

第五篇 生物技術研究

蔡奇助、黃柄龍

壹、前言

本場生物技術的研究源起於民國 81 年，當時隸屬於園藝研究室之下，主要著重於組織培養方面的研究。先期的研究計畫為毛豆的組織培養，由韓青梅小姐及陳庚鳳先生所負責，在兩位前輩的努力，以及各級長官的支持下，已經建立組織培養的研究基礎。後來陸續進行芋健康種苗繁殖技術、毛豆及甜椒的花藥培養、薑之莖頂培養。民國 87 年園藝研究室改制，分為花卉研究室及果樹研究室，組織培養方面的研究隸屬於花卉研究室之下，由鍾德月課長及黃雅玲小姐負責，研究重點著重於花卉的組織培養繁殖及利用，建立蘭花無菌播種及花梗芽繁殖技術，並應用於原生蝴蝶蘭之繁殖。由於生物技術的發展日新月異，本場遂於民國 90 年初正式成立生物技術研究室，由蔡奇助先生及黃柄龍先生負責。在各級長官的協助與指導下，研究工作已步入軌道，研究室同仁也本著草創維艱之心，積極開創本場生物技術的研究領域。目前研究方向可分為植物組織培養、作物種原 DNA 分析及作物基因轉移等三個方向。

貳、歷年生物技術研究成果

· 芋健康種苗繁殖技術之研究

芋的塊莖用途廣泛，可作為主食、副食、乾糧、蔬菜及加工食品原料，故需求量日益增加，高屏兩縣栽培面積佔台灣地區的 75%，為南部重要作物之一。台灣地區農民採收母芋以水田式種植檳榔心芋為主，種苗來源來自生長中之子芋，因此種苗來源有限且成本高，加上秋植檳榔心芋罹患軟腐病的機率高，此病菌可經由子芋傷口侵入而污染幼苗，因此希望藉由組織培養技術繁殖芋健康種苗。自民國 81-82 年兩年的研究，經由芋的莖頂培養，可以誘導芽球類似體，並進一步形成植株，遂能大量繁殖芋健康種苗，以充分供應商業栽培。

· 茄子花藥培養及誘導植株分化

經由花藥培養育成單倍體植株，再經由染色體加倍後，可以形成一固定品系，以縮短育種年限。自民國 85 年起，進行茄子的花藥培養。採集 2-3 mm 大小的茄子花蕾為材料，取其花藥進行培養。由於此發育階段的小孢子均屬於單核期，在適當培養基培養下，能誘導產生癒合組織，將癒合組織培養於再生培養基下，可以促進胚狀體分化，進而形成植株。

· 原生蝴蝶蘭之繁殖及利用

蝴蝶蘭花型優美，花期長且耐瓶插，為深具發展潛力的經濟花卉。台灣地區也有兩種原生蝴蝶蘭，早期因為沒有適當保護，目前在野外幾乎已經無法發現它曼妙的身影。因此，本研究在收集台灣原生蝴蝶蘭種原，並利用組織培養技術加以培育、繁殖及利用，以提供野外復育之用。民國 78 年從台東收集二株台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)，於本場溫室內試種觀察，花期時經自交、組織培養無菌播種，待種子發芽及繼代培養後，實生苗經健化及出瓶，栽培於溫室中。民國 82 年將 20 盆台灣白花蝴蝶蘭實生苗交給墾丁國家公園保育科，於南仁山進行野外試種供復育之用。此外，雖然蝴蝶蘭花期長且耐瓶插，然而本省的環境產期都集中在 1-5 月。雖然可以利用設施或搬運至山區進行催花，然卻增加成本。因此自民國 87 年起，希望能從原生蝴蝶蘭種原中，選育出對溫度鈍感的品種與商業品種進行雜交，以培育出對溫度鈍感的優良品種。

· 薑之組織培養繁殖

薑原產於亞洲西南，為一種主要的香辛類佐料蔬菜。台灣地區主要以生產嫩薑及粉薑為主，除了供應台灣地區市場需求外，亦有相當數量外銷至香港及日本等地。由於台灣地區薑之栽培經長期無性繁殖後，種薑易感染軟腐病，遭受此種細菌性病害感染後，會嚴重影響日後的生長發育，進而影響品質及產量。又因種薑貯存不易，導致種薑苗極度缺乏。因此，自民國 85-86 年兩年的研究，以“廣東種”薑之莖頂 0.3-0.5 mm 進行培養，經由薑的莖頂培養，可以誘導不定芽的產生，遂能大量繁殖健康種苗之技術得以建立。

· 火鶴花組織培養微體繁殖及應用

火鶴花 (*Anthurium* spp.) 為天南星科花燭屬的宿根花卉，具有優美的姿態與神韻，在很多場合都可以看到它的身影，可做為盆花或切花之用，是一種極具經濟價值的熱帶花卉。南部地區由於氣候適合火鶴花生長，遂成為台灣地區火鶴花的重要產區。自民國 90 年起，本場利用組織培養技術，進行火鶴花的微體繁殖。除了可加速種苗的繁殖外，亦可育成健康種苗。以葉枕、莖及根為培植體，置於含植物生長調節劑的適當培養基，在黑暗下，可以逆分化產生癒合組織，其中以葉枕的效果最好。將培養基中的植物生長調節劑移除後，置於照光環境下，經兩個月後，也能順利產生芽體，待芽長至 5 mm，可將芽切下單獨培養，經一週後可長根。

台灣地區夏季炎熱多雨，火鶴花常受到細菌性葉枯病的侵襲，使花卉完全沒有觀賞價值，造成嚴重損失。Amphipathic protein-1 (AP1) 為選殖自甜椒的基因，此基因可以引發植物產生類似過敏性反應的機制，以抵抗細菌性病害的侵襲。因此，自民國 91 年

起，以火鶴花組織培養再生系統為基礎，期能建立火鶴花的轉殖系統，並將具有抗細菌性病害的基因 (API gene) 導入火鶴花中，期能培育出抗細菌性葉枯病火鶴新品種，以降低生產成本，提升產業競爭力。

· 薑花之微體繁殖及應用

薑花 (*Hedychium coronarium* Koenig) 慣行的繁殖方式可以分割根莖 (rhizome) 繁殖，或採用單節及帶雙節以上的扦插繁殖，不過一年僅可繁殖 5~6 倍，繁殖速度較慢。利用組織培養繁殖技術，以分蘖幼苗誘導分蘖芽體的產生，一個芽體一次最高僅可形成 4.78 個芽體，且每一繁殖週期較長。以往台灣地區主要栽培品種均為白色本地種，目前雖然有許多優良的薑花栽培品系育成，但這些以雜交方式選育的具有色彩的薑花，大都不具香氣或香氣很淡，並不能符合消費者習性。自民國 89 年 12 月起配合本場花卉研究室新選育淡黃色且具香氣之 F1-23 品系，利用葉鞘及葉培植體在含 5 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BA、3% 蔗糖及 200 ml/L 椰子水的 VW 固體培養基中，經 3 個月，可誘導產生具體胚分化能力之癒合組織；並於含 4 mg/L BA 及 0.05 mg/L NAA 之 MS 培養基中，直接由此癒合組織的表面產生數個至數十個數目不等之體胚，2 個月後並可形成一完整的植株。建立此一穩定的癒合組織體胚形成模式誘導薑花之微體繁殖，不僅能夠達到短時間大量繁殖的目的，並可作為應用生物技術進行基因轉殖改良品種特性之材料使用，導入調控花色生合成的正義 (sense) 或反義 (anti-sense) 基因，以解決傳統上具色澤的薑花缺乏香氣的缺點。

· 胡瓜體胚之誘導及利用

胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 為本省重要的蔬菜，每年田間栽培的瓜園常因受到病毒感染而造成嚴重危害。目前已知夏南瓜黃化嵌紋病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 是瓜類最猖獗的病毒之一，影響產量、品質甚鉅。植物病毒病害目前尚無防治藥劑可使用，利用病毒鞘蛋白質基因 (CP gene) 轉殖，誘導具抗病性之品種為目前較有效的防治方法，近年來已有不少成功的例子。而適當的組織培養系統更可提高基因轉殖效率，因此建立胡瓜組織培養再生系統，是進行基因轉殖的首要步驟。文獻指出，胡瓜組織培養可以器官或體胚發生的方式增殖，不過其誘導率均相當的低；同時，培養過程均需採用二個步驟、三個步驟，甚至使用杯狀濾紙橋或雙層培養等繁殖的方法方可誘導體胚產生或使胚萌發，增加工作負荷。本研究室於民國 90 年 6 月起即著手建立胡瓜之組織培養再生系統，經各組織培養反應顯示，只有子葉培植體在含 2 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L BA 及 9% 蔗糖的 MS 培養基上，可由誘導的癒合組織直接產生體胚，其體胚形成能力約為 65%，可於單一癒合組織表層產生 1~20 個數目不等的已萌

芽或未萌芽體胚。已萌芽的體胚經 1mg/L BA 培養，可進一步生長，再生成一完整的植株。因此，建立具高度胚分化能力癒合組織培養模式，可作為日後利用生物技術進行瓜類作物抗病毒病基因轉殖改造品種特性之應用。

· 朵麗蝶蘭之繁殖及利用

朵麗蝶蘭滿天紅品種具有花色鮮紅，花梗多分枝性，花朵數多等特性，深獲國人喜愛，本研究承襲前人之花梗腋芽培養研究，初步發現在花梗側芽或分枝節處可使用花寶一號為基本鹽類，添加 BA 10 mg/L、NAA 0.1 mg/L、TDZ 5 mg/L 誘導產生許多體型小之分生苗；且可以在相同培養基中行側芽增殖之繼代培養，產生基部膨大、PLB 形成量多但 PLB 型小之增殖現象；所誘得的 PLB 可在不含植物生長調節物質的培養基中令其成長、展葉、長根。此外，花梗頂芽亦可誘導產生單芽；但葉片組織於含 0.5 mg/L TDZ 之培養基中，約 17.8% 可於切口處形成 PLB。

· 水稻組織培養及其應用

水稻不僅是本省最重要的經濟作物，也是全球性的重要糧食作物，因此極具有發展的潛力。本場以水稻未成熟胚為材料，置於適當培養基誘導形成癒合組織，經滲透壓處理，移至再生培養基下，可以順利再生植株。應用目前已經建立的水稻組織培養再生系統，進行水稻抗病基因轉移試驗。以目前高屏地區主要的梗稻栽培品種台梗五號，及國內栽培面積最多的秈稻品種台中秈 10 號為材料。由於這兩個品種雖然品質佳、產量豐，但對白葉枯病的抗性不佳，因此常會受到白葉枯病的侵襲，造成嚴重的損失。傳統雜交育種育成抗白葉枯病的水稻品種之目標未曾間斷，但往往無法得到同時具有高品質、產量及抗性佳等特性的水稻品種。本研究希望藉由基因轉移的技術，將具有抗細菌性病害的基因 (AP1) 導入台中秈 10 號或台梗五號，期能育成品質、產量及抗白葉枯病兼具的水稻品種，以減少受白葉枯病侵襲的損失。

· 台灣原生杜鵑種原 DNA 分析

杜鵑花屬 (Rhododendron) 為杜鵑花科 (Ericaceae) 植物，本屬全球約有 850 種原生種，由於分類觀點不同，亦有認為僅約 500 至 600 種，主要分佈於北半球寒帶及溫帶。我國西南各省產量亦極豐富，計有 200 餘種，台灣地區約產 19 種。本研究設計一組核酸引子，利用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，將 19 種台灣原生杜鵑 (Rhododendron species) 的核糖體核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 選殖。將上述 ITS 之 DNA 片段定序，發現 19 種台灣原生杜鵑內轉錄間隔區 (ITS) 之長介於 642-648 bp 間。將上述所有杜鵑的 ITS 序列進行比對，並進一步完成樹狀關係圖，發現可以將 19 種杜鵑分成 6 群，其中台灣杜

鴉、玉山杜鵑、南湖杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑為一群；紅毛杜鵑、金毛杜鵑、烏來杜鵑、細葉杜鵑、唐杜鵑、中原氏杜鵑、大屯杜鵑、埔里杜鵑、南澳杜鵑為一群；馬銀花、長卵葉馬銀花為一群；另外，守城滿山紅、西施花、著生杜鵑分別自成一類。除了上述 19 個樣本外，另外，也分析 50 個不同採集點的台灣原生杜鵑樣本進行分析，其結果亦支持將台灣的杜鵑花分為 6 群。

本研究所設計的核酸引子能將台灣各原生杜鵑之 ITS 加以選殖，藉由分析 ITS 序列，可獲取有用的分子標誌，供探討杜鵑花屬的微演化及親緣研究上。未來在杜鵑花育種上，亦可供為品種鑑別，及品種專利之應用。

· 蝴蝶蘭種原收集及核酸鑑定

蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) 是蘭科植物中的重要成員，花的外形有如一隻翩翩飛舞的蝴蝶，不僅清新脫俗，而且雍容華貴，因此有「蘭花之后」的美譽。全球的蝴蝶蘭屬植物約有 75 種左右，主要分佈在東南亞地區，北界為東印度、中國大陸雲南及貴州至台灣，南界為澳洲北部，東至新幾內亞，往西延伸至印度東緣，其中印尼、菲律賓及馬來西亞為主要產地。台灣地區可以找到兩種，分別為台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 及姬蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris*)，分佈於台東、恆春及蘭嶼等地區。

由於蝴蝶蘭花形漂亮，花色豔麗多樣且花期長，因此為花卉育種及栽培的重要標的。台灣對蝴蝶蘭有深厚的栽培基礎與育種經驗，加上無菌播種及組織培養在蘭花繁殖上的應用，使得台灣的蝴蝶蘭在國際間佔有一席之地。國內及國外市場上對蝴蝶蘭的需求量高，台灣每年外銷大量的組織培養瓶苗、小苗，或切花，為我國賺進不少外匯。目前每年不斷的有新品種蝴蝶蘭育成，未來的前景相當看好。雖然蝴蝶蘭已漸漸成為重要的產業，世界各地的育種、栽培及組織培養的研究也蓬勃發展，但是在 DNA 指紋分析的研究卻極其缺乏。台灣目前對蝴蝶蘭產業已佔有天時、地利及人和的條件，應該積極投入蝴蝶蘭的研究。本研究藉由分析各蝴蝶蘭種原的 DNA，以探討蝴蝶蘭屬內各種間的親緣關係、遺傳距離，並獲取各種原的分子標誌，以供未來育種的參考。

原種蝴蝶蘭種原的蒐集自民國 78 年起即開始進行，到了民國 89 年，已經收集 20 種原生種，民國 90 年以後，更積極於原生種的蒐集上。截至目前為止，原種蝴蝶蘭的種原已經有 70 種，約佔全世界所有原種蝴蝶蘭的 95% 以上。此外，為了獲取各個原生種之分子標誌，以提供做為各種原鑑別之用，並能探討種原間的親緣關係及遺傳距離，以做為育種選拔及品種保護的參考，並可進一步闡釋蝴蝶蘭種原天然雜交的現象。因此，針對各原種蝴蝶蘭進行核酸分析，藉由分析核糖體核酸內轉錄間隔區，以及葉綠體 DNA

(chloroplast DNA, cp DNA) 的基因間隔區 (intergenic spacer, IGS)，以獲得各蝴蝶蘭種原的分子標誌，並經由序列比對及群叢分析，以瞭解各蝴蝶蘭種原間的親緣關係及遺傳距離。目前已完成各種原之 ITS 區域及葉綠體 DNA 之 trnL-trnF 基因的基因間隔區的分子標誌。

· 拖鞋蘭種原收集及核酸鑑定

拖鞋蘭是蘭花家族中奇特的成員之一，由於向下的兩片花瓣癒合成類似拖鞋的形狀因而得名。這一群的成員中共有四個屬，分別為巴菲爾鞋蘭(Paphiopedilum)，鬚拉密鞋蘭 (Phragmipedium)，喜普鞋蘭 (Cypripedium)，西麗妮鞋蘭 (Selenipedium)，其中巴菲爾鞋蘭的成員數量最多，也最適合台灣的生長環境，因此最具有發展潛力。巴菲爾鞋蘭主要分佈在亞洲、東南亞地區，成員約有 95 種。本場自民國 90 年起積極蒐集原種巴菲爾鞋蘭，目前已經收集約 80 種的原種巴菲爾鞋蘭，也針對這些原種拖鞋蘭進行核酸分析。經引子設計，目前已能利用聚合酵素連鎖反應 (PCR)，以及定序反應等方法，將核糖體核酸 (rDNA) 內轉錄間隔區 (ITS)，及葉綠體 DNA (cp DNA) 的基因間隔區之序列進行分析。已經完成各種原的 ITS 序列，以及葉綠體 DNA (cp DNA) 之 trnL-trnF 基因的基因間隔區，已能獲得各種原的分子標誌。經群叢分析，能探討種原間的親緣關係及遺傳距離。

· 石斛蘭種原收集及核酸鑑定

石斛蘭 (Dendrobium spp.) 是蘭科家族中成員眾多的一群，本屬共約有 800 種，主要分佈在熱帶、亞熱帶地區，台灣也有分佈，共約 12 種。石斛蘭這群植物的外部特徵變化多，花形、花色多樣化，莖、葉的變化亦相當多，是一種極具商業價值的蘭科植物。本場自民國 90 年起，開始蒐集石斛蘭種原，目前已經收集 140 種的原種石斛蘭。此外，也進一步分析各石斛蘭種原的分子標誌。經引子設計，目前已能利用聚合酵素連鎖反應 (PCR)，以及定序反應等方法，將核糖體核酸內轉錄間隔區，及葉綠體 DNA (cp DNA) 的基因間隔區之序列進行分析。已經完成各種原的 ITS 序列，初步已能獲得各種原的分子標誌。經群叢分析，並能探討種原間的親緣關係及遺傳距離。未來將進一步進行葉綠體 DNA 的基因間隔區 (IGS)，期能進一步探討石斛蘭天然雜交的現象，以提供未來石斛蘭育種的參考。

參、未來展望

台灣地區耕地面積小，生產成本高，因此適合發展高經濟價值農產品的農業型態。此外，為了因應國際自由貿易的競爭，提昇產品品質與開發本土品種為當前兩個重要的課題。本場生物技術的研究未來也會朝這兩個重點發展，除了持續發展作物組織培養，

以建立台灣種苗業的基礎外；也將積極與國內各研究機構及大專院校合作，利用基因轉殖技術，育成高附加價值轉基因作物品種，如抗蟲、抗病及抗殺草劑等作物品種的培育，以減少農藥的施用；或育成耐旱、耐寒、耐熱及耐重金屬等作物品種，以提升作物品種對環境的適應力。此外，也可以利用植物做為生物反應器，生產具高經濟價值的基因產物，如有用蛋白質、維生素、或動物用疫苗等，以提升作物的附加價值，增強未來農業的國際競爭力。