應不同，尤其對原生種交配的品系，往往無法使發芽種子正常發育成健苗，經播種比較試驗發現，研發G7培養基可使多數蝴蝶蘭組合種子發芽發育成原球體，尤其對原生種品系可使原球體發育良好。另外，也發現原球體在G7培養基中經六個月後仍有90%以上的存活率，因此G7培養基亦可作為短期貯存原球體之培養基，以縮短供苗銷售之育苗期限。

二、分生繁殖技術之建立

1. 種原保存

重要的雜交親本必須以無性繁殖方式保存植株，本所發展出來的 P36-P4-P44ac 培養方式，可成功的誘導蝴蝶蘭花梗休眠芽產生不定芽，以保存重要種原，並參加國家作物種原庫，維護蝴蝶蘭資源，促進花卉生產。

2. 大量分生繁殖

利用微體繁殖技術，加速繁殖健康種苗，穩定生產品質，是生物技術提昇農業生產之重要成果之一，在蝴蝶蘭微體繁殖方面，利用擬原球體可達快速且大量無性繁殖的目的。經由本所發展的 A8m-A18-A16 誘導方式，可自不定芽葉片誘導出擬原球體，並經由 T2ac-L8ac 可大量增殖生產優良分生苗。

三、染色體倍加技術之建立

染色體數目的增加，往往伴隨著育種上重要性狀之變化，如花徑、花形、品質及顏色等，尤其在園藝作物之果樹及花卉上，多倍體育種是一條有效的育種途徑。*Phal.* Golden Emperor 'Sweet' 為一純黃花瓣，且花形優美的品種，由於染色體數目為三倍體，所以不易經由交配獲得後代，本所利用葉片誘得之擬原球體，以 100ppm 秋水仙精處理，已獲得兩個六倍體植株。

另外，夏威夷大學在石斛蘭的切花品種的育種上，利用染色體倍加的技術，將異質二元體倍加產生複二元體，再以複二元體為親本，雜交生產品質均一之實生苗後代。本所也嘗試以蝴蝶蘭近緣種 *Dor. pulcherrima* 'alba' 之實生原球體為材料進行四倍體的誘導，發現以 125ppm 處理 1.0-1.2mm 大小的原球體

時，可使 46% 的已分化植株倍加產生四倍體。目前正培育複元體染色體親本，俾生產高品質而均一之價廉實生苗。

四、原生質體分離、融合及培養（部份經費由國科會補助）

應用原生質體培養改良作物之生物科技，已受到植物育種家的重視，其有助於引進遠緣植物的遺傳質或有效的抗病基因進入蝴蝶蘭。將蝴蝶蘭的葉片組織，以 1/2 E4 酵素混合液處理四小時（27℃）後，每公克葉片可得 3.5×10^6 個原生質體，原生質體經電融合儀以 70V RMS/cm 高頻率（800 KHZ）交流電處理後，可排列成對，再以 2500 V/cm² 毫秒短脈衝直流電打擊，可使隣接原生質體融合。另外，由所分離之原生質體，經 0.6M 蔗糖純化及 Kp3 培養液清洗後，培養於 1.2 % (W/V) agarose -kP8 培養液，可得到細胞團。

五、細胞遺傳與同功異構酵素的分析（部份經費由國科會補助）

藉由蝴蝶蘭各原生種間的染色體核型分析，並配合種間雜種 F1 花粉母細胞染色體配對行為，或經由同功異構與圖的相似性，可了解各原生種間親合性，提供將來育種材料之參考。初步的研究顯示，在 *Phal. amabilis* 及 *Dor. pulcherrima* 之染色體核型分析中，發現部分同源染色體環帶分佈有差異，此現象推測可能蘭科植物染色體易受環境的影響而改變其遺傳質，或染色體發生突變，目前正進一步研究。

由 *Phal. schilleriana* 與 *Phal. stuartiana* 雜交種之染色體配對行為，發現此兩個原生種之染色體具有部分親合，而三價體及五價體的產生易造成後代染色體

的缺失或另外，比較 SOD、MDH、SDH、AAT 四種同功異構在蝴蝶蘭的表現時，發現 AAT 較易受材料及環境的影響，而 SDH 則較不易受環境影響，而利用 AAT 及 SDH 可幫助進行品種的鑑定。

六、DNA 增幅指紋的分析（部份經費由國科會補助）

近年來，PCR 的技術已廣泛的應用在分子生物的研究領域上，利用 PCR 的技來進行 DNA 增幅指紋的分析，由於簡單快速，因此在育種上頗具發展潛力。本研究以建立之蝴蝶蘭 DAF 分析技術，針對原生種區分、栽培種鑑定及親緣關係之追蹤及紅花花色性狀 DAF 分子標誌之篩選，進行圖譜標誌之分析，結果以所購置之 10-mer 引子進行 DAF 分析，皆可找到可資利用之標誌。

在花色性狀 DAF 分析上，以朵麗蘭及姬蝴蝶蘭紅花和白花品系進行同種不同花色間之雜交，對親本、 F_1 進行紅花花色 DAF 分子標誌之篩選及分析，以 520 種 Operon 10 mer 引子進行 DAF 遺傳標誌的篩選及分析，累計已有朵麗蘭 13 種及姬蝴蝶蘭 16 種引子可 F_1 雜種之 DAF 圖譜與紅花親本有共同條帶而白花親本缺少此類條帶，這些引子將繼續在 F_1 及 BC_1 世代篩選與花色基因連鎖之分子標誌。

初步以朵麗蘭 BC_1 兩株開花株、親本及 F_1 ，進行 7 種引子之測試，結果找到 OPJ-17 之引子可在紅花親本 F_1 及紅花 BC_1 產生共同條帶而白花親本及白花 BC_1 缺少此類條帶，顯示利用此方式，將可在 F_2 及 BC_1 開花時，找到與紅花花色基因相連鎖之分子標誌，而可在幼苗期篩選紅花品種，俾加速育種效率，減低成本。

七、基因轉殖系統的建立（部份經費由國科會補助）

植物遺傳工程之基因轉殖技術乃為近年來作物育種的一項新途徑。目前最常採用的方法為利用農桿菌 (Agrobacterium) 來進行轉殖，但因蝴蝶蘭為單子葉植物，非農桿菌寄生，且其原生質體再生植株不易，利用此方法可能較為困難。因此應用性更廣的轉殖系統——高速微粒子撞擊系統 (High-velocity microprojectile bombardment) 則逐漸受重視。

本研究室已建立之基因槍轉殖法其較佳之條件為 Gap 為 3/8 inch，macro carrier 飛行距離 1.1cm，氮氣壓力為 650 psi，檔網與材料距離為 6cm，並已以 pBI121 為 DNA 來源進行基因轉殖試驗，經 Kanamycin 篩選後，進一步分析殘存的原球體、小苗，隨機取部份以 X-gluc 溶液進行 GUS 酵素活性組織化學鑑定，證明外來基因經此系統移入蝴蝶蘭組織可表現其活性。將一步對經 Kanamycin 篩選後殘存的球體或小苗，將進行 PCR 分析工作。另外，利用建立的基因槍轉殖，亦將含 CyMV CP 基因之 DNA 送入蝴蝶蘭原球體，並以 Kanamycin 進行篩選。第一期撞擊轉送工作業已結束，共進行 20 次，目前皆處於固體培養基篩選階段，後續的篩選分析工作進行中。

參、深度閱讀資料

1. 陳文輝、陳明言 (民 82)，台灣蝴蝶蘭產銷計畫與品種改良之發展，生物技術醫藥產業透析，1(6)，22-28。
2. 陳耀煌、陳文輝、邱明森、傅仰明、林益賢、蕭崇文、林國仁、洪黎珊 (民 89)，台糖 Taisuco 白花蝴蝶蘭之發展，中國園藝，46(2)，147-156。
3. 馮將魁 (民 86)，台灣蝴蝶蘭新花專輯 II，頁 5-166，世界蘭園，屏東。

4. Sweet, H. R. (1980) The Genus Phalaenopsis. pp.128. The Orchid Digest Inc., USA.
5. Christenson, E. A. (2001) PHALAENOPSIS A monograph. pp.330, Timber press., Hong Kong.