

ISSN 0255-5921

興大園藝

第四十五卷 第一期

百香果自交不親和性探討及克服策略之建立	陳盈君 林慧玲.....	1
1-MCP 對柳橙貯藏期間果皮褐化之影響	高瑩真 林慧玲.....	17
電阻抗式流式細胞儀分析花椰菜小孢子發育階段之應用	林柏穎 夏奇銳 黃三光.....	31
葡萄耐淹水根砧篩選	葉文彬 謝慶昌.....	47
臺灣低地栽培九華蘭生長調查	賴科竹 洪惠娟 張 正.....	57
蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體之構築	傳承泰 潘怡君 尤進欽 曾夢蛟.....	71
溶菌酶、天蠶素、乳鐵蛋白素及四氫嘧啶合成酶基因轉殖到 蝴蝶蘭葉綠體之研究	郭志鵬 馮潔雯 楊明德 陳俊麟 曾夢蛟.....	89

國立中興大學園藝學系編印

中華民國一〇九年三月

百香果自交不親和性探討及克服策略之建立

陳 盈 君¹⁾ 林 慧 玲²⁾

關鍵字：孢子體自交不親和、抗氧化酵素、切柱授粉

摘要：為探討百香果自交不親和性表現及克服其生殖障礙，進行花粉與柱頭型態觀察、花粉發芽力測試及柱頭可溶性蛋白及酵素含量分析。結果顯示黃色種百香果及墨西哥黃色種百香果具孢子體自交不親和性，'台農一號'百香果為自交親和，其花柱之總酚類化合物、可溶性蛋白及總游離胺基酸含量皆高於不親和性的墨西哥黃色種；經自交授粉 10 分鐘後，'台農一號'百香果花柱之過氧化氫酶 (CAT) 及抗壞血酸過氧化物酶 (APX) 活性皆下降，其中 CAT 活性則在自花授粉 60 分鐘有增加的趨勢，經槲皮素處理後授粉花柱，其內含 CAT 活性下降而 APX 活性增加；墨西哥黃色種百香果柱頭授粉後 10 分鐘，無論是否經槲皮素處理，其 CAT 活性皆增加，但 APX 活性則是授粉後先下降而後再上升，推測此些反應與細胞程序性凋亡有關。切除墨西哥黃色種百香果柱頭頂端細胞後行自花授粉，可獲得成熟果實及種子，此些種子發芽長成植株於田間栽培開花後，再行切柱處理同樣可獲得自交種子，顯示此技術為克服百香果自交不親和障礙的可行性策略。

前 言

百香果屬於西番蓮科 (Passifloraceae) 西番蓮屬 (*Passiflora*) 植物，為臺灣夏秋兩季重要果品之一，果實供鮮食及加工之用，主要栽培品種為'台農一號'百香果。為避免毒素病蔓延以及莖腐病感染造成產量下降，目前採每年更新無病毒健康嫁接苗之栽培模式，依據農業委員會農業統計資料，百香果至 2017 年總栽培面積達 680 公頃，總產量增加至 11,547 公噸，所需種苗數量約為每年 80 萬株。'台農一號'百香果種苗外銷量自 104 年開始快速增加，至 2017 年種苗出口量超過 800 萬株，主要出口國家為越南、中國大陸及泰國 (莊和江，2019)。由此可見，無病毒健康嫁接苗生產為百香果產業之發展關鍵。嫁接苗生產除了

1) 國立中興大學園藝系博士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

需要木品台農一號木品百香果無病毒接穗之外，亦包括作為砧木用的種子苗，最常用的砧木品種為黃色種百香果 (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)，具有耐莖腐病之特性，但具自交不親和特性，需以異花授粉方式生產種子。

植物自交不親和性 (Self-incompatibility, SI) 為自然界植物維持其基因多樣性的重要生殖過程，藉此遺傳特性避免自交弱勢。自交不親和性主要分為兩類：配子體自交不親和 (gametophytic self-incompatibility, GSI) 及孢子體自交不親和 (sporophytic self-incompatibility, SSI)。茄科 (Solanaceae)、薔薇科 (Rosaceae) 及玄蔘科 (Scrophulariaceae) 屬於配子體自交不親和；十字花科 (Brassicaceae) 則為典型孢子體不親和性植物 (Takayama and Isogai, 2005)。十字花科藉由自我識別機制 (self-recognition mechanism)，與柱頭具有相同 S-haplotype 花粉被柱頭辨識並發生而專一性交互作用，導致本身花粉被排斥而產生自交不親和現象 (Fujii *et al.*, 2016)。關於百香果自交不親和性之控制機制，多篇研究提出見解及證據。*Passiflora cincinnata* 被鑑定具孢子體自交不親和性，研究提出其存在一個基因座含有 5 個 S-等位基因控制此項特性 (Ho and Shii, 1986)，以及具有 3 個與自交不親和相關的等位基因 (S1、S2 及 S3)，並認為應存在更多數量的等位基因 (Bruckner *et al.*, 1995)。黃色種百香果則被鑑定出具有 6 個 S-等位基因 (S1 至 S6)，由 2 個基因座所控制 (Rêgo *et al.*, 1999)。黃色種百香果授粉後，其花粉管伸長至花柱頂端 1/3 處前停止生長，伴隨無定向生長、花粉管壁變薄及花粉管前端腫脹等現象出現，認為百香果同時存在配子體及孢子體自交不親和性 (Rêgo *et al.*, 2000; Suassuna *et al.*, 2003)。Duarte 等 (2014) 針對巴西地區 5 種原生西番蓮屬植物進行生殖生物學研究，經 4 種授粉試驗 (套袋自花授粉、人工自花授粉、人工異花授粉及自然開放授粉)，結果顯示，*P. cincinnata* 及 *P. tricuspis* 具自交不親和性。

添加百香果開花當天之柱頭萃取液至培養基，抑制 4 個參試黃色種百香果花粉體外發芽 (卓等, 008)；*P. caerulea* 柱頭萃取液加入培養基使其發芽率由 54% 降至 35.7%，具自交親和性的紫色種百香果之柱頭萃取液則可使離體花粉發芽率由 49.1% 顯著提高到 89%，結果顯示柱頭組織所含發芽誘導因素及物質，對於花粉體外發芽呈抑制或促進效應，受種質本身不親和系統所影響 (李等, 1989)。近年來藉由細胞學及分子生物學證據，證實西番蓮屬植物屬於孢子體自交不親和性。黃色種百香果 2 個商業品種之不親和性花粉接觸柱頭後，花粉表面及花粉管細胞壁迅速累積沉澱胼胝質，柱頭細胞及引導組織細胞胞器無組織化，產生多量大液胞而後引發細胞程序性凋亡，造成花粉管在柱頭便無法萌發；並透過蛋白質序列分析篩選到 564 bp 大小片段，經序列比對顯示此片段與歐洲大葉楊 S-receptor kinase gene (SRK) 蛋白質序列、大星牽牛 SLG (S-locus glycoprotein) 蛋白質序列以及油橄欖 SRK 與 SLG 之蛋白質序列皆具有高度相似性，證實其屬於孢子體自交不親和性 (Madureira *et al.*, 2014)。

莖苔屬植物為典型孢子體自交不親和性植物，蕾期授粉為目前主要克服此項障礙的技術，其他技術包括高溫處理、電刺激、CO₂ 處理、混合花粉處理、鋼刷授粉及 γ 射線輻射

等物理、生物學及機械方法 (劉等, 2009; 周, 2004), 但此些方法易對柱頭造成直接傷害或是操作流程較為繁瑣; 利用化學藥劑來抑制柱頭分泌之醣蛋白以降低其對不親和性花粉辨識能力, 進而達到克服自交不親和性之目的, 被認為效果與蕾期授粉相近, 但較為節省人力, 已被提出的藥劑包括植物生長調節劑、植物凝集素、氯化鈉加上硼酸溶液及槲皮素 (quercetin) 等 (周, 2004; 劉等, 2009)。目前以鹽水加上硼酸之溶液於開花前 1-2 天噴施甘藍花苞 (曹和王, 1998; 周, 2004; 劉等, 2009; 周等, 2009) 或是於蕾期 (開花期兩週) 每日噴施 500-1500 μmol 槲皮素皆可提升自交不親和性的親和指數 (呂等, 2001; 周, 2004; 李等, 2005)。槲皮素是一種具有生物活性的天然黃酮類化合物, 作為蛋白激酶抑制劑可有效抑制 SRK 活性, 因而關閉自交不親和性的信號傳導, 使甘藍自交不親和性受阻, 進一步促進花粉發芽而順利受精形成種子 (吳, 2004)。

西番蓮屬植物之自交不親和性研究主要針對其現象及機制加以探討, 但對於克服此項障礙的技術進展較慢。黃色種百香果透過蕾期授粉或重複授粉, 其著果率由 0% 提高至 10-16.67% (Rêgo *et al.*, 2013) 或是 14.8% (Bruckner *et al.*, 1995)。以 2,4-D 處理可促進子房膨大, 但無法促使受精 (Ho and Shii, 1986)。Rêgo 等人 (2000) 研究顯示黃色種百香果蕾期授粉並經後裔篩選及回交等篩選可獲得具親和性品系 (BG), 其花粉接觸柱頭 30 分鐘後便可發芽, 60 分鐘進入至輸導組織, 授粉後 12 小時受精, 並形成連續性胚體。卓等 (2008) 則以蕾期授粉觀察到有 1 個黃色種雜交品系花粉可發芽, 但未調查胚珠受精率。2 種百香果基因型 (M7 及 N9) 於蕾期授粉、開花當日及開花當日切柱授粉以比較其著果率, 結果以開花當日、開花前 1 小時除雄套袋, 開花時切除約 1.5 mm 柱頭組織, 於 13 時及 17 時此 2 時段重複授粉, 7 天後平均著果率可提高至 81.94% (de Lira Júnior *et al.*, 2016)。

本研究目的為探討西番蓮屬植物自交不親和性之機制, 並擬定簡便且有效之克服策略以提高結實率及種子數, 將可應用於砧木種子生產。

材 料 和 方 法

一、植物材料

花粉與柱頭型態觀察以 '台農一號' 百香果、黃色種百香果及墨西哥黃色種百香果當日開放花朵為材料; 柱頭總可溶性蛋白及酵素含量分析則以 '台農一號' 百香果及墨西哥黃色種百香果之一年生成熟植株為材料, '台農一號' 百香果具自交親和性, 墨西哥黃色種百香果則為自交不親和。

二、花粉與柱頭型態觀察及花粉發芽力測試

(一) 掃描式電子顯微鏡觀察

樣品處理及操作流程參考 Chang 等 (2005) 之方法。採集百香果當日開放花朵之花粉及柱頭, 加入含有 2.5% 戊二醛 (Sigma-Aldrich Co., USA) 磷酸緩衝溶液 (0.1 M, pH 7.0) 之固定液, 於 5 °C 黑暗環境進行樣品固定 2 hr, 再以磷酸緩衝液清洗 3 次後, 經酒精-丙酮

序列脫水。樣品以超臨界乾燥機 (HPC-2 Critical Point Dryer, Hitachi, Japan)處理至完全乾燥、以鍍膜儀 (E-1010 ION SPUTTER, Hitachi, Japan)鍍金，於掃描式電子顯微鏡 (S-3500N, Hitachi, Japan)觀察型態並拍照記錄。

(二) 石蠟切片

切取百香果花柱置入固定液 (50%酒精：醋酸：福馬林=18：1：1, v/v/v)，抽氣固定 30 min，靜置 12 hr 以上。樣品以 50%酒精清洗 3 次、以三級丁醇 (t-butanol；TBA)序列脫水，移入 60°C 烘箱 (Firstek, Taiwan)中進行滲蠟 (McCormick 501006)，樣品於室溫下包埋成蠟塊，以轉動式切片機 (LEICA, RM2235, Germany)進行切片，切片厚度為 8 μ m。蠟條固定於載玻片上，以二甲苯處理脫臘 30 min，再經 100%、95%、70%及 50%酒精序列濃度各浸泡 3 min，1% Safranin O 染色 1 hr，再以 50%、70%及 95%酒精浸泡 3 min，以 0.5% Fast Green 染色 5-10 sec，將樣品浸泡於 100%酒精與二甲苯各 6 min，擦拭多餘之二甲苯，蓋上蓋玻片以封片膠 (Entellan, Merck)封片，40°C 烘箱 (Venticell, UK)烘乾，以光學顯微鏡 (Axioskop2, ZEISS, Germany)觀察並拍照紀錄 (CCD 影像系統, Prog Res MF scan, Germany) (蔡，2012)。

(三) 花粉發芽力測試-花粉體內發芽

花朵開放當天進行自花授粉，並於授粉後 1 小時切取子房及花柱，置入上述 (二)固定液並抽氣固定，靜置隔夜；以蒸餾水清洗數次，加入 3 N NaOH 於 60°C 軟化 2 hr；蒸餾水清洗數次，將子房夾出放置於載玻片上，並滴上適量含 2%甘油之 0.1% 苯胺藍 (aniline blue)，以蓋玻片將子房壓扁；置於黑暗環境下染色 1-4 hr (de Groot *et al.* 2004；Chiu *et al.*, 2011)。以螢光顯微鏡 (Axioskop2, ZEISS, Germany)觀察並以 CCD 影像系統拍照。

三、柱頭可溶性蛋白、總酚類化合物、總游離胺基酸及酵素活性分析

選取當日開花花朵之柱頭 (對照組)、自花授粉後柱頭 (包括未經槲皮素處理、甲醇處理及 3000 μ M 槲皮素處理 15 sec，風乾 10 min)為供試材料，槲皮素處理後 10 分鐘、30 分鐘及 60 分鐘，分別剪取柱頭樣品以封口袋分裝，以 6-7 個花柱 (約 0.4-0.6g)為 1 樣品，暫放在含有碎冰的冰桶中，送至實驗室以電子天平秤重，液態氮處理後，保存於-20°C 冰箱。

(一) 可溶性蛋白含量 (soluble protein, SP)測定

參考修正 Lowry 等 (1951)之方法製備樣品。加入 5 mL 磷酸緩衝溶液 (0.1 M, pH7.0) 及適量海砂至花柱樣品，於冰浴中以研鉢研磨，於 4°C 以 20000 $\times$ g 高速離心(RC5C, Sorvall, U.S.A)20 min，濾布 (Miracloth, Merck)過濾後，取上清液參考吳 (2013)方法進行分析。吸取 0.1 mL 萃取液稀釋至 2 mL，加入 5 mL 試劑 A (2 公克 Na₂CO₃、1 mL 2% K₂C₄H₄O₆、1 mL 1% CuSO₄·5H₂O、10 mL 1N NaOH、90 mL H₂O)，震盪均勻後靜置 10 min，加入 0.5 mL 試劑 B (Folin-Ciocalteus phenol reagent：H₂O=1：1)後，同樣震盪均勻並靜置 30 min，以酵素免疫分析測讀儀 (BMG LABTECH, FLUOstar Omega Ω , Germany)測定 660 nm 波長下之吸光值，標準曲線以 0.25 mg·mL⁻¹ BSA 配製，並計算其總可溶性蛋白質含量。

(二) 總酚類化合物 (total phenolic compound, TPC)含量

樣品萃取方法同上述 (一)，依據 Keith 等 (1958) 方法進行分析。吸取 0.2 mL 萃取液以純水稀釋至 1 mL，加入 0.1 mL Folin-Ciocalteus phenol reagent、0.2 mL 之 20% Na_2CO_3 、8.7 mL 去離子水，震盪均勻以沸水煮 3 min 後取出冷卻。隨後以酵素免疫分析測讀儀測定各樣品於 660 nm 波長下之吸光值，標準曲線則以 100 ppm caffeic acid 配製。總酚類化合物含量計算公式： $\text{TPC 含量 } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}) = \text{吸光值 (ppm)} \times 5 (\text{稀釋倍數}) \times 5 (\text{mL}) \div \text{g (鮮重)}$ 。

(三) 總游離胺基酸 (total free amino acid, FAA) 濃度測定

樣品萃取方法同上述 (一)，參考 Rosen (1957) 方法進行分析。吸取 0.2 mL 萃取液稀釋至 1 mL，再加入 1 mL ninhydrin reagent ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ninhydrin、 $95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、 $43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_3 、 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fructose) 均勻震盪後，以沸水煮 10 min 後取出冷卻，再加入 5 mL color diluents (2 g KIO_3 以 600 mL 去離子水完全溶解後，以 95% 酒精定量至 1 L)，混合均勻以酵素免疫分析測讀儀測定各樣品 570 nm 波長之吸光值。標準曲線以 1 mM α -alanine 配製。

(四) 過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性測定

參考吳 (2013) 之方法進行樣品萃取，再依據 Kato 及 Shimizu (1987) 步驟分析。每樣品包括 6-7 個花柱，加入 5 mL 含有 1 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM polyethylene glycol (PEG-6000)、0.1 mM EDTA 之磷酸緩衝溶液 (pH 7.8)、0.1 g polyvinylpyrrolidone (PVPP) 及適量海砂於冰浴中研磨，於 4°C 以 $20000\times g$ 離心 20 min，樣品經濾布過濾後，吸取 20 μL 上清萃取液，依序加入 260 μL 之 100 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0) 及 20 μL 之 50 mM H_2O_2 隨即開始反應。酵素免疫分析測讀儀測定各樣品於 240 nm 波長、1 分鐘內之吸光值變化，為酶萃取液 ΔA_{240} 。空白組以 20 μL 之萃取緩衝溶液代替酶萃取液進行測定。反應產物消光係數為 $40 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，CAT 活性單位 (unit) 表示每分鐘消耗 1 μmol 的 H_2O_2 。

(五) 抗壞血酸過氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 活性測定

參考上述方法 (五) 製備樣品，依據 Nakano 及 Asada (1981) 方法進行分析。吸取 10 μL 萃取液，依序加入 150 μL 之 150 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0)、100 μL 之 1.5 mM ascorbate、40 μL 之 0.75 mM EDTA，最後加入 50 μL 之 6 mM H_2O_2 隨即開始反應。酵素免疫分析測讀儀測定各樣品於 290 nm 波長、1 分鐘內之吸光值數值，為酶萃取液 ΔA_{290} 。空白組以 10 μL 之萃取緩衝溶液代替酶萃取液進行測定。反應產物消光係數為 $2.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，APX 活性單位 (unit) 表示每分鐘消耗 1 μmol 的 ascorbate。

四、授粉障礙之克服

西番蓮屬植物具有孢子體自交不親和性，應用化學藥劑處理柱頭擾亂其分泌的糖蛋白，抑制其對不親和花粉的辨識作用；或是直接以切柱處理阻斷柱頭與花粉間的辨識作用，為可開發之方向。

(一) 槲皮素處理

以墨西哥黃色種百香果及 '台農一號' 百香果為材料，於花朵開放當日摘除花藥，將柱頭浸泡於 750、1500、3000 μM 槲皮素溶液 10 秒，風乾 10 分鐘後進行人工自花授粉，觀察後續著果比例。

(二)切柱處理

以墨西哥黃色種百香果當日開花之花朵為材料，切除柱頭頂部組織進行自花授粉，觀察後續著果比例。成功著果之果實所獲得之種子於溫室進行播種，調查其後續生長與開花型態。

結果與討論

一、花粉與柱頭型態觀察及花粉發芽力測試

為進行授粉試驗，針對百香果柱頭及花粉進行基礎觀察。百香果柱頭為乾式柱頭，不具有黏液，石蠟切片及電子顯微鏡結果皆顯示柱頭表面之絨毛細胞排列整齊緊密，呈長柱狀，為花粉接觸柱頭時最先產生反應的區域 (圖 1a, b)。3 種百香果花粉外壁之花粉長度介於 60-70 μm 之間，以黃色種百香果花粉表面花紋較為緊密 (圖 1c, 1d, 1e)。

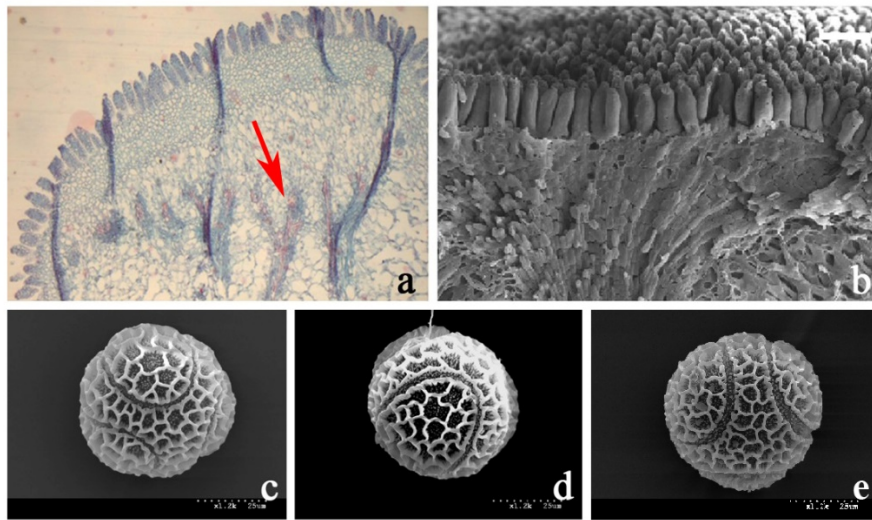


圖 1. 黃色種百香果柱頭細胞排列及 3 種百香果花粉型態。

a-b. 黃色種百香果柱頭之細胞排列及 Y 型輸導組織 (如圖中箭頭所示). c. 黃色種花粉表面型態. d. 台農一號百香果花粉表面型態. e. 墨西哥黃色種百香果花粉。Scale bars: 56.1 μm (a), 30.6 μm (b), 19.3 μm (c), 19.3 μm (d), 18.6 μm (e)。

Fig. 1. The cell pattern of stigma in yellow passion fruit and pollen morphology in 3 kinds of passion fruit.

a-b. Papillae cells and funnel-like pattern of transmitting tissue in yellow passion fruit. c-e. Surface morphology of pollen in yellow passion fruit (c), 'Tainung No.1' passion fruit (d), and *P. edulis* f. *flavicarpa* 'Mex' (e). Scale bars: 56.1 μm (a), 30.6 μm (b), 19.3 μm (c), 19.3 μm (d) and 18.6 μm (e).

前人研究以 ^{35}S -甲硫胺酸偵測柱頭上之絨毛細胞，證實其為合成 S 專一性醣蛋白主要位置，即為柱頭細胞辨識花粉親和性的主要區域，且成熟柱頭才有顯著的醣蛋白產生 (Nasrallah *et al.*, 1985; 卓, 1990)。百香果柱頭絨毛外壁具有附著物及色體。百香果花粉表面具有花紋，花粉外壁含有多量的親脂性物質 (lipophilic substances)，其中 pollenkit 及 tryphine 可能直接參與柱頭辨識親和或不親和花粉的過程 (許和何, 1985; Soares *et al.*, 2013)。

黃色種百香果自花授粉 1 小時，極少部分花粉管可順利生長穿透柱頭頂端絨毛細胞，部分花粉管花粉管伸長但頂端不正常皺縮或腫脹 (圖 2)。台農一號百香果具自交親和特性，其授粉後花粉管則可順利穿透絨毛細胞並伸長至輸導組織。試驗結果顯示，百香果歸屬於孢子體自交不親和性，與前人研究結果相符 (Ho and Shii, 1986; Suassuna *et al.*, 2003; Madureira *et al.*, 2014)。

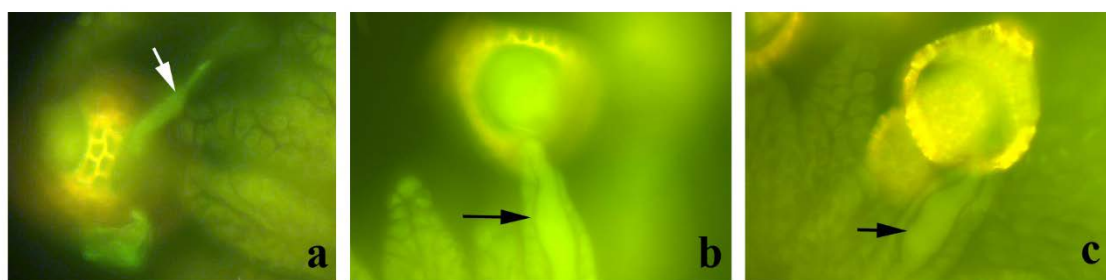


圖 2. 黃色種百香果自花授粉 1 小時後，花粉管於柱頭細胞發芽及生長情形。

a. 花粉管伸長但頂端不正常皺縮; b-c. 花粉管伸長未達花粉長度的兩倍以上，頂端腫脹。Scale bars: 25.4 μm (a), 22.6 μm (b), 20.3 μm (c)。

Fig. 2. Pollen *in vivo* germination and growth on stigma after 1 hr of self-pollination in yellow passion fruit.

a. The pollen tube elongated but the tip is shrunk. b-c. Pollen tube elongated less than twice of the length of pollen, and the top of tube is swollen. Scale bars: 25.4 μm (a), 22.6 μm (b), 20.3 μm (c).

以'台農一號'百香果及黃色種百香果為材料，進行授粉及槲皮素處理。'台農一號'百香果單花柱未授粉且未處理槲皮素，其 TPC、SP 與 FAA 含量皆最高，經槲皮素處理則 3 種含量皆降至最低。柱頭經自交授粉 10 分鐘後，3 種含量皆顯著降低，而後含量增加至與未授粉處理無差異；槲皮素處理授粉後 30 及 60 分鐘，TPC 及 SP 含量增加，FAA 含量則未顯著提高 (表 1)。墨西哥黃色種百香果單花柱之 TPC 含量則是以未授粉、槲皮素處理達 833.5 μg ，顯著高於甲醇處理與自交授粉 60 分鐘；單花柱 SP 以未授粉、槲皮素處理之含量最高，顯著高於甲醇處理及自交授粉 10 分鐘；以授粉與否進行比較，墨西哥黃色種百香果單柱頭 FAA 含量授粉前後並無

顯著差異，但經槲皮素處理後，自花授粉 10 分鐘後 FAA 含量最高，而後含量無明顯變化 (表 2)。比較 2 品種之差異，具自交親和性的'台農一號'百香果花柱之 TPC、SP 及 FAA 含量皆高於不親和性的墨西哥黃色種百香果。呂等人 (2010)研究美女櫻的雄不育性品系與可育性品系花器官發育過程的生理生化指標，結果顯示不育性品系花苞發育過程中的可溶性蛋白量及游離脯氨酸含量較低，指出可溶性蛋白內含的酵素與代謝調節物質對花藥及小孢子生長發育具關鍵作用，游離脯氨酸則提供充足能量和物質促進小孢子發育，此些物質的缺乏可能是導致花粉敗育的原因。鬱金香花柱可溶性蛋白質含量則是自交授粉含量高於雜交授粉 (王等，2010)。黃花菸草授粉前柱頭之游離胺基酸含量高於授粉後 (康等，2013)。木荷自交授粉之總量氨基酸高於異交授粉，且自交授粉子房內精氨酸(Arg)含量顯著較高，認為其為多胺生合成的前驅物，與木荷自交親和性有關 (楊，2017)。

表 1. '台農一號'百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之總酚類化合物、可溶性蛋白及總游離胺基酸變化。

Table 1. Contents of Total phenolic compounds (TPC), soluble protein (SP) and total free amino acid (FAA) of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in 'Tainung No. 1' passion fruit.

Treatment ^z	TPC/one stigma+style (µg)	SP/one stigma+style (mg)	FAA/one stigma+style (µmole alanine)
No pollination, no quercetin	593.0 a	4.0 a	6.9 a
Self-pollination for 10 min	464.9 bc	3.2 bc	4.2 bc
Self-pollination for 60 min	525.8 ab	3.7 ab	5.6 ab
3000 µM Q, 15 sec, no pollination	358.2 c	2.6 c	3.3 c
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	516.6 ab	3.7 ab	4.6 bc
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	542.7 ab	3.5 ab	4.9 bc

^z Three repeats per treatment. Quercetin (Q) treatment: stigmas were dipped into 3000 µM quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand.

表 2. 墨西哥黃色種百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之總酚類化合物、可溶性蛋白及總游離胺基酸變化。

Table 2. Contents of total phenolic compounds (TPC), soluble protein (SP) and total free amino acid (FAA) of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex'.

Treatment ^z	TPC/one stigma+style (μg)	SP/one stigma+style (mg)	FAA/one stigma+style (μmole alanine)
No pollination, no quercetin	656.1 abc	3.6 abc	7.4 ab
Self-pollination for 10 min	678.5 abc	3.2 bc	6.5 b
Self-pollination for 30 min	720.2 abc	3.5 abc	6.5 b
Self-pollination for 60 min	633.7 bc	3.5 abc	6.8 ab
Methanol, no pollination	548.7 c	2.9 c	6.0 b
3000 μM Q, 15 sec, no pollination	774.17 ab	3.7 abc	6.4 b
3000 μM Q, 15 sec, self-pollination for 10 min	833.5 a	4.5 a	9.9 a
3000 μM Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	673.6 abc	3.6 abc	7.8 ab
3000 μM Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	678.4 abc	4.1 ab	7.4 ab

^z Three repeats per treatment. Quercetin treatment: stigmas were dipped into 3000 μM quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand.

近年來，植物自交不親和性被認為與活性氧類物質 (reactive oxygen species, ROS)及一氧化氮 (nitric oxide, NO)引發細胞程序性凋亡 (programmed cell death, PCD)有關 (Serrano *et al.*, 2015)。本研究結果顯示'台農一號'百香果自花授粉 10 分鐘後，2 種酵素活性皆下降，其中 CAT 活性在自花授粉 60 分鐘有增加的趨勢；經槲皮素處理後授粉花柱，其內含 CAT 活性下降，APX 活性

則增加 (表 3)。墨西哥黃色種百香果柱頭授粉後 10 分鐘，無論是否經槲皮素處理，其 CAT 活性皆增加；但其 APX 活性則是授粉後先下降，而後再上升 (表 4)。

ROS 為花粉在柱頭萌發與花粉管在柱頭及花柱內生長的信號物質，累積 ROS 促使花粉管肌動蛋白 (actin)細胞骨架結構之瓦解，因而抑制花粉管生長 (Pasqualini *et al.*, 2015)。橄欖 (*Olea europaea*)不親和性花粉接觸柱頭，花粉內 H_2O_2 含量降低，花粉管內 NADPH oxidases 及 peroxidase (POD)作用使 O_2^- 增加，同時 NO 亦增加，促使 ONOO $^-$ 含量提高而誘發 PCD，最終使花粉管萎縮死亡。該研究並提出花粉 H_2O_2 含量降低可能與 CAT 及 APX 有關 (Serrano *et al.*, 2012)。本研究中具自交不親和性之墨西哥黃色種百香果，經授粉後其 CAT 與 APX 活性皆增加，與前人研究提出之推論相同，但仍待進一步探討。

表 3. '台農一號'百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之 CAT 及 APX 之活性表現。

Table 3. Activity of CAT and APX of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in 'Tainung No. 1' passion fruit.

Treatment ^z	CAT		APX	
	unit·g ⁻¹ ·FW	unit·mg ⁻¹ protein	unit·g ⁻¹ ·FW	unit·mg ⁻¹ protein
No pollination, no quercetin	0.88	0.020	8.42	0.191
Self-pollination for 10 min	0.62	0.012	3.11	0.061
Self-pollination for 60 min	1.54	0.032	5.24	0.109
3000 μ M Q, 15 sec, no pollination	0.77	0.016	4.91	0.104
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	0.65	0.012	7.44	0.141
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	0.58	0.012	8.30	0.166

^z Three repeats per treatment. Quercetin treatment: stigmas were dipped into 3000 μ M quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand.

表 4. 墨西哥黃色種百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之 CAT 及 APX 之活性表現。

Table 4. Activity of CAT and APX of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex'.

Treatment ^z	CAT/one stigma+style (unit)	APX/one stigma+style (unit)
No pollination, no quercetin	0.009	0.169
Self-pollination for 10 min	0.018	0.592
Self-pollination for 30 min	0.010	0.309
Self-pollination for 60 min	0.015	0.400
Methanol, no pollination	0.030	0.054
3000 μ M Q, 15 sec, no pollination	0.010	0.533
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 10 min	0.064	0.031
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	0.016	0.309
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	0.006	0.655

^z Three repeats per treatment. Quercetin treatment: stigmas were dipped into 3000 μ M quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand. The shown data was one of those three experiments.

由於墨西哥黃色種百香果經槲皮素處理未能克服其自交障礙，切除柱頭頂端細胞則可使子房膨大，部分著果至 2-3 周掉落，處理 8 周後獲得 1 個成熟果實（圖 4 a-d），假種皮橘黃色，果重 92 公克（圖 4 e），共收穫 105 粒種子（圖 4 f），冷藏保存於 5°C，8 周後播種於培養土中，2 周後順利發芽，發芽率達 90%（圖 4 g-h）。種子苗移至田間栽培，花芽順利形成且花朵型態正常（圖 4 j-k），再次進行切柱自花授粉，順利克服自交不親和障礙獲得自交果實及種子（圖 4 l-m）。由本研究試驗結果顯示，切除柱頭頂端細胞可用以克服百香果自交不親和障礙，操作較為簡便，仍須配合適宜栽培管理避免落果。

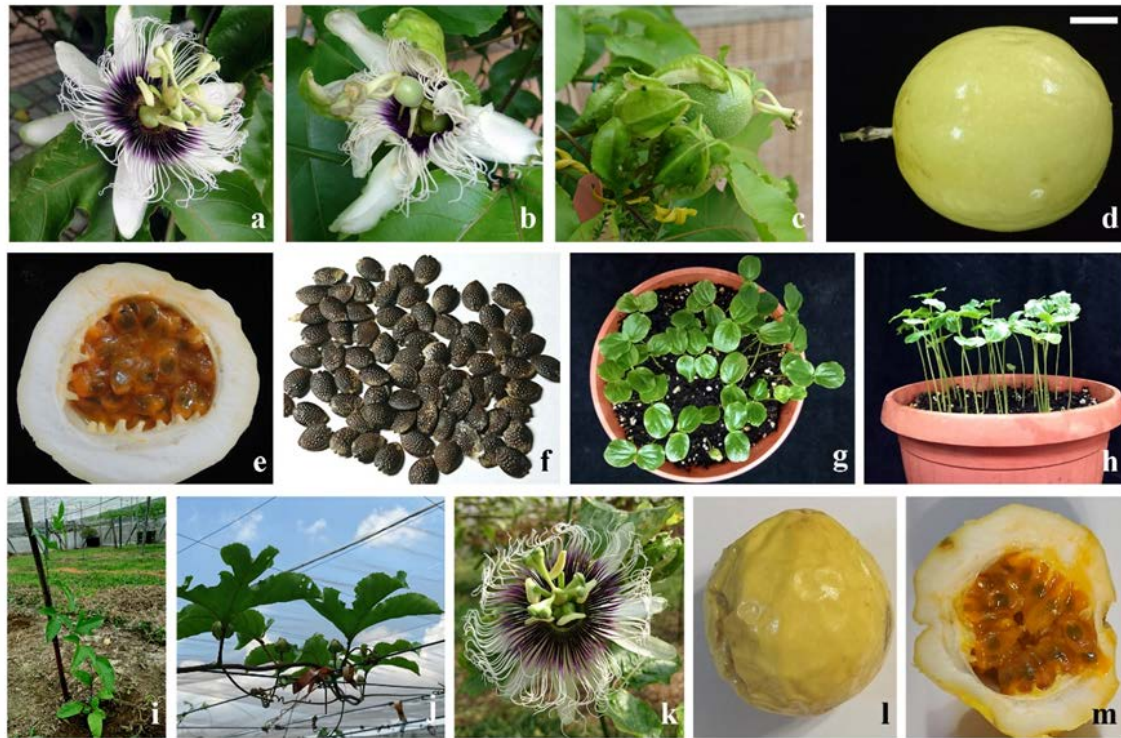


圖 4. 墨西哥黃色種百香果切柱授粉著果、果實發育、自交種子發芽、種子苗生長發育及再次切柱授粉結果。

a. 墨西哥黃色種百香果花朵型態; b-c. 切柱處理後行自花授粉，果實發育; d. 切柱處理自花授粉 8 週後果實成熟，果形圓，果色呈淡黃色; e. 假種皮呈橘紅色，具香氣; f. 種子型態; g-h. 種子於 5°C 冷藏 8 周後，播種於培養土 2 週後種子發芽型態; i. 種子苗田間栽培; j-k. 花芽形成與花朵型態; l-m. 果實及內部種子型態。Scale bars: 1.3 cm (a), 1.3 cm (b), 1.5 cm (c), 1.6 cm (d), 1.4 cm (e), 6 mm (f), 3.1 cm (g), 3.1 cm (h), 15.0 cm (i), 5 cm (j), 1.3 cm (k), 1.5 cm (l), 1.2 cm (m).

Fig. 4. The fruit set, development and inbred seeds germination from cut-column pollination technology in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex'.

a. Flower morphology. b-c. Fruit developed successfully after cut-column and self-pollination. d. After 8 weeks of self-pollination, the mature fruit is round in shape and pale-yellow in color. e. The aril is orange-red, with aroma. f. Seed type. g-h. Seeds were stored for 8 weeks at 5°C, sown in soil, and germinated in 2 weeks. i. Seedling was cultivated in field. j-k. Flower-buds formed and flower opened. l-m. Fruit appearance and seed morphology. Scale bars: 1.3 cm (a), 1.3 cm (b), 1.5 cm (c), 1.6 cm (d), 1.4 cm (e), 6 mm (f), 3.1 cm (g), 3.1 cm (h), 15.0 cm (i), 5 cm (j), 1.3 cm (k), 1.5 cm (l), 1.2 cm (m).

結 論

百香果為西番蓮屬植物，此屬包含 576 種原種，種原豐富多樣為良好育種材料，然本屬已被報導多數具有孢子體自交不親和性，黃色種百香果同樣具有此特性，也因此無法產生自交種子，在作為砧木材料時須開放授粉以獲得種子，品質不易控制。本研究以切柱處理克服自交不親和障礙，獲得自交種子，此些種子發芽長成植株於田間栽培開花後，進行切柱處理同樣可獲得自交種子，結果顯示此技術為克服百香果自交不親和障礙之可行性策略。

參 考 文 獻

- 王彩霞、歐陽彤、姜彥成、樂啟福。2010。鬱金香授粉後雌蕊生理生化變化的初步研究。林業科學研究 23(4): 622-625。
- 吳庭嘉。2013。溫湯及蒸熱聯合處理對‘臺農二號’番木瓜果皮轉色、抗氧化物含量及抗氧化酶活性之影響。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。62 pp。
- 吳能表。2004。甘藍自交不親合性引起的蛋白質磷酸化及其相關特徵研究。西南農業大學博士學位論文。69 pp。
- 呂俊、朱利泉、王小佳。2001。利用蛋白激酶抑制劑和激活劑調控甘藍自交不親和性。園藝學報 28(3): 235-239。
- 呂清璐、沈向群、汪玉、史湘華。2010。美女櫻雄性不育系與可育系花器官發育過程中生理生化指標的比較分析。江蘇農業科學 3: 221-223。
- 李成瓊、周慶紅、宋洪元、任雪松、司軍、吳能表。2005。槲皮素對甘藍自交不親和性及 SRK 活性的影響。園藝學報 32(5): 878-880。
- 李紅曦、許圳塗、李金龍。1989。聚乙二醇對百香果花粉體外發芽之影響。中國園藝 35(2): 21-130。
- 卓俊銘、許圳塗、曾夢蛟。2008。百香果自交不親和性與花粉發芽之研究。興大園藝 33(1): 41-52。
- 卓俊銘。1990。百香果自交不親和性及其柱頭與花柱蛋白質合成之研究。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。106 pp。
- 周慶紅、曾勇軍、楊演貴、李成瓊。2009。鹽硼溶液克服甘藍自交不親和性研究。種子 28(12): 48-51。
- 周慶紅。2004。化學方法克服甘藍自交不親和性及其機理研究。西南農業大學碩士學位論文。60 pp。
- 康洪梅、廖菊鈞、龍春瑞、代瑾然、馬文廣、索文龍、姚恆、王建光、陳穗雲。2013。黃花菸草授粉前後雌蕊生理生化變化研究。華南師範大學學報 45(3): 95-98。

- 曹必好、王遠歐。1998。克服甘藍自交不親和性的探討。天津農業科學 4(1): 32-34。
- 莊凱恩、江秀娥。2019。臺灣百香果種苗產業拓展東南亞市場之策略。百香果產業新南向策略研討會專刊 p. 25-37。
- 許圳塗、何婉芬。1985。百香果柱頭型態及親和特性。中國園藝 31(1): 33-39。
- 農業委員會農業統計資料
<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>
- 楊漢波。2017。木荷繁殖生物學特性及種子園交配系統研究。中國林業科學研究院博士論文。143 pp。
- 蔡淑華。2012。植物解剖學。世界書局股份有限公司。台北。358 p。
- 劉璐、李成瓊、任雪松、宋洪元、司軍。2009。甘藍自交不親和性的化學控制。植物生理學通訊 45(11): 1137-1140。
- Bruckner, C. H., V. W. D. Casali, C. F. de Moraes, A. J. Regazzi, and E. A. M. da Silva. 1995. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). Acta Hort. 370: 45-57.
- Chang C., Y. C. Chen, and H. F. Yen. 2005. Protocorm or rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. Bot. Bull. Acad. Sinica 46: 71-74.
- Chiu, Y. T., C. S. Lin, and C. Chang. 2011. In vitro fruiting and seed production in *Erycina pusilla* (L.) N. H. Williams & M. W. Chase. Propagation of Ornamental Plants 11(3): 131-136.
- de Groot, P., K. Weterings, M. de Been, F. Witting, R. Hulzink, J. Custers, M. van Herpen, and G. Wullems. 2004. Silencing of the pollen-specific gene NTP303 and its family members in tobacco affects *in vivo* pollen tube growth and results in male sterile plants. Plant Mol. Biol. 55: 715-726.
- de Lira Júnior, J. S., C. H. Bruckner, and P. C. S. Carneiro. 2016. Method for overcoming the passion fruit self-incompatibility. Rev. Bras. Frutic. 38(4): e-477.
- Duarte, M. O., M. F. Alves, M. Yamamoto, S. M. Sano, A. A. A. Barbosa, and P. E. Oliveira. 2014. Self-sterility and self-fertility of *Passiflora* L. (Passifloraceae) in the Cerrado of central Brazil. Braz. J. Bot. 37(1): 61-68.
- Fujii, S., K. I. Kubo, and S. Takayama. 2016. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. Nat. Plants 2: 16130.
- Ho, W. F. and C. T. Shii. 1986. Incompatibility system in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). Acta Hort. 194: 31-38.
- Kato, M. and S. Shimizu. 1987. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: Phenolic-dependent
- Keith, R. W., D. L. Tourneau, and D. Mahlum. 1958. Quantitative paper chromatographic determination of phenols. J. Chromatogr. 1: 534-536.
- Lowry, D. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 1007-1012.

- Madureira, H. C., T. N. S. Pereira, M. D. Cunha, D. E. Klein, M. V. V. de Oliverira, L. de Mattos, and G. A. de Souza Filho. 2014. Self-incompatibility in passion fruit: cellular responses in incompatible pollinations. *Biologia* 69(5): 574-584.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase I spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Nasrallah, J. B., T. H. Kai, M. L. Golfberg, and M. E. Nasrallah. 1985. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* 318: 263-267.
- Pasqualini, S. M. Cresti, and C. Del Casino. 2015. Roles for NO and ROS signalling in pollen germination and pollen-tube elongation in *Cupressus arizonica*. *Biologia Plantarum* 59(4): 735-744.
- Rêgo, M. M., C. H. Bruckner, E. A. M. da Silva, F. L. Finger, and K. J. C. Pereir. 2000. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. *Theor. Appl. Genet.* 101: 685-689.
- Rêgo, M. M., C. H. Bruckner, E. A. M. da Silva, F. L. Finger, D.L. de Siqueira, and A. A. Fernandes. 1999. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. *Theor. Appl. Genet.* 98: 564-568.
- Rêgo, M. M., E. R. Rêgo, C. H. Bruckner, F. L. Finger, and W. C. Otoni. 2013. Overcoming self-incompatibility in passion fruit by double pollination in anthesis stage. *Acta Hort.* 1000: 533-536.
- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acid. *Arch Biophys.* 67(1): 10-15.
- Serrano, I., M. C. Romero-Puertas, L. M. Sandalio, and A. Olmedilia. 2015. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility. *J. Exp. Bot.* 66(10): 2869-2876.
- Serrano, I., M. C. Romero-Puertas, M. Rodríguez-Serrano, L. M. Sandalio, and A. Olmedilla. 2012. Peroxynitrite mediates programmed cell death both in papillar cells and in self-incompatible pollen in the olive (*Olea europaea* L.). *J. Exp. Bot.* 63(3): 1479-1493.
- Soares, T. L., O. N. de Jesus, J. A. D. Santos-Serejo, and E. J. de Oliveira. 2013. *In vitro* pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). *Rev. Bras. Frutic.* 35(4): 1116-1126.
- Suassuna, T. de M. F., C. H. Bruckner, C. R. de Carvalho, and A. Borém. 2003. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theor. Appl. Genet.* 106: 298-302.
- Takayama, S. and Isogai, A. 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467-489.

Strategy Development in Overcoming the Self-Incompatibility in Passion Fruit

Ying-Chun Chen¹⁾ Huey-Ling Lin²⁾

Key words: Sporophytic self-incompatibility, Antioxidant enzyme, Cut-column pollination

Summary

In order to investigate the self-incompatibility performance of passion fruit and to overcome its reproductive obstacles, pollen and stigma structure observation, *in vivo* pollen germination test and soluble protein and enzyme content in pistils were carried out. The results indicated that the yellow passion fruit and Mexican yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex') had sporophytic self-incompatibility. 'Tainung No.1' passion fruit was self-compatible, and its total phenolic compound, soluble protein and total free amino acid of pistil were higher than the incompatible Mexican yellow passion fruit. After self-pollination for 10 mins, the activity of catalase (CAT) and ascorbic acid peroxidation (APX) in pistil of 'Tainung No.1' passion fruit was decreased, but the activity of CAT increased at 60 mins from self-pollination. After treatment with quercetin, the CAT activity decreased and APX activity increased. After 10 mins of pollination of the Mexican yellow passion fruit, the CAT activity increased with or without quercetin treatment, but the APX activity decreased first after pollination and then increased. It is speculated that these reactions are related to programmed cell death. After excising the surface cells of the stigma of the Mexican yellow species, the self-pollination can be carried out to obtain mature fruits and seeds. These seeds germinated, growth and then then planted in the field, and the seeds can also be obtained by cut-column technology. As the results shown, this technique is a feasible strategy to overcome the self-incompatibility obstacle.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

1-MCP 對柳橙貯藏期間果皮褐化之影響

高 瑩 真¹⁾ 林 慧 玲²⁾

關鍵字：1-Methylcyclopropene (1-MCP)、柳橙、乙烯、呼吸率、褐化

摘要：以 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0 克安喜培粉劑 (1-MCP，有效成份為 0.43%，利統公司出品)混和 2 毫升純水置於 61 公升之密閉方形呼吸缸中，於室溫 (約 25°C) 下燻蒸柳橙 24 小時，調查果實貯藏於室溫條件 (約 25°C) 及 15°C 時之果實狀況。室溫環境下，1-MCP 處理果實之乙烯釋放率及呼吸率於貯藏期間迅速升高，並於出現高峰後下降，其果皮則伴隨乙烯及呼吸率上升而出現褐化之情形。以 0.5、1.0、2.0 克安喜培粉劑處理之柳橙於 15°C 貯藏時，其離子滲漏率顯著高於對照組，且部分果實果皮於貯藏 5 日後出現褐化症狀，11 日後全數果皮皆褐化，褐化指數介於 4.4 至 4.6。將 15°C 貯藏 3、5、7 日之 1-MCP 處理之柳橙果實取出於室溫回溫，其乙烯釋放率及呼吸率於回溫一天後達高峰，並於 5 天內迅速褐化腐爛。試驗結果顯示，1-MCP 處理誘導乙烯高峰，進而引起果皮傷害，並產生褐化現象。

前 言

一甲基環丙烯 (1-MCP, 1-Methylcyclopropene)，為環狀烯類化合物，化學式 C_4H_6 ，常溫常壓下為氣態，與乙烯結構相似 (Blankenship and Dole, 2003)，透過與乙烯受器 (ETR) 之不可逆之結合，阻斷乙烯與乙烯受器結合後所誘發之老化、後熟等一系列反應 (Blankenship, 2001)，因其化性與天然物質相近、不具毒性、極低濃度下即有活性且殘留因具化性與天然物質相近、不具毒性等優點 (E.P.A, 2002)，使 1-MCP 成為現今商業上廣泛應用之乙烯作用抑制劑。但 1-MCP 處理之效果常因作物種類、品種及採收成熟度等而有差異，藥劑施用量、處理時間、溫度等皆影響 1-MCP 之效果，且三者間存在交互關係 (Blankenship and Dole, 2003)。

1) 國立中興大學園藝系碩士班學生。

2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

柑橘於植物學上之界定為芸香科 (Rutaceae) 柑桔亞科 (Aurantioideae) 柑桔屬 (Citrus)作物，其栽種面積廣泛且種類繁多，為台灣重要果樹產業之一。根據果實採收後特性，柑桔屬於典型非更年型果實，成熟之果實於採收貯藏期間之乙烯釋放率及呼吸率極低 (Kader, 2002)，於適當條件下，期貯藏期可長達數週至數月之久 (Reuther, 1989)。

1-MCP 處理可延緩柑橘果皮轉色 (Porat *et al.*, 1999)，但以高濃度之 1-MCP 處理印度萊姆則反而使其果皮加速轉色 (Win *et al.*, 2006)，此外，前人研究指出，高劑量之 1-MCP 處理導致數種柑橘果實低溫貯藏時寒害發生及增加果實中揮發性物質含量 (Porat *et al.*, 1999; Dou *et al.*, 2005; Kluge *et al.*, 2003)，由於前人研究 1-MCP 處理柑桔類正面及反面均有報導，本試驗以不同劑量 1-MCP 處理柳橙果實，探討 1-MCP 對柳橙貯藏栽培品質之影響並了解相關生理機制。

材 料 與 方 法

一、試驗材料

試驗柳橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng) 來自嘉義縣梅山鄉梅山合作農場，採收當日立即寄送，於隔日抵達中興大學採後處理研究室。挑選果蒂完整、大小及成熟度相近、外觀良好無明顯傷害之果實進行試驗。

二、試驗方法

(一)不同劑量 1-MCP 處理對柳橙果實於室溫貯藏之影響

將柳橙以自來水清洗風乾後分組，並依序將果實編號秤重。將完成編號之果實放入容量 61 公升 (60 公分×40 公分×29 公分)之方形壓克力呼吸缸中，每呼吸缸中放入 30 顆果實，每果重量約於 100-150 克間。另秤取 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0 克 1-MCP 粉劑 (AnsiP 安喜培®,有效成份為 0.43%，利統股份有限公司出品)置入 50 毫升玻璃燒杯中，添加 2 毫升純水後放入呼吸缸內，立即將呼吸缸密閉，置於室溫 (約為 25°C)燻蒸 24 小時，對照組燒杯中僅添加 2 毫升純水，其餘條件皆相同。完成燻蒸之果實取出後置於室溫環境 (約為 25°C)下，每日進行乙烯釋放率及呼吸率及外觀之調查。

(二)0.5、1.0、2.0 克 1-MCP 粉劑處理對柳橙果實於 15°C貯藏之影響

將柳橙以自來水清洗風乾後分組，並依序將果實編號秤重。將完成編號之果實放入容量 61 公升 (60 公分×40 公分×29 公分)之方形壓克力呼吸缸中，每呼吸缸中放入 30 顆果實，每果重量約於 100-150 克間。秤取 0.5、1.0、2.0 克 1-MCP 粉劑 (AnsiP 安喜培®,有效成份為 0.43%，利統股份有限公司出品)置入 50 毫升玻璃燒杯中，添加 2 毫升純水後放入呼吸缸內，立即將呼吸缸密閉，置於室溫 (約為 25°C)燻蒸 24 小時，對照組燒杯中僅添加 2 毫升純水，其餘條件皆相同。果實燻蒸完成後以柑橘專用袋包裝，貯藏於 15°C，於 3、5、7、9、11 日取出調查，查項目包含：果皮顏色、褐化情況、離子滲漏率及貯藏 3、5、7 天取出於室溫回溫果實之乙烯釋放率及呼吸率。

三、調查項目及方法

(一) 乙烯釋放率

以塑膠針筒自出氣口抽取氣體定量至 1 mL，注入氣象層析儀 (gas chromatography, Shimadzu, Model GC 8A) 配以火焰離子檢出器 (FID) 測定，分離管採不鏽鋼管柱 (1/8"×6ft) 填充活性氧化鋁 (Activated Aluminum, 80-100 mesh)，管柱及注射口偵測器溫度分別為 90°C 及 130°C，以氮氣作為攜帶氣體 (carrier gas)，壓力設定為 3kg/cm³，氫氣為燃燒氣體，壓力設定為 0.5kg/cm³，氧氣為助燃氣體，壓力與氫氣相同，測得之乙烯濃度變化與 1.461ppm 之標準品比較計算後獲得乙烯釋放率，單位為 $\mu\text{LC}_2\text{H}_4\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

(二) 呼吸率

以塑膠針筒自出氣口抽取 1 mL 氣體，注入紅外線二氧化碳分析儀 (Infrared analyzer, Maihuk, Model UNOR610)，攜帶氣體為氮氣，利用二氧化碳吸收固定波長之紅外線的特性測得二氧化碳濃度，並與濃度 3.44% 之二氧化碳標準品比較計算後獲得果實呼吸率，單位為 $\text{mL CO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

(三) 果皮褐化率及褐化程度

以肉眼觀察柳橙果皮是否出現褐化之現象，並依據褐化面積將褐化程度分為五個等級：第 1 級之果皮褐化面積為 0，指數以 1 表示；第二級之褐化面積佔果實 10% 以下，指數以 2 表示；第三級為果皮褐化區域佔果實 10%-25%，指數以 3 表示；第四級之褐化面積佔果皮總面積之 26%-50%，指數以 4 表示；褐化面積超越果實總面積之 50% 則評定為第五級，指數為 5。

(四) 果皮離子滲漏率

將柳橙果實切片後剝取果皮，並以去離子水沖洗沾附之果汁，擦乾後以直徑 1.1cm 打孔器鑽取 3 片果皮圓片，依序放入填有 10 ml 0.4 M 甘露醇之塑膠 EC 瓶中，闔上上蓋後置於常溫環境下，以震盪 100rpm 3 小時後量測初始電導度 (EC0)，使用儀器為電導度測定儀 (Suntex, conductivity meter, SC-170)。完成測定後，將樣品連同 EC 瓶至於 -20°C 冷凍 7 天，取出於室溫下回溫，測定解凍後電導度 (EC1)，樣品回溫同時須以 100rpm 震盪，震盪時間為 3 小時。每處理三重複，每重複為 3 顆果實。以下為離子滲漏率之計算方式：

$$\text{離子滲漏率}(\%) = \frac{\text{測初始電導度 (EC0)}}{\text{解凍後電導度 (EC1)}} \times 100$$

結 果

(一) 不同劑量 1-MCP 處理對柳橙果實於室溫貯藏之影響

無論任何劑量 1-MCP 粉劑處理之柳橙果實，其乙烯釋放率與呼吸率趨勢一至，皆高於對照組。以 0.5、1.0、2.0 克 1-MCP 粉劑處理果實之乙烯釋放率 (圖 1) 及呼吸率 (圖 2) 與對照組於處理後第 1 日已出現顯著性差異，於第 2 日驟升，第 3 日達高峰後下降，以 0.5 g 1-MCP 粉劑處理之柳橙乙烯釋放率及呼吸率最高，分別為 $137\mu\text{L C}_2\text{H}_4\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、107

$\text{mL CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。以 0.1 g 1-MCP 粉劑處理之柳橙果實之乙烯釋放率 (圖 3)及呼吸率 (圖 4)顯著高於 0.01g 1-MCP 粉劑處理及對照組，並於貯藏第 4 日時出現乙烯高峰 $22.5 \mu\text{L}$

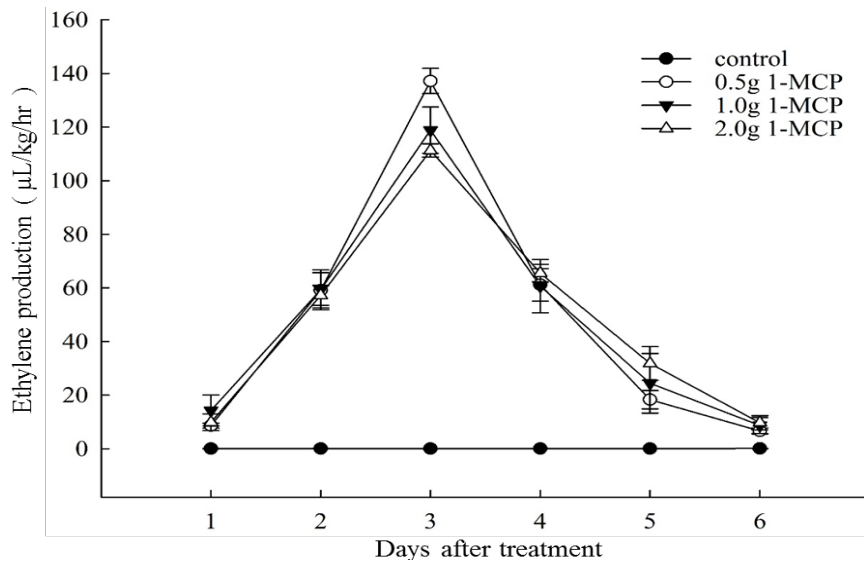


圖 1. 1-MCP (安喜培,0.43%1-MCP)處理之柳橙於常溫下之乙烯釋放率。

Fig. 1. Effect of 1-MCP (AnsiP®,0.43%1-MCP) treatment on the ethylene production rate of orange fruits during stored at room temperature.

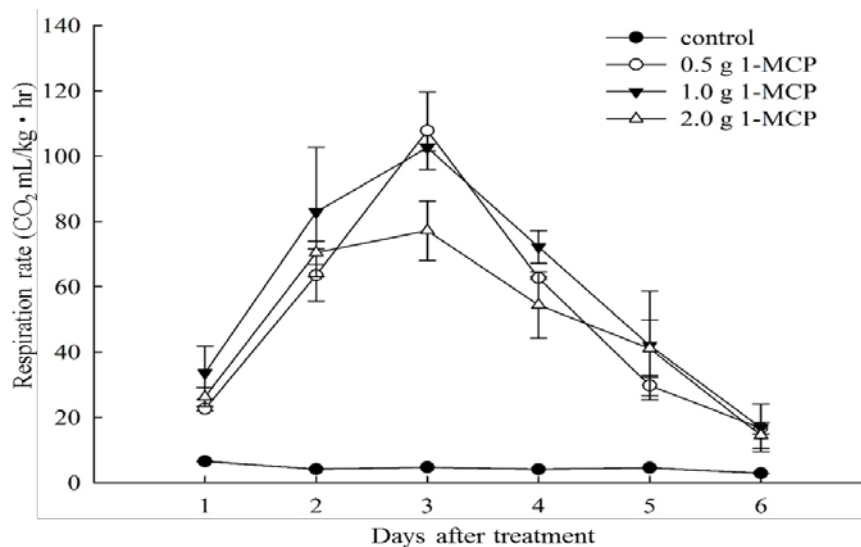


圖 2. 1-MCP 處理之柳橙於室溫下之呼吸率。

Fig. 2. Effect of 1-MCP treatment on the respiration rate of orange fruits during stored at room temperature.

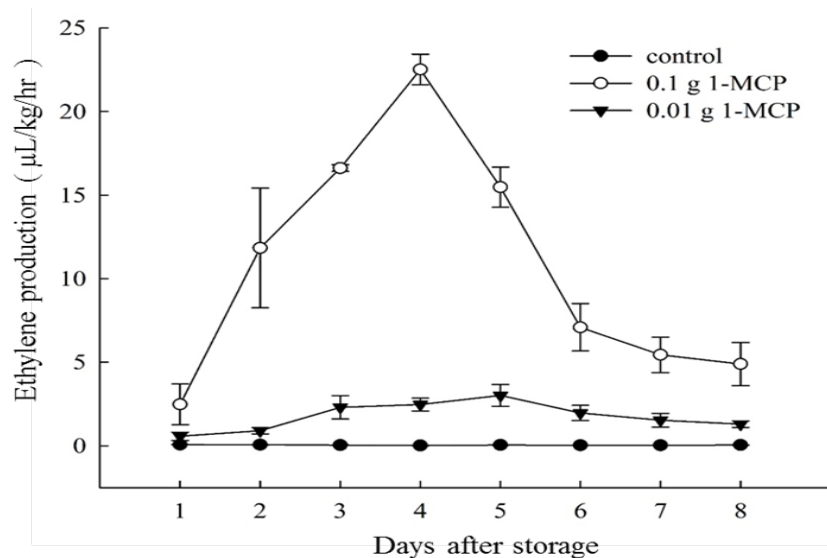


圖 3. 1-MCP 處理柳橙於室溫下之乙烯釋放率。

Fig. 3. Effect of 1-MCP treatment on the ethylene production rate of oranges fruits during stored at room temperature.

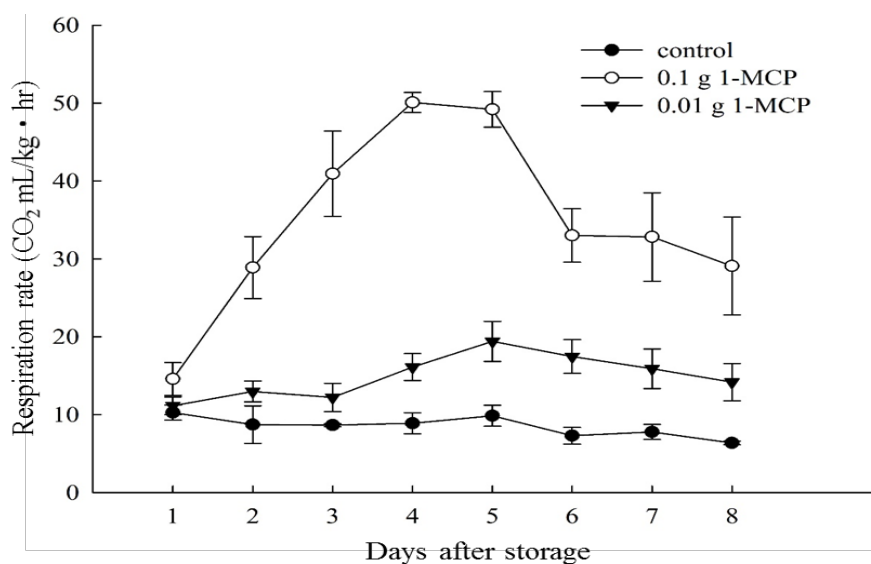


圖 4. 1-MCP 處理柳橙於室溫下之呼吸率。

Fig. 4. Effect of 1-MCP treatment on the respiration rate of oranges fruits during stored at room temperature.

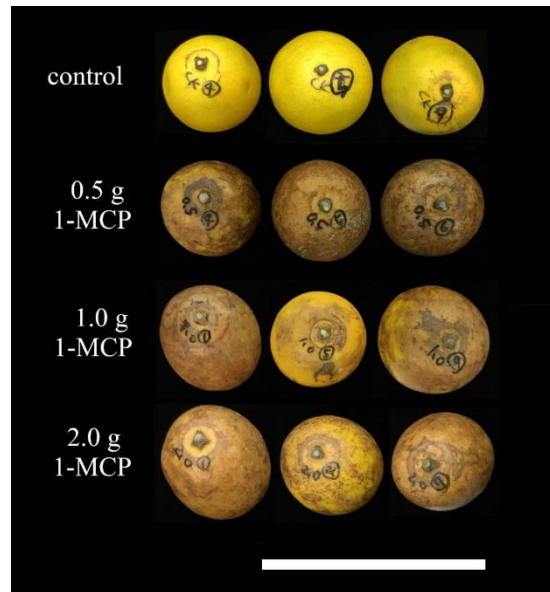


圖 5. 1-MCP 粉劑處理柳橙於常溫貯藏 6 天之果實外觀。

Fig. 5. Effect of 1-MCP treatment on appearance of orange fruits stored at room temperature for 6 days.

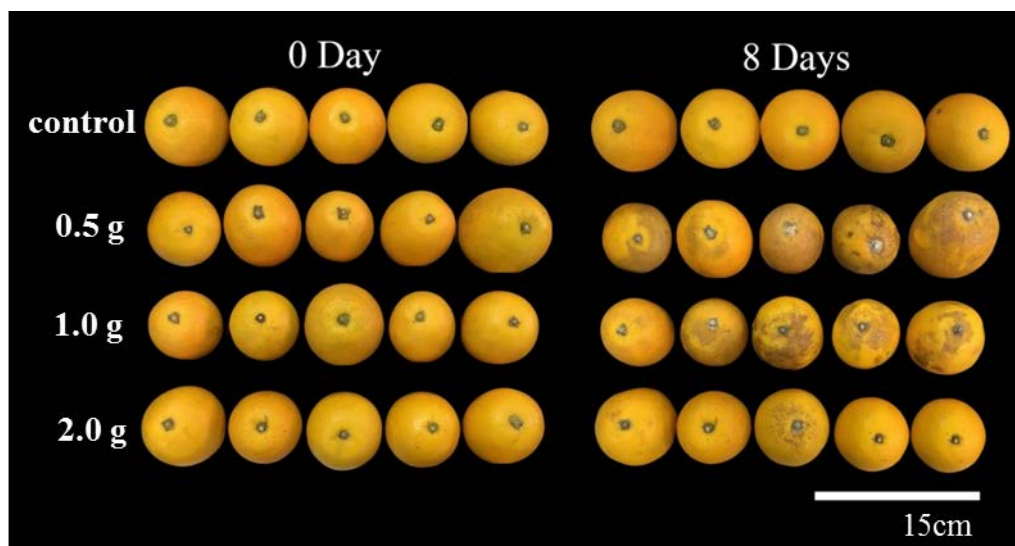


圖 6. 1-MCP 粉劑處理柳橙於 25°C貯藏 8 日之外觀變化。

Fig. 6. Effect of 1-MCP treatment on appearance of oranges fruits stored at 25 °C for 8 days.

$\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 及呼吸率高峰 $50 \text{ mL CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 後迅速下降，而 0.01 g 1-MCP 粉劑處理之果實乙烯釋放率與呼吸率上升較為緩慢，於第 5 日達高峰 $3.01 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 及 $19.38 \text{ mL CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。外觀方面，經 1-MCP 處理之果實皆出現褐化， 0.5 、 1.0 、 2.0 克 1-MCP 粉劑處理柳橙於貯藏第 6 日時全數褐化（圖 5），而 0.1 及 0.01 g 1-MCP 粉劑處理之柳橙則於貯藏 8 日時全數褐化（圖 6）。

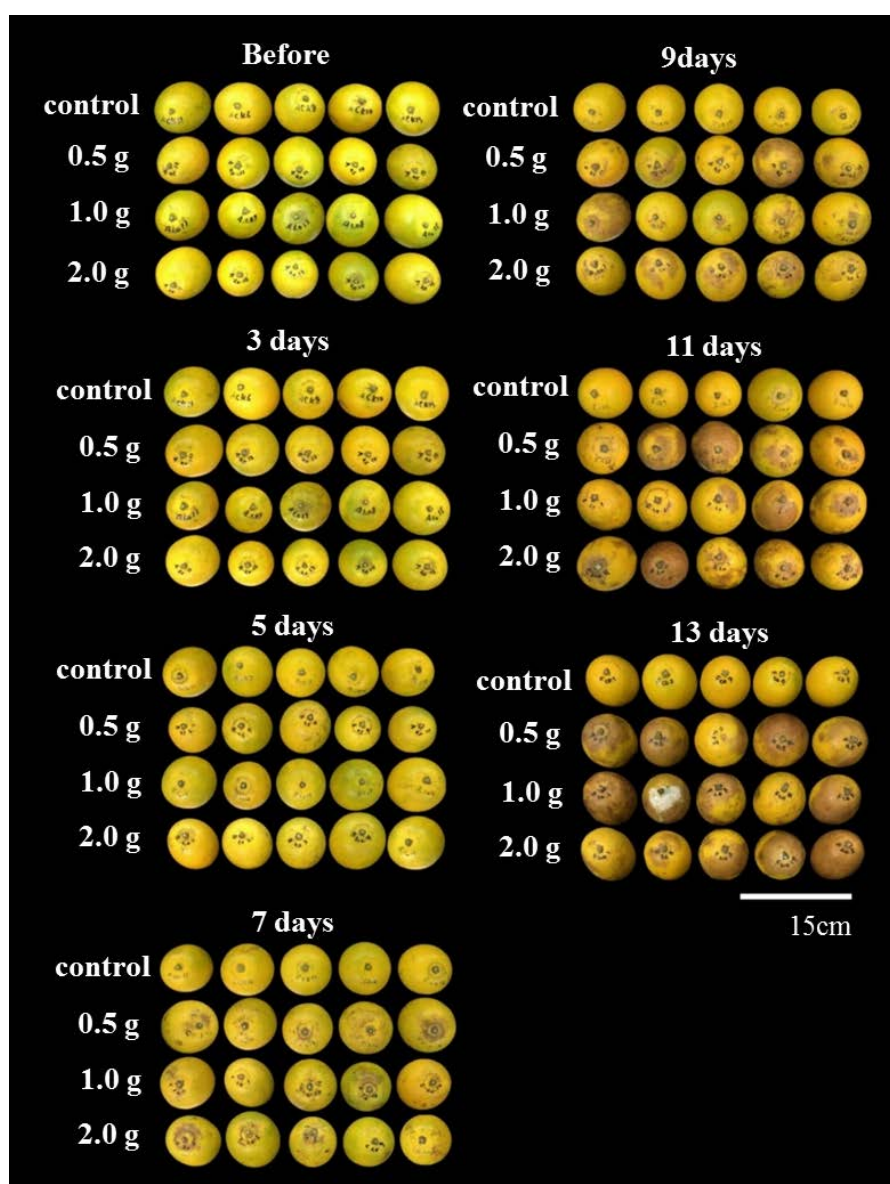


圖 7. 不同劑量 1-MCP 處理之柳橙貯藏於 15°C 之外觀變化。

Fig. 7. Effect of 1-MCP treatment on appearance of orange fruits during storage at 15°C . At harvest, storage at 15°C for 3 days, 5 days, days, 9 days, 11 days, 13 days.

(二) 0.5、1.0、2.0 克 1-MCP 粉劑處理對柳橙果實於 15°C 貯藏之影響

無論濃度，1-MCP 處理柳橙之果皮於貯藏第 5 日時開始出現褐化徵狀 (圖 7)，其發生比例隨貯藏天數增加而上升 (圖 8)，於 11 日時全數褐化。褐化嚴重程度方面，不論以何種濃度 1-MCP 處理，柳橙果實之褐化嚴重程度隨貯藏日數增加而加重 (圖 9)，所有果實之褐化指數於貯藏第 11 日時達 4.4-4.5 (圖 9)，顯示多數果實褐化面積過半。

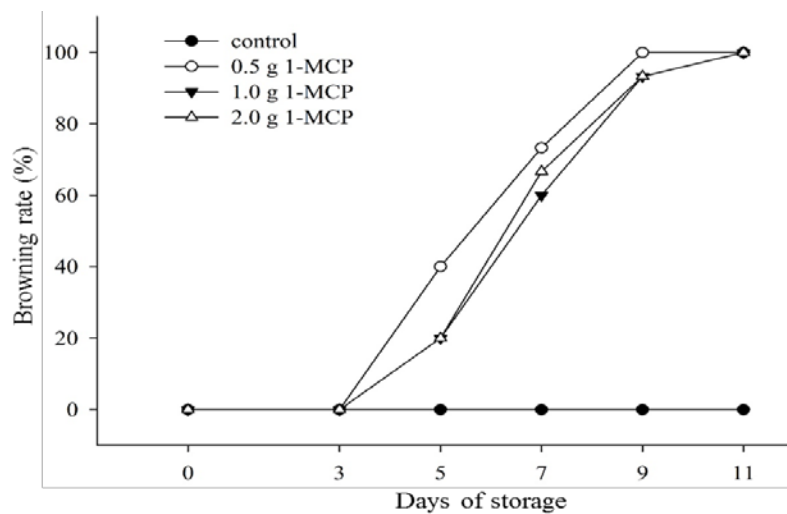


圖 8. 1-MCP 粉劑處理柳橙於 15°C 貯藏之果皮褐化率。

Fig. 8. Effect of 1-MCP treatment on browning rate of orange fruits during storage at 15 °C.

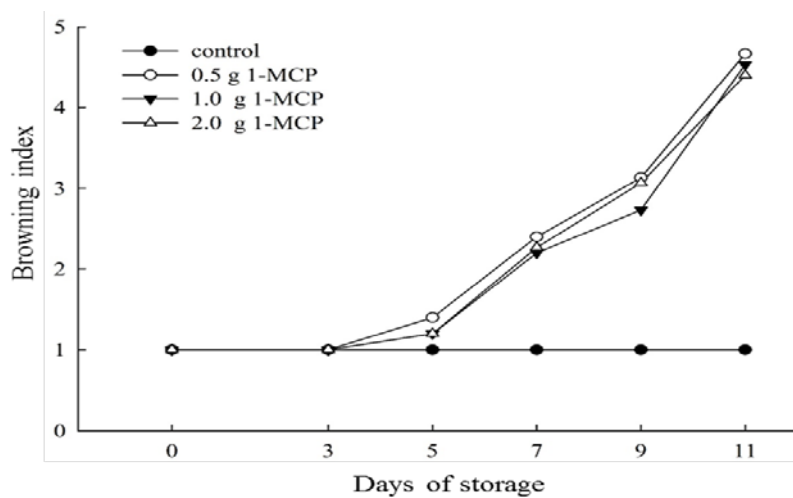


圖 9. 1-MCP 粉劑處理柳橙於 15°C 貯藏期間之果皮褐化指數。

Fig. 9. Effect of 1-MCP treatment on browning index of oranges during storage at 15 °C.

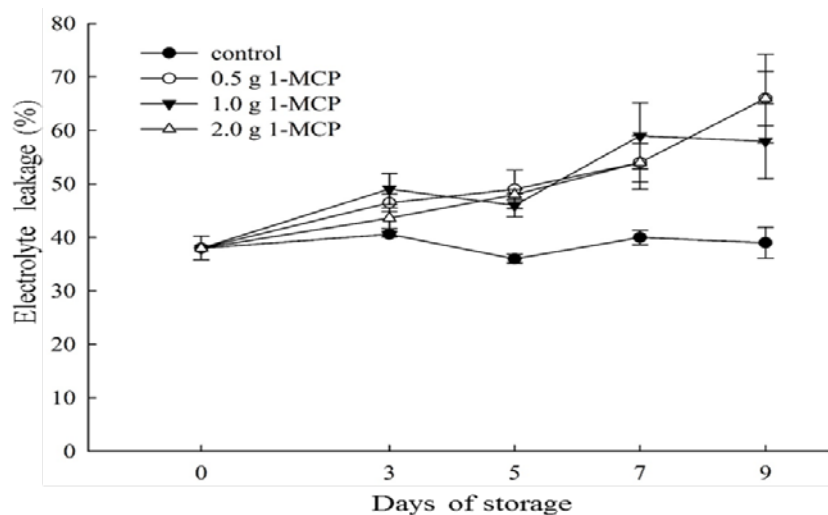


圖 10. 1-MCP 粉劑處理柳橙於 15°C 貯藏期間之離子滲漏率。

Fig. 10. Effect of 1-MCP treatment on electrolyte leakage of orange fruits during storage at 15 °C.

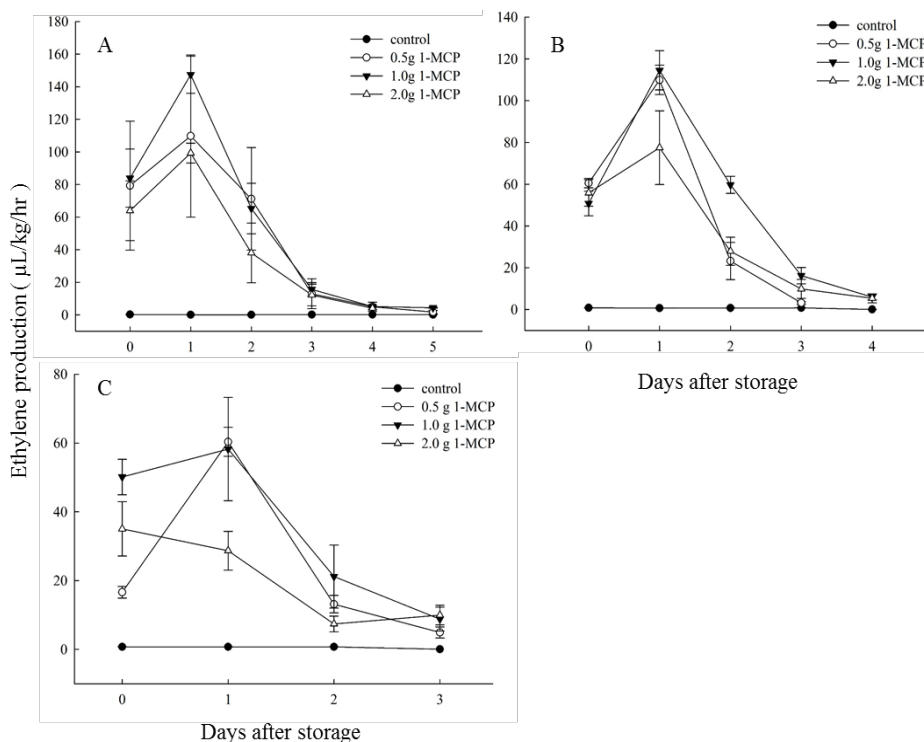


圖 11. 1-MCP 粉劑 (安喜培, 0.43% 1-MCP) 處理柳橙於 15°C 貯藏 3 天、5 天、7 天取出回溫之乙烯釋放率。

Fig. 11. Effect of 1-MCP treatment on the ethylene production rate of oranges fruits stored at 15°C (A) 3 days, (B) 5 days, (C) 7 days and transfer to room temperature following storage.

於果皮離子滲漏率方面，對照組柳橙於貯藏期間維持於 36-40% 間；經 1-MCP 處理之柳橙，無論處理濃度，離子滲漏率隨貯藏日數增加而上升 (圖 10)。於貯藏 5 日時，1-MCP 處理果實離子滲漏率皆顯著高於對照，但不同濃度間並無顯著差異；貯藏 9 日時，1-MCP 處理果實果皮離子滲漏率於 58-66%。

柳橙果實於室溫回溫之乙烯釋放率如圖 11 所示，貯藏 3、5、7 日之柳橙果實取出於室溫回溫時，其乙烯釋放模式相仿，不論濃度，1-MCP 處理柳橙之乙烯釋放率於回溫當日顯著高於對照，除貯藏 5 日回溫之 2.0 g 1-MCP 粉劑處理之柳橙外，其餘皆於第 1 日時達高峰後下降。柳橙果實於室溫回溫之呼吸率模式與乙烯釋放率相仿 (圖 12)，經 1-MCP 處理之柳橙呼吸率上升，與對照組有顯著差異。回溫試驗以果實全數褐化且褐化面積超過 50% 為終點，於 15°C 貯藏愈多日，其果實回溫後褐化發展愈迅速，15°C 貯藏 3 日之 1-MCP 處理柳橙於回溫 5 日後全數果實褐化面積超過 50%，而貯藏 7 日之 1-MCP 處理柳橙於回溫第 3 日，果實褐化面積超過 50%。

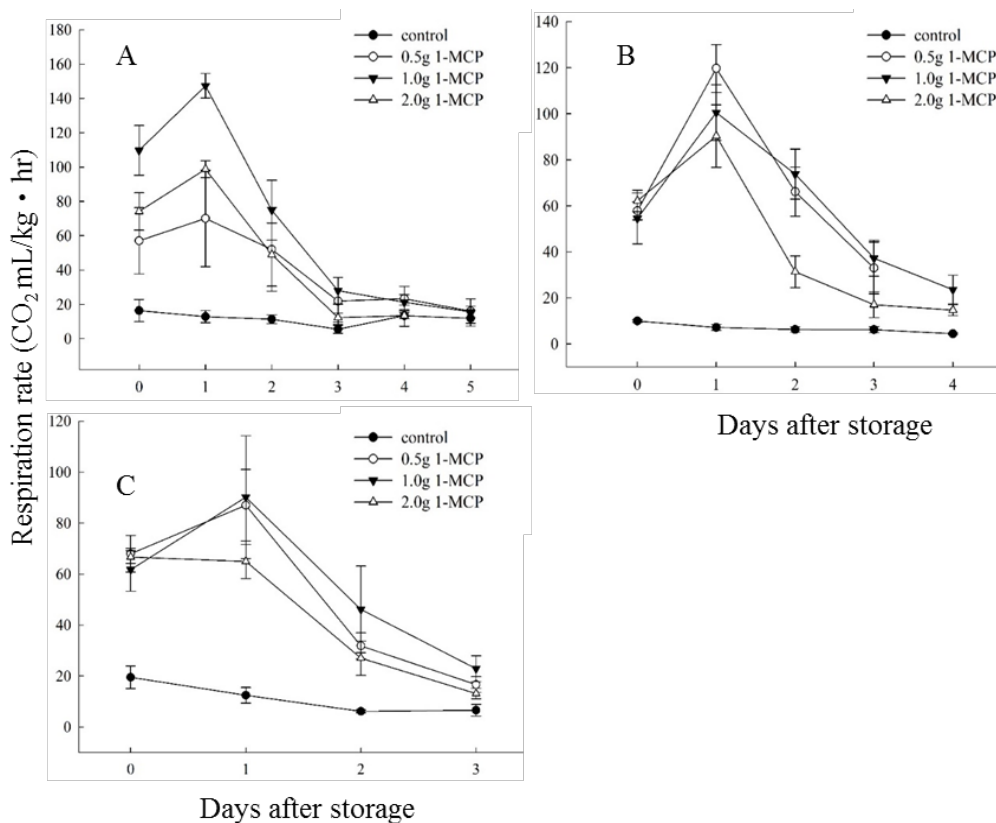


圖 12. 1-MCP 粉劑處理柳橙於 15°C 貯藏 3 天、5 天、7 天取出回溫之呼吸率。

Fig. 12. Effect of 1-MCP treatment on the respiration rate of oranges fruits stored at 15°C (A) 3 days, (B) 5 days, (C) 7 days and transfer to room temperature following storage.

討 論

濃度為影響 1-MCP 效果之因子 (Blankenship and Dole, 2003)，經計算得知，0.01 g、0.1 g、0.5 g、1.0 g、2.0 g 等不同劑量 1-MCP 粉劑於 61 公升之方形呼吸缸中釋放之 1-MCP 濃度分別為 319ppb、3192ppb、15960ppb、31920ppb、63840ppb，不論何種 1-MCP 濃度處理，皆使柳橙乙烯釋放率及呼吸率提高，以 0.5 g 含以上之較高劑量 1-MCP 粉劑處理時，其乙烯釋放率 (圖 1) 及呼吸率 (圖 2) 顯著高於 0.1、0.01g 低劑量 1-MCP 粉劑處理者 (圖 3、圖 4)。以不同濃度 1-MCP 處理 'Marsh' 葡萄柚，於常溫下觀察 72 小時，以 1-MCP 處理之果實乙烯釋放率高於對照，因處理劑量之不同，分別於 24 及 48 小時達高峰，且以愈高濃度之 1-MCP 處理，其乙烯釋放率愈高。此外，於試驗中，使用之 1-MCP 濃度倍增時，乙烯釋放率也跟著加倍 (McCollum and Maul, 2007)，此結果與柳橙試驗相仿，在 'Pera' 橙試驗中，以 0.1、0.5、1.0 μLL^{-1} 1-MCP 處理果實，其於貯藏期間之呼吸率也因處理 1-MCP 而上升，且伴隨處理濃度增高而增加 (Rosa *et al.*, 2016)。

無論何種劑量之 1-MCP 粉劑處理柳橙，於室溫貯藏 8 日後，果實全數皆褐化 (圖 5、圖 6)，劑量愈高，褐化愈迅速，且褐化愈嚴重 (圖 6)。15°C 為柳橙最適貯藏溫度 (劉, 2005a)，以 0.5 g 含以上之較高劑量 1-MCP 粉劑處理之柳橙，於 15°C 貯藏期間全數褐化 (圖 7)，且褐化發生率及嚴重程度皆隨貯藏日數增加而加劇 (圖 8、圖 9)。前人研究指出，以 1 μLL^{-1} 1-MCP 處理臍橙，果皮於 20°C 貯藏期間出現非寒害性下凹小點 (Establés-Ortiz *et al.*, 2016)，此外，Dou 等人 (2005) 以 'Marsh' 葡萄柚為材料試驗不同劑量之 1-MCP，當處理之 1-MCP 粉末劑量高於 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 時，不論貯藏於低溫或常溫，皆對 'Marsh' 葡萄柚造成損害，由此推測，試驗中 0.01 g 以上之 1-MCP 粉劑 (319ppb 以上) 對柳橙而言為過高之劑量，因而誘發柳橙表皮之傷害。

離子滲漏率可做為判定細胞膜完整性之依據，當果實處於老化或低溫等非生物逆境時，因膜質異常導致細胞隔室消失，細胞釋出之酚類化合物被 PPO 氧化後導致褐化發生 (Soler, 1993)。無論任何濃度 1-MCP 處理，貯藏於 15°C 之柳橙果皮離子滲漏率 (圖 10) 與褐化率 (圖 8) 皆隨貯藏日數增加而上升，顯示其膜體系統遭受破壞，使細胞中物質與酵素結合，因而導致褐化發生。

於 15°C 貯藏 3、5、7 日取出之柳橙果實於室溫環境回溫時，其乙烯釋放率及呼吸率趨勢一致，圖 11、圖 12 顯示乙烯釋放率及呼吸率皆於回溫第一天顯著高於對照組，第 2 日達高峰後驟降，其結果與 Lado 等人 (2014) 之研究結果相似，其以 1-MCP 處理 2 品種之葡萄柚，於 2°C 長期貯藏，回溫期間無論葡萄柚是否發生寒害徵狀，其乙烯釋放率於回溫時迅速升高後下降 (Lado *et al.*, 2014)。由試驗結果得知，經 1-MCP 處理之柳橙於室溫條件下或於 15°C 貯藏取出回溫時，乙烯釋放率及呼吸率皆於短時間內顯著升高，並於出現峰值後下降 (圖 11、圖 12)，而果實褐化之現象於乙烯及呼吸升高之過程中同步發生，且隨褐化程度增加。

柳橙為非更年型果實，於一般貯藏情況下，果實採後之乙釋放率及呼吸率於極低，但若果實遭受生物及非生物逆境時，其乙烯釋放率及呼吸率大幅增加 (McCollum and McDonald, 1991; Marcos *et al.*, 2005)，由試驗得知 0.01g 以上之 1-MCP 粉劑處理對柳橙而言為過量之劑量，誘導其乙烯及呼吸高峰，引起果皮傷害，並產生褐化現象，且隨 1-MCP 粉劑處理劑量增加，其乙烯釋放率及呼吸率增加，加速果實褐化發生。

參 考 文 獻

- 劉富文。2005a。極柑、桶柑與柳橙長期貯藏之條件與方法。台灣柑桔產業發展研討會專刊。pp. 209-215。
- Blankenship, S. 2001. Ethylene effects and the benefits of 1-MCP. *Perishables Handling Quarterly*: 2-4.
- Blankenship, S. M. and J. M. Dole. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28: 1-25.
- Dou, H., S. Jones, and M. Ritenour. 2005. Influence of 1-MCP application and concentration on post-harvest peel disorders and incidence of decay in citrus fruit. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80: 786-792.
200. 2002. Federal register 67 (48): 796-48800.
- Establés-Ortiz, B., P. Romero, A.-R. Ballester, L. González-Candelas, and M. T. Lafuente. 2016. Inhibiting ethylene perception with 1-methylcyclopropene triggers molecular responses aimed to cope with cell toxicity and increased respiration in citrus fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 103: 154-166.
- Kader, A. A. 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*, Univ of California Agriculture & Natural Resources. pp.39-41.
- Kluge, R. A., M. L. L. Jomori, A. P. Jacomino, M. C. D. Vitti, and M. Padula. 2003. Intermittent warming in 'Tahiti' lime treated with an ethylene inhibitor. *Postharvest Biol. Technol.* 29: 195-203.
- Lado, J., M. J. Rodrigo, and L. Zacarías. 2014. Analysis of ethylene biosynthesis and perception during postharvest cold storage of Marsh and Star Ruby grapefruits. *Food Sci. Technol. Int.* 21: 537-546.
- Marcos, J. F., L. González-Candelas, and L. Zacarías. 2005. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *J. Exp. Bot.* 56: 2183-2193.
- McCollum, G. and P. Maul. 2007. 1-Methylcyclopropene inhibits degreening but stimulates respiration and ethylene biosynthesis in grapefruit. *HortScience* 42: 120-124.

- McCollum, G. and R. E. McDonald. 1991. Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience* 26: 1191-1192.
- Porat, R., B. Weiss, L. Cohen, A. Daus, R. Goren, and S. Droby. 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 155-163.
- Reuther, W. 1989. Citrus industry: crop protection, postharvest technology and early history of citrus research in california, *Agriculture & Natural Resources*. 374pp.
- Rosa, C. I. L. F., E. Clemente, D. M. Oliveira, K. M. Todisco, and J. M. C. d. Costa. 2016. Effects of 1-MCP on the post-harvest quality of the orange cv. Pera stored under refrigeration. *Rev. Cienc. Agron.* 47: 624-632.
- Soler, A. 1993. Enzymatic characterization of stress induced translucence of pineapple flesh in the Ivory Coast. *Acta Hortic.* 334: 295-304.
- Win, T. O., V. Srilaong, J. Heyes, K. L. Kyu, and S. Kanlayanarat. 2006. Effects of different concentrations of 1-MCP on the yellowing of West Indian lime (*Citrus aurantifolia*, Swingle) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 42: 23-30.

Effects of 1-MCP on the Peel Browning of Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng) Fruit during Storage

Ying-Chen Kao¹⁾ Huey-Ling Lin²⁾

Key word: 1-Methylcyclopropene (1-MCP), Oranges, Ethylene, Respiration, Browning

Summary

Five AnsiP[®] (1-MCP, 0.43% active ingredient, produced by Litong Company) levels 0.01 、 0.1 、 0.5 、 1.0 and 2.0 g were treated on orange fruit at room temperature for 24 hours. Two milliliters of water was added to the AnsiP[®] and placed inside 61-L chambers to observe the changes in fruits stored at room temperature about 25 °C and 15°C. Our results showed that at all concentrations of 1-MCP tested, the ethylene production rate and respiration rate of 1-MCP-treated fruits increased rapidly at room temperature and decreased after peak. The browning of the peel occurred as the ethylene production rate and respiration rate increased. The electrolyte leakage rate was significantly higher than the control when the fruits were treated with 0.5 、 1.0 、 2.0 g AnsiP[®] and stored at 15 °C. Some fruits showed browning peel 5 days after storage. At 11 days after storage, all fruits turned brown and the browning index was between 4.4 to 4.6. Oranges were rewarmed at room temperature after 3, 5, and 7 days of storage at 15 °C, the ethylene production rate and respiration rate of the 1-MCP treated fruits reached a peak one day after rewarming, and rapidly turned brown and rotted within 5 days. Our results showed that 1-MCP treatment induces high ethylene production, which in turn leads to fruit peel damage and browning. °

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

電阻抗式流式細胞儀分析花椰菜小孢子 發育階段之應用

林 柏 穎¹⁾ 夏 奇 鈺²⁾ 黃 三 光³⁾

關鍵字：花椰菜、單核晚期、雙核早期、小孢子培養

摘要：選擇適當發育階段的小孢子作為培養材料是小孢子培養成功的關鍵因素，但現行方法對小孢子發育階段的判別有效率不足的問題。本研究以電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry, IFC) 檢測花椰菜商業 F₁ 雜交種 2.5-6.5 mm 大小花蕾內之小孢子，以每 0.5 mm 間距為分級，調查不同大小花蕾內小孢子發育過程的變化，並用相同材料進行螢光染色以顯微鏡觀察，調查不同分級花蕾中小孢子發育的階段，並合併兩者之結果建立小孢子發育階段與 IFC 分析圖型的相關性，再由此建立花椰菜小孢子發育過程細胞族群變化趨勢的模擬圖。研究結果顯示 IFC 以 2 及 12 MHz 兩種電頻波檢測由小而大的花蕾，可以判別不同發育階段之小孢子細胞族群，依照鏡檢結果'慶農 H-37'及'農友極早生'皆於分級 3.5-4.5 mm 花蕾具有較高含量之單核晚期到雙核早期發育階段小孢子，依 IFC 分析之比例亦顯示 stage III- stage IV 有較高比例小孢子於單核晚期到雙核早期階段，與鏡檢之結果相符。未來可利用 IFC 快速分析且準確的判別具適合培養之小孢子發育階段的花蕾尺寸，並可分析小孢子族群的細胞活性，進而提高小孢子培養技術的效率。

前 言

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) 別名椰菜花或白花菜，英名為 cauliflower，是十字花科芸苔屬中的重要作物，並於臺灣蔬菜生產中佔有一席之地。此外，臺灣花椰菜種苗產業培育出許多優良的花椰菜品種，除廣受臺灣農民喜愛外，更大量外銷至中國大陸與東

1) 國立中興大學園藝學系研究生。

2) 行政院農業委員會農業試驗所生技組研究員、共同通訊作者。

3) 中興大學園藝學系副教授、通訊作者。

南亞國家，在國際上具有相當之競爭力（丁和郭，2016）。

莖苔屬蔬菜的育種目標除了提升產量外，也著重於整齊度、外觀、對逆境的抗性及耐儲運特性的提高（謝等，2011）。一代雜交種（ F_1 ）因能穩定維持品種的特性而受到農民青睞，是目前花椰菜種苗生產的主流，但生產 F_1 種子必須先育成純系親本，一般經由多代自交耗時 6 到 8 年方能育成，然而十字花科莖苔屬作物普遍具有自交不親合性以及自交弱勢等障礙，故純系之育成需耗費更多的人力與時間，不利於新品種的快速推出。近年來國內逐步建立花椰菜小孢子培養技術，得以快速育成生產 F_1 之純系親本，在縮短育種時間方面已具有初步的成果（夏等，2017）。

莖苔屬作物小孢子培養的研究顯示小孢子的胚分化率會受供體植物本身狀況、栽培環境及小孢子培養過程中各種條件的影響，其中被視為關鍵的影響因子如植株的基因型、小孢子的發育階段、逆境處理誘導胚分化及培養基的配方等，並且多數研究中皆認同小孢子發育階段在單核晚期至雙核早期之間是誘導胚分化的最佳時機，有助於提高小孢子培養的成功率（Shmykova *et al.*, 2016; Silva, 2012）。小孢子發育時期的精確判斷需藉助螢光染色後於螢光顯微鏡下觀察細胞核的變化，實務上會以花蕾大小作為分級，再以顯微鏡觀察各分級花蕾內之不同發育階段小孢子的比例，從中選取適當之花蕾尺寸進行小孢子培養（Custers, 2003; Winarto and da Silva, 2011），小孢子不同發育階段的調查方式會因操作者的專業度而有所差異，在調查數量方面也會因人力無法加快的限制而只能觀察少量樣品，因此小孢子發育階段之調查，在實務上有必要尋求更有效率的調查方法。

流式細胞儀是近代生物科學研究細胞之利器，具有以單一細胞為單位快速且大量偵測細胞的功能，是提升小孢子發育階段判別效率的有效工具（Robinson, 2004; Takahira *et al.*, 2011）。近年研發之電阻抗式流式細胞儀（impedence flow cytometer, IFC），將細胞置於特定電解液中，利用流體經過晶片通道的同時通以不同頻率的交流電，再將細胞大小、細胞膜電位的變化及細胞內部離子濃度的不同所產生之電阻信號加以收集轉換並分析（Cheung *et al.*, 2010）。IFC 可用於不同發育階段小孢子的辨識、花粉活性判讀以及花粉萌芽率的預測等，但實際利用 IFC 於監測小孢子發育階段的研究仍屈指可數（Heidmann *et al.*, 2016）。

本研究以臺灣花椰菜 F_1 商業品種為材料，利用顯微鏡觀察及 IFC 檢測花椰菜不同大小花蕾內的小孢子發育之情形，建立顯微鏡觀察數據與 IFC 分析圖形的關聯性，未來可利用 IFC 快速分析的特性，提升小孢子發育階段的判別率，進而提高小孢子培養的成功率。

材 料 與 方 法

一、供驗植株

（一）植物材料

花椰菜 F_1 種子分別為購自於農友種苗公司（Known-You Seed Co., Kaohsiung, Taiwan）

的'農友極早生'及慶農種苗公司 (Ching Long Seed Co., Ltd., Tainan, Taiwan)的'慶農 H-37'。

(二)植物栽培

將種子播種於 60 格育苗穴盤中，使用之介質配方為泥炭土 (荷蘭 BVB 泥炭培養土 3 號)：珍珠石：蛭石 = 4 : 2 : 1 (v : v : v)；種子發芽 2 wk 後，施用一次 1 g L^{-1} 施力優 ($\text{N} : \text{P}_2\text{O}_5 : \text{K}_2\text{O} = 20 : 20 : 20$)液肥；種子發芽 4 wk 後定植於 5 吋盆中，使用之介質配方為泥炭土 (荷蘭 BVB 泥炭培養土 3 號)：珍珠石 = 4 : 1。育苗階段置於溫度為 $22-29^\circ\text{C}$ 且濕度介於 50-60%之密閉溫室 (農業試驗所，霧峰)，待植株花芽分化後，移置於日/夜溫為 $20/15^\circ\text{C}$ 、光照 16 h、光照強度 $98.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 的走入式生長箱 (Hsin Chien Xiang CO., Ltd) 內栽培至開花。定植後的生長期間每週澆水 2 次，並施用 1 次 1 g L^{-1} 施力優液肥，每盆施用量約 200-300 mL，花芽分化後改用 1 g L^{-1} 花寶 3 號 ($\text{N} : \text{P}_2\text{O}_5 : \text{K}_2\text{O} = 10 : 30 : 20$)液肥，施用量同育苗階段之用量。

二、試驗材料

不同大小之花蕾於上午 10 點前剪取自走入式生長箱內之開花株，花蕾以保冷劑維持低溫狀態運送及保存，將花蕾依照長度分級，分為 2.5-3.0、3.0-3.5、3.5-4.0、4.0-4.5、4.5-5.0、5.0-5.5、5.5-6.0 及 6.0-6.5 mm 等共 8 級。

三、試驗方法

(一)以顯微鏡檢測小孢子發育階段

將不同分級長度之新鮮花蕾數個浸泡於 Carnoy's fluid 固定液 [95%乙醇:冰醋酸 = 3:1 (v/v)] 中，置於 4°C 至少 4 小時後使用。另取不同長度之花蕾 3-5 個置於微量離心管中，以 ddH₂O 清洗去固定液，移除洗液後重新加入 700 μL ddH₂O 並以電動棒攪拌，將混合液體以 30 μm 的篩網過濾。取 20 μL 的小孢子濾液置於載玻片上，加入 130 μL 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)螢光染劑 (5 mg/mL)後蓋上蓋玻片，於常溫暗室中靜置 20-30 min，在螢光顯微鏡 (ZEISS Axioskop 2 plus, Germany)下以 400 $\times$ 放大倍率觀察各分級花蕾內小孢子之細胞外型，並參照 Pechan 和 Keller (1988)對小孢子發育階段定義之核形及核數，分為四分子期、單核早中期、單核晚期、雙核早期、雙核中晚期與三核期。每一分級花蕾統計約 100 個小孢子的發育階段，三重複並計算其百分比。

(二)以電阻抗式流式細胞儀檢測不同大小花蕾內小孢子之發育階段

取不同分級長度之新鮮花蕾 3-6 個，加入 500 μL AF3 電解液 (Amphasys, Switzerland) 以電動棒攪拌後，再添加 500 μL AF3 電解液，以 30 μm 篩網過濾兩次。將含有小孢子之濾液混合均勻，吸取 300 μL 置於 1.5 mL 微量試管內，將微量試管以 100°C 加熱 10 min 作為死亡小孢子的對照材料；另一部分之小孢子濾液以電阻抗式流式細胞儀 AmphaZ30 (Amphasys, Switzerland)檢測，使用 80 μm 孔徑晶片，電波頻率設定為 2 MHz 和 12 MHz、析。

結 果

一、不同大小花蕾中小孢子的發育階段分布

以螢光顯微鏡觀察花椰菜'慶農 H-37'各分級花蕾內不同發育階段小孢子之比例分布，如表 1 所示。其中於 2.5-5.5 mm 共 6 個花蕾分級中皆具有位於單核晚期或雙核早期的小孢子，此 2 個發育階段合計比例最低者為 5.0-5.5 mm 花蕾的 15.4%，最高者為 3.5-4.0 和 4.0-4.5 mm 花蕾，分別含有 97.6%及 95.3%；4.5-6.0 mm 花蕾內小孢子發育階段以雙核中晚期為主，比例可達 95.5%；6.0-6.5 mm 花蕾中之雙核中晚期比例下降至 74.9%，但三核期比例則漸增至 25.1%。

表 1. 花椰菜'慶農 H-37'不同大小花蕾以 DAPI 螢光染色調查不同發育階段小孢子所佔之百分比。

Table 1. Percentage of different microspore developmental stages in various sizes of flower buds of cauliflower 'Chinglong H-37' investigated by using DAPI staining.

Bud size (mm)	Microspore developmental stage (%)					
	Tetrad	Uninucleate		Binucleate		Tri-nucleate
		Early- and middle-	Late-	Early-	Middle- and late-	
2.5-3.0	^z	36.4 ± 6.9	41.7 ± 6.3	22.0 ± 8.8	-	-
3.0-3.5	-	25.6 ± 15.7	48.3 ± 6.4	26.1 ± 14.1	-	-
3.5-4.0	-	-	27.2 ± 10.3	70.4 ± 5.5	2.3 ± 3.0	-
4.0-4.5	-	-	23.6 ± 4.8	71.7 ± 6.5	4.7 ± 2.5	-
4.5-5.0	-	-	-	38.1 ± 18.5	61.8 ± 29.8	-
5.0-5.5	-	-	-	15.4 ± 10.6	84.6 ± 11.0	-
5.5-6.0	-	-	-	-	95.5 ± 15.5	4.5 ± 2.5
6.0-6.5	-	-	-	-	74.9 ± 26.5	25.1 ± 15.7

^z - not detected

花椰菜'農友極早生'於 2.5-6.0 mm 共 7 個花蕾分級中，皆含有位於單核晚期或雙核早期的小孢子，此 2 個發育階段合計比例最低者為 5.5-6.0 mm 的 0.3%，而於 3.5-4.0 和 4.0-5.0 mm 分級花蕾中分別含有 94.8%及 84.5%比例較高；於 4.5-6.0 mm 花蕾中則含有較高比例的雙核中晚期小孢子，比例介於 75.5-90.8%；長度大於 5.0 mm 之花蕾會開始出現三

核期小孢子；雖然 6.0-6.5 mm 花蕾仍以雙核中晚期為主 (83.3%)，但三核期小孢子比例已增至 16.7% (表 2)。

表 2. 花椰菜'農友極早生'不同大小花蕾以 DAPI 螢光染色調查不同發育階段小孢子所佔之百分比。

Table 2. Percentage of different microspore developmental stages in various sizes of flower buds of cauliflower 'Know-you Farmers extra early' investigated by using DAPI staining.

Bud size (mm)	Tetrad	Microspore developmental stage (%)				
		Uninucleate		Binucleate		Tri-nucleate
		Early- and middle-	Late-	Early-	Middle- and late-	
2.5-3.0	^z	71.6 ± 1.5	23.2 ± 7.2	5.3 ± 1.4	-	-
3.0-3.5	-	24.3 ± 8.7	69.5 ± 9.0	6.2 ± 1.4	-	-
3.5-4.0	-	2.3 ± 0.8	59.8 ± 6.1	35.0 ± 3.6	2.9 ± 3.5	-
4.0-4.5	-	-	27.8 ± 15.9	56.7 ± 6.4	15.5 ± 18.3	-
4.5-5.0	-	-	-	24.5 ± 15.6	75.5 ± 18.1	-
5.0-5.5	-	-	-	9.0 ± 2.3	89.0 ± 8.0	2.0 ± 1.5
5.5-6.0	-	-	-	0.3 ± 0.4	90.8 ± 1.5	8.9 ± 0.8
6.0-6.5	-	-	-	-	83.3 ± 3.2	16.7 ± 6.6

^z - not detected

二、以 IFC 分析不同大小花蕾內小孢子之發育階段

使用與上述顯微鏡鏡檢相同來源及分級之花蕾作為 IFC 分析材料，並分別以 2 和 12 MHz 兩種電頻波進行檢測 (圖 2-圖 3)。為了區別樣品中不具活性或死亡之小孢子族群，在預備試驗中將 2 個花椰菜品種的新鮮小孢子懸浮液以 100°C 加熱 10 min，使小孢子喪失活性後再以 IFC 進行檢測，可成功顯示出死亡小孢子的族群位置 (圖 1 右欄)；同時將兩栽培種未經 100°C 處理之新鮮小孢子懸浮液以 IFC 進行檢測，結果如圖 1 左欄所示，再從中將右欄所示不具活性或死亡細胞的族群劃分出來 (圖 1. A 及 B 之縱向黑線)，黑線右側所呈現之細胞族群代表具有活性之細胞 (圖 1)。

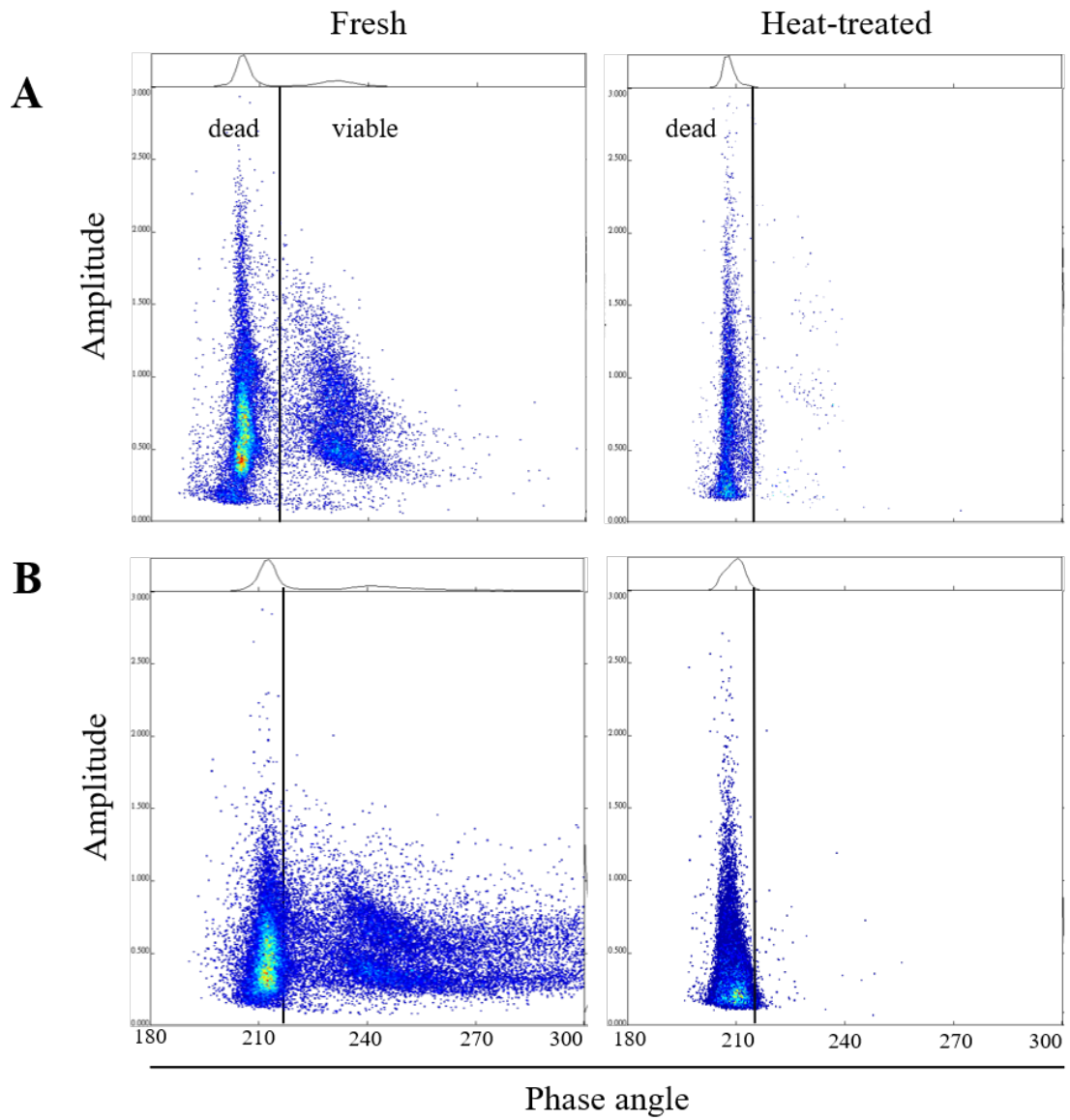


圖 1. 利用 IFC 以 12 MHz 電頻波檢測活性與死亡花粉族群之分析圖型。新鮮花粉 (左)與經 100°C 加熱處理 10 min 之無活性花粉 (右)。(A) '慶農 H-37'；(B) '農友極早生'。

Fig. 1. Identification of viable and dead pollen population using IFC performed at 12MHz. Fresh pollon (left) and pollen inactivated at 100°C for 10 min (right). Cauliflower cultivars 'Chinglong H-37' (A) and 'Know-you Farmer extra early' (B).

花椰菜'慶農H-37'在2.5-3.0 mm花蕾 (stage I)的小孢子發育階段，以DAPI螢光染劑對細胞核染色，並以光學及螢光顯微鏡觀察細胞外型 and 記錄小孢子的發育階段，結果顯示此分級花蕾中主要為單核早中期和單核晚期的小孢子 (表1與圖2-stage I之DAPI)；利用IFC以2 MHz及12 MHz進行檢測的結果顯示，除圖型最左側喪失活性族群外，並在2 MHz分析有一與之並排且細胞分布緊密族群出現於橫軸為相位角 (phase angle)的中間位置 (160° - 180°)，此族群被認為是單核早中期之細胞，同時還有相位角向右邊延伸及向上偏移的2個族群，推測平行向右延伸者為單核晚期的小孢子族群，而向上偏移之族群為雙核早期，在12 MHz亦有相似之分析圖 (圖2- stage I之IFC)。在3.0-3.5 mm花蕾 (stage II)的小孢子發育階段，鏡檢結果比例最高者為單核晚期 (表1與圖2- stage II之DAPI)，IFC在2 MHz及12 MHz分析的圖與stage I相較，其向右邊延伸的族群分布更為均勻 (圖2-I和II之IFC)；在3.5-4.0 mm (stage III)及4.0-4.5 mm (stage IV)花蕾的小孢子發育階段，鏡檢結果兩者皆以雙核早期佔有最高之比例(表1與圖2- stage III和stage IV之DAPI)，此階段之細胞外型有明顯變大 (圖2- stage III和stage IV之Optics)，stage III及stage IV之分析圖於2 MHz及12 MHz皆顯示有振幅一高一低的兩個族群，差別在於stage III的兩族群偏向相位角右側，推測振幅低者為單核晚期，振幅高者為雙核早期之族群，而stage IV在2 MHz分析圖中相位角中間位置 (160° - 180°)有一向上發展之族群其細胞密度漸高，推測為雙核中晚期 (圖2-stage III和stage IV之IFC)；在4.5-5.0 mm (stage V)和5.0-5.5 mm (stage VI)花蕾的小孢子發育階段，鏡檢結果皆以雙核中晚期為主 (表1與圖2- stage V和stage VI之DAPI)，IFC以2 MHz及12 MHz分析的圖型，顯示有兩個族群皆於相位角相同的位置，但振幅呈現高低差異，推測在stage V圖中振幅較低者為雙核早期，及振幅較高者為雙核中晚期族群 (圖2-stage V和stage VI之IFC)。在5.5-6.0 mm (stage VII)和6.0-6.5 mm (stage VIII)花蕾的小孢子發育階段依鏡檢結果主要為雙核中晚期，並可見少數的三核期 (表1與圖2- stage VII和stage VIII之DAPI)，在IFC於2 MHz及12 MHz的分析圖中，2個電頻波所分析的圖皆顯示存活之細胞振幅皆持續向上提升，其中振幅較低的雙核中晚期細胞族群更為集中，故推測振幅在較高處者為三核期之細胞族群 (圖2- stage VII和stage VIII之IFC)。

同樣以IFC分析花椰菜'農友極早生'不同大小花蕾內小孢子之發育階段，stage I鏡檢結果為單核早中期 (表2與圖3- stage I之DAPI)，IFC於2 MHz及12 MHz分析圖中皆具2個族群，其一證實為死亡細胞族群位於左側，另一個位置偏右的族群推測為單核早中期的細胞族群 (圖3- stage I之IFC)；stage II和stage III花蕾內的小孢子發育階段，鏡檢結果主要為單核晚期(表2與圖3- stage II和stage III之DAPI)，IFC於2 MHz及12 MHz分析圖單核早中期之細胞族群朝向相位角朝右邊擴散成為單核晚期，其中以12 MHz有較廣之相位角延伸的族群分布 (圖3- stage II和stage III之IFC)；stage IV鏡檢結果主要為雙核早期 (表2與圖3- stage IV之DAPI)，其IFC以2 MHz及12 MHz分析圖型與stage III相似，但位於相位角中間位置 (160° - 180° 或 210° - 240°)之雙核早期族群較為密集，此外，在2 MHz分析圖中雙核早期之族群相較於stage III亦有向上發展之趨勢，推測為雙核中晚期細胞族群之分布位置

(圖3- stage III和stage IV之IFC)；在stage V、stage VI及stage VII鏡檢結果皆為雙核中晚期為主(圖3- stage V到stage VII之DAPI)，並且在細胞外型上體積也隨著花蕾發育而變大(圖3 stage V到stage VII之Optics)，在IFC以2及12 MHz分析之圖型皆相似，位於相位角中間位置的細胞族群逐漸向上提升之趨勢，並以2 MHz有較明顯的振幅變化，位於較低振幅位置 (0.7-1.0)之雙核中晚期的細胞族群細胞訊號逐漸密集 (圖3- stage V到stage VII之IFC)；在stage VIII其鏡檢結果主要為雙核中晚期，但亦有部分之三核期 (表2與圖3- stage VIII之DAPI)，在IFC於2 MHz分析之圖型可明顯在相位角中間位置 (160° - 180°)有振幅一高及一低之細胞族群，較低振幅 (0.7-1.0)為雙核中晚期之族群，族群細胞訊號呈現高度密集的淺藍色，相較於stage VII有向上發展之現象，另一於振幅較高且傾向左側發展之細胞族群則為三核期 (圖3- stage VII和stage VIII之IFC)。

三、利用IFC建立之小孢子發育階段的途徑模擬圖

利用顯微鏡鏡檢兩個花椰菜栽培種於不同大小花蕾中的小孢子發育階段的結果 (表1與表2)與IFC以2 MHz及12 MHz分析所顯示的細胞族群位置進行關聯性連結 (圖2與圖3)，經由Amphasoft 2.0軟體中的圈選工具，將上述'慶農H-37'及'農友極早生'的小孢子發育階段在IFC分析圖型中加以圈選，6個區塊分別為死亡細胞、單核早中期、單核晚期、雙核早期、雙核中晚期和三核期，建立小孢子發育過程之模擬圖 (圖4)，由於發育階段是一種連續性的轉變，因此IFC分析圖型中不同族群的分布位置會有重疊的現象，故於模擬圖中也是如此呈現，在模擬圖中以黃色線的行進方向代表小孢子經配子體發育途徑的變化趨勢。

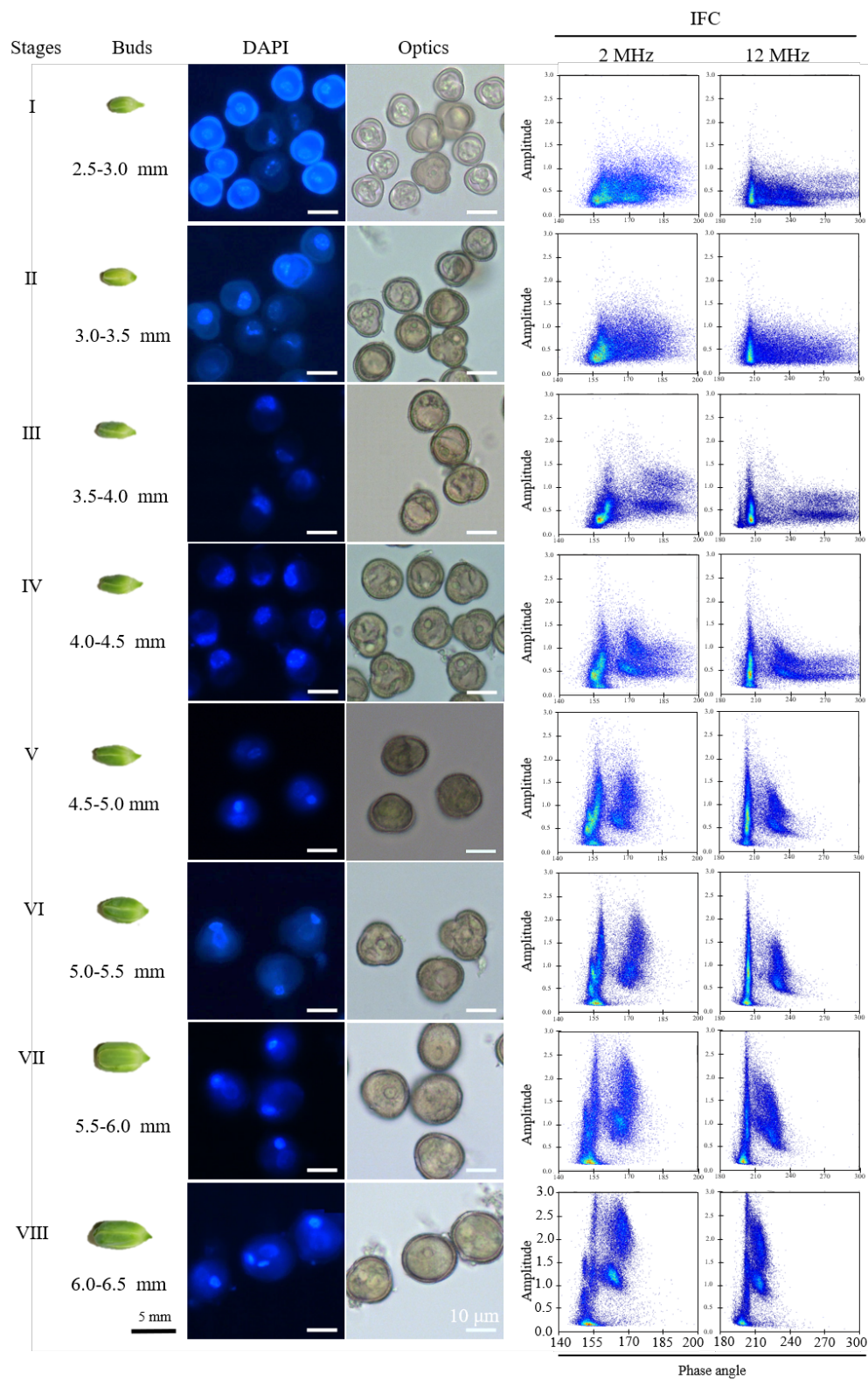


圖 2. 花椰菜'慶農H-37'不同大小花蕾內的小孢子以螢光(DAPI)、光學顯微鏡(Optics)觀察，以及利用IFC以2及12 MHz分析之圖型。各級花蕾之顯微鏡觀察照片以其最主要之發育時期為代表(I-VIII)，(I)單核期；(II)單核晚期；(III-IV)雙核早期；(V-VII)雙核中晚期；(VIII) 雙核期及三核期；Black bar = 5 mm；White bars = 10 μ m。

Fig. 2. Microspore developmental stages observed from various size of flower buds of cauliflower 'Chinglong H-37' using fluorescence (DAPI stain), optical microspore, and IFC analyzed at 2 and 12 MHz. Pictures other than IFC histogram were the images representing the major developmental stage of microspore in each size of flower bud (I-VIII), (I) uni-nucleate, (II) late-uninucleate, (III-IV) early-binucleate, (V-VII) middle- and late-binucleate, (VIII) binucleate and tri-nucleate. Black bar = 5 mm, White bars = 10 μ m.

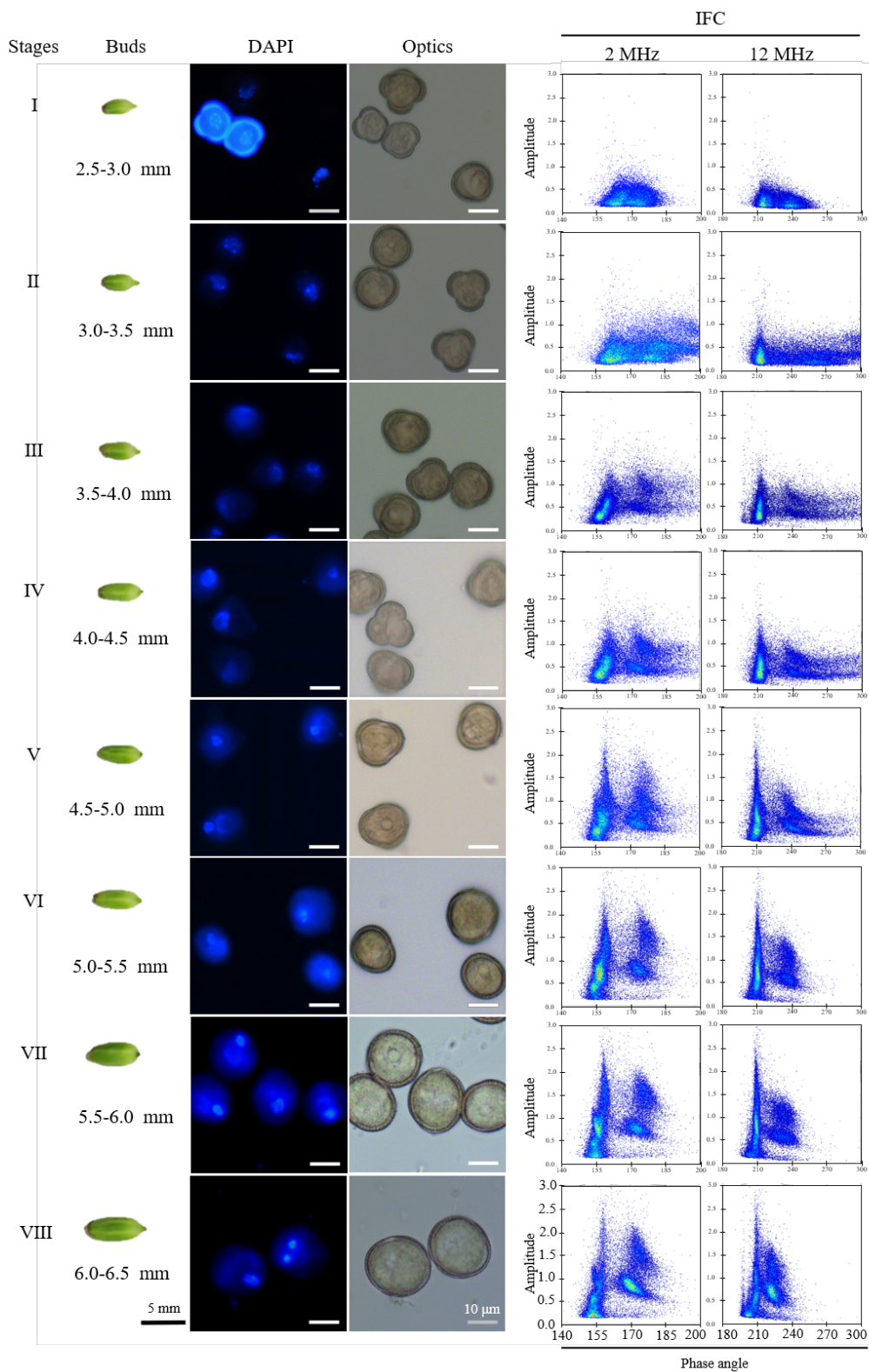


圖 3. 花椰菜'農友極早生'不同大小花蕾內的小孢子以螢光(DAPI)、光學顯微鏡(Optics)觀察，以及利用IFC以2及12 MHz分析之圖型。各級花蕾之顯微鏡觀察照片以其最主要之發育時期為代表(I-VIII)，(I)單核早中期；(II)單核晚期；(III-IV) 單核晚期及雙核早期；(V-VII)雙核中晚期；(VIII)雙核期及三核期；Black bar = 5 mm；White bars = 10 μm 。

Fig. 3. Microspore developmental stages observed from various size of flower buds of cauliflower 'Know-you Farmer extra early' using fluorescence (DAPI stain), optical microspore, and IFC analyzed at 2 and 12 MHz. Pictures other than IFC histogram were the images representing the major developmental stage of microspore in each size of flower bud (I-VIII), (I) early- and middle-uninucleate, (II) late-uninucleate, (III-IV) late-uninucleate and early-binucleate, (V-VII) middle- and late-binucleate, (VIII) binucleate and tri-nucleate. Black bar = 5 mm, White bars = 10 μm .

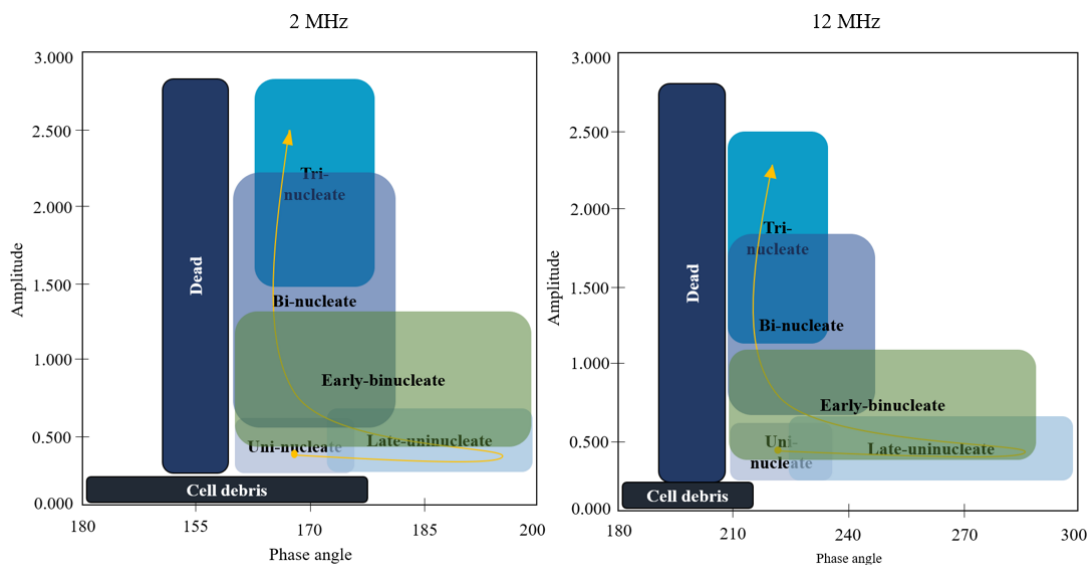


圖 4. 花椰菜利用 IFC 以 2(左)及 12(右) MHz 分析之小孢子發育過程的模擬圖。黃色線為配子體發育進行途徑。

Fig. 4. Simulation model of microspore developmental pathway of cauliflower using IFC performed at 2 (left) and 12 (right) MHz. Yellow line represents the microspore developmental pathway of gametogenesis.

討 論

在十字花科作物的小孢子培養操作上，選取適當大小之花蕾其中含有較高比例適合培養的小孢子發育階段，是小孢子培養於實務上經常使用的策略，但不同花椰菜栽培種其相同大小花蕾內小孢子發育階段是否一致，以及如何提高小孢子發育階段的判別率，是本研究中想要探討的問題。Winaro和da Silva (2011)使用印尼不同地區3個花椰菜栽培種'Babat'、'Graung'及'Kemeh' 取4.4-4.7 mm花蕾並以0.1 mm為分級的間距，發現3個栽培種皆於4.5-4.6 mm分級花蕾中含有最高比例介於單核晚期到雙核早期之小孢子，然而在Bhatia等人(2016)則提出花椰菜早生種之4.0-4.5 mm花蕾與中晚生種4.5-5.0 mm之花蕾，同樣含有最高比例單核晚期到雙核早期發育階段的小孢子，顯示早生種的花蕾會比中生種小約0.5 mm。本研究中的供體植株花椰菜'慶農H-37'及'農友極早生'屬於極早生種，根據顯微鏡調查，兩者皆於3.5-4.0 mm有高達95%的小孢子是介於單核晚期及雙核早期之間(表1和表2)，與前人研究早生種的結果相較，極早生種的花蕾其培養適期又更小約0.5 mm，推測較早熟之品種其花蕾發育較快，因此花蕾在較小時即已達適當之小孢子發育階段；另外，2個花椰菜栽培種其單核晚期與雙核早期比例高於50%之花蕾大小，在'慶農H-37'為2.5-4.5 mm(表1)，而'農友極早生'則為3.0-4.5 mm(表2)，從中可知'慶農H-37'小孢子的發育階段較'農友極早生'提前，且依鏡檢資料顯示，'慶農H-37'在小孢子發育階段有較長的時間停留在單核晚期到雙核早期(stage I到stage IV)，顯示基因型對於小孢子發育階段具有關鍵影響力，不同栽培種若欲取得較高比例之最適小孢子的發育階段，宜以0.5 mm間距進行花蕾分級建立調查資料，有助精確判別小孢子的發育階段。

在本研究中嘗試以IFC分析不同花椰菜栽培種之小孢子發育階段並建立其發育過程中細胞族群的變化趨勢。小孢子的發育階段可利用顯微鏡依據小孢子的細胞大小、外型差異及細胞核型與核數變化作為判別依據，但實際操作的效率偏低 (Pechan and Keller, 1988)。Heidmann等人 (2016)以不同大小菸草花蕾利用鏡檢觀察和IFC分析加以相互對照，並建立的IFC小孢子發育階段分析圖，與本研究以花椰菜花蕾利用IFC於2.5-5.0 mm及4.5-6.5 mm檢測的結果有相似之處(圖2和圖3)。其一為單核晚期到雙核早期的細胞族群於IFC分析圖中皆顯示皆具有相位角向右發展之趨勢；其二為雙核晚期與三核期的細胞族群則會有逐漸集中並趨向相位角左側往死亡或喪失活性之細胞族群靠近。此一結果顯示IFC於不同植物的小孢子發育階段的分析有其相似之處。

Heidmann等人 (2016)利用番茄、甜椒及小黃瓜的小孢子施以梯度高溫加熱處理並調查其細胞存活率，結果顯示IFC判別細胞存活率的功能與人工判讀的結果具有高度相關性。本研究中使用不同大小花蕾以IFC分別檢測其細胞存活率，2個花椰菜栽培種除了2.5-3.0 mm花蕾尺寸外，其餘花蕾之細胞存活率皆不低於50%(數據未顯示)，此結果與Schulze and Pauls (1998)和Winarto and da Silva (2011)將新鮮花椰菜花蕾採收，並分離出小孢子後調查其細胞存活率介於50%左右相似。本研究中以在IFC於12 MHz分析所示，小孢子在

發育初期具有較高之活性，如'慶農H-37'之55.9%及'農友極早生'之60% (數據未顯示)，但發育階段大於3.0 mm之小孢子存活率皆低於培養細胞總數的50%。

花椰菜不同大小花蕾內小孢子發育階段以IFC分析研究之相關的參考文獻相當少，故為本研究的目標之一。目前所知為IFC廠商 (Amphasys)所提供的花粉相關研究資料，分別為小麥、馬鈴薯及玉米經由鏡檢調查小孢子的發育階段，再與IFC分析，所建立之小孢子發育過程的模擬圖 (Amphasys官方網站technical notes)。本研究亦利用IFC以2 MHz及12 MHz分析花椰菜由小至大花蕾中小孢子細胞族群的變化，建立花椰菜之IFC小孢子發育過程模擬圖，提供後續進行花椰菜小孢子培養時能有效選擇最適合之小孢子發育階段。

整體而言，雖然 IFC 對於分析花蕾中小孢子發育階段之精準程度不及鏡檢觀察，但在材料準備上與檢測效率上則較鏡檢操作簡易且省時，IFC 在 5 分鐘內可分析 30,000 個小孢子，然而以人工鏡檢調查 5 分鐘還不到 300 個小孢子，且須熟練之技術人員及先行染色才能操作；另外 IFC 對小孢子細胞的判定方式係依據標準一致的參數設定，其結果相較人為的調查更為客觀，且 IFC 除了分辨小孢子發育階段之外，並能從中得知小孢子整體的細胞活性，有助於提升數據結果的準確度以及可信度。綜合來看，以 IFC 分析作為判定小孢子發育階段之依據，其結果呈現之趨勢在同一物種內之各栽培種應相當類似，但在不同種作物間可能差異較大，建議仍須先透過鏡檢調查配合 IFC 分析圖型建立兩者之相關性後再加以利用。IFC 儀器分析具有大量且快速的特性，若妥善應用可作為細胞發育階段與活性相關研究之利器，對目前小孢子培養技術效率的提升亦有相當之助益。

參 考 文 獻

- 丁川翊、郭大維。2016。全球蔬菜種子產業概況。財團法人農業科技研究院產業發展中心:1-10。
- 夏奇鈺、陳威臣、曹進義、周宜玫、林子凱。2017。花椰菜小孢子培養技術之研究。台灣農業研究 66: 94-104。
- 謝明憲、許涵鈞、王仕賢。2011。十字花科芸薹屬蔬菜育種趨勢與生技應用概況。農業生技產業季刊 25: 46-52。
- Bhatia, R., S. Dey, C. Parkash, K. Sharma, S. Sood, and R. Kumar. 2018. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India. *Sci. Hortic.* 233: 178-187.
- Cheung, K. C., M. Di Berardino, G. Schade-Kampmann, M. Hebeisen, A. Pierzchalski, J. Bocsi, A. Mittag, and A. Tárnok. 2010. Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytometry A*

- 77: 648-666.
- Custers, J. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.), p. 185-193. In: K. K. J. Maluszynski M., Forster B.P., Szarejko I. (eds.). Doubled haploid production in crop plants. Springer, Dordrecht.
- Heidmann, I., G. Schade-Kampmann, J. Lambalk, M. Ottiger, and M. Di Berardino. 2016. Impedance flow cytometry: a novel technique in pollen analysis. Plos one 11: 1-15.
- Pechan, P. and W. Keller. 1988. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. Physiol. Plant. 74: 377-384.
- Robinson, J. P. 2004. Flow cytometry. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering 3: 630-642.
- Schulze, D. and K. P. Pauls. 1998. Flow cytometric characterization of embryogenic and gametophytic development in *Brassica napus* microspore cultures. Plant Cell physiol. 39: 226-234.
- Shmykova, N., D. Shumilina, and T. Suprunova. 2016. Doubled haploid production in *Brassica* L. species. Russ. J. Genet. Appl. Res. 6: 68-77.
- Silva, T. D. 2012. Microspore embryogenesis In: Embryogenesis. Sato KI (ed). InTech. p. 578
- Takahira, J., A. Cousin, M. N. Nelson, and W. A. Cowling. 2011. Improvement in efficiency of microspore culture to produce doubled haploid canola (*Brassica napus* L.) by flow cytometry. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 104: 51-59.
- Winarto, B. and J. A. T. da Silva. 2011. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 107: 305-315.

Application of Impedence Flow Cytometry in Microspore Developmental Stages of Cauliflower

Bo-Ying Lin¹⁾ Chi-Ni Hsia²⁾ San-Gwang Hwang³⁾

Key words : Cauliflower, Late-uninucleate, Early-binucleate, Microspore culture

Summary

Utilization of microspore at suitable developmental stage is a critical factor for successful microspore culture. However, lack of efficiency in distinguishing microspore developmental stages is a problem in current methods. In this study, flower buds of cauliflower F₁ hybrids, with a length between 2.5-6.5 mm were collected and grouped with a 0.5 mm interval, then their microspores were subjected to impedance flow cytometry (IFC) analysis to investigate their developmental stages. Meanwhile, microspores obtained with the same method were stained with 4,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) to verify the developmental stages under a microscope. The microspore developmental stages verified by DAPI and the image models established by IFC were analyzed and compared thereafter. Our results showed that microspores at different developmental stages derived from small to large cauliflower flower buds may be distinguished with IFC at 2 and 12 MHz. In conclusion, the simulation model of microspore developmental pathway in cauliflower were successfully established by using IFC performed at 2 and 12 MHz. Furthermore, 'Chinglong H-37' and 'Know-you Farmer extra early' flower buds with sizes between 3.5-4.5 mm were found to contain high percentage of microspores at developmental stages between late-uninucleate and early-binucleate, and these two stages were corresponding to stage III and stage IV characterized by IFC analysis. In future, IFC may be applied to quickly and accurately determine the suitable size of flower bud containing microspores at suitable developmental stages for microspore culture, meanwhile detect the viability of microspore cell to improve the efficiency of microspore culture.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Researcher, Biotechnology Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Co-corresponding author.

3) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

葡萄耐淹水根砧篩選

葉 文 彬¹⁾ 謝 慶 昌²⁾

關鍵字：葉綠素螢光、生長量、葉片黃化、篩選指標

摘要：葡萄植株生長受栽培環境影響。近年來，臺灣極端天候（強降雨）出現頻率提高且強度增加，持續強降雨造成葡萄園淹水，導致葡萄生長勢衰弱。本研究目的為篩選耐淹水之根砧品種，以'巨峰'、'8B'、'5C'及'1202C'材料，調查淹水與排水回復對植株生長及葉綠素螢光影響，作為淹水耐受性評估指標。淹水第 21 天時'巨峰'葉片黃化率 25.4%，顯著較'8B'及'1202C'根砧高。'巨峰'淹水第 13 天後生長趨緩，第 17 天後幾乎停止生長；'8B'、'5C'及'1202C'至排水仍持續生長。另一方面，所有品種淹水第 21 天葉片 Fv/Fm 低於 0.69，顯著較其他淹水或排水時間低。本研究淹水及排水期間植株生長量及 Fv/Fm，根砧以'8B'對淹水有較高忍受性，其次為'5C'、'1202C'。淹水第 21 天 Fv/Fm 出現快速下降，期間生長量即有不同表現，以生長量作為淹水耐受性篩選參考似乎較快速。

前 言

葡萄 (*Vitis* spp.) 為葡萄 (Vitaceae) 多年生溫帶果樹，2018 年全球葡萄栽培面積超過 750 萬 ha，產量 7,300 萬 ton，產值達 700 億美金，為全球重要園藝產業及經濟果樹 (OIV)。葡萄品種繁多，臺灣主要栽培品種為'巨峰' (*Vitis vinifera* L × *V. labruscana* Bailey cv. Kyoho)，分布於中部彰化縣、臺中市、南投縣及苗栗縣，面積約 2,600 ha (2018 農業統計年報)，其中彰化地區約 1,200 ha，多為稻田轉作 (林，2004)，由於地下水位高，且近年極端天候引起強降雨，使葡萄園淹水，對產業造成嚴重威脅。

淹水逆境直接危害植物根系，造成根部缺氧 (hypoxia) 或無氧 (anoxia)、改變土壤營養及理化性質，對植物細胞代謝造成影響，嚴重者導致後續葡萄植株死亡。因根砧具有抗 (耐)

1) 國立中興大學園藝學系博士班學生。

2) 國立中興大學園藝學系兼任副教授，通訊作者。

不同土壤條件能力，且有效抵抗根瘤蚜危害，全球葡萄栽培多採用嫁接繁殖 (Gu, 2005; Novelli Dias *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2014)。由於歐美雜交種葡萄栽植適宜環境為夏乾冬濕的地中海型氣候，根砧耐淹水品種與程度，則研究相對比較少 (李等, 2013; Kawai, 1996)。另一方面，淹水通常是短暫性，逆境排除回復期是植株是否可復原關鍵且重要的時期 (Yeung *et al.*, 2019)。刁等 (2020)以不同淹水程度調查甜瓜生長，指出淹水抑制生長具可逆性，但回復情況與淹水時間及深度有關聯。

另外，淹水抑制植株生長量，與葉綠素含量降低、氣孔關閉、葉片老化及脫落，進而影響光合作用能力有關 (高, 1997; 潘和薛, 2012; Sairam *et al.*, 2008)。當植物遭遇逆境，光系統 II (PSII)反應中心會關閉，葉片吸收的能量以熱釋放佔 95-97%，其餘 2.5-5%則透過螢光釋放，因此，可利用螢光釋放量，作為估算作物對環境耐受性選拔工具 (姚等, 2002; 劉, 2011)。當植株逆境時 PSII 電子的傳導受影響，使葉綠素螢光比值 (Fv/Fm)降低，因此可作為逆境生理指標 (林等, 2012)。而植物為適應淹水逆境，在莖基部產生不定根 (adventitious roots)，以便於缺氧逆境中獲取更多氧氣以維持生存 (高; 1997; Jackson and Drew, 1984; Yamauchi *et al.*, 2018)。本試驗目的以臺灣目前常見之根砧 8B、5C 及 1202 為材料，調查淹水及排水後植株生長量及葉綠素螢光，比較不同根砧淹水耐受性，評估葡萄淹水逆境傷害篩選指標。

材 料 與 方 法

一、葡萄耐淹水根砧選拔

(一) 植物材料

試驗於臺中區農業改良場 (臺中場，東經 120°30'24"，北緯 24°01'07"，海拔 16-20 m) 進行，以該場保留之根砧品種'Teleki 8B' (*V. berlandieri* × *V. riparia*)、'Teleki 5C' (*V. berlandieri* × *V. riparia*)、'Couderc 1202C' (*V. vinifera* × *V. rupestris*)及商業品種'巨峰'一年生自根苗為材料。種植於寬 5.5 吋高 5 吋之塑膠軟盆。介質為一般田土：泥碳苔=1：1 之比例。2018 年 4 月 16 日進行修剪催芽，萌芽後第 15 天施用台肥 1 號 (N：P：K=20：5：10)一次，每植株 20 g，病蟲害依植物保護資訊查詢系統推薦用藥進行防治處理。

(二) 淹水處理

2018 年 5 月 22 日 (萌芽後第 36 天)將植株移置臺中場覆有綠色塑膠網，遮蔭達 50% 之網室進行。選擇生長勢一致，已有 7 片完全展開葉之植株。將盆栽植株放置於約 84 L (L×W×H=60×38×37 cm)之大型塑膠方桶，水量添加至盆栽容器 1.5 倍，將容器完全淹沒後，在水面遮蓋塑膠布，以降低土溫變化及水分蒸散，每處理 3 盆，每盆為 1 重複，以不淹水為對照組。淹水處理 21 天後，將植株取出移至室外，模擬降雨後排水回復期間晴天之條件。

(三) 淹水期間及排水後植株生長量及性狀調查

- 1、植株生長量：淹水前所有試驗植株，由萌芽處為基準點量測至頂端處，為第 0 天之高度，然後於淹水及排水期間調查生長量，第 2、5、9、13、17 及 21 天為淹水期間之生長量，第 26、36 及 56 天為排水後之生長量。同時計算並紀錄植株節數，節間長度則以株高÷節數換算之，單位為 cm。
- 2、葉片黃化百分率：調查各植株枝條上所有葉片黃化情形，計算方式：單株黃化葉片數÷總葉片數×100%。
- 3、不定根的產生及其直徑調查：淹水及排水後回復期間，介質上方植株不定根產生情形，不定根長度超過 2 cm 者記錄之，再以數位式游標卡尺（日本製，型號：CD-8"ASX, Mitutoyo Corp.），量測距基部 1 cm 處之不定根直徑（最小表示量為 0.01 mm）。

(四) 葉綠素螢光：

植株淹水及排水期間量測葉片葉綠素螢光 (Fv/Fm)，利用攜帶式葉綠素螢光測定儀 (portable chlorophyll fluorometer, MINI-PAM, Walz, Germany Ltd., Effeltrich, Germany) 測定。其探針藉由特殊光纖 (Special Fiberoptic 2010-F) 提供測定光及飽和脈衝光，測得 Fo 及 Fm 值，計算光系統 II 的活性，以 Fv/Fm 表示。Fo 為最小螢光釋放量；Fm 為最大螢光釋放量；Fv = Fm - Fo，為光系統 II 反應中心所釋放的螢光量，代表具活性的光系統 II 量；Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm，光系統 II 的活性，可描述光合作用胞器之生理狀態。測量植株由基部算起第 7 片完全展開葉，標定測定點，葉片測量前先以葉夾暗馴化 30 mins。量測時間同 (三)1。

結 果

1. 淹水對生長量、節數及節間長之影響

淹水 21 天品種間枝條生長量具顯著差異。表 1 顯示淹水期間'8B'生長量為 55.3 cm，顯著較'巨峰'的及'1202C'的 37.3 cm 高，與'5C'的 41.8 cm 無顯著差異。對照組以'5C'生長量 69.7 cm 顯著較'巨峰'的 29.5 cm 高，相差 2.3 倍以上，也顯著較'8B'及'1202C'高。另'1202C'對照組生長量顯著高於淹水處理組；'巨峰'、'8B'及'5C'淹水與對照組生長量無差異。淹水處理各品種間節數無顯著差異，平均 7.0-8.0 節；不淹水處理品種間具顯著差異，'5C'平均 9 節，顯著較'巨峰'的 4.3 節高，相差 2.1 倍；各品種淹水與對照組節間數無差異。節間長度，淹水處理以'8B'的 7.0 cm 顯著較'巨峰'的 3.8 cm 及'1202C'的 5.0 cm 長，'8B'與'5C'無顯著差異；對照組則無差異，介於 6.1-7.7 cm；另外，'巨峰'對照組節間顯著較淹水處理長。

2. 淹水期間葉片黃化及不定根產生情形

不同品種葡萄經 21 天淹水處理，植株下位葉（靠近修剪處）陸續出現黃化現象，表 2 顯示'巨峰'葡萄總葉片黃化率為 25.4%，'5C'為 23.6%，顯著較'8B'的 5.6%及'1202C'的 8.3% 高，相差 4 倍以上；對照組（不淹水處理）則無葉片黃化現象。'巨峰'及'1202C'淹水處理 3

株均產生不定根，'8B'及'5C'只有 1 株產生不定根，葉片黃化情形與不定根產生似乎無關聯性；對照組完全未產生不定根。另外，不定根直徑以'1202C'最高，為 1.69 mm，顯著較'巨峰'、'8B'及'5C'高，較'巨峰'的 1.29 mm 高 0.4 mm。

表 1、淹水 21 天對不同葡萄品種植株生長、節數及節間長度之影響。

Table 1. Effect of waterlogging for 21 days on growth, nodes and internode length of different varieties grapevines.

Varieties	Shoot length (cm)		Node No.		Internode length (cm)	
	Control	waterlogging	Control	waterlogging	Control	waterlogging
Kyoho	29.5cA	26.5cA	4.3cA	7.0aA	7.2aA	3.8cB
8B	39.7bcA	55.3aA	5.7bcA	8.0aA	7.3aA	7.0aA
5C	69.7aA	41.8abA	9.0aA	7.0aA	7.7aA	6.1abA
1202C	50.2bA	37.3bcB	8.0abA	7.7aA	6.1aA	5.0bcA

^z Different small letter within columns indicate significant differences among cultivars and different capital letter indicate significant differences on different treatment by LSD at $P < 0.05$.

表 2、淹水 21 天對不同葡萄品種葉片黃化、不定根產生及不定根直徑之影響。

Table 2. Effect of waterlogging for 21 days on leaves yellow, adventitious root (AR) and AR dimeter of different varieties grapevines.

Treatments	Leaf yellow (%)		AR (%)		AR dimeter (mm)	
	Control	waterlogging	Control	waterlogging	Control	waterlogging
Kyoho	0.0	25.4a ^y	0.0	100.0	0.0	1.29b
8B	0.0	5.6b	0.0	33.3	0.0	1.44b
5C	0.0	23.6a	0.0	33.3	0.0	1.36b
1202C	0.0	8.3b	0.0	100.0	0.0	1.69a

^z Different letter within columns indicate significant differences by LSD at $P < 0.05$.

3. 淹水及排水後生長量變化情形

'巨峰'、'8B'、'5C'及'1202C'淹水第 2、5、9、13、17、21 天及排水第 26、36 及 51 天，處理組與對照組間無差異。'巨峰'葡萄植株生長量隨淹水時間增加，植株持續生長，第 17 天時生長量為 25.8 cm，顯著高於淹水第 2 天及 5 天的 4.2 及 9.3 cm，但自第 17 天後停止生長，對照組則持續生長，第 21 天生長量顯著高於第 2、5 及 9 天，但第 26 天後植株也

無再生長。'8B'淹水處理第 2 天後出現快速生長，由 5.8 cm 增加至第 21 天 55.5 cm，第 21 天與第 2 及 5 天間生長量具顯著差異；當排水移到室外後植株停止生長，第 26 天後開始再生長，至第 51 天增加 10 cm 為 65.3 cm；對照組持續生長，當排水移到室外第 21 天後，生長出現變緩慢現象。'5C'淹水期間增加 41.8 cm，排水後持續生長，至第 51 天為 53.2 cm，生長量顯著較淹水第 2 天高；對照組生長快速，第 51 天生長量顯著較第 2 及 5 天高。'1202C'與'5C'有類似趨勢，隨淹水及排水時間增加，植株持續生長，淹水第 21 天生長量 37.3 cm，顯著高於第 2 天的 4 cm 及第 5 天的 16.5 cm，但淹水 17 天至排水後第 36 天，生長速率有趨緩現象；對照組於移出室外時，出現停止生長情形(圖 1)。另一方面，圖 1 顯示，'巨峰'及'8B'為淹水處理生長量高於對照組，但'巨峰'第 17 天後為對照組高於淹水處理；'5C'及'1202C'則是對照組生長量高於淹水處理，但對照組移至室外時出現生長變緩慢趨勢，但排水期間與'8B'同樣持續生長。

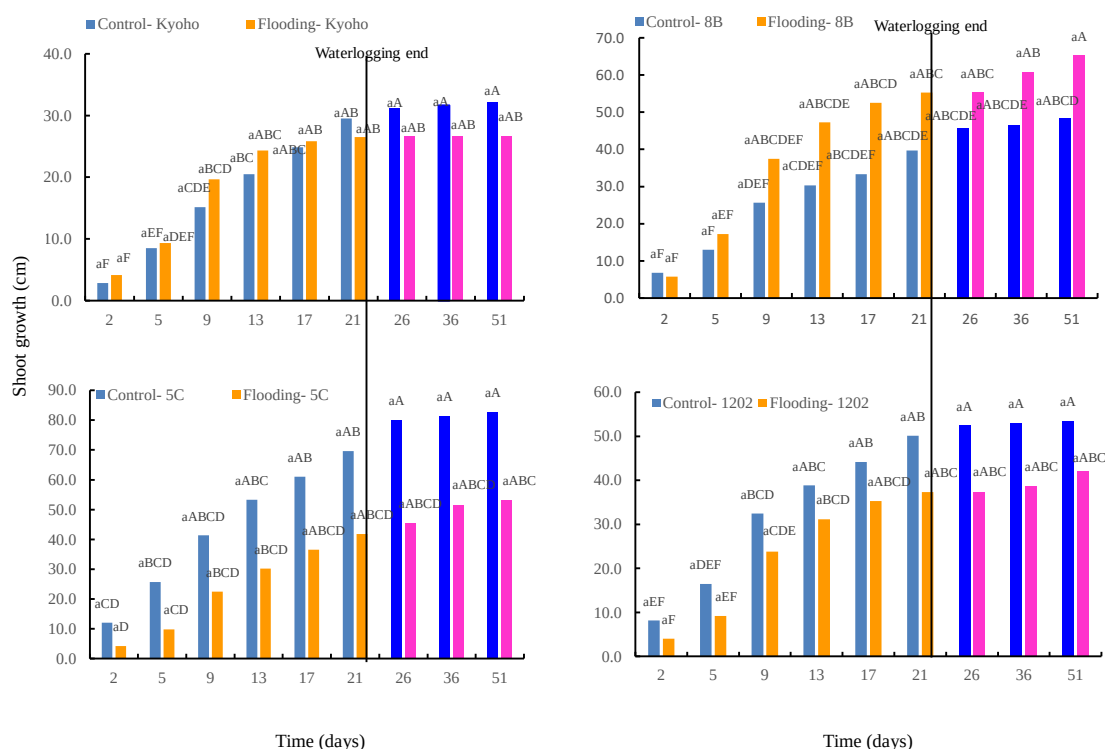


圖 1、不同葡萄品種淹水 21 天及其排水後第 26、36 及 51 天植株生長量之變化。

Fig. 1. Change of vine growth in different grape subjected to waterlogging for 2, 5, 9, 13, 17, 21 day s(■control, ■waterlogging) and 26、36 and 51 days for recovery (■control, ■waterlogging). Different small letter indicate significant differences between control and waterlogging on the same day and different capital letter indicate significant differences in different days by LSD test at $P < 0.05$.

4. 淹水及排水回復期間對葉片葉綠素螢光之影響

不同淹水時間對 Fv/Fm 具有不同影響，'巨峰'淹水第 2-17 天，Fv/Fm 介於 0.77-0.80 間，無顯著差異，淹水與對照組同樣無差異；但第 21 天淹水處理 Fv/Fm 下降至 0.69，顯著低於第 2、5、9 及 13 天，與第 17 天無顯著差異；排水後初期第 26 天 Fv/Fm 持續下降至 0.64，隨時間增加而回復，與第 36 及 51 天具顯著差異。'8B'、'5C'及'1202C'淹水第 2-17 天無顯著差異，淹水與對照組同樣無差異。但第 21 天與'巨峰'一樣，淹水處理 Fv/Fm 顯著較第 17 天低，'8B'及'5C'淹水與對照組無差異間，而'1202C'淹水處理 0.68 顯著較對照組 0.80 低。排水後'5C'及'1202C'第 26 天 Fv/Fm 顯著較第 51 天低，惟與'巨峰'及'8B'相同，隨排水時間增加，Fv/Fm 持續回升，較特別為排水後第 36 天'8B'、'5C'及'1202C'淹水處理 Fv/Fm 高於對照組，且'5C'及'1202C'持續至第 51 天。

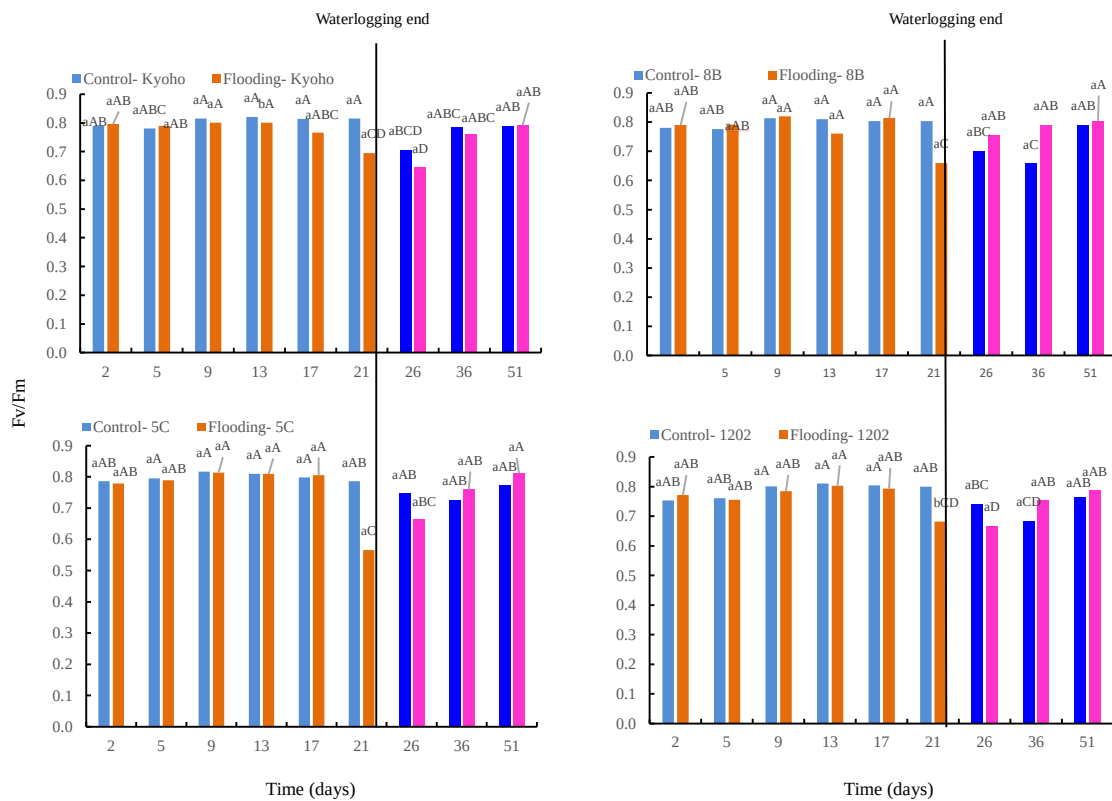


圖 2、不同葡萄品種淹水 21 天及其排水後第 26、36 及 51 天葉綠素螢光之變化。

Fig. 2 . Change of Fv/Fm in different grape subjected to waterlogging for 2, 5, 9, 13, 17, 21 days (■control, ■waterlogging) and 26、36 and 51 days for recovery (■control, ■waterlogging). Different small letter indicate significant differences between control and waterlogging on the same day and different capital letter indicate significant differences in different days by LSD test at P<0.05.

討 論

對多數植物而言，長時間處於浸水或淹沒條件下無法存活，主要原因為淹水使植株根系面臨缺氧或無氧，導致植株生長受到阻礙 (Ashraf, 2012; Loreti *et al.*, 2016)。淹水嚴重影響作物生長與產量，植物為適應自然界的淹水環境，經過長期進化，逐漸產生適應策略 (王等, 2017)。當植物遭受淹水逆境，首當其衝為根部受到危害，改變根部生長及型態 (Ahmed *et al.*, 2002)。植物淹水於莖基部產生不定根，利用此新根可以部份取代原有根系的作用，為適應淹水環境的一種機制 (吳等, 2012; 高, 1997; Jackson and Drew, 1984; Yamauchi *et al.*, 2018)。本研究葡萄處於淹水狀態時，於介質上方莖基部產生不定根，'巨峰'及'1202C' 3株都產生，'8B'及'5C'僅 1 株產生，顯示葡萄產生不定根以調適淹水逆境，但不定根數量及粗細依品種而異 (表 2)。此外，淹水會造成植株生長緩慢，同時加速葉片老化及脫落，可有效降低冠根比，也是一種調適機制 (高, 1997)。但本試驗顯示，隨淹水時間增加，葡萄植株持續生長，生長量'8B' > '5C' > '1202C' > '巨峰'，其中'巨峰'在淹第 13 天後生長開始趨緩甚至停止，葉片黃化也高達 25.4%，植株並無萎凋現象，為'巨峰'調適淹水方式。至於根砧除產生不定根外，持續生長增加節數及葉片，當有更多健康無黃化葉片可進行光合作用，產生維持生命之能量，以抵抗淹水逆境。然而，不定根產生數量、葉片黃化及植株生長量三者間似乎無關聯性。

淹水雖然通常是短暫性，但逆境排除回復期對植株具關鍵性影響 (Yeung *et al.*, 2019)。刁等 (2020)研究不同淹水程度對甜瓜 (*Cucumis melo* L.)生長影響，指出淹水抑制生長具可逆性，但回復情況與淹水時間及深度有關聯。本研究結果，'巨峰'葡萄淹水 21 天，排水回復期間幾乎無生長量，而'8B'、'5C'及'1202C'持續回復生長，但生長量有變低之趨勢，且排水後回復時間延長 (圖 1)。而在正常環境下，植物 Fv/Fm 值趨近於固定數 0.832 ± 0.004 ，若低於 0.8 可視為植物處於高溫與乾旱逆境 (林等, 2012; Demmig and Bjorkman, 1987; Kitao *et al.*, 2000)；李等 (2013)以'Cabernet Sauvignon'葡萄嫁接於不同根砧進行處水處理，葡萄葉片光化學效率介於 0.73-0.77 之間，說明淹水對葡萄葉片 PSII 已造成影響。本試驗結果顯示，淹水處理第 21 天 Fv/Fm 下降至 0.69 以下，'5Cv'甚至只有 0.57 (圖 2)，顯示長時間淹水對葉片已造成影響，Fv/Fm 快速下降，但排水後又逐漸回復。Lee and Lee (1989)進行果樹作物耐淹水試驗，鮮食葡萄'Delaware'較'巨峰'及'Campbell Early'等品種耐淹水；根砧以'SO4'及'101-14'較'99R'、'3306'及'1447P'耐淹水，顯示葡萄品種耐淹水程度差異大，另該研究結果將葡萄歸類於相對耐淹水之果樹。本研究結果顯示，不同葡萄品種淹水 21 天，然後排水回復 30 天，植株生長量表現差異顯著，另 Fv/Fm 淹水第 21 天雖然下降至 0.69 以下，但無植株出現萎凋或死亡現象，或許葡萄是耐淹水果樹作物。

另一方面，淹水逆境造成植物生長受到抑制，以土壤營養缺乏因素大於毒素影響 (Steffens *et al.*, 2005)。因此，葡萄淹水或排水後，需多久時間長出新根群，以吸收營養元素使生長勢回復，尚須進一步研究調查。另外，根砧品種對淹水有不同耐受性，Striegler

等 (1993)指出'3309'為耐淹水之葡萄根砧品種；Kawai 等 (1996)以植株莖與根生長，指出'AXR#1'為耐淹水根砧，'420A'為較不耐淹水之根砧。然而，葡萄採用根砧主要目的為抗根瘤蚜危害，隨後因應線蟲、適應鹼性石灰土、低 pH、乾旱及潮濕環境，陸續育成新的根砧品種 (李等，2016； Gu, 2005)。由於臺灣葡萄栽培多採用自根植株，另外，根砧品種少，未來除透過引種外，同時應進行育種作業，選出適合亞熱帶濕熱氣候條件，以因應氣候變遷引起強降雨之極端天候，穩定葡萄產業。

參考文獻

- 刁倩楠、蔣雪君、顧海峰、陳幼源、張永平、範紅偉。2020。淹水脅迫及恢復對不同品種甜瓜幼苗生長及其生理生化指標的影響。上海農業學報。36：44-52。
- 王露、張宇、楊旭。2017。蔬菜作耐澇性研究進展。中國蔬菜。11：14-20。
- 行政院農業委員會。2018。臺灣農業年報。
<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>
- 李超、白世踐、趙榮華、陳光、蔡軍社。2016。葡萄砧木及其應用的研究進展。農學學報。6：53-59。
- 吳麟、張偉偉、葛曉敏、唐羅忠。2012。植物對淹水脅迫回應機制研究進展。世界林業學報。25：27-33。
- 李豔、杜運鵬、付豔東、翟衡。2013。不同根砧嫁接的赤霞珠葡萄對淹水生理的回應。園藝學報。40：2105-2114。
- 林冠宏、黃薇綺、羅筱鳳。2012。高溫、淹水及乾旱對甘藷葉綠素螢光之影響。臺灣園藝。58：315-325。
- 林嘉興。2004。葡萄產業沿革與栽培技術之發展。葡萄栽培技術研討會專集。p.9-22。臺中區農業改良場特刊第 67 號。
- 姚銘輝、盧虎生、朱鈞。2002。葉綠素螢光與作物生理反應。科學農業。50：31-41。
- 高景輝。1997。淹水逆境下之植物生理。pp.27-35。果樹天然災害預防及復育手冊。臺灣省臺中區農業改良場特刊第 39 號。
- 劉敏莉。2011。葉綠素螢光在作物耐熱性篩選之應用。高雄區農業改良場研究彙報。21：1-15。
- 潘瀾、薛立。2012。植物淹水脅迫的生理學機制研究進展。生態學雜誌。31：2662-2672。
- Ahmed, S. E. Nawata, and T. Sakuratani. 2002. Effects of waterlogging at vegetative and reproductive growth stages on photosynthesis, leaf water potential and yield in Mungbean. *Plant Prod. Sci.* 5: 117-123.
- Ashraf, M. A. 2012. Waterlogging stress in plants: a review. *Afri. J. Agric. Res.* 7: 1976-1981.
- Demmig, B. and O. Bjorkman. 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photo yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171:

171-184.

- Gu, S. 2005. Effect of rootstocks on grapevines. Kentucky State University.
- Jackson, M. B. and M. C. Drew. 1984. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. *In*: Kozlowski, T. T.(ed.): Flooding and Plant Growth. pp. 47-128. Academic Press, Orlando.
- Kawai, Y., J. Benz, and W. M. Kliewer, 1996. Effect of flooding on shoot and root growth of rooted cuttings of four grape rootstocks. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65:455-461.
- Kitao, M., T. T. Lei, T. Koike, H. Tobita, Y. Maruyama, Y. Matsumoto, and L. H. Ang. 2000. Temperature response and photoinhibition investigated by chlorophyll fluorescence measurements for four distinct species of dipterocarp trees. *Physiol. Plant* 109: 284-290.
- Lee, D. K. and J. C. Lee 1989. Studies on flooding tolerance and its physiological aspects in fruit trees, 1. Flooding tolerance by cultivars in different fruit species. *The Korea Soc. Hortic. Sci.* 30: 215-223.
- Loreti, E., H. van Veen. and P. Perata. 2016. Plant responses to flooding stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33: 64-71.
- Novelli Dias, F. A., da Mota, R. V., de Souza, C. R., de Azevedo Pimentel, R. M., de Souza, L. C. and de Albuquerque Regina, M. 2017. Rootstock on vine performance and wine quality of 'Syrah' under double pruning management. *Sci Agric.* 74: 134-141.
- OIV. International Organisation of Vine and Wine. 2018.
(<http://www.oiv.int/oiv/cms/index?lang=en>).
- Sairam, R. K.; D. Kumutha, K. Ezhilmathi, P. S. Deshmukh, and G. C. Srivastava. 2008. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia Planta.* 52: 401-412.
- Steffens, D., B. W. Hütsch, T. Eschholz, T. Lošák, and S. Schubert. 2005. Water logging may inhibit plant primarily by nutrient deficiency rather than nutrient toxicity. *Plat Soil Environ.* 51: 545-552.
- Striegler, R. K., G. S. Howell, and J. A. Flore. 1993. Influence of rootstock on the response of Seyval grapevines to flooding stress. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 313-319.
- Walker, R. R., D. H. Blackmore, P. R. Clingeleffer, and D. Emanuell. 2014. Rootstock type determines tolerance of Chardonnay and Shiraz to long-term saline irrigation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20: 496-506.
- Yamauchi, T., T. D. Colmer, O. Pederson, and M. Nakazono. 2018. Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. *Plant Physiol.* 176: 1118-1130.
- Yeung, E., J. Bailey-Serres, and R. Sasidharan. 2019. After the deluge: plant revival post-flooding. *Trends in Plant Sci.* 24: 443-454.

Selection of Waterlogging-Tolerant Rootstock of Grape Vine

W. P. Yeh¹⁾ C. C. Shiesh²⁾

Key word: Chlorophyll fluorescence, Shoot growth, Leaves yellowing, Selection index

Summary

Grapevine growth is affected by cultivation environment. In recent years, the frequency and intensity of extreme weather (e.g. heavy rainfall) in Taiwan has been increased. Continuous heavy rainfall caused waterlogging in vineyard resulting in weak vine vigor. The objective of this study is to select waterlogging-tolerant rootstock of grape. 'Kyoho', '8B', '5C' and '1202C' were used as selection materials and the effect of waterlogging and drainage recovery on vine growth and chlorophyll fluorescence was evaluated for its possibility to serve as waterlogging tolerance selection index. After 21 days of waterlogging, the leaf yellowing of 'Kyoho' was 25.4%, which was significantly higher than '8B' and '1202C' rootstocks. 'Kyoho' vine growth was slow down after 13 days of waterlogging and the growth almost ceased after 17 days of waterlogging. In contrast, '8B', '5C' and '1202C' kept growing throughout waterlogging and drainage period. On the other hand, leaf Fv/Fm in all rootstocks tested was lower than 0.69 at 21 days of waterlogging, which was significantly lower than the value measured at any other time during the course of this study. Based on vine growth and Fv/Fm determined during waterlogging and drainage, '8B' rootstock has stronger waterlogging tolerance, followed by '5C' and '1202C'. Fv/Fm showed a rapid decline upon 21 days of waterlogging, but the vine growth displayed different performance among various rootstocks during waterlogging, it seemed that the vine growth may serve as a waterlogging tolerance selection index for rapid selection.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate professor. Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

臺灣低地栽培九華蘭生長調查

賴 科 竹¹⁾ 洪 惠 娟²⁾ 張 正²⁾

關鍵字：高溫、生存率

摘要：九華蘭屬於高單價國蘭品系，占臺灣國蘭栽培 1%。九華蘭的天然分布在海拔 3000 m 以上山區，臺灣屏東天氣四季炎熱，夏季日最高溫可到 38.3℃，冬季日最高溫 26.1℃，有相當多業者在此從事國蘭栽培。取九華蘭三品種'大一品'、'長壽梅'和'鄭孝荷'，對新芽萌發、追蹤芽體生長速度、花芽發育及芽體死亡數量進行調查。九華蘭週年有新芽萌發，每 4 週增加 0.02-0.32 芽/盆，3-5 月是新芽萌發高峰，每 4 週有 0.62 芽/盆，第二個高峰期在 8-10 月但增加數量較少，每 4 週 0.52 芽/盆，代表屏東季節溫度差可調節新芽萌發時期。葉片與株高在新芽萌發後 44-48 週內是主要增加時期，且集中在夏季增加，與大量新芽萌發後有關。新芽葉片數增加至成熟株的一半需 4-36 週；新芽生長高度至成熟株一半需 8-44 週，株高需要較長時間生長，且'長壽梅'與'鄭孝荷'幾乎在不同月份萌發新芽皆可達成，唯'大一品'達成的月份較少。可見花芽數量與開花數量少，'大一品'和'鄭孝荷'可見花芽較多，幾乎週年萌發，實際開花數 2-5 梗。

九華蘭三品種在 64 週有 1.8-2.3 芽/盆的增殖倍率，但存活率差異大 39.2-81.6%。新芽萌發符合季節，高溫期長利於營養生長，且生殖生長到抑制，利於將養分轉供應營養生長，因此在屏東平地栽培具有可行性。其他國蘭的原生環境並未如九華蘭需要的低溫，推測其他的國蘭在平地也能有正常的新芽萌發，適於在平地進行其他品種國蘭營養芽繁殖，使業者有更多樣的選擇，產業的豐富度增加。

1) 國立中興大學園藝學系研究生。

2) 行政院農業委員會臺中區農業改良場埔里分場研究助理、助理研究員。

3) 國立中興大學園藝學系教授、通訊作者。

前 言

九華蘭 *Cymbidium faberi* 相關栽培研究少，有擴大生產之潛力。台灣蕙蘭屬種植面積約 198 公頃，大多在中部淺山栽種，其中平地及低海拔占國蘭生產面積 70%，部分業者在屏東平地種植，因此在商業栽培下設計定期觀測試驗評估九華蘭在臺灣南部低地栽培對於高溫的耐候性以及整年環境相對高溫下營養與生殖生長的影響，藉由週年性調查可以歸納出臺灣南部種植國蘭之潛在優勢與相關議題。

此種分布範圍廣，在臺灣其生育環境在向陽面的草地或是稀疏樹林的區域，海拔高度介於 1500-3000 m 的區域，在臺灣自然環境下花期 2-4 月 (林, 1988)；中國的花期在 3-5 月，果期翌年 4-6 月 (劉等, 2006)。國蘭每年成熟假球莖會長出兩側芽，因此在正常情況下新芽增長率約每年 2 芽/成熟芽 (陳等, 1999)。根據王(2018)在多種介質的栽培試驗顯示每半年九華蘭側芽萌發數量各不相同，在拆芽栽培後第二年才可見在暑假有新芽萌發高峰，且芽數的增減約在每半年增加 0-2 芽之間，花芽萌發集中在 5-11 月。金華山報歲蘭在拆單芽繁殖與雙芽繁殖兩年後分別有 4 倍及 2.9 倍的增殖數量 (蘇, 2013)。冬春季開花的國蘭例如寒蘭、春蘭、報歲蘭等多在夏秋季花芽分化，其中九華蘭在 9-10 月可見到花梗，需經過 5 °C 低溫期才能順利開花 (孫等, 2011)，若花梗在較高溫狀態生長有花莖短縮甚至敗育狀況。此外王 (2018)對九華蘭用 0.5°C 處理一個月有顯著催花效果。若是花芽在較高的溫度有敗育與花莖縮短的可能 (孫等, 2011)。由於並未有詳細的平地栽培調查資料，本試驗使用 3 個市面上常見九華蘭品種'大一品'、'長壽梅'、'鄭孝荷'(關與朱, 2002)進行評估。

材 料 與 方 法

以屏東平地栽培九華蘭'大一品'、'長壽梅'、'鄭孝荷'三品種觀察記錄，於 2017 年 6 月中旬分株繁殖，以每盆二成熟芽分株，以碎石混花生殼為栽培介質，種植在五吋黑軟盆。九華蘭'大一品'、'長壽梅'、'鄭孝荷'各取樣 45、40、51 盆做調查，標記成熟芽。觀察平地栽培過程中九華蘭的側芽生長變化，試驗地點在屏東縣鹽埔鄉遮陰網室 (22°72'N, 120°53'S)，網室設雙層黑色遮光網，外層 80%、內層 60%，在離地 60 cm 床架栽培，栽培環境之溫度見附錄一。每日進行噴霧灌溉。每年施用兩次有機肥，一次緩效性粒肥好康多一號 (14N-12P₂O₅-14K₂O，180 天型，旭化成株式會社，日本)3-5 g/盆。

對成熟芽測量株高及葉片數；對新生側芽調查可見側芽數量、株高、葉數、可見花芽與開花時間；對可見芽持續調查芽數量、株高及葉片數。紀錄側芽死亡，並觀察敗育花序內部狀態。調查始於 2017 年 10 月，每四週調查一次，持續追蹤 64 週 (2017/10/1-2018/12/23)。將數據整理成隨時間的變化量與各時間點的變化量。調查項目的實際內容：

一、株高增加 (Increased shoot height):每四週調查自假球莖基部至最長葉片尖端距離增加量 (cm)。

二、葉片數增加 (Increased leaf number)：每個，每四週調查芽的真葉數增加量。

三、可見芽(Visible shoot):肉眼可見側芽突破鞘葉。

四、新芽存活率 (New shoot survival rate):觀察到可見芽在第 64 週時存活比例。

五、可見花芽 (Visible inflorescence):短花序生成且可清楚見到小花發育處膨大。

六、開花 (Flowering stalks):九華蘭花期短,從至少第一朵花開到花朵凋謝皆可視為開花。

七、新芽死亡率 (New bud death rate):新芽前一次調查有紀錄而本次沒有觀察到或死亡數量前一次調查總新芽數。

結 果

屏東平地最熱的時期在夏季,4月中旬到10月中旬間當日最高溫在33.2-38.3°C,日最低溫在21.6-25.3°C,日均溫在22.0-29.7°C;在相對冷涼的秋冬季節,12月到隔年4月,當日最高溫在16.4-26.1°C,日最低溫在10.1-24.1°C,日均溫在12.1-26.8°C(圖1)。當地高溫期有7個月,三品種的九華蘭在栽培期間新芽的增加量隨季節成顯著變化,且株高增加量、葉片數增加量的高峰也與新芽高峰有關,連帶芽死亡率也是落在高溫期。

在64週調查期間可見芽數量'大一品'與'長壽梅'5.0-5.5芽/盆顯著高於'鄭孝荷'2.9芽/盆;但芽存活率是'鄭孝荷'最高81.6%, '大一品'與'長壽梅'分別是39.2%與50.4%;換算後64週內新芽增加數'鄭孝荷'與'長壽梅'2.3芽/盆顯著高於'大一品'的1.8芽/盆(表1)。每4週調查的數據顯示3品種可見芽增加量夏季之後有峰值,第1個高峰落在3/16-5/11號,可見芽增加量可到每4週0.62芽/盆,其中'大一品'持續有較多新可見芽數到8/31;第2個高峰在8-10月,可見芽增加量可到每4週0.52芽/盆,平常時候可見芽增加範圍在每4週0.02-0.32芽/盆(圖2)。新芽葉片數隨著栽培時間有不同的增加量,在可見芽後44週內是重要的生長期,每四週增加0.3-1.2片/盆,'長壽梅'在40週後有較多的葉片數增加量是因為有少數幾個芽較晚開始生長所致(圖3A),新芽的株高的增加量在48週內是要增加時期,每四週增加6.5-6.7cm,'大一品'株高的高峰較晚出現,每4週增加8.1cm(圖3B)。

調查期間可見花芽數量少,最多的是'大一品',出現在10/1到隔年8/31,其次是'鄭孝荷',在4-6月及8-10月,'長壽梅'出現最少(圖4A)。開花數量更少,'大一品'在6/10、7/6及8/3分別開1朵花,'鄭孝荷'在4/13、6/10、7/6及8/3開花,'長壽梅'在1/20及12/23各開一朵(圖4B)。

三品種新芽死亡比例高,在觀察到可見芽後的24週內都有高死亡率,'大一品'、'長壽梅'與最高死亡率可到每4週29.6%及20.1%;'鄭孝荷'的死亡率在48-60週最高值33.3%,其死亡高峰延後(圖5A)。從不同時間點看,'大一品'、'長壽梅'在5/11-8/31有新芽死亡率高峰,最高新芽死亡率每4週分別34.7%與30.3%, '鄭孝荷'的死亡率高峰同樣延遲到12/2號後,最多每4週22.2%(圖5B)。

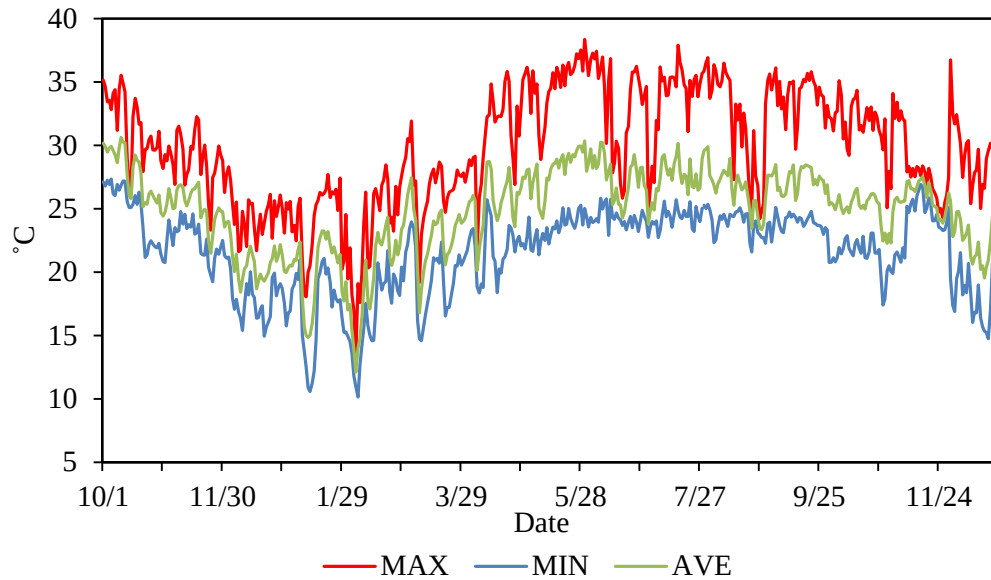


圖 1. 屏東遮陰網室 107/10/1-108/12/23 期間日最高溫(MAX)、日最低溫 (MIN)與日均溫 (AVE)變化。

Fig. 1. The changes of the daily highest temperature (MAX), daily lowest temperature (MIN) and average daily temperature (AVE) in shading-nets in Pingtung at 107/10/1-108/12/23.

表 1. 三品種九華蘭在屏東平地栽培 64 週後新芽數量變化。

Table 1 The new shoot growth of three *Cymbidium faberi* cultured in Pingtung low-land for 64 weeks.

	Number of samples (pot)	Visible shoot number/pot	New shoot survival rate (%)	Proliferation of new shoot number (buds/pot)
'Dayipin'	45	5.5 a	39.2 b	1.8 a
'Zhangshoumei'	40	5.0 a	50.4 b	2.3 a
'Zhengxiaohu'	51	2.9 b	81.6 a	2.3 a

Different letters within a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by LSD Test

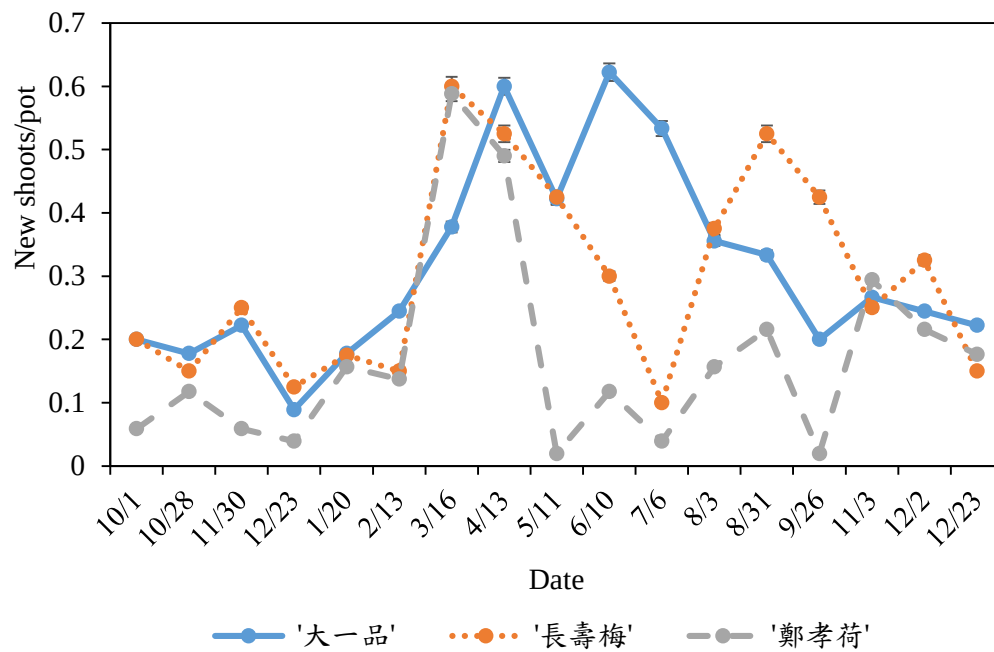


圖 2. 屏東平地栽培三品種九華蘭可見芽數量變化。

Fig. 2. The growth change of the visible shoot number in three *Cymbidium faberi* cultivars in Pingtung low-land.

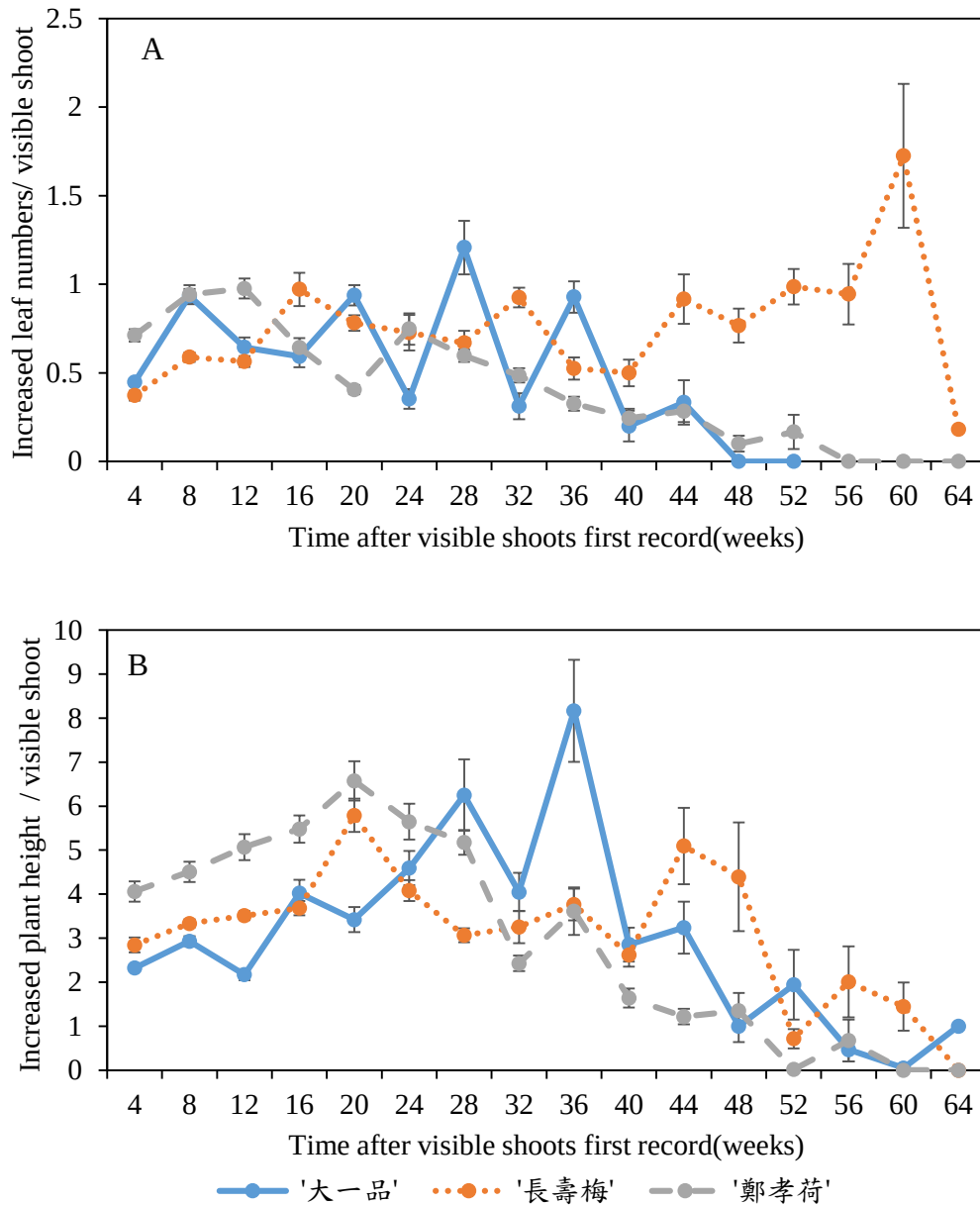


圖 3. 屏東平地栽培下三品種九華蘭新芽葉片數與株高增加情形。(A) 新芽平均葉片數隨時間增加量；(B) 新芽平均株高數隨時間增加量。

Fig. 3. The growth change of the visible shoot height in three *Cymbidium faberi* cultivars in Pingtung low-land (A) Increase in new shoot height after visible shoots first record ; (B) Increase in new shoot height in different time .

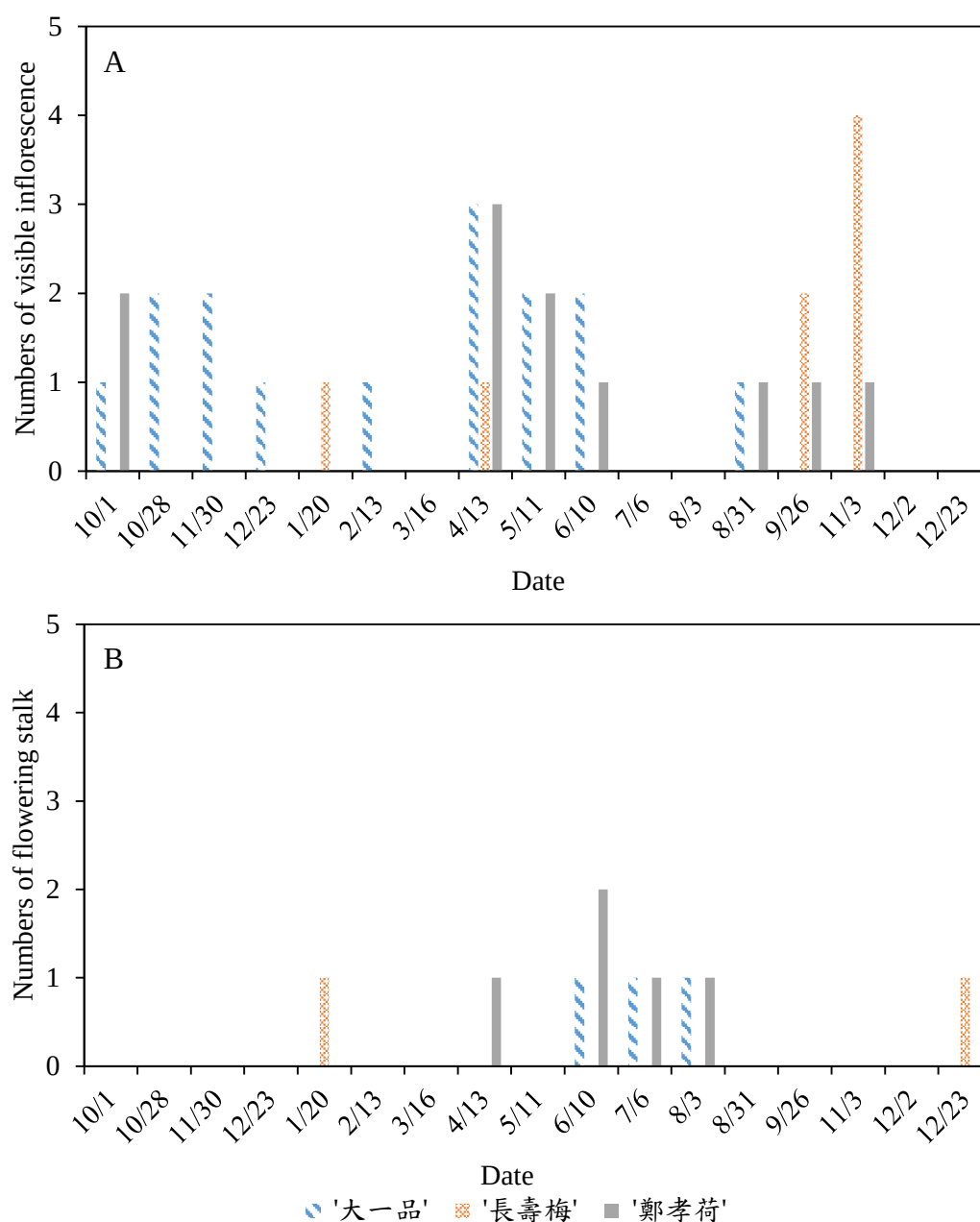


圖 4. 屏東平地栽培下三品種九華蘭花芽及開花紀錄。(A) 可見花芽數量；(B) 開花數量。

Fig. 4. The growth change of the Inflorescence and flowering stalks in three *Cymbidium faberi* cultivars in Pingtung low-land. (A) Numbers of visible inflorescence ; (B) Numbers of flowering stalks.

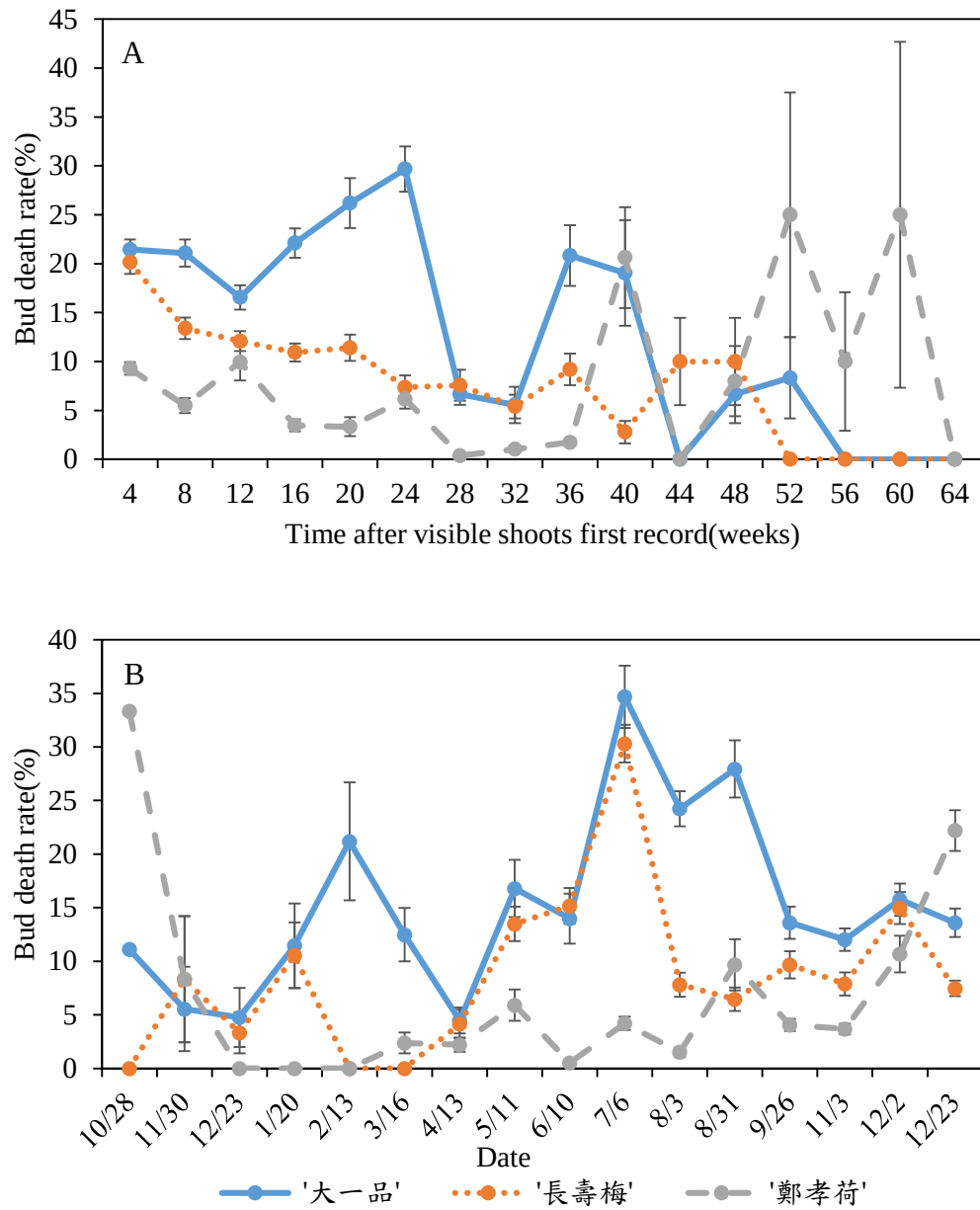


圖 5. 屏東平地栽培下三品種九華蘭可見芽死亡情形。(A) 側芽隨時間死亡百分比；B. 不同日期側芽死亡百分比。

Fig. 5. The growth change of bud death rate in three *Cymbidium faberi* cultivars in Pingtung low-land. (A) Death rate of three cultivar after visible shoots first record ; (B) Death rate of three cultivar in different time.

討 論

屏東平地週年有 7 個月的高溫期與 5 個月的相對低溫期，對於國蘭來說高溫期是營養生長旺盛的季節，屏東可提供充足的生長時間，這對營養繁殖的栽培模式來說有利，能縮短栽培所需時間，而相對低溫的時期恰好能彌補正常生長環境所需的低溫，使新芽萌發有季節性，且低溫期不足以讓九華蘭開花或開花品質差。

九華蘭三品種 64 週期間大一品有最多的可見芽增加量，但是新芽存活率最低，新芽增加數最少 (表 1)，但是在高溫環境下可見芽發還是能穩定大量出現，代表其克服新芽死亡率後將有更好的增殖倍數。

蕙蘭屬的抽芽常發生在當代芽，且抽芽數量不穩定，抽芽時間受季節影響，鐵骨素心蘭與天鵝素心蘭抽芽高峰期落在 2-3 月與 8-9 月 (陳, 2012)，本試驗九華蘭週年有新芽，抽芽高峰期因品種有差異，集中在 3-5 月與 8-10 月，這與素心蘭的頂峰抽芽數相似，表明在屏東平地的季節性氣候足以調節新芽萌發，且九華蘭原生高緯度山區，在國蘭中屬生長環境氣溫較低者，氣候冷涼，開花月份在 3-5 月，代表開花對開花需低溫需求較高，但在屏東平地的相對高溫下，還可調節新芽的萌發週期，推測調控國蘭可見芽萌發不需要非常低的溫度差，九華蘭需要 30 到 25 度足以提供新芽萌發，而這些新芽萌發的季節會集中在 3-5 月天氣轉高溫的時期，以及較小幅度的 8-10 月之間 (圖 2)。

造成新芽萌發數量的差異有許多因素，包含不同栽培條件與品種，例如拆芽過程留單芽與雙芽會造成金華山報歲蘭新芽數量不同，單芽繁殖者有較多的抽芽數而雙芽則會傾向芽數少；對生長勢較佳狀況，包含株高、葉片數、乾物重等，這現象僅在 1 年內有差異 (蘇, 2013)。天鵝素心蘭的抽芽數比鐵骨素心蘭少 (陳, 2012)。在不同遮光處理下新芽數量也有顯著差異，玉花報歲蘭與金華山報歲蘭在遮光率 60-80% 的範圍內，60% 有較多的新芽數與較佳的植株性狀，表明適量的光強度對新芽萌發與生長皆必要；遮光處理的調控上以每日隨天氣調控遮陰網與隨季節加用遮陰網及固定性遮陰網有更好的新芽數與生長勢，這也有因屏東週年光照強度充足所致 (蘇, 2013)。

九華蘭在新芽增加數量受到死亡率影響很大，推測養分競爭與病害所致，可見芽在觀測第 40 週前是高死亡率時期，而'鄭孝荷'的死亡率高峯期卻往後延，與高溫期對不上，推測養分競爭是主要原因，而在程序性死亡的過程可能伴隨潛伏的病害表現而死亡 (圖 5.A、B)。

參考屏東科技大學網室光強度紀錄，在 2 月晴天外層網 60% 光強度約 $407.4 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，9 月的晴天搭配 60% 外遮陰網與 50% 內遮陰網的光強度約 $166.6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (蘇, 2013)，本試驗遮陰處理為外層 80%，內層 60%，推測實際的光強度會小於上述數據。九華蘭光飽和點 $500 \pm 32 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (李等, 2005)，因此並不會有光強度過強造成光呼吸的現象。但屏東當地氣溫偏高，對於高海拔植物來說可能會造成呼吸率增加，進而減少養分的存儲。溫帶植物會比熱帶植物對加溫有更強烈的增加呼吸率 (respiration)，隨著溫度增

加到一個高峰後會急速下降 (Atkin and Tjoelker, 2003)，這可能是九華蘭較其他國蘭在非低溫生產上的一個困境。日本扁柏在週年栽培中可看出季節會造成呼吸率變化，夏季較高而冬季則會轉而維持最低消耗所需 (Paembonan *et al.*, 1992)，且在高夜溫的環境下水稻會有較高的呼吸率，造成儲存碳水化合物較少，甚至對細胞造成損傷 (Mohammed and Tarpley, 2009)。因而推測高溫導致生產可供利用的碳水化合物較少，芽體過多時不足以供給全部芽，因此有較高的新芽死亡率。

國蘭在栽培過程中以分株為主要繁殖方式，因此在病害的傳播難控制，且在市面上充斥各國產地的品種，表明這些品種輾轉流傳已久，病害的傳播也難以預防，尤其早期沒有防疫概念，對器具、介質的消毒不全等，使潛在病害存在，在植株較衰弱時發病。其中比較常見的病徵是萎凋，形成萎凋的原因眾多，包含 *Fusarium* 引起基腐病 (Basal rot or pseudobulb) 及細斑病 (*Fusarium* leaf spot)、由 *Colletotrichum* 引起的炭疽病 (Anthracnose)、疫病 (*Phytophthora* blight)、白絹病 (*Sclerotium rolfsii*) 等 (沈，2015；洪等，2010)。試驗中觀察到植株在新芽成長階段死亡，其中有部分植株外觀形似有罹患基腐病，基腐病與疫病好發溫度在 25-30°C 之間，幾乎整年都是病害的好發期。

農民在介質的調配都有各自配方，但是在組成成份中過多有機質及保水材質會使介質提早酸化，造成根部腐爛感病的結果 (陳，1994；蔡與黃，1992)，在調查期間植株有施用有機肥，推測是造成病害的原因之一，以化肥取代有機肥可改善。

九華蘭新芽葉片數隨著栽培時間有在可見芽後 44 週內是重要的生長期，不同時間點觀察可見到隨著季節葉片增加數量有波動變化，恰好對應到高溫的夏季 (圖 3 A)；芽株高增加量在栽培 48 週內是重要增加期，同樣的可對應到夏季高溫期 (圖 3 B)，因此推測可見芽萌發後 48 週內及高溫環境是較適合營養生長。

屏東平地栽培期間九華蘭可見花芽數量少，出現在 10/1 到隔年 8/31 較多，與王(2013)在九華蘭的可見花芽期重合，品種間抽花梗率也不同，'大一品'最多，其次是'鄭孝荷'，'長壽梅'出現最少 (圖 4)，正常情況下可見花芽在 9 月出現，可見屏東平地的氣溫對九華蘭過高，打亂花芽抽出的季節甚至抑制花芽抽出，這部份與 *C. Sazanami* 'Harunoumi' 有相似結果，花序的發育受夏天高溫 (20-35°C) 影響而停止，可在夏季高溫期利用低溫處理 (14/10°C) 避開高溫造成的危害 (Ohno and Kako, 1991)。且花芽在開花前有明顯的低溫需求，王 (2018) 試驗出日夜溫 10/0.5°C 維持一個月可催花，在實際操作上不符合經濟效益。無法打破休眠的花芽表面苞片逐漸褐化，若順利開花也會有負面影響，包含花莖短縮、花朵數少與花朵無法完全綻開等現象。在花朵發育過程需要植物生長調節劑的引導，包含生長素 (Ohno and Kako, 1991)、細胞分裂素 (Corbesier *et al.*, 2003) 與赤酶素 (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009)，溫度等外在環境會造成內部含量或比例的變化，例如高溫會使蝴蝶蘭內生 GA₃ 變成 GA₈ 而無法順利花芽分化 (Su *et al.*, 2001)。此外蕙蘭屬已確定植物體內低溫促進開花的 SVP 基因 (Yang *et al.*, 2019)，推測與其他春化作用植物一樣，未經低溫打破休眠就無法引導花芽繼續分化生長，最終停止生長的花芽就會敗育。

九華蘭原生環境比其它國蘭更冷涼，栽培業者普遍認為九華蘭應該給予更低溫的栽培環境，甚至有些業者特地在冷房內栽培。本試驗表明在屏東平地繁殖九華蘭的可行性與遇到的困境，屏東位處臺灣南部，炎熱的環境能促進生長，同時也伴隨高死亡率，這部分認為與溫度過高造成光合產物無法大量累積有關。平地栽培不利於生殖生長，反而適於減少養分消耗在生殖生長，轉供新芽生長。但也能推測屏東往北與淺山地區都可培養九華蘭，且九華蘭在此氣候能新芽抽出與營養生長，表明其它蕙蘭屬也可在臺灣平地栽培。搭配移地低溫處理例如運至高山催花 (羅，2003)、銷往其它氣溫較低國家後利用當地天然低溫催花 (洪等，2010)、空調的方式降溫催花 (王，2018)與用 BA 催花處理 (趙等，2008)，可形成完整九華蘭有系統生產鏈。

參 考 文 獻

- 王俊閔。2018。九華蘭生物系統工程之建立。國立中興大學生物產業機電工程學研究所碩士論文。pp.120。
- 李鵬民、高輝遠、鄒琦、王滔、劉永。2005。5種國蘭 (cymbidium) 的光合特性。園藝學報。32(1): 151-154。
- 沈原民。2015。小花蕙蘭病害調查與管理試驗。臺中區農業改良場特刊。129: 212-215。
- 林讚標。1988。臺灣蘭科植物 2。南天書局有限公司。p.101-129。
- 洪惠娟、魏芳明、張致盛。2010。國蘭生產作業手冊。行政院農委會臺中區農業改良場。pp. 135。
- 孫葉、包建中、劉春貴、李鳳童、馬輝、張甜、陳秀蘭。2011。國蘭花期調控機制研究進展。中國園藝文摘。8: 99-110。
- 陳心啟、吉占和、郎楷永、朱光華。1999。中國植物誌 18。科學出版社。p.219-220。
- 陳任芳。1994。國蘭病蟲害種類消長調查及其防治方法研究。花蓮區農業改良場研究彙報。10: 104-114。
- 陳俊源。2012。素心蘭之生育習性與產期調節。國立中興大學園藝學系碩士論文。pp.123。
- 趙虎、封宸、邢海、孫葉芳、褚劍峰、林國梅、鄭琪。2008。春蘭提前開花的栽培試驗。浙江農業科學。2008(1): 37-38。
- 劉仲建、陳心啟、茹正忠。2006。中國蘭屬植物。科學出版社。p. 209-212。
- 蔡宜峰、黃慶祥。1992。報歲蘭品質及生產技術改進之研究。土壤肥料試驗報告。80: 205-211。
- 羅英妃。2003。不同海拔栽培對虎頭蘭開花之影響。臺中區農業改良場特刊。60:105-113。
- 關文昌、朱和興。2002。蘭蕙寶鑑。杭州出版社。pp.372。
- 蘇其琦。2013。遮雨設施內遮光調控對金華山報歲蘭及玉華四季蘭生長之影響。國立屏東

科技大學農園生產系碩士論文。pp.137。

- Atkin, O. K. and M. G. Tjoelker. 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci.* 8(7): 343-351.
- Corbesier, L., E. Prinsen, A. Jacqumard, P. Lejeune, H. Van Onckelen, C. Périlleux, and G. Bernier. 2003. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J. Exp. Bot.* 54(392): 2511-2517.
- Mohammed, A. R. and L. Tarpley. 2009. Impact of high nighttime temperature on respiration, membrane stability, antioxidant capacity, and yield of rice plants. *Crop Sci.* 49(1): 313-322.
- Mutasa-Göttgens, E. and P. Hedden. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 60(7): 1979-1989.
- Ohno, H. and S. Kako. 1991. Roles of floral organs and phytohormones in flower stalk elongation of *Cymbidium* (Orchidaceae). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 60(1): 159-165.
- Paembonan, S. A., A. Hagihara, and K. Hozumi. 1992. Long-term respiration in relation to growth and maintenance processes of the aboveground parts of a hinoki forest tree. *Tree Physiol.* 10(1): 101-110.
- Su, W. R., W. S. Chen, M. Koshioka, L. N. Mander, L. S. Hung, W. H. Chen, Y. M. Fu, and Huang, K. L. 2001. Changes in gibberellin levels in the flowering shoot of *Phalaenopsis hybrida* under high temperature conditions when flower development is blocked. *Plant Physiol. Biochem.* 39(1): 45-50.
- Yang F., G. Zhu, Y. Wei, J. Gao, G. Liang, L. Peng, C. Lu, and J. Jin. 2019. Low-temperature-induced changes in the transcriptome reveal a major role of *CgSVP* genes in regulating flowering of *Cymbidium goeringii*. *BMC. Genom.* 20: 53.

Survey on Growth of *Cymbidium faberi* in Lowland of Taiwan

Ko-Chu Lai¹⁾ Hui-Chuan Hung²⁾ Cheng Chang²⁾

Key words: High temperature, Survival rate

Summary

Cymbidium faberi is a high-priced commodity and accounting for 1% of chinese cymbidium in Taiwan. The distribution of *C. faberi* is in the mountainous area above 3000 m. The weather in Pingtung, Taiwan was hot, and the daily highest temperature in summer and winter was 38.3 °C and 25 °C. Quite a few cultivators engage in chinese cymbidium there. We took *C. faberi* 's three varieties 'Dayipin', 'Zhangshoumei' and 'Zhengxiaohe' to survey on the sprouting of new shoots and tracked the growth rate of buds, flower bud development and the number of bud deaths. *C. faberi* had sprouts 0.02-0.32 buds/pots in 4weeks, and April to March have the peak with 0.62 buds/pot in 4 weeks. The second peak was in August to October and the amplitude was smaller 0.52 buds/pot in 4 weeks. This ambient temperature regulated sprouting and new shoot height and leaf numbers increased in summer after new shoot sprout. When number of new shoot leaves reached to half of mature, it took 4-36 weeks and the new shoot height reached to half of mature took 8-44 weeks. Reached to half of new shoot height cost more times than half of leaf number. 'Zhengxiaohe' and 'Dayipin' reached it in almost all months sprouted buds but 'Dayipin' was't. The number of visible inflorescence and flowering stalks were rare. 'Dayipin' and 'Zhengxiaohe' had more visible inflorescence than 'Zhangshoumei'. The number of flowering stalks in 64 weeks were 2-5.

The proliferation rate in three varieties were 1.8-2.3 buds/pot in 64 weeks, but the survival rate was 39.2-81.6%. The sprout of new shoots was in line with the season, the high temperature period was suit for vegetative growth, and the reproductive growth was inhibited, which was conducive to the transfer of nutrients to vegetative growth. Therefore, it is feasible for *C. faberi*

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant and Assistant Research, Puli Branch, TDARES, Nantou, Taiwan, ROC.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

to cultivate in Pingtung. The original environment of other national orchids are not as low as that required by *C. faberi*. It is speculated that other chinese cymbidium can also have normal sprouts in the flat land. It is suitable for cultivating other varieties of chinese cymbidium in the flatland, so the cultivators has more choice and the industry will have more abundance.

蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體之構築

傅 承 泰¹⁾ 潘 怡 君²⁾ 尤 進 欽³⁾ 曾 夢 蛟⁴⁾

關鍵字：蝴蝶蘭、葉綠體基因轉殖、同源重組插入位置、溶菌酶、抗菌胜肽

摘要：本研究參考已發表之臺灣白花蝴蝶蘭之葉綠體基因組序列，完成構築二組以 *trnI/trnA* (pMT93t 系列)及 *trnV/3'rps12* (pMT93t1 系列)為同源重組位置的蝴蝶蘭葉綠體轉殖通用載體 (含 *gus* 及 *aada*)。並構築成攜帶 *lys* (溶菌酶, lysozyme)或/及 *cecA* (抗菌胜肽, cecropin)目標基因的八種蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體。

前 言

在國際上台灣的蘭花產業具有重要的地位，2017 年的出口花卉總金額達 1.95 億美元，其中蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*)就有 1.4 億美金，足見蝴蝶蘭在台灣花卉產業中的重要地位。植物葉綠體基因轉殖具有：增加轉殖基因大量表現，母系遺傳不會造成基因污染、不會有基因靜寂及插入位置效應，且較細胞核基因轉移穩定等優點 (Jin and Daniell, 2015)。因此開發葉綠體基因轉殖技術為近代生物技術的主力研發工作。但蘭花葉綠體基因轉殖技術則尚未有報告。

抗細菌性病原菌之植物抗病育種研究，目前是所有抗病研究中進展最緩慢，運用生物技術將可加速抗病作物品種之育成，以減少化學農藥對環境、生態、人類健康之危害。溶菌酶 (lysozyme, *lys*)可以使細菌細胞壁中的肽聚糖網狀結構崩解，破壞細菌的細胞壁導致細菌死亡 (Loessner, 2005)。而抗菌胜肽 (cecropin, *cec*)可在脂雙層膜上形成陰離子選擇性通道殺死病原菌，對細菌、真菌、病毒等均具有強力的殺傷作用 (吳，2012；陳，2005；Lee *et al.*, 2011)。因此本研究將 *cecropin*、*lys* 基因構築成蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體，將來利用基因槍轉殖法轉殖 *cecropin* 及 *lys* 基因到蝴蝶蘭葉綠體，期望獲得更能抗多種病害之蝴蝶蘭。

1) 國立中興大學園藝學系博士班學生。

2) 國立中興大學園藝系副教授。

3) 國立宜蘭大學園藝學系教授。

4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

材料與方法

一、試驗材料

蝴蝶蘭葉綠體 DNA 來源為白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)、台糖阿媽 (*Phalaenopsis amabilis* 'TSC97')、姬蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris*)、V3 (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3')等四種蝴蝶蘭為材料。

二、試驗方法

(一)、蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體之選殖

1. 植物總 DNA 萃取

取 0.1 g 之葉片以 Plant Genomic DNA Purification Kit DP022 萃取總 DNA。

2. 引子設計與聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

利用 PCR 技術選殖出葉綠體轉殖載體基因片段包含蝴蝶蘭 *trnI/trnA* (Daniell *et al.*, 2001; 2004)與 *trnV/3'rps12* (Maliga, 2004)之 DNA 片段 (圖 1)。本試驗採用 DNA 聚合連鎖反應器進行 PCR 分析。取葉片之 DNA (200 ng)為模板，並加入 1.25 U Blend Taq® -Plus-DNA polymerase (TOYOBO)、1 倍 Blend Taq buffer、0.2 mM dNTP、1 μM 核酸引子，最後加入去離子水。最終反應體積為 25 μL。偵測各基因的引子如表 1 所示。取 8 μL 終產物於 1%的 agarose gel 上進行電泳分析。

表 1、偵測構築蝴蝶蘭載體之各基因的引子序列及增幅片段大小

基 因	引子號碼 (序列)	增幅片 段大小 (bp)
<i>trnI</i>	1 : 5'- GGGCCTTGACACACCG-3' 7 : 5'- CTG GGCCATCCTGGACTTG-3'	1,477
<i>trnA</i>	5 : 5'- CTGCGCCAGGGAAGAATAG-3' 6 : 5'- ATCATAGTATCAGCTAAGTTCACGG-3'	964
<i>trnV</i>	8 : 5'- AATTCACCGCCGTATGGCTGAC-3' 9 : 5'- CAATGGAATCCAATTTTTC CCA-3'	1,787
<i>3'rps12</i>	10 : 5'- TCAACTGCTCCTATCGGAA ATAG-3' 11 : 5'- GATCTTTCTCGATCAATCC CTTTGC-3'	1,388
<i>Prrn— aada</i>	12 : 5'- GATATCGCTCCCCGCGTC GTTC -3' 13 : 5'- TCTAGACCCGGGAATTCTATTTAAATTTATTTGCCGACT ACCTTGGTG -3'	952
<i>GUS</i>	16 : 5'- CTA CTGGAATTCGGGAGGGATTTATGTTACGTCCTGTAGA AACCC -3' 18 : 5'- GATTCTCCCG GGTTATTGTTGCCTCCCT -3'	1,823
<i>lys</i>	19 : 5'- CTGCCAATTTAAATTGGGAGGGATTTATGGGCAGCCAGA CCGCTA -3' 20 : 5'- GATCTGGAATTCCTACTCGAGTGCCGCTC -3'	531
<i>cecA</i>	21 : 5'- GATTCTCCCGGGGG AGGGATTTATGGGCTGGCTGAAAA AAATCGGCA -3' 22 : 5'- CAGTCATCTAGATCAACCCTTTAATGTAGCGGCAACGT -3'	137

3. TA 選殖 (蝴蝶蘭 *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 等基因片段選殖)

將蝴蝶蘭 (subsp. *formosana*) *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 等基因片段以 PCR 增幅出之產物，參照 pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector System 說明書實驗流程並構築到質體 pGEM®-T，以進行後續之 DNA 定序與載體構築。

- (1) pGEM-T-P,F,*trnI*：質體 pGEM®-T 連接上蝴蝶蘭 *trnI* 基因片段 PCR 產物。
- (2) pGEM-T-P,F,*trnA*：質體 pGEM®-T 連接上蝴蝶蘭 *trnA* 基因片段 PCR 產物。
- (3) pGEM-T-P,F,*trnV*：質體 pGEM®-T 連接上蝴蝶蘭 *trnV* 基因片段 PCR 產物。
- (4) pGEM-T-P,F,*3'rps12*：質體 pGEM®-T 連接上蝴蝶蘭 *3'rps12* 基因片段 PCR 產物。
- (5) pGEM-T-*Prrn+aada*：質體 pGEM®-T 連接上 *Prrn+aada* 基因片段 PCR 產物。

4. 蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體構築

(1) pMT93t、pMT93t-0

將質體 pKM-*aada* 與 pGEM-T-P,F,*trnI* 以限制酵素 *SalI* 和 *EcoRV* 進行切割後將 *trnI* 基因片段構築至 pKM-*aada* 載體上，獲得之中間載體以及 pGEM-T-P, F, *trnA* 再以限制酵素 *PstI* 和 *SacII* 進行切割後將 *trnA* 基因片段構築至中間載體。進而獲得質體 pMT93t (圖 2A)。再將 pMT93 質體與 pGEM-T-*Prrn+aada* 以限制酵素 *XbaI* 和 *EcoRV* 進行切割後將 *Prrn+aada* 基因片段構築至 pMT93t 質體上以獲得新增切位之質體 pMT93t-0 (圖 3A)以進行後續實驗。

(2) pMT93t1、pMT93t1-0

將質體 pKM-*aada* 與 pGEM-T-P,F,*trnV* 以限制酵素 *SalI* 和 *EcoRV* 進行切割後將 *trnV* 基因片段構築至 pKM-*aada* 載體上，獲得之中間載體以及 pGEM-T-P,F,*3'rps12* 再以限制酵素 *PstI* 和 *SacI* 進行切割後將 *trnA* 基因片段構築至中間載體。進而獲得質體 pMT93t1 (圖 2B)。再將 pMT93t1 質體與 pGEM-T-*Prrn+aada* 以限制酵素 *XbaI* 和 *EcoRV* 進行切割後將 *Prrn+aada* 基因片段構築至 pMT93t1 質體上以獲得新增切位之質體 pMT93t1-0 (圖 3A)，以進行後續實驗。

(3) pMT93t-GUS

將質體 pMT93t-0 與 *GUS* 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 *GUS* 基因片段構築至 pMT93t-0 載體上，獲得質體 pMT93t-GUS (圖 3B)。

(4) pMT93t1-GUS

將質體 pMT93t1-0 與 *GUS* 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 *GUS* 基因片段構築至 pMT93t1-0 載體上，獲得質體 pMT93t1-GUS (圖 3B)。

(5) pMT93t-GL-A

將質體 pMT93t-GUS 與溶菌酶 (*lys*) 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *SwaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 *lys* 基因片段構築至 pMT93t-GUS 載體上，獲得質體 pMT93t-GL-A (圖 3C)。

(6) pMT93t1-GL-A

將質體 pMT93t1-GUS 與溶菌酶 (*lys*) 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *SwaI* 和 *EcoRI* 進

行切割後將 *lys* 基因片段構築至 pMT93t1-GUS 載體上，獲得質體 pMT93t1-GL-A (圖 3C)。

(7) pMT93t-GCa-A

將質體 pMT93t-GUS 與抗菌肽 cecropin A (*cecA*) 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *Sma*I 和 *Xba*I 進行切割後將 *cecA* 基因片段構築至 pMT93t-GUS 載體上，獲得質體 pMT93t-GCa-A (圖 3D)。

(8) pMT93t1-GCa-A

將質體 pMT93t1-GUS 與抗菌肽 cecropin A (*cecA*) 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *Sma*I 和 *Xba*I 進行切割後將 *cecA* 基因片段構築至 pMT93t-GUS 載體上，獲得質體 pMT93t1-GCa-A (圖 3D)。

(9) pMT93t-GLCa-A

將質體 pMT93t-GCa-A 與溶菌酶 (*lys*) 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *Swa*I 和 *Eco*RI 進行切割後將 *lys* 基因片段構築至 pMT93t-GCa-A 載體上，獲得質體 pMT93t-GLCa-A (圖 3E)。

(10) pMT93t1-GLCa-A

將質體 pMT93t1-GCa-A 與溶菌酶 (*lys*) 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *Swa*I 和 *Eco*RI 進行切割後將 *lys* 基因片段構築至 pMT93t1-GCa-A 載體上，獲得質體 pMT93t1-GLCa-A (圖 3E)。

(二)、*E. coli* 勝任細胞熱休克轉型

本試驗使用 ECOS™101 勝任細胞 [DH5 α] (Yeastern Biotech) 進行熱休克轉型。依序將 2 μ L ligation mixture or 1 μ L plasmid DNA 加入 25 μ L 的勝任細胞中，vortex 1 秒混合。放置冰上 5 分鐘。42°C 熱休克 45 秒。放置冰上備用。取菌液加到含有抗生素的 LB plate，以三角玻棒將菌液塗均勻。放置 37°C 過夜。

(三)、基因定序

將定序基因構築上 pGEMR-T 或 pGEMR-T Easy Vector 並轉型到大腸桿菌 DH5 α 後取得有單一菌落的 plate。送給明欣生物科技有限公司進行基因定序。使用引子為 M13F (-21): 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' 與 SP6: 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'。

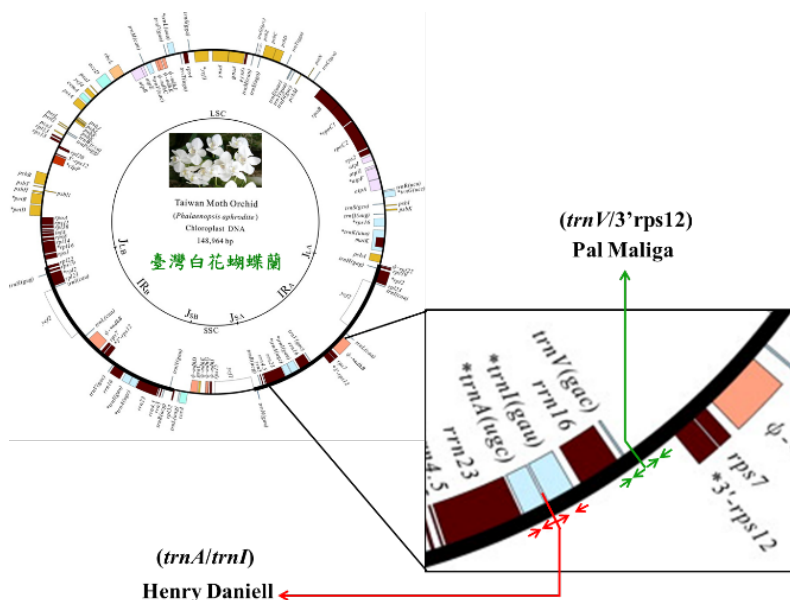


圖 1. 蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖所使用之兩種同源重組插入位置：*trnA/trnI* (Henry Daniell)與 *trnV/3'rps12* (Pal Maliga)。小箭頭代表 PCR 引子設計位置。

Fig. 1. Two homologous recombination insertion sites are used for *Phalaenopsis* chloroplast transformation: *trnA/trnI* (Henry Daniell) and *trnV/3'rps12* (Pal Maliga). The small arrow represents the design position of the PCR primer.

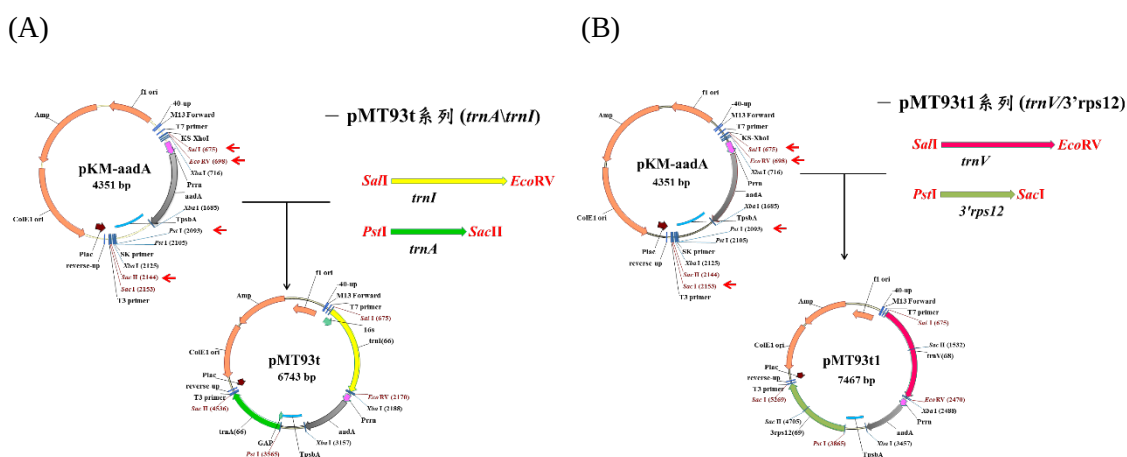


圖 2. pMT93t (A)及 pMT93t1 (B)葉綠體轉殖載體之構築流程圖。

Fig. 2. Construction scheme of pMT93t (A) and pMT93t1 (B) chloroplast transformation vector.

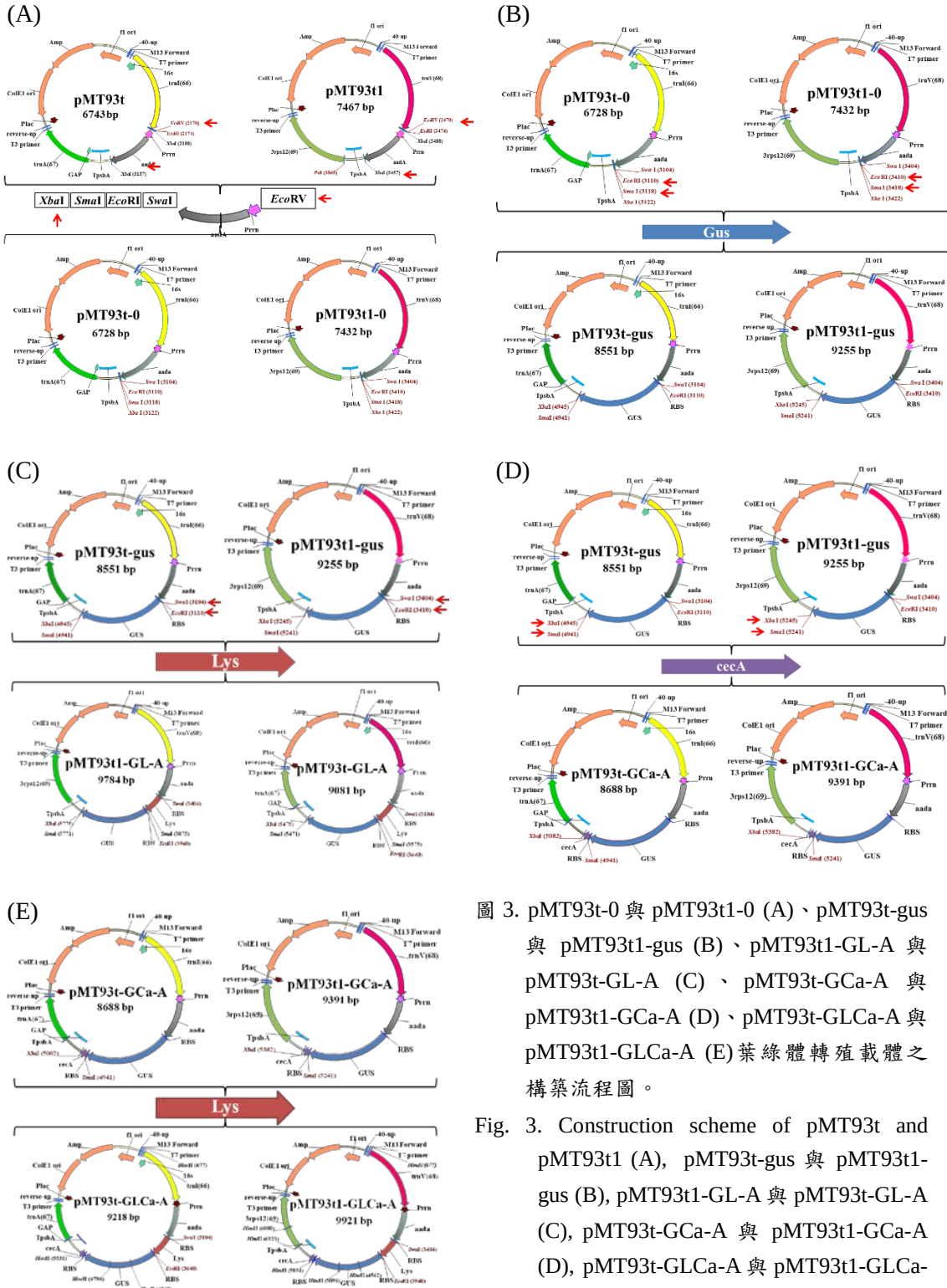


圖 3. pMT93t-0 與 pMT93t1-0 (A)、pMT93t-gus 與 pMT93t1-gus (B)、pMT93t1-GL-A 與 pMT93t-GL-A (C)、pMT93t-GCa-A 與 pMT93t1-GCa-A (D)、pMT93t-GLCa-A 與 pMT93t1-GLCa-A (E) 葉綠體轉殖載體之構築流程圖。

Fig. 3. Construction scheme of pMT93t and pMT93t1 (A), pMT93t-gus 與 pMT93t1-gus (B), pMT93t1-GL-A 與 pMT93t-GL-A (C), pMT93t-GCa-A 與 pMT93t1-GCa-A (D), pMT93t-GLCa-A 與 pMT93t1-GLCa-A (E) chloroplast transformation vector.

結 果

一、蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體之選殖

(一)、植物總 DNA 萃取

為確認植物總 DNA 之萃取是否成功，將萃取自台灣白花蝴蝶蘭、台糖阿媽蝴蝶蘭、姬蝴蝶蘭、'V3'蝴蝶蘭等葉片的基因組 DNA 以電泳膠片分析，其結果如圖 4 所示，顯示成功萃取獲得四種蝴蝶蘭葉片之 DNA (圖 4)。

(二)、蝴蝶蘭 *trnI/trnA* 與 *trnV/3'rps12* 基因片段

以台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 基因組 DNA 為模板，分別使用核酸引子 5/6、1/7、8/9 與 10/11 進行 PCR 增幅之產物，以電泳膠片分析 *trnI* (1,477 bp)、*trnA* (964 bp)、*trnV* (1,787 bp) 與 *3'rps12* (1,388 bp) 基因序列片段。結果顯示各個基因都有正確片段大小 (圖 4)。為分析台灣白花蝴蝶蘭、台糖阿媽蝴蝶蘭、姬蝴蝶蘭、'V3'蝴蝶蘭等四種蝴蝶蘭之間的葉綠體基因片段 *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 的同源性。以葉片萃取的基因組 DNA 為模板，使用核酸引子 5/6 及 1/7 (圖 5A) 與 8/9 及 10/11 (圖 5B) 進行 PCR 分析，產物以電泳膠片分析 *trnI* (1,477 bp) 及 *trnA* (964bp) (圖 5A) 與 *3'rps12* (1,388 bp) 及 *trnV* (1,787 bp) (圖 5B) 基因序列片段的情形。結果顯示四種蝴蝶蘭之間之 *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 基因片段都能以 PCR 用同樣引子增幅出來且大小相同。由上述結果推論四種蝴蝶蘭之間的葉綠體基因片段有高度同源性。

(三)、台灣白花蝴蝶蘭的葉綠體 *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 基因之核酸序列定序與分析

將載體 pGEM-T-P,F,*trnA*、pGEM-T-P,F,*trnI*、pGEM-T-P,F,*trnV* 與 pGEM-T-P,F,*3'rps12* 交由明欣生技公司進行選殖之台灣白花蝴蝶蘭的葉綠體 *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 蝴蝶蘭基因片段定序，其核酸序列分別如圖 6A~D 所示。並將已發表之台灣白花蝴蝶蘭葉綠體基因組序列 (*P. aphrodite* subsp. *formosana*，NCBI Reference Sequence: NC_007499.1) 的核酸序列與定序結果以軟體 vector NTI AlignX 執行序列比對，結果顯示顯示核酸序列一致性分別為 *trnI* 99.0%，*trnA* 97.4%、*trnV* 99.4%、*3'rps12* 98.9% (數據未顯示)。

二、蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體構築

1. pMT93t、pMT93t-0

將質體 pMT93t 以限制酵素 *SalI* 和 *EcoRV* 進行切割後可獲得 5,268 bp、1,495 bp 片段；以限制酵素 *PstI* 和 *SacII* 進行切割後可獲得 5,801 bp、964 bp 片段。證實 *trnI* 與 *trnA* 基因片段已構築成功進入載體。再將 pMT93t-0 質體以限制酵素 *EcoRI* 和 *EcoRV* 進行切割後可獲得 5,788 bp、940 bp 片段。證實 *Prn+aadA* 基因片段已構築至 pMT93t-0 質體上，並獲得新增切位。(數據未顯示)

2. pMT93t1、pMT93t1-0

將質體 pMT93t1 以限制酵素 *SalI* 和 *EcoRV* 進行切割後可獲得 5,672 bp、1,795 bp 片

段；以限制酵素 *Pst*I 和 *Sac*II 進行切割後可獲得 6,079 bp、1,388 bp 片段。證實 *trnI* 與 *trnA* 基因片段已構築成功進入載體。再將 pMT93t1-0 質體以限制酵素 *Eco*RI 和 *Eco*RV 進行切割後可獲得 5,788 bp、940 bp 片段。證實 *Prrn*+*aadA* 基因片段已構築至 pMT93t1 質體上，並獲得新增切位。(數據未顯示)

3. pMT93t-GUS

將質體 pMT93t-GUS 以限制酵素 *Sma*I 和 *Eco*RI 進行切割後可獲得 6,672 bp、1,831 bp 片段，證實 *GUS* 基因片段已成功構築進入載體。(數據未顯示)

4. pMT93t1-GUS

將質體 pMT93t1-GUS 以限制酵素 *Sma*I 和 *Eco*RI 進行切割後可獲得 7,423 bp、1,831 bp 片段，證實 *GUS* 基因片段已成功構築進入載體。(數據未顯示)

5. pMT93t-GL-A

將質體 pMT93t-GL-A 以限制酵素 *Swa*I 和 *Eco*RI 進行切割後可獲得 8,545 bp、536 bp 片段，證實 *lys* 基因片段已成功構築進入載體。(數據未顯示)

6. pMT93t1-GL-A

將質體 pMT93t1-GL-A 以限制酵素 *Swa*I 和 *Eco*RI 進行切割後可獲得 9,248 bp、536 bp 片段，證實 *lys* 基因片段已成功構築進入載體。(數據未顯示)

7. pMT93t-GCa-A

將質體 pMT93t-GCa-A (圖 7A)以限制酵素 *Sma*I 和 *Pst*I 進行切割後可獲得 8,139 bp、549 bp 片段(圖 7C)，以限制酵素 *Hinc*II 進行切割後可獲得 4,364 bp、3,055 bp、735 bp、534 bp (圖 7C)片段，證實 *cecA* 基因片段已成功構築進入載體。

8. pMT93t1-GCa-A

將質體 pMT93t1-GCa-A(圖 7B)以限制酵素 *Sma*I 和 *Pst*I 進行切割後可獲得 8,842 bp、549 bp 片段(圖 7C)，以限制酵素 *Hinc*II 進行切割後可獲得 3,718 bp、3,355 bp、735 bp、557 bp、534 bp、492 bp 片段(圖 7C)。證實 *cecA* 基因片段已成功構築進入載體。

9. pMT93t-GLCa-A

將質體 pMT93t-GLCa-A(圖 8A)以限制酵素 *Swa*I 和 *Eco*RI 進行切割後可獲得 8,682 bp、536 bp 片段(圖 8C)，證實 *lys* 基因片段已成功構築進入載體。以限制酵素 *Hinc*II 進行切割後可獲得 4,364 bp、3,585 bp、735 bp、534 bp (圖 8C)片段，證實 *cecA* 基因片段已成功構築進入載體。

10. pMT93t1-GLCa-A

將質體 pMT93t1-GLCa-A(圖 8B)以限制酵素 *Swa*I 和 *Eco*RI 進行切割後可獲得 9,385 bp、536 bp 片段(圖 8C)，證實 *lys* 基因片段已成功構築進入載體。以限制酵素 *Hinc*II 進行切割後可獲得 3,885 bp、3,718 bp、735 bp、557 bp、534 bp、492 bp 片段(圖 8C)，證實 *cecA* 基因片段已成功構築進入載體。

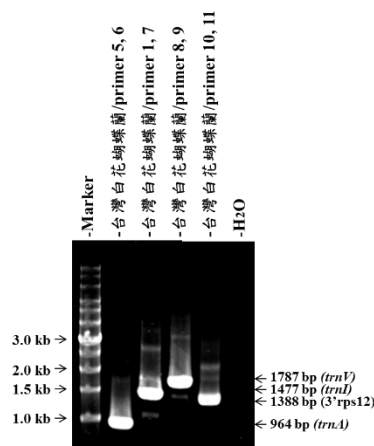


圖 4.以台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 基因組 DNA 為模板，分別使用核酸引子 5/6、1/7、8/9 與 10/11 進行 PCR 增幅之產物，以電泳膠片分析 *trnA* (964 bp)、*3'rps12* (1388 bp)、*trnI* (1477 bp) 與 *trnV* (1787 bp) 基因序列片段的情形。

Fig. 4. Gel electrophoresis analysis of PCR product of *trnA* (964 bp), *3'rps12* (1388 bp), *trnI* (1477 bp), and *trnV* (1787 bp) DNA fragments amplified from *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* DNA using primer 5/6, 1/7, 8/9, and 10/11, respectively.

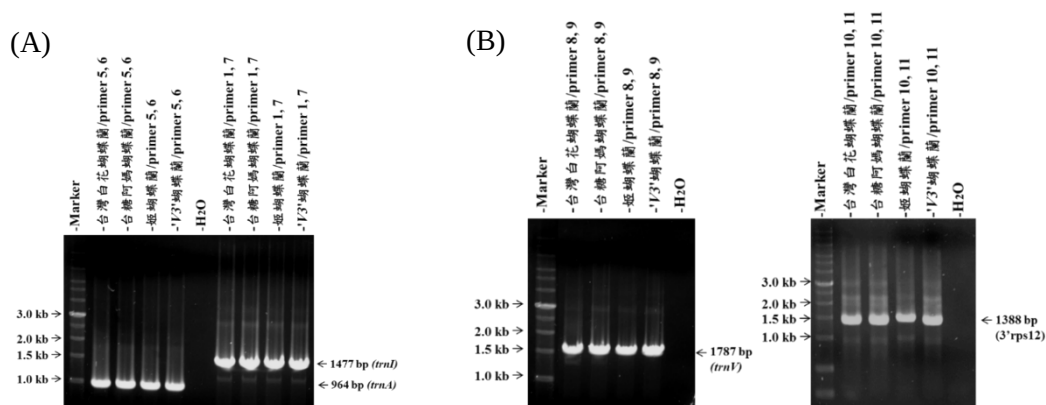


圖 5. 以台灣白花蝴蝶蘭、台糖阿媽蝴蝶蘭、姬蝴蝶蘭、'V3'蝴蝶蘭葉片之基因組 DNA 為模板，使用核酸引子 5/6 及 1/7 (A) 與 8/9 及 10/11 (B) 進行 PCR 之產物，以電泳膠片分析 *trnI* (1477 bp) 及 *trnA* (964 bp) (A) 與 *3'rps12* (1388 bp) 及 *trnV* (1787 bp) (B) 基因序列片段的情形。

Fig. 5. Gel electrophoresis analysis of PCR product of *trnA* (964 bp) and *trnI* (1477 bp) (A), *3'rps12* (1388 bp) and *trnV* (1787 bp) (B) DNA fragments amplified from *P. aphrodite* subsp. *formosana*, *P. amabilis* var. *formosa* 'TS97', *P. equestris*, *P. Sogo Yukidian* 'V3' DNA using primer 5/6 and 1/7 (A), 8/9 and 10/11 (B), respectively.

(A)

trnI of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *Formosana* (台灣白花蝴蝶蘭)

gggccttgtaacacccgcccgtcacactatgggagctggccatgccgaagtcgttaccttaaccgcaaggaggggatg
ccgaaggcagggctagtgaactggagtgaaagtcgtaacaaggtagccgtactggaaggtgcggctggatcacctccttttc
aggagagctaatgcttatgcttgttgggtatgttgggttgacactgcttgacacccaaaaagaagcgagctacatctga
gttaagcttgatataggaagtcttcttctgttctcgacgggtgaagtaagaccaagcccatgagccttattatctctag
gttcgtaacaagtgtgattaagatctcttctgttaacgtcccatgtogccacacgggagggagacatggagacggtacaaaag
gaaagacagggatgggggttctctctgcttcttggcatagcaggcctccccagggagggccacacgacgggctattagctc
agtggtagagcgcgcccctgataattgcgtcgttgcctgggctgtgagggctctcagctacatggatagttcaatgtg
ctcatcgccgctgacccggagatgtggatcatccaaggcacattagcatggcgactcctcctgttcgaatcgaggtt
gaaaccaaacttctcctcaggaggatagatggggcgattcagggtgagacccaatggagatcgaacttctattcactcgt
gggatccgggcggtccggggggggccccacggctcctctctctcgagaatccatacaccccttatcagtggtatggacag
ctatctctcgagcacagggttaggttcggcctcaatgagaaaaatggagcacctaacaacgcactcttcacagaccaagaac
tacgagatcgcccttctcattctggggtgacagagggatcataccattcgagccttttttcatgcccggaggtctgaaga
aagcagcaatcaataggattttccgaatcctccttcccgaagggaagaaacgtgaaattcttttcttccgcaggggac
caggagattggatctagccataacataagaagaatgcttgggtataaataactccacttcttgggttttcgacccctcagt
cactacgagcgctcctcgatcagtgcaatgggaatgtgtctatttatctatctcttgactcgaaatggaggagcgagcag
gtttgaaaaaggatcttagagtgtctagggttggccagaagggtctcttaacgcttcttcttcttccatccgattga
tttcacaaagacttgccatggtaagggaagggggaacaagcacacttgaaagagcgagtagacaatgaagagttgtatgc
tgcttcgggaaggatgaatcgctcccgaaaaagaatatattgattctctcccaattggttggatcgtaggtgcgatgat
ttacttcacgggcgaggtctctggttcaagtcacaggatggccag

(B)

trnA of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *Formosana* (台灣白花蝴蝶蘭)

ctgcgccagggaagaatagaagaagcatctgactcttctcatgcatgcttcacccggctcgggggatatagctcagttg
gtagagctccgctcttgcaattgggtcgttgcaattacgggttggtatgtctaatgtccaggcggtaatgatagtatctt
gtacctgaaccggtggctcacttttcttaaggaaatgggggaaggagaccgaaacatgccactgaaagactctactgagaca
aaaagatgggctgtcaagaacgtagaggaggtaggatgggcagttgggtcagatctagtaggtatgacatggacgatag
ttggagtcggcggtctcctcagggttccctcatctgggatccctaggaaaggatcaagtggcccttgcaatagctt
gatgcactatctcccttcaaccctttgagcaaaatgtggcaaaagggaaggaaaaatccatggaccgaccccatcgtctcca
ccccgtagaaactgcgagatcgcccaaggacgccttcggcatccagggttcacggaccgaccatagaccctgttcaata
agtggaaaggcattagctgtccgctctcgggttgggcagtaagggtcggagaagggaatcactcgttctttaaaccagca
ttctgaagaccaaagagtcgggcggaaaaggaggagagctcttgttctggttctcctgtagctggattctccggaa
ccacaagaatccttagaatgggtattccaactcagcaccccttgagattttgagaagagttgctcttggagagcacagta
cgatgaaagtgtgaagctgtgttcgggggggagttattgtctatcggttggcctctatggtagaatcagccggagaggcct
gagaggcgggtggtttaccctgtggcggtatgacgggttcagtcogcttatctccagccgctgaacttagctgatacta
tgat

(C)

trnV of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *Formosana* (台灣白花蝴蝶蘭)

aattcacgcgcgtatggctgaccgggcattactagcgattccggcttcatgcaggcgagttgcagcctgcaatccgaact
 gaggaacgggttttggagtttagctcaccctcgcggtatcgcgaccctttgtcccgccattgttagcacgtgtgtcgccag
 ggcataaggggcatgatgacttgacgtcatcctcacccttctccggcttatcccggcagtgctgttcagggttccaaact
 caatgggtggcaactaaacacaagggttgcgctcgttgcgggacttaacccaacaccttacggcacgagctgacgacagcc
 atgcaccacctgtgtccgcttccgaaggcaccctctctttcaagaggattcacggcatgtcaagccctggtaagggtt
 cttecgctttgcatcgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgggcccccgctcaattccctttgagtttcattcttgcg
 aacgtactccccaggcgggatacttaacgcgttagctacagcactgcacgggtcgatagcacagcgccctagtatccatc
 gtttaacggcttaggactactggggtatctaatcccatttgcctcccttagctttcgtctctcagtgctcagtgctggccagc
 agagctcttccgcttgggttcttccgctctctacgcatttccacgctccacggaaattccctctgccccctaccgt
 actccagcttggtagtttccaccgcctgtccagggttgagccctgggatttgacggcggacttgaaaagccacctacaga
 cgctttacgccccaatcattccggataacgcttgcacccctgtcttaccgcggtgtctggcacagagtttagccgatgctt
 attcctcagataccgctcattgtcttctctcagagaaaagaagttcaccgacccgtgggctttctacctcaccggcgattgc
 tccgtcaggcttttcgcccatttgcggaaaattccccactgctgcctcccgtaggagctctgggccgtgtctcagtcaccagtg
 tggctgatcatctctcggaccagctactgatcatcgcccttggttaagctattgcctcaccaacttagctaatcagacgcga
 gccccctctcgggaggattccctccttttgcctcctcagcctacggggtattagcaaccgtttccagttgttgttccccctcc
 caagggcaggttctctacgcgttactcaccgctccgacctggaaacaccacttcccgctcagcttgcatgtgttaagcat
 gccgccagcgttcatcctgagccaggatcgaaactctccatgagattcatagttgcattacttatagcttccctgttctgta
 ggcaaaagctgattcagaattgtctttcattccaaaggccgaaggcttgatccatccatgcgcttcatattagcctggagt
 tcgctcccagcaatatagccatccctaccctatcagctcaatcccacaagcctcttctcttattccattctcgttcgatca
 cggcgggggagcaagtccaaatagaaaaactcccatggggtttagggtataatcaggctcgaaactgatgacttccaccacg
 tcaaggtgacactctacgcgtgagttatattcccttcccggttccgctcgagaaatagaactaactaatcctaaggcaagg
 gtcgagaaactaaacaccactatttctgaacaacctggggccgggccttcttttcgcactattatgttatgtagatgcaa
 ataat**gggaaaaattggattccattg**

(D)

3'rps12 of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *Formosana* (台灣白花蝴蝶蘭)

tcaactgctcctatcggaatagggggcaaagatcgagcatagcacatgggtttcctaaaaatccgttttcccgatctaaatc
 gaacaggtttttacatgaagaaaattcttttcagcatgctctattcgagactggtaggagaagaaccgactcgggtattgta
 aaaaaaagagtggaagcagaaccaagtcaagatgatatgaatcacccttcttcttgcgccaaggatcttactaccatt
 tccgaaagaactggagctacttttcttttccatttccattccagagttcctatgtgtttccacgccttttctttagaagg
 ataacgccccccatctaactacttcttcttcttcttgaattgaatagtaataagaagtaataaaatacacgctcctaccga
 gacagagacagaatttgtaacttgctatcctcttgcctagcaggcaaaagatggacccccgtggaaagactgattcattcg
 gatcaacatgaggaactccattgcattgccagaatccatgttgtatatttgaagcagttgacctccttgcctctctcctatg
 gtacaacccctcttcccccttctcctcgttccacagagacaaaatgtaggactgggtgccaacagttcatcacggaagaaa
 ggactcgccgagccgggatcactcactaataactaaaactaagactataagactaatataactaatctaattagaatttag
 aaagaatataataataatatacataatagaaaagatagaatagaaaagaactgtcttttctgttgctaccgcgccctta
 cgcaatcgatcgatatatttgcacacaacataggctcatcgaaaggatctcgggcgactcaccaaagcacgaaagccag
 gatctttcagaaaatggattcctatttttaagagtgcataacggcatggataagctcacactaacccgtccattttggatc
 caattcgggattttccttaggaggtatcgggaagggaattggaatgtaagaatatcgattcatacagaagaaaagggtctc
 tattgattcaaacgctatacctatgggataataggatagaggaggaaggaaggaaggaaggaaggaaggaaggaaggaagga
 tgaaaaagaaatctgatttcttctgtaacccctcgtcgtcgatgggaaaatgggtcagattctacaggatcaacaaacctatg
 ggacttcagggaatgatggaagggaatcaaaagaaaatcgaaatgaaataaaaaatccaaagaaagaagaaaaaaagtag
 gagatagaagagccagatttcaaatgaacaaattcaaaactcgaaaggatcttctgtctcaag**gcaagggttgatcg**
agaaagatc

圖 6. 選殖之台灣白花蝴蝶的葉綠體 *trnI* (A)、*trnA* (B)、*trnV* (C)與 *3'rps12* (D)基因之核酸序列。

Fig. 6. The nucleic acid sequences of cloning chloroplast *trnI* (A), *trnA* (B), *trnV* (C), and *3'rps12* (D) genes of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*.

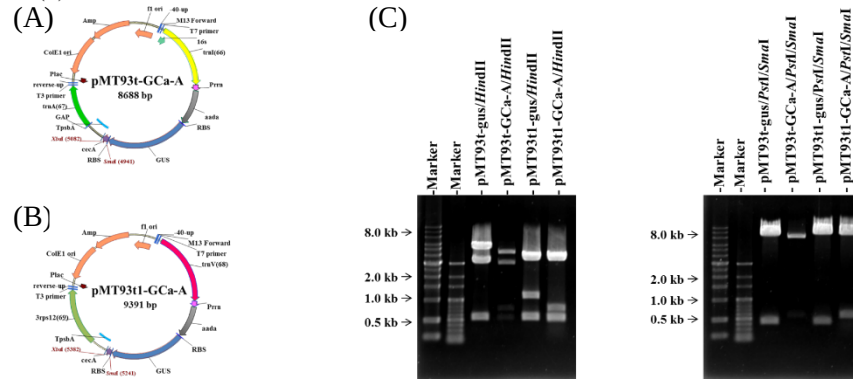


圖 7. 將 pMT93t-GCa-A (A)與 pMT93t1-GCa-A (B)載體以限制酵素切割後以電泳膠片分析載體正確性 (C)。pMT93t-gus/*HindII* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t-GCa-A/*HindII* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t1-gus/*HindII* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t1-GCa-A/*HindII* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t-gus/*PstI/SmaI* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t-GCa-A/*PstI/SmaI* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t1-gus/*PstI/SmaI* : 67026 bp、1694 bp ; pMT93t1-GCa-A/*PstI/SmaI* : 67026 bp、1694 bp。

Fig. 7. Identification of pMT93t-GCa-A (A)and pMT93t1-GCa-A (B)vectors by restriction endonuclease digestion. pMT93t-gus/*HindII*: 67026 bp, 1694 bp; pMT93t-GCa-A/*HindII*: 67026 bp, 1694 bp; pMT93t1-gus/*HindII*: 67026 bp, 1694 bp; pMT93t1-GCa-A/*HindII*: 67026 bp, 1694 bp; pMT93t-gus/*PstI/SmaI*: 67026 bp, 1694 bp ; pMT93t-GCa-A/*PstI/SmaI*: 67026 bp, 1694 bp; pMT93t1-gus/*PstI/SmaI* : 67026 bp, 1694 bp ; pMT93t1-GCa-A/*PstI*、*SmaI* : 67026 bp, 1694 bp.

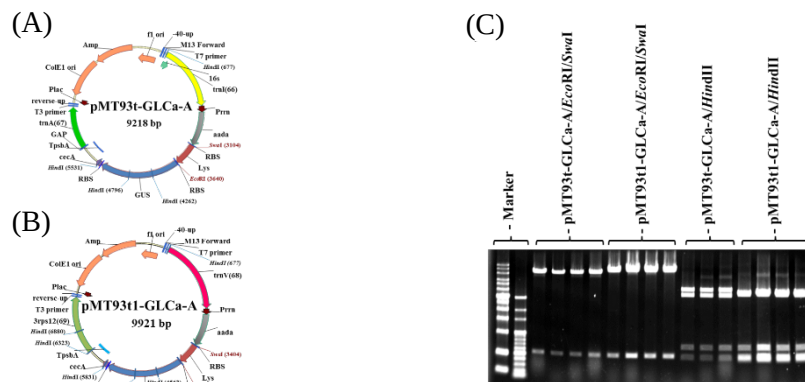


圖 8. 將 pMT93t-GLCa-A (A)與 pMT93t1-GLCa-A (B)載體以限制酵素切割後以電泳膠片分析載體正確性 (C)。pMT93t-GLCa-A/*EcoRI*、*SwaI* : 8682bp、536bp ; pMT93t1-GLCa-A/*EcoRI* : 9385 bp、536 bp ; pMT93t-GLCa-A/*HindII* : 4364 bp、3585 bp、735 bp、534 bp ; pMT93t1-GLCa-A/*SwaI/HindII* : 3885 bp、3718 bp、735 bp、557 bp、534 bp、492 bp。

Fig. 8. Identification of pMT93t-GCa-A (A)and pMT93t1-GCa-A (B)vectors by restriction endonuclease digestion (C). pMT93t-GLCa-A/*EcoRI/SwaI*: 8682 bp, 536 bp; pMT93t1-GLCa-A/*EcoRI/SwaI*: 9385 bp, 536 bp; pMT93t-GLCa-A/*HindII*: 4364 bp, 3585 bp, 735 bp, 534 bp; pMT93t1-GLCa-A/*HindII*: 3885 bp, 3718bp, 735 bp, 557 bp, 534 bp, 492 bp.

三、台灣白花蝴蝶蘭與多種蘭科之葉綠體同源重組序列相似度比對

以從台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 選殖出的葉綠體基因片段之核酸序列 *trnI*、*trnA*、*trnV* 和 *3'rps12* 為基礎所建構的 17 種台灣常見之蘭科植物 (NCBI 網站資料) 的系統發生樹狀圖及其葉綠體 *trnI* (圖 9)、*trnA* (圖 10)、*trnV* (圖 11) 和 *3'rps12* (圖 12) 基因片段之核酸序列的相似度圖如圖 9~12 所示。分析結果顯示台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 選殖出的葉綠體基因片段之核酸序列 *trnI*、*trnA*、*trnV* 和 *3'rps12* 與 Tiny Star (Accession: KJ944326.1) 蝴蝶蘭、台灣白花蝴蝶蘭 (Accession: AY916449.1) 和姬蝴蝶蘭 (Accession: JF719062.1) 的序列有較高的核酸序列相似度 (95~99%)。且台灣白花蝴蝶蘭之 *trnI*、*trnA*、*trnV* 核酸序列和 17 種台灣常見之蘭科植物的相似度約略高達 95~100%，顯示以台灣白花蝴蝶蘭之 *trnA/trnI* 為重組部位所構築的葉綠體轉殖載體將可供這 17 種台灣常見之蘭科植物的葉綠體基因轉殖之用。

討 論

台灣白花蝴蝶蘭、台糖阿媽蝴蝶蘭、姬蝴蝶蘭和 'V3' 蝴蝶蘭等四種蝴蝶蘭之間之 *trnI*、*trnA*、*trnV* 與 *3'rps12* 基因片段都能用 PCR 以同樣引子增幅出來且大小相同。由上述結果推論四種蝴蝶蘭之間的葉綠體基因片段有高度同源性。以從台灣白花蝴蝶蘭選殖出的葉綠體基因片段之核酸序列 *trnI*、*trnA*、*trnV* 和 *3'rps12* 為基礎所建構的 17 種台灣常見之蘭科植物 (NCBI 網站資料) 的系統發生樹狀圖及其葉綠體 *trnI*、*trnA*、*trnV* 和 *3'rps12* 基因片段之核酸序列的相似度圖 (圖 9~12)。結果顯示台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 選殖出的葉綠體基因片段之核酸序列 *trnI*、*trnA*、*trnV* 和 *3'rps12* 與 Tiny Star (Accession: KJ944326.1) 蝴蝶蘭、台灣白花蝴蝶蘭 (Accession: AY916449.1) 和姬蝴蝶蘭 (Accession: JF719062.1) 的序列有高度相似。所以從台灣白花蝴蝶蘭選殖出的葉綠體基因片段之核酸序列 *trnI*、*trnA*、*trnV* 和 *3'rps12* 所構築的蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體可能通用於其他台灣常見之蘭科植物上使用。*trnI/trnA* 和 *trnV/3'rps12* 兩個不同的同源重組插入位置最大的差異是 *trnI/trnA* 是屬於基因頻繁轉錄的區域反之 *trnV/3'rps12* 則是轉錄不頻繁的區域 (Maliga et al., 2014; Sinagawa-García et al., 2009)，並沒有報告指出兩者在葉綠體轉殖成功率的差異，但在菸草葉綠體轉殖 *trnI/trnA* 區域的文獻有更高量蛋白表現的報告較多 (Daniell et al., 2001; 2011)，而目前並沒有搜尋到蘭科包括蝴蝶蘭有關葉綠體基因轉殖的研究，所以本研究將構築 *trnI/trnA* 和 *trnV/3'rps12* 兩個不同插入位置的葉綠體基因轉殖載體。本研究總共完全以 *trnI/trnA* (pMT93t 系列) 及 *trnV/3'rps12* (pMT93t1 系列) 為同源重組位置的蝴蝶蘭葉綠體轉殖通用載體 (含 *gus* 及 *aada*)。並構築成攜帶 *lys* 或/及 *cecA* 目標基因的 8 種蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體。

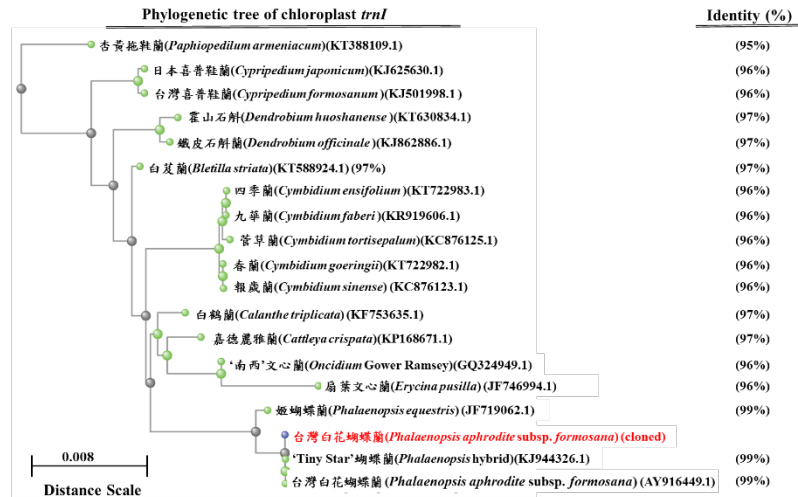


圖 9. 以自台灣白花蝴蝶蘭 (*P. aphrodite* subsp. *formosana*)選殖出的葉綠體 *trnI* 基因片段之核酸序列為基礎所建構的 17 種台灣常見之蘭科植物的系統發生樹狀圖及其葉綠體 *trnI* 基因片段之核酸序列的相似度圖。

Fig. 9. Phylogenetic tree of chloroplast *trnI* and identity among 17 kinds of common orchids in Taiwan using cloned *trnI* of *P. aphrodite* subsp. *formosana* as reference.

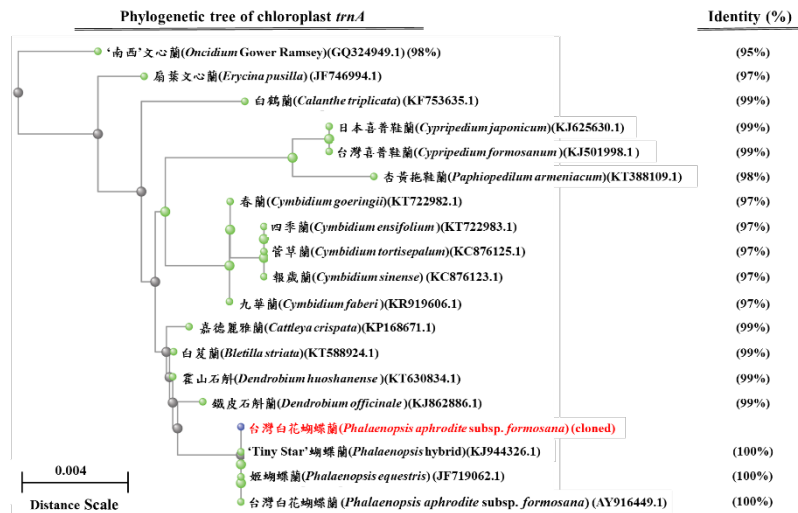


圖 10. 以從台灣白花蝴蝶蘭 (*P. aphrodite* subsp. *formosana*)選殖出的葉綠體 *trnA* 基因片段之核酸序列為基礎所建構的 17 種台灣常見之蘭科植物的系統發生樹狀圖及其葉綠體 *trnA* 基因片段之核酸序列的相似度圖。

Fig. 10. Phylogenetic tree of chloroplast *trnA* and identity among 17 kinds of common orchids in Taiwan using cloned *trnA* of *P. aphrodite* subsp. *formosana* as reference.

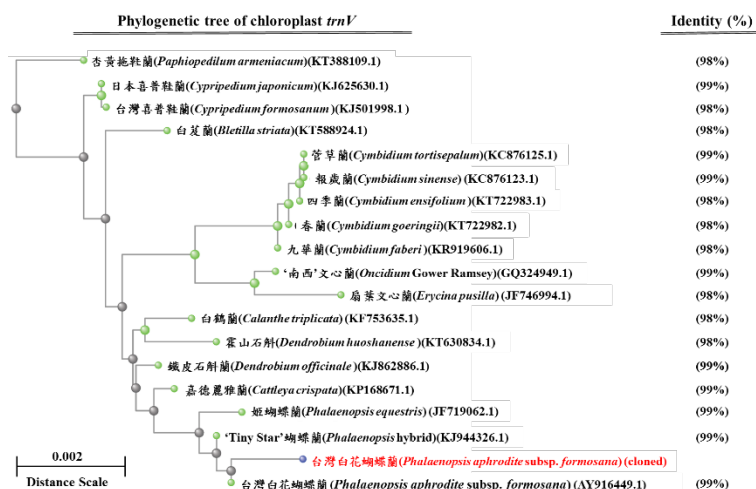


圖 11. 以從台灣白花蝴蝶蘭 (*P. aphrodite* subsp. *formosana*)選殖出的葉綠體 *trnV* 基因片段之核酸序列為基礎所建構的 17 種台灣常見之蘭科植物的系統發生樹狀圖及其葉綠體 *trnV* 基因片段之核酸序列的相似度圖。

Fig. 11. Phylogenetic tree of chloroplast *trnV* and identity among 17 kinds of common orchids in Taiwan using cloned *trnV* of *P. aphrodite* subsp. *formosana* as reference.

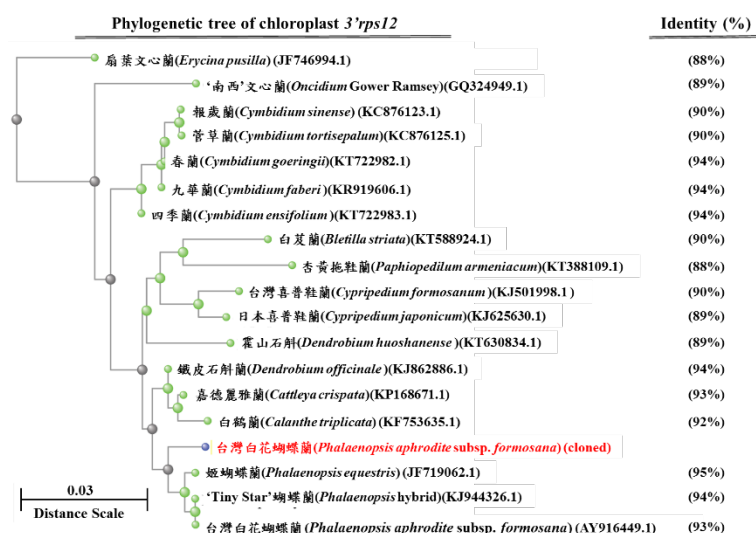


圖 12. 以從台灣白花蝴蝶蘭 (*P. aphrodite* subsp. *formosana*)選殖出的葉綠體 3'*rps12* 基因片段之核酸序列為基礎所建構的 17 種台灣常見之蘭科植物的系統發生樹狀圖及其葉綠體 3'*rps12* 基因片段之核酸序列的相似度圖。

Fig. 12. Phylogenetic tree of chloroplast 3'*rps12* and identity among 17 kinds of common orchids in Taiwan using cloned 3'*rps12* of *P. aphrodite* subsp. *formosana* as reference.

參 考 文 獻

- 吳致淵。2012。 *Xanthomonas* 細菌素基因及抗菌胜肽於大腸桿菌表現及純化之探討。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 陳慶三。2005。抗蟲蛋白質。科學發展。392: 12-15。
- Daniell, H., O. Carmona-Sanchez, and B. E. Burns. 2004. Chloroplast derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. molecular farming: plant-made pharmaceuticals and technical proteins: 113-133.
- Daniell, H., S. B. Lee, T. Panchal, and P. O. Wiebe. 2001. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. J. Mol. Biol. 311 (5): 1001-1009.
- Jin, S. and H. Daniell. 2015. The engineered chloroplast genome just got smarter. Trends Plant Sci. 20 (10): 622-640.
- Lee, S.-B., B. Li, S. Jin, and H. Daniell. 2011. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. Plant Biotechnol. J. 9 (1): 100-115.
- Loessner, M. 2005. Bacteriophage endolysins-current state of research and application. Curr. Opin. Microbiol 8: 480-487.
- Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. Annu. Rev. Plant Biol. 55 (1): 289-313.
- Maliga, P. and T. Tungsuchat-Huang. 2014. Plastid transformation in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana sylvestris* by biolistic DNA delivery to leaves. Chloroplast biotechnology: methods and protocols. P. Maliga. Totowa, NJ, Humana Press: 147-163.
- Sinagawa-García, S. R., T. Tungsuchat-Huang, O. Paredes-López, and P. Maliga. 2009. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. Plant Mol. Biol. 70 (5): 487-498.

Construction of Chloroplast Transformation Vectors in *Phalaenopsis* orchid

Cheng-Tai Fu¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Jinn-Chin Yiu³⁾ Menq-Jiau Tseng⁴⁾

Key words: *Phalaenopsis* orchid, Chloroplast gene transformation, Homologous recombination insertion site, Lysozyme, Cecropin

Summary

In this study, *Phalaenopsis* orchid chloroplast transformation vectors harboring the *lys* and *cecA* genes were constructed. Based on the sequence information from the *Orchidbase* database, the appropriate primers for isolating *trnI/tanA* and *trnV/3'rps12* DNA fragments were designed and both *trnI/tanA* and *trnV/3'rps12* were isolated from *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* and cloned, and their sequences were correctly confirmed. Two sets of eight orchid chloroplast transformation vectors harboring the *gus*, *cecA*, *lys* or *cerA-lys* as target genes were constructed by using *trnI/tanA* (pMT93t series) or *trnV/3'rps12* (pMT93t1 series) DNA fragments as recombination site, respectively.

-
- 1) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Professor, Department of Horticulture, National Ilan University.
 - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

溶菌酶、天蠶素、乳鐵蛋白素及四氫嘧啶合成酶基因轉殖到蝴蝶蘭葉綠體之研究

郭志鵬¹⁾ 馮潔雯²⁾ 楊明德³⁾

陳俊麟⁴⁾ 曾夢蛟⁵⁾

關鍵字：葉綠體基因轉殖、蝴蝶蘭、溶菌酶、天蠶素、乳鐵蛋白素、四氫嘧啶合成酶

摘要：本研究即是混合溶菌酶 (lysozyme, *lys*)、天蠶素 (cecropin, *cecA*)、乳鐵蛋白素 (lactoferrin B, *lfcinB*)、四氫嘧啶合成酶 (ectoine synthase, *ectA*、*ectB*、*ectC*) 等基因之載體，以基因槍轟擊轉殖到蝴蝶蘭之葉綠體中、篩選、再生與分析轉殖植株。本研究目的為建立蝴蝶蘭之葉綠體基因共同轉殖系統，並探討利用葉綠體基因轉殖系統，培育出抗病及耐逆境之蝴蝶蘭的可行性。

本研究已完成利用基因槍轉殖法，將抗病基因 (*lys*、*cecA* 和 *lfcinB*) 及耐逆境的之四氫嘧啶合成酶基因 (*ectA*、*ectB*、*ectC*) 共同轉移至蝴蝶蘭葉綠體中。以 spectinomycin 或 D-alanine 持續篩選培植體，目前已獲得擬轉殖再生蝴蝶蘭植株。PCR 及 RT-PCR 分析擬轉殖再生蝴蝶蘭植株之結果顯示，轉殖溶菌酶 *lys* 基因、天蠶素 *cecA* 基因、乳鐵蛋白素 *lfcinB* 基因及四氫嘧啶合成酶基因 *ectA*、*ectB* 及 *ectC* (*ectABC*) 等已存在蝴蝶蘭葉綠體基因組中，並表現其 mRNA。本研究初步研究結果顯示，葉綠體基因轉殖系統，共轉殖基因是可行的。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學分子生物學研究所博士班研究生。
 - 3) 國立中興大學分子生物學研究所副教授。
 - 4) 中州科技大學景觀系助理教授。
 - 5) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

前 言

蝴蝶蘭為蘭科蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*)植物，蝴蝶蘭為多年生草本，多變的花色與極長的花期使之具有相當高的觀賞性和經濟價值，使其成為世界重要經濟花卉之一，也是臺灣最重要的外銷花卉。在臺灣蝴蝶蘭是生產量化且企業化栽植最成功的作物，主要以開花苗、組織培養苗、切花等外銷美、日等地。臺灣蝴蝶蘭外銷近5年來皆排名花卉類第一名，2017年蝴蝶蘭的出口總金額達1.3億美元，在台灣花卉產業中的佔重要地位（農業統計年報，2018）。

台灣蝴蝶蘭多栽培於溫室中，溫暖潮濕的環境很適合細菌及真菌的生長，一旦管理不善，全面蔓延，影響蘭花品質甚鉅，造成嚴重經濟損失，病害的防治為產業永續發展的關鍵問題。目前台灣蝴蝶蘭的主要細菌性病害為軟腐病、褐斑病及褐腐病；真菌病害為疫病、灰黴病（花瓣灰斑病）、白絹病、炭疽病、葉黃病及基腐病等（謝，2004）。此外因高溫或強光等環境逆境也引起生理異常現象，包括：花苞掉落、葉片凹陷斑點、紅葉等（李和林，1984）；栽培過程或銷儲運時遭遇低溫環境造成寒害使葉片呈水浸狀，葉片黃斑或黃化等（陳等，2005），使蝴蝶蘭植株失去商品價值。以生物技術改善蝴蝶蘭產業生產上最主要的產品品質不穩定及規格良莠不齊等問題，將可穩定蝴蝶蘭產品的商業化，開創台灣蘭花事業永續經營的新契機。

植物葉綠體基因轉殖具有：增加轉殖基因大量表現，不會造成基因污染、基因靜默及插入位置效應，較細胞核基因轉移穩定等優點（Maligar, 2004）。中興大學分子生物學研究所楊明德老師研究室已自 *Xanthomonas fragariae*（草莓角斑病菌）菌株的類似噬菌體(phage XF)尾部細菌素的基因組 (phage tail-like bacteriocin)分離出溶菌酶基因；發現對水稻白葉枯病菌、柑桔潰瘍病菌、十字花科黑腐病菌等具有強烈抑菌效果。楊明德老師之研究室同時以 PCR 合成蒼蠅 (*Musca domestica*) *cecropin*（抗菌勝肽，Antimicrobial peptide）基因，且將 *lys* 與 *cecropin* 基因增幅成融合基因 (*lys-cecA*)，所形成之融合蛋白更能提升殺菌活性（廖，2006；吳，2012）。Ectoine（四氫嘧啶）為細胞內產生的一種溶質，許多嗜鹽菌或耐鹽菌在逆境下用以維持、調節滲透壓以提高細胞對於低溫、乾旱、高溫、高鹽、輻射等各種環境逆境的適應性（Ren and Zhou, 2003; Kuhlmann and Bremer, 2002）。楊明德老師之研究室已自嗜鹽菌 *Halomonas magadiensis* 分離與選殖出 *ectA*、*ectB*、*ectC* 等三個 Ectoine 合成酶的基因。乳鐵蛋白的 N 端較鹼的區域即為乳鐵蛋白素的序列（25 個胺基酸），乳鐵蛋白素 (*LfcinB*)的抗菌能力最高（Hwang *et al.*, 1998）。*LfcinB* 抗菌活性比完整的乳鐵蛋白高出 400 多倍，抗菌範圍很廣，包含多種革蘭氏陽性、陰性病原菌與真菌，例如大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、白色念珠菌等（趙等，2004）。

楊明德老師之研究室已將抗病基因 (*lys*、*cecA* 和 *lfcinB*)及耐逆境的滲透調節相容性溶質 ectoine 的合成酶基因 (*ectA*、*ectB* 及 *ectC*)構築成以 *trnI/trnA* 為同源重組位置的蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體。本研究即是混合抗病 (*lys*、*cecA* 和 *lfcinB*)及耐逆境基因 (*ectA*、

ectB 及 *ectC*)之載體以基因槍轟擊轉殖到蝴蝶蘭之葉綠體中、篩選、再生與分析轉殖植株。本研究目的為建立蝴蝶蘭之葉綠體基因共同轉殖系統，並探討利用葉綠體基因轉殖系統，培育出抗病及耐逆境之蝴蝶蘭的可行性。

材 料 與 方 法

一、供試材料

(一) 基因轉殖之植物材料

本試驗使用植物材料為商業種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'Sogo Vivien'，作為葉綠體基因轉殖之植物材料。材料增殖流程如下：取適當大小之單一擬圓球體 (Protocorm-like body, PLB) 切去其頂芽距離至吸收毛以上，後將培植體植入蝴蝶蘭再生培養基中 [1/2 MS including vitamin (Murashige and Skoog, 1962)、1 g/L Tryptone、0.1 g/L Citric acid、0.1 g/L myo-inositol、20 g/L Sucrose、20 g/L Sweet potato、25 g/L Banana、3 g/L gelrite、1 g/L Charcoal、pH = 5.5]。將材料置於 25°C±2°C，光週期 12/12 小時 (照光/黑暗)，之培養箱中培養 3 至 4 個月後獲得足夠大小與數量之 PLB，將材料切去頂芽位置至吸收毛以上，癒傷 1 週後，將材料直立倒插，並緊密地排列於培養基中央，待後續進行基因槍轟擊試驗。

(二) 轉殖之基因與載體

本試驗轉殖之四氫嘧啶合成酶基因 (Ectoine, *ectA*、*ectB*、*ectC*) (*ectABC*)、溶菌酶基因 (Lysozyme, *lys*)、天蠶素基因 (Cecropin, *cecA*)、乳鐵蛋白素基因 (LactoferricinB, *lficinB*) 是由楊明德教授實驗室提供，使用之勝任細胞為：*E.coli* (TOP10F')，攜帶之質體 DNA 分別為：pMT93-GEct-sA、pMT93-GL-sA、pMT93-GCaD-sA、pMT93-GEctA、pMT93-GLBA、pMT93-GEctD、pMT93-GL-sD、pMT93-GCaD、pMT93-GEct-sD、pMT93-GLB-sD。

二、試驗方法

(一) 基因槍轟擊

本實驗使用 Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System 進行基因槍轟擊實驗。

(二) 擬轉殖材料篩選

1. *aadA* 基因篩選組

轟擊後之 PLB 去其頂芽距離至吸收毛以上，將其種植於蘭花再生培養基，癒傷 7 天後，再移至篩選再生培養基 (再生培養基添加 50 ppm Spectinomycin)，每兩週繼代一次，並逐步提高 Spectinomycin 抗生素之篩選濃度以 50 ppm 為一階梯度上升至 300 ppm，直至再生出健全 PLB 後，取出擬轉殖株種植於再生培養基上使其恢復生長勢。

2. *daao* 基因篩選組

轟擊後之 PLB 去其頂芽距離至吸收毛以上，將其種植於蝴蝶蘭再生培養基，癒傷 7 天後，再移至篩選再生培養基 (再生培養基添加 300 ppm D-alanine)，每 2 週繼代一次，並逐

步提高 D-alanine 之篩選強度以 100 ppm 為一階梯度上升至 700 ppm，直至再生出健全 PLB 後，取出擬轉殖株種植於再生培養基上使其恢復生長勢。

(三) 再生與出瓶馴化

將經篩選後存活之擬轉殖株繼代至蝴蝶蘭再生培養基中進行再生與增殖，使擬轉殖株恢復生長勢，每 3 週進行一次繼代。約 6 個月至 12 個月擬轉殖株生長勢正常時，可對擬轉殖株進行出瓶馴化。將擬轉殖株從蘭花瓶中取出，以清水清洗其表面之培養基，並將其定植於水苔 (moss) 上，套上塑膠袋維持空氣濕度，並置於日照光源之環境 [溫度 25°C ~27°C，濕度 (RH)：30%~40%，平均光照 (PPFD)：63.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ，光照時數 12/12 小時 (光照/黑暗)]，每兩週施以稀釋 1,000 倍之 Hyponex No.1 促進植株成長。

(四) 擬轉殖株分析

1. 擬轉殖植物 genomic DNA 萃取

本試驗取 0.1 g 之葉片以 Plant Genomic DNA Purification Kit DP022 (ZgeneBio Co) 萃取總 DNA。

2. 轉基因植物之聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 分析

偵測 *cecA* 基因，使用引子為 5'-GATTCTCCCGGGGGAGGGATTTATGGGCTGGCTGAAAAAATCGGCA-3' (*Cec*-F) 及 5'-TCAACCCTTTAATGTAGCGGCA-3' (*Cec*-R)。PCR 反應流程為 95°C 10 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，57°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 149 bp 目標片段。

偵測 *ectA* 基因，使用引子為 5'-CTGTTGGCAACCCAGTTTCG-3' (*EctA*-F) 及 5'-ATTC TCGGCTATTGAGCGGG-3' (*EctA*-R)。PCR 反應流程為 95°C 10 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，58°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 307 bp 目標片段。

偵測 *ectB* 基因，使用引子為 5'-TCGTGACCAACTCCAAGTCG-3' (*EctB*-F) 及 5'-GATACCGCGCATCAAACCAC-3' (*EctB*-R)。PCR 反應流程為 95°C 10 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，58°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 296 bp 目標片段。

偵測 *ectC* 基因，使用引子為 5'-AAGAAGCACGCAAAACC-3' (*EctC*-F) 及 5'-ATCTTC ACGGTGCACT TCGT-3' (*EctC*-R)。PCR 反應流程為 95°C 10 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，58°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 347 bp 目標片段。

偵測 *lfcinB* 基因，使用引子為 5'-TTAAGGAGTTGGGTACATGTTCAAATGCCGCCG TTGGCAGTGGCGTATGA-3' (*LfcinB_LIC_A*) 及 5'-CTTTTCCCTGGCGCGGTTTCATAGTT GCATTACTTATAGCTTCCTTGTTTCG-3' (*Prn(Pa)_R*) PCR 反應流程為 95°C 5 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，55°C 30 秒，72°C 2 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 1730 bp (pMT93-GLBA) 或 873 bp (pMT93-GLB-sD) 之目標片段。

偵測 *lys* 基因，使用引子為 5'-TAAACACCACGCCATTTTCGC-3' (*Lys*-F) 及 5'-GCACC TCGCCCTATCAGT-3' (*Lys*-R)。PCR 反應流程為 95°C 10 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，58°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 368 bp 目標片段。

偵測 *gus* 基因，使用引子為 5'-CGTGGTGATGTGGAGTATTG-3' (GUS-F) 及 5'-GATC CCTTTCTTGTACCGC-3' (GUS-R)。PCR 反應流程為 95°C 5 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，58°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 40 cycle，可增幅出 499 bp 目標片段。

偵測 *daao* 基因，使用引子為 5'-ATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGC-3' (DAAO-1) 及 5'-CTAAAGGTTTGGACGAGTAAGAGCTCT-3' (DAAO-2)。PCR 反應流程為 95°C 5 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，57°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 25 cycle，可增幅出 1070 bp 目標片段。待 PCR 反應完畢後，取產物 5 μ L 經電泳分析 PCR 增幅之產物，比較對照組可判斷該系之擬轉植株中有無目標基因之表達。

偵測目標載體 *aadA* 基因，使用引子為 5'-GCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTC-3' (AADA-1) 及 5'-GCCGACTACCTTGGTGATCTCGCC-3' (AADA-2)。PCR 反應流程為 95°C 5 分鐘 1 cycle；95°C 30 秒，57°C 30 秒，72°C 1 分鐘共進行 25 cycle，可增幅出 777 bp 目標片段。待 PCR 反應完畢後，取產物 5 μ L 使用電泳分析。

3. RNA 萃取

取 0.1 g 植物葉片，以液態氮冷卻磨至細碎，加入 1 mL NC RNA Extraction Reagent 於室溫反應 5 分鐘，以 12,000 $\times$ g 離心 15 分鐘，取上清液約 600 μ L 移至新的 1.5 mL eppendorf 中，加入等體積 isopropanol 以 12,000 $\times$ g 離心 15 分鐘。去除上清液後加入 1 mL 70%酒精 wash，以 8,000 $\times$ g 離心 3 分鐘(此步驟重複兩次)，完成後去除上清液，於操作台中靜置，後以 200 μ L 之 DEPC 水回溶 RNA 貯存於 -80°C 備用。

4. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

使用 HiScript ITM First Strand cDNA Synthesis Kit，進行 cDNA 之合成。取 1 μ g-10 pg 之 RNA，加入 1 μ L 2x Fast premix 和 2 μ L Oligo dT，再以 RNase free ddH₂O 補至 19 μ L，於 65°C 作用 5 分鐘，再移到冰上冷卻 1 分鐘。加入 1 μ L HiScript I Reverse Transcriptase，於 42°C 作用 30 分鐘，再移至 85°C 作用 5 分鐘，完成 cDNA 之合成。進行 RT-PCR 時以 cDNA 作為模板進行 PCR 反應。

結 果

一、第一組轉殖：共同轉殖 pMT93-Gect-sA、pMT93-GL-sA、pMT93-GCaD-sA 質體到 *Phal.* 'Sogo Vivien' 之葉綠體 (目標基因 *cecA-lys-ectABC*、篩選基因 *aadA*)

(一) 轟擊、再生後、再篩選

將純化後之質體 pMT93-Gect-sA、pMT93-GL-sA、pMT93-GCaD-sA 調整濃度至 1 μ g/ μ L、以 1:1:1 混合均勻後共同鍍於金粉上進行基因槍轟擊轉殖。將轟擊後材料再生增殖，之後對再生之 PLB 進行篩選，以強度 100 ppm 之 spectinomycin 對培植體進行篩選。約一個月可發現篩選後部分培植體白化死亡，將死亡之培植體挑除再進行篩選，逐步提高

篩選濃度至 300 ppm，待培植體再生出健全之 PLB 後，將存活之擬轉殖株取出，將其種植於再生培養基上使其恢復生長勢，隨後移至培植瓶促進 PLB 抽芽生長，成株後將擬轉殖株出瓶移至溫室生長（圖 1）。

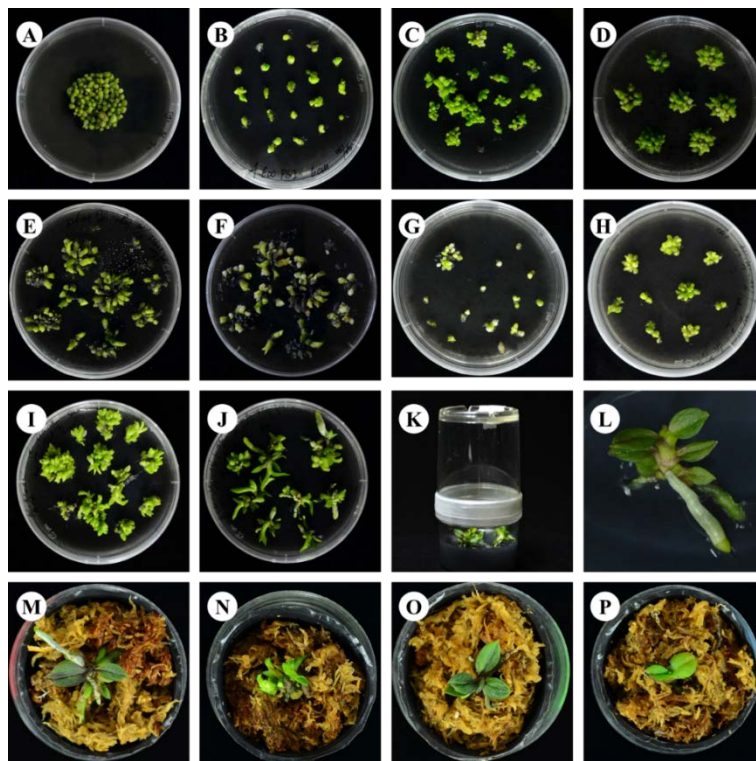


圖 1. 基因槍轉殖 pMT93-Gect-sA、pMT93-GL-sA、pMT93-GCaD-sA 之擬轉殖蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'Sogo Vivien' 再生與增殖情形。(A) 基因槍轟擊後之 PLB；(B~D) 轟擊後癒傷並增殖；(E~F) 以 300 ppm spectinomycin 對擬轉殖株進行篩選；(G~J) 篩選後移植至再生培養基中恢復與增殖；(K~L) 移植至培植瓶中之擬轉殖株；(M~P) 擬轉殖株出瓶移至溫室生長。

Fig. 1. Regeneration and proliferation of putative transplastomic *Phalaenopsis* Sogo Vivien via particle gun bombardment with pMT93-Gect-sA, pMT93-GL-sA, and pMT93-GCaD-sA. (A) PLB after particle gun bombardment; (B~D) PLB curing and proliferation; (E~F) Selection of putative transplastomic *Phalaenopsis* plantlets by 300 ppm spectinomycin; (G~J) Recover and proliferation of plantlets in regeneration medium after remove of spectinomycin; (K~l) Transfer to culture bottle; (M~P) Putative transplastomic seedlings were transfer to pot and grown in greenhouse.

(二) 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)分析轉殖再生植株

蝴蝶蘭 PLB 經基因槍轟擊、抗生素篩選、再生出數棵擬轉殖蝴蝶蘭植株，選取其葉片萃取 genomic DNA。分別以 *cecA*、*ectA*、*ectB*、*ectC*、*lys* 等核酸引子進行 PCR 分析，偵測蝴蝶蘭葉綠體是否攜帶有 *cecA*、*ectA*、*ectB*、*ectC*、*lys* 等目標基因。分析結果顯示，經電泳分離，GEct-sA 轉殖系共 10 株(A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10) 擬轉殖植株可檢測到 *ectA*、*ectB*、*ectC* 基因之 307 bp、296 bp、347 bp 的預期條帶；GCaD-sA 轉殖系共 7 株(A1、A2、A3、A4、A5、A6、A8)擬轉殖植株可檢測到 *cecA* 基因之 149 bp 的預期條帶；GL-sA 轉殖系共 10 株 (A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10) 擬轉殖植株可檢測到 *lys* 基因之 368 bp 的預期條帶 (圖 2)。

其中轉殖系 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A8 為成功導入 *ectABC*、*cecA*、*lys* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 A7、A9、A10 為成功導入 *ectABC* 與 *lys* 基因之蝴蝶蘭轉殖株。

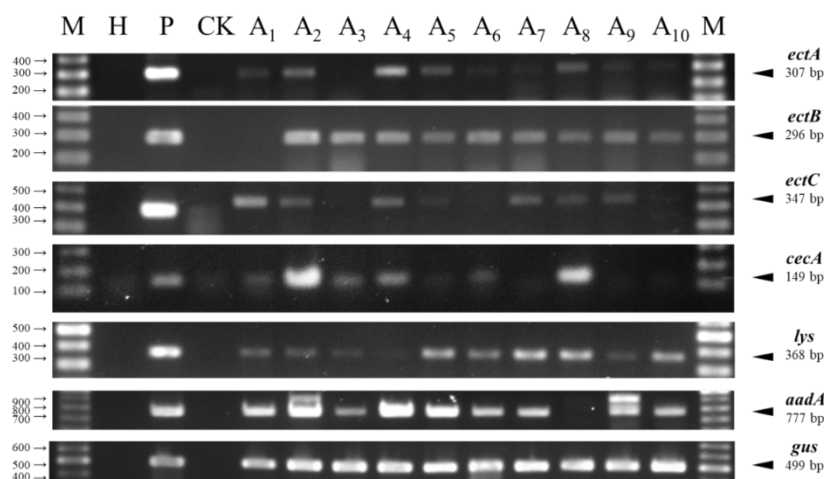


圖 2. 以 GEct-sA、GL-sA、GCaD-sA 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 DNA 為模板，進行聚合酶鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*cecA* (149 bp)、*lys* (368 bp)、*aadA* (777 bp)、*gus* (499 bp) 基因的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEct-sA、pMT93-GL-sA、pMT93-GCaD-sA。

Fig. 2. PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *cecA*, *lys*, *aadA*, and *gus* genes in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEct-sA, GL-sA, and GCaD-sA. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *cecA* (149 bp), *lys* (368 bp), *aadA* (777 bp), and *gus* (499 bp) gene sequences were amplified from plant DNAs and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEct-sA, pMT93-GL-sA, and pMT93-GCaD-sA.

(三) 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 分析轉殖再生植株

為進一步確認轉殖基因是否有順利表達，並成功轉錄為 RNA，取擬轉殖植株葉片萃取其 total RNA 之後反轉錄合成 cDNA，再進行 PCR 增幅，檢測轉殖植株表現轉錄目標基因之 *cecA*、*ectB*、*ectC*、*cecA*、*lys* 的 mRNA 情形。分析結果顯示，經電泳分離，A1 轉殖系為成功轉錄 *ectABC*、*cecA*、*lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；A2、A4、A9、A10 轉殖系為成功轉錄 *lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；A3、A5、A6 轉殖系為成功轉錄 *cecA*、*lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；A7、A8 轉殖系為成功轉錄 *ectABC*、*lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株 (圖 3)。

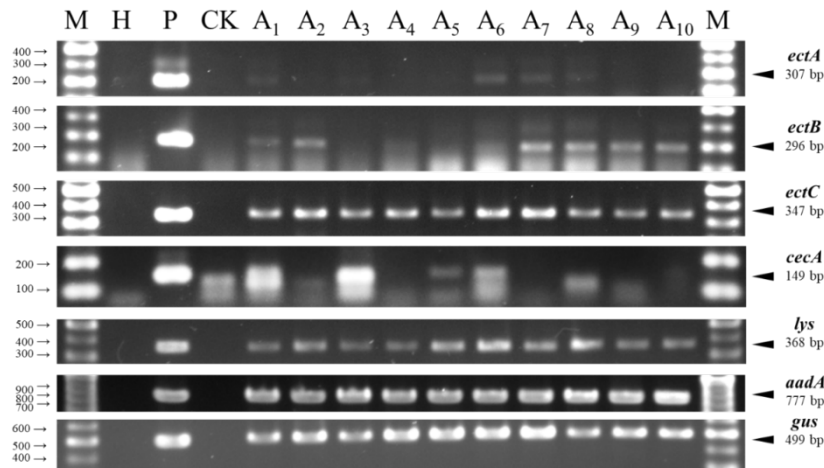


圖 3. 以 GEct-sA、GL-sA、GCaD-sA 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 RNA 反轉錄之 cDNA 為模板，使用 EctA-F/EctA-R、EctB-F/EctB-R、EctC-F/EctC-R、CecA-F/CecA-R、Lys-F/Lys-R、AADA-1/AADA-2、GUS-F/GUS-R 核酸引子進行聚合酵素連鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*cecA* (149 bp)、*lys* (368 bp)、*aadA* (777 bp)、*gus* (499 bp) mRNA 的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEct-sA、pMT93-GL-sA、pMT93-GCaD-sA。

Fig. 3. RT-PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *cecA*, *lys*, *aadA*, and *gus* mRNA in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEct-sA, GL-sA, and GCaD-sA. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *cecA* (149 bp), *lys* (368 bp), *aadA* (777 bp), and *gus* (499 bp) cDNA sequences were amplified from plant RNAs using EctA-F/EctA-R, EctB-F/EctB-R, EctC-F/EctC-R, CecA-F/CecA-R, Lys-F/Lys-R AADA-1/AADA-2, and GUS-F/GUS-R primers and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: untransformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEct-sA, pMT93-GL-sA, and pMT93-GCaD-sA.

二、第二組轉殖：共同轉殖 pMT93-GEctA、pMT93-GLBA 質體到 *Phal.* 'Sogo Vivien'之葉綠體 (目標基因 *ectABC-lfcinB*、篩選基因 *aadA*)

(一) 轉殖篩選與再生

將純化後之質體 pMT93-GEctA、pMT93-GLBA 調整濃度至 1 µg/µL，以 1:1 混合均勻後共同鍍於金粉上進行基因槍轟擊轉殖。將轟擊後材料癒傷一週後切除其頂芽距離至吸收毛以上，處理後置於含 50 ppm spectinomycin 之再生培養基進行篩選，每兩週繼代一次並逐步提高抗生素 spectinomycin 之篩選強度至 100 ppm。經篩選後挑除白化死亡之培植體，待培植體再生出健全之 PLB 後，將擬轉殖株取出，將其種植於再生培養基上使其恢復生長勢。

(二) 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)分析轉殖再生植株

蝴蝶蘭 PLB 經基因槍轟擊、抗生素篩選、再生出數棵擬轉殖蝴蝶蘭植株，選取其葉片萃取 genomic DNA 分別以 *ectA* 核酸引子、*ectB* 核酸引子、*ectC* 核酸引子、*lfcinB* 核酸引子進行 PCR 分析，偵測蝴蝶蘭葉綠體是否帶有目標基因 *ectA*、*ectB*、*ectC*、*lfcinB* 等基因。分析圖 4 之結果顯示，經電泳分離，GEctA 轉殖系共 5 株(B1、B2、B7、B8、B10)擬轉殖植株可檢測到 *ectA*、*ectB*、*ectC* 基因之 307 bp、296 bp、347 bp 的預期條帶、GLBA

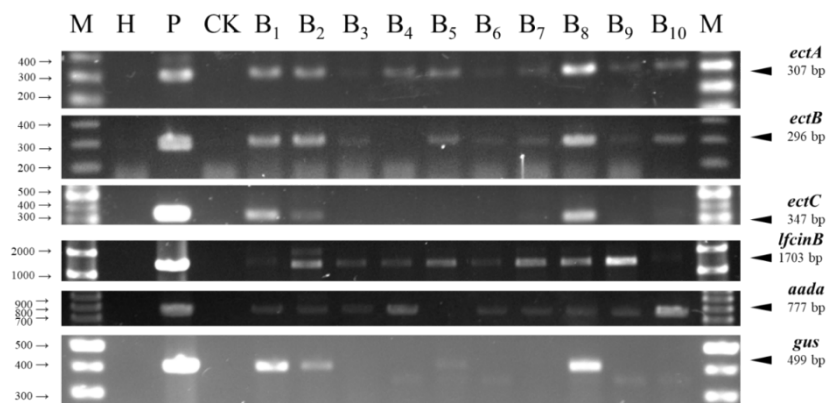


圖 4. 以 GEctA 與 GLBA 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 DNA 為模板，進行聚合酶鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*lfcinB* (1703 bp)、*aadA* (777 bp)、*gus* (499 bp) 基因的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEctA、pMT93-GLBA。

Fig. 4. PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *lfcinB*, *aadA*, and *gus* genes in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEctA and GLBA. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *lfcinB* (1703 bp), *aadA* (777 bp), and *gus* (499 bp) gene sequences were amplified from plant DNAs and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: untransformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEctA and pMT93-GLBA.

轉殖系共 10 株(B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10)擬轉殖植株可檢測到 *lfcinB* 基因之 1,703 bp 的預期條帶 (圖 4)。

其中轉殖系 B1、B2、B7、B8、B10 為成功導入 *ectABC*、*lfcinB* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 B3、B4、B5、B6、B9 為成功導入 *lfcinB* 基因之轉殖蝴蝶蘭轉殖株。

(二) 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)分析轉殖再生植株

為進一步確認轉殖基因是否有順利表達，並成功轉錄為 RNA，取擬轉殖植株葉片萃取其 total RNA 之後反轉錄合成 cDNA，再進行 PCR 增幅，檢測擬轉殖植株表現轉錄目標基因之 *cecA*、*ectB*、*ectC*、*lfcinB* 的 mRNA 情形。分析結果顯示，經電泳分離，B3 轉殖系為成功轉錄 *ectABC*、*lfcinB* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；B7 轉殖系為成功轉錄 *ectABC* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；B2、B4、B5、B6 轉殖系為成功轉錄 *lfcinB* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株 (圖 5)。

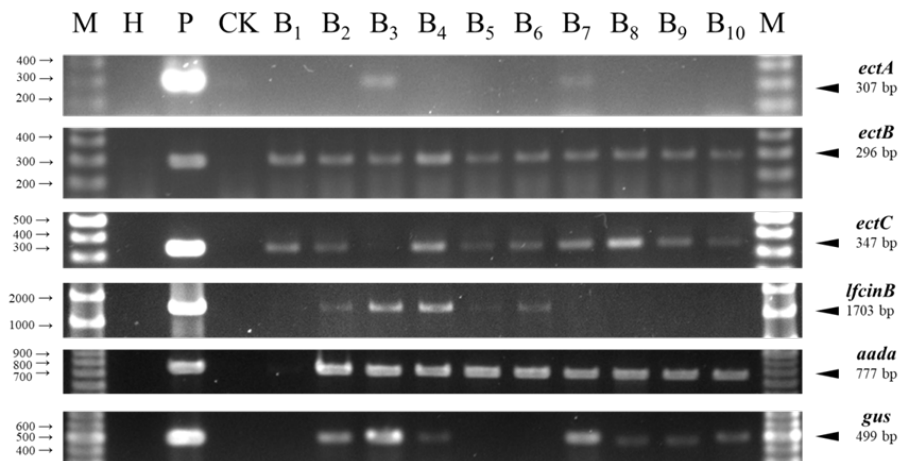


圖 5. 以 GEctA 和 GLBA 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 RNA 反轉錄之 cDNA 為模板，進行聚合酵素連鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*lfcinB* (1703 bp)、*aadA* (777 bp)、*gus* (499 bp) mRNA 的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEctA、pMT93-GLBA。

Fig. 5. RT-PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *lfcinB*, *aadA*, and *gus* mRNA in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEctA, and GLBA. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *lfcinB* (1464 bp), *aadA* (777 bp), and *gus* (499 bp) cDNA sequences were amplified from plant RNAs and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEctA, and pMT93-GLBA.

三、第三組轉殖：共同轉殖 pMT93-GEctD、pMT93-GL-sD、pMT93-GCaD 質體到 *Phal.* 'Sogo Vivien'之葉綠體（目標基因 *cecA-lys-ectABC*、篩選基因 *daao*）

（一）轉殖、篩選與再生

將純化後之質體 pMT93-GEctD、pMT93-GL-sD、pMT93-GCaD 調整濃度至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，之後以 1:1:1 混合均勻後共同鍍於金粉上進行基因槍轟擊轉殖。將轟擊後材料癒傷一週後，切除其頂芽距離至吸收毛以上。處理後置於含 300 ppm D-alanine 之再生培養基進行篩選，每兩週繼代一次並逐步提高 D-alanine 篩選強度至 500 ppm。可發現篩選後有部分培植體死亡，將死亡之培植體挑除再進行篩選，待培植體再生出健全之 PLB 後，將擬轉殖株取出，將其種植於再生培養基上使其恢復生長勢，隨後移至培植瓶中促進 PLB 抽芽生長成植株（圖 6）。

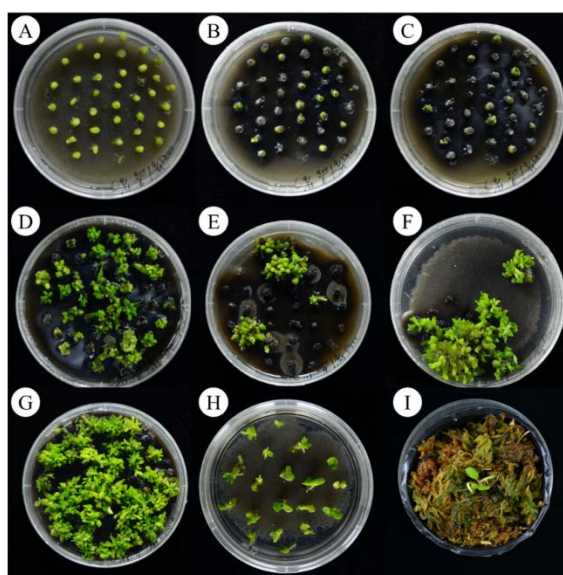


圖 6. 基因槍轉殖 pMT93-GEctD、pMT93-GL-sD、pMT93-GCaD 之蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'Sogo Vivien'再生與增殖之情形。(A)以基因槍轟擊後癒傷之 PLB。(B)使用 500 ppm D-alanine 對擬轉殖株進行篩選一個月，部分培植體出現死亡現象。(C)持續以 500 ppm 強度之 D-alanine 篩選至兩個月之培植體。(D)以 500 ppm 強度之 D-alanine 篩選至三個月之培植體。(E~H)存活之擬轉殖株移植。(I) 擬轉殖株出瓶移至溫室生長。

Fig. 6. Regeneration and proliferation of putative transplastomic *Phalaenopsis* 'Sogo Vivien' via particle gun bombardment with pMT93-GEctD, pMT93-GL-sD, and pMT93-GCaD. (A) PLB after particle gun bombardment; (B) Selection of putative transplastomic *Phalaenopsis* plantlets by 500 ppm D-alanine for 1 month; (C) Survivor plantlets were subjected to 500 ppm D-alanine for second month; (D) Survivor plantlets were subjected to 500 ppm D-alanine for third month. (E~H) Recover and proliferation of survivor plantlets in regeneration medium after remove of spectinomycin; (I) Putative transplastomic seedlings were transfer to pot and grown in greenhouse.

(二) 聚合酶鏈鎖反應(PCR)分析轉殖再生植株

蝴蝶蘭 PLB 經基因槍轟擊、抗生素篩選、再生出數棵擬轉殖蝴蝶蘭植株，選取其葉片萃取 genomic DNA 分別以 *cecA* 核酸引子、*ectA* 核酸引子、*ectB* 核酸引子、*ectC* 核酸引子、*lys* 核酸引子進行 PCR 分析，偵測蝴蝶蘭葉綠體是否帶有目標基因 *cecA*、*ectA*、*ectB*、*ectC*、*lys* 等基因。分析結果顯示，經電泳分離，GEctD 轉殖系共 10 株 (C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10) 擬轉殖植株可檢測到 *ectA*、*ectB*、*ectC* 基因之 307 bp、296 bp、347 bp 的預期條帶、GCaD 轉殖系共 9 株 (C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C9、C10) 擬轉殖植株可檢測到 *cecA* 基因之 149 bp 的預期條帶、GL-sD 轉殖系共 10 株 (C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10) 擬轉殖植株可檢測到 *lys* 基因之 368 bp 的預期條帶 (圖 7)。

其中轉殖系 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10 為成功導入 *ectABC*、*cecA*、*lys* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 C8 為成功導入 *ectABC*、*lys* 基因之轉殖蝴蝶蘭。

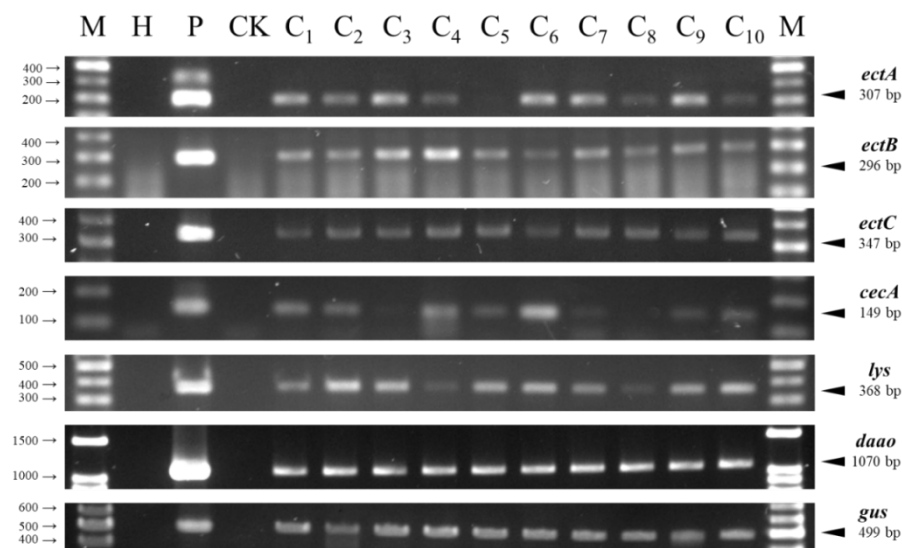


圖 7. 以 GEctD、GL-sD、GCaD 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 DNA 為模板，進行聚合酶鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*cecA* (149 bp)、*lys* (368 bp)、*daao* (1070 bp)、*gus* (499 bp) 基因的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEctD、pMT93-GL-sD、pMT93-GCaD。

Fig. 7. PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *cecA*, *lys*, *daao*, and *gus* genes in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEctD, GL-sD, and GCaD. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *cecA* (149 bp), *lys* (368 bp) *daao* (1070 bp), and *gus* (499 bp) gene sequences were amplified from plant DNAs and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEctD, pMT93-GL-sD, and pMT93-GCaD.

(三) 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 分析轉殖再生植株

為進一步確認轉殖基因是否有順利表達，並成功轉錄為 RNA，取擬轉殖植株葉片萃取其 total RNA 之後反轉錄合成 cDNA，再進行 PCR 增幅，檢測轉殖植物表現轉錄目標基因之 *cecA*、*ectB*、*ectC*、*cecA*、*lys* 的 mRNA 情形。分析結果顯示，經電泳分離，C3、C5 轉殖系為成功轉錄 *ectABC*、*cecA*、*lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；C4、C6、C7、C10 轉殖系為成功轉錄 *ectABC*、*lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；C1、C2 轉殖系為成功轉錄 *cecA* 與 *lys* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；而 C9 轉殖系為成功轉錄 *ectABC* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株(圖 8)。

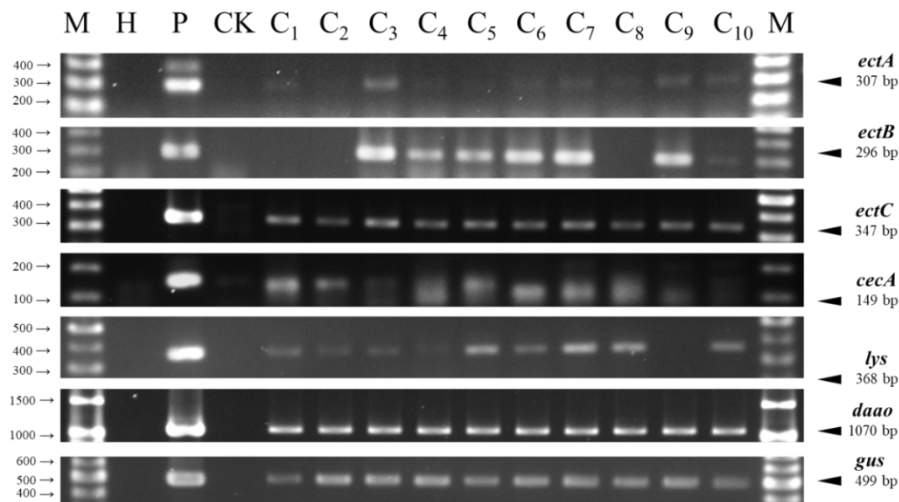


圖 8. 以 GEctD、GL-sD、GCaD 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 RNA 反轉錄之 cDNA 為模板，進行聚合酵素連鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*cecA* (149 bp)、*lys* (368 bp)、*daao* (1070 bp)、*gus* (499 bp) mRNA 的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEctD、pMT93-GL-sD、pMT93-GCaD。

Fig. 8. RT-PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *cecA*, *lys*, *daao*, and *gus* mRNA in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEctD, GL-sD, and GCaD. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *cecA* (149 bp), *lys* (368 bp), *daao* (1070 bp), and *gus* (499 bp) cDNA sequences were amplified from plant RNAs and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEctD, pMT93-GL-sD, and pMT93- GCaD.

四、第四組轉殖：共同轉殖 pMT93-GEct-sD、pMT93-GLB-sD 質體到 *Phal.* 'Sogo Vivien' 之葉綠體 (目標基因 *ectABC-lfcinB*、篩選基因 *daao*)

(一) 轉殖篩選與再生

將純化後之質體 pMT93-GEct-sD、pMT93-GLB-sD 調整濃度至 1 µg/µL，以 1:1 混合均勻後共同鍍於金粉上進行基因槍轟擊轉殖。將轟擊後材料癒傷一週後切除其頂芽距離至吸收毛以上，處理後種植於含 300 ppm D-alanine 之再生培養基進行篩選。每兩週繼代一次並逐步提高抗生素 D-alanine 之篩選強度至 500 ppm，可發現篩選後有部分培植體死亡，將死亡之培植體挑除再進行篩選。待培植體再生出健全之 PLB 後，將擬轉殖株取出，將其種植於再生培養基上使其恢復生長勢，隨後移至培植瓶中促進 PLB 抽芽生長成植株。

(二) 聚合酶鏈鎖反應(PCR)分析轉殖再生植株

蝴蝶蘭 PLB 經基因槍轟擊、抗生素篩選、再生出數棵轉殖蝴蝶蘭植株，選取其葉片萃取 genomic DNA 分別以 *ectA* 核酸引子、*ectB* 核酸引子、*ectC* 核酸引子、*lfcinB* 核酸引子進行 PCR 分析，偵測蝴蝶蘭葉綠體是否帶有目標基因 *ectA*、*ectB*、*ectC*、*lfcinB* 等基因。分析結果顯示，經電泳分離，GEct-sD 轉殖系共 10 株 (D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7、D8、D9、D10) 擬轉殖植株可檢測到 *ectA*、*ectB*、*ectC* 基因之 307 bp、296 bp、347 bp 的預期條帶、GLB-sD 轉殖系共 8 株 (D1、D2、D3、D4、D5、D7、D9、D10) 擬轉殖植株可檢測到 *lfcinB* 基因之 873 bp 的預期條帶(圖 9)。

其中轉殖系 D1、D2、D3、D4、D5、D7、D9、D10 為成功導入 *ectABC*、*lfcinB* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 D6、D8 為成功導入 *ectABC* 基因之轉殖蝴蝶蘭轉殖株。

(三) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 分析轉殖再生植株

為進一步確認轉殖基因是否有順利表達，並成功轉錄為 RNA，取擬轉殖株葉片萃取其 total RNA 之後反轉錄合成 cDNA，再進行 PCR 增幅，檢測擬轉殖植株表現轉錄目標基因之 *cecA*、*ectB*、*ectC*、*lfcinB* 的 mRNA 情形。分析結果顯示，經電泳分離，D4、D7 轉殖系為成功轉錄 *ectABC*、*lfcinB* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株；D1、D2、D3、D9、D10 轉殖系為成功轉錄 *lfcinB* 基因 mRNA 之蝴蝶蘭轉殖株 (圖 10)。

討 論

一、蝴蝶蘭基因槍轉殖與再生

利用基因槍進行葉綠體基因轉殖時，通常選取葉綠體較多葉綠體組織或器官進行，但由於蝴蝶蘭葉片組織誘導再生相當不容易，本研究選以蝴蝶蘭之擬圓球體 (PLB) 進行葉綠體基因轉殖。另外在使用基因槍進行轉殖時，為提高單一擊發狀況下，可接受轟擊之組織或培植體個數，須先進行排盤，而在排盤前先將蝴蝶蘭擬圓球體 (PLB) 切去頂芽後若無使 PLB 癒傷 1 週直接經基因槍轟擊後 PLB 的死亡率相當高。

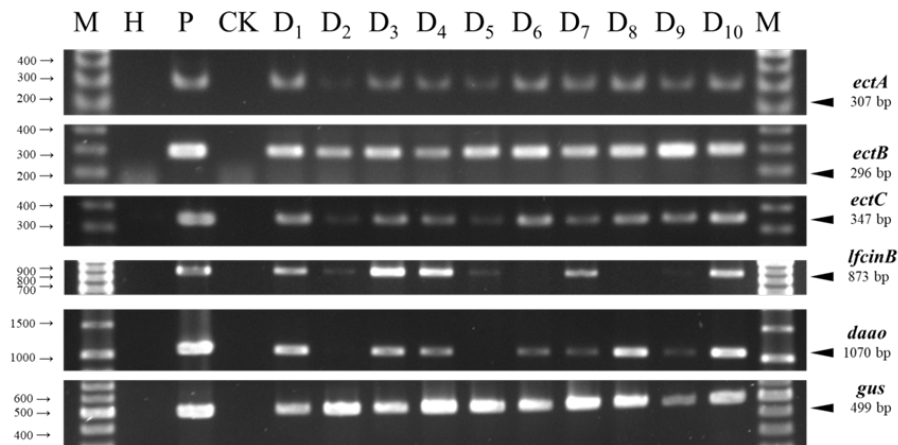


圖 9. 以 GEct-sD 與 GLB-sD 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 DNA 為模板，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*lfcinB* (873 bp)、*daao* (1,070 bp)、*gus* (499 bp) 基因的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEct-sD、pMT93-GLB-sD。

Fig. 9. PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *lfcinB*, *daao*, and *gus* genes in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEct-sD and GLB-sD. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *lfcinB* (873 bp), *daao* (1,070 bp), and *gus* (499 bp) gene sequences were amplified from plant DNAs and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed *Phalaenopsis*. P: pMT93-GEct-sD and pMT93-GLB-sD.

二、Spectinomycin 與 D-alanine 應用在篩選轉殖蝴蝶蘭

在基因轉殖的過程，用於篩選植物的篩選標誌主要有兩種：負向篩選標誌與正向篩選標誌。負向篩選標誌在轉移入目標基因的同時將抗性基因也同時轉移入受體的植物細胞內，再透過選擇壓力存在的情況下對轉殖細胞與非轉殖細胞進行篩選，將非轉殖細胞殺死，而轉殖細胞由於對選擇壓力具有耐性可以正常分裂與再生，*aadA* 基因則屬之。轉入 *aadA* 基因之植物可透過環境中施加 spectinomycin 與 streptomycin 製造選擇壓力，一般植物會直接白化死亡，而成功表達 *aadA* 基因之轉殖細胞對 spectinomycin 具有抗性，再生成功之轉殖培植體可以對高濃度 spectinomycin 具抗性。*daao* 基因屬於正向篩選標誌，在成功導入 *daao* 基因之培植體會對環境中累積的 D-alanine 具有抗性。一般情況下，D 型組態的氨基酸是不能被植物所代謝，且對植物可造成累積性毒害，試驗前期預試驗得知蝴蝶蘭 *Phal.* 'Sogo Vivien' 至少需在培養基中添加 500 ppm 的 D-alanine 才對蝴蝶蘭具有較明顯的毒害，而受到毒害之蝴蝶蘭會褐化死亡。若要將 D-alanine 篩選鑑別率提高，則需將 D-alanine 濃度提高至 700 ppm 以上才會有較良好的鑑別率。

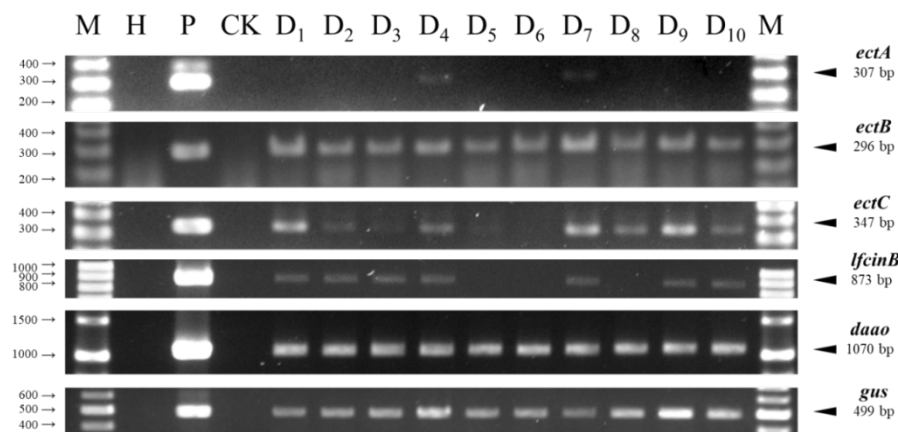


圖 10. 以 GEct-sD 和 GLB-sD 等轉殖系之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 RNA 反轉錄之 cDNA 為模板，以電泳膠片分析 *ectA* (307 bp)、*ectB* (296 bp)、*ectC* (347 bp)、*lfcinB* (873 bp)、*daao* (1,070 bp)、*gus* (499 bp) mRNA 的情形。CK：未轉殖蝴蝶蘭。P：pMT93-GEct-sD、pMT93-GLB-sD。

Fig. 10. RT-PCR analysis of *ectA*, *ectB*, *ectC*, *lfcinB*, *daao*, and *gus* mRNA in putative transplastomic *Phalaenopsis* lines GEct-sD, and GLB-sD. The parts of *ectA* (307 bp), *ectB* (296 bp), *ectC* (347 bp), *lfcinB* (873 bp), *daao* (1,070 bp), and *gus* (499 bp) cDNA sequences were amplified from plant RNAs analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed *Phalaenopsis*. P：pMT93- GEct-sD, and pMT93- GLB-sD.

以 spectinomycin 及 D-alanine 對擬轉植株進行篩選時，spectinomycin 對轉 *aadA* 基因的篩選速度相當迅速，約在 1~2 個月便可大量淘汰眾多擬轉植株，而 D-alanine 對轉 *daao* 基因組之擬轉植株的篩選時間則相當長，甚至需要 6 個月以上才能淘汰部分擬轉植株。此與 *aadA* 與 *daao* 兩種篩選標誌的類型有關。

三、擬轉植株之基因分析

(一) 共同轉殖 pMT93-GEct-sA、pMT93-GCaD-sA 及 pMT93-GL-sA (目標基因 *cecA*-*lys-ectABC*、篩選基因 *aadA*)

本研究使用 pMT93-GEct-sA、pMT93-GCaD-sA 及 pMT93-GL-sA 等三個蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體，是將各自之目標基因 *ectoine* 合成酶基因 *ectABC*、溶菌酶基因 *lys* 和天蠶素基因 *cecA*，各自與報導基因 *gus* 與篩選基因 *aadA* 構築成一操縱組(operon)，以 *prrrn* 為啟動子，方便多個蛋白同時表現，且將篩選基因 *aadA* 構築在同源重組序列(*trnA/trnI*)外側，此設計做為剔除篩選標誌基因 *aadA* 的轉殖載體。以共同轉殖的方式，嘗試將三個載體同時以基因槍轟擊導入蝴蝶蘭葉綠體內，期望經篩選後可獲得導入一組或是多組基因之轉殖蝴蝶蘭。

共同轉殖 pMT93-GEct-sA、pMT93-GCaD-sA 及 pMT93-GL-sA 三個載體至葉綠體中可能獲得轉入單一目標基因(*cecA*、*ectABC*、*lys*)之轉殖株，亦可能獲得各組合轉基因之蝴蝶蘭。本試驗已成功獲得攜帶不同組基因之轉殖系，轉殖系 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A8 為成功導入 *ectABC*、*cecA*、*lys* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 A7、A9、A10 為成功導入 *ectABC* 與 *lys* 基因之蝴蝶蘭轉殖株。

(二) 共同轉殖 pMT93-GEctA 及 pMT93-GLBA (目標基因 *ectABC-lfcinB*、篩選基因 *aadA*)

本研究轉殖 pMT93-GEctA 和 pMT93-GLBA 這兩個蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體是將各自之目標基 *ectoine* 合成酶基因 *ectABC*、乳鐵蛋白基因(*lfcinB*)各自與報導基因 *gus* 篩選基因 *aadA* 構築成一操縱組(*operon*)，以 *prn* 為啟動子，以共同轉殖的方式，嘗試將三個載體同時以基因槍轟擊導入蝴蝶蘭葉綠體內，期望經篩選後可獲得導入一組或是兩組基因之轉殖蝴蝶蘭。共同轉殖 pMT93-GEctA 和 pMT93-GLBA 兩個載體至葉綠體中可能獲得單一表現 *ectABC* 和 *lfcinB* 基因之蝴蝶蘭轉殖株。本試驗已成功獲得攜帶不同組基因之轉殖系，轉殖系 B1、B2、B7、B8、B10 為成功導入 *ectABC*、*lfcinB* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 B3、B4、B5、B6、B9 為成功導入 *lfcinB* 基因之蝴蝶蘭轉殖株。

(三) 共同轉殖 pMT93-GEctD、pMT93-GCaD 及 pMT93-GL-sD (目標基因 *cecA-lys-ectABC*、篩選基因 *daao*)

pMT93-GEctD、pMT93-GCaD 及 pMT93-GL-sD 這三個蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體是將各自之目標基 *ectoine* 合成酶基因 *ectABC*、溶菌酶基因 *lys* 和天蠶素基因 *cecA* 各自與報導基因 *gus* 篩選基因 *daao* 構築成一操縱組(*operon*)，以 *prn* 為啟動子，方便多個蛋白同時表現，而 pMT93-GL-sD 則是將篩選基因 *daao* 構築在同源重組序列(16S rRNA、23S rRNA)外側，此設計做為剔除篩選標誌基因 *daao* 的轉殖載體，以共同轉殖的方式，嘗試將三個載體同時以基因槍轟擊導入蝴蝶蘭葉綠體內，期望經篩選後可獲得導入一組或是多組基因之轉殖蝴蝶蘭。共同轉殖 pMT93-GEctD、pMT93-GCaD 及 pMT93-GL-sD 三個載體至葉綠體中可能獲得單一表現 *cecA*、*ectABC*、*lys* 基因之轉殖株，亦可能獲得各組合轉基因之蝴蝶蘭。本試驗已成功獲得攜帶不同組基因之轉殖系，轉殖系 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10 為成功導入 *ectABC*、*cecA*、*lys* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 C8 為成功導入 *ectABC*、*lys* 基因之蝴蝶蘭轉殖株。

(四) 共同轉殖 pMT93-GEctA 和 pMT93-GLBA (目標基因 *ectABC-lfcinB*、篩選基因 *daao*)

本研究轉殖 pMT93-GEctA 和 pMT93-GLBA 這兩個蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體是將各自之目標基 *ectoine* 合成酶基因 *ectABC*、乳鐵蛋白基因(*lfcinB*)各自與報導基因 *gus* 篩選基因 *aadA* 構築成一操縱組(*operon*)，以 *prn* 為啟動子，以共轉殖的方式，嘗試將兩個載體同時以基因槍送入蝴蝶蘭葉綠體內，經篩選後可獲得同時導入一組或是兩組目標基因之葉綠體轉殖蝴蝶蘭。共同轉殖 pMT93-GEctA 和 pMT93-GLBA 兩個載體至葉綠體中可能獲得單一表現 *ectABC* 和 *lfcinB* 基因之蝴蝶蘭轉殖株。本試驗已成功獲得攜帶不同組基因之轉殖系，轉殖系 D1、D2、D3、D4、D5、D7、D9、D10 為成功導入 *ectABC*、*lfcinB* 基因之轉殖蝴蝶蘭，轉殖系 D6、D8 為成功導入 *ectABC* 基因之轉殖蝴蝶蘭轉殖株。

參考文獻

- 吳致淵。2012。 *Xanthomonas* 細菌素基因及抗菌肽於大腸桿菌表現及純化之探討。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 李晔、林菁敏。1984。溫度對白花蝴蝶蘭生長發育與開花之影響。中國園藝 34: 223-231。
- 陳慶三。2005。抗蟲蛋白質。科學發展。392: 12-15。
- 廖珮鑾。2006。 *Xanthomonas* 細菌素基因的篩選及在 *E. coli* 中表現。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 趙春江、劉兆寧、李寧。2004。人乳鐵蛋白轉基因研究進度。農業生物技術學報 12 (4): 470-475。
- 謝廷芳。2004。蘭花真菌性與細菌性病害的介紹及防治。蘭花種苗病毒驗證制度及病蟲害整合性防治講習會。台灣蘭花產銷發展協會。pp.250-259。
- Kuhlmann, A. U. and E. Bremer. 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 68(2):772-783.
- Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. Annu. Rev. Plant Biol. 55 (1): 289-313.
- Ren, P. G. and P. J. Zhou. 2003. Research progress of moderately halophilic bacteria. Acta Meteorol. Sin. 43(3): 427-431.
- Silvestro, L., J. N. Weiser, and P. H. Axelsen, 2000. Antibacterial and antimembrane activities of cecropin A in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 44(3): 602-607

Studies on Transformation of Lysozyme, Cecropin, Lactoferrin, and Ectoine Synthase Genes into the Chloroplast of *Phalaenopsis* Orchid

Chih-Peng Kuo¹⁾ Kit-Man Fung²⁾ Ming-Te Yang³⁾
Chun-Lin Chen⁴⁾ Menq-Jiau Tseng⁵⁾

Key words: Chloroplast gene transformation, *Phalaenopsis* orchid, Lactoferrin, Lysozyme, Cecropin, Ectoine synthase.

Summary

In this study, we attempt to engineering the *lysozyme* (*lys*), cecropin (*cecA*), and lactoferrin (*LfcinB*) genes, as well as genes (*ectA*, *ectB*, *ectC*) involving the biosynthesis of ectoine into the chloroplast of *Phalaenopsis* orchid. The objectives of this study are to establish the co-transformation system for transplastomic *Phalaenopsis* orchid and to engineering transplastomic *Phalaenopsis* orchid with disease resistance and stress tolerance.

Chloroplast vectors harboring the *lys*, *cecA*, *LfcinB*, and *ectABC* genes were bombarded into the *Phalaenopsis* PLB, and selected by D-alanine or spectinomycin. The results of PCR and RT-PCR analysis of putative transplastomic *Phalaenopsis* plants indicated that the transformed *lys*, *cecA*, *LfcinB*, and *ectABC* genes were present in the chloroplast genome of transplastomic *Phalaenopsis* plants, and its mRNAs were expressed. The preliminary results of this study show that the co-transformation system for transplastomic *Phalaenopsis* orchid is feasible.

-
- 1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Student in Ph.D. Program, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 3) Associate Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 4) Assistant Professor, Department of Landscape Architecture, Chung Chou University of Science and Technology.
 - 5) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

興大園藝

第四十五卷 第二期

酸鹼值對'台農1號'百香果生育之影響	徐曉晴	林慧玲	1	
紅龍果開花生理與產期調節之研究進展	朱堉君	張哲嘉	13	
評估稻稈煙燻水抑制番茄早疫病病原菌效果	李明樺	黃三光	林慧玲	25
不同養液硝酸鈣濃度對牛番茄屍腐病發生之影響	方亮鈞	宋 妤	37	
芭菲爾鞋蘭組織培養文獻回顧與進展	張珈錡	張 正	49	
溶菌酶 (lysozyme)與抗菌胜肽 (Cecropin)基因轉殖至 蝴蝶蘭葉綠體之研究	傅承泰	潘怡君	曾夢蛟	59
植物產生空氣負離子之機制初探	朱恬儀	吳振發	69	

國立中興大學園藝學系編印

中華民國一〇九年六月

酸鹼值對'台農 1 號'百香果生育之影響

徐 筱 晴¹⁾ 林 慧 玲²⁾

關鍵字：百香果、酸鹼值、巨量營養元素、微量營養元素

摘要：本研究目的探討酸鹼值對'台農 1 號' (*Passiflora edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*) 百香果生長之影響。以水耕栽培系統控制酸鹼值栽培百香果植株，調查對百香果生長之影響。結果顯示以 pH 5.5 在葉片數、株高、側芽數、莖鮮重、葉鮮重、根乾重、莖乾重、葉乾重顯著高於 pH 7.0，pH 3.5 植株生長受抑制，因此'台農 1 號' 百香果之生長以酸鹼值於 4.5 至 5.5 間較適合。pH 5.5 處理之植株葉片磷含量顯著高於 pH 3.5 和 7.0，葉片鈣含量顯著低於 pH 3.5，而根、莖、葉之鉀含量則顯著高於 pH 7.0；pH 7.0 處理之莖部鈣含量顯著高於 pH 4.5 及 5.5 處理。顯示，pH 5.5 對磷、鉀吸收較多，因此有助於提升果實品質。

前 言

百香果 (*Passiflora edulis*)，是西番蓮科 (*Passifloraceae*) 西番蓮屬 (*Passiflora*) 的多年生蔓性果樹，原產於美洲熱帶地區，現廣泛栽培於熱帶美洲、亞洲和非洲。目前台灣百香果栽培之主要品種為'台農 1 號'，由農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所以紫色百香果為母本，黃色百香果為父本，所育成具有自交親合性的品種 (李，2005)。近年來因苗株品質改善、栽培技術提高、產值提高，整體經營考量漸具優勢，且因價格提高，使栽培地區擴及至過去主要栽培地區南投埔里以外。百香果由於獨特的香氣跟風味而風靡全球，加工及鮮食需求增加，加上高經濟價值及健康成分的附加價值，許多國家紛紛引進，預計未來幾年百香果產量和種植面積將繼續提高。利用葉片營養分析可以提早於缺乏症狀出現之前調整植株營養，避免缺乏症狀出現後難以補救之情形，是提高栽培管理效率的有效方法。為提高果實品質及產量，肥培管理至關重要，肥料的有效性、營養吸收與酸鹼值高度相關。由

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

於中部地區百香果主要產區集中於埔里地區，其土壤多為紅土，性質偏酸。因此，土壤酸鹼值對百香果生長之影響值得進一步探討。

栽培百香果可接受的土壤 pH 值範圍變化很廣：由 5.5 至 7.5 皆有研究提出，目前在台灣百香果的相關之研究尚少，本研究利用水耕控制酸鹼值，探討酸鹼值對百香果生長及礦物營養元素的吸收之影響。

材 料 與 方 法

(一) 試驗材料

1. 植物材料

於 2018 年 09 月 03 日自國立中興大學園藝試驗場葡萄中心購入 28 株'台農 1 號'百香果嫁接苗。經洗根去除介質後以水耕系統栽培於國立中興大學園藝系之玻璃溫室。

2. 水耕液配置：

依據 Hoagland 配方，配製濃度均為 1 M 之大量元素、微量元素及 EDTA-Fe 之水耕母液。大量元素分別以 1 莫耳之 KNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 溶於去離子純水中，定量到 1 公升。微量元素分別以 3.728 g 之 KCl 、1.546 g 之 H_3BO_3 、0.845 g 之 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.575 g 之 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.125 g 之 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 及 0.0184 g 之 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶於去離子純水中，定量至 1 L。EDTA-Fe 則取 3.72 g Na_2EDTA 及 2.78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶於純水中，定量至 1 L。

以上述之水耕母液配置水耕液，每公升水耕液含 5 mL 的 KNO_3 母液、5 mL 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 母液、2 mL 的 MgSO_4 母液、1 mL 的 KH_2PO_4 母液、1 mL 的微量元素母液、2 mL 的 EDTA-Fe 母液。

(二) 調查項目及分析方法

1. 不同酸鹼值水耕液配置：

將配置完成後之水耕液分別裝入不同處理桶中，以 HCl 及 NaOH 調整酸鹼值至 3.5、4.5、5.5、7，每週更換水耕液。本試驗 4 處理 6 重複，共 24 株。

2. 生長量調查：

2018 年 10 月 04 日至 2018 年 11 月 08 號改以 Hoagland 全養液配方栽培。待百香果主蔓生長至超過 160 公分/上棚架後，去頂使植株平均株高約 80 公分。2018 年 11 月 09 號選擇植株狀況接近之植株進行試驗，紀錄處理當週生長相關數據並開始每週進行生長量調查，調查至植株生長量出現顯著差異，生長量記錄包含植株葉片數、株高、側芽數、葉面積及根、莖、葉之乾、鮮重。

a、葉片數：整株百香果之葉片總數，未展開之新葉不納入計算。

b、株高：以皮尺沿植株莖部測量，由莖頂至根莖交接處之長度。以公分為單位，測量尺規之最小刻度為 1 公分。

- c、側芽數：整株百香果之側芽總數，百香果側芽超過 0.5 公分即肉眼可見，紀錄側芽總數後立即以消毒後器械將其摘除，避免重複計算及經器械感染病毒。
- d、根、莖、葉乾、鮮重：於 2018 年 12 月 13 號砍除植株進行破壞性調查，以自來水洗淨附著葉片上之灰塵，以餐巾紙擦乾後以電子天平分別測量植株根、莖、葉鮮重。接著再以 1% 鹽酸溶液快速涮洗，之後以去離子水清洗 3 次，放入牛皮紙袋，置於烘箱中，以 100 °C 烘箱中殺菁 1 小時，接著以 70 °C 烘乾 48 小時以上，至完全乾燥後取出，以電子天平秤重。

3. 礦物營養元素分析：

於破壞性調查當日將葉片分出由莖頂往下數第 8 片葉做為葉片營養分析材料，分別以根、莖、葉進行分析。樣品乾燥後精稱樣品粉末 0.5 g。放入灰化爐 (muffle furnace) 內，將粉末以高溫灰化，除去 C、H、O、N、S 等有機質，此為乾灰化。灰化結束後取出待樣品冷卻，加入 5 ml 2 N HCl (Merck Company)。以 Whatman#42 號濾紙過濾，以濾除灰化液的殘渣濾液，並將其定量至 25 ml。

a、氮

全氮分析採用凱氏氮測定法 (Micro Kjeldahl method)，精稱乾燥樣品粉末 0.2 g。以 1/4 張 Whatman#1 號濾紙包裹樣品，加入 1 g 催化劑 (Selenium reagent mixture, K_2SO_4 : $CuSO_4$: $Se = 100:10:1$, w/v, Merck)，以 410 °C 加熱分解，直至分解管中液體呈澄清淡綠色後，取出冷卻。將分解管樣品倒入 Micro-Kjeldahl 裝置之凱氏氮球型分解瓶，加入 20 ml 12 N NaOH 於凱氏氮分解瓶，隨即通蒸氣使之氫化，以 20 ml 含 2% Boric acid 及全氮指示劑 (19 μ M Bromocresol 和 25 μ M Methyl red) 之指示劑溶液接收氨水與氨氣，至總體積達 50 ml 為止。最後利用經反滴定校正 F 值之 1/14 N H_2SO_4 滴定，計算氮之含量。

b、磷

磷分析使用鉬黃法，取 1 mL 乾灰化濾液，加入 3 mL 去離子純水，再加入 1 mL 鉬黃試劑，混合均勻後靜置 30 分鐘，使用 Elisa (FLUO star Omega) 測定 470 nm 波長之吸光值。以 50 ppm 之磷標準品配置 0、10、20、30、40 ppm 做出檢量線後可將樣品吸光值代入，即可計算出該樣品所含之元素濃度。經換算後以 % 表示單位。

c、鉀、鎂

取 0.1 mL 乾灰化濾液，稀釋 200 倍，再以偏光茲曼吸收光譜儀 (Series polarized Zeeman atomic absorption spectrophotometer, Model Z-2000, Hitachi, Japan) 測定吸光值，以標準品做出檢量線後可將樣品吸光值代入，即可計算出該樣品所含之元素濃度。經換算後以 % 表示單位。

d、鈣

取 0.1 mL 乾灰化濾液，稀釋 50 倍，混合均勻後以偏光茲曼吸收光譜儀測定吸光值，以標準品做出檢量線後可將樣品吸光值代入，即可計算出該樣品所含之元素濃度。經換算後以 % 表示單位。

e、微量元素：鐵、錳、鋅、銅

鐵、錳、鋅、銅之測定直接以偏光茲曼吸收光譜儀測定，以標準品做出檢量線後可將樣品吸光值代入，即可計算出該樣品所含之元素濃度。經換算後以 ppm 表示單位。

f、 硼

取 0.2 mL 乾灰化濾液加入 0.4 mL buffer masking reagent 均勻混合後，加入 0.2 mL 之 azomethine-H reagent，反應 1 小時結束後，使用 Elisa (FLUO star Omega) 測定 420 nm 波長之吸光值。以 100 ppm 之硼標準品配置 0、1、2、3、4、5 ppm 做出檢量線後可將樣品吸光值代入，即可計算出該樣品所含之元素濃度。經換算後以 ppm 表示單位。

(三) 數據統計分析

試驗數據以統計軟體 CoStat 6.4 (CoHort Software, Monterey, CA, USA)，使用費雪爾最小顯著差異法(Fisher's protected least significant difference procedure, LSD)探討處理間的個別差異性($P < 0.05$)。

結 果

一、酸鹼值對'台農 1 號'百香果生長之影響

(一) 酸鹼值對'台農 1 號'百香果生長量之影響

1. 葉片數：

開始處理後 1 週，pH 7.0 處理之水耕'台農 1 號'百香果葉片數顯著低於 pH 3.5 之處理，至開始處理後 4 週，pH 5.5 處理顯著高於 pH 7.0 處理。試驗開始處理後 5 週內，pH 7.0 處理之葉片數皆呈較少的現象 (圖 1)。

2. 株高：

不同 pH 水耕液處理後 1 週，pH 4.5 及 5.5 處理之水耕'台農 1 號'百香果株高顯著低於 pH 7.0。開始處理後兩週開始，pH 7.0 處理顯著高於 pH 3.5。試驗開始處理後 5 週內，pH 3.5 處理之株高皆呈較低的表現，其中又以 pH 5.5 生長表現較佳 (圖 2)。

3. 側芽數：

開始處理後 1 週，pH 3.5 處理之水耕'台農 1 號'百香果側芽萌發數顯著低於其他處理，至開始處理後 5 週，pH 3.5 處理之側芽萌發數皆呈較低的表現 (圖 3)。

4. 根、莖、葉之乾、鮮重：

於 2018 年 12 月 13 號進行破壞性調查，處理之根鮮重無顯著差異。pH 3.5 處理之莖鮮重顯著低於 pH 4.5 及 5.5 處理。pH 3.5、4.5 及 7.0 處理之葉鮮重顯著低於 pH 5.5 處理。pH 7.0 之根乾重顯著低於 pH 5.5 處理。pH 3.5、7.0 之莖乾重顯著低於 pH 5.5。pH 5.5 之葉乾重顯著高於其他處理 (圖 4、5)。

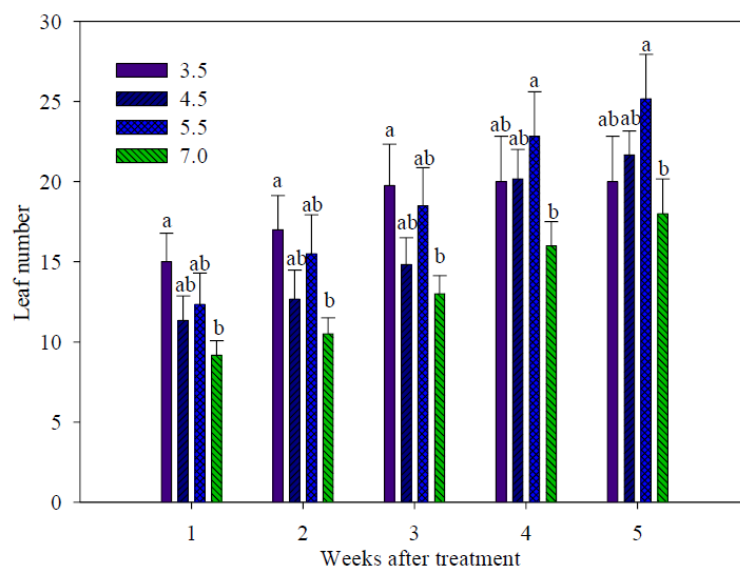


圖 1. 不同酸鹼值對水耕'台農 1 號'百香果葉片數之影響。

Fig. 1. Effects of hydroponic solution treatment with different pH on the leaf number of 'Tainung No. 1' passion fruit.

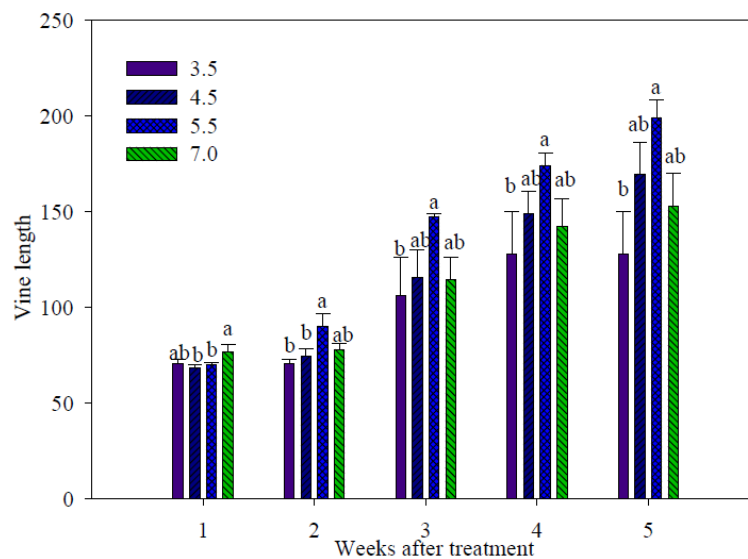


圖 2. 不同酸鹼值對水耕'台農 1 號'百香果株高之影響。

Fig. 2. Effects of hydroponic solution treatment with different pH on the vine length of 'Tainung No. 1' passion fruit.

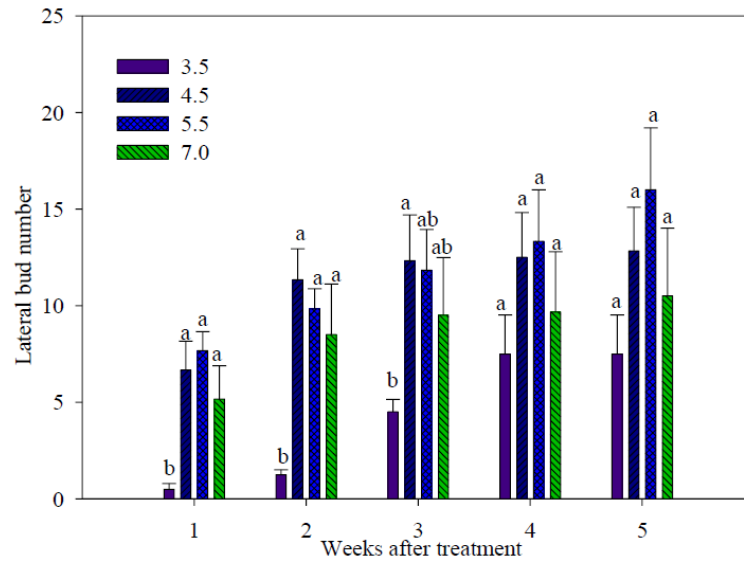


圖 3. 不同酸鹼值對水耕'台農 1 號'百香果側芽數之影響。

Fig. 3. Effects of hydroponic solution treatment with different pH on the lateral bud number of 'Tainung No. 1' passion fruit.

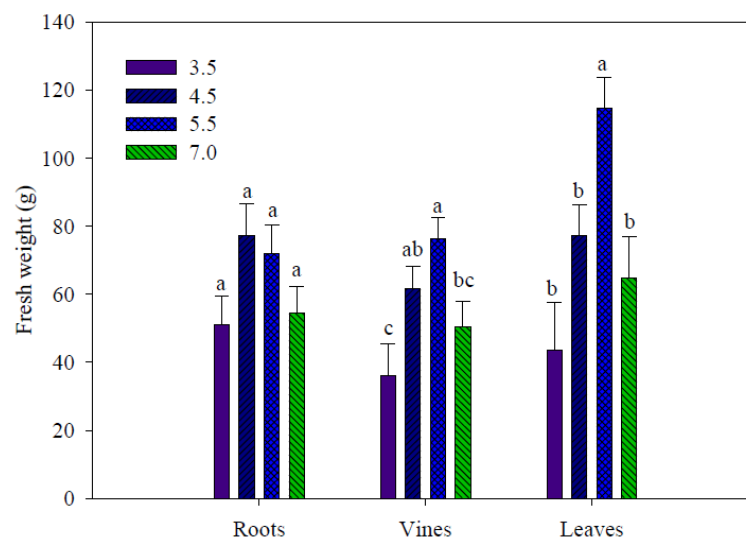


圖 4. 不同酸鹼值處理 9 個月對水耕'台農 1 號'百香果根、莖、葉鮮重之影響。

Fig. 4. Effects of pH on the 'Tainung No. 1' passion fruit fresh weight of roots, vines and leaves under hydroponic solution culture.

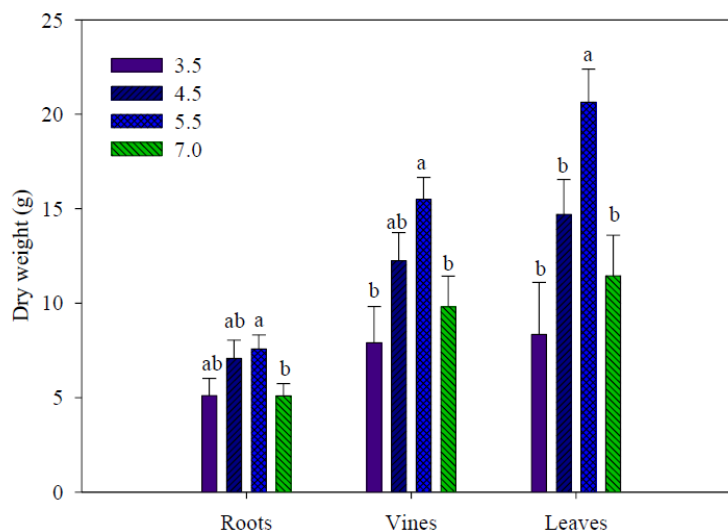


圖 5. 不同酸鹼值處理 9 個月對水耕'台農 1 號'百香果根、莖、葉乾重之影響。

Fig. 5. Effects of pH on the 'Tainung No. 1' passion fruit dry weight of roots, vines and leaves under hydroponic solution culture.

(二) 酸鹼值對'台農 1 號'百香果營養元素含量之影響

pH 5.5 處理之水耕'台農 1 號'百香果葉片磷含量顯著高於 pH 3.5 和 7.0，pH 4.5 處理之根部磷含量顯著高於 pH 7.0。pH 5.5 處理之'台農 1 號'百香果分別在根、莖、葉之鉀含量顯著高於 pH 7.0。pH 5.5 處理之水耕'台農 1 號'百香果葉片鈣含量顯著低於 pH 3.5 和 7.0；pH 7.0 處理之莖部鈣含量顯著高於 pH 4.5 及 5.5 處理。pH 5.5 處理之莖部鎂含量顯著低於 pH 3.5；pH 5.5 處理之根部鎂含量顯著高於 pH 3.5 (表 1)。

pH 7.0 處理之莖部鐵含量顯著低於 pH 4.5 及 5.5；pH 3.5 處理之根部鐵含量顯著高於其他處理。pH 3.5 處理之葉片錳含量顯著高於 pH 5.5。pH 7.0 處理之莖部銅含量顯著高於其他處理；pH 3.5 處理之根部銅含量顯著高於其他處理。不同酸鹼值之'台農 1 號'百香果分別在根、莖、葉之鋅、硼含量無顯著差異 (表 2)。

討 論

酸鹼值及 EC 值往往直接影響到作物的生長與發育，與營養元素的吸收息息相關，酸鹼值低於 5.5 時，鈣、鎂、鉬、硫、磷等元素較難被植物根部吸收，若酸鹼值高於 6.5 時，鐵、錳、硼、銅與鋅則不易吸收。王和吳 (1990) 提出由於作物吸收較多銨態氮容易導致酸鹼值的下降，因此推測酸鹼值較低的原因與養液中銨態氮含量較高有關。

表 1. 不同酸鹼值處理對'台農一號'百香果葉片巨量元素濃度之影響。

Table 1. Effects of hydroponic solution pH on the concentration of macronutrients concentration in passion fruit leaves, stem and root of 'Tainung No. 1'.

Sampling part	Treatments ^z	Macronutrients concentration (%)				
		N	P	K	Ca	Mg
Leaf	3.5	5.02 a ^y	0.41 b	2.80 b	2.37 a	0.58 a
	4.5	4.95 a	0.49 ab	4.25 a	1.88 ab	0.48 a
	5.5	5.59 a	0.57 a	4.66 a	1.46 b	0.44 a
	7.0	5.01 a	0.45 b	3.81 ab	2.26 a	0.52 a
Stem	3.5	3.34 a	0.37 a	1.82 b	1.24 ab	0.22 a
	4.5	2.89 a	0.40 a	2.72 a	1.01 b	0.18 ab
	5.5	3.11 a	0.40 a	2.59 a	1.02 b	0.16 b
	7.0	3.49 a	0.42 a	2.35 ab	1.48 a	0.20 ab
Root	3.5	1.66 a	0.80 ab	1.94 b	1.68 a	0.25 b
	4.5	1.70 a	0.95 a	2.57 ab	1.15 a	0.32 ab
	5.5	1.63 a	0.83 ab	3.00 a	1.16 a	0.40 a
	7.0	2.03 a	0.65 b	2.56 ab	1.07 a	0.34 ab

^zHogland total nutrient solution was adjusted the pH value to 3.5, 4.5, 5.5, 7 with HCl and NaOH.

^yMeans within the column followed by the same letter are not significantly different by LSD test at $P \leq 0.05$.

Kondo 等 (2017)在沖繩進行不同土壤酸鹼值對百香果生長之影響的結果中指出，成熟葉片的中軸長越高代表葉面積越大，在 pH 7.4 處理下莖長、莖乾重及花數最低，而成熟葉片的中軸長最低，表示其葉面積最小。隨著土壤酸鹼值的升高，幼葉和成熟葉的 SPAD 指數降低。在酸鹼值 6.8 和 7.4 處理下葉片光合速率和氣孔導度均低於酸性介質處理。葉片光合速率的降低可能是由於氣孔導度的降低。顯示百香果在酸性介質下生長勢較佳，而對於此結果 Kondo 等 (2017)提出百香果喜歡酸性土壤的原因之一，可能是銨態氮是酸性土壤中主要的無機氮形態。由以上結果可推知酸性土壤如 pH 4.7 和 5.4 適合百香果生長。茶樹和藍莓是偏好在酸性土壤中生長的代表作物；在酸鹼值為 3.5 的土壤環境下可得到最高的茶葉乾種 (Fung and Wong, 2002)，而藍莓的最佳生長環境為土壤酸鹼值範圍 4.5~4.8 (Harmer, 1945)。除了葉片光合速率和氣孔導度外，並未觀察到 pH 6.8 的不利影響，因此百香果種植的允許 pH 範圍相對茶及藍莓寬。

表 2. 不同酸鹼值處理對'台農一號'百香果葉片微量元素濃度之影響。

Table 2. Effects of hydroponic solution pH on the concentration of macronutrients concentration in passion fruit leaves, stem and root of 'Tainung No. 1'.

Sampling part	Treatments ^z	Macronutrients concentration(%)				
		Fe	Mn	Zn	Cu	B
Leaf	3.5	095.2 a ^y	43.8 a	23.7 a	04.7 a	83.1 a
	4.5	099.5 a	39.5 ab	22.8 a	04.8 a	86.2 a
	5.5	081.3 a	28.4 b	21.8 a	04.1 a	86.0 a
	7.0	095.3 a	31.2 ab	20.9 a	04.0 a	75.3 a
Stem	3.5	022.8 ab	09.75a	14.5 a	03.0 b	55.2 a
	4.5	020.0 b	09.50a	13.8 a	03.3 b	37.4 a
	5.5	018.5 b	08.50a	13.4 a	03.5 b	45.3 a
	7.0	027.9 a	07.62a	14.6 a	04.3 a	57.4 a
Root	3.5	1133.8 a	124.4 a	28.8 a	25.0 a	91.5 a
	4.5	0686.9 b	129.4 a	18.8 a	11.9 b	82.5 a
	5.5	0473.8 b	088.1 a	19.4 a	09.6 b	73.0 a
	7.0	0412.5 b	140.0 a	13.1 a	11.0 b	73.9 a

^zHogland total nutrient solution was adjusted the pH value to 3.5, 4.5, 5.5, 7 with HCl and NaOH.^yMeans within the column followed by the same letter are not significantly different by LSD test at $P \leq 0.05$.

Niwayama 和 Higuchia (2018 a)以養液處理至 pH 3.5 時，根長、根乾重及根密度高於所有處理，在此酸鹼值環境下生長可加速根部剪除 1/2 後的恢復速度，表示酸性土壤有利於百香果的營養生長。酸鹼值達 6.5 時，根系幾乎不生長。根體積的增加可以減輕水分逆境並導致高的光合速率，促進生長。植物在酸性土壤中根發育被抑制主要的限制因素是鋁的毒害，因為鋁在 $\text{pH} \leq 4.5$ 的酸性土壤中溶解度增加，土壤交換性鋁 (soil exchangeable aluminum, Al) 以及 Al 飽和度在酸性介質下比在鹼性介質下高，而百香果根系在酸性介質下生長較佳。即使土壤中的鋁含量較高，百香果根中亦無明顯累積鋁的現象，推論鋁難以進入百香果根部的共質體運輸，因此，Niwayama 和 Higuchia (2018 a)認為百香果根系具排除鋁機制，提高鋁耐受性而可在酸性介質中表現較好的生長勢。

由於較高的根體積可減少夏季的水分逆境。在所有處理中，光合速率、蒸散速率和氣孔導度均表現出相似模式。光合速率取決於氣孔導度，受水分逆境影響。由於根體積有限，在較高土壤酸鹼值處理下可能面臨更高的水分逆境，並導致光合速率下降。並可預期光合

速率的降低會降低營養生長。

本研究中，試驗開始處理後 5 週內，pH 7.0 處理之葉片數皆呈較低的表現，與 Niwayama 和 Higuchia (2018 a) 在較高酸鹼值 (pH 6.5) 之較低生長勢結果相符。且本研究中以 pH 4.5 及 5.5 處理在葉片數、株高、側芽數、莖鮮重、葉鮮重、根乾重、莖乾種、葉乾重顯著高於 pH 7.0 處理，其中又以 pH 5.5 處理的平均表現較佳。

但在試驗開始處理後 5 週內，pH 3.5 處理之株高及側芽數上皆呈較低的表現，此結果與 Niwayama 和 Higuchia (2018 a) 提出的在酸鹼值達 3.5 時，根長、根乾重及根密度高於所有處理相反，推測可能原因為水耕栽培所使用的水耕液溫度難以控制，溶氧量的控制將影響水耕栽培植株的生長。基本上養液溫度愈高，溶氧量愈低。作物在養液溶氧量低於 2 ppm 之環境下，根系生理機能不良，養分吸收減少，尤其磷、鉀與錳吸收能力明顯減少，因此建議將溶氧量控制在 5 ppm 以上，以避免根腐問題。而 Niwayama 和 Higuchia (2018 a) 以介質栽培加上日本地區溫度較台灣低，相對降低土壤溫度對植株生長的影響。

鹼性土壤中，微量營養元素的吸收效率偏低，因此可能導致在偏鹼性土壤環境下栽培的葉片相對葉綠素含量 SPAD 的降低。Kondo 等 (2017) 指出在 pH 4.7 中，葉片氮、磷含量最高，鈣、鎂含量最低，隨著土壤 pH 值的升高，葉片錳和鋅含量下降。鹼性土壤會抑制微量營養素，例如錳和鋅的吸收。而缺乏微量營養素導致 SPAD 指數下降。Niwayama 和 Higuchia (2018 b) 的研究結果亦顯示隨著土壤酸鹼值的增加，葉片氮、錳、鋅的含量降低。與 Kondo 等 (2017) 在以番茄作為材料之試驗中，隨著土壤酸鹼值的升高，葉片錳和鋅含量下降的結果一致。氮、錳、鋅，此三種元素與葉綠素合成和光合作用密切相關 (Mae et al., 2001; Masuda, 1988)。這些礦物質的缺乏可能造成酸鹼值較高的 (pH 6.5) 處理下光合速率和 SPAD 指數的降低。

本研究結果顯示，鐵、銅、硼元素主要累積於根部，其餘氮、磷、鉀、鈣、鎂、錳、鋅皆以葉片之含量較高，而處理間在根、莖、葉之礦物營養元素含量變化相近。pH 3.5 處理之葉片錳含量顯著高於 5.5 之處理。雖不具顯著性，但可觀察到隨著酸鹼值提高，葉片錳、鋅含量下降，此結果在根、莖、葉三個部位皆有相似趨勢。同時，酸鹼值達 7.0 之處理在葉綠素含量上明顯較低，雖然未進行實際葉綠素含量之測定，但由整株葉片顏色黃化可推知其光和速率及 SPAD 指數較低。

試驗結果顯示 pH 5.5 處理之葉片磷含量顯著高於 pH 3.5 及 7.0 處理、葉片與根部鉀含量顯著高於 pH 3.5 處理。磷為植物生長之大量必要元素之一，在植物生理扮演提供能量、組成細胞成分等重要的角色。光合作用、呼吸作用等植物代謝都需要有磷所組成的高能化合物：ATP、ADP 來供給、貯藏能量；組成細胞中各種胞器，細胞膜上的雙層磷脂質以及細胞核中的核酸都需要由磷來組成。此分析結果可解釋本研究中以 pH 5.5 處理在葉片數、株高、側芽數、莖鮮重、葉鮮重、根乾重、莖乾種、葉乾重顯著高於 pH 7.0 處理，以及 pH 3.5 處理之株高及側芽數皆顯著低於酸鹼值 5.5 處理的表現。

參考文獻

- 王銀波、吳正宗. 1990. 培養液之理論與實際. p.14-26. 刊於：沈再發、許森森主編. 養液栽培技術講習會專刊第三輯. 行政院農業委員會。
- 李文立. 2005. 百香果. 台灣農家要覽. p.103-108。
- Fung, K. F. and M. H. Wong. 2002. Effects of soil pH on the uptake of Al, F and other elements by tea plants. *J. Sci. Food Agric.* 82: 146-152.
- Harmer, P. M. 1945. The effect of varying the reaction of organic soil on the growth and production of the domesticated blueberry. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 9: 133-141.
- Kondo, T., H. Higuchi, N. Kozai, and T. Ogata. 2017. Effects of neutralization of acidic soil on vegetative growth, flowering, and leaf mineral contents of passion fruit cultivated in Okinawa. *Acta. Hort.* 1178: 93-98.
- Mae, T., H. Koyama, K. Tawaraya, T. Hara, J. Sekiya, S. Inanaga, H. Sasakawa, M. Takahashi, M. Fukami, H. Obata, Y. Watanabe, T. Matoh and M. Yamanouchi. 2001. Shokubutsuno-seiiku-to-eiyoushisutemu In: S. Mori, T. Mae and T. Yoneyama eds. Shokubutsueiyougaku. Buneido Publishing, Tokyo. p.117-183.
- Masuda, Y. 1988. Shokubusu-no-eiyoushi. In: Y. Masuda ed. Shokubutsuseirigaku. Baifukan, Tokyo. p.119-212.
- Niwayama, S. and H. Higuchi. 2018a. Effects of soil pH on the root growth of passion fruit and the mechanism of mineral uptake. *Acta. Hort.* 1217: 111-120.
- Niwayama, S. and H. Higuchi. 2018b. Passion fruit quality under acidic soil conditions. *Hort. J.* 88: 50-56.

Effects of pH on the Growth and Development of 'Tainung No. 1' Passion Fruits

Hsiao-Ching Hsu¹⁾ Huey-Ling Lin²⁾

Key words: Passion fruit, pH, Macronutrients concentration, Micronutrients concentration

Summary

The purpose of this study was to investigate the impact of pH on the growth of 'Tainung No.1' passion fruit (*Passiflora edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*). A hydroponic system was adopted to control the pH value for the cultivation of passion fruit and to study the effect of pH on the growth of passion fruit. Our results showed that number of leaves, plant height, number of lateral buds, stem fresh weight, leaf fresh weight, root dry weight, stem dry weight and leaf dry weight were significantly higher at pH 5.5 than those at pH 7.0. Growth was restricted at pH 3.5. Therefore, the growth of 'Tainung No.1' passion fruit was more suitable with pH values between 4.5 and 5.5. At pH 5.5, leaf phosphorous content was significantly higher than that at pH 3.5 and 7.0, leaf calcium content was significantly lower than that at pH 3.5, however, root, stem and leaf potassium contents were significantly higher than those at pH 7.0. At pH 7.0, stem calcium content was significantly higher than that at pH 4.5 and 5.5. Taken together, phosphorous and potassium absorption was higher at pH 5.5 which may in turn increase the fruit quality.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University, Corresponding author.

紅龍果開花生理與產期調節之研究進展

朱 堉 君¹⁾ 張 哲 嘉²⁾

關鍵字：紅龍果、光週、溫度、細胞分裂素、開花

摘要：紅龍果 (*Hylocereus* spp.)盛產於夏季，因此被認為是長日性植物。利用疏刪枝條或短截新梢等田間操作，可稍微提早自然產期數週；以燈照中斷暗期誘導花芽於秋冬至早春萌發則為產期調節的主要方法，然而產期調節的成效並不穩定，因此瞭解植株內在因子及環境因子如何調控開花為產期調節之關鍵。紅龍果的芽體位於刺座下方，芽體萌發型態會受到光週的調控，在長日光週或短日下暗期中斷，花芽才可受誘導形成；而溫度則是影響芽體的發育重要因子，與光週互相調控紅龍果的開花。暖溫可刺激芽體發育、膨大，在滿足長日光週的條件下，溫度須達到滿足開花的條件，花芽才得以形成並萌發；短日下或長日下低溫則僅有營養芽能萌出。具活性之細胞分裂素會在花芽萌出前大量表現，顯示荷爾蒙亦參與紅龍果開花之調控，然而在栽培上應用生長調節劑 CPPU 仍須同時滿足開花所需之光週與溫度的條件才能達到催花之效果。未來仍需持續探討光週、溫度及細胞分裂素等因子在調控紅龍果開花上的最佳交互作用條件，以提升產期調節效率。

前 言

紅龍果 (pitaya, pitahaya, dragon fruit)為仙人掌科 (Cactaceae)，三角柱屬 (*Hylocereus*) 植物，原產於中、南美洲，是攀附性仙人掌的一種，亦為景天酸代謝 (CAM, Crassulacean acid metabolism)植物；又具耐高溫、乾旱等特性，栽培地區已遍布全球，包括中、南美洲、美國南部、越南、台灣、泰國、中國、澳洲及以色列等，儼然成為最具潛力的新興果樹作物，全球栽培面積估計已超過5萬公頃，經濟栽培物種包括白肉種 (*H. undatus*)及紅肉種

1)國立中興大學園藝學系博士班研究生、高雄區農業改良場助理研究員。

2)國立中興大學園藝學系教授及通訊作者。E-mail: jerchiachang@dragon.nchu.edu.tw

(*H. polyrhizus*)兩大類 (顏和江, 2015; Mizrahi *et al.*, 1997; Mizrahi, 2015; Nerd *et al.*, 2002; Ortiz-Hernandez and Carrillo-Salazar, 2012)。

紅龍果之經濟栽培已逾 40 年,產區雖遍及全球,但仍以東南亞為主 (顏和江, 2015)。而越南是紅龍果當今產銷規模最大的國家,至 2015 年之栽培面積已達 4.2 萬公頃,其中 95%栽培白肉種,越南以外銷為導向進行計畫性生產,超過 80 %產量行銷至全世界 40 多國,使紅龍果成為全球性的水果 (顏和江, 2015; Hoa *et al.*, 2015; Campbell, 2015)。臺灣紅龍果的經濟栽培始於 1983 年,近 10 年來,在栽培技術提升且有優良品種的流通下,使紅龍果產業迅速的蓬勃發展。紅龍果的自然產期為 5-12 月,其中又以 7-10 月為盛產期,藉由對紅龍果開花生理的瞭解,而研發的產期調節是目前生產的關鍵技術,將產期延續至冬末及初春,可降低夏季生產的滯銷風險、避免天災損害,提高產值,以穩定供應內、外銷的需求。

以燈照中斷暗期是紅龍果主要的產調技術 (Zee *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2012),然而受到品種、樹勢、產地緯度及氣候的影響,燈照對產調的效果並不穩定,入冬之後進行燈照需要更長的時間,才能使花芽萌發 (顏和張, 1997; 蘇, 2004; Jiang *et al.*, 2016),且冬果生長期較長,導致生產在 3-4 月間仍有空窗,長時間的燈照使栽培成本大幅提高,也增加能源的消耗。本研究將就紅龍果的開花物候、調控開花的因子及產期調節技術進行文獻回顧與探討,以供未來研究方向之參考。

紅龍果的開花及著果物候期

在臺灣,紅龍果的營養生長於秋末冬初開始,營養梢萌發在 12 月至 2 月達到高峰,至 5 月下旬,營養梢停止萌發。以屏東地區為例,白肉及紅肉種的花芽萌發始於 5 月中旬,在 10 月中旬停止萌發,紅肉種在 7 月下旬達到高峰,白肉種則遲至 8 月中旬才達高峰,部分紅肉品系的花芽可提早於 4 月中旬萌發,並延遲至 11 月上旬才停止 (徐, 2004)。

除了品種差異,紅龍果的開花物候會隨產地之日長及氣候而有不同,在中部產區,白肉種至 8 月下旬即停止花芽萌發 (邱和陳, 2004);在以色列的花期則是在 6 月至 10 月 (Weiss *et al.*, 1994);而在赤道附近的區域,如馬來西亞全區及印尼位於赤道之產區,在日長約為 12 小時,年均溫為 26-27°C 條件下,可週年自然生產;印尼位於南緯 5 度以南的產區,產期則是 11 月至隔年 4 月,為北半球的反季節產區 (Zainudin and Ahmad Hafiz, 2015; Muas and Jumjunidang, 2015)。

在台灣的自然產期,紅龍果每年可萌花數次,約 10-15 天會有一批花次,花量不一,一年最多可有 10 批花次以上,商業栽培會進行疏花,調整為 4-6 批花次,以兼顧產量與品質 (劉, 2013)。然受到高溫影響,會減少花芽萌發批次,在以色列,夏季的高溫達 38°C,僅能萌發 3-4 批花,在極度高溫之地區 (44-46°C),甚至僅在 9 月萌 1 批花 (Nerd *et al.*, 2002)。

花芽萌現後約 17-21 天會開花 (張和顏,1997a; Nerd *et al.*, 2002; Zee *et al.*, 2004)。花朵於傍晚後逐漸暫放,花被至凌晨開放最盛,至翌日清晨及閉合後凋謝 (張和顏,1997a; Weiss *et al.*, 1994; Zee *et al.*, 2004)。紅龍果的花朵呈現漏斗形或高腳碟形。花朵開放時,柱頭與花藥位置依接近的程度可分為兩者有碰觸及無碰觸兩種類型 (江,2005),部分品種具自交不親和特性 (self-incompatibility),為配子體自交不親和 (gametophytic incompatibility),自交不親和的品種需以人工授予其他品種花粉才能著果 (蔡,2003),若是自交親和品種,但柱頭高於花藥位置,且未碰觸者,也需輔以人工授粉,提高著果率。

著果物候可由開花期來推算,紅龍果的果實發育為單 S 生長曲線 (黃和林,2009),在自然產期,白肉種開花後 24-25 天,紅肉種 26-27 天,果皮開始由紅轉綠,開始轉色後 4-5 天,果實即轉色完全 (Nerd *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2005),轉色期間,果肉內的總可溶性固形物及總可溶性糖會逐漸增加,而澱粉則逐漸降低 (黃和林,2009),紅肉種在花後 30-32 天達最低採收成熟度 (許和吳, 2014)。當開花之後的積溫 (accumulated temperature)達到 25,000-26,000°C,果實的總可溶性固形物含量及 a*值會達到最高,為最佳採收成熟度,在夏季約需 32 天,秋季則需 39 天 (Nomura *et al.*, 2005)。在冬季產調時期,紅龍果開花及果實發育受溫度影響,花芽萌發後至開花需增加至 27-30 天,授粉後至果實成熟時間需增加至 60-90 天不等 (個人未發表資料)。

調控植物的開花因子

植物的開花是由營養相 (vegetative phase)轉為生殖相 (reproductive)的過程,受內在 (endogenous factor)因子或外在因子 (external factor)或二者同時的高度調控。

一、內在因子:如生理時鐘 (circadian rhythms)、生育時期變化 (phase change)及荷爾蒙等。意指植物的開花受到植株年齡、植株大小等內在生理因素而調控開花,而非受到環境的直接調控,又稱為自律調控 (autonomous regulation)。如植物的莖頂分生組織需通過幼年期 (juvenile phase)後,產生相的改變,再透過內在的生理時鐘感受適當之環境因子,而被誘導開花 (Taiz and Zeiger, 2010)。

二、外在因子:包含了日長 (光週, photoperiod)及溫度。植物對光週的反應可分為長日性 (Long-day plants, LDPs)或短日性植物 (Short-day plants, SDPs)。長日性植物係指日長超過某一臨界日長 (critical day length)即開花,或可藉由延長日照 (暗期中斷)而提早開花。若需要在某個臨界長度以上的日長才會被誘導開花者,稱為絕對性長日植物 (qualitative LDPs);而在短日下延後開花,但於長日可促進開花者稱相對性長日植物 (quantitative LDPs)。反之,短日性植物則需在日長短於臨界日長時才開花 (黃, 2002)。植物的開花亦受溫度調控,如透過低溫完成春化作用 (vernalization),進而促進開花。光週及溫度常共同調控植物開花,如短日性開花的草莓 (*Fragaria x ananassa* Duch., cv. 'Korona'),相較長日高溫處理,若在相同光週條件下給予低溫,則其花芽形成率較高 (Verheul *et al.*,2007)。

在花芽形態發生 (expressed)之前，需在莖頂歷經花的呼喚 (floral evocation)，包含感受期 (competent)及決定期 (determined)兩個階段。當植物通過幼年期 (juvenile phase)後，就可接受到發育的訊號而產生反應，如光週可誘導花器的發育，並決定花器發育的起始。隨後即使被切離母體，仍能持續發育並接受其他訊號，如荷爾蒙或碳水化合物途徑的誘導，頂端分生組織即可發生相的改變而開花 (Taiz and Ziger, 2010)。

在基因層次上對開花調控，以長日性植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)作為模式植物，已初步得知以下四個途徑參與開花的調控 (Taiz and Ziger, 2010)：

(一) 光週途徑 (photoperiodic pathway)：植物的光受體(紅光受體：光敏素 (Phytochrome) 及藍光受體：隱花色素 (cryptochrome)，在接受光週誘導後啟動生理時鐘相關基因，進而誘導表現 CONSTANS (CO)使得花分生組織的決定基因 LEAFY (LFY)表現增加，在起始花器形成的相關基因 (AP1、AP2、AP3、AG、PI)。

(二) 自律途徑及春化作用途徑：兩個途徑均會降低開花抑制基因 FLOWERING LOCUS (FLC) (LFY 抑制基因)的表現，進而調控開花。

(三) 碳水化合物途徑：蔗糖會藉由增加 LFY 的基因的表來促進開花，目前已知海藻糖-6-磷酸 (trehalose-6-phosphate)，會參與此途徑而調控阿拉伯芥的開花。

(四) GA 途徑：GA 會在短日下，誘導阿拉伯芥提早開花。

目前在多年生果樹作物，僅在柑橘 (Endo et al., 2005)及蘋果 (Tränkner et al., 2010)等作物於開花生理之研究已達分子及基因層次。紅龍果目前尚無基因調控開花的相關研究，但在光週、荷爾蒙及溫度等傳統生理已有初步之進展 (Jiang et al., 2012; 2016; Khaimov-Armoza et al., 2012)。

影響紅龍果開花之因子

一、光強度、光週、光週及溫度之交互作用對紅龍果開花之調控

光週 (photoperiod)及光照強度 (light intensity)均會影響紅龍果開花，若於 6-9 月完全給予紅肉種植株全天 95%遮陰，會使萌花芽的枝條比例由 32.4%降至 2% (Jiang et al., 2012); 在以色列，紅龍果不耐當地強烈日照及紫外線輻射，需在遮陰網內栽培，以防止嚴重日燒；惟自然產期內，紅肉種在遮陰達 60%時，其開花量會較遮陰 30%的減少約 50%以上 (Raveh et al., 1998)。

Jiang et al. (2012)於秋季進行暗期中斷可使紅龍果於 10-12 月萌花，且在夏季縮短日長為 8 小時則可抑制萌花，初步證實紅龍果為長日性植物的推論，且進一步估算其臨界日長約為 12 小時。

然而，紅龍果的開花於長日或於暗期中斷的效應下並非絕對性。例如，Jiang et al (2012)在宜蘭 (北緯 24.4 度)及屏東 (北緯 22.7 度)於 9-10 月間，以暗期中斷進行秋季產調後，累積萌花的枝條比例為分別 28%及 88%，可見以暗期中斷產調的效率並不穩定。又在台灣

南部地區，紅肉種於秋分 (autumn equinox) (日長<12 小時)後進行產調(溫度仍高的 10 月)，僅需 3-4 週即可萌現花芽，若於冬至後(低溫期的 12 月)，則需 80 天以上的燈照時間，才會萌發花芽 (Jiang et al., 2012)。Jiang et al (2016)更指出，紅肉種紅龍果產調可能需在夜溫高於 15°C時進行。白肉種在較溫暖的年份 (夜溫>20°C)進行產期調節，可使花期提早 15 天，若在低溫的年份進行 (夜溫<20°C)，僅能增加第一批自然產期的花量，而無法使花期真正提早(蘇，2004)。

Chu and Chang (2020)於可控溫之人工氣候室內探討紅龍果萌花所需之溫度條件，白肉種紅龍果在長日下萌花適溫為 32/22°C，而萌花所需最低溫度約為 29/19°C，在 25/15°C 下，即使延長日長達 14 小時 14 週，仍無法使花芽萌發 (Chu and Chang, 2020)，顯示在長日光週誘導下，仍須滿足最低之溫度需求，紅龍果花芽才得以形成並萌發。

此外，自然產期內極端的高溫亦抑制紅龍果花芽形成。以色列的 Qutera 地區其夏季平均高溫可達 38°C，致使產季內僅萌生一批花芽，且花期由 6 月延後至 9 月(Nerd et al., 2002)。Khaimov-Armoza 等 (2012)以白肉種 (*H.undatus* clone89-024)為材料，比較不同溫度對萌花之影響，結果顯示，長日高溫 34/28°C (日/夜溫)及低溫 22/16°C (日/夜溫)處理者之萌花量均 28/22°C (日/夜溫)為低，然此研究並未探討芽體發育過程及營養芽之萌發，無法得知溫度對於芽體發育及營養芽萌發的影響。

紅龍果枝條的最適生育溫度為 30/20°C (日/夜溫)，此溫度下的 CO₂ 淨吸收量達到最高，超過 35/25°C 或低於 25/15°C，均影響其光合作用效率，並使枝條產生黃化壞疽 (necrosis) (Nobel and Barrera, 2002)，推測即使於長日或暗期中斷下，若植株受遮陰、自然光照不足，或處於溫度逆境下均可能影響光合作用效率，而降低碳水化合物化合物的合成，最終影響開花。

二、紅龍果芽體發育及萌發與溫度及細胞分裂素 (CPPU)對其調控

(一) 紅龍果的芽體發育及萌發

肉質莖具有三個稜邊 (three ribs)，形成三角柱狀形，稜邊分布許多刺座 (areole)，刺座如同側芽，芽體被覆蓋於刺座下方，日後萌出營養芽或花芽。Jiang et al. (2016)將刺座的芽體依大小及苞片 (bracteole)的數量分類為 0、1、2、3 等級，並發現無論秋季有無進行暗期中斷，均持續發育，但僅在暗期中斷下的芽體可萌出花苞。在秋分過後至下個春分 (spring equinox)來臨前，芽體無法發育為花芽，且部分芽體會在冬季死亡 (Jiang et al., 2016)。

江和楊 (2015)將芽體的類型依型態分為典型枝條、部分呼喚型 (partial evocation)枝條、部分呼喚型花苞及典型花苞，各種類型芽體萌發自 3 月初至 5 月依序出現。部分呼喚型芽體多出現於春分前後的 3-4 月間，係因未接受足夠的環境誘導 (長日)而提早萌出，營養芽一旦萌動，即使於長日下，也無法完成花芽分化。典型花苞穩定出現於 5 月下旬，進而推測春分後的八週為完成花芽呼喚的關鍵期，並提出紅龍果的臨界日長應為 12 小時 (江和楊，2015)，然而，作者尚忽略溫度與光週的共伴作用。

(二) 溫度對紅龍果芽體發育及萌發之調控

以人工氣候室模擬不同溫度觀察白肉種於長日下芽體之發育，發現暖溫 (32/22°C)能

促進芽體發育至較高等級 (3 級芽)，並促進生殖芽萌發，而低溫處理 ($<27/17^{\circ}\text{C}$) 的芽體大多停留至第 2 級，且僅有營養芽萌發，顯示低溫會抑制芽體的發育，且抑制生殖芽之萌發；相較生殖芽，紅龍果的營養芽較不受低溫影響，而生殖芽受到長日誘導形成，然萌發與否則受到暖溫的調控 (Chu and Chang, 2020)。

綜合上述芽體的類型與其萌發的型態研究可知，芽體在任何光週下都會持續發育，在適溫的前提下，長日或短日光週會決定芽體分化的方向為生殖芽或營養芽。

(三) 細胞分裂素對紅龍果開花之調控

紅龍果花芽萌出前，具活性的細胞分裂素會在刺座大量產生，顯示細胞分裂素會參與開花的調控或芽體的萌發 (Khaimov-Armoza *et al.*, 2012)。若於 3-4 月間，在自然光週下，分別於不同週數施用 CPPU，花芽會在 4 月 29 日施用後 1 週萌出，表示此時刺座內的芽體形態在光週條件足夠下已被決定，嗣經植物生長調節劑刺激而萌出花芽 (Jiang and Yang, 2015)。然而在以色列，於 4 月中旬 50 mg/L CPPU 施用一個月後萌出營養芽，需至於 5 月中旬之後施用 CPPU，須經 2 週後才能促使花芽萌發至肉眼可辨別之程度，可能是因早春溫度較低，導致芽體未能轉為生殖芽的狀態而萌出 (Khaimov and Mizrahi, 2006)。

紅龍果產期調節技術之發展

一、以燈照暗期中斷之產調模式

紅龍果被認為是長日性植物，因此以燈照暗期中斷是最主要的產期調節方式，暗期中斷大多配合當地自然產期進行，如越南的主產區前江省、隆安省及平順省，主要栽培白肉種，其正期果產期為 4 至 9 月，產調則於 9 月開始，處理暗期中斷 6-8 小時 15-25 天可萌花；或於 2 月處理 7 小時暗期中斷 10-12 天，產調果於 10 月至隔年 3 月生產(陳和顏, 2015)。早期越南使用 60W 白熾燈泡 (Incandescent bulb, IB)，近年改用 20W 省電燈泡 (Compact fluorescence bulb, CFB)，甚至以 7W LED 燈進行產調，以節省電費 (Hoa *et al.*, 2015; 顏和江, 2015)。

紅龍果在台灣主要產區為南部及中部，紅肉種自然產期為 5-12 月，白肉種則為 6-10 月，7-10 月為盛產期 (Zee *et al.*, 2004; 劉和留, 2015)。中、南部產區受到氣候限制，二者產調的時間及模式略有差異。產調多以 100W 白熾燈或 23W 省電燈泡行暗期中斷 2-6 小時/日 (Jiang *et al.*, 2012; 江等, 2015; 劉和留, 2015)，又可分為延長產期催晚花 (自然花期的延後，生產冬及早春果) 及隔年催早花 (自然花期的提前，生產春果) 2 種策略 (江等, 2015)。白肉種於中部產區 (固定型網室栽培) 之晚花於 9 月上旬至 10 月中旬開始進行燈照，持續 2 個月後可知，若以白熾燈可來花 3-5 批次，省電燈泡則為 3 批花次，果實於 11 月下旬開始採收，可延長產期至翌年 2 月 (簡等, 2016)。紅肉種於 10 月中旬開始燈照，約 3-4 週後來花，可將產期延後至 1-2 月 (Jiang *et al.*, 2012)。再者，南部產區早花可於 1 月下旬，中部於 2 月中旬至 3 月上旬間再次進行電照，花芽會於 3-4 月萌發，可提高 5 月下

旬的產量 (朱堉君與張哲嘉，未發表資料)。

二、生長調節劑於紅龍果產期調節之應用

除了燈照，在越南及以色列亦使用生長調節劑進行催 (Khaimov and Mizrahi, 2006; Hoa *et al.*, 2015; 顏和江，2015)，如越南使用含細胞分裂素類 (Cytokinin) (100 mg/L) 之生長調節劑 POMOTE-H 及 VAC-VSL1 (VAC, DONA Inc., Vietnam)，然需逐一點漬 (dipping) 在刺座 (areole) 上，催花雖然快速，然費工且易造成果實畸形 (顏和江，2015)。以色列產區位於北緯 29 至 32 度左右，產地均溫約 15-29°C，自然產期內受到夏季高溫限制 (超過 38°C) (Nerd *et al.*, 2012)，大部分品種花期分布於 6 月下旬至 10 月上旬，產期較短 (Weiss *et al.*, 1994)，即使利用燈照也無法使產期提早，僅於 5 月施用細胞分裂素類的生長調節劑 200 及 50 mg l⁻¹ CPPU [N-(2-chloro-4-pyridinyl)-N-phenylurea]，使白肉種紅龍果花期提早 1.5-2.5 個月，若施用 100 or 500 mg l⁻¹ GA₃ 則會使花期延後 1-2 個月 (Khaimov and Mizrahi, 2006)。

三、疏刪、短截與疏花於紅龍果產期調節之應用

除了暗期中斷及生長調節劑等產調方式可生產異時果，利用疏刪 (thinning)、短截 (heading back) 或疏花等田間操作則可調節自然產期之花期，

紅龍果萌花芽時期與肉質莖的成熟有關，疏刪及短截等措施可調整新梢之萌發時期，藉由培養不同成熟度的肉質莖，並分配其組成比例，可達到產期調節的效果。紅龍果在產季結束後，即開始萌發新梢，至翌年 5 月，12 月至 2 月為萌梢的高峰，此時萌發的枝條定義為當年生枝條 (徐，2004)，因此植株上的枝條是由當年生及一年生以上 2 種肉質莖組成。其中一年生以上的肉質莖為主要的開花結果枝，且花芽萌發的部位以枝條的遠軸端 (abaxial site) 為主，產季內約有 47-68% 的枝條可開花著果 (徐，2004)。未經疏刪的植株，萌梢的高峰在 3 月，在 11-12 月疏刪肉質莖，可促使芽體提早至 1、2 月萌發，於 5 月下旬成熟後即具開花能力，故當年生枝條的初始萌花期決定於其萌梢時間，因此提早於 11-12 月進行疏刪，有助於提高當年生及一年生以上枝條的萌花比例，此外在 1-3 月短截當年生枝條 10%，可使花芽提早 2 周萌出，並提高自然花期初的花量達 6 倍以上 (江，2005)。

產季的盛期，其花芽萌發於當年生及一年以上枝條的比例相近，然至產季末期以及產期調節時期，花芽的萌發則會集中於當年生的枝條，主要是因為非當年生枝條於夏季開花著果，已消耗大量養分及芽體，然當年生枝條至夏季才逐漸成熟，在夏季未因開花著果消耗養分，且枝條上仍有許多未萌花之芽體所致 (江，2005；廖，2012)。

單一肉質莖在同一產季內經歷一次開花著果後，再次萌花率低，僅 0.4-3.4%，兩次萌花的間隔時間約 53-77 天，僅有在花期之初即萌花芽的枝條，可在產季內有足夠時間回復營養狀態，較有機會再次萌花，因此若在花芽萌發初期給予枝條短截，並保留 120 cm 長度，使初期的萌花率提高，這些在初期萌花的枝條則較有機會在產季內萌發第二次花 (江，2005)。

夏季紅龍果植株上是否有花果的負載會影響產調的成功率 (邱和陳，2004)，且單一肉質的再次萌花率低 (江，2005)，在自然花期中，利用疏花可調節下一批次的花期，於 7 月

底將第一批次的花芽疏除，可延後花期至 8-9 月 (Khaimov and Mizrahi, 2006)，若以夏季 (6-9 月)持續疏花，則可將冬季產調 (10-12 月)的累積萌花枝條比例由 6.1%提高至 20.3%，顯示抑制夏季著果，可提高冬季之萌花量 (Jiang *et al.*, 2012)。

結 論

光週及溫度為調控紅龍果開花的環境因子，在可誘導 (inductive)的光週下，需滿足相當的溫度需求，花芽才得以順利的被誘導形成並且萌發，顯示光週與溫度具有明顯的交感作用，然而兩者間最佳交互作用之條件則有待確認。細胞分裂素亦參與開花調控，並且與光週和溫度均有交感作用，由此交感作用下所對應萌發之芽體型態可推測，成熟枝條的芽體可感受光週及溫度，而長日及適溫下可完成花芽的創始，進而接受細胞分裂素的刺激而萌發。

利用疏刪修剪、短截或疏花等田間操作可使花芽於自然產期開始前提早萌發；而在非誘導 (non-inductive)光週下，則需以燈照中斷暗期誘導花芽形成，暗期中斷配合生長調節劑 (CPPU)之施用雖然可刺激芽體萌發，但受到光週及荷爾蒙與溫度之交感作用之影響，需滿足花芽發育及萌發的溫度才得以產調成功。溫度為產調技術的關鍵因子之一，也影響開花及著果至採收所需時間，因此亦關係到產調的成本與效益，未來如利用氣象預測資料評估產調期間之環境條件是否符合效益，據以擬定產調策略，將能降低成本、節能且準確預測產期。

參 考 文 獻

- 江一蘆。2005。攀附性仙人掌果品系分類、開花著果習性與修剪。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。102pp。
- 江一蘆、楊雯如。2015。紅龍果春季短截後之芽體萌發物候期。台灣園藝 61(1):45-54。
- 江一蘆、廖苑吟、楊雯如。2015。紅龍果光週性與萌芽物候期。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所。pp. 59-66。
- 徐萬德。2004。*Hylocereus spp.* 仙人掌紅龍果之栽培、生育習性及物候調查。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。180pp。
- 陳丁河、顏昌瑞。2015。越南紅龍果的生產現況與銷售。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所。pp.147-167。
- 黃敏展。2002。亞熱帶花卉學總論。興大園藝系。381pp。
- 黃琇亭、林慧玲。2009。紅龍果果實生長期間果實和肉質莖組成份之變化。台灣園藝 55(1): 31-42。
- 廖苑吟。2012。暗期中斷對紅龍果(*Hylocereus polyrhizus*)芽體分化與萌花之影響。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。53pp。

- 劉碧鵬、留欽培。2015。台灣紅龍果品種選育現況與未來展望。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所。pp. 29-43。
- 蔡正壽。2003。紅龍果(*Hylocereus undatus* Britt.& Rose)異種授粉對果實形質之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。97pp。
- 簡熾捷、朱堉君、張哲嘉。2016。以固定型網室生產白肉種紅龍果(*Hylocereus undatus*)秋季產調果之研究。台灣園藝 62(4): 333-334 (摘要)。
- 簡熾捷、張哲嘉。2018。網室內微氣候及紅肉種'大紅'紅龍果生產夏果、秋果之影響。興大園藝 43(4): 1-13。
- 顏昌瑞、江一蘆。2015。世界紅龍果產業概況。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所編印。pp. 19-27。
- 蘇雲翰。2004。光週期及修剪對仙人掌紅龍果(*Hylocereus spp.*)產期調節之影響。國立屏東科技大學農園生產系碩士學位論文。105pp。
- Campbell, J. M., N. V. Hoa, N. M. Chau, and N. H. Hoang. 2015. Value chain initiatives for dragon fruit (pitaya) market development. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 165-173.
- Chien, Y. C. and J. C. Chang. 2019. Net houses effects on microclimate, production and plant protection of white-fleshed pitaya. HortScience 54(3): 692-700.
- Chu, Y. C. and J. C. Chang. 2020. Regulation of floral bud development and emergence by ambient temperature under a long-day photoperiod in white-fleshed pitaya (*Hylocereus undatus*). Sci. Hortic. 271: 109479.
- Hoa, N. V., J. Campbell, N. H. Hoang, and N. M. Chau. 2015. Development and implementation of gap on pitaya in Vietnam: status and challenges. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 155-164.
- Jiang, Y. L., Y. Y. Liao, T. Z. Lin, C. L. Lee, C. R. Yen, and W. J. Yang. 2012. The photoperiod-regulated bud formation of red pitaya. HortScience. 47(8): 1063-1067.
- Jiang, Y. L. and W. J. Yang. 2015. Pitaya reproductive phenology in relation to production system. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 79-86.
- Jiang, Y. L., Y. Y. Liao, M. T. Lin, and W. J. Yang. 2016. Bud Development in response to night-breaking treatment in the non-inductive period in red pitaya (*Hylocereus sp.*). HortScience. 51(6): 690-696.
- Khaimov, A. and Y. Mizrahi. 2006. Effects of day-length, flower thinning and growth regulators on flowering of the vine cacti *Hylocereus undatus* and *Selenicereus megalanthus*. J. Hortic.

- Sci. Biotechnol. 81(3): 465-470.
- Khaimov, A, A. O. Novák, M. Strnad and Y. Mizrahi. 2012. The role of endogenous cytokinins and environmental factors in flowering in the vine cactus *Hylocereus undatus*. Israel J. Plant Sci. 60: 371-383.
- Mizrahi, Y. 2015. Thirty-one years of research and development in the vine cacti pitaya cultivation in Israel. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 1-18.
- Mizrahi, Y., A. Nerd, and P. S. Nobel. 1997. Cacti as crops. Hortic. Rev. 8: 291-391.
- Muas, I. and Jumjunidang. 2015. Status of Dragon Fruit Cultivation and Marketing in Indonesia. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 19-29.
- Nerd, A., Y. F. Gutman, and Y. Mizrahi. 1999. Ripening and postharvest behavior of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). Postharvest Biol. Technol. 17: 39-45.
- Nerd, A., N. Tel-Zur, and Y. M. Nobel. 2002. Fruits of Vine and Columnar Cacti. In: Cacti Biology and Uses. Nobel (eds.) Univ. of California. pp.185-198.
- Nerd, A., Y. Sitrita, R. A. Kaushika, and Y. Mizrahi. 2002. High summer temperatures inhibit flowering in vine pitaya crops (*Hylocereus spp.*). Sci. Hortic. 96: 343-350.
- Nobel, P. S. and E. D. L. Barrera. 2002. High temperature and net CO₂ uptake, and stem damage for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. Biotropica. 34(2): 225-231.
- Nomura, K., M. Ide, and Y. Yonemoto. 2005. Changes in sugars and acids in Pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit during development. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 80(6): 711-715.
- Raveh, E., A. Nerd, and Y. Mizrahi. 1998. Responses of two hemiepiphytic fruit crop cacti to different degrees of shade. Sci Hortic. 73: 151-164.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2015. Plant physiology. 5th ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp.782.
- Verheij, M. J., A. Sønsteby, and S. O. Grimstad. 2007. Influences of day and night temperatures on flowering of *Fragaria x ananassa* Duch., cvs. Korona and Elsanta, at different photoperiods. Sci Hortic. 112: 200-206.
- Weiss, J., A. Nerd, and Y. Mizrahi. 1994. Flowering behavior and pollination requirements in climbing cacti with fruit crop potential. HortScience 29: 1487-1492.
- Zainudin, M. and B. A. Hafiz. 2015. Status of dragon fruit production in Malaysia. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 31-38.
- Zee, F., C. R. Yen, and M. Nishina. 2004. Pitaya (Dragon Fruit, Strawberry Pear). Fruit Nut. 9:1-3.

Recent Research Advances in the Flowering Physiology and Off-Season Production of Pitaya (*Hylocereus* spp.)

Yu-Chun Chu¹⁾ Jer-Chia Chang²⁾

Key words: Cytokinin, Flowering, Pitaya (*Hylocereus* spp.), Photoperiod, Temperature

Summary

Pitaya (*Hylocereus* spp.) is considered as a long-day plant because it mainly produces fruit in summer. The flower buds of pitaya can be stimulated to emerge several weeks before the natural production season through shoot thinning and heading-back pruning, while night-breaking with artificial light is the main method used for off-season production. However, the resulting production levels are unstable, making it crucial that the internal and environmental factors involved in regulating flowering are elucidated. The bud beneath the areole emerges as a flower bud or a vegetative bud depending on the photoperiod, with flower bud formation being induced by a long-day photoperiod or night-breaking under short-day conditions. Temperature also affects bud development and interacts with the photoperiod to regulate flowering, with warm temperatures accelerating bud development and swelling. Thus, flower bud emergence occurs under long-day conditions when the minimum required temperature is reached, whereas only vegetative buds appear under short-day conditions or under long-day conditions with low temperatures. Expressions of active forms of endogenous cytokinins peak before flower bud formation, indicating that endogenous hormones are also involved in the regulation of flowering. However, flowering can only be forced by the application of the plant growth regulator CPPU [N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea] when the photoperiod and temperature are appropriate. Therefore, the effects of photoperiod, temperature, cytokinins, and their interaction on forcing flowering need to be further explored to enhance the efficiency of off-season production.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Assistant Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author. E-mail: jerchiachang@dragon.nchu.edu.tw

紅龍果開花生理與產期調節之研究進展

朱 堉 君¹⁾ 張 哲 嘉²⁾

關鍵字：紅龍果、光週、溫度、細胞分裂素、開花

摘要：紅龍果 (*Hylocereus* spp.)盛產於夏季，因此被認為是長日性植物。利用疏刪枝條或短截新梢等田間操作，可稍微提早自然產期數週；以燈照中斷暗期誘導花芽於秋冬至早春萌發則為產期調節的主要方法，然而產期調節的成效並不穩定，因此瞭解植株內在因子及環境因子如何調控開花為產期調節之關鍵。紅龍果的芽體位於刺座下方，芽體萌發型態會受到光週的調控，在長日光週或短日下暗期中斷，花芽才可受誘導形成；而溫度則是影響芽體的發育重要因子，與光週互相調控紅龍果的開花。暖溫可刺激芽體發育、膨大，在滿足長日光週的條件下，溫度須達到滿足開花的條件，花芽才得以形成並萌發；短日下或長日下低溫則僅有營養芽能萌出。具活性之細胞分裂素會在花芽萌出前大量表現，顯示荷爾蒙亦參與紅龍果開花之調控，然而在栽培上應用生長調節劑 CPPU 仍須同時滿足開花所需之光週與溫度的條件才能達到催花之效果。未來仍需持續探討光週、溫度及細胞分裂素等因子在調控紅龍果開花上的最佳交互作用條件，以提升產期調節效率。

前 言

紅龍果 (pitaya, pitahaya, dragon fruit)為仙人掌科 (Cactaceae)，三角柱屬 (*Hylocereus*) 植物，原產於中、南美洲，是攀附性仙人掌的一種，亦為景天酸代謝 (CAM, Crassulacean acid metabolism)植物；又具耐高溫、乾旱等特性，栽培地區已遍布全球，包括中、南美洲、美國南部、越南、台灣、泰國、中國、澳洲及以色列等，儼然成為最具潛力的新興果樹作物，全球栽培面積估計已超過5萬公頃，經濟栽培物種包括白肉種 (*H. undatus*)及紅肉種

1)國立中興大學園藝學系博士班研究生、高雄區農業改良場助理研究員。

2)國立中興大學園藝學系教授及通訊作者。E-mail: jerchiachang@dragon.nchu.edu.tw

(*H. polyrhizus*)兩大類 (顏和江, 2015; Mizrahi *et al.*, 1997; Mizrahi, 2015; Nerd *et al.*, 2002; Ortiz-Hernandez and Carrillo-Salazar, 2012)。

紅龍果之經濟栽培已逾 40 年,產區雖遍及全球,但仍以東南亞為主 (顏和江, 2015)。而越南是紅龍果當今產銷規模最大的國家,至 2015 年之栽培面積已達 4.2 萬公頃,其中 95%栽培白肉種,越南以外銷為導向進行計畫性生產,超過 80 %產量行銷至全世界 40 多國,使紅龍果成為全球性的水果 (顏和江, 2015; Hoa *et al.*, 2015; Campbell, 2015)。臺灣紅龍果的經濟栽培始於 1983 年,近 10 年來,在栽培技術提升且有優良品種的流通下,使紅龍果產業迅速的蓬勃發展。紅龍果的自然產期為 5-12 月,其中又以 7-10 月為盛產期,藉由對紅龍果開花生理的瞭解,而研發的產期調節是目前生產的關鍵技術,將產期延續至冬末及初春,可降低夏季生產的滯銷風險、避免天災損害,提高產值,以穩定供應內、外銷的需求。

以燈照中斷暗期是紅龍果主要的產調技術 (Zee *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2012),然而受到品種、樹勢、產地緯度及氣候的影響,燈照對產調的效果並不穩定,入冬之後進行燈照需要更長的時間,才能使花芽萌發 (顏和張, 1997; 蘇, 2004; Jiang *et al.*, 2016),且冬果生長期較長,導致生產在 3-4 月間仍有空窗,長時間的燈照使栽培成本大幅提高,也增加能源的消耗。本研究將就紅龍果的開花物候、調控開花的因子及產期調節技術進行文獻回顧與探討,以供未來研究方向之參考。

紅龍果的開花及著果物候期

在臺灣,紅龍果的營養生長於秋末冬初開始,營養梢萌發在 12 月至 2 月達到高峰,至 5 月下旬,營養梢停止萌發。以屏東地區為例,白肉及紅肉種的花芽萌發始於 5 月中旬,在 10 月中旬停止萌發,紅肉種在 7 月下旬達到高峰,白肉種則遲至 8 月中旬才達高峰,部分紅肉品系的花芽可提早於 4 月中旬萌發,並延遲至 11 月上旬才停止 (徐, 2004)。

除了品種差異,紅龍果的開花物候會隨產地之日長及氣候而有不同,在中部產區,白肉種至 8 月下旬即停止花芽萌發 (邱和陳, 2004);在以色列的花期則是在 6 月至 10 月 (Weiss *et al.*, 1994);而在赤道附近的區域,如馬來西亞全區及印尼位於赤道之產區,在日長約為 12 小時,年均溫為 26-27°C 條件下,可週年自然生產;印尼位於南緯 5 度以南的產區,產期則是 11 月至隔年 4 月,為北半球的反季節產區 (Zainudin and Ahmad Hafiz, 2015; Muas and Jumjunidang, 2015)。

在台灣的自然產期,紅龍果每年可萌花數次,約 10-15 天會有一批花次,花量不一,一年最多可有 10 批花次以上,商業栽培會進行疏花,調整為 4-6 批花次,以兼顧產量與品質 (劉, 2013)。然受到高溫影響,會減少花芽萌發批次,在以色列,夏季的高溫達 38°C,僅能萌發 3-4 批花,在極度高溫之地區 (44-46°C),甚至僅在 9 月萌 1 批花 (Nerd *et al.*, 2002)。

花芽萌現後約 17-21 天會開花 (張和顏,1997a; Nerd *et al.*, 2002; Zee *et al.*, 2004)。花朵於傍晚後逐漸暫放,花被至凌晨開放最盛,至翌日清晨及閉合後凋謝 (張和顏,1997a; Weiss *et al.*, 1994; Zee *et al.*, 2004)。紅龍果的花朵呈現漏斗形或高腳碟形。花朵開放時,柱頭與花藥位置依接近的程度可分為兩者有碰觸及無碰觸兩種類型 (江,2005),部分品種具自交不親和特性 (self-incompatibility),為配子體自交不親和 (gametophytic incompatibility),自交不親和的品種需以人工授予其他品種花粉才能著果 (蔡,2003),若是自交親和品種,但柱頭高於花藥位置,且未碰觸者,也需輔以人工授粉,提高著果率。

著果物候可由開花期來推算,紅龍果的果實發育為單 S 生長曲線 (黃和林,2009),在自然產期,白肉種開花後 24-25 天,紅肉種 26-27 天,果皮開始由紅轉綠,開始轉色後 4-5 天,果實即轉色完全 (Nerd *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2005),轉色期間,果肉內的總可溶性固形物及總可溶性糖會逐漸增加,而澱粉則逐漸降低 (黃和林,2009),紅肉種在花後 30-32 天達最低採收成熟度 (許和吳, 2014)。當開花之後的積溫 (accumulated temperature)達到 25,000-26,000°C,果實的總可溶性固形物含量及 a*值會達到最高,為最佳採收成熟度,在夏季約需 32 天,秋季則需 39 天 (Nomura *et al.*, 2005)。在冬季產調時期,紅龍果開花及果實發育受溫度影響,花芽萌發後至開花需增加至 27-30 天,授粉後至果實成熟時間需增加至 60-90 天不等 (個人未發表資料)。

調控植物的開花因子

植物的開花是由營養相 (vegetative phase)轉為生殖相 (reproductive)的過程,受內在 (endogenous factor)因子或外在因子 (external factor)或二者同時的高度調控。

一、內在因子:如生理時鐘 (circadian rhythms)、生育時期變化 (phase change)及荷爾蒙等。意指植物的開花受到植株年齡、植株大小等內在生理因素而調控開花,而非受到環境的直接調控,又稱為自律調控 (autonomous regulation)。如植物的莖頂分生組織需通過幼年期 (juvenile phase)後,產生相的改變,再透過內在的生理時鐘感受適當之環境因子,而被誘導開花 (Taiz and Zeiger, 2010)。

二、外在因子:包含了日長 (光週, photoperiod)及溫度。植物對光週的反應可分為長日性 (Long-day plants, LDPs)或短日性植物 (Short-day plants, SDPs)。長日性植物係指日長超過某一臨界日長 (critical day length)即開花,或可藉由延長日照 (暗期中斷)而提早開花。若需要在某個臨界長度以上的日長才會被誘導開花者,稱為絕對性長日植物 (qualitative LDPs);而在短日下延後開花,但於長日可促進開花者稱相對性長日植物 (quantitative LDPs)。反之,短日性植物則需在日長短於臨界日長時才開花 (黃, 2002)。植物的開花亦受溫度調控,如透過低溫完成春化作用 (vernalization),進而促進開花。光週及溫度常共同調控植物開花,如短日性開花的草莓 (*Fragaria x ananassa* Duch., cv. 'Korona'),相較長日高溫處理,若在相同光週條件下給予低溫,則其花芽形成率較高 (Verheul *et al.*,2007)。

在花芽形態發生 (expressed)之前，需在莖頂歷經花的呼喚 (floral evocation)，包含感受期 (competent)及決定期 (determined)兩個階段。當植物通過幼年期 (juvenile phase)後，就可接受到發育的訊號而產生反應，如光週可誘導花器的發育，並決定花器發育的起始。隨後即使被切離母體，仍能持續發育並接受其他訊號，如荷爾蒙或碳水化合物途徑的誘導，頂端分生組織即可發生相的改變而開花 (Taiz and Ziger, 2010)。

在基因層次上對開花調控，以長日性植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)作為模式植物，已初步得知以下四個途徑參與開花的調控 (Taiz and Ziger, 2010)：

(一) 光週途徑 (photoperiodic pathway)：植物的光受體(紅光受體：光敏素 (Phytochrome) 及藍光受體：隱花色素 (cryptochrome)，在接受光週誘導後啟動生理時鐘相關基因，進而誘導表現 CONSTANS (CO)使得花分生組織的決定基因 LEAFY (LFY)表現增加，在起始花器形成的相關基因 (AP1、AP2、AP3、AG、PI)。

(二) 自律途徑及春化作用途徑：兩個途徑均會降低開花抑制基因 FLOWERING LOCUS (FLC) (LFY 抑制基因)的表現，進而調控開花。

(三) 碳水化合物途徑：蔗糖會藉由增加 LFY 的基因的表來促進開花，目前已知海藻糖-6-磷酸 (trehalose-6-phosphate)，會參與此途徑而調控阿拉伯芥的開花。

(四) GA 途徑：GA 會在短日下，誘導阿拉伯芥提早開花。

目前在多年生果樹作物，僅在柑橘 (Endo et al., 2005)及蘋果 (Tränkner et al., 2010)等作物於開花生理之研究已達分子及基因層次。紅龍果目前尚無基因調控開花的相關研究，但在光週、荷爾蒙及溫度等傳統生理已有初步之進展 (Jiang et al., 2012; 2016; Khaimov-Armoza et al., 2012)。

影響紅龍果開花之因子

一、光強度、光週、光週及溫度之交互作用對紅龍果開花之調控

光週 (photoperiod)及光照強度 (light intensity)均會影響紅龍果開花，若於 6-9 月完全給予紅肉種植株全天 95%遮陰，會使萌花芽的枝條比例由 32.4%降至 2% (Jiang et al., 2012); 在以色列，紅龍果不耐當地強烈日照及紫外線輻射，需在遮陰網內栽培，以防止嚴重日燒；惟自然產期內，紅肉種在遮陰達 60%時，其開花量會較遮陰 30%的減少約 50%以上 (Raveh et al., 1998)。

Jiang et al. (2012)於秋季進行暗期中斷可使紅龍果於 10-12 月萌花，且在夏季縮短日長為 8 小時則可抑制萌花，初步證實紅龍果為長日性植物的推論，且進一步估算其臨界日長約為 12 小時。

然而，紅龍果的開花於長日或於暗期中斷的效應下並非絕對性。例如，Jiang et al (2012)在宜蘭 (北緯 24.4 度)及屏東 (北緯 22.7 度)於 9-10 月間，以暗期中斷進行秋季產調後，累積萌花的枝條比例為分別 28%及 88%，可見以暗期中斷產調的效率並不穩定。又在台灣

南部地區，紅肉種於秋分 (autumn equinox) (日長<12 小時)後進行產調(溫度仍高的 10 月)，僅需 3-4 週即可萌現花芽，若於冬至後(低溫期的 12 月)，則需 80 天以上的燈照時間，才會萌發花芽 (Jiang et al., 2012)。Jiang et al (2016)更指出，紅肉種紅龍果產調可能需在夜溫高於 15°C時進行。白肉種在較溫暖的年份 (夜溫>20°C)進行產期調節，可使花期提早 15 天，若在低溫的年份進行 (夜溫<20°C)，僅能增加第一批自然產期的花量，而無法使花期真正提早(蘇，2004)。

Chu and Chang (2020)於可控溫之人工氣候室內探討紅龍果萌花所需之溫度條件，白肉種紅龍果在長日下萌花適溫為 32/22°C，而萌花所需最低溫度約為 29/19°C，在 25/15°C 下，即使延長日長達 14 小時 14 週，仍無法使花芽萌發 (Chu and Chang, 2020)，顯示在長日光週誘導下，仍須滿足最低之溫度需求，紅龍果花芽才得以形成並萌發。

此外，自然產期內極端的高溫亦抑制紅龍果花芽形成。以色列的 Qutera 地區其夏季平均高溫可達 38°C，致使產季內僅萌生一批花芽，且花期由 6 月延後至 9 月(Nerd et al., 2002)。Khaimov-Armoza 等 (2012)以白肉種 (*H.undatus* clone89-024)為材料，比較不同溫度對萌花之影響，結果顯示，長日高溫 34/28°C (日/夜溫)及低溫 22/16°C (日/夜溫)處理者之萌花量均 28/22°C (日/夜溫)為低，然此研究並未探討芽體發育過程及營養芽之萌發，無法得知溫度對於芽體發育及營養芽萌發的影響。

紅龍果枝條的最適生育溫度為 30/20°C (日/夜溫)，此溫度下的 CO₂ 淨吸收量達到最高，超過 35/25°C 或低於 25/15°C，均影響其光合作用效率，並使枝條產生黃化壞疽 (necrosis) (Nobel and Barrera, 2002)，推測即使於長日或暗期中斷下，若植株受遮陰、自然光照不足，或處於溫度逆境下均可能影響光合作用效率，而降低碳水化合物化合物的合成，最終影響開花。

二、紅龍果芽體發育及萌發與溫度及細胞分裂素 (CPPU)對其調控

(一) 紅龍果的芽體發育及萌發

肉質莖具有三個稜邊 (three ribs)，形成三角柱狀形，稜邊分布許多刺座 (areole)，刺座如同側芽，芽體被覆蓋於刺座下方，日後萌出營養芽或花芽。Jiang et al. (2016)將刺座的芽體依大小及苞片 (bracteole)的數量分類為 0、1、2、3 等級，並發現無論秋季有無進行暗期中斷，均持續發育，但僅在暗期中斷下的芽體可萌出花苞。在秋分過後至下個春分 (spring equinox)來臨前，芽體無法發育為花芽，且部分芽體會在冬季死亡 (Jiang et al., 2016)。

江和楊 (2015)將芽體的類型依型態分為典型枝條、部分呼喚型 (partial evocation)枝條、部分呼喚型花苞及典型花苞，各種類型芽體萌發自 3 月初至 5 月依序出現。部分呼喚型芽體多出現於春分前後的 3-4 月間，係因未接受足夠的環境誘導 (長日)而提早萌出，營養芽一旦萌動，即使於長日下，也無法完成花芽分化。典型花苞穩定出現於 5 月下旬，進而推測春分後的八週為完成花芽呼喚的關鍵期，並提出紅龍果的臨界日長應為 12 小時 (江和楊，2015)，然而，作者尚忽略溫度與光週的共伴作用。

(二) 溫度對紅龍果芽體發育及萌發之調控

以人工氣候室模擬不同溫度觀察白肉種於長日下芽體之發育，發現暖溫 (32/22°C)能

促進芽體發育至較高等級 (3 級芽)，並促進生殖芽萌發，而低溫處理 ($<27/17^{\circ}\text{C}$) 的芽體大多停留至第 2 級，且僅有營養芽萌發，顯示低溫會抑制芽體的發育，且抑制生殖芽之萌發；相較生殖芽，紅龍果的營養芽較不受低溫影響，而生殖芽受到長日誘導形成，然萌發與否則受到暖溫的調控 (Chu and Chang, 2020)。

綜合上述芽體的類型與其萌發的型態研究可知，芽體在任何光週下都會持續發育，在適溫的前提下，長日或短日光週會決定芽體分化的方向為生殖芽或營養芽。

(三) 細胞分裂素對紅龍果開花之調控

紅龍果花芽萌出前，具活性的細胞分裂素會在刺座大量產生，顯示細胞分裂素會參與開花的調控或芽體的萌發 (Khaimov-Armoza *et al.*, 2012)。若於 3-4 月間，在自然光週下，分別於不同週數施用 CPPU，花芽會在 4 月 29 日施用後 1 週萌出，表示此時刺座內的芽體形態在光週條件足夠下已被決定，嗣經植物生長調節劑刺激而萌出花芽 (Jiang and Yang, 2015)。然而在以色列，於 4 月中旬 50 mg/L CPPU 施用一個月後萌出營養芽，需至於 5 月中旬之後施用 CPPU，須經 2 週後才能促使花芽萌發至肉眼可辨別之程度，可能是因早春溫度較低，導致芽體未能轉為生殖芽的狀態而萌出 (Khaimov and Mizrahi, 2006)。

紅龍果產期調節技術之發展

一、以燈照暗期中斷之產調模式

紅龍果被認為是長日性植物，因此以燈照暗期中斷是最主要的產期調節方式，暗期中斷大多配合當地自然產期進行，如越南的主產區前江省、隆安省及平順省，主要栽培白肉種，其正期果產期為 4 至 9 月，產調則於 9 月開始，處理暗期中斷 6-8 小時 15-25 天可萌花；或於 2 月處理 7 小時暗期中斷 10-12 天，產調果於 10 月至隔年 3 月生產(陳和顏, 2015)。早期越南使用 60W 白熾燈泡 (Incandescent bulb, IB)，近年改用 20W 省電燈泡 (Compact fluorescence bulb, CFB)，甚至以 7W LED 燈進行產調，以節省電費 (Hoa *et al.*, 2015; 顏和江, 2015)。

紅龍果在台灣主要產區為南部及中部，紅肉種自然產期為 5-12 月，白肉種則為 6-10 月，7-10 月為盛產期 (Zee *et al.*, 2004; 劉和留, 2015)。中、南部產區受到氣候限制，二者產調的時間及模式略有差異。產調多以 100W 白熾燈或 23W 省電燈泡行暗期中斷 2-6 小時/日 (Jiang *et al.*, 2012; 江等, 2015; 劉和留, 2015)，又可分為延長產期催晚花 (自然花期的延後，生產冬及早春果) 及隔年催早花 (自然花期的提前，生產春果) 2 種策略 (江等, 2015)。白肉種於中部產區 (固定型網室栽培) 之晚花於 9 月上旬至 10 月中旬開始進行燈照，持續 2 個月後可知，若以白熾燈可來花 3-5 批次，省電燈泡則為 3 批花次，果實於 11 月下旬開始採收，可延長產期至翌年 2 月 (簡等, 2016)。紅肉種於 10 月中旬開始燈照，約 3-4 週後來花，可將產期延後至 1-2 月 (Jiang *et al.*, 2012)。再者，南部產區早花可於 1 月下旬，中部於 2 月中旬至 3 月上旬間再次進行電照，花芽會於 3-4 月萌發，可提高 5 月下

旬的產量 (朱堉君與張哲嘉，未發表資料)。

二、生長調節劑於紅龍果產期調節之應用

除了燈照，在越南及以色列亦使用生長調節劑進行催 (Khaimov and Mizrahi, 2006; Hoa *et al.*, 2015; 顏和江，2015)，如越南使用含細胞分裂素類 (Cytokinin) (100 mg/L) 之生長調節劑 POMOTE-H 及 VAC-VSL1 (VAC, DONA Inc., Vietnam)，然需逐一點漬 (dipping) 在刺座 (areole) 上，催花雖然快速，然費工且易造成果實畸形 (顏和江，2015)。以色列產區位於北緯 29 至 32 度左右，產地均溫約 15-29°C，自然產期內受到夏季高溫限制 (超過 38°C) (Nerd *et al.*, 2012)，大部分品種花期分布於 6 月下旬至 10 月上旬，產期較短 (Weiss *et al.*, 1994)，即使利用燈照也無法使產期提早，僅於 5 月施用細胞分裂素類的生長調節劑 200 及 50 mg l⁻¹ CPPU [N-(2-chloro-4-pyridinyl)-N-phenylurea]，使白肉種紅龍果花期提早 1.5-2.5 個月，若施用 100 or 500 mg l⁻¹ GA₃ 則會使花期延後 1-2 個月 (Khaimov and Mizrahi, 2006)。

三、疏刪、短截與疏花於紅龍果產期調節之應用

除了暗期中斷及生長調節劑等產調方式可生產異時果，利用疏刪 (thinning)、短截 (heading back) 或疏花等田間操作則可調節自然產期之花期，

紅龍果萌花芽時期與肉質莖的成熟有關，疏刪及短截等措施可調整新梢之萌發時期，藉由培養不同成熟度的肉質莖，並分配其組成比例，可達到產期調節的效果。紅龍果在產季結束後，即開始萌發新梢，至翌年 5 月，12 月至 2 月為萌梢的高峰，此時萌發的枝條定義為當年生枝條 (徐，2004)，因此植株上的枝條是由當年生及一年生以上 2 種肉質莖組成。其中一年生以上的肉質莖為主要的開花結果枝，且花芽萌發的部位以枝條的遠軸端 (abaxial site) 為主，產季內約有 47-68% 的枝條可開花著果 (徐，2004)。未經疏刪的植株，萌梢的高峰在 3 月，在 11-12 月疏刪肉質莖，可促使芽體提早至 1、2 月萌發，於 5 月下旬成熟後即具開花能力，故當年生枝條的初始萌花期決定於其萌梢時間，因此提早於 11-12 月進行疏刪，有助於提高當年生及一年生以上枝條的萌花比例，此外在 1-3 月短截當年生枝條 10%，可使花芽提早 2 周萌出，並提高自然花期初的花量達 6 倍以上 (江，2005)。

產季的盛期，其花芽萌發於當年生及一年以上枝條的比例相近，然至產季末期以及產期調節時期，花芽的萌發則會集中於當年生的枝條，主要是因為非當年生枝條於夏季開花著果，已消耗大量養分及芽體，然當年生枝條至夏季才逐漸成熟，在夏季未因開花著果消耗養分，且枝條上仍有許多未萌花之芽體所致 (江，2005；廖，2012)。

單一肉質莖在同一產季內經歷一次開花著果後，再次萌花率低，僅 0.4-3.4%，兩次萌花的間隔時間約 53-77 天，僅有在花期之初即萌花芽的枝條，可在產季內有足夠時間回復營養狀態，較有機會再次萌花，因此若在花芽萌發初期給予枝條短截，並保留 120 cm 長度，使初期的萌花率提高，這些在初期萌花的枝條則較有機會在產季內萌發第二次花 (江，2005)。

夏季紅龍果植株上是否有花果的負載會影響產調的成功率 (邱和陳，2004)，且單一肉質的再次萌花率低 (江，2005)，在自然花期中，利用疏花可調節下一批次的花期，於 7 月

底將第一批次的花芽疏除，可延後花期至 8-9 月 (Khaimov and Mizrahi, 2006)，若以夏季 (6-9 月)持續疏花，則可將冬季產調 (10-12 月)的累積萌花枝條比例由 6.1%提高至 20.3%，顯示抑制夏季著果，可提高冬季之萌花量 (Jiang *et al.*, 2012)。

結 論

光週及溫度為調控紅龍果開花的環境因子，在可誘導 (inductive)的光週下，需滿足相當的溫度需求，花芽才得以順利的被誘導形成並且萌發，顯示光週與溫度具有明顯的交感作用，然而兩者間最佳交互作用之條件則有待確認。細胞分裂素亦參與開花調控，並且與光週和溫度均有交感作用，由此交感作用下所對應萌發之芽體型態可推測，成熟枝條的芽體可感受光週及溫度，而長日及適溫下可完成花芽的創始，進而接受細胞分裂素的刺激而萌發。

利用疏刪修剪、短截或疏花等田間操作可使花芽於自然產期開始前提早萌發；而在非誘導 (non-inductive)光週下，則需以燈照中斷暗期誘導花芽形成，暗期中斷配合生長調節劑 (CPPU)之施用雖然可刺激芽體萌發，但受到光週及荷爾蒙與溫度之交感作用之影響，需滿足花芽發育及萌發的溫度才得以產調成功。溫度為產調技術的關鍵因子之一，也影響開花及著果至採收所需時間，因此亦關係到產調的成本與效益，未來如利用氣象預測資料評估產調期間之環境條件是否符合效益，據以擬定產調策略，將能降低成本、節能且準確預測產期。

參 考 文 獻

- 江一蘆。2005。攀附性仙人掌果品系分類、開花著果習性與修剪。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。102pp。
- 江一蘆、楊雯如。2015。紅龍果春季短截後之芽體萌發物候期。台灣園藝 61(1):45-54。
- 江一蘆、廖苑吟、楊雯如。2015。紅龍果光週性與萌芽物候期。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所。pp. 59-66。
- 徐萬德。2004。*Hylocereus spp.* 仙人掌紅龍果之栽培、生育習性及物候調查。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。180pp。
- 陳丁河、顏昌瑞。2015。越南紅龍果的生產現況與銷售。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所。pp.147-167。
- 黃敏展。2002。亞熱帶花卉學總論。興大園藝系。381pp。
- 黃琇亭、林慧玲。2009。紅龍果果實生長期間果實和肉質莖組成份之變化。台灣園藝 55(1): 31-42。
- 廖苑吟。2012。暗期中斷對紅龍果(*Hylocereus polyrhizus*)芽體分化與萌花之影響。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。53pp。

- 劉碧鵬、留欽培。2015。台灣紅龍果品種選育現況與未來展望。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所。pp. 29-43。
- 蔡正壽。2003。紅龍果(*Hylocereus undatus* Britt.& Rose)異種授粉對果實形質之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。97pp。
- 簡熾捷、朱堉君、張哲嘉。2016。以固定型網室生產白肉種紅龍果(*Hylocereus undatus*)秋季產調果之研究。台灣園藝 62(4): 333-334 (摘要)。
- 簡熾捷、張哲嘉。2018。網室內微氣候及紅肉種'大紅'紅龍果生產夏果、秋果之影響。興大園藝 43(4): 1-13。
- 顏昌瑞、江一蘆。2015。世界紅龍果產業概況。台灣紅龍果生產技術改進研討會專刊。行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所編印。pp. 19-27。
- 蘇雲翰。2004。光週期及修剪對仙人掌紅龍果(*Hylocereus spp.*)產期調節之影響。國立屏東科技大學農園生產系碩士學位論文。105pp。
- Campbell, J. M., N. V. Hoa, N. M. Chau, and N. H. Hoang. 2015. Value chain initiatives for dragon fruit (pitaya) market development. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 165-173.
- Chien, Y. C. and J. C. Chang. 2019. Net houses effects on microclimate, production and plant protection of white-fleshed pitaya. HortScience 54(3): 692-700.
- Chu, Y. C. and J. C. Chang. 2020. Regulation of floral bud development and emergence by ambient temperature under a long-day photoperiod in white-fleshed pitaya (*Hylocereus undatus*). Sci. Hortic. 271: 109479.
- Hoa, N. V., J. Campbell, N. H. Hoang, and N. M. Chau. 2015. Development and implementation of gap on pitaya in Vietnam: status and challenges. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 155-164.
- Jiang, Y. L., Y. Y. Liao, T. Z. Lin, C. L. Lee, C. R. Yen, and W. J. Yang. 2012. The photoperiod-regulated bud formation of red pitaya. HortScience. 47(8): 1063-1067.
- Jiang, Y. L. and W. J. Yang. 2015. Pitaya reproductive phenology in relation to production system. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 79-86.
- Jiang, Y. L., Y. Y. Liao, M. T. Lin, and W. J. Yang. 2016. Bud Development in response to night-breaking treatment in the non-inductive period in red pitaya (*Hylocereus sp.*). HortScience. 51(6): 690-696.
- Khaimov, A. and Y. Mizrahi. 2006. Effects of day-length, flower thinning and growth regulators on flowering of the vine cacti *Hylocereus undatus* and *Selenicereus megalanthus*. J. Hortic.

- Sci. Biotechnol. 81(3): 465-470.
- Khaimov, A, A. O. Novák, M. Strnad and Y. Mizrahi. 2012. The role of endogenous cytokinins and environmental factors in flowering in the vine cactus *Hylocereus undatus*. Israel J. Plant Sci. 60: 371-383.
- Mizrahi, Y. 2015. Thirty-one years of research and development in the vine cacti pitaya cultivation in Israel. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 1-18.
- Mizrahi, Y., A. Nerd, and P. S. Nobel. 1997. Cacti as crops. Hortic. Rev. 8: 291-391.
- Muas, I. and Jumjunidang. 2015. Status of Dragon Fruit Cultivation and Marketing in Indonesia. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 19-29.
- Nerd, A., Y. F. Gutman, and Y. Mizrahi. 1999. Ripening and postharvest behavior of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). Postharvest Biol. Technol. 17: 39-45.
- Nerd, A., N. Tel-Zur, and Y. M. Nobel. 2002. Fruits of Vine and Columnar Cacti. In: Cacti Biology and Uses. Nobel (eds.) Univ. of California. pp.185-198.
- Nerd, A., Y. Sitrita, R. A. Kaushika, and Y. Mizrahi. 2002. High summer temperatures inhibit flowering in vine pitaya crops (*Hylocereus spp.*). Sci. Hortic. 96: 343-350.
- Nobel, P. S. and E. D. L. Barrera. 2002. High temperature and net CO₂ uptake, and stem damage for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. Biotropica. 34(2): 225-231.
- Nomura, K., M. Ide, and Y. Yonemoto. 2005. Changes in sugars and acids in Pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit during development. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 80(6): 711-715.
- Raveh, E., A. Nerd, and Y. Mizrahi. 1998. Responses of two hemiepiphytic fruit crop cacti to different degrees of shade. Sci Hortic. 73: 151-164.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2015. Plant physiology. 5th ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp.782.
- Verheij, M. J., A. Sønsteby, and S. O. Grimstad. 2007. Influences of day and night temperatures on flowering of *Fragaria x ananassa* Duch., cvs. Korona and Elsanta, at different photoperiods. Sci Hortic. 112: 200-206.
- Weiss, J., A. Nerd, and Y. Mizrahi. 1994. Flowering behavior and pollination requirements in climbing cacti with fruit crop potential. HortScience 29: 1487-1492.
- Zainudin, M. and B. A. Hafiz. 2015. Status of dragon fruit production in Malaysia. In: Intl. Wkshp. Proc.: Improving Pitaya Production and Mtg., Jiang, Liu, and Huang (eds.), Food and Fert. Technol. Center. pp. 31-38.
- Zee, F., C. R. Yen, and M. Nishina. 2004. Pitaya (Dragon Fruit, Strawberry Pear). Fruit Nut. 9:1-3.

Recent Research Advances in the Flowering Physiology and Off-Season Production of Pitaya (*Hylocereus* spp.)

Yu-Chun Chu¹⁾ Jer-Chia Chang²⁾

Key words: Cytokinin, Flowering, Pitaya (*Hylocereus* spp.), Photoperiod, Temperature

Summary

Pitaya (*Hylocereus* spp.) is considered as a long-day plant because it mainly produces fruit in summer. The flower buds of pitaya can be stimulated to emerge several weeks before the natural production season through shoot thinning and heading-back pruning, while night-breaking with artificial light is the main method used for off-season production. However, the resulting production levels are unstable, making it crucial that the internal and environmental factors involved in regulating flowering are elucidated. The bud beneath the areole emerges as a flower bud or a vegetative bud depending on the photoperiod, with flower bud formation being induced by a long-day photoperiod or night-breaking under short-day conditions. Temperature also affects bud development and interacts with the photoperiod to regulate flowering, with warm temperatures accelerating bud development and swelling. Thus, flower bud emergence occurs under long-day conditions when the minimum required temperature is reached, whereas only vegetative buds appear under short-day conditions or under long-day conditions with low temperatures. Expressions of active forms of endogenous cytokinins peak before flower bud formation, indicating that endogenous hormones are also involved in the regulation of flowering. However, flowering can only be forced by the application of the plant growth regulator CPPU [N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea] when the photoperiod and temperature are appropriate. Therefore, the effects of photoperiod, temperature, cytokinins, and their interaction on forcing flowering need to be further explored to enhance the efficiency of off-season production.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Assistant Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author. E-mail: jerchiachang@dragon.nchu.edu.tw

評估稻稈煙燻水抑制番茄早疫病病原菌效果

李 明 樺¹⁾ 黃 三 光²⁾ 林 慧 玲³⁾

關鍵字：煙燻水、早疫病、茄鏈格孢菌

摘要：本研究以台灣水稻種植常見之廢棄物稻稈製成稻稈煙燻水以作為病害防治資材。透過 GC-MS 分析稻稈煙燻水之有機揮發成分，並測試其對早疫病病原菌之菌絲生長及孢子發芽的抑制效果。結果顯示，稻稈煙燻水主要成分為酚類物質，相對含量 57%，其中以愈創木酚 (Guaiacol) 含量最高。含 7% (v/v) 煙燻水之 V8 培養基可 100% 抑制菌絲生長。濃度 1% (v/v) 煙燻水對早疫病孢子發芽抑制效果達 97%。研究結果顯示稻稈煙燻水具有潛力發展為防治番茄早疫病之非化學合成之防治資材。

前 言

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 為茄科 (Solanaceae) 之一、二年生蔓性草本植物。果實可鮮食及加工利用之。果實富含茄紅素和維生素等營養成分。台灣番茄種植面積於 2011-2018 年皆超過四千公頃，且每年產量皆超過十萬公噸 (糧食供需年報，2018)。

台灣位於高溫且高濕環境之熱帶與亞熱帶地區，栽培番茄期間植株容易因病蟲危害致使產量或品質降低。其中 *Alternaria solani* 所引起之番茄早疫病 (early blight) 為常發生的真菌性病害，危害嚴重時會引起提早落葉。番茄早疫病之防治多採用化學藥劑防治，易造成抗藥性而降低防治效果。因此，研發非化學合成之防治資材並且建立有效率之病害防制策略為重要研究課題。

煙燻水 (smoke-water) 為收集燃燒植物體過程所產生的煙霧，並導入水中而得之溶液。研究指出，煙燻水具廣效防治病害效果。因此，本研究欲以稻稈作為燒燒之材料，測試稻稈煙燻水對番茄早疫病病原菌 *Alternaria solani* 之防治效果，並透過分析其有機揮發成分、探討於培養基上之菌絲生長、孢子發芽抑制效果之主要成分，以評估稻稈煙燻水對病原菌之防治效果，作為評估稻稈煙燻水應用於早疫病病害之非化學合成防治資材的潛力。

-
- 1) 國立中興大學園藝系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝系副教授。
 - 3) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

材 料 與 方 法

一、試驗材料

本試驗使用之病害防治資材稻稈煙燻水，來源為位於臺中市霧峰區之國立中興大學園藝學系試驗農場葡萄中心之煙燻水製造機。每次裝入約 2 公斤之乾燥稻稈，燃燒時溫度達約 143℃，燃燒過程會利用真空壓縮機將燃燒產生之氣體抽出，使氣體中可溶於水之成分有效率的溶於水中。最終收集 500 ml 液體即為稻稈煙燻水。隨後以濾紙 (filter paper, Whatman No.1)過濾並保存於 1℃ 恆溫箱。

供試病原菌為番茄早疫病病原菌 *Alternaria solani*，菌株來源為於 2018 年 11 月於台中新社之番茄溫室採集之具早疫病病徵的葉片。將切取之小塊罹病組織葉片，經消毒後即以三道無菌水漂洗，並於 Water agar 培養 3 日後，切取培養基邊緣之菌絲塊，並接續培養於 10%V8 瓊脂培養基 (10% V8 juice, 0.2% CaCO₃ and 2% agar)，於 25℃ 恆溫箱培養 7 天後，鏡檢確定為 *Alternaria solani* 進行單孢分離純化。將三個單孢分離之菌株接種於番茄植株上作病原性測試，以確定發病情形，最後選定對植物感病力最高之菌株作為試驗菌株。

二、試驗方法

(一) GC-MS 分析鑑定:萃取與分析條件

將經濾紙 (filter paper, Whatman No.1)過濾後之稻稈煙燻水以固相微萃取(Solid-phase microextraction, SPME)取樣完成，接著於氣相層析儀注射口以熱脫附方式將吸附在纖維的分析物脫附並進行分析。取樣方式為利用微量吸管吸取 5 ml 煙燻水樣品並加入頂空瓶 (24ml)，放置平衡 10 分鐘，再將吸附纖維 (纖維固定相:DVB/CAR/PDMS)放出吸附，萃取 30 分鐘後即完成取樣。

本試驗使用 GC-MS 設備與條件如下：

GC：Agilent，7890B (USA)；MS：Agilent，5977B MSD (USA)；Liner：5190-3983 Splitless；Column：HP-5 MS Ultra。升溫條件：起始溫度 40℃ 維持 1 分鐘後，每分鐘上升 5℃，至 150℃ 維持 1 分鐘後，每分鐘上升 10℃，並在溫度 250℃ 時維持 11 分鐘。進樣口溫度：250℃，檢測器溫度：300℃；纖維熱脫附時間：20 分鐘；SPME 注入方式：不分流模式。

(二) 稻稈煙燻水於培養基上對番茄早疫病病原菌之抑菌效果試驗

使用 6mm 之不銹鋼打孔器取培養 3 日菌絲圓塊接種至依煙燻水處理濃度配製而成之 10%V8 瓊脂培養基 (10% V8 juice, 0.2% CaCO₃ and 2% agar)，將培養皿以石蠟膜封緊後，置於 25℃ 恆溫箱，每日光照 12 小時，黑暗 12 小時。每日測量菌絲直徑，於對照組菌絲生長至培養皿邊緣時，測量最後一次菌絲直徑，並計算菌絲抑制率。病原真菌菌絲生長抑制率 (%) = $\frac{[(\text{對照組平均直徑} - \text{處理組平均直徑}) / \text{對照組平均直徑}]}{1} \times 100\%$ 。每處理 5 重覆。

(三) 稻稈煙燻水於玻片上對番茄早疫病孢子發芽抑制效果試驗

本試驗以微量吸管分別吸取 45 μ L 煙燻水處理液及 45 μ L 含 1% glucose 之孢子懸浮液至雙凹載玻片上，並抽吸數次使其均勻混和，蓋上蓋玻片後置於高濕之密閉容器內，置於 25°C 恆溫箱，四小時後確定對照組發芽率達 90% 以上後，開始計算所有處理之孢子發芽率與抑制率。病原真菌孢子生長抑制率(%)=【(對照組平均孢子發芽數-處理組平均孢子發芽數)/對照組平均孢子發芽數】 $\times$ 100%。每處理 5 重覆。

結 果

一、稻稈煙燻水之有機揮發成分

透過頂空固相微萃取法 (SPME) 萃取煙燻水並以氣相層析質譜儀 (GC-MS) 進行分析稻稈煙燻水之有機揮發成分，分析結果顯示其有機揮發成分共有 26 種，酚類占了 16 種，占總有機揮發成分之 57.1%；呋喃類占 3 種，相對含量為 10.1%；烴類占 3 種，相對含量為 5.1%；酯類占 1 種，相對含量為 2.4%；酮類占 1 種，相對含量為 0.8%；醚類則含 1 種，相對含量為 0.8%；另含一種其他物質，相對含量為 0.1%；而無法由 GC-MS 鑑定之未知成分共占 23.6% (表 1)。

酚類物質，以愈創木酚 (Guaiacol) 相對含量最高，達 11.9%；其次為苯酚 (Phenol)，達 11.3%；第三和第四分別為 3-甲基苯酚 (m-Cresol) 與 2-甲基苯酚 (o-Cresol)，各占 6.8% 與 6.5%。而其他酚類物質依序以相對含量排序則分別為：4-乙基苯酚 (4-Ethylphenol)，占 3.9%；2,3-二甲基苯 (2,3-Dimethylphenol)，占 3.5%；4-甲基愈創木酚 (2-Methoxy-4-methylphenol)，占 2.9%；2,5-二甲基苯酚 (2,5-Xylenol)，占 2.8%；4-乙基愈創木酚 (4-Ethylguaiacol)，占 2.7%；2-乙基苯酚 (2-Ethylphenol)，占 2.4%；2-異丙基苯酚 (2-Isopropylphenol)，占 1%；2,3,5-三甲基苯酚 (2,3,5-Trimethylphenol)，占 0.7%；2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-Dimethoxyphenol)，占 0.4%；丁香酚 (Eugenol)，占 0.1%；二氫丁香酚 (Dihydro eugenol)，占 0.1%；4-烯丙基苯酚 (4-Allylphenol)，占 0.1%。

除上述酚類物質外，10 種有機揮發物質包含：3 種呋喃類之相對含量為 10.1%，依其相對含量高至低排序分別為糠醛 (Furfural)，相對含量為 7.3%；Benzofuran, 2,3-dihydro-，相對含量為 1.5%；糠醇 (Furfuryl alcohol)，相對含量為 1.3%。；3 種烴類相對含量共占 5.1%，依相對含量高至低排序分別為：2,4-Hexadiene, 2,5-dimethyl- (4.4%)；6-Methyltetralin (0.4%)；2-甲基萘 (2-Methylnaphthalene)，相對含量為 0.3%；酯類 1 種，乙酸 4-甲基苯酯 (p-Tolyl acetate)，含 2.4%；酮類 1 種，乙基環戊烯醇酮 (3-Ethylcyclopentan-1,2-dione)，相對含量為 0.8%；醚類 1 種，對-甲基苯甲醚 (1-Methoxy-4-methylbenzene)，相對含量為 0.8%；另含一種物質，為 trans-Isoeugenol (相對含量為 0.2%)；無法由 GC-MS 鑑定之未知成分共占 23.6%。

表 1. 稻稈煙燻水 GC-MS 分析結果。

Table 1. Component identification of smoke-water.

No.	Retention time (min)	Area Pct	Peak Identifications	Quality Assurance (%)	Molecular Formula
1	5.3244	7.2688	2-Furancarbaldehyde	86	C ₅ H ₄ O ₂
2	6.1264	1.3055	2-Furanmethanol	90	C ₅ H ₆ O ₂
3	7.3092	4.4163	2,4-Hexadiene, 2,5-dimethyl-	72	C ₈ H ₁₄
4	9.7369	11.2707	Phenol	90	C ₆ H ₆ O
5	10.4104	0.7912	1-Methoxy-4-methylbenzene	93	C ₈ H ₁₀ O
6	11.7202	6.516	o-Cresol	95	C ₇ H ₈ O
7	12.3789	6.753	m-Cresol	95	C ₇ H ₈ O
8	12.6842	11.8517	Guaiacol	95	C ₇ H ₈ O ₂
9	13.0717	2.7625	Phenol, 2,5-dimethyl-	89	C ₈ H ₁₀ O
10	13.492	0.8009	3-Ethyl-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one	92	C ₇ H ₁₀ O ₂
11	13.9903	2.4099	Phenol, 2-ethyl-	93	C ₈ H ₁₀ O
12	14.3058	3.5159	2,3-Dimethylphenol	95	C ₈ H ₁₀ O
13	14.8288	3.9379	4-Ethylphenol	93	C ₈ H ₁₀ O
14	15.5348	2.8588	2-Methoxy-4-methylphenol	93	C ₈ H ₁₀ O ₂
15	16.2565	1.4906	Benzofuran, 2,3-dihydro-	72	C ₈ H ₈ O
16	16.5618	0.6777	2,3,5-Trimethylphenol	91	C ₉ H ₁₂ O
17	16.7732	1.0246	2-Isopropylpheno	87	C ₉ H ₁₂ O
18	17.9136	2.7257	4-Ethylguaiacol	94	C ₉ H ₁₂ O ₂
19	18.2333	0.2933	2-Methylnaphthalene	90	C ₁₁ H ₁₀
20	18.6059	0.3665	6-Methyltetralin	72	C ₁₁ H ₁₄
21	18.86	2.4425	Acetic acid, 4-methylphenyl ester	90	C ₉ H ₁₀ O ₂
22	19.4874	0.0707	Phenol, 4-(2-propenyl)-	86	C ₉ H ₁₀ O
23	19.7965	0.4008	Phenol, 2,6-dimethoxy-	90	C ₈ H ₁₀ O ₃
24	19.9568	0.1837	Eugenol	97	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
25	20.2111	0.1202	Phenol, 2-methoxy-4-propyl	74	C ₁₀ H ₁₄ O ₂
26	21.2609	0.1445	trans-Isoeugenol	95	C ₁₀ H ₁₂ O ₂

二、稻稈煙燻水於培養基上對番茄早疫病病原菌之抑菌效果試驗

本試驗比較不同稀釋倍率煙燻水於培養基上對番茄早疫病病原菌之抑菌效果。培養 7 日菌落正面形態可見菌落黑色沉澱 (圖 1A)，於顯微鏡下可發現孢子為具橫向與縱向的分隔之橢圓三角型態 (圖 1B)。

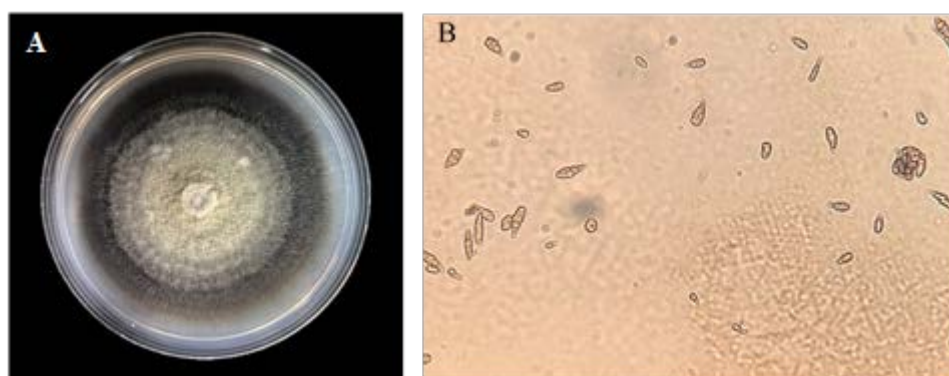


圖 1. *Alternaria solani* 之正面形態 (A)與顯微鏡下孢子形態 (B)。

Fig 1. Morphological characteristics of *Alternaria solani*.

培養的 7 日間每日菌絲生長情形之結果顯示 (圖 2)，培養後自第 1 日至第 7 日比較 1%處理組與對照組菌落外觀無明顯抑制情形，而其餘處理濃度的菌絲大小皆明顯低於對照組，培養後第 1 日之 4%處理或高於 4%濃度的處理組時菌絲生長完全受到抑制，然而培養後第 2 日起至第 7 日僅剩 7%處理有完全抑制菌絲生長之能力，且煙燻水濃度至 1%提升至 6%時，平均每日菌絲生長速度隨煙燻水濃度提升而下降 (圖 3)。第 7 日測量菌絲生長之結果顯示，1%濃度處理與對照組無顯著差異，2%、3%、4%、5%、6%、7%濃度與對照組相比具顯著差異且處理間皆有顯著差異，兩處理間皆以高濃度處理之菌絲生長速度顯著低於低濃度處理，而 7%濃度具 100%之菌絲抑制效果 (表 2)。於處理濃度自 1%提升至 6%，菌絲生長抑制率亦隨煙燻水濃度提高而上升 (圖 4)。

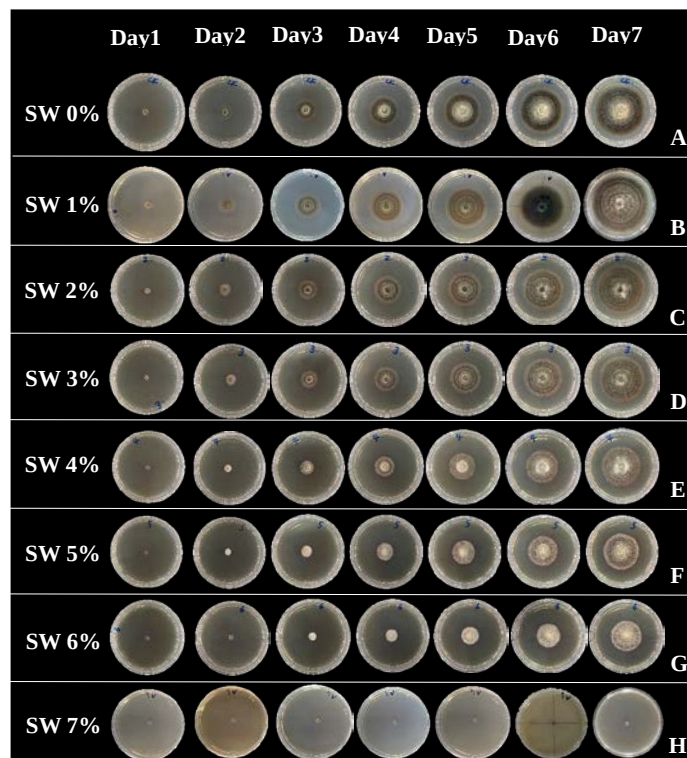


圖 2. 不同濃度煙燻水對 *Alternaria solani* 第 1-7 日菌絲生長之影響。

Fig. 2. Effect of smoke-water concentrations on mycelial growth at 1-7 day.

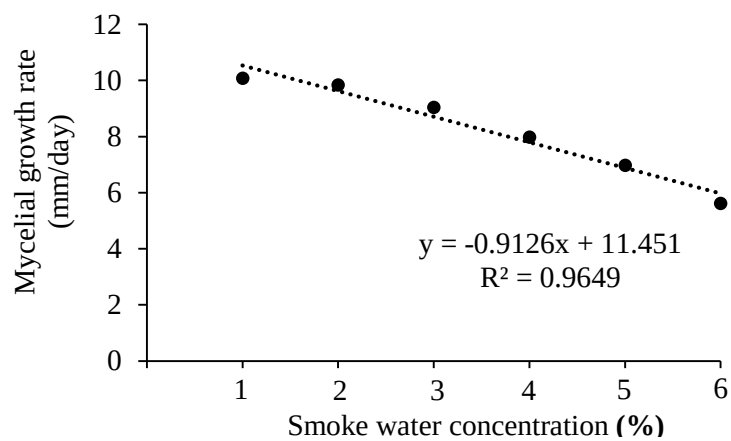


圖 3. 不同濃度煙燻水對 *Alternaria solani* 每日菌絲生長速率之影響。

Fig. 3. Effect of smoke-water concentrations on mycelial growth rate (mm/day).

表 2. 不同濃度煙燻水對 *Alternaria solani* 第 7 日菌絲生長之影響。

Table 2. Effect of smoke-water concentrations on mycelial growth at 7 day.

Smoke-water concentration	Mycelial growth (mm)	Inhibition of mycelial growth (%)
Control	71.06 a*	-
1%	67.56 a	4.93 g
2%	61.80 b	13.02 f
3%	55.56 c	21.82 e
4%	47.86 d	32.65 d
5%	41.90 e	41.03 c
6%	33.66 f	52.64 b
7%	0.00 g	100.00 a

*Means followed by the same letter are not significantly different by LSD test at $P \leq 0.05$.

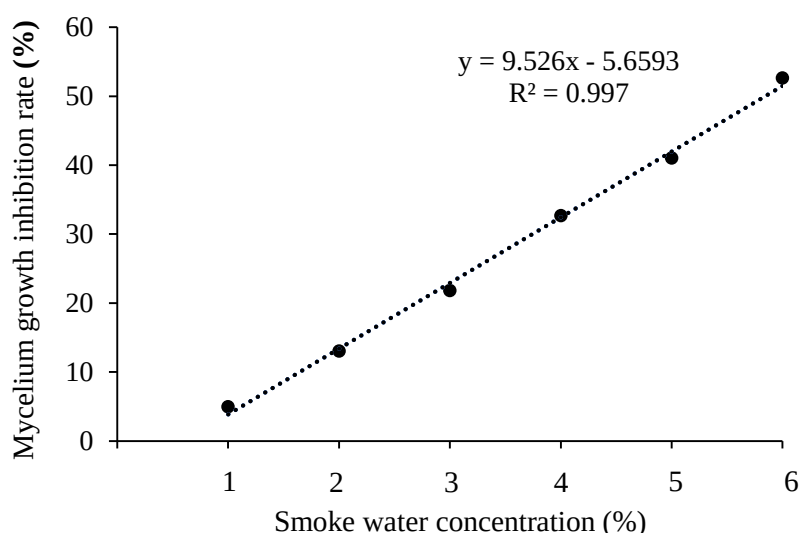


圖 4. 不同濃度煙燻水對 *Alternaria solani* 菌絲生長抑制率之影響。

Fig. 4. Effect of smoke-water concentrations on mycelium growth inhibition rate at 7 day.

三、稻稈煙燻水於玻片上對番茄早疫病孢子發芽抑制效果試驗

培養 4 小時後於顯微鏡下觀察玻片上孢子之結果顯示 (表 3)，對照組之孢子發芽率超過 90%，而所有煙燻水處理之孢子發芽率皆低於 10%，均顯著低於對照組。其中 1%、1.5% 與 2% 煙燻水處理組之孢子發芽率與抑制率於處理之間並無顯著差異，而 1% 處理之抑制率顯著高於 0.5% 處理，0.5% 處理之孢子發芽抑制率顯著高於較低濃度之 0.25% 處理。顯示 1% 之低濃度煙燻水即可抑制高達約 96.8% 之孢子發芽率，0.5% 處理抑制率較低但仍達 93.8%，而處理組抑制率效果最低的為 0.25% 之濃度處理，孢子發芽抑制率約 88.7%。

表 3. 不同濃度煙燻水對 *Alternaria solani* 孢子發芽之影響。

Table 3. Effect of smoke-water concentrations on spore germination (%).

Smoke-water concentration	Spore germination(%)	Spore germination Inhibition rate (%)
Control	95.2a*	-
0.25%	9.8b	88.7c
0.50%	5.4c	93.8b
1.00%	2.8d	96.8a
1.50%	2.8d	96.8a
2.00%	2d	97.7a

*Means followed by the same letter are not significantly different by LSD test at $P \leq 0.05$.

討 論

一、氣相層析質譜儀 (GC-MS) 分析稻稈煙燻水之有機揮發成分

分析結果顯示稻稈煙燻水含有酚、呋喃、醚、酮類、酯類等，其中酚類相對含量最高，相對含量最高之酚類為愈創木酚 (Guaiacol)，次之為苯酚 (Phenol)。莊 (2012) 指出柳杉木醋液之分析結果以酚類物質相對含量最高，其中又以愈創木酚 (Guaiacol) 及苯酚 (Phenol)

之相對含量占較高。孟宗竹竹醋液之酚類物質相對含量最多的為苯酚 (蔡, 2009; 陳, 2010), 分析結果與本試驗相似。Jung 等 (2007)以氣相層析質譜儀分析對 *Alternaria mali* 病原菌有菌絲生長抑制效果之松針萃取液, 共分析出四種主要之成分, 分別為: acetol, furfural, 5-methyl furfural, terpine-4-ol, 並試驗各成分對 *Alternaria mali* 病原菌之菌絲生長抑制效果, 結果顯示 acetol, furfural, 5-methyl furfural, terpine-4-ol 的 MICs (minimum inhibitory concentrations) 分別為 6.25, 0.78, 0.78, and 12.5 (mg/ml), 而抗菌效果以糖醛與 5-methyl furfural 較佳。此外亦分析到與糖醛相關之糠醇 (furfuryl alcohol), 又名呋喃甲醇 (2-Furanmethanol), 呋喃甲醇為呋喃甲醛之下游產物。呋喃甲醇於農業上相關之應用多為提高木材品質, 呋喃甲醇可充分進入木材細胞壁且可與木材之羥基反應之特性亦能降低木材吸濕性, 達到降低白蟻食害木材之效果 (Handi et al., 2005)。另分離到屬於醚類物質之對-甲基苯甲醚 (1-Methoxy-4-methylbenzene), 其對線蟲有一定毒性, Blazsó 等 (2018)之研究結果指出加熱氧化 (thermo-oxidative)處理菸草 (*Nicotiana tabacum*)後, 可檢測出對-甲基苯甲醚 (1-Methoxy-4-methylbenzene) 之揮發成分。Xu 等 (2015)提出利用固相微量萃取法 (SPME)萃取並以氣相層析質譜儀 (GC-MS)檢測出 53 種揮發性之有機化合物, 並選定其中 19 種作為後續之毒殺線蟲活性 (nematicidal activity), 結果顯示對-甲基苯甲醚 (1-Methoxy-4-methylbenzene)具有毒殺秀丽隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 與南方根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)之效果。而酮類, 乙基環戊烯醇酮 (3-Ethylcyclopentan-1,2-dione), 亦為山毛櫸雜酚油中 22 種主要揮發成分之一 (Ogata and Baba, 1989)。

二、稻稈煙燻水於培養基上對番茄早疫病病原菌之抑菌效果試驗

處理中表現最佳的為 7%濃度處理, 於培養基試驗結果顯示可完全抑制病原真菌生長, 推測菌絲結構已遭到損壞而死亡 (陳, 2012)。Melching 等 (1974)利用燃燒煙草產生的煙霧抑制病原菌孢子發芽試驗, 結果顯示燃燒煙草產生的煙霧可有效抑制培養基上的 *P. striiformis*、*Pyricularia oryzae* 以及 *Alternaria* sp.之孢子發芽情形, 但其指出, 仍需確立其燃燒流程與方式方能與不同研究者之結果作比較。燃燒煙草之煙霧中具生物毒性之成分包含尼古丁、一氧化碳、吡啶、酚類以及氰化氫, 本試驗分析稻稈煙燻水之結果亦含多種酚類物質, 但考量燃燒煙草的煙霧中被鑑定出超過 1,200 種成分 (Stedman, 1968), 因此難以就此推斷兩者抑病之相關性。然而酚類及其衍生物能夠破壞病菌細胞膜且使蛋白質變異, 進而導致細胞質滲漏、細胞融解甚至死亡, 藉此抑制真菌之生長 (Murray et al., 2007)。因此推論酚類物質可能在稻稈煙燻水抑制病菌菌絲生長扮演重要角色。

三、稻稈煙燻水於玻片上對番茄早疫病孢子發芽抑制效果試驗

稻稈煙燻水於低濃度處理下對孢子發芽具良好抑制效果, 對照組孢子發芽率達 90% 以上時低濃度煙燻水處理之發芽率皆未達 10%, 與培養基上菌絲抑制情形相比, 顯示稻稈煙燻水可能對孢子的毒性較高於菌絲。但仍需考量稻稈煙燻水之主要抑菌成分為酚類

物質，可能煙燻水與培養基混合會影響揮發性物質的釋放，Fisher 與 Phillips (2008)認為培養基之結構會影響精油裡之揮發性物質的釋放，進而降低抑制菌絲生長效果。

綜合上述研究結果顯示，稻稈煙燻水對番茄早疫病病原菌具抑制效果，隨煙燻水濃度之增加抑菌效果亦隨之增加，主要抑菌成分以酚類化合物為主，因此，稻稈煙燻水具有替代部分化學農藥防治效果之潛力。

參 考 文 獻

- 行政院農業委員會農糧署。2018。糧食供需年報。
- 莊純琍。2012。柳杉木醋液有機成分之分離及其木材防腐與促進種子發芽之應用。國立中興大學森林學系碩士學位論文。臺中。
- 陳柏光。2010。不同溫度採集竹/木醋液抑菌性及初步安全性之評估。國立嘉義大學農學院林產科學暨家具工程學系研究所碩士論文。嘉義。
- 陳湄禎。2012。煙燻水對台農二號番木瓜種子發芽、幼苗生長、抗真菌性病害及收後果實品質的影響。國立中興大學園藝學系博士論文。臺中。
- 蔡忠庭。2009。不同溫度採集孟宗竹竹醋液抗氧化與抗脂肪氧化能力之研究。碩士論文，國立嘉義大學農學院林產科學系研究所碩士論文。嘉義。
- Blazsó, M., B. Babinszki, Z. Czégény, E. Barta-Rajnai, Z. Sebestyén, E. Jakab, J. Nicol, C. Liu, and K. McAdam. 2018. Thermo-oxidative degradation of aromatic flavour compounds under simulated tobacco heating product condition. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 134: 405-414.
- Fisher, K. and C. Phillips. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci. Technol.* 19: 156-164.
- Handi, Y. S., M. Westin, and E. Rasyid. 2005. Resistance of furfurylated wood to termite attack. *Forest Prod. J.* 55(11): 85-88.
- Jung, K. H., S. K. You, S. K. Moon, and U. S. Lee. 2007. Furfural from pine needle extract inhibits the growth of a plant pathogenic fungus. *Alternaria Mail. Mycobiology*. 35(1): 39-43.
- Melching, J. S., J. R. Stanton, and D. L. Koogle. 1974. Deleterious effects of tobacco smoke on germination and infectivity of spores of *Puccinia graminis tritici* and on germination of spores of *Puccinia striiformis*, *Pyricularia oryzae* and an *Alternaria* species. *Phytopathology*. 64: 1143-1147.
- Murray A. R., E. Kisin, V. Castranova, C. Kommineni, M. R. Gunther, and A. A. Shvedova. 2007. Phenol induced *in vivo* oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 1769-1777.

- Ogata, N. and T. Baba. 1989. Analysis of beechwood creosote by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacology*. 66(3): 411-423.
- Stedman, R. L. 1968. Chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem. Rev.* 68(2): 153-207.
- Xu, Y. Y., H. Lu, X. Wang, K. Q. Zhang, and G. H. Li. 2015. Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. *Chem. Biodiversity*. 12: 1415-1421.

Evaluation of Rice Straw Smoke-water of Inhibitory Effect on Tomato Early Blight

Ming-Hua Li¹⁾ San-Gwang Hwang²⁾ Huey-Ling Lin³⁾

Key words : Smoke-water, Early blight, *Alternaria solani*

Summary

In this study, rice straw, an agricultural waste of rice production, was used to produce the smoke-water solution as a disease control material. The volatile organic molecules in the smoke-water solution was analyzed by using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and the inhibitory effect of the smoke-water solution on the mycelial growth and spore germination of *Alternaria solani* was evaluated. Our results revealed that the major compounds in the smoke-water solution are mainly phenolics which account for 57% of all compounds. The main phenolic compound in the smoke-water solution was guaiacol. Mycelial growth was completely inhibited on V8 medium treated with 7% (v/v) smoke-water solution. Up to 97% of spore germination was inhibited with 1% (v/v) smoke-water solution. Taken together, results from this study suggested that the smoke-water solution derived from rice straw has the potential to be developed into an effective non-chemical fungicide for the control of early blight in tomato.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

不同養液硝酸鈣濃度對牛番茄屍腐病發生之影響

方 亮 鈞¹⁾ 宋 妤²⁾

關鍵字：牛番茄、硝酸鈣、屍腐病

摘要：本研究以 8 品種牛番茄進行三種養液硝酸鈣濃度栽培以釐清造成屍腐病發生之條件並比較各品種對屍腐病敏感性之差異，期能篩選出適合設施無土栽培下果實不易發生屍腐病牛番茄品種。於 360 g/1000 L 處理下，各品種產量最高，為 3649.2 至 5084.4 g，屍腐病發生率為 0 %至 6.3 %。當養液硝酸鈣濃度下降至 60 g/1000 L 各品種產量顯著降低，對屍腐病敏感品種如'TMB-688'、'洛克'之屍腐病發生率分別上升至 22.9 及 15.4 %。於果實維管束分布，可見易發生屍腐病該 2 品種於果頂處維管束分別僅有 30.0 及 31.0 條，顯著低於其他品種，'全福 994'、'TMB-490'果頂處維管束則分別有 35.5 及 50.3 條，與'TMB-688'及'洛克'有顯著差異。設施無土栽培減少屍腐病發生建議養液硝酸鈣濃度 360 g/1000 L，或選用'全福 994'及'TMB-490'較耐屍腐病。

前 言

番茄 (*Solanum lycopersicum*)原產於南美洲，為茄科一、二年生草本作物，營養豐富，供生食或加工用，為世界重要茄科作物之一。番茄品種分為大果及小果，大果中有青蓋、全紅番茄，其中牛番茄為全紅番茄，因汁少、肉厚久煮不爛而得名，果重約 150-250 g，全年皆有需求。栽培牛番茄品種多以進口為主，目前臺灣以農友種苗股份有限公司、和生種子股份有限公司、全福種苗股份有限公司之品種為主。近年來因病蟲害及環境條件使露天生產番茄之果實品質及產量不穩定，農民漸改以設施栽培生產，精準化控制環境條件、水分及肥培管理，提升產量及品質。番茄屍腐病為田間栽培常見之生理病害，此生理病害為果頂處缺鈣引起，其病徵為果實果頂處產生黑褐色水浸狀斑塊，褐化

1) 國立中興大學園藝系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

並凹陷腐爛，嚴重時可擴及半個果實。大部分的番茄商業生產地區常遭遇此生理病害之問題，造成嚴重之經濟損失。為瞭解影響番茄尻腐病發生之因素，以介質耕方式，測試不同養液硝酸鈣濃度以釐清尻腐病於無土栽培時可能發生之條件，並比較不同品種對尻腐病之敏感性，期能篩選出耐尻腐病品種，以供設施無土栽培上參考。

材 料 與 方 法

一、試驗材料：

1. 供試品種：'全福993'、'全福994'(全福種苗)、牛番茄'TMB-768'、'TMB-743'、'TMB-688'、'TMB-490'(和生種子有限公司)、'洛克'(興農供應中心)、'漢堡用'(台灣種苗)。
2. 栽培介質：商用泥炭土 (Bio-Mix Potting substratum 003B, Terf, The Netherlands)

二、試驗方法：

1. 栽培時間及地點：國立中興大學園藝學系蔬菜實驗室水牆風扇溫室、民國109年2月至5月。
2. 處理：以含不同濃度硝酸鈣 (五葉肥料股份有限公司，15 % N，25 % CaO)之養液進行澆灌，硝酸鈣濃度分別為180、270、360 g/1000 L，苗期以每株每日300 ml澆灌量進行處理，本葉6片後調整至每日500 ml，後期隨植株大小調整澆灌量至2000 ml，每處理3重複，每重複三株。

三、栽培管理：

1. 播種及育苗：育苗至第3片本葉完全展開時定植於8 L黑色塑膠軟盆，盆內以003 B商用泥炭土裝填至8分滿，植株栽培至第五花序。
2. 整枝及採收：試驗採直立式單幹整枝栽培，於溫室兩端繫上鋼索，尼繩繫於其上，以瓜夾綁在尼龍繩尾端，夾定植株基部，使植株莖部纏繞尼龍繩向上攀爬，植株生長至第5花序即於該花序上方留3片葉打頂。採收白熟果，整串花序剪下，分開正常果實及患尻腐病果實。
3. 養液配方及管理：試驗基礎養液由山崎氏養液 (山崎，1982)配方調整EDTA鐵至30 g(表1)，並依上述方法依不同處理調整硝酸鈣濃度。定植2天後開始人工供給1/2試驗基礎養液，生長至本葉6片後則改以全量養液澆灌，植株第一花序開始著果時則調整為1 1/2養液，視天候狀況調整養液澆灌頻率。

四、調查項目：

1. 果實性狀調查：

- (1) 果實橫徑：以游標卡尺測量果實赤道線最寬處，單位為 mm。
- (2) 果實縱徑：以游標卡尺測量果底至果頂處，單位為 mm。

- (3) 單果重：以電子磅秤測量果實重量，單位為 g。
- (4) 屍腐病發生率：計算每花序上患屍腐病果實之數量並除以果實總數再換算百分比，單位為 %。
2. 維管束數量：將整串花序剪下，每處理挑選大小相近之白熟果實，基部切口處浸於 safranin O 染劑，放置1日後，將其剖開，計算果底、赤道線、果頂之維管束數量。
3. 果實鈣分析：果實採收後以水去除雜質，以1% HCl清洗，再以去離子水清洗。果實以刀切成果底、赤道線、果頂三部分，以72°C烘箱烘乾磨成粉末後以Mehlich法處理，精秤1g樣品置於坩鍋，置入高溫分解爐後先以200°C加熱2小時再升溫至400°C加熱1小時，最後以550°C使樣品完全灰化，樣品取出冷卻1小時後以5 ml 2N HCl溶解，以去離子水經Whatman #42濾紙過濾並定量至25 ml，倒入PE瓶保存。鈣含量測定取0.1 ml灰化濾液加4.9 ml去離子水及1 ml 5 %氧化鎳後以原子吸收光譜儀測定之 (Mehlich, 1984)

五、統計分析：

數據採用SAS套裝軟體9.4版 (SAS. Institute, Cary NC)進行統計分析，因子與因子間交互作用以ANOVA (Analysis of variance)進行變方分析($\alpha=0.05$)，以Fisher's LSD進行各處理平均值比較。

表 1. 牛番茄試驗用基礎養液配方。

Table 1. The basic nutrient solution of beef tomato.

成分	濃度 (g/1000 L)	成分	濃度 (g/1000 L)
Ca(NO ₃) ₂	360	H ₃ BO ₃	2
KNO ₃	400	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2
NH ₄ H ₂ PO ₄	80	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
MgSO ₄	250	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05
Fe-EDTA	30	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.02

EC 值：1.64 dS/m

pH 值：6.0-6.6

結 果

一、養液硝酸鈣濃度對牛番茄果實大小及產量之影響

養液硝酸鈣濃度處理後果實大小、產量如表 2，果實橫徑部分，在養液硝酸鈣濃度60 g/1000 L時，各品種皆為最低，'TMB-490'果實橫徑為各品種間最大，為80.5 mm，其餘七

表 2. 在不同養液硝酸鈣濃度處理下各品種牛番茄果實大小及產量
Table 2. Beef tomato fruit size and yield under different CaNO₃ treatment

鈣處理 (g/1000 L)	橫徑 (mm)			縱徑 (mm)			單果重 (g)			單株總產量/4 花序 (g)		
	60	180	360	60	180	360	60	180	360	60	180	360
994	66.9 b ^z	76.7 a	78.1 a	57.3 b	62.0 a	60.5 a	102.9 a	154.0 a	153.7 b	2633.2 b	3688.4 a	3683.2 a
993	73.8 b	78.8 a	78.2 ab	60.9 a	64.0 a	63.1 a	147.9 a	164.6 a	170.3 a	3548.4 a	4086.4 a	3951.2 a
768	68.3 b	74.2 a	76.3 a	53.2 b	58.5 ab	61.4 a	124.2 b	138.2 ab	154.1 a	3976.0 b	4699.6 b	5084.4 a
743	76.7 b	76.6 b	83.4 a	55.2 b	58.6 ab	61.1 a	139.4 b	152.4 ab	182.6 a	3346.4 b	3656.8 ab	4383.2 a
688	71.9 b	77.0 ab	81.0 a	55.5 b	60.7 a	61.0 a	114.2 c	144.2 b	174.6 a	2882.8 b	3382.0 b	4190.8 a
490	80.5 a	83.0 a	84.5 a	58.9 a	61.5 a	64.0 a	169.5 b	204.4 a	206.4 a	4199.6 b	4905.6 a	4953.6 a
洛克	74.9 b	80.5 a	81.4 a	63.1 a	64.4 a	64.0 a	142.3 b	174.0 a	180.6 a	3415.6 b	4176.8 a	4332.8 a
漢堡用	63.1 b	68.1 a	69.0 a	56.5 b	58.7 b	67.0 a	107.5 c	132.0 b	152.1 a	2579.6 c	3172.0 b	3649.2 a
鈣處理	***y			***			***			***		
品種	***			***			***			***		
鈣處理 X 品種	NS			NS			NS			NS		

^zMeans within the same letters in each row are not significantly different by Fisher's LSD Test at 5 % level .

^yNS, *, **, ***, means non-significant or significant different at p≤0.05, 0.01, or 0.001, respectively..

品種則介於63.1至76.7 mm。當養液硝酸鈣濃度提升至180 g/1000 L，除'TMB-688'及'TMB-490'，其餘品種果實橫徑皆較60 g/1000 L處理有顯著增加情形，為68.1至78.8 mm。在360 g/1000 L處理下，'全福994'、'全福993'、'TMB-768'、'TMB-743'、'TMB-688'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'果實橫徑介於69.0至84.5 mm，比較180 g/1000 L處理，唯'TMB-743'於果實橫徑增加情形較為顯著，其餘品種則無顯著增加。

果實縱徑部分，各品種於60 g/1000 L處理下果實縱徑皆為最低，品種間'全福993'、'TMB-490'、'洛克'果實縱徑較大，分別為60.9、58.9、63.1 mm，其餘5品種間則介於53.2至57.3 mm，在180 g/1000 L處理下，以'全福994'及'TMB-688'在果實縱徑較60 g/1000 L處理顯著增加，分別為62.0、60.7 mm，其餘品種則無顯著增加。當養液硝酸鈣濃度提升至360 g/1000 L時，8品種牛番茄果實縱徑為各處理最大，但僅以'漢堡用'增加較顯著。

單果重部分，在60 g/1000 L處理下各品種單果重皆為最低，僅'TMB-490'單果重超過150 g，其餘7品種介於102.9 g至147.9 g。在180 g/1000 L處理下各品種單果重皆較60 g/1000 L處理有所提升，以'TMB-688'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'單果重提升較為顯著，分別為144.2、204.4、174.0、132.0 g。當養液硝酸鈣濃度提升至360 g/1000 L時各品種單果重為最高，比較180 g/1000 L處理，'全福994'、'TMB-688'、'漢堡用'單果重提升情形較為顯著，為153.7、174.6、152.1 g。

總產量部分，在60 g/1000 L處理下總產量為最低，為2579.6至4199.6 g。在180 g/1000 L處理下，'全福994'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'總產量較60 g/1000 L處理顯著提升，為3172.0至4905.6 g，其他品種總產量則無顯著提升。當養液硝酸鈣濃度提升至360 g/1000 L時除'全福994'及'全福993'，其餘品種總產量皆為各處理最高，比較180 g/1000 L處理，則以'TMB-768'、'TMB-688'、'漢堡用'總產量提升較為顯著，為3649.2至5084.4 g。

二、 養液硝酸鈣濃度對牛番茄尻腐病之影響

以三種養液硝酸鈣濃度處理後八品種尻腐病發生情形如圖 1，在養液硝酸鈣濃度 60 g/1000 L 下'全福 994'、'全福 993'、'TMB-768'、'TMB-743'、'TMB-688'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'尻腐病發生率為 0.83 至 22.9 %，品種間比較以'TMB-688'尻腐病發生率為顯著最高，'全福 994'及'TMB-490'則顯著較低，為 0.83 %及 1.8 %。在 180 g/1000 L 處理下，除'全福 994'，各品種之尻腐病發生率有減少情形，以'TMB-490'顯著最低，皆為 0 %，'洛克'達 10.7 %為顯著最高，其餘品種則介於 1.7 至 9.2 %。當養液硝酸鈣濃度提升至 360 g/1000 L 時各品種尻腐病發生率為最低，'TMB-688'及'洛克'顯著較高，為 5.3 及 6.0 %，其他品種差異不顯著，為 0 至 3.1 %。

三、 果實鈣含量

果實鈣含量如表 3，在養液硝酸鈣濃度 60 g/1000 L 下各品種果實鈣含量為最低，果底處鈣含量部分，以'TMB-743'及'洛克'顯著較低，為 0.34 及 0.38 %，'TMB-490'及'漢堡用'則顯著較高，為 0.59 及 0.60 %。赤道線鈣含量部分以'TMB-743'及'洛克'顯著較低，為 0.23 及 0.26 %，其餘品種間差異則不顯著，為 0.35 至 0.37 %。果頂鈣含量部分，品種間比較

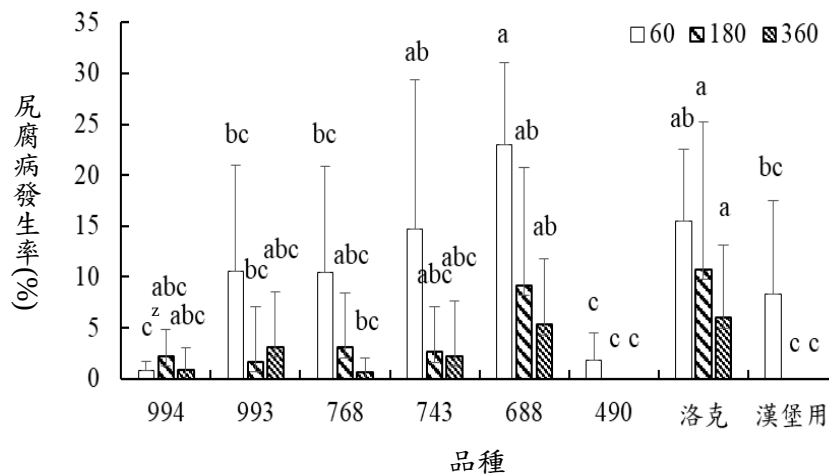


圖 1. 養液硝酸鈣濃度處理下各品種牛番茄果實尻腐病發生情形。

Fig. 1. Blossom-end rot occurrence of 8 beef tomato cultivars under different CaNO_3 treatment.

I represent standard error $\pm$ SE (n=3). ^aMean different letters above the bar within same CaNO_3 treatment indicate a significantly difference by Fisher's LSD test at 5 % level.

以'TMB-490'及'漢堡用'顯著較高，為 0.29 及 0.28 %，'TMB-743'則顯著最低，為 0.14 %，其他品種差異則不顯著，為 0.19 % 至 0.24 %。在養液硝酸鈣濃度 180 g/1000 L 處理下，果底處鈣含量以'全福 994'、'TMB-490'顯著較高，為 0.77 及 0.73 %，'TMB-768'、'TMB-743'及'洛克'則顯著較低，分別為 0.53、0.49、0.52 %。赤道線鈣含量部分，'全福 994'、'TMB-490'、'漢堡用'鈣含量顯著較高，分別為 0.53、0.49、0.53 %，'洛克'則顯著最低，為 0.32 %。果頂鈣含量部分，品種間差異不顯著，為 0.24 至 0.30 %。當養液硝酸鈣濃度提升至 360 g/1000 L 時，各品種果實各部位鈣含量普遍為各處理中最高，果底處鈣含量部分以'全福 994'、'TMB-490'顯著較高，為 0.83 及 0.88 %，'TMB-768'、'TMB-743'、'TMB-688'、'洛克'則顯著較低，為 0.59 至 0.64 %。赤道線鈣含量部分，以'TMB-490'顯著最高，為 0.73 %，'TMB-743'及'洛克'則顯著較低，為 0.32 及 0.31 %，果頂鈣含量部分，'全福 994'、'全福 993'、'TMB-768'、'TMB-743'、'TMB-688'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'分別為 0.32、0.30、0.31、0.28、0.28、0.33、0.24、0.33 % 以'TMB-490'及'漢堡用'顯著較高，皆為 0.33 %，'洛克'則顯著最低，為 0.24 %，其餘品種則介於 0.28 至 0.32 %，差異不顯著。

四、 果實維管束分布情形

果實維管束分布情形如表 4，果底處維管束部分，以'TMB-490'於果底處 72.3 條顯著最多，其餘品種差異不顯著，為 59.2 條至 64.7 條。赤道線維管束部分，以'TMB-490' 64.8 條顯著最高，'TMB-768'、'TMB-743'則顯著較少，為 47.7 及 47.8 條。果頂處維管束部分，以'TMB-490'顯著最多，為 50.3 條，'TMB-688'、'洛克'，30.0 及 31.0 條則顯著最少。其他品種差異不顯著，為 31.3 至 35.5 條。

表 3. 在不同養液硝酸鈣濃度處理下各品種牛番茄果實各部位鈣含量

Table 3. The Ca concentration in different part of beef tomato fruit under different CaNO₃ treatment

鈣處理(g/1000 L)		60		180		360	
部位/品種		果底	赤道線	果頂	果底	赤道線	果頂
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
994		0.52 b ^z	0.37 a	0.23 bc	0.77 a	0.53 a	0.24 b
993		0.48 b	0.35 ab	0.21 bc	0.60 c	0.42 b	0.28 ab
768		0.49 b	0.36 ab	0.24 b	0.53 d	0.42 b	0.27 ab
743		0.34 c	0.23 c	0.14 d	0.49 d	0.35 cd	0.28 ab
688		0.51 b	0.32 b	0.19 c	0.62 bc	0.39 bc	0.27 ab
490		0.59 a	0.35 ab	0.29 a	0.73 a	0.49 a	0.29 a
洛克		0.38 c	0.26 c	0.21 bc	0.52 d	0.32 d	0.26 ab
漢堡用		0.60 a	0.37 a	0.28 a	0.67 b	0.53 a	0.30 a
鈣處理			***y			***	***
品種			***			***	***
鈣處理 X 品種			***			***	***

^zMeans within the same letters in a column are not significantly different by Fisher's LSD Test at 5 % level .

^yNS, *, **, ***, means non-significant or significant different at p≤0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

表 4. 牛番茄 8 品種果實各部位之維管束數量 (條)。

Table 4. The vesicular bundle numbers of different parts in eight beef tomato cultivar fruits.

品種	果底	赤道線	果頂
994	63.5 bc ^z	50.5 de	35.5 bc
993	59.2 c	51.7 cde	34.5 bcd
768	60 bc	47.7 e	35.7 b
743	59.7 bc	47.8 e	31.3 cde
688	64.2 bc	56.8 bc	30.0 e
490	72.3 a	64.8 a	50.3 a
洛克	64.7 b	53.3 bcd	31.0 de
漢堡用	62.7 bc	57.3 b	34.5 bcd

^zMeans within the same letters in a column are not significantly different by Fisher's LSD Test at 5 % level.

討 論

本試驗以8品種牛番茄進行三種不同硝酸鈣含量養液處理，以評估最適之養液內硝酸鈣濃度，根據結果，養液硝酸鈣濃度於60 g/1000 L下8品種牛番茄產量相較於180、360 g/1000 L處理下皆為最低，而在'全福994'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'上此情形較為顯著，推測因以上為果實較大品種，對鈣及氮需求較高所致。當養液硝酸鈣濃度提升至180 g/1000 L時則可見在8品種產量及單果重上皆有所提升，360 g/1000 L果實大小及產量則為最高，番茄對鈣需求大，適量鈣肥能延緩器官衰老、預防生理病害及增進果實品質及產量 (Zhang *et al.*, 2005)，許多試驗皆發現充足的鈣對番茄產量增加有所助益，Hao和Papadopoulos (2004)發現養液中鈣濃度於300 mg/L相較於150 mg/L產量普遍較高，Yang等人 (2012)則以含0、0.3、0.5、0.8、1 %鈣之養液栽培番茄，並發現有添加鈣肥之處理光合作用能力及產量較無添加鈣之處理好，並且整體以0.8 %處理為最佳。Islam (2016)及Spurr(1959)研究中則發現若鈣不足，則果實細胞呈不規則狀，而鈣為中膠層半聚乳糖醛酸鍵結之橋梁，有助於維持細胞結構穩定因此細胞得以穩定膨脹。

本次試驗鈣源為硝酸鈣，因此在產量增加方面除鈣之影響，硝酸態氮亦可能為影響因子，Flores等人 (2003)即於試驗中發現養液中硝酸態氮:銨態氮比例為14:0相較於10:412:2處理產量有增加情形，Borgognone等人 (2013)亦發現以養液中硝酸態氮:銨態氮比例為100:0或70:30栽培番茄可獲得較高之產量。於本試驗，養液硝酸鈣濃度於60 g/1000

L時可見各品種之產量為最低，而提升至180 g/1000 L時可見'全福994'、'TMB-490'、'洛克'、'漢堡用'於總產量有顯著提升，當濃度再提升至360 g/1000 L時除'TMB-768'、'TMB-688'、'漢堡用'產量有顯著提升，其餘5品種並不顯著，可得知依品種不同，氮肥最適用量也有所不同，於該處理下各品種單果重皆為150 g以上，根據臺北農產運銷股份有限公司制定之牛番茄分級標準，果重需大於150 g、果實周徑需大於18 cm方具商品價值，因此本試驗結果以養液硝酸鈣濃度360 g/1000 L栽培牛番茄為最佳。

(二)、不同養液硝酸鈣濃度處理對牛番茄尻腐病之表現及品種表現

本試驗除評估8供試牛番茄於3種養液硝酸鈣濃度處理下之產量，亦比較三種濃度下各品種尻腐病發生情形，於60 g/1000 L下可見各品種尻腐病發生率皆高於8%，而在180 g/1000 L處理下各品種尻腐病發生情形則有減緩，至360 g/1000 L處理則大部分供試品種尻腐病發生率普遍低於5%，由該結果可見硝酸鈣濃度不同確實對尻腐病發生有所影響。本試驗於60、180 g/1000 L處理下尻腐病發生率普遍高於360 g/1000 L，可見該2處理鈣含量明顯不足，Paiva等人 (2008)試驗中以含鈣量0.2、2.5、5、10、15、20 mmol L⁻¹養液栽培番茄，發現在2.5 mmol L⁻¹鈣濃度下植株即於第二花序以上果實發生尻腐病，Bar-Tal和Pressman (1996)發現養液中鈣濃度於3 mmol/L時相較於7 mmol/L尻腐病發生率較高，Vinh等人 (2014)則發現養液中鈣濃度為12 me/L則尻腐病發生機率較低，以上試驗結果皆與本試驗結果類似。

比較供試8牛番茄品種尻腐病發生情形，以'TMB-743'、'TMB-688'、'洛克'尻腐病發生情形最嚴重，於試驗三部分亦有相同情形發生，對照其果實維管束分布情形可見該三品種果頂為管束於正常條件下分別僅31.5、32.0、28.7條，因此可能果實對鈣之吸收運移能力較差，果實於快速生長時所能運送之鈣無法滿足細胞膨大發育所需，導致細胞壁結構減弱而易組織崩潰造成尻腐病。尻腐病發生情形較不嚴重之品種如'全福994'、'TMB-490'、'漢堡用'可見果實於果頂處維管束分布較多，分別為43.5、51.0、53.8條，顯著多於上述對尻腐病敏感品種，因此推測其對鈣運移能力較佳，於本試驗中所見此現象與Belda等人 (1996)及Ho等人 (1993)試驗結果相符。

造成品種間對尻腐病敏感程度差異除各品種果實維管束分布不同，亦可能有其他因素造成品種間之差異，試驗二部分即發現'TMB-688'葉片蒸散作用速率大於'TMB-768'，對照本試驗結果，可見'TMB-768'尻腐病發生率低於'TMB-688'，葉片蒸散作用速率高可能造成葉片獲得之鈣配比較多，果實較少 (Ho, 1989)，'TMB-688'甚至於360 g/1000 L處理下仍有5.3%之尻腐病發生率，可見其可能因蒸散作用較強，縱使在鈣充足狀態下仍受限於葉片與果實間鈣之競爭而導致果實容易缺鈣。

於各品種間可見各品種間果實大小有所不同，Vinh等人 (2018)發現果實生長速率較快之品種尻腐病發生機率普遍較高，可得知此類品種果實快速膨大時鈣供應無法滿足細

胞需求。本次試驗所選品種'TMB-743'、'TMB-688'、'洛克'於正常條件栽培單果重皆達170 g以上，並且於試驗過程中觀察到'TMB-743'果實膨大速率極快，因此推測在低鈣供給條件下可能造成其鈣稀釋效應嚴重而易發生尻腐病，而尻腐病發生情形較不嚴重之品種如'全福994'、'TMB-768'、'漢堡用'其單果重相對較輕，因此推測其鈣稀釋效應可能較不嚴重。於試驗中亦發現'TMB-490'於正常條件栽培單果重雖逾200 g，但其尻腐病發生情形屬本試驗中最輕微者，除可推測為其果實內維管束分布較多，能提供較多鈣供果實生長。

(三)、養液中鈣/銨態氮、鈣/鉀、鈣/鎂比例對尻腐病之影響

在本次試驗中，因所配置之養液皆含有80 g/1000 L濃度之磷酸一銨，三種硝酸鈣濃度處理下造成養液中鈣:銨態氮之比例不同，本次試驗所使用之硝酸鈣鈣含量為11%，磷酸一銨銨態氮含量為12%，換算鈣:銨態氮比例60 g/1000 L處理為6.6:9.6，180 g/1000 L處理鈣:銨態氮為19.8:9.6，360 g/1000 L處理鈣:銨態氮則為39.6:9.6，於60 g/1000 L處理下可見銨態氮比例高於鈣，銨態氮屬於一價陽離子，而鈣屬二價陽離子，在一價陽離子比例較多時會使二價陽離子有效性降低而致使根部優先吸收一價陽離子 (Geraldson, 1957; Marschner, 1997)，因此造成拮抗作用致使鈣於根域有效性降低。Dekock等人(1978)及Nukaya等人 (1995)試驗結果發現提升養液中銨態氮濃度及比例造成果實鈣含量下降及尻腐病發生機率提升，與本試驗結果相似。除銨態氮可能造成拮抗致使鈣吸收受抑制，其他屬單價陽離子元素尚有鉀、鎂，可能與鈣造成拮抗，本次試驗所使用之硝酸鉀鉀含量為13%，硫酸鎂鎂含量為16%，換算鈣:鉀:鎂比例60 g/1000 L處理為6.6:52:40，180 g/1000 L處理為19.8:52:40，360 g/1000 L處理則為39.6:52:40。鉀與鈣拮抗機制與銨態氮類似，Bar-Tal和Pressman (1996)發現調整養液中鉀/鈣比會影響植體內鉀及鈣含量，當養液中鉀/鈣比提升至2時，尻腐病發生率顯著增加，而Taylor等人 (2004)研究中指出將養液中鉀濃度降至1/2則可有效預防尻腐病發生。Hao和Papadopoulos (2002、2004)則於試驗中發現養液若鈣含量於150 mg/L時，鎂含量高於50 mg/L尻腐病發生率明顯提升，以上試驗皆與結果相符。

參 考 文 獻

- Bar-Tal, A. and E. Pressman. 1996. Root restriction and potassium and calcium solution concentration affect dry-matter production, cation uptake, and blossom-end rot in greenhouse tomato. *J. Amer. Soc. Sci.* 121: 649-655.
- Belda, R. M., J. S. Fenlon, and L.C. Ho. 1996. Salinity effects on the xylem vessels in tomato fruit among cultivars with different susceptibilities to blossom-end rot. *J. Hort. Sci.* 71: 173-179.
- Borgognone, D., G. Colla, Y. Rouphael, M. Cardarelli, E. Rea, and D. Schwarz. 2013. Effect of

- nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineral composition of self-grafted and grafted tomatoes. *Sci. Hort.* 149: 61-69.
- DeKock, P. C., A. Hall, R. H. E. Inkson, and R. A. Robertson. 1979. Blossom-end rot in tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* 30: 508-514.
- Flores, Pilar., J. Navarro, M. Carvajal, A. Cerdà, and V. Martínez. 2003. Tomato yield and quality as affected by nitrogen source and salinity. *Agro. EDP Sci.* 23: 249-256.
- Geraldson, C. M. 1957. Control of blossom-end rot of tomatoes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 69: 309-317.
- Ho, L. C., R. Belda, M. Brown, J. Andrews, and P. Adams. 1993. Uptake and transport of calcium and the possible cause of blossom-end rot in tomato. *J. Experi. Bot.* 259: 509-518.
- Hao, X. and A. P. Papadopoulos. 2004. Effects of calcium and magnesium on plant growth, biomass partitioning, and fruit yield of winter greenhouse tomato. *Hort. Sci.* 39: 512-515.
- Marschner, H. 1977. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic, San Diego, Calif.
- Pavia, E. A. S., H. E. P. Martinez, V. W. D. Casali, and L. Padilha. 1998. Occurrence of blossom-end rot in tomato as a function of calcium dose in the nutrient solution and air relative humidity. *J. Plant Nutri.* 21: 2663-2670.
- Taylor, M. D., S. J. Locasico, and M. R. Alligood. 2004. Blossom-end rot incidence of tomato as affected by irrigation quantity, calcium source, and reduced potassium. *Hort. Sci.* 39: 1110-1115.
- Yang, L., H. Qu, Y. Zhang, and F. Li. 2012. Effects of partial root-zone irrigation on physiology, fruit yield and quality and water use efficiency of tomato under different calcium levels. *Agri. Water Manag.* 104: 89-94.
- Zhang, X., L. Du, Y. Wang, and T. Han. 2005. Effect of Ca treatment on physiological disorder and abscission of post-harvest fruits. *Hebei Fruit* 1: 3-5.

The Effects of Different Nutrient CaNO_3 Concentration on the Occurrence of Blossom-end Rot of Beef Tomato

Liang-Chun Fang¹⁾ Yu Sung²⁾

Key words : Beef tomato, CaNO_3 , Blossom-end rot, Vascular bundles

Summary

Due to the unstable climate, diseases, pests, and continuous cropping obstacles in Taiwan, screen houses are used for tomato soilless cultivation. However, this way should be more precise in controlling water and fertilizer regime to avoid physiological disease such as blossom-end rot. In this study, eight beef tomato cultivars and three nutrient CaNO_3 concentrations were used to understand the possible Ca concentrations for blossom-end rot occurrence and compare the sensitivity of blossom-end rot of each cultivar, expecting to screen cultivar which is suitable for soilless culture in green house. The highest yield of eight cultivars was at 360 g/1000 L, ranged from 3649.2 g to 5084.4 g, and the blossom-end rot rate was 0 % to 6.3 %. When the CaNO_3 concentration dropped by 1/4 to 60 g/1000 L, the yield of every cultivar decreased significantly. The blossom-end rot rate of blossom-end rot sensitive cultivars such as 'TMB-688' and 'Roko' increased to 22.9 % and 15.4 %, respectively. Corresponding to their vascular bundles at distal end of fruit, 'TMB-688' and 'Roko' only had 30.0 and 31.1 vascular bundles, which were significantly less than other cultivars. According to the results, 360 g/1000 L CaNO_3 in nutrient solution was recommended to prevent the occurrence of blossom-end rot, and the most suitable cultivar for resistant blossom-end rot was 'Chenfu 994'.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

芭菲爾鞋蘭組織培養文獻回顧與進展

張 珈 錡¹⁾ 張 正²⁾

關鍵字: 芭菲爾鞋蘭、癒合組織、擬原球體、芽體增殖、根系誘導

摘要: 芭菲爾鞋蘭為我國重要的經濟花卉作物，然而其種苗繁殖有極高的比例仰賴無菌播種法或分株法，使得商業生產模式發展不易。本篇回顧了芭菲爾鞋蘭組織培養技術相關的研究進展，並從組織培養再生途徑、培養條件及物種差異性等不同面向進行整理及探討。事實上，近來的研究對改善芭菲爾鞋蘭組織培養效率有一些突破性的嘗試，包括：培植體取樣、褐化抑制處理及增殖培養方式等，期望未來能有更多的研究資源投入發展芭菲爾鞋蘭組織培養技術，以加速建立有效率且穩定的種苗量化方法。

前 言

芭菲爾鞋蘭 (*Paphiopedilum*) 為仙履蘭 (slipper orchids) 的其中一屬，仙履蘭為蘭科 (Orchidaceae) 拖鞋蘭亞科 (Cypripediolideae) 下的一群植物，該群之植物特徵為有 2 個可孕雄蕊和 1 個假雄蕊、2 枚側萼片合生形成 1 枚合萼片，且花朵的唇瓣特化成囊袋狀。因其特殊的花型約自 1980 年代左右受到國內賞蘭玩家的重視，開始大量自國外引種栽培，並逐漸發展成為我國重要的經濟花卉作物，以盆花或切花型式流通於市場，而國內無論在雜交育種或商業栽培生產上多以芭菲爾鞋蘭屬之物種為主。該屬約有 80 餘種主要分布在熱帶亞洲，範圍包含東南亞、喜馬拉雅山低地到中國大陸西南部、馬來西亞、新幾內亞及索羅門群島等地，以地生型為主，少數著生型，分布於海拔 0-3000 公尺，主要生長在高山繁茂的樹林下，富有腐植質的森林地表和岩石裂縫中 (Cribb, 1998; Nash, 1985)。

關於芭菲爾鞋蘭之分類學研究，最早是由德國植物學家 E. H. Pfitzer 於 1886 年將原產於熱帶亞洲且具有二列基生葉的物種自喜普鞋蘭屬分離另歸類為芭菲爾鞋蘭屬。之後 Pfitzer (1894)、Hallier (1896) 分別將芭菲爾鞋蘭屬物種再細分成數個亞屬，惟此時分類的物

1) 國立中興大學園藝系博士班研究生、行政院農業委員會種苗改良繁殖場助理研究員。
2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

種尚包含 Rolfe(1896)後才歸類為鬍拉密鞋蘭屬之南美洲硬葉種。之後歷經 Pfitzer(1903)、Brieger (1973)、Karasawa and Saito (1982)、Atwood (1984)和 Cribb (1997)對芭菲爾鞋蘭屬物種之重新定義及分類 (Cribb, 1998)。近來研究根據形態學、細胞學和分子系統發育學將芭菲爾鞋蘭屬分為三亞屬，包括：硬葉尖瓣亞屬 (*Parvisepalum*)、短瓣亞屬 (*Barchypetalum*)、芭菲爾亞屬 (*Paphiopedilum*)，其中芭菲爾亞屬又可分為 5 個節 (Section)，包括：綠葉多花 (*Coryopedilum*)、紅瓣多花 (*Pardalopetalum*)、續花 (*Cochlopetalum*)、斑葉單花 (*Barbata*)、綠葉單花 (*Paphiopedilum*) (許，2007；Cribb, 1998；Chochai *et al.*, 2012)。本篇目的主要在回顧及探討國內、外有關芭菲爾鞋蘭屬物種組織培養技術之研究進展。

芭菲爾鞋蘭之組織培養研究始於 1973 年 Bubeck 嘗試以新生側芽之頂端分生組織進行培養，隨後 Morel (1974)、Stewart and Button (1975)亦陸續發表以綠葉單花物種 (*P. villosum*、*P. fairieanum*、*P. insigne*)及一些雜交種之莖基部作為培植體進行組織培養，然而其共同的結果顯示，芭菲爾鞋蘭培植體消毒不易且培養成功率低 (Yam and Arditti, 2017)。Huang (1988)也指出除了培植體污染情形嚴重外，芭菲爾鞋蘭尚有培養材料取得困難以及在體外培養條件下培植體發育不良、生長緩慢之問題，其組織培養技術較之其他蘭花顯得難以突破，目前商業栽培使用的芭菲爾鞋蘭種苗主要仍仰賴無菌播種法 (Hong *et al.*, 2008)或分株法，然傳統分株法繁殖營養系植株之速率慢，而實生苗植株在株型、花色、花型表現上的不一致和開花整齊度不均，使得芭菲爾鞋蘭朝向商業量化生產發展面臨困境 (林，2013)。

芭菲爾鞋蘭組織培養的進展

關於芭菲爾鞋蘭組織培養的研究過去多集中在種子無菌播種技術的建立，以及利用無菌播種之實生苗進行後續芽體增殖或癒合組織、擬原球體再生之研究 (Zeng *et al.*, 2015)，此與芭菲爾鞋蘭試管外培植體消毒不易有極大的關係。而近來嘗試利用試管外植體進行組織培養之研究增加，主要選用之培植體以側芽 (Do *et al.*, 2019；Huang, 1988；Luan *et al.*, 2019；Nguyen *et al.*, 2018)及花芽 (林和林 2010；黃，2012；王和林，2017；Liao *et al.*, 2011)為主，相關研究除了探討提升繁殖效率之培養條件外，部分文章亦著重在改善培植體消毒及褐化抑制處理。本篇將依據文獻中使用之繁殖再生途徑、培植體類型、主要影響因子以及選用之芭菲爾鞋蘭物種進行歸納整理。

一、癒合組織 (callus)和擬原球體 (protocorm-like body, PLB)再生途徑

芭菲爾鞋蘭誘導癒傷組織或擬原球體再生植株之文獻，依其使用之培植體不同大致可分為兩類：

(一) 種子無菌播種形成之原球體、擬原球體

蘭花發芽過程中形成之原球體具有快速細胞分裂之能力，自然環境下原球體形成頂端

分生組織後迅速發育成芽體，然而在適當的培養下亦可自表面形成癒合組織或擬原球體，又或是形成癒傷組織後經器官發生誘導產生擬原球體 (Yeung, 2017)。

在此類型之研究中，所使用之物種包含芭菲爾亞屬斑葉單花節之原生種及雜交種，以及硬葉尖瓣亞屬 (*P. delenatii*)、短瓣亞屬 (*P. niveum*)之原生種。Lin 等 (2000)將 *P. callosum* 'Oakhi'× *Paph. lawrenceanum* 'Tradition'種子播種形成之原球體，培養於 1/2MS 添加 1 mg L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg L⁻¹ TDZ 之培養基中，可成功誘導 55%的培植體形成癒合組織，癒合組織再於含有 NAA 和 TDZ 之芽體分化培養基培養，結果平均每 0.1g 癒合組織可誘導 3-7 個芽體形成，此研究成功自原球體誘導胚性癒合組織，且可維持 6 個月以上。Hong 等 (2008)試驗 *P. Alma Gavaert* 種子培養在 1/2MS 添加 22.6 μM 2,4-D 和 4.54 μM TDZ 之培養基中可形成癒合組織，並以 2 個月繼代 1 次的頻度維持未分化狀態 2 年以上，之後將癒合組織移至含有 2.69 μM NAA 和 0.45 μM TDZ 之 1/2MS 培養基中，結果有 30%形成擬原球體，每培植體形成 2.8 個擬原球體或芽。另外，*P. niveum*、*P. delenatii* 和 *P. callosum* 種子衍生之擬原球體經培養於含有 2,4-D 和 TDZ 組合之培養基方能獲得癒合組織，單獨使用任一種植物生長調節劑培植體皆褐化 (Luan *et al.*, 2012; Chaireok *et al.*, 2015)。

上述結果指出以種子無菌播種衍生之擬原球體進行癒合組織誘導，在芭菲爾亞屬、硬葉尖瓣亞屬、短瓣亞屬之原生物種都獲得成功，且僅在同時添加 2,4-D 和 TDZ 之培養基方能獲得癒合組織(相關研究未嘗試其他生長素及細胞分裂素種類)，而芭菲爾亞屬斑葉單花節雜交種以種子無菌播種形成之原球體，同樣表現出培養於 2,4-D 結合 TDZ 之培養基有助於癒合組織誘導，顯示不同亞屬之物種間，或原生種和雜交種間之培養結果無明顯差異。此方法透過大量增殖癒合組織、擬原球體，可達到快速量化種苗之目的，有助於提高發芽困難品種之種苗繁殖速率，惟缺點在於材料來源仍為實生苗，無法針對具有良好園藝性狀的材料個體進行繁殖，難以應用於商業生產上。

(二) 植體之組織、器官

除了以種子播種形成之原球體進行癒合組織或擬原球體誘導，研究也嘗試使用莖頂、莖節、根尖或葉片等作為培植體。Lin *et al.* (2000)嘗試以 *P. henryanum* '#1' × *P. philippinense* '#10' 實生苗之莖、根尖和嫩葉進行癒合組織誘導結果未能成功。同樣的 Long *et al.* (2010)針對 4 個仙履蘭品種(*P. villosum* var. *densissimum*、*P. insigne*、*P. bellatulum*、*P. armeniacum*)同時使用種子形成之原球體和實生苗葉片嘗試誘導癒合組織，結果僅由原球體形成少量癒合組織，葉片培植體全部褐化。Ng and Saleh (2011)取 *P. rothschildianum* 實生苗長約 0.5cm 之莖節培養於 1/2MS 添加 4 μM kinetin、2 g L⁻¹ peptone、170 mg L⁻¹ NaH₂PO₄ 和 30 g L⁻¹ sucrose 之培養基，經過 8 週的培養觀察到癒合組織形成，至培養第 12 週約有 75%之莖節培植體形成癒合組織。之後經相同培養基培養癒合組織發育成擬原球體並持續增生二次、三次擬原球體，最後培養於添加 20%椰子汁之培養基可誘導 67.9%之擬原球體再生芽體。另外，Borah *et al.* (2015)則嘗試自溫室生長之 *P. spicerianum* 植株取莖頂和葉片經培植體消毒處理後進行癒合組織誘導，其雖成功於培養 34 天、48 天後，分別自莖尖、葉片培植體

觀察到癒合組織形成，但指出癒合組織的形成和發育非常緩慢且生長不佳。上述文獻顯示芭菲爾鞋蘭利用植體器官進行癒合組織或擬原球體誘導，常表現誘導成功率不高、癒合組織及擬原球體繼代培養不易（生長緩慢、易褐化），以及植株再生率低之問題。目前僅在芭菲爾亞屬綠葉多花節 (*P. rothschildianum*)、綠葉單花節 (*P. spicerianum*)物種取得成功，且可誘導之培植體部位以含有芽分生組織之莖節、莖頂為主。

二、芽體誘導與增殖培養

前面提到多數研究係利用種子播種後之無菌植株、莖段、葉片等進行芽體增殖研究，此方式因不需經過培植體無菌化步驟較容易取得試驗材料。僅有少數的研究成功自試管外之植體材料建立無菌瓶苗。以下係針對芭菲爾鞋蘭組織培養文獻中主要探討的影響因子進行整理。

(一) 培植體消毒、褐化抑制處理

目前已知之文獻中，利用芭菲爾鞋蘭試管外植體進行組織培養主要選用之培植體以側芽、花芽為主。Huang (1988)取芭菲爾鞋蘭開花株之側芽作為培植體，側芽自植株分離後先以 pHisoHex 溶液 (含抗菌成分-六氯苯，現為禁用之持久性有機汙染物)清洗，再經蒸餾水沖洗後移除葉片，取頂芽以 0.5%次氯酸溶液消毒 15 分鐘，再以 0.005%次氯酸溶液替代一般常用滅菌水進行清洗後，培養於調整過之 MS 基礎培養基添加 100 mg L^{-1} myo-inositol、 0.1 mg L^{-1} NAA、 3 mg L^{-1} 2-ip、 30 mg L^{-1} adenine、 150 ml L^{-1} 椰子汁，並於培養基中加入抗生素 (350 mg L^{-1} carbenicillin)、殺菌劑 (100 mg L^{-1} benomyl) 以抑制細菌、真菌等微生物繁殖，此研究指出芭菲爾鞋蘭側芽培植體汙染率高且誘導成功率低。其他曾用於芭菲爾鞋蘭側芽培植體消毒之處理，除了次氯酸溶液和 70%酒精外，尚包含： 0.1 mg L^{-1} streptomycin 浸泡 30 分鐘 (Luan *et al.*, 2019)、0.1%氯化汞溶液消毒 10 分鐘 (Nguyen *et al.*, 2018)、浸泡 2%中性洗滌劑 30 分鐘 (Do *et al.*, 2019)。此外，研究發現取樣季節顯著的影響芭菲爾鞋蘭側芽培植體消毒成功率，2、5 月取得之側芽較 8、11 月表現出較高之存活率、低汙染率，甚至對後續繼代之芽體增殖同樣有促進之效果 (Do *et al.*, 2019)。而相較於側芽培植體表現消毒不易，花芽培植體在消毒步驟上較為簡單，多數研究顯示以 1.0%次氯酸鈉溶液消毒 10-15 分鐘可獲得無汙染之培植體，惟花芽培植體易褐化，成功誘導芽體之比例不高 (林和林, 2010; Liao *et al.*, 2011)。

對於芭菲爾鞋蘭培植體褐化抑制處理，Huang (1988)曾嘗試將莖頂培植體以 100 mg L^{-1} 抗壞血酸及 150 mg L^{-1} 檸檬酸浸泡以抑制培植體褐化發生。而近年來之研究顯示芭菲爾鞋蘭植株先以 $900 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP 前處理 24 小時再取花芽進行消毒處理，或於初代培養基中添加 25 mg L^{-1} 半胱胺酸 (黃, 2012)，以及取花芽培植體預先於 100 mg L^{-1} 抗壞血酸加上 4 mg L^{-1} Kinetin 溶液中手搖震盪 25 分鐘後進行消毒及初代培養 (王, 2016)，皆有助於提高花芽培植體之芽體誘導率。王 (2016)更進一步證實培養基中添加半胱胺酸 ($50 \sim 100 \text{ mg L}^{-1}$)能有效降低芭菲爾鞋蘭培植體在培養初期之多酚氧化酶、苯丙胺酸脫氫酶之活性，以

及酚類化合物-香豆酸之含量，改善培植體因發生酵素型褐化之影響。

(二) 基本鹽類培養基

關於芽體誘導與增殖培養基中基本鹽類培養基之濃度，Nguyen 等 (2018) 以 *P. vietnamense* 成熟植株側芽消毒建立之母瓶為材料，試驗 MS、1/2MS、RE、1/2RE 四種鹽類濃度對其芽體增殖之影響，結果以培養於 1/2MS 芽體再生率達 66.67% 為最佳。而 *P. Hsinying Rubyweb* 實生苗芽體經縱切培養於 MS、1/2MS、VW、P2-AC 培養基，結果培養於 1/2MS 每培植體產生 28.8 芽顯著高於其他處理 (Udomdee et al., 2012)。其他同樣曾被發表使用 1/2MS 作為基本鹽類培養基進行芽體誘導及增殖之品種尚有：*P. philippinense* (hybrid PH59 and hybrid PH60)、*P. Alma Gavaert*、*P. rothschildianum*、*P. callosum* (Chen et al., 2002；Hong et al., 2008；Ng et al., 2010；Wattanawikkit et al., 2011)。上述研究中包含了硬葉尖瓣亞屬原生種 (*P. vietnamense*)、芭菲爾亞屬之原生種 (*P. rothschildianum*、*P. callosum*) 及雜交種。另外，亦有使用其他基本鹽類培養基如：Hyponex (*P. 'Delrosi'*)、MS- $\frac{1}{4}$ N (*P. Armeni White*、*P. Deperle*)、KC (*P. villosum*、*P. insigne*、*P. bellatulum*、*P. armeniacum*) (Long et al., 2010；Liao et al., 2011；Thongpukdee et al., 2013)。整體來說，芭菲爾鞋蘭對基本鹽類濃度的需求似乎較低。

而近來王 (2016) 之研究發現鹽類中氮源之比例及型態對芭菲爾鞋蘭斑葉單花品種 (*P. Hsinying Web 'Giant' x P. Pulsar 'Hsinying Flame'*) 芽體增殖會產生顯著之影響，其比較全量 MS 及 MS 減銨態氮 (NH_4NO_3) 處理 (僅添加 0.83、0.55、0.41、0 g L⁻¹ 之 NH_4NO_3)，結果於 MS 無添加硝酸銨之培養基有最佳之芽體增殖率 (100%)、芽體形成數 (2.9 芽)，顯示銨態氮含量與培植體褐化比例呈正相關，且如將氮源改為硫酸銨、氯化銨等會造成植株葉綠素含量降低，並對芽體增殖與根部生長產生抑制效果；反之以硝酸態氮 (尤其是硝酸鉀) 為主要氮源，對提高芽體增殖、降低培植體褐化有最佳之效果。此結果暗示芭菲爾鞋蘭除了可能偏好低鹽類濃度培養基外，亦可能是對銨態氮的濃度及銨鹽在植體內的累積較敏感，進而影響芽體誘導與增殖結果。

(三) 植物生長調節劑

在植物生長調節劑 (PGR) 使用方面，相關研究主要試驗單獨處理細胞分裂素 (TDZ、BA、Kinetin) 或搭配生長素 (2,4-D、NAA) 對芭菲爾鞋蘭芽體誘導與增殖之影響。*P. Alma Gavaert* 由癒合組織再生之芽體，以 IAA、NAA、Kinetin、Zeatin 各三種濃度進行繼代培養，結果於 4.65 μM (1 mg L⁻¹) Kinetin 之芽體增殖率達 3 倍為最佳 (Hong et al., 2008)。*P. callosum* 實生苗經培養於添加 10 μM (2.25 mg L⁻¹) BA 或 0.5 μM (0.11 mg L⁻¹) TDZ 之培養基 3 個月後，平均每培植體可形成 2.3、1.6 芽，較無 PGR 或 2,4-D 和 TDZ 之組合僅形成 1.0-1.4 芽為佳 (Wattanawikkit et al., 2011)；*P. 'Delrosi'* 實生苗芽體培養於 0.45 μM (0.1 mg L⁻¹) TDZ 或 0.45 μM TDZ 加 4.52 μM (1 mg L⁻¹) 2,4-D，或 8.88 μM (2 mg L⁻¹) BA 加 13.56 μM (3 mg L⁻¹) 2,4-D 15 週後，芽體形成率達 80.0-90.0%，平均形成芽數為 1.1-1.5 芽，而無 PGR 之對照組芽體形成率僅 30.0%、每培植體形成 0.3 芽 (Thongpukdee et al., 2013)。*P.*

vietnamense 芽體於添加 2.0 mg L^{-1} BA 和 1.0 mg L^{-1} NAA 之培養基培養 5 週，有最佳之芽體形成率達 85%、每培植體形成 2.83 芽，然而當 BA 濃度超過 2.0 mg L^{-1} 時，芽體形成率和增殖數皆顯著下降 (Nguyen *et al.*, 2018)。Long *et al.* (2010) 以四種芭菲爾鞋蘭原生種 *P. villosum*、*P. insigne*、*P. bellatulum*、*P. armeniacum* 之實生苗培養於 TDZ 加 NAA、BA 加 NAA 之培養基，結果以培養於 BA 加 NAA 之組合有最佳之每培植體形成芽數和芽長度，其適宜之 BA 濃度範圍為 $0.2\text{-}6.0 \text{ mg L}^{-1}$ ，NAA 為 $0.1\text{-}1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ，其中 *P. insigne* 於低濃度不超過 1.0 mg L^{-1} BA 較佳，而 *P. armeniacum* 則在多數濃度組合下都可增殖。

綜合上述結果顯示，以單獨細胞分裂素或細胞分裂素加生長素組合皆可誘導芽體增殖。而不同亞屬間對植物生長調節劑的反應，似乎無明顯差異，例如：*P. vietnamense* (硬葉尖瓣亞屬)、*P. bellatulum* (短瓣亞屬)、*P. insigne* (芭菲爾亞屬綠葉單花節) 之芽體增殖皆於低濃度 BA 處理 ($1.0\text{-}2.0 \text{ mg L}^{-1}$) 較佳；而 *P. armeniacum* (硬葉尖瓣亞屬)、*P. villosum* (芭菲爾亞屬斑葉單花節) 則較能適應高濃度 BA (最高至 6.0 mg L^{-1})。

(四) 培植體切傷處理及培養方式：

植物利用切頂方式去除頂芽優勢增加腋芽形成 (Tanaka *et al.*, 2006)，以及創傷能引發植物再生能力已被證實 (Chen *et al.*, 2016)。張 (2010) 以 *P. Daisy Barclay* 試驗切頂方式配合 3.0 mg L^{-1} BA 之培養基進行芽體增殖培養，每培植體可誘導 5.13 個不定芽，高於不切頂之 2.24-2.92 個芽，且研究顯示 *P. Ruby Leopard* 和 *P. In Charm Silver Bell* 二品種經切頂處理較不切頂處理可大幅縮短誘導不定芽增生之時間 (張，2010)。Udomdee *et al.* (2012) 以 *P. Hsinying Rubyweb* 試驗將芽體進行縱切、橫切及十字切處理，結果以縱切有最高之芽體分化數可達 10.5 芽顯著高於橫切之 1.0 芽和十字切之 2.5 芽。Nhut *et al.* (2005) 於 *P. delenatii* 實生苗芽體基部以針製造 3-4 個直徑約 0.3mm 之傷口培養於固體或液體培養基，結果無創傷處理之對照組皆無芽體增殖，經創傷處理及固體培養基可產生 2.3 個芽，若以創傷處理加液體培養基處理最高產生 5.2 個芽，顯示創傷處理搭配液體培養基能有更佳之芽體增殖效果。Luan *et al.* (2019) 試驗除去頂葉、針尖創傷處理對 *P. delenatii*、*P. callosum*、*P. gratixianum* 三品種芽體增殖之影響，結果除去頂葉之培植體於 SH 添加 $0.4\text{-}0.6 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ 之液體培養基培養 90 天後，三品種之平均芽體增殖數為 5.48-6.00 個芽；而在同樣培養條件以針尖創傷處理，三品種之平均芽體增殖數為 4.48-5.37 個芽。上述研究顯示切傷處理 (切頂、縱切、除葉、針刺傷) 較對照組皆能提高芭菲爾鞋蘭芽體增殖數，此結果在三種亞屬之原生種或雜交種皆可觀察到，此外切傷處理若搭配液體培養對芽體增殖數似有加乘的效果。

三、根系誘導：

生長素、有機添加物及活性碳常使用作為促進組培苗根系誘導之培養基成份。Zeng *et al.* (2013) 試驗 NAA 和香蕉泥不同濃度對 *P. hangianum* 根系誘導之影響，當培養基中僅添加 NAA 隨著其濃度由 0 增加到 2.0 mg L^{-1} ，發根率由 15.33% 提高至 51.00%，若單獨添加

100 g L⁻¹ 香蕉泥之發根率為 54.67%，而以 2.0 mg L⁻¹ NAA 加上 100 g L⁻¹ 香蕉泥可將發根率提高至 91.00%、平均根數 4.60 根。Nguyen *et al.* (2018) 於培養基中添加 0.5 mg L⁻¹ NAA，顯著提高 *P. vietnamense* 之發根率由 10% (對照組) 提高為 70.0%，超過 0.5 mg L⁻¹ 則發根率反而降低；另以 0.5 mg L⁻¹ NAA 加上 1.0-1.5 g L⁻¹ 活性碳發根率最高可達 88.89%。Luan *et al.* (2019) 試驗指出 *P. callosum*、*P. gratixianum*、*P. delenatii* 三品種皆以培養於 1.0 mg L⁻¹ NAA 有最佳之根數 (4.15-4.50 條根)、根長 (5.10-5.29cm) 以及植株鮮重 (1.65-3.13g)。由上述研究結果可知，芭菲爾鞋蘭組培苗以低濃度 NAA (不超過 2.0 mg L⁻¹)，並搭配活性碳或香蕉泥可獲得良好之發根率。

結 論

自前面的文獻回顧得知，芭菲爾鞋蘭組織培養技術較之其他蘭花顯得難以突破，包括存在芽體增殖褐化比例偏高 (15-30%)、增殖倍率不穩定 (1.0-28.8 芽)、繼代培養時間長 (90 天)，以及自器官或組織誘導癒合組織/擬原球體形成困難等問題。近來部分研究提出一些有助於提高芽體增殖率、降低培植體褐化之可行方式，包括：取樣季節影響芭菲爾鞋蘭側芽培植體消毒成功率及後續繼代培養之芽體增殖效果；對培養前植株、培植體消毒前或增殖培養期間進行褐化抑制處理，有助抑制培植體褐化發生；切傷處理搭配液體培養有助於提高芭菲爾鞋蘭芽體增殖數量等，皆對芭菲爾鞋蘭組織培養技術進展有所突破。而本篇探討芭菲爾鞋蘭不同亞屬間物種對組織培養的反應，其結果並未呈現出明顯之差異，此可能受限於文獻未同時比較不同物種，且所選用之培植體條件、試驗條件不盡相同，因此目前要歸納出差異較為困難，然而此初步之結果是否也暗示有機會建立符合多數芭菲爾鞋蘭物種之組織培養條件，亦值得期待並投入更多的研究加以印證。

參 考 文 獻

- 王美琪。2016。培植體抗氧化劑前處理及培養基成分對仙履蘭芽體再生之研究。國立中興大學園藝學研究所博士論文。118pp。
- 王美琪、林瑞松。2017。仙履蘭培植體前處理抗氧化物與細胞分裂素對芽體再生之影響。興大園藝 42(2):109-123。
- 林德承、林瑞松。2010。仙履蘭之器官培養。興大園藝 35(4):87-98。
- 林宗榮。2013。仙履蘭分生技術對產業之影響。苗栗區農業專訊 62:22-24。
- 許伊琍。2007。仙履蘭芭菲爾亞屬賞花圖鑑。日月文化出版股份有限公司。229pp。
- 張曉媛。2010。芭菲爾鞋蘭離體繁殖之研究。國立嘉義大學園藝系研究所碩士論文。190pp。
- 黃琳方。2012。1-MCP 前處理、光源與半胱胺酸對仙履蘭花梗芽生長之影響。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。64pp。
- Borah, N. J., S. Chakraborty, S. Roy Choudhury, and B. K. Dutta. 2015. *In vitro* propagation of

- Paphiopedilum spicerianum* (Reichb. f.) Pfitz.-a rare and endangered orchid species from northeast India. J. Orchid Soc. India 29:85-90.
- Chaireok, S., K. Thammasiri, and U. Meesawat. 2015. Optimization of protocorm-like bodies tissue culture and clonal propagation condition for endangered lady's slipper orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Stein). Pak. J. Biotechnol. 12(2): 105-114.
- Chochai, A., I. J. Leitch, M. J. Ingrouille, and M. F. Fay. 2012. Molecular phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid sequences. Bot. J. Linn. Soc. 170: 176-196.
- Chen, T. Y., J. T. Chen, and W. C. Chang. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 595-597.
- Chen, L., B. Sun, L. Xu, and W. Liu. 2016. Wound signaling: the missing link in plant regeneration. *Plant Signal. Behav.* 11(10): e1238548 (3pp.).
- Cribb, P. 1998. The Genus *Paphiopedilum*. 2nd ed. Natural History Publications (Borneo). Kota Kinabalu, Royal Botanic Gardens, Kew. 427pp.
- Do, V. N. T., S. T. Hsu, and Y. I. Lee. 2019. Clonal propagation *in vitro* of *Paphiopedilum* Hybrids from adult plants. *HortScience*. 54(9): 1565-1569.
- Hong, P. I., J. T. Chen, and W. C. Chang. 2008. Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed derived callus of a maudiae type slipper orchid. *Acta Physiol. Plant* 30: 755-59.
- Huang, L. C. 1988. A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilum in vitro*. *Am Orchid Soc. Bull.* 57: 274-8.
- Liao, Y. J., Y. C. Tsai, Y. W. Sun, R. S. Lin, and F. S. Wu. 2011. *In vitro* shoot induction and plant regeneration from buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev- Bio. Plant* 47(6): 702-09.
- Lin, Y. H., C. Chang, and W. C. Chang. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 62: 21-25.
- Long B, A. X. Niemiera, Z. Y. Cheng, and C. L. Long. 2010. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 101: 151-62.
- Luan, L.Q., N. H. P. Uyen, and V. T. T. Ha. 2012. *In vitro* mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation. *Sci Hortic.* 144: 1-9.
- Luan, V. Q., L. K. Guong, H. T. Tung, V. T. Hien, T. Hien, and D. T. Nhut. 2019. Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species. *Sci. Hortic.* 256: 108648.
- Morel, G. 1974. Clonal multiplication of orchid. In: Withner CL, ed. The orchid. Scientific studies.

- New York: Wiley Interscience.
- Nash, N. 1985. *Paphiopedilum* Culture for Beginners-2. American Orchid Society Bulletin. 54 (5): 533-539.
- Nhut, D. T., P. T. T. Trang, N. H. Vu, D. T. T. Thuy, D. Van Khiem, N. Van Binh, and K.T.T. Van. 2005. A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delenatii* propagation. Propag. Ornam. Plants 5: 158-163.
- Ng, C. Y., N. M. Saleh., and F. Q. Zaman. 2010. *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). Afr. j. biotechnol. 9(14): 2062-2068.
- Ng, C. Y. and N. M. Saleh. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm like bodies. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 105: 193-202.
- Nguyen, T. T., T. D. Nguyen, X. T. Dao, T. D. Chu, and X. B. Ngo. 2018. *In vitro* propagation of a Vietnam endemic lady's slipper orchid (*Paphiopedilum vietnamense* O. Gruss & Perner). Journal of Horticulture and Plant Research. 1: 1-8.
- Stewart, J. and J. Button. 1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. Am. Orchid Soc. Bull.44: 591-599.
- Tanaka, M., K. Takei, M. Kojima, H. Sakakibara, and H. Mori. 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J.45: 1028-1036.
- Thongpukdee, A., E. Nisayan, and C. Thepsithar. 2013. Multiple shoot formation of *Paphiopedilum* 'Delrosi'. World Academy of Science, Engineering and Technology.7(6): 399-402.
- Udomdee, W., P. J. Wen, S. W. Chin, and F. C. Chen. 2012. Shoot multiplication of *Paphiopedilum* orchid through *in vitro* cutting methods. Afr. J. Biotechnol. 11: 14077-14082.
- Wattanawikkit, P., E. Bunn, K. Chayanarit, and S. Tantiwiwat. 2011. Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2,4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. Kasetart J. Nat. Sci. 45: 12-19.
- Yam, T. W. and J. Arditti. 2017. *Paphiopedilum*. In: Micropropagation of orchids (3rd ed.). Wiley. pp.1322-1399.
- Yeung, E. C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. Bot. Stud. 58:33.
- Zeng, S., J. Wang., K. Wu., J. A. Teixeira da Silva, J. Zhang, and J. Duan. 2013. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum hangianm* Perner & Gruss. Sci. Hortic.151: 147-156.
- Zeng, S., W. Huang, K. Wu, J. Zhang, J. A. Teixeira da Silva, and J. Duan. 2015. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. Crit Rev Biotechnol, Early Online: 1-14.

A Review on Tissue Culture Technology of *Paphiopedilum*

Jia-Qi Zhang¹⁾ Chen Chang²⁾

Key Word: *Paphiopedilum*, Callus, Protocorm-like body, Shoot multiplication, Rooting

Summary

Paphiopedilum is an important economic flower crop in Taiwan, but its seedling propagation has a very high proportion of relying on asymbiotic seed germination or division, which makes the development of commercial production mode difficult. This article reviews the research progress related to tissue culture technology of *Paphiopedilum*, and sorts out it from the directions of regeneration pathways, culture conditions, and species. In fact, recent studies have made some breakthroughs in improving the propagation efficiency of *Paphiopedilum in vitro*, including: explant sampling, browning inhibition treatments, and shoot proliferation methods. It is hoped that more research resources can be invested in the development of *in vitro* propagation of *Paphiopedilum* in the future, and the establishment of efficient and stable seedling propagation methods will be accelerated.

-
- 1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Assistant Researcher, Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, council of Agriculture, Executive.
 - 2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

溶菌酶 (lysozyme) 與抗菌胜肽 (Cecropin) 基因轉殖至 蝴蝶蘭葉綠體之研究

傅 承 泰¹⁾ 潘 怡 君²⁾ 曾 夢 蛟³⁾

關鍵字：蝴蝶蘭、葉綠體基因轉殖、溶菌酶、抗菌胜肽

摘要：本研究之目的為：1. 建立蝴蝶蘭之葉綠體基因轉殖系統，2. 探討利用葉綠體基因轉殖系統，轉殖溶菌酶 (lysozyme, *lys*) 與抗菌胜肽 (cecropin, *cecA*) 基因到蝴蝶蘭葉綠體，培育出抗病之蝴蝶蘭的可行性。以基因槍法將所構築之攜帶 *lys* 及 *cecA* 基因之蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體轟擊到蝴蝶蘭的培植體 (protocorm like body, PLB)。以 Spectinomycin 篩選轉殖培植體並誘導再生成蝴蝶蘭植株。轉殖再生植株葉片之 PCR 及 RT-PCR 分析之結果顯示，轉殖之 *lys* 及 *cecA* 基因已存在於轉殖蝴蝶蘭之葉綠體基因組，並表現其 mRNA。

前 言

台灣的蝴蝶蘭產業在台灣及國際上的花卉產業中佔重要的地位。台灣蝴蝶蘭多栽培於溫室中，溫暖潮濕的環境很適合細菌及真菌的生長，一旦管理不善，全面蔓延，影響蘭花品質甚鉅，病害的防治為產業永續發展的關鍵問題。目前台灣蝴蝶蘭的主要細菌性病害為軟腐病、褐斑病及葉斑病；真菌病害為疫病、灰黴病 (花瓣灰斑病)、白絹病、炭疽病、葉黃病及基腐病等 (謝，2004)。以生物技術改善蝴蝶蘭產業生產上最主要的產品品質不穩定及規格良莠不齊等問題，將可穩定蝴蝶蘭產品的商業化，開創台灣蘭花事業永續經營的新契機。

抗細菌性病原菌之植物抗病育種研究，目前是所有抗病研究中進展最緩慢，運用生物技術將可加速抗病作物品種之育成，以減少化學農藥對環境、生態、人類健康之危

1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系副教授。

3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

害。溶菌酶 (lysozyme, *lys*) 可以使細菌細胞壁中的肽聚糖網狀結構崩解，破壞細菌的細胞壁導致細菌死亡 (Loessner, 2005)。而抗菌肽 (cecropin, *cecA*) 可在脂雙層膜上形成陰離子選擇性通道殺死病原菌，對細菌、真菌、病毒等均具有強力的殺傷作用 (吳，2012；陳，2005；Lee *et al.*, 2011)。

植物葉綠體基因轉殖有以下優點：1. 葉綠體轉殖基因表現量高於核轉殖、2. 葉綠體基因組為母系遺傳不會基因漂流、3. 目前沒有報告指出有基因沉默和插入位置效應的問題 (Sinagawa-García, 2009)。基於以上優點建立葉綠體基因轉殖技術是現代生物技術研究的重要方向 (Ahmad *et al.*, 2016)。但蘭花葉綠體基因轉殖技術則尚未有報導。

本研究目標是轉殖溶菌酶 (lysozyme, *lys*) 及抗菌肽 (cecropin, *cec*) 基因到蝴蝶蘭的葉綠體。本研究所轉殖之溶菌酶基因是由中興大學分生所楊明德老師之研究室自 *Xanthomonas fragariae* (草莓角斑病菌) 菌株的類似噬菌體 (phage XF) 尾部細菌素的基因組 (phage tail-like bacteriocin) 中所分離獲得的 (廖，2006)。。發現對十字花科黑腐病菌、水稻白葉枯病菌和柑桔潰瘍病菌等具有強烈抑菌。楊明德老師之研究室同時以 PCR 合成蒼蠅 (*Musca domestica*) cecropin (抗菌肽, Antimicrobial peptide) 基因，且將 cecropin 與 *lys* 基因增幅成 cecropin/*lys* 基因，所形成之融合蛋白更能提升兩種蛋白之相對殺菌活性。

本研究將 cecropin、*lys* 基因構築成蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體，使用基因槍轉殖法轉殖 cecropin 及 *lys* 基因到蝴蝶蘭葉綠體，期望獲得更能抗多種病害之蝴蝶蘭。本研究目的為建立蝴蝶蘭之葉綠體基因轉殖系統，並且探討以葉綠體基因轉殖開發抗病之蝴蝶蘭的可行性。

材料與方法

一、供試材料

(一)、基因轉殖之植物材料

本試驗使用植物材料為台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 之的培植體 (protocorm like body, PLB)，作為葉綠體基因轉殖之植物材料。

(二)、轉殖之基因與載體

本試驗轉殖之溶菌酶基因 (Lysozyme, *lys*) 及天蠶素基因 (Cecropin, *cecA*) 是由楊明德教授實驗室提供。載體為：1. pMT93t-GLCa-A：攜帶 *lys*、*cecA*、*aada*、*gus* 等基因，以 *trnI/trnA* 為基因重組位置 (圖 1A)；2. pMT93t1-GLCa-A：攜帶 *lys*、*cecA*、*aada*、*gus* 等基因，以 *trnV/3'rps12* 為基因重組位置 (圖 1A)，為本研究室自行構築之載體 (傅等，2020)。

二、試驗方法

(一)、蝴蝶蘭 PLB 之基因槍轟擊與再生

1. 基因槍轟擊

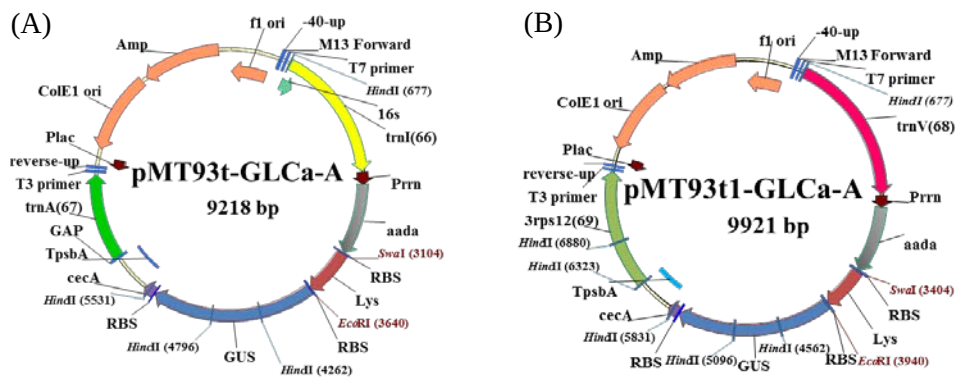


圖 1. 葉綠體轉殖載體 pMT93t-GLCa-A (A)與 pMT93t1-GLCa-A (B)之限制酵素圖譜。

Fig.1. Restriction enzyme maps of transplastomic vectors pMT93t-GCa-A (A) and pMT93t1-GCa-A (B).

(1) 金粉備置

準備 50 mg 金粉裝入離心管中。加入 1.5 mL 70%酒精。以最高速震盪 5 分鐘。放置室溫 15 分鐘。離心 600 g，1 分鐘後去除上清液。以下重覆三次，加入 1.5 mL 無菌水，最高速震盪 1 分鐘，放置室溫 1 分鐘，離心 600 g，1 分鐘後去除上清液。加入 834 μ L 50%甘油。以最高速震盪 5 分鐘。震盪的情況下分裝每管 50 μ L 共 17 管，金粉溶液之濃度為 60 mg/mL。存放於-20°C。

(2) 金粉與轉殖載體 coating 流程

將轉殖載體取 2.5 μ L 的 1 μ g/ μ L pMT93t-GLCa-A 與 pMT93t1-GLCa-A (圖 1)混合，取其 5 μ L 加入 50 μ L 的 60 mg/mL 金粉溶液中，加入 50 μ L 2.5M CaCl₂，20 μ L 0.1M spermidine，以上流程都在持續的震盪。將金粉混合液持續的震盪 3 分鐘。震盪完成後室溫放 1 分鐘。離心 600 g，10 秒後去除上清液。加入 140 μ L 70%酒精清洗並去除上清液。加入 140 μ L 99.9%無水酒精洗滌並去除上清液。加入 48 μ L 99.9%無水酒精並震盪懸浮 pellet。持續的震盪吸取 7.5 μ L 塗在微載片上，總共可塗 5 次。將微載片放置在低溼度的環境下吹乾即可進行基因槍轟擊。

(3) 基因槍轟擊

使用 PDS-1000/He 基因槍 (Bio-Rad)，將攜帶 DNA 的金粒子轟擊入蝴蝶蘭 PLB 之細胞中。

(4) 蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株之情形

首先將 PLB 切成小塊或對半切誘導 PLB 產生約一個月，轟擊前一週 PLB 切成小塊或對半切後放置 T2 培養基癒傷，PLB 置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊，PLB 的殖體頂端與尾部各轟擊 1 次。以不同的條件進行轟擊距離 6、9 或 12 公分。轟擊壓力 900

或 1,100 psi。真空度為 28Hg/in。

轟擊後，PLB 以含 25、50、100 或 200 ppm Spectinomycin 的 T2 再生培養基 (0.35% Hyponex No.1<花寶一號>，0.1% Tryptone，0.01% Citric acid，2% Sucrose，2% Sweet potato，2.5% Banana，pH 5.5，0.1% Charcoal，0.3% Phytigel)進行篩選再生 (3~12 個月)。

(二)、蝴蝶蘭葉綠體擬轉植株分析

1. 植物總 DNA 萃取

取 0.1 g 之葉片以 Plant Genomic DNA Purification Kit DP022 萃取總 DNA。

2. PCR

本試驗使用 KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA Biosystems)進行 PCR。Lysozyme 基因 PCR：依序加入 12.5 μ L 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μ L ddH₂O、0.75 μ L Forward Primer: Lyso 444bp-R 5'- ATGAGCCAGACCGCTAAA -3'、0.75 μ L Reverse Primer: Lyso 444bp-F 5'- GGTGCCTTTGACATATACCC -3'、0.2 μ L 2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μ L DNA (原液稀釋 20 倍)，混合後總體積 25 μ L，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、15 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。Cecropin A 基因 PCR：依序 12.5 μ L 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μ L ddH₂O、0.75 μ L Forward Primer: 21-SmaI-cecA-GGAGG 5'- GATTCTCCCGGG GGGAGGGATTTATGGG CTGGCTGAAAAAATCGGC A -3'、0.75 μ L Reverse Primer: Cecropin-R 5'- TCAACCCTT T AAT GTAGCG GCA -3'、0.2 μ L 2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μ L DNA (原液稀釋 20 倍)，混合後總體積 25 μ L，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、15 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。獲得的產物以 1% agarose gel 分離後使用 ETBR 染色並照相。

3. 總 RNA 萃取

本試驗使用 TRIzol (Invitrogen)藥劑進行植株總 RNA 萃取。將蝴蝶蘭葉片或根樣本秤重約 100 mg。研鉢中加入液態氮將樣本磨細，將粉末加入離心管再加入 1 mL TRIzol 藥劑。將樣本裝入離心管，以 4°C 離心 12,000 g，5 分鐘。取上清液到新的離心管加入 0.2 mL chloroform 搖晃後放置室溫 3 分鐘。4°C 離心 12,000 g，15 分鐘。取上層液體到新的離心管加入等體積 isopropanol 室溫放置 10 分鐘。4°C 離心 12,000 g，10 分鐘。去除上清液。加入 1 mL 75%酒精。以 vortex 懸浮 pellet。4°C 離心 7,500 g，5 分鐘。去除上清液。將 pellet air dry 10 分鐘。依據 pellet 不同大小加入 20~50 μ L nuclease free water (Fermentas) 回溶 RNA。放入 55~60°C 水浴鍋 10~15 分鐘。將已回溶的 RNA 放入 -80°C 保存。

4. RNA 反轉錄 cDNA

本試驗使用 ReverTra Ace Set (PU-TRT-100)進行 RNA 反轉錄。將 4 μ L 5x RT Buffer、2 μ L dNTP Mixture、0.25 μ L RNase Inhibitor、1 μ L Sequence specific downstream primer (10 pmol/ μ L)、X μ L RNase Free H₂O、1 μ L ReverTra Ace 和 0.5 μ g RNA 混合後總體積 20 μ L。以熱循環：42°C、20 min；99°C、5 min。將 cDNA 放入 -80°C 保存。

5. RT-PCR

本試驗使用 KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA Biosystems) 進行 RT-PCR。Lysozyme 基因 RT-PCR：依序加入 12.5 μ L 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μ L ddH₂O、0.75 μ L Forward Primer：Lyso 444bp-R 5'- ATGAGCCAGACCGCTAA A -3'、0.75 μ L Reverse Primer: Lyso 444bp-F 5'- GGTGCCTTTGACATATACC C -3'、0.2 μ L 2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μ L cDNA，混合後總體積 25 μ L，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、15 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。Cecropin A 基因 RT-PCR:依序加入 12.5 μ L 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μ L ddH₂O、0.75 μ L Forward Primer: 21-SmaI-cecA-GGAGG 5'- GATTCTCCCGGGGGGA GGGATTTA TGGGCTGGCTGAAAAAATCGGCA -3'、0.75 μ L Reverse Primer: Cecropin-R 5'- TCAAC CCTTTAATGTAGCGGCA -3')、0.2 μ L 2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μ L cDNA，混合後總體積 25 μ L，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、35 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。獲得的產物以 1% agarose gel 分離後使用 ETBR 染色並照相。

結 果

一、蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株之情形

首先將台灣白花蝴蝶蘭之 PLB 切成小塊或對半切誘導 PLB 產生，約一個月後做為轟擊材料 (圖 2A)。轟擊前一週將切成小塊或對半切後放置 T2 培養基癒傷 (圖 2B)，PLB 置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊 (圖 2C)。轟擊後，以含 25 (圖 2D)、50 (圖 2E)、100 (圖 2F) 或 200 ppm Spectinomycin (圖 2G) 的 T2 再生培養基進行篩選 (3 個月)。篩選期間未轉殖 PLB 白化死亡。持續篩選 6~12 個月可獲得蝴蝶蘭綠色擬轉殖株 (圖 2H)。

二、PCR 分析蝴蝶蘭擬轉殖株

以擬轉殖蝴蝶蘭的 DNA 為模板，使用引子 Lyso 444bp-R、Lyso 444bp-F 進行 PCR 反應，在編號 1、4、8、10 和 17 的轉殖株能增幅出 0.44 kb 的 *lys* 基因片段 (圖 3)，顯示 *lys* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。以擬轉殖蝴蝶蘭的 DNA 為模板，使用引子 21-SmaI-cecA-GGAGG、Cecropin-R 進行 PCR 反應，在編號 2、3、8、14、21 和 22 能增幅出 0.15 kb 的 *cecA* 基因片段 (圖 3)，顯示 *cecA* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。

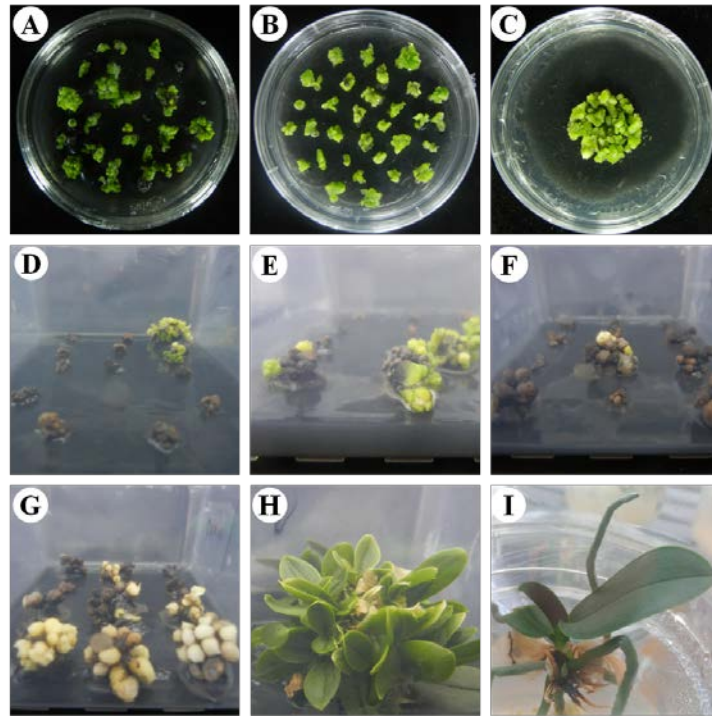


圖 2. 台灣白花蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株之情形。(A)PLB 誘導；(B)轟擊前 PLB 癒傷一週；(C)PLB 置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊；(D)~(G)轟擊後，以含 25 (D)、50 (E)、100 (F)或 200 ppm Spectinomycin (G)的再生培養基進行篩選 (3 個月)；(H)(I)獲得蝴蝶蘭擬轉植株 (6 個月~24 個月)。

Fig. 2. Regeneration of transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana* from PLBs. (A)Induction of PLBs. (B)PLBs were cut into small pieces then cultivated in regeneration medium 1 week before bombardment. (C)PLBs were placed in the circle within a 2.5 cm radius for gene gun bombardment. (D~G)After bombardment, PLBs were placed in regeneration medium supplied with 25 (D), 50 (E), 100 (F), and 200 ppm (G)spectinomycin (3 month). (H~I)Appearances of putative transplastomic *Phalaenopsis* plantlets (H)and shoots (I)after 6 month (H)and 24 month of cultivation, respectively.

三、RT-PCR 分析蝴蝶蘭擬轉植株

以擬轉殖蝴蝶蘭的 cDNA 為模板，使用引子 Lyso 444bp-R、Lyso 444bp-F 進行 RT-PCR 反應，在編號 1、4 和 22 能增幅出 0.44 kb 的 *lys* 基因片段 (圖 4)，證明 *lys* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上並表現其 mRNA。

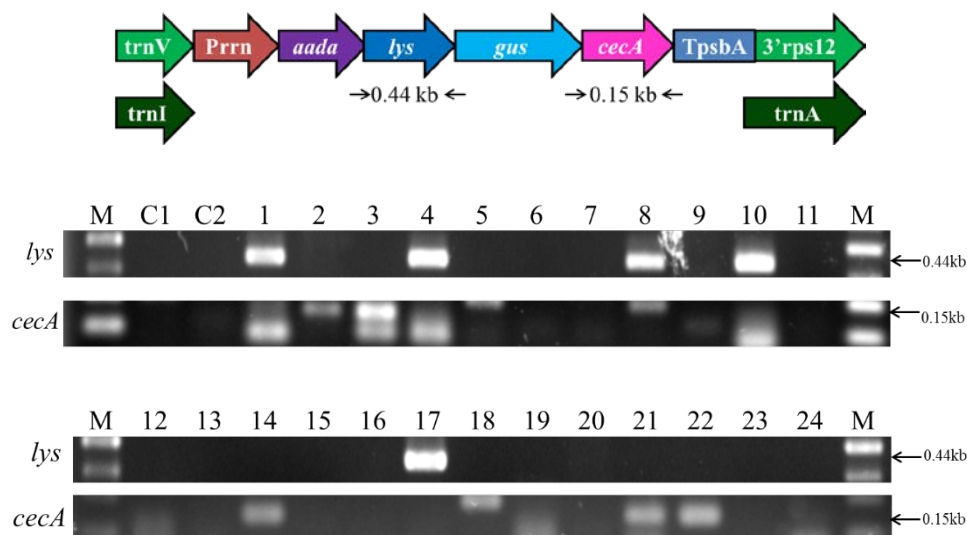


圖 3.以葉綠體基因擬轉殖台灣白花蝴蝶蘭之基因組 DNA 為模版，使用引子 Lyso 444bp-R/Lyso 444bp-F 或 21-SmaI-cecA-GGAGG/ Cecropin-R 進行 PCR 偵測目標基因 *lys* 或 *cecA*。M:DNA ladder。C1:台灣白花蝴蝶蘭未轉植株。C2:姬蝴蝶蘭未轉植株。1~24: 葉綠體基因轉殖台灣白花蝴蝶蘭擬轉植株。

Fig. 3. Identification of *lys* and *cecA* genes in putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana* by PCR. M: DNA ladder ; C1: untransformed *P. aphrodite* subsp. *formosana*; C2: untransformed *P. equestris*); 1~24: putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana*.



圖 4. RT-PCR 偵測葉綠體基因轉殖蝴蝶蘭目標基因 *lys* 之表現情形。M：DNA ladder。C1：台灣白花蝴蝶蘭未轉植株。C2：姬蝴蝶蘭未轉植株。1~22：葉綠體基因轉殖蝴蝶蘭擬轉植株。

Fig. 4. Identification of *lys* mRNA in putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana* by RT-PCR. M: DNA ladder ; C1: untransformed *P. aphrodite* subsp. *formosana*; C2: untransformed *P. equestris*); 1~22: putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana*.

討 論

一、蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株

PLB 切成小塊或對半切誘導 PLB 產生約一個月，轟擊前一週將切成小塊或對半切後放置 T2 培養基癒傷，再將 PLB 置於培養皿中心。由於誘導出來的 PLB 是由母株 PLB 的圓球表面分化，所以基因槍轟擊 PLB 的正反兩面期待轟擊到更多的圓球表面。轟擊後，以含 25、50、100 或 200 ppm Spectinomycin 的 T2 再生培養基進行篩選，以 25、50 ppm Spectinomycin 篩選期間 PLB 白化較不明顯大多是褐化死亡。但以 100 或 200 ppm Spectinomycin 篩選 PLB 白化明顯，所以此濃度可能是較適合的篩選濃度。持續篩選 6~12 個月可獲得蝴蝶蘭綠色擬轉殖株，但大多植株都有汙染不明的細菌或真菌，所以為了拯救植株將其移到沒有 Spectinomycin 的培養基，此期間汙染的細菌或真菌依然生長有些植株也被影響死亡。因為獲得的植株未進行同質化的處理如果移除篩選藥劑可能導致轉殖成功的葉綠體漸漸變少。由於轉殖之目標基因 *cecA* 和 *lys* 都是抗菌基因所以汙染的細菌或真菌也可能作為一種篩選壓力，期望轉殖成功的葉綠體能夠比未轉殖的葉綠體有更好的生長優勢。

二、蝴蝶蘭葉綠體擬轉殖株分析

經過 Spectinomycin 和細菌或真菌的篩選獲得 24 株蝴蝶蘭葉綠體擬轉殖株。萃取葉片或根之基因組 DNA 進行 PCR 分析，擬轉殖株編號 1、4、8、10 和 17 能增幅出 *lys* 基因，證明 *lys* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。擬轉殖株編號 2、3、9、14、21 和 22 能增幅出 *cecA* 基因，證明 *cecA* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。比較特別的是基因槍轟擊使用的轉殖載體是帶有 *cecA* 和 *lys*，但是擬轉殖株都只能各別偵測到其中一個目標基因。推測有可能是 DNA 同源重組的現象發生，因為 *cecA* 和 *lys* 基因都是以同樣 RBS 序列約 14 bp，產生短的順向重複 (short direct repeats) 序列可能誘發同源重組導致序列缺失。雖然前人研究發現順向重複 (short direct repeats) 序列在 400 bp 以上有較高的誘發同源重組的機率，但在小麥葉綠體也有觀察到短的順向重複 (short direct repeats) 序列 5~9 bp 的長度的兩段序列就可能是引發小麥葉綠體基因組序列缺失的原因 (Ogihara *et al.*, 1988)。所以設計葉綠體轉殖載體應避免存在順向重複序列。進一步將擬轉殖株編號 1、2、3、4、8、9、10、14、17、21 和 22 萃取總 RNA 偵測 *cecA* 和 *lys* 基因表現情形，結果顯示擬轉殖株編號 1、4 和 22 能偵測到 *lys* 基因表現。但不是所有在 PCR 偵測到 *lys* 基因的植株都能在 RT-PCR 偵測到 mRNA 的表現。因為葉綠體轉殖的文獻中並沒有轉基因沉默的報告 (Ahmad *et al.*, 2016)。所以推測可能是 PCR 或 RT-PCR 檢測技術上的問題。

參考文獻

- 吳致淵。2012。 *Xanthomonas* 細菌素基因及抗菌胜肽於大腸桿菌表現及純化之探討。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 陳慶三。2005。抗蟲蛋白質。科學發展。392:12-15。
- 謝廷芳。2004。蘭花真菌性與細菌性病害的介紹及防治。蘭花種苗病毒驗證制度及病蟲害整合性防治講習會。台灣蘭花產銷發展協會。pp.250-259。
- 廖珮鑾。2006。 *Xanthomonas* 細菌素基因的篩選及在 *E. coli* 中表現。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 傅承泰、潘怡君、曾夢蛟。2020。蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體之構築與分析。興大園藝。45(1): 95-114。
- Ahmad, N., F. Michoux, A. G. Lössl, and P. J. Nixon. 2016. Challenges and perspectives in commercializing plastid transformation technology. *J. Exp. Bot.* 67(21): 5945-5960.
- Lee, S. B., B. Li, S. Jin, and H. Daniell. 2011. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol. J.* 9(1): 100-115.
- Loessner, M. 2005. Bacteriophage endolysins-current state of research and application. *Curr. Opin. Microbiol* 8: 480-487.
- Ogihara, Y., T. Terachi, and T. Sasakuma. 1988. Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by short direct-repeat sequences in wheat species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(22): 8573-8577.
- Sinagawa-García, S. R., T. Tungsuchat-Huang, O. Paredes-López,, and P. Maliga. 2009. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 70(5): 487-498.

Studies on Transferring Lysozyme and Cecropin Genes into the Chloroplast of *Phalaenopsis* Orchid

Cheng-Tai Fu¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: *Phalaenopsis* orchid, Chloroplast gene transformation, Lysozyme, Cecropin

Summary

The objectives of this study are to establish the transplastomic system of *Phalaenopsis* orchid and to explore the possibility for transplastomic *Phalaenopsis* orchid with disease resistance by engineering the lysozyme (*lys*) and cecropin (*cerA*) genes. Constructed vectors harboring the *cerA* and *lys* genes were bombarded into the PLB of *Phalaenopsis* and selected by Spectinomycin. The results of PCR and RT-PCR analysis indicated that the transformed genes were presented in the transplastomic *Phalaenopsis* orchid plants and its mRNAs were expressed.

1) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

植物產生空氣負離子之機制初探

朱 恬 儀¹⁾ 吳 振 發²⁾

關鍵字：室內植物、室內空氣品質

摘要：目前國內外關於空氣負離子的研究多進行不同環境中空氣負離子之時空間變化監測，或者其濃度與環境、植物群落、氣象因子之相關性，開發產生負離子之相關產品，以及其對人體健康效益之研究，鮮少針對單株植物產生空氣負離子的研究。鑑此，本研究以文獻回顧法來探究植物產生空氣負離子的機制，並進行先驅實驗，測量室內植物空氣負離子產生量，最為後續應用室內植物配置營造健康環境之參考。

前 言

1980 年美國太空總署(NASA)研究發現室內植物可以淨化空氣。後續由美國景觀協會的植物清淨空氣協會 (Plants for Clean Air Council)與渥文特環境服務 (Wolverton Environmental Services)共同研究推動植物改善空氣品質的觀念，證實植物是維持密閉建物空氣清淨的重要元素 (Wolverton, 2007；郭丙華，2010)。空氣中負離子含量與其清潔度密切相關，更成為評價空氣清潔度的指標 (李繼育，2008b)。世界衛生組織規定清新空氣的空氣負離子標準濃度為 1000~1500 個/cm³ (Kukec *et al.*, 2014; Lazzerini *et al.*, 2018)。植物是產生空氣負離子的主要來源，空氣負離子能吸附、聚集和沉降空氣中的懸浮顆粒、污染物質 (楊等，2009)。在富含空氣負離子的空氣中，直徑 1 μm 以下的微塵、細菌、病毒等幾乎為零，且空氣負離子對有毒氣體有降解、裂解的作用 (林等，2006)。空氣負離子能中和空氣中的空氣中的細菌、灰塵、煙霧等帶正電的微粒，是淨化空氣，特別是解決 PM_{2.5} 危害的有效物質。陸地上空氣負離子的平均濃度為 650 個/cm³，但分布不均勻，尤其在工業區、辦公室等室內，其濃度更趨近於 0 (錢等，2016)。透過種植和擺設植物可產生對人體有益的空氣負離子並降低空氣中污染物質 (郭丙華，2010；林等，2012；趙潔，2015)。

1) 國立中興大學園藝系博士班研究生。

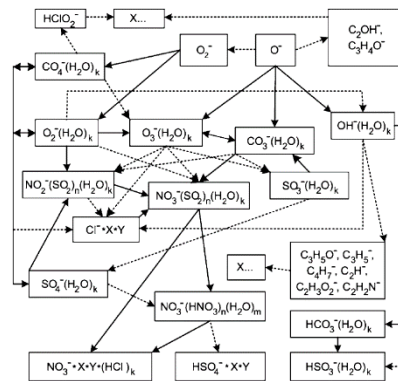
2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

文獻回顧

一、空氣負離子

(一) 空氣負離子的概述

空氣是由 N_2 、 O_2 、 CO_2 等多種氣體組成。正常狀態下，氣體分子及原子的正負電荷呈中性。經宇宙射線、太陽光照、電磁波、岩石和土壤產生的射線、植物的尖端放電和光合作用光電效應、海浪、瀑布及各種氣象活動等能量作用下，氣體分子中某些原子的外層電子離開軌道，成為呈負電極性的自由電子 (e^-)，電子的原子呈正電極性，此過程稱“空氣電離”。負電極性的自由電子與空氣中其他中性分子 (如 H_2O 、 O_2 、 N_2 、 CO_2 、 SO_2 等) 結合，使得到多餘電子的中性分子呈負電極性，即成為“空氣負離子”亦稱“負離子”(Negative Air Ions; NAIs)，或負氧離子 (Negative Oxygen Ions; NOIs) (Krueger, 1962；林等，2006；王等，2013；朱等，2018)，此過程稱空氣離子化 (林玉雯，2014)。各氣體元素的電子親和力不同， N_2 電子親和力遠低於 O_2 、 CO_2 ；而 O_2 為大氣中最豐富的元素；因此自由電子 e^- 多被 O_2 獲取，形成空氣負離子 (李等，2017)。



資料來源：Lin and Lin, 2017

圖 1. 空氣負離子產生流程。

Fig. 1. The basic scheme of the negative air ions transformation processes.

空氣負離子包括小離子 (直徑 $0.001\sim0.003\mu m$)、中離子 (直徑 $0.003\sim0.030\mu m$)、大離子 (直徑 $0.03\sim0.10\mu m$)。空氣負離子指的是小離子，具最大的生物活性，以 1 立方公分空氣中含有空氣離子個數表示濃度，單位為“個/ cm^3 ”。大氣中正離子濃度略高於負離子，約為 1.15 : 1.00 (吳振發，2009；范琪林，2015)。而空氣負離子存在的時間與空氣清潔程度呈正相關，存在時間為數秒～數千秒 (單晟燁，2016；Ling, 2019)。

國際大地測量學與地球物理學聯合會 (International Union of Geodesy and Geophysics; IUGG) 指出空氣負離子分子式為負氧離子 $O_2^-(H_2O)_n$ 、氫氧根負離子 $OH^-(H_2O)_n$ 、 $CO_4^-(H_2O)_2$ (Lin, and Lin, 2017; Jiang, *et al.*, 2018)。

(二) 空氣負離子的產生方式

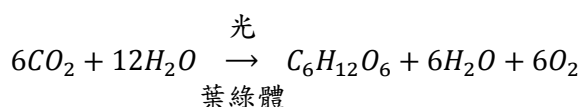
空氣負離子產生的方式分有人為、自然兩種。人為產生方式為外線照射法、熱離子發射法、放射性物質輻射法、電荷分離法、電暈放電法、高壓水噴射作用等方式。自然產生負離子的方式為物枝葉的尖端放電、光合作用形成光電效應使空氣電離，產生空氣負離子 (林，2006；林，2010)。

二、植物產生空氣負離子

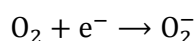
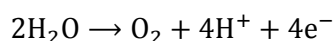
(一) 植物產生空氣負離子的概述

植物透過光合作用產生空氣負離子 (林等，2006；潘，2006)，Z 型光反應系統是植物光合作用光反應的重要部分 (陳等，2016)。

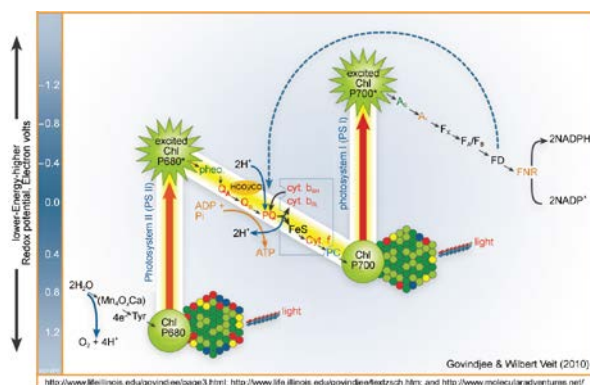
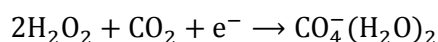
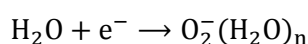
1. 光合作用：包含光反應 (Light Reaction) 與暗反應 (Dark Reaction)，其關鍵是葉綠體。葉綠體在光的作用下，將由氣孔進入的 CO_2 和由根部吸收的 H_2O 轉成葡萄糖，釋放 O_2 。



光反應需光，涉及 H_2O 的光解及光合磷酸化，產生 O_2 且經氣孔釋放； O_2 再與產生的電子 e^- 合成空氣負離子。另外，暗反應不需要光，涉及 CO_2 的固定。



另，釋出的 e^- 與 CO_2 、 H_2O 反應，產生空氣負離子。



圖片來源：陳博才等, 2016

圖 2. 植物光合作用過程中電子的 Z 型傳遞機理。

Fig. 2. Z-scheme of electron transport mechanism in plant photosynthesis progress

2. 植物尖端放電：

生態環境中，植物於光合作用過程吸收空氣中正離子，於葉片尖端放電產生負離子。植物的尖端放電是地面上空氣負離子主要來源（蒙等，2005；楊等，2009）。植物的莖、皮、葉等器官或組織分化成曲率較小的針狀結構，發生“尖端放電”作用，誘導產生負離子；另外，植物分泌的萜烯類和芳香類物質會促使空氣電離產生負離子（林等，2006）。

(二) 植物淨化空氣

1980 年美國太空總署 (NASA) 於南密西西比的約翰史丹尼斯太空中心 (John C. Stennis Space Center) 研究發現室內植物可以淨化封閉的實驗艙內的空氣。於 1989 年再指出植物對甲醛、苯、三氯乙烯的排除能力效果顯著。後續由美國景觀工程會成立植物清淨空氣協會 (Plants for Clean Air Council) 及沃文特環境服務公司 (Wolverton Environmental Services) 共同研究。於 NASA 創建的實際居住空間中進行實驗，結果表明室內空氣淨化植物是維持健康的室內環境不可缺少的植物。針對揮發性化學物質的去除能力、濕度調節能力、病毒去除能力、室內環境適應能力等四項指標的綜合評價結果，篩選、公布 50 種空氣淨化植物 (Wolverton, 2007；劉等，2013；劉等，2015)。

室內空氣淨化植物 (Eco-friendly Houseplants) 是指在室內易生長、適應，且易淨化空氣中各種污染物的植物。植物透過氣孔吸收 CO_2 ，產生 O_2 和 H_2O ；同時吸收空氣中的污染物。同時，產生的空氣負離子能去除或中和室內建築材料、地毯、黏著劑等化學物質散發出的各種氣味、吸附灰塵、抑制病毒及黴菌等（郭丙華，2010）。

對植物而言，室外、室內的生長環境條件差異相當大，並非所有植物都適合於室內生長。適於室內栽培、應用的植物，稱為室內植物 (House Plants 或 Indoor Plants)；觀葉植物 (Foliage Plants) 多源自陽光不足、高溫多濕的熱帶雨林，具耐蔭特性，能適應室內光線不足的條件，因此室內植物的種類常是以觀葉植物為主（李，1989）。

(三) 植物產生空氣負離子的研究趨勢

本研究於臺灣華藝線上圖書館、臺灣博碩士論文網及大陸的中國知識資源總庫（包含中國期刊全文數據庫、中國博士學位論文全文數據庫、中國優秀碩士學位論文全文數據庫）等電子資料庫，以空氣負離子為關鍵字查詢，發現相關研究的期刊、論文等文獻資料總數懸殊差距極大。

目前，對植物產生空氣負離子的研究，集中在戶外環境中的植物群落或度假區。研究該地區空氣負離子的時空間變化監測或研究該地區空氣負離子濃度與氣象因子的關係（付等，2013；彭等，2013；李等，2016；張等，2016；毛等，2017）。對單株植物產生空氣負離子的研究甚少，在植物產生空氣負離子的研究可分為：自然狀態下及人為控制或刺激時兩種類型。

在自然狀態下，研究不同時間（日、月、季節、年）、空間環境（室內、戶外、城市、森林、水體…）、氣象因素（溫度、濕度、陰晴）、植物類型（群落、結構、數量、鬱閉度…）與空氣負離子濃度的變化關係（張帥，2010；吳等，2011a；吳等，2011b；丁等，2015；

張等，2015)。

在人為控制或電刺激方面，主要探討改變光照、溫度、電刺激植物等不同變數施以植物時，植物產生空氣負離子濃度的變化，以及受外在刺激後植物生長或生理作用的影響程度關係 (Tikhonov *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009；吳，2017a；吳，2017b；吳，2017c)。

表 1. 臺灣和大陸有關空氣負離子的文獻統計。

Table 1. Kinds of Literature about Air Negative Ions in Taiwan and China.

電子資料庫 E- Resources	期刊 Journal	博碩論文 thesis	總數 Total
臺灣華藝線上圖書館	79	23	102
臺灣博碩士論文網	博士論文 5、碩士論文 63		68
中國知識資源總庫	1028	192	1220

資料來源：本研究整理，查詢時間 107 年 12 月 19 日

(四) 測量植物產生空氣負離子的實驗

以往認為單株植物在自然狀態下所產生的空氣負離子量少且難以測量，故鮮少對單株植物產生空氣負離子量的探討 (吳等，2011a；吳等，2011b；張等，2015)。本研究於有限的文獻中整理發現，目前在自然狀態下，對單株植物產生空氣負離子的研究可分為日間 12 小時與全日 24 小時進行監測，兩種類型。

1. 日間進行的實驗：

比較李繼育 (2008a)、丁旭玲等 (2015)、張萬超等 (2015)三篇，於日間連續 12 小時測量植物產生空氣負離子的試驗方法得知；植物產生空氣負離子的濃度與株齡、環境光照、風速、溫度、濕度等因素有關 (Tikhonov *et al.*, 2004)。因此為避免不同生長勢的影響，多選擇株齡與外型相近的植株為試驗材料並設置三重複。選於晴朗、乾爽、無風的天氣，在室內環境的密閉玻璃箱中進行試驗。同時記錄光照、溫度、相對濕度。在監測數據讀取的時間上雖不盡相同，但多將植物正對儀器、保持在同一位置或重複測量四次、每次將植株旋轉 90°來讀取數據，所測得之數據處理以 EXCEL、SPSS 軟體來分析。

2. 全日進行的實驗：

比較吳仁燁等 (2011a、2011b、2015)三篇，於全日連續 24 小時測量植物產生空氣負離子的試驗方法，並與日間進行實驗的三篇文獻相比得知：對照組除無植物無栽培土的空盆外 (吳等，2011a；吳等，2011b)，另吳仁燁等 (2015)改以無植物的栽培土 (吳等，2015)為空白對照。同樣為避免各植株其不同生長勢的影響，選擇株齡、外型相近的植株並設置三重複為試驗材料。試驗選在晴天，於室內的密閉玻璃箱中進行。監測時間分別 150 秒、100 秒。以 EXCEL、SPSS 軟體進行分析。

3. 本研究彙整植物產生空氣負離子的文獻結果：

- i. 自然狀態下，多數植物在產生空氣負離子數量的表現為日間時段高於夜間時段，說明光照對植物產生空氣負離子極具影響 (Tikhonov *et al.*, 2004；李，2008a；吳等，2015)；植物在日間或夜間產生的空氣負離子數量，除少數植物變化幅度較大外，大部分植物於全天的空氣負離子數量表現都較為平穩 (吳等，2011a；吳等，2011b)。
- ii. 植物能產生空氣負離子；但單株植物產生空氣負離子的量與促進人體健康所需的濃度相差甚遠 (辛等，2014；鄧等，2014)。
- iii. 植物產生空氣負離子的能力與植株年齡相關，且受溫度、濕度、光照等環境條件影響 (Tikhonov *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009)。
- iv. 實驗設計大多只測量每立方公分空氣中的空氣離子個數，少數採用高壓電刺激植物的研究 (李等，2008a)，才有採用安培空氣質量係數計算。同時選於環境因素干擾較少的室內或密閉玻璃箱進行測量，選擇有相似株型、生長勢的植物並設置三重複為試驗材料，選用更新穎、精確度更高的空氣離子測量儀器 (吳等，2011a；吳等，2011b；張等，2016)。

材 料 與 方 法

一、試驗目的

為測量植物空氣負離子產量的研究試驗作前測，以避免正式試驗時的錯誤，同時應用此前測之結果加以修正試驗設計的流程。

二、材料選擇

由於本研究之參考文獻多源於大陸，為了解兩岸對植物名稱是否不同。將前人研究結果 (吳等，2011a；吳等，2011b) 與 50 種常見淨化室內空氣植物 (葉德銘，2010) 做彙整比對。得知尚有 30 種常見淨化室內空氣植物未測量過空氣負離子產生量。將 30 種未測量過的室內植物，依預計進行的試驗日期進行分組。

三、試驗材料

選擇 6 吋盆大岩桐：株齡三個月，設置 A、B、C，三個重複；選擇 6 吋盆非洲菊，株齡四個月，設置 A、B、C，三個重複。受測植物均於同一花市採買，株齡、蓬型、高度、穴盆大小等參數相似。

四、試驗時間與地點

試驗日期訂於 2017 年 03 月 13 日，日間 07:00~19:00，連續 12 小時進行測量植物產生空氣負離子的試驗。天氣晴朗少雲。試驗地點為中興大學作物科學大樓 8 樓。

五、試驗設備

(一) 玻璃箱：採用厚度 8 mm 玻璃，製成規格為 80 cm×80 cm×80 cm 的密封玻璃箱，其中一側面截取 108 mm×114 mm 的窗口，該窗口與 COM-3600F 空氣離子測量儀的測量進風口面大小相吻合，未測量時用玻璃擋板封閉窗口。

(二) 日本 COM-3600F 高機能空氣正負離子測定器：可測量空氣正、負離子。每秒可測量 1 個數據。同時能測量溫度及相對濕度並連接、記錄於電腦。

(三) 台灣 LUTRON 路昌 LM-8000 多功能環境表：測量光照度 $\pm 5\%$ 。

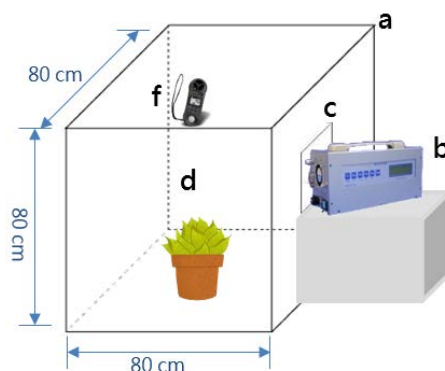


圖 3. 測量植物產生空氣負離子量之試驗設置示意圖。a.密閉玻璃箱 b.空氣離子測量儀 c.測量開口 d.受測植物 e.墊高物 f.光度計。

Fig. 3. Schematic Diagram of the Experimental Setup for Measuring the Amount of Air Negative Ions Produced by Plants. a. Airtight glass box, b. NAI detector, c. Sampling holed, d. Testing Houseplant, e. Stand, f. Photometer.

六、試驗方法與資料處理

於 07:00~19:00 間，每小時測量一次，連續測量 12 小時。植株固定在同一位置。測量時，植物正對測量儀器。每株植物每小時測量一次，連續讀取 300 秒，得 300 個有效資料。每小時測量順序為大岩桐 A、B、C；非洲菊 A、B、C。每小時每種植物共得 900 個資料，以平均值為該株植物該時段的空氣負離子數值。每次測量結束後，玻璃箱皆充分通風，同時記錄溫度、相對溼度、光照度，以 Excel 2016 計算各參數平均值並繪製趨勢圖。

結果與討論

由日間連續 12 小時測量玻璃箱內大岩桐與非洲菊的空氣負離子數量與紀錄溫度、相對濕度、光照度，以每小時之平均值分析並繪製趨勢圖：

一、空氣負離子數

大岩桐於 10:00、15:00、18:00 等時段達到峰值，分別為 551 個/cm³、554 個/cm³、558 個/cm³；於 07:00、11:00 產生空氣負離子量較低，分別是 312 個/cm³、447 個/cm³。非洲菊於 10:00、15:00、18:00 等時段達到峰值分別為 536 個/cm³、546 個/cm³、584 個/cm³；於 07:00、11:00 等時段產生空氣負離子量較低，分別是 389 個/cm³、456 個/cm³，詳見圖 4。

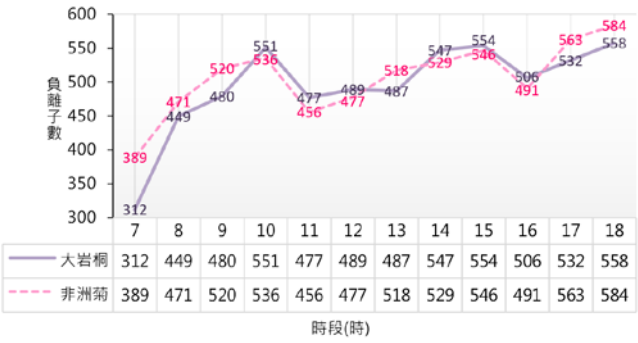


圖 4. 大岩桐、非洲菊之產生空氣負離子數趨勢圖。
Fig. 4. The Trend of Air Negative Ions Concentration by Gloxinia and Gerbera.

二、相對濕度與溫度

(一) 大岩桐 (見圖 5)

- 1. 相對濕度：最高於 07:00-10:00 等時段：86%。最低於 11:00-16:00 等時段：69%。平均值：75%。差距 (最大-最小)：17 %。
- 2. 溫度：最高於 17:00 時段：29.0℃。最低於 07:00-10:00 等時段：25.9℃。平均值：27.8℃。差距 (最大-最小)：3.1℃。

(二) 非洲菊 (見圖 6)

- 1. 相對濕度：最高於 07:00-10:00 等時段：86%。最低於 11:00-16:00 等時段：69%。平均值：75%。差距 (最大-最小)：17 %。
- 2. 溫度：最高於 17:00 時段：29.4℃。最低於 07:00-09:00 等時段：25.9℃。平均值：28.1℃。差距(最大-最小)：3.5℃。

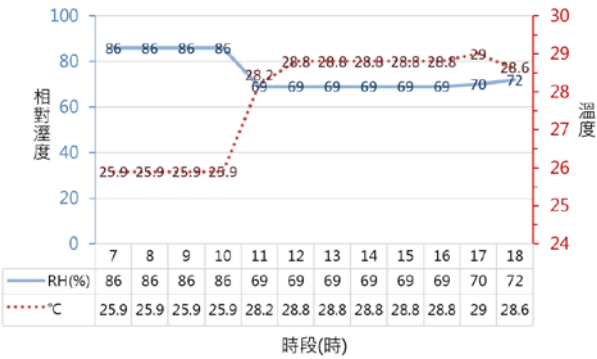


圖 5. 大岩桐—相對溼度與溫度趨勢圖。
Fig. 5. The trend of Relative Humidity and Temperature by Gloxinia.

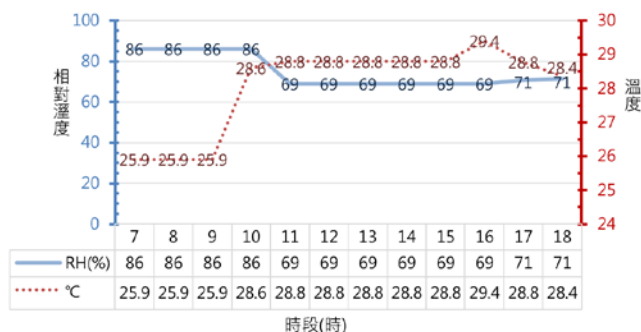


圖 6. 非洲菊—相對溼度與溫度趨勢圖。

Fig. 6. The trend of Relative Humidity and Temperature by Gerbera.

三、空氣負離子數與光照度

(一) 大岩桐 (見圖 7)

1. 空氣負離子數：最高於 18:00 時段：558 個/cm³。最低於 07:00 時段：312 個/cm³。平均值：495 個/cm³。差距 (最大-最小)：246 個/cm³。
2. 光照度：最高於 11:00 時段：2092 lux。最低於 18:00 時段：2 lux。差距 (最大-最小)：2090 lux。

(二) 非洲菊 (見圖 8)

1. 空氣負離子數：最高於 18:00 時段：584 個/cm³。最低於 07:00 時段：389 個/cm³。平均值：507 個/cm³。差距 (最大-最小)：195 個/cm³。
2. 光照度：最高於 11:00 時段：2020 lux。最低於 18:00 時段：0 lux。差距 (最大-最小)：2020 lux。

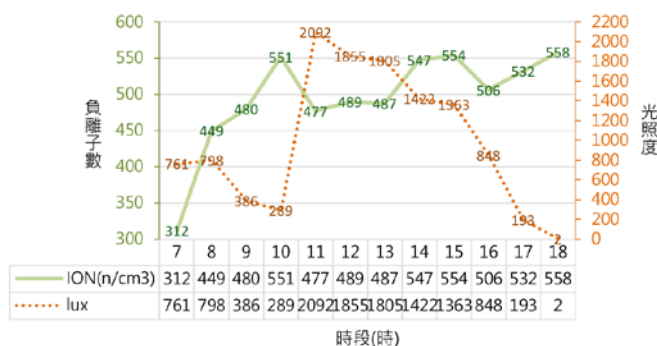


圖 7. 大岩桐—空氣負離子數與光照度趨勢圖。

Fig. 7. The trend of Air Negative Ion Concentration and Illuminance by Gloxinia.

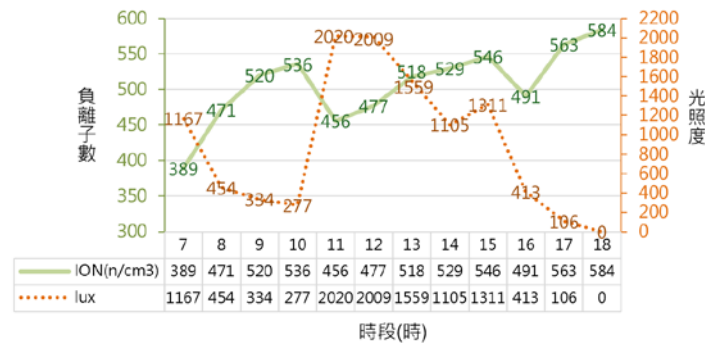


圖 8. 非洲菊—空氣負離子數與光照度趨勢圖

Fig. 8. The trend of Air Negative Ion Concentration and Illuminance by Gerbera.

(三) 全日趨勢 (見圖 7、圖 8)

1. 07:00 光照度較低，隨著時間到 11:00、12:00 光照度達最大;之後逐漸下降至 0。
2. 07:00~11:00 玻璃箱內所測得之空氣負離子數量呈現緩升，推測因光照度逐漸上升帶動植物光合作用速率提升;故，所測得的空氣負離子數逐漸增加。
3. 11:00-12:00 光照度達最高值，玻璃箱內所測得之空氣負離子數量呈現下降。推測此時光照度過高，植物光合作用速率趨緩。於 13:00 後光照度下降至植物光合作用適當範圍，故玻璃箱內所測得空氣負離子數量又逐漸升高。

四、空氣負離子數與溫度

玻璃箱內大岩桐 (見圖 9)、非洲菊 (見圖 10)測得空氣負離子與溫度趨勢：

- (一) 07:00 溫度最低，隨著時間緩升到 16:00~17:00 時段溫度達最高，之後逐漸下降。
- (二) 07:00~11:00 玻璃箱內測得空氣負離子個數及溫度呈現緩升。推測因溫度逐漸上升帶動光合作用速率提升;故，所測得空氣負離子數量逐漸增加。
- (三) 11:00-12:00 測得溫度逐漸升高、空氣負離子數呈現相對下降。推測除光照度過高且溫度也提高，雙重影響光合作用速率有關。13:00~15:00 溫度維持在 28.8℃，但所測得空氣負離子數量呈現緩增，推測此時溫度雖維持，但光照度逐漸降低至光合作用適宜範圍，故玻璃箱內所測得空氣負離子數量又逐漸升高。
- (四) 16:00~17:00 測得溫度達最高，空氣負離子數呈現先降後升。推測是溫度過高，影響光合作用暗反應的酶活性所致，故光合作用速率降低，空氣負離子數量呈現相對下降。
- (五) 18:00 溫度逐漸下降而光照度趨近於 0，所測得空氣負離子呈現緩升;推測是溫度下降至適宜範圍，植物使用剩餘的儲備能量來進行光合作用，此時為植物的滯後效應，故讓植物持續產生空氣負離子。此現象與前人研究結果一致 (Wang *et al.*, 2009)。

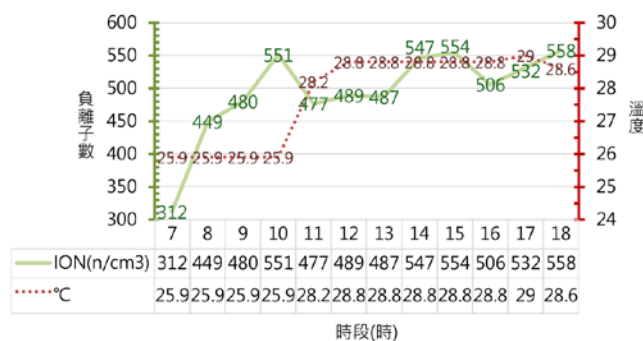


圖 9. 大岩桐—空氣負離子數與溫度趨勢圖。

Fig. 9. The Trend of Air Negative Ion Concentration and Temperature by Gloxinia.

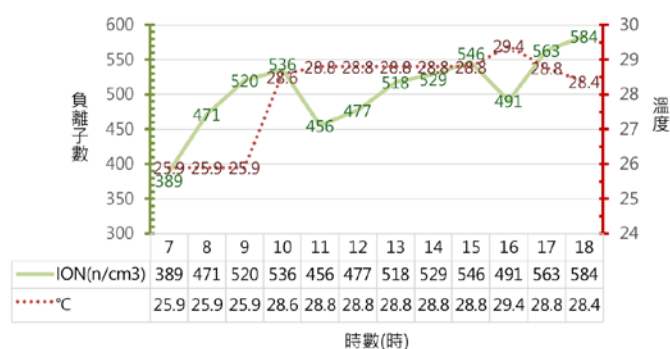


圖 10. 非洲菊—空氣負離子數與溫度趨勢圖。

Fig. 10. The Trend of Air Negative Ion Concentration and Temperature by Gerbera.

五、空氣負離子數與相對溼度

玻璃箱內大岩桐（見圖 11）、非洲菊（見圖 12）測得空氣負離子與相對濕度趨勢：

- (一) 07:00~10:00 相對濕度 86%。11:00~16:00 相對濕度 69%。17:00~18:00 相對濕度約 70%。
- (二) 07:00-10:00 因溫度、光照度逐漸上升帶動光合作用；所測得空氣負離子數呈現緩增。而 O₂ 與 H₂O 為光合作用產物，故相對濕度較高。
- (三) 11:00-12:00 測得空氣負離子數呈現趨緩；相對濕度下降至 69%。推測 11:00-12:00 光照度高、溫度高、加上 07:00-10:00 光合作用持續而相對濕度高；三者同時影響光合作用速率，故所測得空氣負離子數呈現下降。
- (四) 16:00 相對濕度上升至 71%；所測得空氣負離子數呈現緩升。推測此時除溫度、光照度下降至適宜範圍，讓植物光合作用提升，故玻璃箱內所測得空氣負離子數量又逐漸升高。

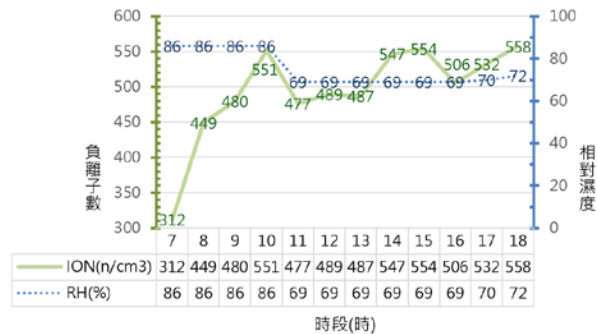


圖 11. 大岩桐—空氣負離子數與相對濕度趨勢圖。

Fig. 11. The Trend of Air Negative Ion Concentration and Relative Humidity by Gloxinia.

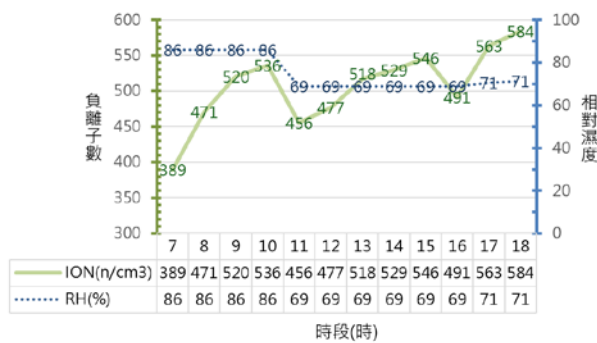


圖 12. 非洲菊—空氣負離子數與相對濕度趨勢圖

Fig. 12. The Trend of Air Negative Ion Concentration and Relative Humidity by Gerbera.

後續研究

由日間連續 12 小時監測玻璃箱內大岩桐、非洲菊所測得空氣負離子數與環境因素得知：玻璃箱內溫度與相對濕度呈現負相關，可從植物光合作用的機制來分析，大岩桐、非洲菊所產生的空氣負離子趨勢受光照度影響 (Tikhonov *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009)。另，林金明等 (2006)指出植物透過光合作用、尖端放電方式來產生空氣負離子；光合作用的 O_2 產量與光合速率、葉面積、生長老化、環境因素有關；光合作用是光化學反應，日照量越大、光合作用速率越快；但光照增加到一定程度後，光合作用速度不再增加。光合作用的暗反應屬於酶促反應，隨著溫度升高，酶促反應加快，光合成加快；但溫度過高時會影響酶的活性，光合速度降低。因此，本研究推測植物產生空氣負離子的數量除受光照度、風速、溫度、相對濕度等環境因素影響外，也與植物種類、光合作用速率、光補償點、光飽和點、植物體內水分含量等相關。建議後續可針對植物光合作用速率影響因素進行研究分析。本研究為測量室內植物空氣負離子產生量的先驅實驗，並應用本研究結果提出後續試驗流程

之修正建議。本研究於測量當天發現中興大學作物科學大樓 8 樓陽台易受風速干擾;偶發儀器測量之空氣負離子最小值低於起測背景值的狀況,建議未來實驗地點應選擇背景環境穩定且變動小的地點。且由於人力與試驗設備之限制,本研究來不及進行對照組測量,故本研究只分析每小時空氣負離子數、溫度、濕度、光照的變化趨勢,無法計算每小時空氣負離子產生量的平均值。建議後續試驗時,除需選於室內避免風速干擾、設置適於室內植物生長所需之溫度、相對濕度、光照度的實驗環境外,同時建議需增加人力以監測、比較各植物於相同環境下所產生的空氣負離子數量。另,各植物有其不同生長季節,故試驗日期也需依植物種類特性,隨時做時程上的調整。

參 考 文 獻

- 丁旭玲、張萬超、黃龍飛、鄭金貴、吳仁燁、鄧傳遠。2015。常態下仙人掌科植物負離子釋放量與其刺尖數量的相關性研究。安徽農業大學學報 42(2): 263-267。
- 毛成忠、張明、劉艷玉、冷鵬飛、汪軍、陳星、楊戈。2017。空氣負氧離子濃度與主要氣象因子擬合試驗。綠色科技(19): 202-205。
- 比爾沃文特 B.C.Wolverton。2007。居家空氣大淨化:50 種能製造新鮮空氣的室內植物 HOW TO GROW FRESH AIR。蘋果屋出版社。155pp。
- 王薇、余莊。2013。中國城市環境中空氣負離子研究進展。生態環境學報 22(4): 05-711。
- 潘瑞熾(2006)。植物生理學。藝軒圖書出版社。379pp。
- 付聖東、黃彥青、陳瑋、孫曉梅、王振廷。2013。植物群落負離子濃度及空氣質量調查分析。中國園藝文摘(6)55、63。
- 朱怡諾、崔麗娟、李偉。2018。濕地環境中負(氧)離子研究概述。山東林業科技(3): 96-99,108。
- 李少寧、劉斌、石媛、魯紹偉。2016。天津典型綠化樹種提供空氣負離子研究。北方園藝(12): 188-193。
- 李晔。1989。室內植物。淑馨出版社。119pp。
- 辛桂亮、孟偉、夏青、黃龍飛、鄭金貴。2014。影響沿階草釋放負離子的 3 種因素分析。黑龍江八一農墾大學學報 26(2): 1-7。
- 李繼育、薛印泉、李印穎、任釗、小林昭雄。2008a。高壓刺激對幾種盆栽植物產生空氣負離子的影響。西北林學院學報 23(4): 38-41。
- 李繼育。2008。植物對空氣負離子濃度影響的研究。西北農林科技大學林學系碩士論文。48pp。
- 李琳、杜倩、劉鐵男、梁素鈺。2017。空氣負離子研究進展。現代化農業 12, 30-31。
- 林玉雯。2014。以生態設計觀點探討台大校園植栽配置。國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系碩士論文。125pp。
- 林金明、宋冠群、趙利霞。2006。環境、健康與負氧離子。化學工業出版社。

- 林溫凰。2010。住宅庭園空氣離子時空間變遷之探討。國立中興大學園藝學系碩士論文。83pp。
- 林韻芬、莊海華。2012。室內空氣與健康：漫談病態建築物症候群。家庭醫學與基層醫療，27(5): 161-165。
- 吳仁燁、鄧傳遠、王彬、黃德冰、林麗、黃建民、鄭金貴。2011a。具備釋放負離子功能室內植物的種質資源研究。中國農學通報 27(8): 91-97。
- 吳仁燁、黃德冰、郭梨錦、林麗、黃建民、鄧傳遠。2011b。具備釋放負離子功能室內植物的種質資源研究II。常態下室內植物負離子的釋放。亞熱帶農業研究 7(1): 1-6。
- 吳仁燁、鄧傳遠、楊志堅、翁海勇、朱帖俊容、鄭金貴。2015。脈衝電場作用對植物釋放負離子的影響。應用生態學報 26(2): 419-424。
- 吳仁燁、鄭金貴、翁海勇、張萬超、鄧傳遠、葉大鵬、王晴水、孫緣芬。2017a。脈衝電場刺激對植物釋放負離子的影響及其機理。生態學雜誌 36(5): 1224-1233。
- 吳仁燁、孫緣芬、鄭金貴、鄧傳遠、葉大鵬、王晴水。2017b。脈衝電場作用對植物釋放負離子與氣孔特徵的關係。植物學報 52(6): 744-755。
- 吳仁燁、鄭金貴、楊志堅。2017c。環境氣象因素對植物釋放負離子能力的影響。福建農業科技(9): 6-11。
- 吳振發、林溫凰。2009。台灣及大陸空氣負離子研究趨勢分析與展望。戶外遊憩研究 22(3): 57-81。
- 范琪林。2015。負氧離子及其應用分析。技術與市場 22(11): 160。
- 陳博才、沈洋、魏建紅、熊銳、石兢。2015。基於 g-C₃N₄ 的 Z 型光催化體系研究進展。物理化學學報 32(6): 1371-182。
- 郭丙華。2010。超有效室內空氣淨化植物。和平國際文化有限公司。215pp。
- 張兵、儲雙雙、張立超、張朝明、宋相金、孔德敏、肖夢蕊、曾曙才。2016。廣東車八嶺國家級自然保護區空氣負離子水平及其主要影響因子。廣西植物 36(5): 523-528。
- 張帥。2010。植物與空氣離子關係的研究。南京農林大學碩士論文。49pp。
- 張萬超、鄭金貴、黃龍飛、時順鋒、吳仁燁、鄧傳遠。2015。常態下仙人掌科植物負離子釋放量的比較及其與刺數量的關係。福建農林大學學報 44(4): 402-407。
- 單晟燁。2016。水體空氣負離子分布及其生態價值估算。哈爾濱師範大學碩士論文。
- 彭輝武、鄭鬆發、劉玉玲、胡明嬌、朱宏偉。2013。珠海淇澳島紅樹林群落空氣負離子濃度特徵研究。北京林業大學學報 35(5): 64-67。
- 楊運經、習崗、張社奇。2009。脈衝電場介導的植物空氣負離子發射的倍增效應及其意義。大學物理 28(12): 39-42。
- 葉德銘。2010。淨化室內空氣之植物應用及管理手冊：居家生活版。行政院環境保護署。191pp。
- 蒙晉佳、張燕。2005。地面上的空氣負離子主要來源於植物的尖端放電。環境科學與技術

- 1: 112-113。
- 鄧傳遠、鄭金貴、王艷英、吳仁燁、黃巧玲。2014。脈沖電場刺激對部分仙人掌科植物釋放負離子的影響。福建農林大學學報 43(6): 622-627。
- 趙潔。2015。室內植物對苯污染的耐脅迫能力及吸收淨化效果研究。山東建築大學碩士論文。61pp。
- 錢芳、潘魁曉、奚冠東。2016。面向健康城市的負離子生活圈構建初探。建築與文化 146: 192-19。
- 劉夢雲、張莉莉、熊勉、章麗茜、張春曉。2013。室內觀葉植物淨化空氣的研究進展。化學工程師 10: 38-39。
- 劉鳳、高澤、劉松奇、金仁傑、劉長明、汪閱。2015。室內植物淨化空氣的研究進展。安徽農業科學 43(10): 254-255, 289。
- Krueger, A. P. 1962. Air ions and physiological function. *J. Gen. Physiol.* 45: 233-241.
- Kukec, A. and Dovjak, M. 2014. Prevention and control of sick building syndrome (SBS). Part 1: identification of risk factors. *Int. J. Sanit. Eng.* 8(1): 16-40.
- Lazzerini, F. T., Orlando, M. T., and De Prá, W. 2018. Progress of negative air ions in health tourism environments applications. *Bol. Soc. Esp. Hidrol. Méd.* 33: 27-46.
- Lin, H. F. and J. M. Lin. 2017. Generation and determination of negative air ions. *J. Anal. Test.* 1: 6.
- Ling, D. 2019. Review on research of the negative air ion concentration distribution and its correlation with meteorological elements in mountain tourist area. *Earth.* 8(1): 60-68.
- Tikhonov, V. P., V. D. Tsvetkov, E. G. Litvinova, T. V. Sirota and M. N. Kondrashova. 2004. Generation of negative air ions by plants upon pulsed electrical stimulation applied to soil. *J. Plant Physiol.* 51(3): 414-419.
- Wang, J. and S. H. Li. 2009. Changes in negative air ions concentration under different light intensities and development of a model to relate light intensity to directional change. *J. Environ. Manage.* 90(8): 2746-2754.

The Mechanism of Negative Air Ions Produced by Plants

Tien-Yi Chu¹⁾ Chen-Fa Wu²⁾

Keyword : House Plants, Indoor air quality

Summary

Negative air ions (NAIs) research mostly focus on some topics, such as monitoring temporal and spatial changes of number of NAIs with various environment, the relationship among NAIs with climate, plants and environment factors, develop NAIs production products, and benefits of NAIs with human health. The topic of mechanism of air negative ions produced by plants is important issue but rare publication focus on it. This work review literature to explore the mechanism of plants producing air negative ions. Then, a pioneer experiment was test to manure plants production NAIs. This work will be useful for future work with plants producing air negative ions.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding Author.

藝園大興

第四十五卷 第三期

- 益收對佛利蒙柑(*Citrus clementina* x *Citrus reticulata*)果實轉色之影響
.....吳保諒 張哲嘉..... 1
- Effects of Piper betel Leaf Powder on Tomato Seedling Emergence, Seedling Growth
and Pythium Mycelial Growth
.....K. Jamcharoensup, S. G. Hwang, and H. L. Lin 17
- 介質添加木黴菌對草莓生長之影響
.....尤品人 黃政華 黃三光.....27
- 種子乾燥速率與含水量對苦瓜種子活力之影響
.....許冠旻 宋 妤.....43
- 食藥用百合品系試管內鱗片再生效率比較
.....蔡挹恆 陳葦玲 張 正.....55
- 扇形文心蘭品系及品種染色體數分析
.....莊子平 鄭雅銘 陳昌岑 張 正.....65
- 遮光對荷蘭薄荷光合作用及生長之影響
.....簡文捷 陳錦木.....79

國立中興大學園藝學系編印

中華民國一〇九年九月

益收對佛利蒙柑(*Citrus clementina* x *Citrus reticulata*)果實轉色之影響

吳 保 諒¹⁾ 張 哲 嘉²⁾

關鍵字：益收生長素、'佛利蒙'柑、催色、使用時機

摘要：本研究連續兩年以苗栗縣卓蘭鎮露天栽培之 7 年生'佛利蒙'柑 (*Citrus clementina* x *Citrus reticulata*)為材料，調查益收生長素 (ethephon)於'佛利蒙'柑催色之時期、濃度及售價之影響。第一年 (2018 年)利用不同濃度益收生長素於兩種果實成熟度進行全株噴施，尋找最佳時期及濃度，次年 (2019 年)探討高濃度益收生長素對於'佛利蒙'柑之影響。第一年結果顯示，轉色前施用 200 ppm 之處理較其他處理提早轉色，且售價較對照組高 (44.2 元/台斤 VS 36.3 元/台斤)，但果實總可溶性固形物含量(Total soluble solid content, TSS)較對照組為低 (10.0 ± 0.3 VS 11.8 ± 0.3)，並於 2019 年仍正常來花，且無樹勢衰退之現象。第二年結果顯示，植株在施用 600 及 400 ppm 之處理下會產生大量落葉 (70~77%)，且延後 16 天盛花，但果實可較 200 ppm 之處理早轉色，且 TSS 較低，但果實重與對照組無差異。綜合二年之結果顯示，以益收催色在'佛利蒙'是具可行性，但會有造成將低果實品質、植株樹勢及開花延後等可能性，因此在施用上仍需注意樹勢及施用倍數。

前 言

'佛利蒙'柑 (*Citrus clementina* x *Citrus reticulata*) 為以歐洲小果寬皮柑 Clementine 與極柑雜交選育而得的早熟雜交柑，具有高開花率與高著果率之特性，果實成熟時為亮麗的橙紅色 (黃與陳，2012)，極為誘人。在臺灣可自九月採收至十二月下旬，且台灣柑橘採收由南至北，北部種植'佛利蒙'柑之農民，在採收時市場因柑橘類供過於求導致價格低迷，而南部採收時果實多為半轉色，賣相不佳，因此欲將北部'佛利蒙'柑採收時期提早轉色以提

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

升售價。

葉綠素的分解及代謝是植物中重要的過程，這過程不僅影響植物的光合作用也參與了果實的轉色，更是一判斷果成熟的重要指標。在柑橘果皮顏色改變由綠色轉為黃或紅色，主要由柑橘果皮所含的葉綠素減少，類胡蘿蔔素增加所導致，而柑橘果皮葉綠素減少主要歸因於果實內生乙烯影響改變其活性及表達 (Jacob-Wilk *et al.*, 1999; Harpaz-Saad *et al.*, 2007; Shemer *et al.*, 2008)，此外，果皮顏色因葉綠素降解，其他有色體生成而改變的現象在許多作物中發現 (Jacob-Wilk *et al.*, 1999)，然影響轉色的因子除果實內生乙烯外也因果實成熟度、溫度及溼度等有所影響 (Porat, 2008)。

乙烯在更年性果實中為一重要的植物賀爾蒙影響著果實成熟、果實軟化、香氣、糖度、酸度和顏色變化等的生理及生化現象 (Lelievre *et al.*, 1997; Barry and Giovanoni, 2007)，而非更年性果實成熟過程中並未伴隨著呼吸及乙烯高峰，但果實會因為外源或內生乙烯造成果實成熟及果皮色澤等影響 (Eaks, 1970)，如：柑橘會因果實中乙烯的生成導致果皮轉色 (Denny, 1924)。

柑橘果實成熟及果皮中的葉綠素降解與類胡蘿蔔素累積會因外源乙烯的使用而提早 (Stewart and Wheaton, 1972; Purvis and Barmore, 1981; Rodrigo and Zacarias, 2007)，如 'Navelate' 的綠熟果經由 10 ppm 乙烯處理一週後呈黃橘色，而未處理乙烯的果實經自然轉色 21 天後果皮顏色始與處理組相同 (Rodrigo and Zacarias, 2007)。「Rishon」寬皮柑果色於 10 月初呈暗綠色，經 1.5 ppm 之乙烯處理 5 天後轉為黃橘色，與果實在正常環境下兩週後（自然轉色後第 3 天）色澤相同 (Porat, 2008)，然「Shamouti」柑橘以低濃度乙烯 (10~40 ppm) 處理無法使果皮轉色，處理濃度提高至 100 ppm 時可使轉色緩慢發生 (Cohen, 1978a)。

益收生長素是一乙烯類似物，可分解成乙烯促進其他色素的生成並促進果實成熟，但促進果實成熟後其貯架壽命會遭限縮 (Saure, 1990; Wang and Dilley, 2001; Stover *et al.*, 2003)。在現今栽培上利用益收生長素進行催熟、轉色及疏果等栽培管理已在許多作物上用，如：藍莓及梨上施用益收生長素可以提早果實成熟及果皮轉色 (Ban *et al.*, 2007; Dhillon and Mahajan, 2011)，果皮顏色是判斷藍莓成熟度的重要指標，須待果皮呈藍色方可採收，而益收生長素可促進果皮的轉色；在柑橘的研究指出導致果實脫落除本身產生的乙烯外，可藉由外源的益收生長素或因果皮受傷所誘導出的 CMN-Pyrazole (CMNP) 所致 (Davies *et al.*, 1976; Kossuth and Biggs, 1977)。但非所有作物皆會在乙烯環境中促進轉色，如：'Valencia' 柑橘及 'Duncan' 葡萄柚在乙烯的環境下並不會轉色，而是在移出該環境後才開始轉色，此現象稱為乙烯殘留效應 (Grierson and Newhall, 1960)。

益收生長素不僅促進轉色也可幫助果實的採收，在櫻桃 (Flore and Bukovac, 1982; Olien and Bukovac, 1978) 及橄欖 (Denny and Martin, 1994) 利用益收生長素幫助成熟果脫落已廣泛使用，柑橘雖也可以藉由益收生長素使成熟果脫落，但柑橘卻有葉片脫落的風險 (Kender *et al.*, 2000)。

除乙烯濃度外，溫度屬控制柑橘轉色之重要因子，在採收後柑橘中葉綠素會逐漸將解，

歸因於環境的高溫 (Sievers and True, 1912)。研究顯示雖然葉綠素會在高溫 (30~35°C) 下降解速度較快，但類胡蘿蔔素的合成會遭受抑制。而轉色期溫度在 15~20°C 時果皮仍可以緩慢的速度達預期的顏色 (Stewart and Wheaton, 1972; Ahrens and Barmore, 1986)，且在許多地區中也推薦以中低溫 (20-25°C) 促進柑橘轉色 (Eaks, 1977; Cohen, 1978b)。在極柑中於 25°C 的環境下，利用 5 ppm 的乙烯處理極柑 48 小時有良好的催色效果 (劉, 2007)，然陳 (2013) 的試驗中認為較早採收的極柑轉色程度不足，且即使經乙烯催色仍無法有最佳的轉色程度，因此於採前進行不同藥劑處理，發現以益收生長素進行處理轉色程度較佳。

為能使'佛利蒙'柑 (*Citrus clementina* x *Citrus reticulata*) 提早轉色以增加售價，且陳 (2013) 研究中指出益收生長素可使果實掛樹轉色，但在不同品種間對於益收生長素應有不同使用濃度及時機。因此本試驗希望第一年 (2018) 找出'佛利蒙'柑的最佳使用濃度及時機，第二年 (2019) 探討高濃度益收生長素對'佛利蒙'柑之影響，試驗結果可供農民栽培之參考。

材 料 與 方 法

一、材料

本試驗自 2018 年連續 2 年於苗栗卓蘭吳氏 7 年生'佛利蒙'柑果園進行，該園以慣行農法栽培 (24.303319 N, 120.866274 E)。

二、益收生長素處理

以市售 39.5% 益收生長素 (台灣日產化工股份有限公司) 進行全株噴施。2018 年以 50、100、200 ppm 於轉色前及 1/3 轉色後進行試驗，2019 年以 200、400、600 ppm 於轉色前進行試驗，試驗皆以慣性栽培為對照組，噴施益收生長素為處理組。果皮轉色前為淡綠色果皮，果皮 1/3 轉色則為全株約 8 成果實達 1/3 轉色 (黃綠色)。

三、噴施方法

2018 年於 9 月初標定對照組及轉色前處理之植株，而轉色前 (L: 42.8; a*: -11.6; b*: 18.5) 處理於 9/15 (六) 下午兩點以全株噴灑的模式進行，分別施用 50、100 及 200 ppm，1/3 轉色處理 (L: 43.4; a*: -10.0; b*: 20.8) (圖 5-4) 於 9/29 (六) 施用時間及方法與轉色前處理相同 (表 5-1)，並於採收後調查果實品質。

2019 年於 9 月初標定對照組及轉色前處理之植株，而轉色前 (L: 44.1 a*: -11.6 b*: 20.2) 處理於 9/06 (五) 下午兩點進行，以全株噴灑的模式進行，分別施用 200、400 及 600 ppm，並計算落葉率，其中 400 及 600 ppm 因有嚴重落葉故只使用 3 次 (表 5-2)，並於採收後調查果實品質及貯藏腐爛率。

四、果實品質調查：

(一) 果皮顏色

以筆式色差計 (pen-type colorimeter) (spectro-pen, Dr. Lange, Germany)測量向陽面、背陽面及鱗片之果皮顏色，結果以 CIE 表色系統之 L*(亮度)、a*(紅/綠值)及 b* (黃/藍值) 表示。

(二) 果實重

以上皿式天平 (XS 3250C-SCS, Precisa Gravimetrics AG, Switzerland)測量果實，結果以 g 表示。

(三) 果實橫縱徑

果實縱切後，以數位液晶游標卡尺 (500-196-20, Mitutoyo Crop., Japan)測量果實縱、橫徑及果皮厚度結果以 mm 表示。

(四) 糖度

數位式曲折度計 (PAL-1, ATAGO, Japan)以蒸餾水校正歸零後，縱切果實後取 1/4 果實之果汁，結果以 °Brix 表示。

(五) 酸度

取果汁 1ml 加入 24ml 蒸餾水，加入一滴 0.02ml 酚酞 (phenolphthalein)後，使用數字型連續滴定器 (VITLAB continuous E/RS, Germany)以 0.1N NaOH 進行滴定至變色為粉紅色為滴定終點。因檸檬酸為柑橘主要有機酸種類，故將 NaOH 含量換算為檸檬酸含量，結果以百分比表示

(六) 落葉率：

於 2019/09/06 每重複取 5 枝條，每枝條取上半段 45 公分進行葉片數計算，每週一次，共五次，落葉率 = $[(\text{第一週葉片數}-\text{第五週葉片數})/\text{第一週葉片數}] \times 100\%$ 。

五、微氣候調查

氣象資料記錄器裝設於露天果園植株樹冠下方。溫度及濕度藉由溫溼度感應器 (U23 Pro V2, HOBO)記錄，並將記錄器給予遮蔽，避免太陽直射，所有記錄器皆設定每 15 分鐘紀錄 1 筆資料，並據監測數據計算最高溫、平均溫。

六、價格調查：

各處理於果實採收後，於農產品批發市場交易行情站查詢各市場價格，自採收日算起一週，並將價格進行平均。轉色前施用 200 ppm 益收於 10/20~10/26 進行平均；其他處理於 11/4~11/10。

七、試驗設計：

2018 年試驗採複因子完全隨機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，包含噴施時間因子及益收生長素濃度因子。噴施時間處理為轉色前及 1/3 轉色後；益收生長素濃度為 50、100、200 ppm。依兩因子組合成六處理，並以慣性栽培為對照組，每處理五重複，共 35 重複，每重複取 20 顆果實進行果實調查。

2019 年試驗採單因子完全隨機設計 (CRD)，於轉色前噴施益收生長素分為 0 (CK)、50、100、200 ppm 共四處理，每處理五重複，每重複取 10 顆果實進行果實調查。

結 果

一、2018 年田間果實及採後果實品質調查

果實顏色分析結果顯示，轉色前施用 200 ppm 果實之 a^* 值於第 3 週開始有與對照組有差異，色澤已由綠轉紅，並於後續快速上升 (圖 1)，在 b^* 值上除轉色前施用 200 ppm 處理與對照組有差異，但與其他處理皆無差異 (圖 2)，綜合 a^* 與 b^* 可知在轉色前噴施 200 ppm 益收生長素之處理果實較快達採收標準，在 10/20 即可採收，此時其他處理果實僅達半轉色 (圖 3) (其它處理於 11/4 採收)，且轉色前施用 200 ppm 益收生長素採收時批發價格 (44.2 元/公斤) 高於其他處理所採收的價格 (36.3 元/公斤)。

將採收後的果實進行果實品質分析可知，轉色前與 1/3 轉色施用益收生長素對於採收時果實外觀上色澤、縱橫徑及果實重並無影響 (表 1; 表 2)，但在果實內部品質上，轉色前施用 200 ppm 益收生長素之果實可溶性固形物 (TSS) 與對照組有顯著差異 (轉色前施用 200 ppm: 10.0 ± 0.3 ; 對照組: 11.8 ± 0.3)，但在酸度上皆無顯著差異 (表 2)。

二、2019 年田間果實及採後果實品質調查

2019 年的試驗中，在轉色前施用益收生長素對於果實的色澤上與前一年結果相同在採收時在果實色差無差異 (表 3)，而本試驗顯示在才收時間上皆早於對照組，其中以轉色前噴用 600 ppm 進行處理的果實最早 (600 ppm 處理: 10/15 採收; 400 ppm 處理: 10/22; 200 ppm 處理: 10/28; 對照組: 11/14)，然果實重上皆坐落於 115~184 公克間，在 TSS 上

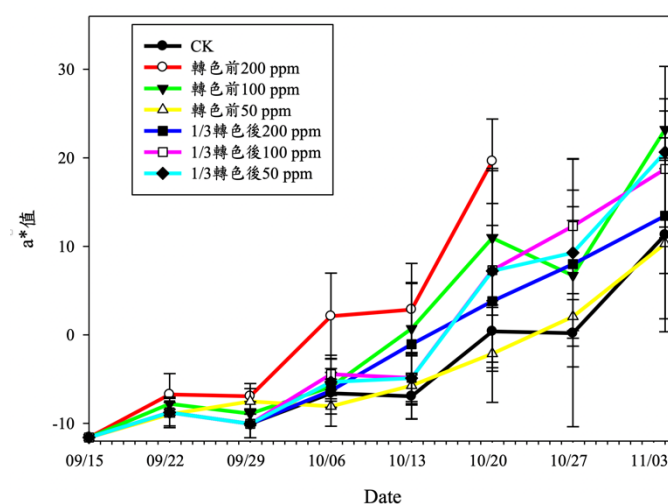


圖 1. 2018 年於轉色前及 1/3 轉色後施用不同濃度益收生長素之每週 a^* 值變化趨勢 (n=5)。

Fig. 1. The weekly a^* value changes by using different concentration of ethephon before color transform or after 1/3 color transform in 2018 (n=5).

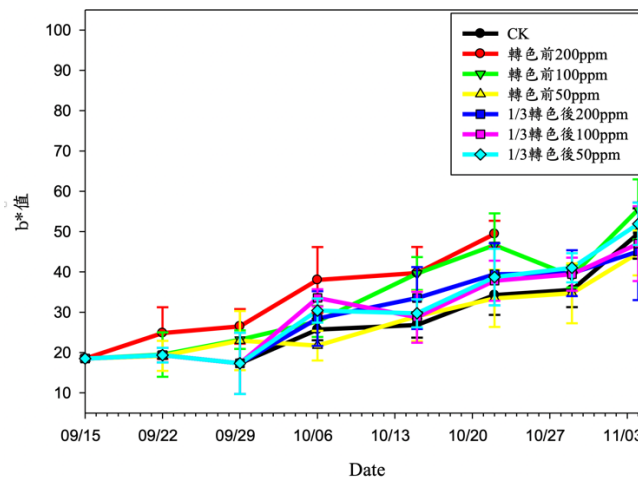


圖 2. 2018 年於轉色前及 1/3 轉色後施用不同濃度益收生長素之每週 b* 值變化趨勢 (n=5)。

Fig. 2. The weekly b* value changes by using different concentration of ethephon before color transform or after 1/3 color transform in 2018 (n=5).

以 600 ppm 及 400 ppm 益收生長素進行施用的果實顯著低於對照組，雖然可以提早採收但卻對果實造成影響，且在處理過程中以 600、400 ppm 的植株有顯著的落葉，落葉率達 70~77% (表 4)，並導致隔年開花時間延後 (CK 於 2/29 盛花；400 ppm 及 600 ppm 於 3/14 盛花)，而 200 ppm 處理的植株在連續施用兩年益收生長素後，植株勢仍維持正常，開花期與對照組相同，且修剪時無發現葉片呈淡綠或春梢短且少等樹體營養不良之現象。

三、微氣候調查

在本試驗中以益收生長素之處理自施用至採收的平均溫度均在 20~30°C 內 (2018 年：21.7°C；2019 年：23.6°C)，而 2018 年轉色前施用益收生長素使用期間 (2018/9/15 至 2018/10/13) 平均溫度為：22.8°C；1/3 轉色後施用益收生長素使用期間 (2018/9/29 至 2018/10/27) 平均溫度為：21.2°C，2019 年轉色前施用益收生長素使用期間 (2019/9/6 至 2019/10/4) 平均溫度為：23.3°C。

討 論

2018 年的試驗中，在轉色前施用 50 及 100 ppm，未能使果實提早轉色，然轉色前以 200 ppm 進行處理的果實卻提早轉色，應是濃度不足以產生足夠的乙烯含量刺激果皮轉色，結果與 'Shamouti' 柑相同，以 10~40 ppm 乙烯處理的 'Shamouti' 柑橘無法使果皮轉色，當濃度提升至 100 ppm 時可使轉色發生 (Cohen, 1978a)，而 1/3 轉色後施用益收生長素卻無法

使果實提早轉色，推測是因葉綠素分解酶及葉綠素過氧化酶活性較低，導致無法加速轉色。在阿拉伯芥研究指出成熟葉葉片的葉綠素分解酶活性高於老化葉片 (Todorov, 2003)，而 1/3 轉色後的果實細胞已開始老化，而葉綠素分解酶活性較轉色前低，因此施用益收生長素無法促進果實轉色。轉色前施用 200 ppm 益收生長素的結果與'Tifblue'藍莓、'Patharnakh'梨及'Cripp's Pink'蘋果所呈現結果相符，當果實於轉色前施用益收生長素會促進果實內花青素或類胡蘿蔔素提早成熟轉色 (Ban et al., 2007; Whale et al., 2008; Dhillon and Mahajan, 2011)。

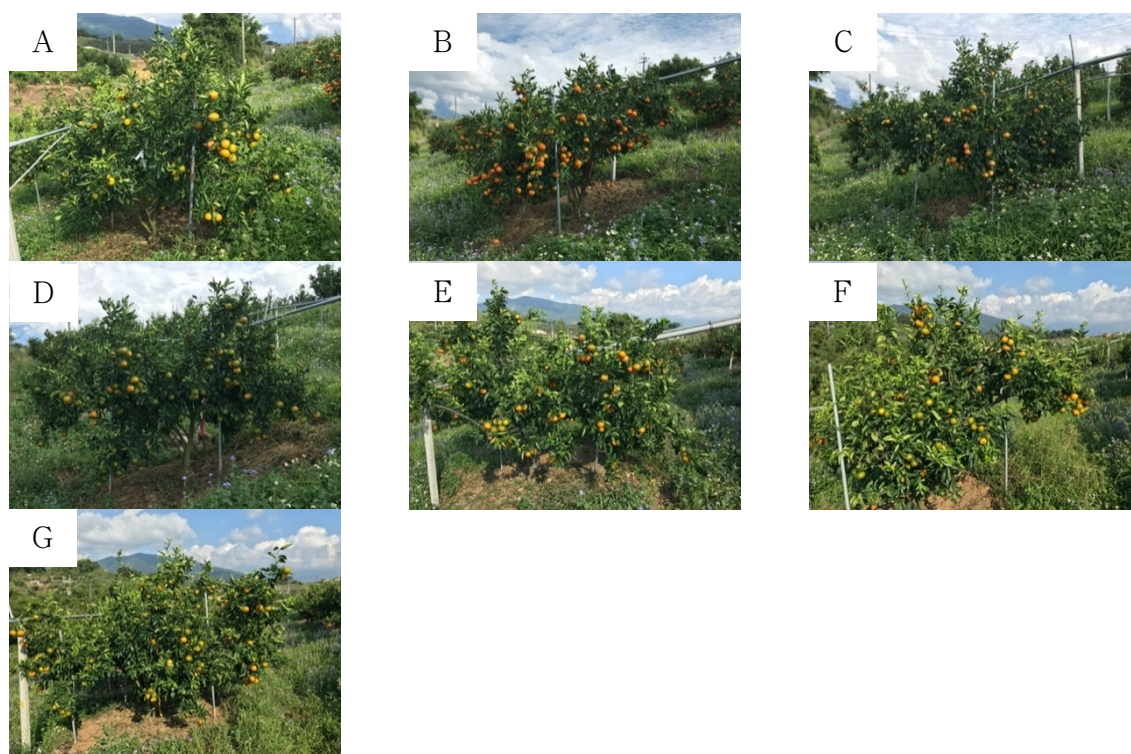


圖 3. 2018/10/20 田間果實轉色情況。(A)CK; (B)轉色前噴用 200 ppm; (C)轉色前噴用 100 ppm; (D)轉色前噴用 50 ppm; (E)1/3 轉色噴用 200 ppm; (F)1/3 轉色噴用 100 ppm; (G)1/3 轉色噴用 50 ppm。

Fig. 3. Fruit color on 2018/10/20 in field. (A)CK; (B)spray 200 ppm ethephon before color transform; (C)spray 100 ppm ethephon before color transform; (D)spray 50 ppm ethephon before color transform; (E)spray 200 ppm ethephon after 1/3 color transform; (F)spray 100 ppm ethephon after 1/3 color transform; (G)spray 50 ppm ethephon after 1/3 color transform.

表 1. 2018 年'佛利蒙'柑於不同轉色期噴用不同濃度益收生長素之果皮顏色調查。

Table 1. The peel color analysis of 'Fremont' mandarin by using different concentration of ethephon at different coloration in 2018.

處理 ^z	果皮顏色		
	L*	a*	b*
CK	53.2 ± 0.8a ^y	32.4 ± 1.0a	38.2 ± 1.7a
轉色前 200 ppm	53.9 ± 1.0a	30.1 ± 2.6a	40.7 ± 1.7a
100 ppm	52.0 ± 0.5a	32.7 ± 0.9a	37.3 ± 0.9a
50 ppm	52.9 ± 0.8a	31.5 ± 1.5a	38.0 ± 0.8a
1/3 轉色後 200 ppm	52.9 ± 0.9a	31.1 ± 0.5a	37.5 ± 1.2a
100 ppm	52.6 ± 0.9a	31.7 ± 1.8a	37.4 ± 1.3a
50 ppm	53.1 ± 1.4a	32.1 ± 0.5a	37.3 ± 1.3a

^z 於轉色前及 1/3 轉色後分別噴施 200、100、50 ppm 益收生長素

^y Mean ± standard deviation (n=5). Mean within each column followed by the same letters are not significantly different by Fisher's protected LSD test at 5% level.

表 2. 2018 年'佛利蒙'柑於不同轉色期噴用不同濃度益收生長素之果實品質調查。

Table 2. The qualities analysis of 'Fremont' mandarin by using different concentration of ethephon at different coloration in 2018.

處理 ^z	縱徑 (mm)	橫徑 (mm)	果實重 (g)	TSS (°Brix)	可滴定酸 (檸檬酸)(%)	售價 (元/台斤)
CK	55.5 ± 1.1a ^y	68.1 ± 2.4a	143.2 ± 10.8a	11.8 ± 0.3a	0.75 ± 0.02a	36.3
轉色前 200 ppm	54.8 ± 2.0a	66.3 ± 2.1a	131.9 ± 11.0a	10.0 ± 0.3c	0.78 ± 0.00a	44.2
100 ppm	53.8 ± 1.4a	68.7 ± 1.1a	144.4 ± 4.8a	11.4 ± 0.5ab	0.74 ± 0.02a	36.3
50 ppm	55.0 ± 1.6a	67.6 ± 1.6a	139.4 ± 8.1a	10.4 ± 0.7c	0.70 ± 0.03a	36.3
1/3 轉色後 200 ppm	58.1 ± 1.4a	68.9 ± 1.5a	149.3 ± 8.6a	11.1 ± 0.2b	0.69 ± 0.03a	36.3
100 ppm	54.5 ± 3.0a	66.1 ± 3.5a	131.8 ± 18.3a	11.2 ± 0.5b	0.72 ± 0.10a	36.3
50 ppm	54.5 ± 1.0a	68.0 ± 1.3a	137.9 ± 6.9a	11.1 ± 0.4b	0.76 ± 0.07a	36.3

^z 於轉色前及 1/3 轉色後分別噴施 200、100、50 ppm 益收生長素

^y Mean ± standard deviation (n=5). Mean within each column followed by the same letters are not significantly different by Fisher's protected LSD test at 5% level.

表 3. 2019 年'佛利蒙'柑於不同轉色期噴用不同濃度益收生長素之果皮顏色調查。

Table 3. The peel color analysis of 'Fremont' mandarin by using different concentration of ethephon at different coloration in 2019.

處理 ^z	果皮顏色		
	L*	a*	b*
CK	53.4 ± 1.8a ^y	30.8 ± 1.9a	41.7 ± 1.1a
600 ppm	54.5 ± 1.4a	29.7 ± 1.2a	42.0 ± 1.3a
400 ppm	53.7 ± 1.1a	29.5 ± 1.4a	49.6 ± 16.6a
200 ppm	55.3 ± 2.4a	28.5 ± 3.2a	45.4 ± 3.1a

^z 於轉色前噴施 200、400、600 ppm 益收生長素^y Mean ± standard deviation (n=5). Mean within each column followed by the same letters are not significantly different by Fisher's protected LSD test at 5% level.

表 4. 2019 年'佛利蒙'柑於不同轉色期噴用不同濃度益收生長素之果實品質調查。

Table 4. The qualities analysis of 'Fremont' mandarin by using different concentration of ethephon at different coloration in 2019.

處理 ^z	果實重(g)	縱徑(mm)	橫徑(mm)	TSS(°Brix)	可滴定酸 (以檸檬酸表示)(%)	落葉率 (%)
CK	135.7 ± 10.6a	56.3 ± 1.5a	67.3 ± 2.3a	12.1 ± 0.4a	0.79 ± 0.040a	8.0 ± 3.8c
600 ppm	139.5 ± 44.9a	53.8 ± 1.3b	64.6 ± 1.1a	11.1 ± 0.1b	0.82 ± 0.017a	32.0 ± 3.8b
400 ppm	122.8 ± 6.9a	53.4 ± 1.4b	65.8 ± 1.4a	11.0 ± 0.3b	0.77 ± 0.019a	71.3 ± 1.8a
200 ppm	127.3 ± 5.9a	54.1 ± 1.1b	66.4 ± 0.9a	11.8 ± 0.5a	0.79 ± 0.030a	72.7 ± 2.8a

^z 於轉色前噴施 600、400、200 ppm 益收生長素^y Mean ± standard deviation (n=5). Mean within each column followed by the same letters are not significantly different by Fisher's protected LSD test at 5% level.

2019 年調查發現轉色前施用 600 ppm 及 400 ppm 益收生長素比 200 ppm 處理更早達商業價值，顯示當益收濃度提高可加速果皮轉色。這與梨及芒果的趨勢相同，梨的研究中益收生長素濃度 1500 ppm 的處理較 500 ppm 處理果皮轉色速度較快 (Dhillon and

Mahajan, 2011), 'Neelum' 芒果在浸泡高濃度益收生長素後較低濃度處理早進行轉色 (Lavanya, 2019), 而提高益收生長素導致轉色提早, 這歸因於乙烯的增加導致葉綠素分解酶及葉綠素過氧化酶活性上升, 使葉綠素降解快速 (Whale et al., 2008), 而乙烯是來自於益收生長素的分解所產生。

已知乙烯是由益收生長素分解所生成, 而益收生長素會受到外在環境溫度影響其作用的效果, 在橄欖中利用益收生長素可提升採收效率, 但在環境溫度較高的地區並無此效果 (Klein et al., 1978), 推測益收生長素在高溫下可快速分解成乙烯 (Biddle et al., 1976), 而乙烯為一氣態植物賀爾蒙, 在空氣中會快速揮散, 而無法作用於果實中。然柑橘利用乙烯或乙烯類似物進行催色雖在國外已推廣許久, 而施用濃度會因品種、催色溫度及預期轉色時間而有所不同。

許多研究指出柑橘類在 20~30°C 有最佳的催色效果 (Eaks, 1977; Cohen, 1978b; Barmore et al., 1976; Mayuoni and Porat, 2011), 如: 極柑、'Navel' 及 'Shamouti' 在 25°C 葉綠素降解及類胡蘿蔔素生成的能力最佳 (劉, 2007; Aharoni et al., 1973; Cohen, 1978b), 'Eureka' 檸檬於不同溫度下以 5 ppm 乙烯進行催色, 結果顯示於 30°C 之處理較以 25°C 快完成轉色 (林, 2015), 然本試驗中自施用益收至採收的平均溫度均在 20~30°C 內 (第一年: 21.7°C; 第二年: 23.6°C), 因此證實本試驗中果實轉色主要是受到益收濃度及施用時期影響。

利用益收生長素可促進果實成熟與果皮轉色, 但卻也產生其他附加的作用, 如: 植株落葉、落果及果實品質改變等。極柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 及 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 的研究中發現噴施益收生長素的植株會有落葉的現象, 且極柑植株的落葉率會隨著施用濃度的提高而增加, 而造成 'Hamlin' 落葉除了施用益收生長素外與施用時環境溫度有關, 結果顯示 'Hamlin' 施用益收生長素後溫度高於 21°C 以上時落葉加劇, 除了落葉外也伴隨著落果的問題 (陳, 2013; 陳, 2015; Yuan and Burns, 2004), 而此現象在兔眼藍莓 'Tifblue' 中也有所發現, 'Tifblue' 施用益收後落果率會逐漸增加 (Ban et al., 2007), 在本試驗中僅發現落葉問題, 尤在第二年的試驗中以濃度 400 ppm 以上之益收噴施 '佛利蒙' 柑發現, 果實可更快完成轉色但落葉率高達 70% 以上。

施用益收導致果實品質如: 硬度、酸度、糖度等發生改變在許多作物中皆有所發現, 在 'Tifblue' 藍莓、'Patharnakh' 梨及 'Cripp's Pink' 蘋果的研究中顯示施用益收生長素導致果實硬度的下降, 此現象歸因於藍莓、梨及蘋果皆是更年性果實施用益收生長素後導致乙烯含量的增加, 而促使果實內細胞老化 (Ban et al., 2007; Whale et al., 2008; Dhillon and Mahajan, 2011), 但在果實 TSS 會有上升的現象, 而 'Clemenules' 寬皮柑試驗中指出, 果實 TSS 會因施用乙烯的時機有所不同, 當果皮呈黃綠色時施用乙烯果實內 TSS 會提高 (Sdiri, 2012), 但極柑在施用 400 ppm 益收生長素 + 300 ppm NAA 後調查發現果實 TSS 顯著低於對照組, 而酸度則反之。

本試驗中不論在轉色前或 1/3 轉色後搭配不同濃度下施用益收生長素皆不影響其重量、縱徑及橫徑，因果實大小取決於開花時砂瓢數的多寡所決定，砂瓢數越多則成為大果的趨勢越高 (林, 2013)，兩年的試驗中顯示果實在高濃度 (200 ppm 以上) 的處理下較快達商業價值，但果實之 TSS 隨著益收生長素使用濃度的上升而下降，這與藍莓等作物施用益收生長素趨勢皆不相同，推測是因為益收生長素產生乙烯加速果實轉色，而綠色果皮中的葉綠體可進行光合作用，並最終有助於水果的生長，發育和品質 (Hetherington *et al.*, 1998; Klee, 2010)，而加速果實轉色導致果實光合作用減緩，影響糖類合成，然果實內部細胞發育可能不會因此受到影響 (Mayuoni, 2011)。

氮、磷、鉀為植物中重要的營養素，其中鉀肥又稱為果肥，可用於改善果實產量與品質，但隨著鉀肥的不同會對果實所產生的效果也不相同，如：文旦中利用硫酸鉀有較高的糖度，而施用硝酸鉀的處理中果皮有較厚的厚度，施用氯化鉀果實有較高的酸度 (江, 1998)，因此欲利用鉀肥提升施用益收後果實 TSS 需慎選鉀肥的種類進行施用。

2019 年試驗中以 600 ppm 及 400 ppm 處理的果實有果蒂脫落現象 (數據未顯示)，此現象在椪柑、檸檬、柳橙、櫻桃及橄欖皆有發現 (陳, 2015; Flore and Bukovac, 1982; Olien and Bukovac, 1978; Denny and Martin, 1994)，推測因為施用益收生長素產生乙烯導致果蒂細胞老化而脫落 (劉, 2007)，而櫻桃及橄欖施用益收生長素目的在於使果蒂產生離層脫落以方便果實採收，但柑橘是為達較佳的果皮顏色提升商品價值，然果蒂脫落卻造成商品價值下降，因此使用濃度需再經考量。

參 考 文 獻

- 林宗翰。2015。乙烯催色與貯藏溫度對'Eureka'檸檬果實轉色及品質之影響。中興大學園藝學系所學位論文。105pp。
- 林詠洲、陳邦華、蔡雲鵬。2013。柑橘生長與栽培管理。農業試驗所特刊 175: 23-28。
- 陳盟松。2013。不同藥劑處理對椪柑果實催色之影響。臺中區農業改良場特刊 87-93。
- 陳盟松。2015。利用益收生長素促進椪柑提早轉色技術。臺中區農業改良場特刊 113-118。
- 劉富文、黃祐慈、梁穎芝。2007。椪柑用乙烯催色之效果與方法。臺灣園藝 53(4): 395-407。
- 江國忠。1998。不同鉀肥種類與其施用量對文旦柚品質及產量之影響。花蓮區農業改良場研究彙報 15: 30-37。
- 黃阿賢、陳祈男。2012。台灣中北部有潛力的柑橘新興品種。苗栗區農業專訊 58: 10-14。
- Aharoni, Y., F. S. Lattar, and S. Angel. 1973. Peel color of oranges treated with ethylene before vs after waxing. HortScience 8: 58.
- Ahrens, M. J. and C. R. Barmore. 1986. Interactive effects of temperature and ethylene concentration on postharvest color development in citrus. Acta Hort. 201: 21-27.

- Ban, T., M. Kugishima, T. Ogata, S. Shiozaki, S. Horiuchi, and H. Ueda. 2007. Effect of ethephon (2-Chloroethylphosphonic acid) on fruit ripening characters of rabbiteye blueberry. *Sci. Hortic.* 112: 278-281.
- Barmore, C. R., T. A. Wheaton, and A. A. McCornak. 1976. Ethylene degreening of 'Bearss' lemons. *HortScience* 11(6): 588-590.
- Barry, C. S. and J. Giovannoni. 2007. Ethylene and fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26: 143-159.
- Biddle, E., D. G. Kerfoot, Y. H. Kho, and K. E. Russell. 1976. Kinetic studies of the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonic acid in aqueous solution. *Plant Physiol.* 58(5): 700-702.
- Cohen, E. 1978a. Ethylene concentration and duration of the degreening process in Shamouti orange fruit. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 53: 139-142.
- Cohen, E. 1978b. The effect of temperature and relative humidity during degreening on the coloring of Shamouti orange fruit. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 53: 143-146.
- Davies, F. S, W. C. Cooper, and R. E. Holm. 1976. The effect of four abscission chemicals on orange fruit and leaf ethylene production. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 101: 651-653.
- Denney, J. O. and G. C. Martin. 1994. Ethephon tissue penetration and harvest effectiveness in olive as a function of solution pH, application time, and BA or NAA addition. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119: 1185-1192.
- Denny, F. E. 1924. Hastening the coloration of lemons. *J. Agric. Res.* 27: 757-769.
- Dhillon, W. S. and B. V. C. Mahajan. 2011. Ethylene and ethephon induced fruit ripening in pear. *J. Stored Prod. Postharvest Res.* 2(3): 45-51.
- Eaks, I. L. 1970. Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene of citrus fruit during ontogeny. *Plant Physiol.* 45: 334-338.
- Eaks, I. L. 1977. Physiology of degreening summary and discussion of related topics. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 223-226.
- Flore, J. A. and M. J. Bukovac. 1982. Factors influencing absorption of ¹⁴C (2-chloroethyl) phosphonic acid by leaves of cherry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107: 965-968.
- Grierson, W. and W. F. Newhall. 1960. Degreening of Florida citrus fruits. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull.* 620: 5-80.
- Harpaz-Saad, S., T. Azoulay, T. Arazi, E. B. Yaakov, A. Mett, Y. M. Shibolet, S. Hertensteiner, D. Gidoni, A. G. On, E. E. Goldschmidt, and Y. Eyal. 2007. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *Plant Cell* 19: 1007-1022.

- Hetherington, S. E., R. M. Smillie, and W. J. Davies. 1998. Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato. *J. Exp. Bot.* 49: 1173-1181.
- Jacob-Wilk, D., D. Holland, E. E. Goldschmidt, J. Riov, and Y. Eyal. 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.* 20: 653-661.
- Kender, W. J., U. Hartmond, R. Yuan, L. Pozo, and A. Grant. 2000. Factors influencing the effectiveness of ethephon as a citrus fruit abscission agent. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 113: 88-92.
- Klee, H. J. 2010. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytol.* 187: 44-56.
- Kossuth, S. V. and R. H. Biggs. 1977. Fruit removal force, cellulase, and ethylene production in Release and ethephon-treated oranges. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102: 609-612.
- Lavanya, E. K., D. B. Rao, L. Edukondalu, R. Lakshmi, and V. S. Rao. 2019. Effect of ethephon and storage temperature on physico-chemical changes during ripening of Mango (*Mangifera indica* L.) Cv. Neelum. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 1-11.
- Lelievre, J. M., A. Latche, A. Jones, M. Bouzayen, and J. C. Pech. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 101: 727-739.
- Mayuoni, L. and R. Porat. 2011. Postharvest treatments for degreening of 'Villa franca' lemons. *Hort. Technology* 21(5): 624-627.
- Mayuoni, L., Z. Tietel, B. S. Patil, and R. Porat. 2011. Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit? *Postharvest Biol. Technol.* 62: 50-58.
- Olien, W. C. and M. J. Bukovac. 1978. The effect of temperature on rate of ethylene evolution from ethephon and from ethephon-treated leaves of sour cherry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107:965-968.
- Porat, R. 2008. Degreening of citrus fruit. *Tree For. Sci. Biotech.* 2: 71-76.
- Purvis, A. C. and C. R. Barmore. 1981. Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus fruit. *Plant Physiol.* 68: 854-856.
- Rodrigo, M. J. and L. Zacarias. 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthesis genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 43: 14-22.
- Saure, M. C. 1990. External control of anthocyanin formation in apple. *Sci. Hortic.* 42: 181-218.
- Sdiri, S., P. Navarro, A. Mnterde, J. Beabda, and A. Salvador. 2012. New degreening treatments to improve the quality of citrus fruit combining different periods with and without ethylene exposure. *Postharvest Biol. Technol.* 63: 25-32.

- Shemer, T. A., S. Harpaz-Saad, E. Belausov, N. Lovat, O. Krokhin, V. Spicer, K. G. Standing, E. E. Goldschmidt, and Y. Eyal. 2008. Citrus chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: a study of chlorophyllase expression, post- translational processing kinetics, and in situ intracellular localization. *Plant Physiol.* 148: 108-118.
- Sievers, A. F. and R. H. True. 1912. A preliminary study of the forced curing of lemons as practiced in California. *USDA Bulletin* 232: 1-38.
- Stewart, I. and T. A. Wheaton. 1972. Carotenoids in citrus: their accumulation induced by ethylene. *J. Agric. Food Chem.* 20: 448-449.
- Stover, E., M. J. Fargione, C. B. Watkins, and K. A. Iungerman. 2003. Harvest management of 'Marshall McIntosh' apples: Effects of AVG, NAA, ethephon, and summer pruning on preharvest drop and fruit quality. *HortScience* 38: 1093-1099.
- Todorov, D. T., E. N. Karanov, A. R. Smith, and M. A. Hall. 2003. Chlorophyllase activity and chlorophyll content in wild and mutant plants of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia plantarum.* 46(1): 125-127.
- Wang, Z. and D. R. Dilley. 2001. Aminoethoxyvinylglycine, combined with ethephon, can enhance red color development without over-ripening apple. *HortScience* 36(2): 328-331.
- Whale, S. K., Z. Singh, M. H. Behboundian, J. Janes, and S. S. Dhaliwal. 2008. Fruit quality in 'Cripp's Pink' apple, especially colour, as affected by preharvest sprays of aminoethoxyvinylglycine and ethephon. *Sci. Hortic.* 115: 342-351.
- Yuan, R. and J. K. Burns. 2004. Temperature factor affecting the abscission response of mature fruit and leaves to CMN-pyrazole and ethephon in 'Hamlin' oranges. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129(3): 287-293.

Effects of Ethephon on Fruit Degreening of 'Fremont' Mandarin (*Citrus clementina* x *Citrus reticulata*)

Pao-Liang Wu¹⁾ Jer-Chia Chang²⁾

Key words: Ethepon, 'Fremont' Mandarin, Degreening, Occasion

Summary

Citrus (*Citrus* spp.) is one of the most common species fruit tree in Taiwan. 'Fremont' (*C. clementina* x *C. reticulata*) is an early-harvest cultivar. These citrus fruits are typically sold with poor color; in northern Taiwan, the price of 'Fremont' decreases once harvesting begins. This study aimed to determine the feasibility of using ethephon for degreening of 'Fremont' fruit in the field. We use 7-year-old open-field-grown 'Fremont' citrus field-grown plants between September 2018 and March 2020 in Juolan, Miaoli, Taiwan, as field materials. This study was divided into two parts: 1) using low concentrations of ethephon at different color phases (control treatment; 50, 100, and 200 ppm ethephon before color transformation; and 50, 100, and 200 ppm ethephon after 1/3 color transformation), 2) using higher concentrations of ethephon (control treatment and 200, 400, and 600 ppm ethephon before color transformation). The results showed that fruits treated with 200 ppm ethephon before color transformation ripened significantly earlier than other treatments, but these fruits' TSS contents were lower than those of the fruits in the control group (200 ppm ethephon before color transformation: 10.0 ± 0.3 ; control group: 11.8 ± 0.3). Moreover, the price of fruit treated with 200 ppm ethephon before the color change was the best. This price difference was due to differences in color; the application of 200 ppm ethephon treatment yielded bright red fruit at a time when the market mostly consisted of poorly colored fruit. The results of using high concentrations of ethephon (400 and 600 ppm) in the following year showed that although these fruits turned color earlier than with treatment of 200 ppm, they also displayed a higher leaf drop (70-77%). The fruits treated with 400 and 600 ppm also displayed both smaller diameters and smaller TSS contents. Furthermore, their flowers bloomed later in the year. Therefore, we can deduce that it is feasible to use ethephon for the degreening of 'Fremont' fruits, but close attention should be paid to the concentration of ethephon applied, and lower tree vigor should be expected.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

Effects of *Piper betel* Leaf Powder on Tomato Seedling Emergence, Seedling Growth and *Pythium* Mycelial Growth

Karun Jamcharoensup¹⁾ San-Gwang Hwang²⁾ Huey-Ling Lin³⁾

Key words: *Piper betel*, *Pythium*, Tomato

Summary

This study investigated the most optimal mixing ratio of *Piper betle* leaf powder when mixed with peat moss for tomato seedling growth and inhibition of tomato *Pythium* mycelial growth. *Piper betel* leaves were collected from Horticulture Research Station, College of Agriculture and Natural Resources, National Chung Hsing University. *Piper betel* leaf powder and peat moss were mixed in ratio of 0%, 1.25%, 2.5% and 5% (ml/ml), respectively to test its effect on tomato seedling emergence rate and growth. Our results showed that growth substrates containing 5% and 2.5% of *Piper betle* leaf powder decrease seedling emergence rate. Seedling emergence rate was not significantly different between treatment with 1.25% and 0% *Piper betle* leaf powder. *Pythium* was inoculated in potato dextrose agar (PDA) that treated with 0%, 0.1%, 0.5%, and 1% *Piper betel* leaf powder, respectively to determine its mycelial growth. Results from this study indicated that mycelial growth of *Pythium* was most inhibited on PDA treated with 1% of *Piper betle* powder with a mycelial growth rate of 0.39 mm/hr and a mycelial growth inhibition rate of 78% after 48 hr of inoculation. *Pythium*-infested peat moss was mixed with *Piper betel* leaf powder at mixing ratios of 0%, 0.1%, 0.5%, and 1% (ml/ml), respectively. Our results demonstrated that the highest seedling emergence rate, plant height and root length were recorded at the mixing ratio of 0.5% compared to those of 0%, 0.1% and 1%. Taken together, results from this study suggested that peat moss containing 0.5% *Piper betle* leaf powder may reduce the inhibitory effects of tomato *Pythium* on tomato seedling growth.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

Introduction

Piper betle belongs to the family *Piperaceae* and is normally named as Phlu in Thai, Sirih in both Malaysian and Indonesian, Paan in both Indian and Bangladesh and Betle in English (Mahfuzul *et al.*, 2011). *Piper betle* has more than 700 species around the world. They were found around Asia and East African countries (Sripradha, 2014).

Piper betle is normally used as an oral medicine by wrapping with betle nut for oral hygiene. The *betle* powder is treated as herb medicine on symptom and disease such as carminative, aphrodisiac, stimulant, analgesic and cooling properties, antiseptic, wound healing, anti-parasitic, antifungal, and antibacterial agent (Caburian and Osi, 2010). The leaf is also useful for the treatment of various diseases such as bad breath, boils, and abscesses, ulcers, conjunctivitis, constipation, headache, hysteria, itches, mastitis, mastoiditis, leucorrhoea, catarrh, diphtheria, ringworm, swelling of gum, rheumatism, abrasion, cuts, and injuries (Chopra *et al.*, 1956, Jayaweera, 1982).

Fungal disease often causes tremendous decrease in crop yield and fungal pathogens may remain in soil after harvest. Agriculturist encounters a huge problem when they find incidence of fungal infection in the field. Crude extracts of *Piper betle* were previously reported to have antibacterial and antifungal activities (Bissa *et al.* 2007; Nair and Chanda 2008). However, the effect of leaf powders derived from *Piper betle* on plant pathogenic fungi remains largely unknown. There is a possibility that leaf powders of *Piper betle* may be used as an alternative to suppress fungal disease in the field and to improve farmers' income. Therefore, this study aims to find the most suitable mixing ratio of *Piper betle* leaf powder mixed with peat moss, to observe the effect of *Piper betle* leaf powder on *Pythium* mycelial growth, and to test the potential of using *Piper betle* leaf powder containing peat moss as an antifungal agent to reduce the inhibitory effect of *Pythium* on tomato seedling growth.

Materials and Methods

1. Plans materials

Piper betle leaves were collected from Horticulture Research Station, College of Agriculture and Natural Resource, National Chung Hsing University. *Piper betle* leaves were incubated in 45 °C until water was eliminated. Dry *piper betle* leaves were then ground to powder by a grinding machine and stored at 1°C

2. Evaluation of tomato seedling emergence rate and seedling growth

Growth substrates for tomato seedling emergence rate and seedling growth tests were prepared by mixing peat moss with four different proportions of *piper betle* leaf powder with final concentrations of 0%, 1.25%, 2.5% and 5% (ml/ml), respectively. Tomato seeds were planted on the above-mentioned mixed substrates. Tomato seedling emergence rate, plant height and root length were measured one week after planting.

3. Preparation of *Piper betle* leaf powder-containing PDA

Two hundred grams of unpeeled potato was cut into small cubes, mixed with one liter of distill water and boiled for 30 minutes, then filtered through cheesecloth. The effluent was saved as potato infusion.

One liter of potato infusion was mixed with 20 g sucrose and 20 g agar, then incubated in autoclave at 121 °C for 15 minutes. Potatoes dextrose agar (PDA) was treated with 4 different proportions of *Piper betle* leaf powder at final concentrations of 0%, 0.1%, 0.5% and 1%, respectively by dilution and dispensing into petri dishes.

4. Measurement of *Pythium* mycelial growth

Pythium was obtained from the Department of Horticulture, Naitonal Chung Hsing University. The pathogenic fungus was sampled by cutting from the margin of an actively growing fungal culture and put on the above-mentioned PDA media. *Pythium* mycelial growth was defermined daily by measuring the diameter of the fungal colony until mycelium spread throughout the plate.

5. Preparation of *Pythium*-infested and *Piper betle* leaf powder-containing peat moss for measurement of tomato seedling emergence rate and seedling growth tests

One-kilogram peat moss was added with 200 ml distill water in a sterile plastic bag and then autoclaved for sterilization. After the temperature of the peat moss decreased, the sterile peat moss was infested with *Pythium*.

Pythium-infested peat moss was mixed with 4 different proportions of *Piper betle* leaf powder with final concentrations of 0%, 0.1%, 0.5% and 1% (ml/ml), respectively then incubated at 25± 2 °C for 1 week. After that, tomato seeds were planted in the growth substrate. Seedling emergence rate, plant height and root length were recorded two weeks after planting.

6. Statistical analysis

The statistical analysis was performed by using SAS 9.0 (Institute Inc., 2000) and the data was subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) for a completely randomized design (CRD) statistical model. Mean values among treatments were compared by least significant difference (LSD) range test at the 5% ($p \leq 0.05$) level of significance.

Results

Our results showed that treatment with 2.5% *Piper betle* leaf powder has the lowest seedling emergence rate and treatment with 1.25% *Piper betle* leaf powder has the highest seedling emergence rate. In addition, no significant difference in plant height was noticed among all treatments. On the other hand, root length is similar between treatment with 1.25% *Piper betle* leaf powder and the control (0%) and a significant reduction in the root length was recorded in treatment with 2.5% and 5% *Piper betle* leaf powder (Table 1). Taken together, peat moss containing 1.25% *Piper betle* leaf powder may be used as a suitable growth substrate for tomato seedling growth.

Results from mycelial growth analysis indicated that mycelial growth of *Pythium* spp. on PDA containing 1% *Piper betle* leaf powder was minimal with a colony diameter of 18.9 mm after 48 hours of inoculation and a mycelial growth rate of 0.39 mm/hr (Table 2).

After 48 hr of inoculation, the inhibition rate of *Pythium* mycelial growth was maximal with a value of 78% on PDA containing 1% of *Piper betle* leaf powder compared to that of 0%, 0.1% and 0.5 % (Table 3, Fig. 1).

Tomato seedlings cultivated in *Pythium*-infested peat moss containing 0.5% and 1% *Piper betle* leaf powder showed higher seedling emergence rate, plant height and root length compared to that of 0 and 0.1%. Treatment with 0.5% *Piper betle* leaf powder had significantly higher root length compared to that of 1%, however, no significant difference on plant height was observed. Treatment with 0.1% of *Piper betle* leaf powder had significantly lower plant height and root

Table 1. Effect of *Piper betle* leaf powder on seedling emergence rate and seedling growth of tomato cultivated in peat moss for one week.

Treatment	Emergence Rate (%)	Plant Height (cm.)	Root Length (cm.)
0%	87.0	3.3±0.3A ^z	5.5±0.5A
1.25%	98.2	3.5±0.1A	5.5±0.2A
2.50%	77.8	3.1±1.0A	3.7±0.4B
5%	87.0	2.6±0.3A	2.9±0.4B

^zValues with different letters in the same column are not significantly different at $P < 0.05$ by LSD test.

Table 2. Effect of *Piper betle* leaf powder on mycelial growth of *Pythium* spp.

Treatment	Colony Diameter (mm)			Mycelial ^y Growth Rate (mm/hr)
	24 ^z	48	72	
0%	63.7A ^x	85A	85A	1.77A
0.1%	62.1B	85A	85A	1.77A
0.5%	40.6C	85A	85A	1.77A
1%	0D	18.9B	18.9B	0.39B

^z Representing the time period (hr) during *Pythium* inoculation.

^y Mycelial growth rate was calculated by using the colony diameter (mm) when it first reaches the maximum value divided by the time period (hr) during inoculation.

^x Values with different letters in the same column are not significantly different at $P < 0.05$ by LSD test.

Table 3. Inhibitory effect of *Piper betle* leaf powder on mycelial growth of *Pythium* spp..

Treatment	Inhibition Rate of Mycelial Growth (%) ^z
0%	0B ^y
0.1%	0B
0.5%	0B
1%	78A

^z Inhibition rate of mycelial growth (%) = (colony diameter of the control (0%) – colony diameter of the treatment) / colony diameter of the control x 100

^y Values with different letters in the same column are not significantly different at $P < 0.05$ by LSD test.

Data are collected and calculated 48 hr after inoculation.

length compared to that of 0%, 0.5% and 1%. Treatment with 0.5% *Piper betle* leaf powder displayed the highest seedling emergence rate with a value of 79.63%, follow by 1%, 0% and 0.1% with values of 70.37%, 40.74%, and 22.22%, respectively (Table 4). Overall, these results suggested that peat moss containing 0.5% *Piper betle* leaf powder has the potential to be considered as a suitable growth substrate for tomato seedling growth against tomato *Pythium* infection.

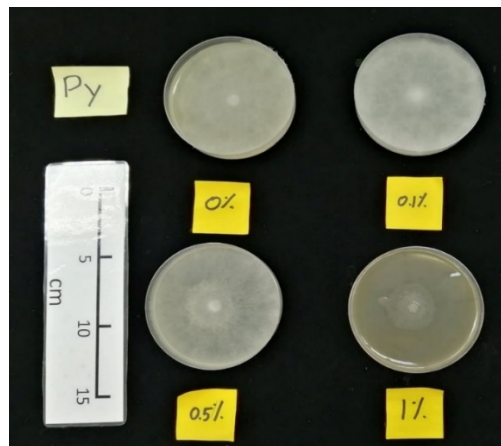


Fig. 1. Mycelial growth of *Pythium* spp. on PDA containing different proportions of *Piper betle* leaf powder. The picture was taken 72 hours after inoculation.

Table 4. Effect of *Piper betle* leaf powder on seedling emergence rate and seedling growth of tomato cultivated in *Pythium*-infested peat moss for two weeks.

Treatment	Emergence Rate (%)	Plant Height (cm.)	Root Length (cm.)
0%	40.74	1.27±0.2B ^z	2.12±0.4C
0.1%	22.22	0.61±0.1C	0.81±0.2D
0.5%	79.63	2.58±0.2A	3.90±0.3A
1%	70.37	2.43±0.2A	3.16±0.3B

^zValues with different letters in the same column are not significantly different at $P < 0.05$ by LSD test.

Discussion

Singha *et al.* (2011) reported that tomato plants cultivated in soil containing 0% and 1% chloroform extract of *Piper betle* demonstrate no significant difference in plant height and root length. This report is consistent with our results in which peat moss treated with 0% and 1.25% *Piper betle* leaf powder showed no significant difference in plant height and root length (Table 1). Nevertheless, treatment with 1.25% *Piper betle* leaf powder had the highest seedling emergence rate one week after planting among all treatments tested (Table 1) and may be suitable for tomato seedling growth.

On the other hand, results from PDA test indicated that treatment with 1% *Piper betle* leaf powder displays the highest inhibition rate of mycelial growth in *Pythium* (Tables 2, 3 and Fig. 1). These results were similar to Singha *et al.* (2010) who reported that petroleum ether, chloroform and methanol extract of *Piper betle* may inhibit mycelial growth in *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Curvularia sp.* Future research may involve various extraction methods of *Piper betle* to evaluate its inhibitory effect on mycelial growth of different fungal species.

In addition, growth analysis of tomato seedlings cultivated in *Pythium*-infested peat moss treated with different proportions of *Piper betle* leaf powder showed that treatment with 0.5% and 1% *Piper betle* leaf powder, especially 0.5%, have higher seedling emergence rate and seedling growth compared to 0% and 0.1% (Table 4). These results were closely related to the findings of Singha *et al.* (2011) who revealed that tomato cultivated in *Fusarium*-infested soil containing 1% or 2% chloroform extract of *Piper betle* has significant higher plant height and root length compared to *Fusarium*-infested soil without chloroform extract of *Piper betle*.

Taken together, our results suggested the potential of mixing *Piper betle* leaf powder with peat moss for fungal inhibition during tomato seedling growth. These results may be applied to other vegetables, however, suitable mixing ratio of *Piper betle* leaf powder should be tested. Although the use of *Piper betle* may be considered to be an alternative way to inhibit the mycelial growth of various fungal pathogens, further research should involve more growth substrates and various extraction methods of *Piper betle*.

References

- Bissa, S., D. Songara, and A. Bohra. 2007. Traditions in oral hygiene: chewing of betle (*Piper betle* L.) powder. *Curr. Science*. 92: 26–28.

- Caburian, A. B. and M. O. Osi. 2010. Characterization and evaluation of antimicrobial activity of the essential oil from the powder of *Piper betle* L. Int. Sci. Res. J. 2: 1-13.
- Jayaweera, D. M. A., 1982. Medicinal plants (Indigenous and Exotic) Used in Ceylon, J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka. 52-53.
- Mahfuzul, H., R. Shemona, S. M Asaduzzaman, M. L. Bari., Y. Inatsu, S. Kawamoto. 2011. Antibacterial activity of ethanol extract of betle leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. Bangladesh. J. Microbiol. 28(2): 58-63.
- Nair, R. and S. Chanda. 2008. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betle* leaf extract. Indian. J. Pharm. Sci. 70: 390-393.
- Singha, I. M., Y. Kakoty, B. G. Unni, M. C. Kalita, J. Das *et al.* 2011. Control of Fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: A preliminary study. World. J. Microbiol. Biotechnol. 27: 2583-2589.
- Singh M, S. Shukla, V. K. Soni, A. Dangi, N. Kumar, and S. M. Bhattacharya. 2009. The n-hexane and chloroform fractions of *Piper betle* L., trigger different arms of immune responses in BALB/c mice and exhibit antifilarial activity against human lymphatic filarid *Brugia malayi*. Int. Immunopharmacol. 9: 716-728.
- Sripradha, S. 2014. Betel leaf - The green gold. Int. J. Pharm. Sci. Res. 6: 36-37.

茛菪葉片粉末對番茄幼苗出土率、幼苗生長 及腐霉菌菌絲生長之影響

吳 建 才¹⁾ 黃 三 光²⁾ 林 慧 玲³⁾

關鍵字：茛菪、番茄、腐霉菌

摘要：本實驗探討在泥炭土中拌入茛菪葉片粉末對番茄幼苗生長及抑制番茄腐霉菌菌絲生長之最適混合比例。從國立中興大學農資學院園藝試驗場採集茛菪葉片乾燥製成粉末後和泥炭土混合，分別配製含 0%、1.25%、2.5%和 5% 茛菪葉片粉末之混合介質，用於測試番茄的幼苗出土率及生長。結果顯示，含 5% 和 2.5% 茛菪粉末的介質會降低幼苗出土率。幼苗出土率在含 1.25% 的茛菪粉末和不含茛菪粉末的處理組間相比並無顯著差異。腐霉菌分別接種於含 0%，0.1%，0.5% 和 1% 茛菪粉末之 PDA 中測量菌絲生長狀況。結果顯示，經過 48 小時，在含 1% 茛菪粉末之 PDA 中有最佳之腐霉菌菌絲生長抑制率，其菌絲生長速率為 0.39 mm/hr，生長抑制率為 78%。將腐霉菌接種於混入不同比例茛菪粉末的泥炭土裡，混合比例分別為 0%，0.1%，0.5% 及 1% (ml/ml)。結果顯示，與 0%，0.1% 及 1% 相比，含 0.5% 茛菪粉末的介質具有最高之幼苗出土率，株高及根長。因此，實驗結果顯示含 0.5% 茛菪粉末之泥炭土可減少腐霉菌對番茄幼苗生長之抑制作用。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
2) 國立中興大學園藝學系副教授。
3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

介質添加木黴菌對草莓生長之影響

尤 品 人¹⁾ 黃 政 華²⁾ 黃 三 光³⁾

關鍵字：草莓、木黴菌、介質

摘要：本研究主要探討介質添加木黴菌(T)對草莓生長之影響。草莓於不同生長介質之栽培試驗結果顯示，B 介質栽種前、後之 pH 值均為各處理組中最高，分別為 7.38 及 7.65，而 CK 則均為最低，分別為 5.20 及 5.37；在生長性狀上，以 CK、A 及 E 介質所栽種草莓之生長性狀較佳，大多優於 B 介質栽種之草莓植株且顯著優於 C 及 D 介質栽種之草莓植株；植株營養元素分析之結果顯示，所有處理組之植株氮及部分處理組之磷、鈣與銅元素濃度低於理想範圍，鎂、錳、鋅及鐵元素濃度則均於適量範圍內，鉀元素濃度以 CK、CKT、D 及 DT 高於適量之濃度範圍。於相同介質中，有無添加木黴菌(T)對草莓之生長性狀多無顯著之影響。可能與供試介質中該木黴菌菌株密度過低有關。綜合上述，草莓以 CK、A 及 E 介質栽培之生長性狀較佳，而如何提升木黴菌促進草莓生長之效應仍需進一步研究。

前 言

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duchesne) 為薔薇科草莓屬，為多年生草本植物，由北美洲之維吉尼亞草莓(*F. virginiana*)及南美洲智利的智利草莓 (*F. chiloensis*)雜交育種而得，是現在草莓的主流品種 (Bringhurst, 1990; Edger *et al.*, 2019)。草莓為台灣冬春季栽培之高經濟作物，於各縣市皆有生產，以苗栗縣為主要產區，目前我國栽種面積約 489 公頃，總產量約 8743 公噸 (農業統計年報，2020)。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生

2) 國立中興大學土壤環境學系副教授，第二及共同通訊作者

3) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者

使用土壤生產草莓時通常會在種植前對土壤進行燻蒸處理，使用溴化甲烷和氯仿之化合物燻蒸，以防治土壤傳播之病害及病原體 (Chamorro *et al.*, 2015; Kokalis-Burelle, 2003; Larson and Shaw, 1996)。然而，溴化甲烷等燻蒸劑可危害環境及人類健康，且燻蒸劑的使用規定日益嚴格，導致田間土壤生產的草莓因缺乏有效的土壤傳播病害及病原體控制方法而面臨嚴峻的挑戰。使用無土介質為取代田間土壤栽培草莓的潛在替代方法 (Wang *et al.*, 2016)，以無土介質栽培草莓的產量較使用傳統土耕栽培者為高，且無土栽培較有利於病蟲害之管理及可更有效的利用勞動力；在無土栽培中，影響草莓產量的主要因素可能為：栽培介質種類、品種、栽培之密度以及施肥的效率 (Adak *et al.*, 2018)。在草莓育苗方面，農友大多會自行調配介質，若介質資材過於單一，則易造成營養元素失衡。另一方面，近年來於介質中添加有益微生物應用於作物栽培已然成為顯學，但介質添加有益微生物之效用亦受到各種因素影響，例如有機質含量、介質通氣性、介質含水量、溫度、光照強度、農藥及肥料之施用量等 (吳和蔡，2019)。目前已知木黴菌 (*Trichoderma*) 具有促進作物生長之潛力，如：添加木黴菌於土壤可增加草莓之產量 (Porras and Romero, 2007)，是以本試驗評估不同介質接種棘孢木黴菌 (*T. asperellum*) 對草莓生長之影響。

材 料 與 方 法

一、試驗材料

(一)、木黴菌種

棘孢木黴菌 (*T. asperellum*, CHF78)，由中興大學土壤環境學系環境微生物研究室提供，以代號 T 表示該菌株，以孢子懸浮液添入介質進行處理，使孢子含量為每克介質乾重含 10^6 之孢子數。

(二)、介質代號及組成內容物

本研究所使用之介質代號及其內容物組成配方與比例如表 1 所示。

(三)、草莓品種

栽培品種為‘豐香’，以培育 21 日之草莓走莖苗進行試驗，栽培期間針對白粉病、二點葉蟎及小黃薊馬施藥進行防治。

二、試驗方法

(一)、植株栽培管理

試驗開始前將介質含水量調整至最大容水量之 80%，裝於 4 吋盆，並將植株枯葉進行移除，挑選具有 2 至 3 片展開葉且根系健壯之植株移入試驗盆器，並於 2 日後施用木黴菌孢子懸浮液。本試驗含 6 種介質，各介質又區分為有添加木黴菌 (T) 及未添加木黴菌 2 種

表 1. 供試介質代號及其內容物組成配方與比例。

Table 1. Code names and composition of growth substrates tested.

介質代號	介質內容物組成之體積比
CK	沃鬆 1 號 ^w
CKT	沃鬆 1 號 + 木黴菌
A	菇包 ^x ：泥炭 ^y ：椰纖：蛭石=1：5：1：3
AT	菇包：泥炭：椰纖：蛭石=1：5：1：3 + 木黴菌
B	菇包：泥炭：蛭石=1：1：1
BT	菇包：泥炭：蛭石=1：1：1 + 木黴菌
C	泥炭：蛭石：河砂=1：1：1
CT	泥炭：蛭石：河砂=1：1：1 + 木黴菌
D	泥炭：菇包：稻殼=1：1：1
DT	泥炭：菇包：稻殼=1：1：1 + 木黴菌
E	泥炭：蛭石=1：1
ET	泥炭：蛭石=1：1 + 木黴菌

w:大益農業科技股份有限公司之草莓育苗專用介質，內含椰纖、泥炭。

x:菇包堆肥。

y:UAB Klasmann-Deilmann 公司的 Base Substrate.

處理，共計 12 處理，每處理栽植三棵植株為一重複，共三重複，共進行兩次重複試驗。

試驗過程每週澆灌 30 ml 稀釋 500 倍之漢將博士肥 (N：P₂O₅：K₂O：MgO=16：10：18.5：3；禾盛農業企業)，並每週每盆澆灌 10 ml 稀釋 1000 倍之漢將生力肥補充微量元素。

病蟲害防治依行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所之植物保護資訊系統網站登記藥劑及規範，並以草莓栽培歷推估病蟲害之發生期，提前進行預防性施藥，降低病蟲害之影響。

(二)、栽培環境及介質之化學性質調查

兩次試驗皆於中興大學土壤環境學系 A 區溫室進行，環境之溫度及濕度以 HOBO 溫濕度紀錄器 (HOBO Data logger, U23-001 HOBO Pro v2 Temp/RH, USA)紀錄溫室環境之溫濕度變化。

栽種前後分析所有處理介質之 pH 及 EC 值，採 5 g 之介質加入 25 ml 去離子水，以 100 rpm 震盪一小時，再以 ADVANTECE NO.1 濾紙進行過濾，濾液以 pH meter (Suntex-SP-23)及 EC meter (Suntex-SP 170)測定其 pH 及 EC 值。

(三)、草莓植株性狀調查

- 1.地上部鮮重：以草莓植株冠部之根系分化處以上界定為地上部，測量其重量，測量單位為公克(g)
- 2.根鮮重：以草莓植株冠部之根系分化處以下界定為根部，測量其重量，測量單位為公克(g)
- 3.冠徑：以草莓植株冠部之根系分化處界定為冠部，測量單位為公分 (cm)
- 4.葉面積：以草莓之完全展開葉進行測量，放置比例尺拍攝其葉片，再以圖像處理軟體 ImageJ 進行分析，測量單位為平方公分 (cm²)
- 5.地上部乾重：地上部以 70°C 烘乾 3 日，測量其重量，測量單位為公克 (g)
- 6.根乾重：根部以 70°C 烘乾 3 日，測量其重量，測量單位為公克 (g)

(四)、莓地上部營養元素濃度測定

將植株地上部以 1% 之 HCl 刷洗，以脫去蟲卵等雜質，再經由去離子水清洗三次後放入 70°C 烘箱乾燥 3 日。乾燥完之植體將其磨至粉末狀，以硫酸紙袋盛裝，並乾燥保存。

分析時秤取樣品粉末 0.5 g，放入坩鍋，再將坩鍋置入灰化爐進行灰化，先升溫至 200°C 加熱 2 小時，再升溫至 400°C 加熱 1 小時，最終以 550°C 2 小時灰化，使樣品充分灰化。坩鍋從灰化爐中拿出，並進行冷卻，當冷卻至室溫時加入 5 ml 2N 之 HCl，以 Whatman NO.42 濾紙進行過濾，再將濾液以純水定量至 25 ml，裝入元素分析用塑膠瓶保存。

1. 氮含量之測定

總氮含量以 Micro-Kjeldahl 法進行測定，秤取 0.2 g 之樣品粉末，以濾紙(toyo NO.1)包覆，置入分解管，管內加入 1 g 之混合硒 ($K_2SO_4 : CuSO_4 : Se = 100 : 10 : 1$, w/v)，再加入 4.5 ml 濃硫酸；將分解管放置於 410°C 之分解爐，每小時翻動分解管以利管壁之殘留物分解，放入分解爐 2 小時後確認管內無明顯冒煙，管內液體呈現清澈之淡藍色，即可取出冷卻，冷卻至室溫時加入 15 ml 純水。將樣品倒入 Micro-Kjeldahl 裝置之燒氮瓶，加入 20 ml 12N NOH，並通過水蒸氣使其氨化，通氣管另一端盛裝 2% Boric acid 20 ml 之測氮指示劑 (0.33 g Biomocresol Green + 0.165 g Methyl Red + 500 ml 95% Alcohol) 接收氨氣及氨水，色澤由紫紅轉為青綠色，累積至總體積 50 ml 為止，再以 1/14N 之 H_2SO_4 滴定，當色澤由青綠色轉為紫紅色澤停止滴定，並換算含氮之百分比，其單位為 %。

2. 磷含量之測定

以鉬黃法 (Vanadate-Molybdate Yellow Method) 進行測定，抽取 1 ml 之灰化濾液於試管，再加入 3 ml 之純水與 1 ml 之鉬黃試劑，以試管震盪機均勻混合後靜置 10 分鐘，加入鉬黃試劑後勿放置超過 30 分鐘，以避免樣品發生沉澱影響測定之精準度，使用 Elisa Reader (BMG LABTECH, FLUOstar Omega, Germany) 以吸光值 470 nm 進行測定，利用不同濃度之 K_2HPO_4 標準液確立標準曲線，並依此換算樣品之磷含量，其單位為 %。

3.鉀、鎂含量之測定

抽取 0.1 ml 之灰化濾液於元素分析專用試管，加入 4.9 ml 純水，以試管震盪機均勻混合後，抽取 0.5 ml，加入 4.5 ml 純水進行稀釋，並震盪均勻，再以原子吸收光譜儀 (Atomic Absorption Spectrophotometer, Hitachi Z-2300)測定其濃度，單位為%。

4.鈣含量之測定

抽取 0.1 ml 之灰化濾液於元素分析專用試管，加入 4.9 ml 純水及 1 ml 氧化釷(La_2O_3)，以試管震盪機均勻震盪後，使用原子吸收光譜儀 (Hitachi Z-2300)測定其濃度，單位為%。

5.錳、鋅、銅、鐵含量之測定

以灰化濾液原液進行測定，使用原子吸收光譜儀(Hitachi Z-2300)測定其濃度，單位為 ppm。

(五)、介質木黴菌族群密度調查

每週分別取各介質 5 g 混合 45 ml 之無菌水，稀釋 10^3 、 10^4 倍，塗抹於五氯硝基苯 (Pentachloronitrobenzene, PCNB)選擇性培養基，調查介質中木黴菌之孢子數，每處理 4 重複。

(六)、統計分析

試驗採取隨機完全區集設計 (Randomized Complete Block Design, RCBD)。調查之數據以 SAS 統計軟體 (version 9.4: SAS Institute, Cary, NA, USA)進行 ANOVA (analysis of variance)變異數分析 ($\alpha=0.05$)，分析結果具顯著差異後，再使用 Fisher's LSD 進行試驗處理之平均值比較。

結 果

(一)草莓栽培前、後介質 pH 值及 EC 值之變化

栽培前 CK、A、B、C、D 及 E 介質之 pH 值依序為 5.20、6.70、7.38、6.95、7.30 及 6.08，而 B 及 D 介質之 pH 值顯著高於其他處理組，CK 介質則顯著低於其他處理組 (表 2)；栽培後 CK、A、B、C、D 及 E 介質之 pH 值依序為 5.37、6.85、7.65、7.42、7.59 及 5.85，CKT、AT、BT、CT、DT 及 ET 處理組之 pH 值依序為 5.56、6.83、7.61、7.47、7.60 及 6.00，其中 B 之 pH 值最高，而 CK 之 pH 值 5.37 顯著低於其他處理組(表 3)。

栽培前 CK、A、B、C、D 及 E 介質之 EC 值依序為 2.57、1.31、1.52、0.39、1.87 及 0.44 dS/m，其中 CK 之 EC 值顯著高於其他介質，C 及 E 介質之 EC 值則顯著低於其他介質之 EC 值 (表 2)；栽培後之調查結果顯示，CKT 處理組之 EC 值 2.21 dS/m

顯著高於其他處理組之 EC 值，而 C 及 CT 處理組之 EC 值分別為 0.35 及 0.37 dS/m，顯著低於其他處理組之 EC 值 (表 3)。此外，栽培後 CK、A、B 及 C 介質之 EC 值皆有下降之趨勢，D 及 E 介質 EC 值則會上升。

表 2.栽培前不同介質處理之 pH 值及 EC 值。

Table 2. The pH and EC values of different substrates before cultivation.

Treatments	pH	EC (dS/m)
CK	5.20e ^z	2.57a
A	6.70c	1.31d
B	7.38a	1.52c
C	6.95b	0.39e
D	7.30a	1.87b
E	6.08d	0.44e

^zMeans with the same letter in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

表 3.栽培後不同介質處理之 pH 值及 EC 值。

Table 3. The pH and EC values of different growth substrates after cultivation.

Treatments	pH	EC (dS/m)
CK	5.37f ^z	2.01b
CKT	5.56e	2.21a
A	6.85c	1.18e
AT	6.83c	1.21e
B	7.65a	1.40d
BT	7.61a	1.33de
C	7.42ab	0.35g
CT	7.47ab	0.37g
D	7.59ab	1.95bc
DT	7.60ab	1.81c
E	5.85d	0.61f
ET	6.00d	0.55f

^zMeans with the same letter in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

(二)草莓植株之性狀調查

栽種 7 週後進行草莓植株之生長性狀調查，結果如表 4 所示，D 及 DT 處理組之葉片數 5.72 及 5.17 較其他處理組為低，CK、A、B 及 E 介質栽種之草莓葉片數顯著高於 D 介質，而各介質中有無添加 T 之相互比較結果顯示，除了 A 處理組 6.67 顯著高於 AT 處理 6.00 外，其餘各介質中有無添加 T 彼此間並無顯著差異；葉面積方面，CK、CKT、A、AT、E 及 ET 處理組之葉面積顯著高於 B、BT、C、CT、D 及 DT 處理組之葉面積，而 D 及 DT 處理組之葉面積則顯著低於其他處理組之葉面積，在各介質中有無添加 T 彼此之間則無顯著差異；冠徑方面，CK、CKT、A、AT、E 及 ET 處理組之冠徑較高，D 及 DT 處理組之冠徑分別為 8.38 mm 及 8.15 mm，較各處理組為低，且顯著低於 CK、A、B 及 E 介質有無添加 T 處理組之冠徑；地上部鮮重方面，CK、CKT、A、AT、E 及 ET 處理組之地上部鮮重顯著高於 C、CT、D 及 DT 處理組；根部鮮重方面，除了 B 處理組與 A 及 AT 處理組之間無顯著差異外，CK、CKT、A 及 AT 處理組顯著高於 BT、C、CT、D、DT、E 及 ET 處理組。除了 D 處理組之 8.73 g 顯著高於 DT 處理組之 7.24 g 外，其餘各介質中有無添加 T 彼此間並無顯著差異；地上部乾重方面，除了 E 處理組外，A 處理組顯著高於其他處理組，而 D 處理組之 1.19 g 及 DT 處理組之 1.03 g 顯著低於其他處理組，在各介質中有無添加 T 彼此間僅 A 處理組之 2.95 g 顯著高於 AT 處理組之 2.39 g，其餘各介質中有無添加 T 處理之地上部乾重並無顯著差異；根部乾重方面，CK、CKT、A 及 AT 處理組顯著高於 C、CT、D 及 DT 處理組，而各介質中有無添加 T 彼此之間亦無顯著差異。

(三)草莓植株之地上部營養調查

草莓植株之地上部巨量元素濃度如表 5 所示，氮元素濃度以 C 處理組及 C T 處理組顯著高於其他處理，而 CK、CKT 及 D 處理組之氮元素濃度較低，此外，除了 D 處理組之 1.41% 顯著低於 DT 處理組之 1.56% 外，其餘各介質中有無添加 T 彼此之間並無顯著差異；磷元素濃度方面，CK、CKT、A、AT、B、BT 及 DT 處理組顯著高於其他處理組，而 C、CT 及 E 處理組顯著低於其他處理組，所有介質僅 D 及 E 介質中有無添加 T 彼此之間具顯著差異；鉀元素濃度方面，D 及 DT 處理組顯著高於其他處理組，CK 及 CKT 處理組次之，而除了 C 處理組之 2.98% 與 E 及 ET 處理組無顯著差異外，E 及 ET 處理組顯著低於其他處理組，其濃度皆為 2.92%，而各介質中有無添加 T 並未顯著影響植株鉀含量；鈣元素濃度方面，CT、E 及 ET 處理組顯著高於其他處理組，而 CK、CKT、D 及 DT 處理組的鈣濃度則顯著低於其他處理組，除了 C 介質之 1.54% 顯著低於 CT 處理組之 1.64% 外，其他各介質中有無添加 T 彼此之間並無顯著差異；鎂元素濃度方面，除了 B 處理組之 0.55% 與 BT 處理組之 0.56% 無顯著差異外，BT 處理組顯著高於其他處理組，而 E 及 ET 處理組之鎂元素濃度相較於其他處理組為低，分別為 0.41 及 0.42%，而各介質有無添加 T 並未顯著影響草莓植株之鎂元素濃度。

表 4. 不同介質處理對草莓生長性狀之影響。

Table 4. Effects of different growth substrates on growth phenotypes of strawberry.

Treatments	葉片數	葉面積 (cm ²)	冠徑 (mm)	地上部 鮮重(g)	根部 鮮重(g)	地上部 乾重(g)	根部 乾重(g)
CK	6.72a ^z	217.38a	10.79a	10.11a	12.78a	2.57bc	2.37a
CKT	6.61abc	222.79a	10.33ab	9.52ab	12.95a	2.36cd	2.15abc
A	6.67ab	213.00a	10.72a	9.90a	12.09ab	2.95a	2.32ab
AT	6.00cd	218.76a	9.72bcd	8.87ab	12.15ab	2.36cd	2.17abc
B	6.50abc	181.33b	9.32cde	8.41bc	11.40bc	2.29cde	2.09abc
BT	6.56abc	185.36b	9.35cde	7.49cd	10.37c	1.97ef	1.87cde
C	6.06bcd	150.82c	9.01def	7.21cd	8.84de	2.01def	1.75de
CT	6.00cd	169.40bc	8.87efg	6.65d	8.83de	1.84f	1.71e
D	5.72de	111.16d	8.38fg	4.65e	8.73e	1.19g	1.61ef
DT	5.17e	93.47d	8.15g	4.39e	7.24f	1.03g	1.34f
E	6.61abc	213.66a	10.09abc	9.78ab	10.47c	2.86ab	2.11abc
ET	6.97a	217.04a	9.40cde	9.27ab	10.16cd	2.58bc	2.05bcd

^zMeans with the same letter in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

微量元素方面 (表 6)，錳元素濃度以 D 處理組之 109.61 ppm 及 DT 處理組之 110.35 ppm 為最高，而除了 B 處理組及 BT 處理組之 63.98 ppm 及 64.14 ppm 與 E 處理組之 79.71 ppm 無顯著差異外，B 介質有無添加木黴菌之錳濃度顯著低於其他處理組，而各介質中有無添加 T 彼此之間並無顯著差異；鋅、銅元素濃度於所有處理組間並無顯著差異；鐵元素濃度方面，C 及 CT 處理組濃度分別為 162.01 ppm 及 167.82 ppm，其高於其他處理組，而 CK 及 CKT 處理組之鐵濃度分別為 92.99 ppm 及 94.46 ppm，低於其他處理組。

介質木黴菌族群密度調查結果顯示，每克供試介質在添加含 10^6 孢子數之木黴菌(T)後，第一週之木黴菌族群密度約為 10^5 CFU/g，至第七週 AT、BT、DT 及 CKT 處理組之孢子數降至 10^4 CFU/g (圖 1)。

表 5.不同介質處理對草莓巨量元素濃度之影響。

Table 5. Effects of different growth substrates on macronutrient concentrations of strawberry.

Treatments	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
CK	1.49cd ^z	0.30a	4.63b	0.74e	0.51bc
CKT	1.49cd	0.31a	4.58b	0.78e	0.51bc
A	1.58bc	0.30a	3.30d	1.41c	0.48cd
AT	1.62b	0.31a	3.21de	1.41c	0.47cd
B	1.57bc	0.29ab	3.67c	1.23d	0.55ab
BT	1.62b	0.31a	3.87c	1.29d	0.56a
C	1.77a	0.17c	2.98ef	1.54b	0.48cd
CT	1.86a	0.19c	3.21de	1.64a	0.48cd
D	1.41d	0.27b	5.11a	0.79e	0.45def
DT	1.56bc	0.29a	5.25a	0.76e	0.46de
E	1.56bc	0.17c	2.92f	1.62a	0.41f
ET	1.59bc	0.18b	2.92f	1.66a	0.42ef

^zMeans with the same letter in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

表 6.不同介質處理對草莓微量元素濃度之影響。

Table 6. Effects of different growth substrates on micronutrient concentrations of strawberry.

Treatments	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Fe (ppm)
CK	87.57bcd ^z	32.66a	3.83a	92.99f
CKT	96.71abcd	28.91a	3.75a	94.46f
A	87.63bcd	30.15a	3.91a	102.45ef
AT	93.48abcd	33.74a	3.83a	145.30abcd
B	63.98e	30.16a	3.75a	128.62cde
BT	64.14e	32.41a	4.00a	131.12bcde
C	103.62ab	33.81a	3.91a	162.01ab
CT	98.24abc	32.58a	4.00a	167.82a
D	109.61a	29.82a	4.16a	154.51abc
DT	110.35a	28.73a	4.16a	121.60cdef
E	79.71de	31.32a	3.92a	120.95def
ET	82.81cd	27.99a	3.42a	108.63ef

^zMeans with the same letter in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

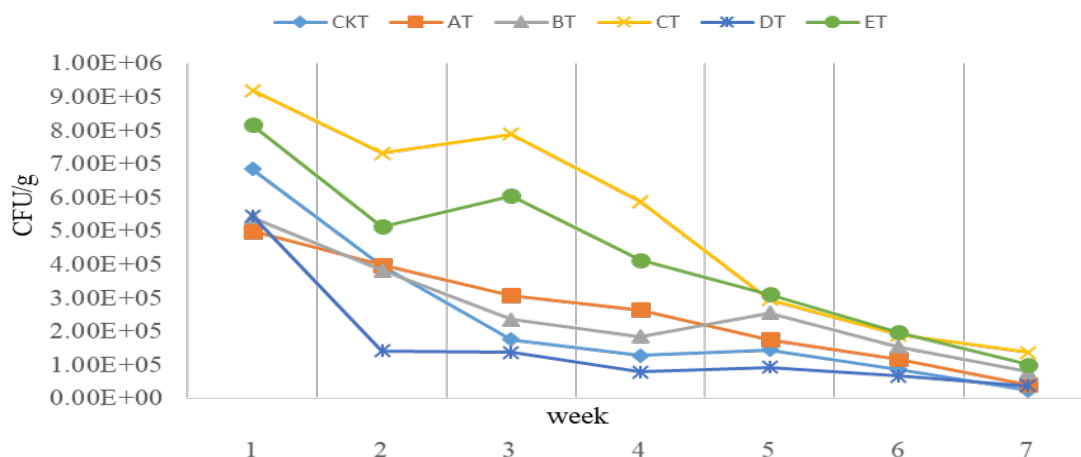


圖 1. 介質木黴菌族群密度。

Fig. 1. *Trichoderma* population density in the substrates at different weeks after inoculation.

討 論

(一) 草莓栽種前、後介質化學性質之變化

本試驗介質所分析之化學性質包含酸鹼度 (pH)及電導度 (EC)。植物根系對於不同養分之吸收能力取決於介質之 pH 值，pH 值變化將影響介質溶液中 H^+ 及 OH^- 之高低，並影響介質溶液之離子的平衡及養分有效性，進而可導致作物之營養障礙 (Arnon and Gronli, 1942)。土壤 pH 值在 5 至 8 之間時，適合大多數植物之生長 (卓，2005)，而一般育苗之商用介質以泥炭土居多，其多為偏酸性之介質 (崔和王，2001)，本試驗於栽種前所測得之介質 pH 值在 5.2 至 7.38 之間，而對照組 (CK)為草莓育苗專用介質 (沃鬆 1 號)，pH 值為 5.20，為偏酸性之介質。

草莓可於土壤 pH 值 4 至 8 之間進行栽培，適合之 pH 值介於 5.5 至 6.5 間 (李，2005；吳和蔡，2019)，在過於極端之 pH 值下將降低草莓產量及果實品質 (Milosevic *et al.*, 2008)。本試驗 A、B、C 及 D 介質栽種前之 pH 值分別為 6.70、7.38、6.95 及 7.30 (表 2)，而栽種後 A、B、C 及 D 介質有無添加 T 之 pH 值介於 6.83 至 7.65 (表 3)，高於草莓生產之適合 pH 值。供試用之 B、C 及 D 介質偏中性或鹼性 (表 2)，這些介質主要成分為泥炭、蛭石、河砂、稻殼及菇包堆肥 (表 1)，其中泥炭為酸性之商用泥炭 (UAB Klasmann-Deilmann, Base Substrate)，pH 約 5.6，蛭石則為中性或偏鹼性，但主要造成 B 及 D 介質偏鹼性之原因可能為添加菇包堆肥，蔡 (1994)指出菇包堆肥之 pH 值介於 7.3 至 8.1 間。

大多數蔬菜作物栽培介質合適之 EC 值範圍為 1 至 2.5 dS/m (Machado and Serralheiro, 2017)，另有文獻指出，介質 EC 值應控制於 2 dS/m 以下，且建議介質 EC 值宜控制於 0.5 dS/m 以下，以利作物生長進 (楊等, 2011)，本試驗栽培前之介質 EC 值在 0.39 至 2.57 dS/m 間(表 2)，栽種後則在 0.35 至 2.21 dS/m 間 (表 3)，符合其上述文獻建議之合適範圍。

(二)草莓植株之生長性狀調查

本試驗主要探討不同混合介質對草莓生長性狀之影響，藉由調查草莓之生長狀況，判定何種介質適合應用於草莓栽培，並且由這些調查項目判斷不同混合介質添加木黴菌 (T) 是否能促進草莓植株生長，調查項目包含：葉片數、葉面積、冠徑、根長、地上部鮮重、根部鮮重、地上部乾重及根部乾重。Adak 等 (2018)探討不同無土介質對草莓形態、生理特性及產量之影響，其結果顯示，產量與草莓植株之葉片數、地上部乾重、根部乾重及根長呈正相關，Grijalba 等 (2015)之研究結果顯示草莓冠徑與產量呈正相關。雖然所有供試介質中以沃鬆一號 (CK)在多項生長性狀之調查數值較高，但 A 處理之地上部乾重 (2.95 g) 顯著高於 CK 處理 (2.57 g)。此外，試驗結果顯示，CK、A 及 E 介質所栽培草莓之生長性狀大多優於 B、C 及 D 介質，從介質化學性質分析可知，CK、A 及 E 介質之 pH 值較符合草莓生長適合之 pH 值(5.5-6.5) (李, 2005; 吳和蔡, 2019)，而在介質成分方面，CK 及 A 介質皆有添加椰纖，前人研究顯示，以含有椰纖之介質所栽培之草莓生長性狀如：葉片數、冠徑、地上部乾重、根部乾重、根之數量、根長等及產量可顯著高於使用泥炭土培育之草莓，且椰纖及泥炭土之物理性質相似，但相同體積之椰纖較泥炭土輕，推測因泥炭土及椰纖之透氣性較高有助於根部生長，進而有較高之根長及根數 (Adak *et al.*, 2015; Adak *et al.*, 2018)。

各介質自比，添加木黴菌 (T)對草莓生長多無顯著之影響，除了 A 介質之葉片數、冠徑、地上部乾重及 D 介質之根部鮮重於添加 T 後會顯著降低外，其餘介質添加 T 對草莓之生長皆無顯著之影響 (表 4)，其可能之原因可能與 T 於介質中族群密度過低有關 (圖 1)。Porra 等 (2007)探討在田間使用木黴菌或太陽能殺菌對草莓產量之影響，結果顯示第一年木黴菌於土壤之族群並不穩定，至第二年期族群趨於穩定產量才顯著高於對照組，而 Leandro 等人 (2007)研究添加木黴菌及燻蒸處理對草莓生長及產量之影響，其結果顯示，添加木黴菌處理組之生長與對照組並無顯著差異，且在可銷售果實產量甚至顯著低於燻蒸處理組，推測可能原因為木黴菌於土壤中之含量低於理想水平，或該菌株無法適應其生長環境。

(三)草莓植株之地上部營養調查

植體營養元素濃度可反應植株之生育狀態，而改變其濃度的原因可能來自於環境因素、作物品種特性、人為因素等，而藉由調查植株之生長與分析植體營養元素濃度有助於瞭解作物之生育特性。

陳等 (1999)曾建議草莓植體各營養元素之適量範圍，其中氮元素之適當濃度介於 2.25-4.0%之間，而本試驗植體之氮元素濃度皆低於此適量範圍值，代表其可能有氮元素缺乏之現象，而氮元素之充足與否可能影響木黴菌促進植物生長及拮抗病原菌之作用 (Khattabi *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2019)；磷元素濃度方面，C、CT、E 及 ET 處理組略低於適量範圍 (0.2-1.0%)，其數值依序為 0.17、0.19、0.17 及 0.18%；鉀元素濃度方面，除了 C、E 及 ET 處理組落於適量範圍之 1.0-3.0%間外，其他處理組皆高於其適量範圍，而又以 CK、CKT、D 及 DT 處理組顯著高於其他處理組，依據介質之組成內容物 (表 1)，CK 含高比例椰纖，D 則是含有稻殼，這兩項基質之有效性鉀的濃度較高，進而提升植株的鉀吸收量，因而提高植體之鉀元素濃度 (楊等，2011)；鈣元素濃度方面，除了 CK、CKT、D 及 DT 處理組略低於適量範圍之 0.8-2.5%，其他處理組則在適量範圍之內；鎂元素濃度則皆於適量範圍 0.23-1.0%之內 (表 5)。

植體微量元素濃度分析結果顯示，各處理組之錳、鋅、銅及鐵元素濃度分別介於 63.98 ppm-110.35 ppm、27.99 ppm-33.81 ppm、3.42 ppm-4.16 ppm 及 92.99 ppm-167.82 ppm，而陳等 (1999)所建議草莓植體各微量元素之適量範圍分別為錳 40-200 ppm、鋅 15-200 ppm、銅 4-50 ppm 及鐵 40-200ppm，本試驗各處理組之錳、鋅及鐵元素濃度皆在適量範圍值內，而銅元素濃度除了 BT、CT、D 及 DT 處理組介於適量範圍內，其他處理組皆略低於適量範圍。

綜合上述，本試驗結果顯示介質添加棘孢木黴菌並無顯著促進草莓之生長，可能與供試介質中該木黴菌菌株密度過低有關 (圖 1)，如何提升木黴菌促進草莓生長之方法仍需進一步研究。此外，本研究發展之 A(菇包：泥炭：椰纖：蛭石=1：5：1：3)與 E(泥炭：蛭石=1：1)介質具備開發成草莓栽培介質之潛力。

參 考 文 獻

- 李窓明。2005。草莓。台灣農家要覽 (增修訂三版)。農作篇 (二)豐年社出版。pp. 576-580。
- 吳添益、蔡正賢。2019。草莓育苗介質 (土壤)選擇經驗談。苗栗區農業專訊 85: 3-7。
- 卓家榮。2005。土壤肥力檢測及營養診斷。臺南區農業改良場技術專刊 132 期: 63-74。
- 陳仁炫、林正鎔、郭惠千。1999。作物養分需求及植體分析之分級標準彙編。國立中興大學土壤環境科學系。
- 農業統計年報。2020。行政院農業委員會統計資料。
- 楊秋忠、陳仁炫、郭猛德、曾慶平、黃裕銘、楊盛行、李文汕。2011。台灣有機廢棄物的再利用。

- 蔡宜峰。1994。菇類太空包廢料堆肥化製作之研究。台中區農業改良場研究彙報 44: 13-21。
- Adak N. and H. Gubbuk. 2015. Effect of planting systems and growing media on earliness, yield and quality of strawberry cultivation under soilless culture. *Not. Bot. Horti Agrob. Cluj Napoca* 43(1): 204-209.
- Adak N., L. Tozlu and H. Gubbuk. 2018. Influence of different soilless substrates to morpho-physiological characteristics and yield relations in strawberries. *Erwerbs-Obstbau* 60: 341-348.
- Arnon, D. I. and M. Gronli. 1942. Influnce of hydrogen ion concentration on the growth of higher plants under controlled conditions. *Plant Physiol.* 17: 525.
- Bringhurst, R. S. 1990. Cytogenetics and Evolution in American *Fragaria*. *Hortscience* 25(8): 879-881.
- Chamorro M., P. Domínguez, J. J. Medina, L. Miranda, C. Soria, F. Romero, J. M. LópezAranda, O. Daugovish, J. Mertely and B. D. I. Santos. 2015. Assessment of chemical and biosolarization treatments for the control of *Macrophomina phaseolina* in strawberries. *Sci. Hortic.* 192: 361-368.
- Edger, P. P., T. J. Poorten, R. VanBuren, M. A. Hardigan, M. Colle, M. R. McKain, R. D. Smith, S. J. Teresi, A. D. L. Nelson, C. M. Wai, E. I. Alger, K. A. Bird, A. E. Yocca, N. Pumplin, S. J. Ou, G. Ben-Zvi, A. Brodt, K. Baruch, T. Swale, L. Shiue, C. B. Acharya, G. S. Cole, J. P. Mower, K. L. Childs, N. Jiang, E. Lyons, M. Freeling, J. R. Puzey, and S. J. Knapp. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat. Genet.* 51(4): 765.
- Erdogan, U., R. Cakmakcl, A. Varmazyari, M. Turan, Y. Erdogan, and Kitir. 2016. Role of inoculation with multi-trait rhizobacteria on strawberry under water deficit. *Zemdirbyste* 103(1): 67-76.
- Fang, X., M. P. You, and M. J. Barbetti. 2012. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. *European J. Plant Pathol.* 134: 619-629.
- Grijalba, C. M., M. M. Perez-Trujillo, D. Ruiz, and A. M. Ferrucho. 2015. Strawberry yields with-tunnel and open-field cultivations and the relationship with vegetative and reproductive plant characteristics. *Agron. Colomb* 33: 147-154.
- John, L. 2004. *Diseases of Fruits and Vegetables, Volume II :Strawberry disease management.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 441-483.
- Khattabi, N., B. Ezzahiri, L. Louali, and A. Oihabi. 2004. Effect of nitrogen fertilizers and

- Trichoderma harzianum on Sclerotium rolfsii. Agronomie 24: 281-288.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of Fusarium oxysporum from natural soil. Rev. Plant Prot. Res. 8: 114-125.
- Larson, K. D. and D. V. Shaw. 1996. Soil fumigation, fruit production, and dry matter partitioning of field-grown strawberry plants. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 121, 1137-1140.
- Leandro, L. F. S., L. M. Ferguson, and F. J. Louws. 2007. Strawberry Growth and Productivity in Fumigated Compared to Compost-amended Production Systems. HortScience 42(2): 227-231.
- Milosevic, T. M., N. T. Milosevic, and I. P. Glisic. 2008. Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) yield as affected by the soil pH. Anais da Academia Brasileira de Ciências 81(2): 265-269.
- Mikiciuk, G., M. Mikiciuk, and M. Hawrot-Paw. 2015. Influence of superabsorbent polymers on the chemical composition of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) and biological activity in the soil. Folia Hort. 27(1): 63-69.
- Montaño, F. P., A. C. Villegas, I. J. Guerrero, F. L. Baena, F. Ollero, and T. Cubo. 2013. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. Microbiol. Res. 169: 25-36.
- Porras, M., C. Barrau., and F. Romero. 2007. Effects of soil solarization and Trichoderma on strawberry production. Crop Prot. 26: 782-787.
- Singh, B. N., P. Dwivedi, B. K. Sarma, G. S. Singh, and H. B. Singh. 2019. A novel function of N-signaling in plants with special reference to Trichoderma interaction influencing plant growth, nitrogen use efficiency, and cross talk with plant hormones. Biotechnol. 9:2-13.
- Wang, D., M. Z. Gabriel, D. Legard and T. Sjulín. 2016. Characteristics of growing media mixes and application for open-field production of strawberry (*Fragaria ananassa*). Sci. Hortic. 198: 294-303.

Effects of Growth Substrates Supplemented with *Trichoderma asperellum* on the Growth of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*)

Pin-Ren Yu¹⁾ Cheng-Hua Huang²⁾ San-Gwang Hwang³⁾

Key word: Strawberry, Trichoderma, Substrate

Summary

This study is to investigate the effects of growth substrates supplemented with *Trichoderma asperellum* (T) on the growth of strawberry. The pH value prior and after cultivation was both the highest in B substrate, whereas CK was both the lowest. In regard to growth phenotypes, better growth was observed in strawberry cultivated in CK, A and E substrates with the majority of growth phenotypes recorded better than those of B substrate and significantly better than those of C and D substrates. Results from plant nutrient analysis revealed that concentrations of plant N in all treatments and concentrations of plant P, Ca and Cu in some treatments were lower than the ideal range, concentrations of plant Mg, Mn, Zn and Fe were all within the ideal range, and concentration of plant K was higher than the ideal range in CK, CKT, D and DT treatments. In terms of individual substrate, supplementing with T showed no significant effect on the majority of strawberry growth phenotypes recorded. Taken together, strawberry cultivated in CK, A, and E substrates had better growth phenotypes, therefore other than CK, A and E substrates had the potential to be developed into cultivation substrates for strawberry, and future study is needed to further determine how to apply T in order to enhance its plant growth-promoting functions.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University. Co-corresponding author.

3) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

食藥用百合品系試管內鱗片再生效率比較

蔡 挹 恆¹⁾ 陳 葦 玲²⁾ 張 正³⁾

關鍵字：野百合、亞洲型百合、試管培養、鱗片再生、小鱗莖

摘要：野百合與卷丹等百合種類為常見之食藥用百合，由於組織培養技術具短時間大量生產一致性種苗之用途，且鱗片為百合屬植物最常應用之培植體，再生小鱗莖能力亦因種類而異，因此本研究以國立中興大學園藝學系花卉實驗室選拔之野百合、卷丹等十個食藥用百合品系組培苗進行三代試管內鱗片再繁殖，比較各品系鱗片再生小鱗莖能力，初步選拔易增殖之品系或種類。三代試管內鱗片再生小鱗莖能力以野百合 L641 與亞洲型百合 L709 再生最佳，平均每個鱗莖鱗片可形成二至三個小鱗莖，且再生能力不因代數增加而弱化。

前 言

百合屬植物可作為切花、盆花等花卉觀賞價值外，部分種類之鱗片可作為食用與藥用之用途（許等，2002；Lee *et al.*, 2007；Wang *et al.*, 2015）。食用方面主要將鱗片作為蔬菜作物烹煮或熬煮為百合羹（龍等，1999；李等，2012；Lee *et al.*, 2007；Yu *et al.*, 2015）；藥用方面主要作為植物性中藥，其性味甘寒，具抗發炎、鎮靜、鎮咳、抗氧化、養陰潤肺與清心安神之效果，可用於治療陰虛久咳、痰中帶血與精神恍惚等症狀（張等，2006；Wang *et al.*, 2015）。中國可供食用與藥用之百合種類約有十種，而卷丹(*Lilium lancifolium* Thumb.)等亞洲型百合以及野百合 (*L. brownii* F.E. Brown ex Mieliez等)，為較常見之食藥用百合種類（張等，2006；Okubo, 2014）。

種子繁殖或鱗片扦插繁殖法等方式繁殖能力有限，難於短時間內繁殖大量植株(Taha *et al.*, 2018)，因此需開發易於短時間內大量繁殖之技術。而組織培養技術具快速且大量繁殖一致性後代、生產無病毒與高品質植株、種原保存與縮短生長週期等重要性（龍等，1999

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 行政院農委會臺中區農業改良場副研究員。

3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

；許等，2002；Bhandari and Aswath, 2018)。百合屬植物之鱗片為組織培養最常應用之培植體，再生能力亦佳 (Saadon and Zaccai, 2013；Bakhshaie *et al.*, 2016)，且再生小鱗莖能力因種類而異，因此可以之為基礎進行易增殖種類之初步選拔。因此本研究擬比較野百合、卷丹等十種食藥用百合品系組培苗之三代試管內鱗莖鱗片再生小鱗莖能力，以之為基礎初步選拔易再生小鱗莖之種類或品系，並觀察十種百合之各時期鱗莖鱗片再生小鱗莖變化，以及三個再生世代中小鱗莖再生效率之差異。

材 料 與 方 法

一、植物材料

本試驗植物材料為國立中興大學園藝學系花卉實驗室蒐集之野百合、卷丹採集株、大花卷丹食用品種白銀 (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii* Baker) (Kawagishi and Miura, 1996a)和花蓮吉安鄉農會之亞洲型食用百合L709等十個百合品系組培苗(表1)，進行三代器內鱗莖鱗片再生小鱗莖效率，以及出瓶栽植之存活率與生長能力比較。

表1. 參試百合食藥用選拔品系種類及來源。

Table 1. Type and its origin of edible and medicinal lily selected accessions tested in the experiment.

Accession No.	種類(品種)	Origin	Year
L493T	野百合	馬祖北竿選拔株	103
L494T	野百合	馬祖北竿選拔株	103
L560	卷丹	浙江採集	106
L637 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L638 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L639 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L640 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L641 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	104
L708	白銀	購自台中第六市場	106
L709	亞洲型百合	花蓮吉安鄉農會	105

二、百合品系組培苗三代試管內鱗片再生小鱗莖效率比較

(一)培養基製備

1. 鱗片增殖培養基製備

鱗片增殖培養基製備如下，以MS (Murashige and Skoog, 1962)配方為基礎鹽類，添加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 (台灣糖業股份有限公司)、 $170\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (Hayashi Pure Chemical Ind., Co., Ltd.)、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Casein Hydrolysate (Sigma-Aldrich Co.)、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸 (α -naphthaleneacetic acid; NAA) (Sigma-Aldrich Co.)、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苄胺基腺嘌呤 (6-Benzylaminopurine; BA) (Sigma-Aldrich Co.)、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ myo-inositol (Sigma-Aldrich Co.)與 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 洋菜 (Agar) (光惠貿易有限公司)，以 0.1 N HCl與NaOH調整pH為5.7，接著以 $20\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ (直徑 $\times$ 長)之試管 (Pyrex No. 9820)分裝培養基，每支試管8 mL，再以單層鋁箔紙亮面朝下之方式封口，經滅菌釜以 121°C 、 $1.2\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 高溫高壓滅菌20分鐘，製成斜面培養基，冷卻後備用。

2. 發根培養基製備

發根培養基製備如下，以鱗片增殖培養基為基礎，移除 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA及加入 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭 (Taiwan Active Carbon Corp.)，配製完成後以 $20\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ (直徑 $\times$ 長)之 (Pyrex No. 9820)分裝培養基，每支試管8 mL，再以單層鋁箔紙亮面朝下之方式封口。發根培養基另配製以617 mL蘭花瓶分裝之培養基，每瓶蘭花瓶100 mL。經滅菌釜以 121°C 、 $1.2\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 高溫高壓滅菌20分鐘，試管培養基則另製成斜面培養基，冷卻後備用。

(二)三代試管內鱗片再生小鱗莖能力評估

取鱗莖徑大於 0.8 cm 之組培苗，切除根部與葉片後剝下鱗片，以基部向下且向軸面向上之方式培養於鱗片增殖培養基，每支試管培養一個培植體。各品系均培養20個鱗片，培養條件為溫度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、光週期12 hr與光強度 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之日光燈散射光環境。培養後每兩週調查一次各品系鱗片再生小鱗莖情形至第六週，調查項目包含小鱗莖數、帶葉小鱗莖數與生成癒傷組織鱗片數等項目，並以解剖顯微鏡 (Olympus / SZX10, Japan) 搭配CCD影像系統 (ProgRes Scan Digital Colour CCD, Germany) 拍照記錄。第六週後將植株自鱗莖鱗片分離，切除根部與葉片後繼代至發根培養基，培養條件為溫度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ，光週期12 hr與光強度 $56\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之日光燈光照環境。待鱗莖發育至周徑大於 0.8 cm 時，再進行下一代增殖，共增殖三代，比較各代各品系鱗莖鱗片小鱗莖再生效率。

三、統計分析

本試驗採用完全隨機設計 (complete randomized design; CRD)，並以CoStat軟體 (CoStat Software, CoHort Software, USA) 進行最小顯著差異比較法 (least significant difference; LSD)，於 $p \leq 0.05$ 下進行試驗結果之單因子變異數 (one way ANOVA) 之顯著差異比較。

結 果

各品系百合試管內鱗片培養後第二週，多數品系可見小鱗莖自鱗片基部形成（圖1、2、3），野百合L637、L638、L641等品系之鱗片於培養後易形成癒傷組織（圖1、2），且以野百合L641於培養後第四週與第六週形成癒傷組織之鱗片比例最高，鱗片再生小鱗莖能力則以L709與野百合L641最佳，培養後第六週每個鱗片可分別形成2.82個與2.67個帶葉與不帶葉之小鱗莖，且第一代至第三代再生能力均無弱化（表2）。鱗片再生小鱗莖效率最差之品系為野百合L637，培養後第六週每個鱗片僅可形成0.75個小鱗莖（表2；圖1）。L493T、L494T、L637、L639等野百合品系第二代小鱗莖繼代後無法發育甚至白化死亡，導致上述四個野百合品系無法進行第三代試管內鱗片再生；而卷丹L560，L638與L640等兩種野百合品系，以及白銀L708第二代小鱗莖繼代後，小鱗莖發育所需時間較長，且無法達到適宜進行試驗之鱗莖徑0.8 cm，因此上述品系於第三代試管內鱗莖鱗片再生時無法以試驗所訂之一代20個鱗莖鱗片進行試驗。野百合L640鱗莖鱗片再生能力亦佳，但由於鱗莖含有花青素呈紫紅色，繼代後易褐化，且第二代鱗莖發育能力有限，於第三代增殖時僅以七個鱗莖鱗片進行試驗。

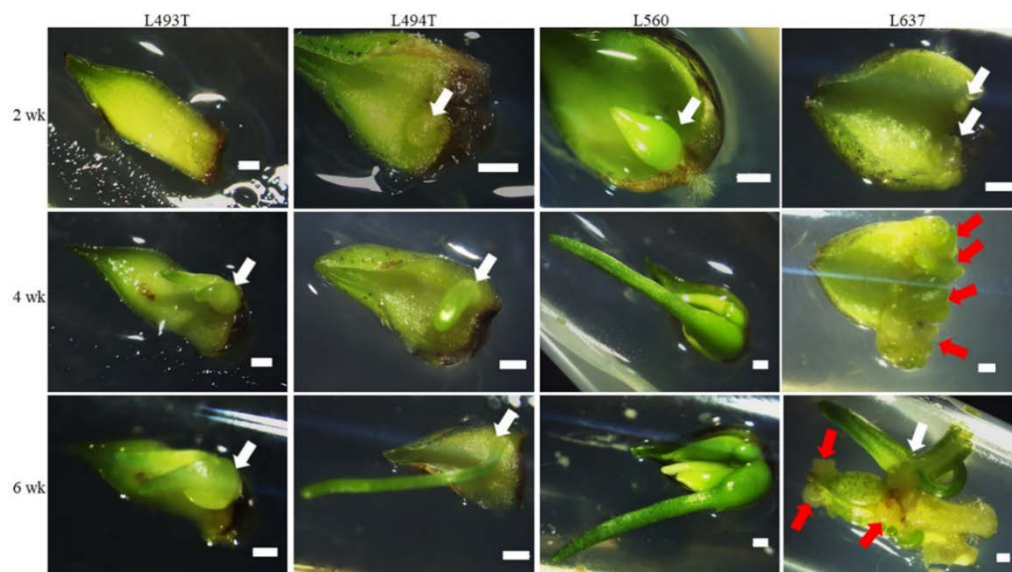


圖1. 野百合及卷丹優良選拔品系試管內鱗片再生小鱗莖能力。

Fig. 1. Ability of *in vitro* bulb scale regenerated bulblets of elite selected line *L. brownii* and *L. lancifolium*.

White arrow indicates well developed bulblets. Red arrow indicates calli and vitrified bulblets. Bar = 1 mm.

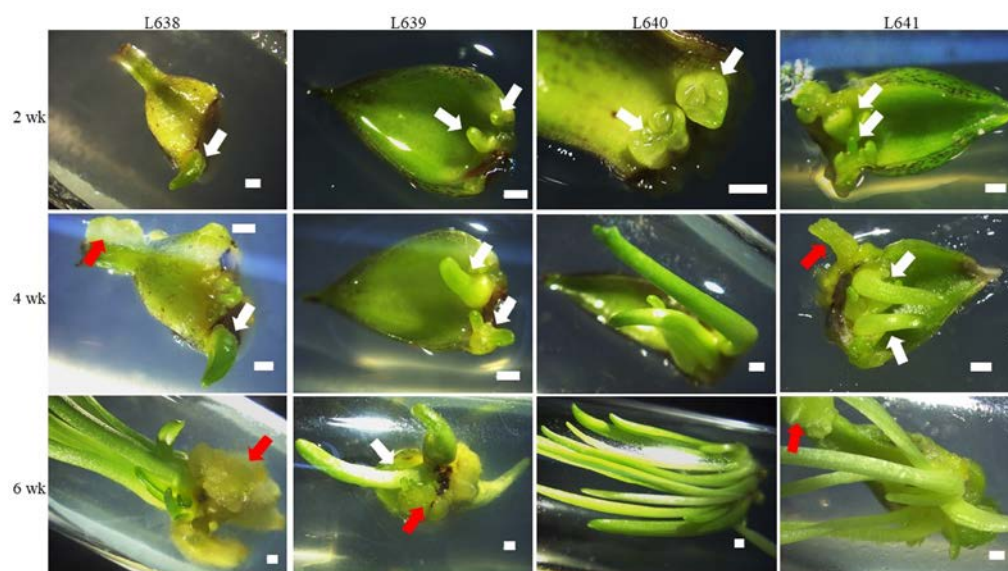


圖2. 野百合優良選拔品系試管內鱗片再生小鱗莖能力。

Fig. 2. Ability of *in vitro* bulb scale regenerated bulblets of *L. brownii*.

White arrow indicates well developed bulblets. Red arrow indicates calli and vitrified bulblets. Bar = 1 mm.

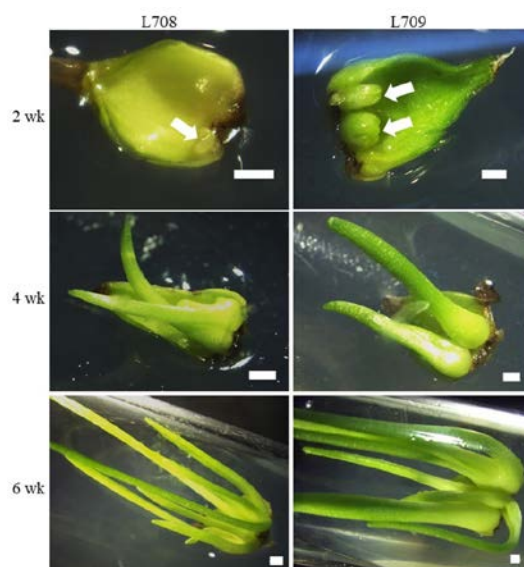


圖3. 大花卷丹'白銀'與亞洲型百合L709優良選拔品系試管內鱗片再生小鱗莖能力。

Fig. 3. Ability of *in vitro* bulb scale regenerated bulblets of Hakugin (L708) and Asiatic lily (L709).

White arrow indicates well developed bulblets. Bar = 1 mm.

表 2. 百合品系第一至三代試管內鱗片再生小鱗莖與小植株效率總和。

Table 2. Sum of efficiency of *in vitro* bulblets and plantlets regenerated from bulb scale of lilies elite lines from first to third generated line.

No. line ^z	Percentage of scales regenerated callus (%) ^y			No. bulblets per scale ^w			No. bulblets with leaves per scale ^v			No. total bulblets and buds on 6 th week ^u
	2 nd week	4 th week	6 th week	2 nd week	4 th week	6 th week	2 nd week	4 th week	6 th week	
L493T	0 ab	0 d	2.5±2.5 d	0.40±0.15 bc	0.95±0.21 bc	1.05±0.22 ab	0.05±0.03 a	0.05±0.03 d	0.05±0.03 e	1.10±0.22 ef
L494T	0 ab	0 d	2.5±2.5 d	0.70±0.16 b	0.63±0.13 c	0.43±0.10 cd	0.05±0.03 a	0.88±0.20 b	1.13±0.21 cd	1.55±0.20 de
L560	0 b	0 d	2.2±2.2 d	0.71±0.17 b	1.42±0.22 ab	1.07±0.19 a	0 a	0.29±0.10 d	0.58±0.14 de	1.64±0.21 de
L637	5.0±3.5 ab ^y	17.5±6.1 bc	55.0±8.0 b	0.13±0.06 c	1.08±0.22	0.60±0.18	0 a	0.08±0.04 d	0.15±0.08 e	0.75±0.20 f
L638	5.4±3.0 a	28.6±6.1 b	53.6±6.7 b	0.39±0.09 bc	0.75±0.14 c	0.86±0.15	0.04±0.03 a	0.86±0.16 b	1.30±0.25 c	2.16±0.26 bcd
L639	0 ab	7.5±4.2 cd	40.0±7.8 bc	0.43±0.13 bc	1.15±0.18	1.10±0.18 a	0.03±0.03 a	0.33±0.12 cd	0.80±0.21 cd	1.90±0.23 cd
L640	0 b	8.5±4.1 cd	27.7±6.6 c	0.72±0.15 b	1.40±0.23 ab	0.43±0.11 cd	0.02±0.02 a	0.77±0.17 bc	1.85±0.24 b	2.28±0.23 abc
L641	3.3±2.3 ab	40.0±6.4 a	76.7±5.5 a	0.62±0.11 b	1.57±0.18 a	0.73±0.16	0.02±0.02 a	0.95±0.17 b	1.93±0.21 b	2.67±0.21 ab
L708	0 b	0 d	0 d	0.73±0.13 b	0.73±0.14 c	0.75±0.15	0.05±0.04 a	0.91±0.16 b	1.18±0.17 c	1.93±0.20 cd
L709	3.3±2.3 ab	6.7±3.2 cd	8.3±3.6 d	1.43±0.15 a	0.70±0.14 c	0.33±0.09 d	0 a	1.92±0.18 a	2.48±0.18 a	2.82±0.19 a

^z L641 and L709 used 60 bulb scales in experiment, respectively; L638 and L708 used 55 bulb scales in experiment, respectively; L640 used 47 bulb scales in experiment; L560 used 45 bulb scales in experiment; L493T, L494T, L637, and L639 used 40 bulb scales in experiment, respectively.

^y Means ± SE within each column with different letter are significantly different by LSD test at $P \leq 0.05$.

^x Number of bulb scales regenerated callus / number of cultured bulb scales.

^w Number of bulblets without leaf regenerated from bulb scale / number of cultured bulb scales.

^v Number of bulblets with leaf regenerated from bulb scale / number of cultured bulb scales.

^u Sum of no. bulblets without leaf and with leaf regenerated from bulb scale on 6th week.

討 論

卷丹 (*L. lancifolium*)、野百合 (*L. brownii*)與川百合 (*L. davidii*)為較常見之食藥用百合種類 (張等, 2006)。本研究使用之兩個品系野百合L493T與L494T為103年自馬祖北竿採集；五個品系野百合L637、L638、L639、L640與L641為105年自金門採集，均為食用口感較佳且苦味較低之食藥用野百合選拔單株；卷丹L560為106年自浙江採集；白銀L708為食用品種之大花卷丹 (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii*)或大花卷丹與卷丹之雜交種 (Kawagishi and Miura, 1996a)，於106年購自台中第六市場；L709則來自花蓮縣吉安鄉農會。其中野百合園藝學分類上為喇叭型；卷丹為亞洲型；白銀L708為亞洲型，主要栽植地為日本北海道，與天香百合 (*L. auratum*)和卷丹等為日本常見之食用百合種類 (Kawagishi and Miura, 1996a, 1996b；Okubo, 2014)；而L709則依花形判斷其為亞洲型。

百合屬植物所有培植體中以鱗片再生能力最佳 (盧, 2002；Saadon and Zaccari, 2013)，錡 (2017)亦指出各品系野百合試管內鱗莖鱗片再生小鱗莖能力不同，且部分野百合品系之鱗片易形成癒傷組織。本研究中野百合L637、L638、L639與L641之鱗莖鱗片進行試管內再生時，有較多鱗片形成癒傷組織，與錡 (2017)之研究相符。野百合L493T、L494T、L637與L639等品系第二代植株生長勢明顯弱化，而野百合L637再生之小鱗莖常呈水浸狀，影響增殖效率，難以發育至適宜進行試管內鱗莖鱗片再生之鱗莖徑0.8 cm，甚至再生之植株有白化死亡之情形，因此上述四個品系之野百合無法進行第三代試管內鱗片再生小鱗莖；野百合L638、L640，以及卷丹L560與白銀L708，第二代植株發育能力有限，小鱗莖發育需更長時間，因此第三代試管內鱗片增殖無法以試驗所訂之一代20個鱗片進行試驗。野百合L641與L709之三代植株皆能正常發育，且野百合L641易形成側芽，繼代後植株數量常較繼代前增加一倍，因此極易繁殖，且生長勢穩定。而L493T、L494T、L637與L639等四種難增殖之野百合品系，未來可針對其生長特性，調整培養基配方，開發適合其鱗片再生小鱗莖之專一性培養基。

本研究亦觀察試驗中十個百合品系之小鱗莖均由鱗片基部形成，與王等 (2002)和莫等 (2007)提及之野百合單一鱗片再生不定芽之能力以基部最佳相符。Leshem等 (1982)提及將鐵炮百合 (*L. longiflorum*)鱗片以背軸面向下且直立之方式進行試管內鱗片再生，有最佳小鱗莖發育情形，推測鱗片再生小鱗莖之器官發生能力存在生長極性差異。Wu等 (2016)提及百合栽培種 (*L. 'Sorbonne'*)鱗片再生小鱗莖過程包含澱粉粒降解、細胞有絲分裂、維管束與輸導組織形成、外帶-內體組織形成、小葉原基與根原基形成、新芽與根部形成等六個階段，而不定芽經直接器官發生形成。

參考文獻

- 王剛、杜捷、李桂英、梁萬福、幸亨泰。2002。蘭州百合和野百合組織培養及快速繁殖研究。西北師範大學學報38:69-71。
- 杭玲、蘇賓、陳麗新、蘇國秀、程湯、黃卓忠。2001。龍牙百合組培快繁技術研究。廣西農業科學4:183-184。
- 莫昭展、符韻林、戚萌。2007。野百合鱗莖芽的誘導和增殖的初步研究。安徽農業科學35:9890-9892。
- 許圳塗、金石文、阮明淑。2002。百合。臺灣花卉發展協會。pp. 23-27, 84-89。
- 張慧芳、蔡寶昌、張志傑、李林。2006。食用百合與藥用百合的成分比較。中醫藥學刊24:436-438。
- 龍雅宜、張金政、張蘭年。1999。百合-球根花卉之王。金質出版社。pp. 7, 48-50。
- 錡虹汝。2017。野百合野生族群花卉性狀之評估與雜交育種。國立中興大學園藝學系碩士論文。台中。63 pp。
- 盧其能。2002。龍牙百合的組織培養和快速繁殖研究。江西農業學報14:43-46。
- Bakhshaie, M., S. Khosravi, P. Azadi, H. Bagheri, and J. M. van Tuyl. 2016. Biotechnological advances in *Lilium*. Plant Cell Rep. 35:1799-1826.
- Bhandari, N. S. and C. Aswath. 2018. Standardization of an effective protocol for *in vitro* culture of *Lilium longiflorum* Thunb cv. Pavia. Intl. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7: 1183-1190.
- Kawagishi, K. and T. Miura. 1996a. Changes in nutrient content of spring-planted edible lily (*Lilium leichtlinii* Hook f. var. *maximowiczii* Baker). J. Japan, Soc. Hort. Sci. 65: 339-347.
- Kawagishi, K. and T. Miura. 1996b. Growth characteristics and effect of nitrogen and potassium topdressing on thickening growth of bulbs in spring-planted edible lily (*Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* baker). Jpn. J. Crop Sci. 65: 51-57.
- Lee, K. S., J. Y. Lee, J. W. Lee, E. M. Lee, and M. J. Oh. 2007. Nutritional value in lily scales in *Lilium lancifolium* and *Lilium davidii*. Food 1: 344-346.
- Leshem, B., H. Lilien-Kipnis, and B. Steinitz. 1982. The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets on *Lilium longiflorum* Thunb, bulbscale sections cultured *in vitro*. Scientia Hort. 17: 129-136.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Okubo, H. 2014. History of *Lilium* species in Asia. In: Van Tuyl, J.M. (ed). III Intl. Symp. Genus *Lilium* 1027. pp. 11-26.
- Saadon, S. and M. Zaccari. 2013. *Lilium candidum* bulblet and meristem development. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 49: 313-319.

- Taha, L. S., S. S. Sayed, M. M. Farahat, and I. M. El-Sayed. 2018. *In vitro* culture and bulblets induction of Asiatic hybrid lily 'Red Alert'. J. Biol. Sci. 18: 84-91.
- Wang, T., H. Huang, Y. Zhang, X. Li, H. Li, Q. Jiang, and W. Gao. 2015. Role of effective composition on antioxidant, anti-inflammatory, sedative-hypnotic capacities of 6 common edible *Lilium* varieties. J. Food Sci. 80: 857-868.
- Wu, Y., Y. Li, Y. D. Ma, L. Zhang, Z. M. Ren, and Y. P. Xia. 2016. Hormone and antioxidant responses of *Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne' bulblets to humic acid treatments *in vitro*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 92: 155-167.
- Yu, X., J. Zhang, A. Li, Z. Wang, and F. Xiong. 2015. Morphology and physicochemical properties of 3 *Lilium* bulb starches. J. Food Sci. 80: 1661-1669.

Comparison of *In Vitro* Regenerated Efficiency Using Bulb Scale of Edible and Medicinal Lilies Line

Yi-Heng Tsai¹⁾ Wei-Ling Chen²⁾ Chen Chang³⁾

Key words: *L. brownii* F.E. Brown ex Mieliez, *Lilium lancifolium* Thunb., *In vitro* culture, Bulb scale regeneration, Bulblet

Summary

Lilium brownii F.E. Brown ex Mieliez and *L. lancifolium* Thunb., etc. are common edible and medicinal lilies. Propagation by tissue culture can produce mass amount as well as uniform seedlings in a short time. Bulb scales are the most often used plantlet for *Lilium*, however, the ability of bulblet regenerated from bulb scales *in vitro* were varied with species. Ten edible and medicinal lily selected lines included *L. brownii* and *L. lancifolium*, etc. offered from Lab. Floriculture, NCHU were chosen as experimental materials. Then, the regenerated ability of bulblet *in vitro* within three generations were evaluated. It expected to select lines or cultivars which are easy to propagate primary. According to the results, L641 and L709 had the best ability to regenerate bulblet using *in vitro* bulb scale propagation bulblets, Each bulb scale can produce 2 to 3 bulblets on average. Besides it. the regenerated ability of these two lines were not reduce when the cultural-frequency increasing.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Researcher, Taichung District Agriculture Research and Extension Station.
Chunghwa, Taiwan, R.O.C.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

扇形文心蘭品系及品種染色體數分析

莊子平¹⁾ 鄭雅銘²⁾ 陳昌岑³⁾ 張正⁴⁾

關鍵字：扇形文心蘭、染色體、核型、螢光原位雜合

摘要：扇形文心蘭 (*Erycina pusilla*) 之染色體數為 $2n=12$ 。近年來則確認了自然界中有不同染色體數 ($2n=10$) 的扇型文心蘭族群存在，並建立了兩族群的核型圖譜。本研究室歷年來發展出了許多扇型文心蘭品系，希望藉由根尖染色體觀察、核型組成測量及螢光原位雜合技術鑑定扇形文心蘭各品系的核型特性。試驗樣本中涵蓋了自交選拔品系及品種、化學誘變選拔品系。研究結果顯示多數自交選拔品系之染色體數為 $2n=11$ ，也有染色體數為 $2n=20$ 、 21 、 22 、 24 的品系，各品系的核型組成也不盡相同。而在自交選拔品系 EP05 上之原位雜合結果則顯示核型中遺失了一條具 5S rDNA 之染色體。這些結果顯示試驗材料可能因本身核型歷經複雜的重排事件，使得後續配對時再度發生染色體重排之機率提高。另一方面，長期的瓶內培養環境也可能對植株的減數或有絲分裂產生影響，而使得遺傳穩定性發生改變。

前 言

扇形文心蘭 (*Erycina pusilla* (L.) Williams *et al.*) 具有幼年期短、週年開花，以及瓶內開花之特性 (Livinston, 1962; Sheehan and Sheehan, 1989; Chiu *et al.*, 2011)，為近年備受矚目的原種蘭花。在過去關於扇形文心蘭染色體數的報導共有 $2n=10$ 、 12 兩種不同細胞型 (Dodson, 1957a; 1957b; Felix and Guerra, 1999; 2000)，相關研究透過以 45S 及 5S rDNA 進行螢光原位雜合，建立了扇形文心蘭之核型圖譜，並發現在演化過程中，核型歷經了複雜

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學農藝學系教授。

3) 行政院農業委員會農業試驗所技術服務組研究員。

4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者

的染色體重排 (Yeh *et al.*, 2015; 2017a; 2017b)。這些細胞遺傳資訊的建立，有助於後續研究者在進行育種或試驗時參考。因此本試驗藉由觀察各品系及品種之染色體數，作為鑑定遺傳特性的基礎資訊，並探討造成染色體數或核型變異的潛在原因。

材料與方法

一、試驗材料

試驗品系包含 (1)自交選拔品系及品種，共有品系代號 EP01~EP07 及品種'興大黃金'；(2)化學誘變品系，共有品系代號 EP11、12 (表 1)。所有自交選拔品系及品種'興大黃金'均為民國 96 年時自清華蘭園所購入的實生瓶苗 (已鑑定染色體數為 $2n=12$)，自交後所衍生的子代；扇形文心蘭化學誘變品系則為以興大黃金為試驗材料，利用秋水仙素誘變所選拔出之品系 (林，2013)；所有品系中除 EP11 外，均為於長期瓶內培養過程中分芽增殖之植株。

品系 EP11 以 PLB 營養系增殖系統提供，PLB 以 MS (Murashige and Skoog, 1962)基礎培養基[大量及微量鹽類為半量，其中 NH_4NO_3 及 KNO_3 為 1/8 量， $\text{NaFe}\cdot\text{EDTA}$ 、 FeSO_4 、vitamin、glycine 為全量、170 mg/L NaH_2PO_4 (Hayashi Pure Chemical Ind., Co., Ltd., Japan)、20 g/L 蔗糖 (Taiwan Sugar Corporation, Taiwan)、150 ml/L 椰子水 (ZICO, Los Angeles, USA)、100 mg/L myo-inositol (Sigma-Aldrich Co., USA)、1g/L 活性碳、1g/L peptone (Uni-Onward Co., Taiwan)、8 g/L agar (Trade Mark, Taiwan)，以 0.1 N HCl 或 NaOH 調整 pH 值至 5.2]進行培養，培養環境為溫度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、光週期 12/12 小時、光度 $5.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每三個月繼代一次。同時自母瓶中挑選具 3~5 片小葉且具根之苗株，繼代至子瓶中。

所有試驗品系植株均培養於 MS 基礎培養基[大量及微量鹽類為半量；其中 $\text{NaFe}\cdot\text{EDTA}$ 、 FeSO_4 、vitamin、glycine 為全量、170 mg/L NaH_2PO_4 、20 g/L 蔗糖、150 ml/L 椰子水、100 mg/L myo-inositol、1g/L 活性碳、1g/L peptone、8 g/L agar，以 0.1 N HCl 或 NaOH 調整 pH 值至 5.2]，培養環境為溫度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、光週期 12/12 小時、光度 $56\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每 3 個月繼代一次。

二、扇形文心蘭品系及品種之染色體數鑑定及核型測量

(一)根尖染色體觀察

根尖處理及染色體觀察方法參照馮 (2014)中玉米根尖有絲分裂中期染色體鑑定之試驗方法。首先於操作台中以解剖刀切取植株剛萌發之根尖 (約 5 mm 為佳)，將根尖放入離心管中，依序加入 1 ml 去離子水、2.5 μl BrNa、3.5 μl DMSO，於常溫避光環境下靜置 5 小時。接著移除管內液體，加入固定液 (Farmer's solution, 95%酒精/冰醋酸= 3/1，須即時配置使用)，置於 4°C 冰箱中避光處理至少 8 小時。

表 1. 扇形文心蘭各品系及品種之染色體數。

Table 1. Chromosome number of *Erycina pusilla* lines and cultivar.

Experiment material type	Line code/cultivar name	Chromosome number ^z
Self-crossing selected lines	EP01	11
	EP02	11
	EP03	11
	EP04	11
	EP05	11
	EP06	24/11
	EP07	22
Self-crossing selected cultivar	<i>Erycina pusilla</i> 'Hsinda Golden'	22/11
Chemical mutation selected lines	EP11	20
	EP12	21

^z The chromosome number of diploid (2n).

將管內固定液移除，加入 1 N HCl (液面高過處理樣本即可) 靜置 10 分鐘，移除 HCl 後再加入一次 1 N HCl，並置於 60°C 乾浴鍋 10 分鐘。將離心管移出乾浴鍋，並移除 HCl，再於管中加入二次水 (液面高過處理樣本即可) 清洗根尖兩次，接著加入 50 μ l Feulgen，置於常溫避光環境下 1 小時。移除 Feulgen 後加入 50 μ l 1% pectinase，置於常溫避光環境下 1 小時，最後移除 pectinase，加入去離子水 (液面高過處理樣本即可) 並置於 4 °C 冰箱中保存。觀察時以鑷子夾取處理好之根尖，置於載玻片中央，並切去其餘未呈粉紫色部分，滴上醋酸洋紅約 17.5 μ l 並將其搗碎，蓋上蓋玻片，以酒精燈進行間歇性火烤 (每次約 1~2 秒，重複約 30~40 次)，再以濾紙包裹玻片後，用力按壓蓋玻片將多餘醋酸洋紅排出。根尖玻片以顯微鏡 (Olympus, BX50, Japan) 進行觀察及染色體計數，並拍照記錄 (Olympus, DP72, Japan)。

(二)核型組成測量

取自交選拔品系 EP01-EP03、品種'興大黃金'、化學誘變品系 EP11-EP12 至少五個可

清晰辨認染色體型態及數量之細胞，以 Image J software (LOCI, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) 量測各染色體之染色體長、長短臂長，並依照獲得數據換算染色體臂長比(長臂測量值/短臂測量值)，依據染色體外觀、染色體長度及臂長比進行染色體配對。並依照臂長比對染色體之型態進行分類：

臂長比 1.0-1.7 為中位中節染色體 (metacentric chromosome, M)；1.7-3.0 為次中位中節染色體 (submetacentric chromosome, Sm)；3.0-7.0 為近末端中節染色體 (acrocentric chromosome, t)；7.0-∞ 為末端中節染色體 telocentric chromosome, T)，再以核型公式 ($nM+nSm+nt+nT$, n = chromosome number of the type) 進行表示。

三、螢光原位雜合分析

本試驗之螢光原位雜合技術中探針製備、根尖染色體製備，及雜合方法均參照馮 (2014) 中試驗方法。

(一) 45S 及 5S rDNA 序列之質體構築及質體純化抽取

45S rDNA 序列 (來自小麥 *Triticum aestivum*) 構築於質體 pTA71(9-kb)；5S rDNA 序列則來自玉米 *Zea mays*，並構築於質體中 (約 2.5-kb)。含有質體之轉型大腸桿菌菌株均由國立成功大學生命科學系張松彬 副教授之研究室慷慨提供。接著參照質體純化套件 (Plasmid Miniprep Purification Kit, GeneMark) 之操作步驟進行抽取。首先將事先培養好含有上述質體之大腸桿菌菌液倒入離心管中，以離心機 (機型) 進行離心 (12,000 rpm, 1 min)。倒出上清液，加入 200 μ l Solution I 並震盪均勻，再加入 200 μ l Solution II，輕晃離心管 3~5 下，加入 200 μ l Solution III 並輕晃 3~5 下後進行離心 (12,000 rpm, 5 min)。吸取管中上清液，滴入組合好的 Spin column 及下部收集管中並離心 (12,000 rpm, 1 min)，接著倒去收集管中的下清液，加入 700 μ l Wash Solution 後離心 (12,000 rpm, 1 min)，再加入一次 700 μ l Wash Solution 後離心 (12,000 rpm, 10 min)。丟棄下部之收集管，並將上部的 Spin column 放至新離心管上，加入 40 μ l Elution solution (60 $^{\circ}$ C)，待 2 分鐘反應後離心 (12,000 rpm, 1 min)，最後去除上部 Spin column，存放於 -20 $^{\circ}$ C 下。

(二) 探針製備

取一已滅菌之離心管，於離心管中依序加入 1.8 μ l 去離子水、1 μ l NT buffer (DNA polymerase I buffer : DNase I buffer = 1:1)、0.8 μ l 0.5 mM dUTP、0.2 μ l 1M DIG/Biotin-dUTP、5 μ l Plasmid DNA、0.2 μ l DNA Polymerase I (10 u/ μ l, NEB)、1 μ l 1/800X DNase I (2 u/ μ l, NEB)，最後總體積為 10 μ l，於 15 $^{\circ}$ C 乾浴鍋中待作用 20 分鐘，過後將離心管置於冰上，取 1 μ l 進行電泳分析，若顯現之條帶過大，則再加入 1 μ l 1/800X DNase I，重複以上步驟至條帶集中在約 1000 bp 處，即可加入 1 μ l 3M NaOAc 及 200 μ l 99.8% EtOH，於 -20 $^{\circ}$ C 下進行沉澱一天。接著進行低溫離心 (12,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)，而後倒去 EtOH，再加入 200 μ l 99.8% EtOH，進行低溫離心 (12,000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C)，然後倒去 EtOH，倒扣離心管待

乾直至管內呈完全透明，最後加入 10 μ l FISH buffer 中，輕拍離心三次後即保存於-20 $^{\circ}$ C 下，待後續試驗步驟使用。

(三) 根尖固定及染色體製備

切取染色體數為 $2n = 11$ 之自交選拔品系 (本試驗選取品系 EP05)之剛萌發根尖，並參照前述根尖染色體觀察試驗中根尖固定之方法備妥材料。接著切下根尖前端白色部分，放入內含 30 μ l Enzyme buffer 的離心管中，待其作用 10 分鐘。接著移除 Enzyme buffer 並離心乾淨，加入 15 μ l CP solution (2% cellulase, 1% pectinase)，置於 37 $^{\circ}$ C 乾浴鍋中 4 小時。過後移除 CP solution，並加入 30 μ l 45% acetic acid，待其作用 10 分鐘，期間配製固定液(ethanol: acetic acid = 1:1)。接著移除 acetic acid，再加入 300 μ l 現配固定液，並利用吸量管將軟化之根尖與固定液均勻混合為細胞液。吸取 20 μ l 細胞液，滴於乾淨載玻片中央，再於相同位置滴上 15 μ l 的固定液，並以刻刀於載玻片背面刻劃出細胞液擴散邊界，待玻片靜置風乾後，以相位差顯微鏡檢查玻片上是否有合適可觀察染色體的細胞，並標記細胞群位置，接著將玻片放入乾燥箱中乾燥過夜，最後將玻片存放於防潮箱中，待後續試驗步驟使用。

(四) 探針雜合雜合訊號觀察

首先須進行脫水處理。將玻片依序進行以下步驟: 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0) 中 5 分鐘、4% formaldehyde 10 分鐘、2X SSC 中 5 分鐘、2X SSC 中 5 分鐘、70% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘。接著待玻片瀝乾後，才可進行變性(denature)處理，依序進行以下步驟：70% formamide (72 $^{\circ}$ C，2.5 分鐘)、70% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘，接著待玻片瀝乾後進行探針雜合。吸取 20 μ l 已備妥的 probe mixture [每玻片需先前置備好的 probe 1 (DIG)及 probe 2 (Biotin)各 2 μ l，FISH buffer 將體積補到 21 μ l，於 85 $^{\circ}$ C 下作用 10 分鐘，置於冰上 5 分鐘以上]，分散滴於載玻片上，並蓋上蓋玻片，以 rubber cement 封好邊緣，將玻片放入保濕盒中，並將其置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中 24 小時進行雜合反應。雜合過後，滑除蓋玻片，並快速放入 wash buffer (20% formamide)中 10 分鐘，接著依序進行 3 次 2X SSC 5 分鐘、4XT (4X SSC, 0.1% Tween 20) 5 分鐘的處理(以上處理均須於 37 $^{\circ}$ C，搖晃 80 下/分鐘之水浴鍋中進行)。接著於避光環境下於玻片上滴入備好之 50 μ l antibody mixture (0.25 μ l anti-dig-FITC 1/200X, 0.25 μ l avidin-rhodamine 1/200X, 50 μ l 4XT)，蓋上塑膠片後，放入保濕盒中並置於 37 $^{\circ}$ C 生長箱中 1 小時反應。滑除塑膠片後，經 3 次 4XT 5 分鐘(須於 37 $^{\circ}$ C，搖晃 80 下/分鐘之水浴鍋中進行)，晾乾玻片後加上 25 μ l DAPI (50 ng/ml)，蓋上蓋玻片後以指甲油進行封片，待乾後即可以螢光顯微鏡(Olympus, BX51, Japan)觀察或是存放於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，並須在 7 天內鏡檢及拍照記錄 (Olympus, DP72, Japan)。

結 果

一、扇形文心蘭各品系染色體數

本次試驗除 EP02 及 EP03 品系葉片上具斑紋外，其餘品系在植株性狀上並未有差異。品系 EP04-EP06 則未能觀察其花朵性狀，其餘品系之花朵性狀可參照圖 1。

在自交選拔品系中，EP01-EP05 之染色體數均為 $2n=11$ (圖 2A-E)，與目前學術界所認定的 $2n=12$ 有所差異。EP06 則為正常染色體數之四倍體，染色體數為 $2n=24$ ，但也有觀察到少數為 $2n=12$ 的細胞(圖 2F、G)；EP07 為異常染色體數的四倍體，染色體數為 $2n=22$ (圖 2H)。而在扇形文心蘭品種興大黃金上，則同時觀察到 $2n=11$ 及 $2n=22$ 的細胞，且有同一根尖中均觀察到相同染色體數，或是同一根尖同時具有不同染色體數細胞的情形存在(圖 2I、J)。在興大黃金的秋水仙素誘變選拔品系 EP11 中，則觀察到 $2n=20$ 的染色體數(圖 2K)；另一誘變選拔品系 EP12 之染色體數則為 $2n=21$ (圖 2L)。本次試驗所觀察到之各品系染色體數詳見表 1。

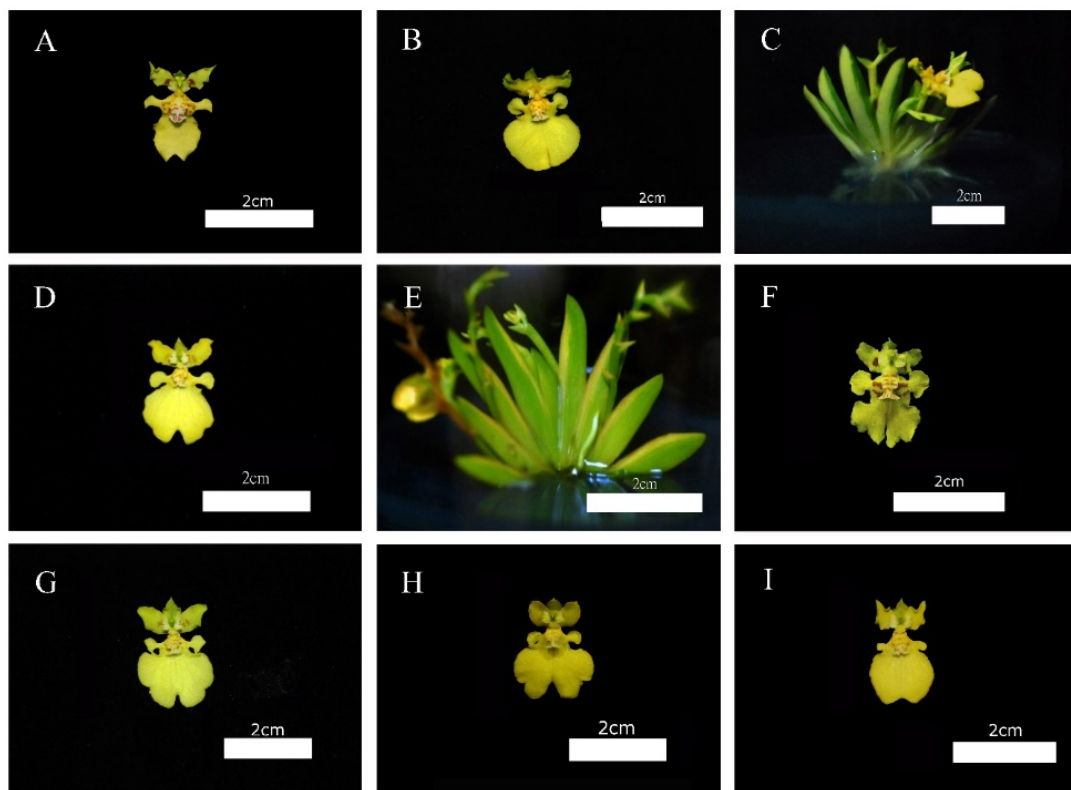


圖 1. 扇形文心蘭品系之花朵與植株性狀。

Fig. 1. Flower and plant character of *Erycina pusilla* lines.

(A) EP01; (B), (C) EP02; (D), (E) EP03; (F) EP07; (G) 'Hsinda Golden'; (H) EP11; (I) EP12.

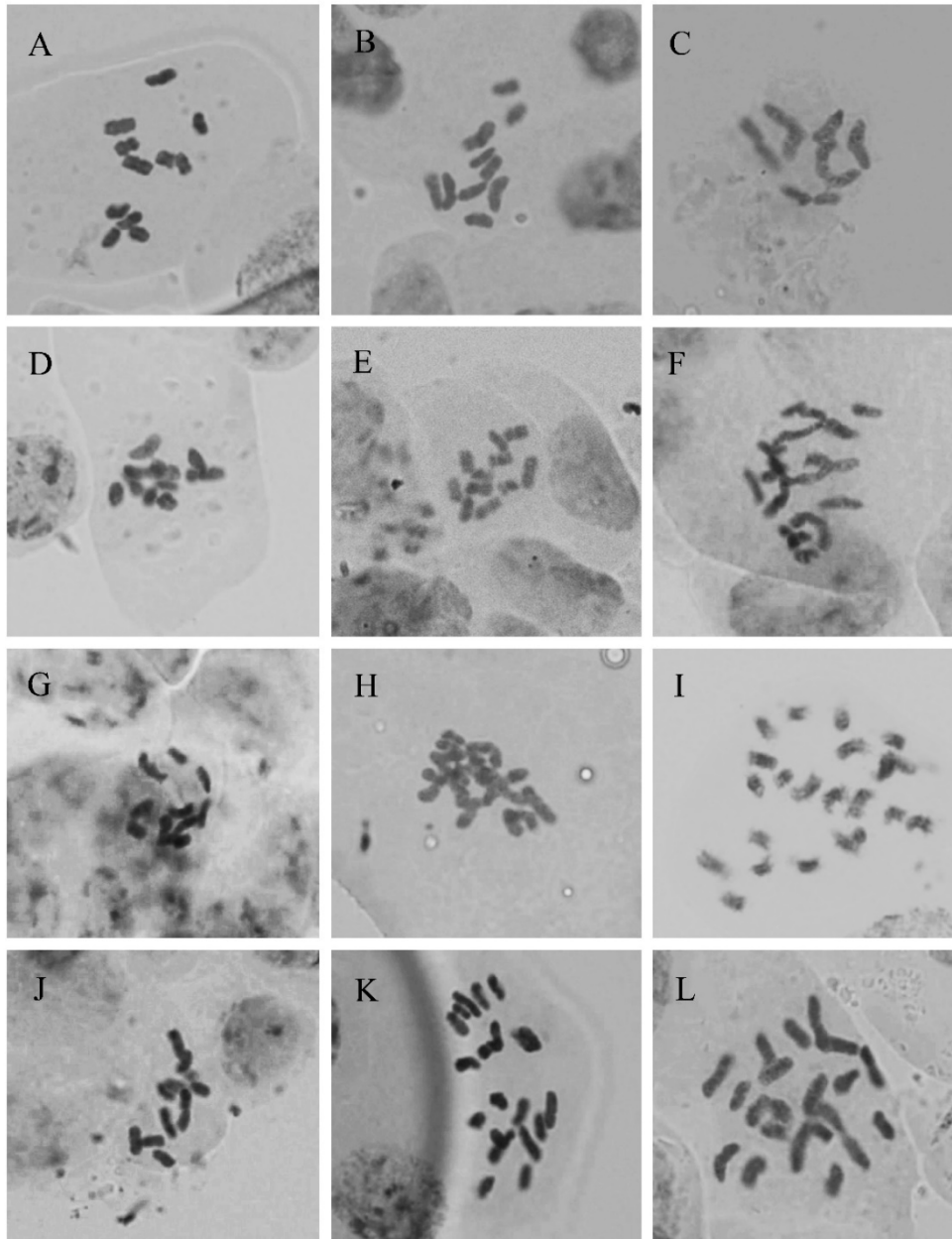


圖 2. 扇形文心蘭品系之染色體觀察。

Fig. 2. The chromosome observation of *Erycina pusilla* lines and cultivar.

(A) EP01, $2n=11$; (B) EP02, $2n=11$; (C) EP03, $2n=11$; (D) EP04, $2n=11$; (E) EP05, $2n=11$;
(F) EP06, $2n=24$; (G) EP06, $2n=12$; (H) EP07, $2n=22$; (I) 'Hsingda Golden', $2n=22$; (J)
'Hsingda Golden', $2n=11$; (K) EP11, $2n=20$; (L) EP12, $2n=21$.

二、扇形文心蘭各類型品系之核型組成

自交選拔品系 EP01 之核型中包含 7 條中位中節染色體及 4 條次中位中節染色體；自交選拔品系 EP02 及 EP03 之核型則為 11 條中位中節染色體；品種興大黃金之 $2n=22$ 細胞之核型中包含 14 條中位中節染色體及 8 條次中位中節染色體， $2n=11$ 細胞之核型中則包含 7 條中位中節染色體、2 條次中位中節染色體以及 2 條近末端中節染色體；化學誘變品系 EP11 之核型中包含 18 條中位中節染色體及 2 條次中位中節染色體，EP12 之核型則包含 15 條中位中節染色體及 6 條次中位中節染色體 (表 2)。

三、5S 及 45S rDNA 序列定位結果

圖 3 為扇形文心蘭自交品系 EP05 之雜合定位結果，該品系染色體上 5S rDNA 位點僅有一個，位於染色體近末端 (圖 3A)；此品系染色體上 45S rDNA 位點則有二個，同樣位於染色體之末端 (圖 3B)。而在圖 3 (C)中也顯示 5S 及 45S rDNA 並未有位在同一處或同一染色體上的現象。

表 2. 扇形文心蘭品系及品種之染色體數及核型特性。

Table 2. The chromosome number and karyotype character of *Erycina pusilla* lines and cultivar.

Investigation item	Line code/cultivar name					
	Self-crossing selected lines			Self-crossing selected cultivar	Chemical mutation selected lines ^x	
	EP01	EP02	EP03	<i>Erycina pusilla</i> 'Hsinda Golden'	EP11	EP12
Chromosome number ^z	11	11	11	22/11	20	21
Karyotype constitution ^y	7M+4Sm	11M	11M	14M+8Sm/7M+2Sm+2t	18M+2Sm	15M+6Sm

^z The chromosome number of diploid (2n).

^y Letter 'M' indicates chromosome with arm ratio 1.0-1.7 ; 'Sm' indicates chromosome with arm ratio 1.8-3.0 ; 't' indicates chromosome with arm ratio 3.1-7.0 ; 'T' indicates chromosome with arm ratio 7.1-∞.

^x Colchicine-induced mutation of *Erycina pusilla* 'Hsinda Golden'.

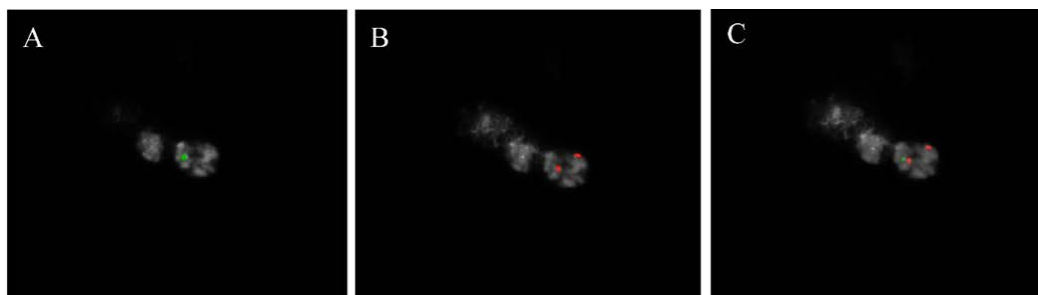


圖 3. 扇形文心蘭品系 EP05 之 5S 及 45S rDNA 之有絲分裂中期染色體定位結果。

Fig. 3. The 5S and 45S rDNA loci on mitotic metaphase chromosome of the *Erycina pusilla* line code EP05.

(A) 5S rDNA (green); (B) 45S rDNA (red); (C) Merged image of 5S and 45S rDNA loci.

討 論

一、扇形文心蘭染色體數之變異原因探討

自交選拔品系 EP01-07 中，所觀察到的染色體數多為 $2n=11$ ，與學界認知的染色體數 $2n=12$ 有所不同。同時也觀察到在各類型品系及品種之核型組成也不盡相同。在 Yeh 等人 (2015; 2017b) 的報導中，確定了 $2n=10$ 細胞型 (cytotype) 存在。兩細胞型在外觀上並沒有差異，兩者互交後可以獲得染色體數 $2n=11$ 的子代。然而本次所觀察到具有 $2n=11$ 染色體數的品系均為親本自交所獲得，且親本之染色體數已確認為 $2n=12$ ，因此其染色體數變異原因並非來自不同細胞型間的雜交。此外 Yeh 等人 (2017b) 也指出扇形文心蘭之染色體間的重排事件繁多，這可能影響到自身的遺傳穩定性。而本次試驗中在 EP01-EP05 上所觀察到的染色體數變異為 $2n=11$ 的結果，也可能是透過染色體重排的機制演變而來。這些染色體重排事件可能發生於有性生殖中減數配子產生及營養繁殖之細胞分裂的過程。

減數配子生成時，同源染色體間會發生聯會及同源重組，此一機制可能使染色體之長度及組成等特性發生改變。後續配對時除依靠外觀及大小進行配對外，也可能依照同源染色體片段來進行配對，因此如同源片段重組至其他染色體上，可能造成三條染色體配對的情形，造成不對等減數分裂，導致具有非常態性單套染色體數的配子產生，該配子再與正常的單套配子結合後，便可能產生染色體數異常的子代 (Schubert and Rieger, 1985; Schubert and Lysak, 2011)。另一方面瓶內培養的環境、培養基成分，以及培養對培植體細胞分裂週期所造成的影響等因素均可能誘發培植體產生變異，其中也包括了染色體數的改變 (Bairu et al., 2011)。Devi 等人 (2015) 以印度豬籠草 (*Nepenthes khasiana*) 進行莖節瓶內

扦插對遺傳穩定性(genetic fidelity)的影響的研究中，也發現經過多次的培養再生後，培植體中含有的變異染色體數的細胞顯著增加。Sacristan (1971)也在還陽參屬 (*Crepis capillaris*) 經癒傷組織 (callus)所增殖出來的後代中發現相同情況，比對變異細胞與正常細胞的染色體核型後也顯示確實有染色體重排的情形發生。這些變異可能是因分裂過程中，紡錘體受到干擾進而造成著絲時的錯誤，抑或是染色體的斷裂等情形造成。其中染色體斷裂的位點通常會位於染色體較晚開始複製的區塊，如異染色質豐富處、中節處 (Sacristan, 1971; Devi et al., 2015)。本次試驗中，在扇形文心蘭各品系中除了觀察到染色體數的變異外，也發現各品系的核型組成也有所差異，可能也可作為發生染色體重排的一個佐證。

二、5S 及 45S rDNA 定位結果比對

根據本次原位雜合結果，可確認品系 EP05 核型中共具 1 個 5S rDNA 及 2 個 45S rDNA 位點，比對 Yeh 等人 (2017b)所建構的兩細胞型核型圖譜後，可發現品系 EP05 之核型與 $2n=12$ 之細胞型較為接近，主要差異點就在於 5S rDNA 位點為一個而非一對，因此可推斷品系 EP05 染色體數之變異是因帶有一 5S rDNA 的染色體遺失。其原因可能牽涉前述所提到的染色體重排，扇形文心蘭核型中的染色體在大小上並未相差甚大，如在繁殖及培養的過程中發生重排，而後又在減數分裂時發生配對上的錯誤，極有可能造成染色體數變異 (Schubert and Rieger, 1985; Schubert and Lysak, 2011)。除了染色體之間結構的交換外，減數分裂或有絲分裂過程中如紡錘體或著絲時的失誤也可能參與其中 (Bairu et al., 2011)。然而目前仍需後續試驗確定其他品系的染色體數變異是否也來自染色體的遺失。

三、扇形文心蘭倍體數變異原因之探討

品系中染色體數異常的狀況，除了染色體數減少外，在品系 EP07、興大黃金中則觀察到異常染色體數的四倍體 ($2n=22$)的情形，以下針對可能造成多倍體化之因素進行探討。在有性生殖上，未減數配子 (unreduced gamete)的產生可能驅使物種的多倍體化。以 *Phalaenopsis* Taipei Gold 為例，其親本為 *Phal. Glady's* Read (4X)及 *Phal. venosa* (2X)。在兄弟株中，*Phal. Taipei Gold 'STM'* (3X)與 *Phal. Taipei Gold 'Gold Star'* (4X)分別為不同倍體數，可推測在親本雜交所用的減數配子中有未減數配子的存在 (Lee et al., 2020)。Chung 等人(2013)也在 *Lilium auratum* × *L. henryi* Hybrid 所產生的減數配子中發現其中具一定比率的未減數配子。而在阿拉伯芥上則發現某些基因 (ex: *cyc1;2/tam*、*osd1*、*Atps1*、*tes/stud*)的突變株會使減數分裂產生未減數配子的頻率提升，且各個基因突變後，均影響減數分裂過程中的不同時期 (Brownfield and Köhler, 2011)。而在營養繁殖方面，內生多倍體化之特性可能為影響多倍體化之主要因子之一。內生多倍體化的程度在植體上之分布可能隨著植物種類、組織部位及環境因子而不同 (Barow, 2006)，本次試驗於 EP06 及興大黃金上所觀察到品系內包含不同染色體數細胞的現象可能也與此有關。相關研究以白蝴蝶蘭 (*Phal. aphrodite* subsp. *formosana*)作為試驗樣本，發現其內生多倍體化分布具有發育階段及組織

的特異性，並利用此一特性，配合截切原球體誘導 PLB 生成之處理，順利誘導出多倍體化的植株 (Chen *et al.*, 2009; 2011)。一些蝴蝶蘭商業品種在經過了大量的無性繁殖後，出現了許多花朵或植株性狀變異的單株，進一步分析這些單株，與正常植株比對後，發現確實在異常單株之變異組織中有較為顯著的內生多倍體化情形 (Lee *et al.*, 2016; 2017)。以上研究結果顯示，在大量微體繁殖技術的應用下，是有一定的機率使培植體之倍體數抑或是內生多倍體化情形發生改變的，進而影響到後續植株的性狀表現。

參 考 文 獻

- 林依潔。2013。扇形文心蘭誘變育種。國立中興大學園藝學系碩士論文。76pp。
- 馮滢茹。2014。玉米變異 B 染色體的特性分析。國立中興大學農藝學系碩士論文。67pp。
- Bairu, M. W., A. O. Aremu, and J. Van Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63(2): 147-173.
- Barow, M. 2006. Endopolyploidy in seed plants. *Bioessays* 28(3): 271-281.
- Brownfield, L. and C. Köhler. 2011. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *J. Exp. Bot.* 62(5): 1659-1668.
- Chen, W. H., C. Y. Tang, and Y. L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 98(2): 229-238.
- Chen, W. H., C. Y. Tang, T. Y. Lin, Y. C. Weng, and Y. L. Kao. 2011. Changes in the endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* (Orchidaceae). *Plant Sci.* 181(1): 31-38.
- Chiu, Y. T., C. S. Lin, and C. Chang. 2011. *In vitro* fruiting and seed production in *Erycina pusilla* (L.) NH Williams and MW Chase. *Propag. Ornam. Plants* 11: 131-136.
- Chung, M. Y., J. D. Chung, M. Ramanna, J. M. Van Tuyl, and K. B. Lim. 2013. Production of polyploids and unreduced gametes in *Lilium auratum* × *L. henryi* hybrid. *Int. J. Biol. Sci.* 9(7): 693.
- Devi, S. P., S. Kumaria, S. R. Rao, and P. Tandon, 2015. Genetic fidelity assessment in micropropagated plants using cytogenetical analysis and heterochromatin distribution: a case study with *Nepenthes khasiana* Hook f. *Protoplasma* 252(5): 1305-1312.
- Dodson, C. 1957a. Chromosome number in *Oncidium* and allied genera. *Am. Orchid Soc. Bull.* 26:323-330.
- Dodson, C. 1957b. *Oncidium pusillum* and its allies I. *Am. Orchid Soc. Bull.* 26:170-172.
- Felix, L. P. and M. Guerra. 1999. Chromosome analysis in *Psychomorphis pusilla* (L.) Dodson and Dressier: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. *Caryologia* 52: 165-168.

- Felix, L. P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. Genet. Mol. Biol. 23: 957-978.
- Lee, H. J., Y. E. Kim, Y. J. Yoon, C. S. Jeong, M. L. Lian, K. Y. Paek, and S. Y. Park. 2016. Highly endoreduplicated floral organs of somaclonal variants in clonally propagated *Phalaenopsis* 'Spring Dancer'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 126: 67-77.
- Lee, H. J., Y. J. Yoon, K. Y. Paek, and S. Y. Park. 2017. Endoreduplication and gene expression in somaclonal variants of clonally propagated *Phalaenopsis* 'Wedding Promenade'. Hortic Environ Biotechnol. 58(1): 85-92.
- Lee, Y. I., Y. F. Tseng, Y. C. Lee, and M. C. Chung. 2020. Chromosome constitution and nuclear DNA content of *Phalaenopsis* hybrids. Sci. Hortic. 262: 109089.
- Livingston, R. B. 1962. *Oncidium pusillum* blooming in flask. Am. Orchid Soc. Bull. 31: 1007.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.
- Sacristan, M. D. 1971. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Chromosoma 33(3): 273-283.
- Schubert, I. and R. Rieger. 1985. A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. Theor. Appl. Genet. 70(2): 213-221.
- Schubert, I. and M. A. Lysak. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. Trends Genet. 27(6): 207-216.
- Sheehan, T. and M. Sheehan. 1989. Orchid genera illustrated 127-*Psychmorchis*. Am. Orchid Soc. Bull. 58: 24-25.
- Williams, N. H., M. W. Chase, T. Fulcher, and W. M. Whitten. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). Lindleyana 16:113-139.
- Yeh, H. Y., C. S. Lin, and S. B. Chang. 2015. Cytogenetic and cytometric analyses in artificial intercytotypic hybrids of the emergent orchid model species *Erycina pusilla*. Euphytica 206(2): 533-539.
- Yeh, H. Y., C. S. Lin, and S. B. Chang. 2017a. Chromosome Number Variation in the Emergent Orchid Model Species *Erycina pusilla*. In: Orchid biotechnology III. W.H. Chen and H.H. Chen (eds.). World Scientific Publishing Co Pte Ltd. pp. 51-60.
- Yeh, H. Y., C. S. Lin, H. de Jong, and S. B. Chang. 2017b. Two reported cytotypes of the emergent orchid model species *Erycina pusilla* are two different species. Euphytica 213(10): 233.

The Chromosome Number Analysis of *Erycina pusilla* Lines and Cultivar

Tzu-Ping Chuang¹⁾ Ya-Ming Cheng²⁾ Chang-Tsern Chen³⁾ Chen Chang⁴⁾

Key words : *Erycina pusilla*, chromosome, karyotype, fluorescent *in situ* hybridization

Summary

The chromosome number of *Erycina pusilla* is $2n = 12$. Studies have confirmed that other cytotypes ($2n = 10$) exist in nature, and the karyotype pattern of two cytotypes had been set up. Our laboratory have many *Erycina pusilla* lines. By using root tip staining technique and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), the karyotype traits of these lines can be identify. The experimental lines include self-crossing selection lines, cultivar, and chemical mutation selection lines. The results show that chromosome number of most self-crossing selection lines are not $2n = 12$, but rather $2n = 11$. For other lines, it is $2n = 20, 21, 22, 24$, and karyotype constitutions between lines are varied. The FISH result in self-crossing selection line EP05 indicates that one chromosome with 5S rDNA is lost. These results indicates that itself complicated chromosome rearrangement in karyotype may enhance probability of chromosome pairing error. In addition, long-time *in vitro* culture may influence meiosis and mitosis and result in genetic change.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University.

3) Research Fellow, Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute.

4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

遮光對荷蘭薄荷光合作用及生長之影響

簡 文 婕¹⁾ 陳 錦 木²⁾

關鍵字：遮光、光合作用、荷蘭薄荷

摘要：荷蘭薄荷 (*Mentha spicata* L.)為臺灣居家常見盆栽，本試驗以荷蘭薄荷 5 寸盆栽為材料，進行三種遮光處理並以露天為對照，分別為遮光 0%、34%、51% 及 77%。與對照組相比，於遮光 77%下處理 43 天後，荷蘭薄荷之莖長、節間長及葉面積分別提升 2.3 倍、4.1 倍及 3.5 倍。葉片厚度則是在遮光 0%下最厚，為 1.28 mm，隨著遮光程度增加葉片厚度減少。葉片電解質滲透率則隨遮光程度增加而減少，遮光 0%時數值最高，為 53.52%。SPAD-502 值則隨遮光程度增加呈現先上升後下降的變化。在遮光 34%的條件下荷蘭薄荷具有最高的最大光合作用速率 $12.12 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，高於露天對照組 $9.26 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

前 言

隨著都市發展，高樓林立，市區內可供種植面積逐漸縮小 (劉等, 2014)。室內、陽臺、露臺或家庭庭院種植皆屬都市園藝範疇，其栽培環境隨建築樣態不同而有複雜的環境條件 (吳和沈, 2010)。都市之建築物密度提高及規模擴大，影響建築物採光 (Leslie, 2003)。據李雅君 (2016b)調查目前臺北市市民在家栽培植物環境多為陽台，其次是屋頂，植物生長受日光的影響，光線因照射到太陽的時數隨建物坐落方向及是否有鄰近建物的遮擋而有不同，在城市中更為明顯 (Song *et al.*, 2018; Tan and Ismail, 2014)。與全日照環境相比，建築物互相遮擋會使光合作用有效輻射 (Photosynthetically active radiation; PAR)降低大約 50% (Taib *et al.*, 2019)。若將植株於屋頂等空間種植，通常會受到陽光直射，Fujita (2001)提到大多數植物在夏天於高溫 and 強風的作用下，承受著極度高溫和乾旱的壓力環境。臺灣地處亞熱帶地區，這種夏季高光強度也是都市園藝需要考慮的因素。為了提高作物產量及產品品質，確定最佳或最低的光照需求是非常重要的。

1) 國立中興大學園藝學系研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授、通訊作者。

食用盆栽近年來已成為居家種植的新趨勢。食用盆栽的概念與可食地景 (edible landscaping)相似，兼具食物生產與環境綠化功能，符合現代人多目標的需求特性 (Castro *et al.*, 2018；謝，2018)。

荷蘭薄荷因其濃郁香氣、生長快速及具多樣化食用性等特點，為台灣居家常見盆栽之一，但常因光線環境不佳而生長不良。本試驗選用五寸之荷蘭薄荷盆栽，於三種遮光下進行處理，並以露天栽培作為對照，進行生長與形態調查及光合參數的測量，以找出居家種植綠薄荷之適宜光環境。

本試驗建立荷蘭薄荷盆栽作物對遮光環境之形態及生理資訊，供未來研究、推廣及篩選都市園藝作物時之參考。

材 料 方 法

一、植物材料

荷蘭薄荷 3.5 寸黑軟盆苗購自台中市神岡區京府園藝，於 108 年 3 月 4 日換盆至盆徑 14.7 cm，盆高 13.2 cm 之磚紅色硬質塑膠盆中，介質為泥炭土 (TS4, Klasmann-Deilmann, Germany)：珍珠石 (KMAUF，荷蘭)=3：1 混合。待其馴化適應後於 108 年 3 月 11 日移至試驗場地進行處理。試驗期間每盆施用 14N-11 P₂O₅-13 K₂O 之緩釋肥 (新好康多 1 號 180 天，Hi-Control®, Shizuoka, Japan)5 g 以及每兩週施用 1,000 倍之 Peters 速效性肥料 (20N-20P₂O₅-20K₂O)。植物依水分需求 2~3 天人工澆水一次，並視情況噴灑藥劑防治病蟲害。

二、試驗處理

試驗地點於國立中興大學園藝試驗場葡萄中心之大網室內，床架上以鐵架設有 180 cm 長×120 cm 寬×190 cm 高之空間，以 50%與 70%黑色針織網 (金櫃園藝資材公司,苗栗縣,臺灣)覆蓋，以網室外露天栽培作為對照組，製造四種不同光度環境，分別為露天對照、網室內未遮光處理、網室內 50%黑色針織網覆蓋及 70%黑色針織網覆蓋，實際遮光比率分別為 0% (全日照)、34%、51%及 77%。試驗期間各處理以光度及溫度感應器 (HOBO® Pendant® MX Temperature/Light Data Logger MX2202, Onset, USA)紀錄氣象資料，每 15 分鐘紀錄一筆。

三、調查項目

1. 生長形態調查

- (1) 莖長：由介質表面至枝條頂端之長度。
- (2) 節間長：以尺測量距頂端大約五公分處之節間長度。
- (3) 葉面積：摘取葉片後鋪平，以數位相機拍攝，再利用 image J (National Institute of Health, Md., USA)軟體進行圖像分析，計算葉面積。

- (4) 葉片長寬：以尺測量葉片最長及最寬位置。
- (5) 葉片厚度：以游標尺測量成熟葉片之厚度。
- (6) 葉綠素計讀值：以葉綠素計 (SPAD-502 plus, Minolta Co., Tokyo, Japan) 隨機測量三片完全展開葉並取平均值，測量時避開葉脈，以免影響儀器判讀。原理是利用葉片對650 nm及940 nm兩種波長之吸收率的差異，來估算葉綠素之相對含量。
- (7) 地上部乾鮮重：取植株所有地上部 (莖及葉) 進行測量，途中噴水並以密封之夾鏈袋盛裝，防止樣品失水。先秤取鮮重，再放置於牛皮紙袋中以70°C烘乾72小時至樣品完全乾燥，再秤取其乾重。
- (8) 葉片電解質滲漏率：取一片葉圓片 (直徑1.2 cm) 放入EC瓶中，並加入10 ml純水，以100 rpm震盪3小時後，以電導度計 (electrical conductivity meter, SC-2300, SUNTEX, Taiwan) 測定初始電導度 (initial electrical conductivity, EC_0)；再將EC瓶置於-20 °C下，以低溫破壞其膜體系統，三天後取出解凍再次以100 rpm震盪3小時，測定其最大電導度 (maximum electrical conductivity, EC_1)。計算公式： $EC (\%) = (EC_0/EC_1) \times 100 \%$ 。
- (9) 生長勢：試驗期間每星期調查荷蘭薄荷之莖長並記錄，連續調查直至試驗結束。

2. 葉片之光合作用測定

於0800 HR至1500 HR測量植株之淨光合作用，以可攜式光合作用測定儀 (LI-6400, Li-Cor, Lincoln, Nebr., USA) 紀錄各處理之展開新成熟葉 (由頂芽往下數約第三至第四對葉) 之淨光合作用速率。以葉夾夾取葉片進行測量，每處理3重複。葉箱中使用紅藍光光源，控制葉箱內光度為0、5、25、50、100、200、400、500、700、1,000、1,500及2,000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，葉溫設定為 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，利用乾燥劑silica gel (sorbead orange chameleon, Engelhard, USA) 調控葉箱內濕度。流速控制為500 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ，以大氣中輸入 CO_2 濃度為 $410 \pm 10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，植物材料使用之葉夾面積為6 cm^2 ，葉箱中平均濕度控制在 $60 \pm 3\%$ 。

在光度為0、5、25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 之淨光合作用速率與光量進行直線迴歸($y = y^0 + ax$)， y^0 為暗呼吸速率 (dark respiration rate, R_d)， a 為光量子效率， y^0/a 計算為光補償點。在光度為0、5、25、50、100、200、400、500、700、1,000、1,500及2,000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 測得之淨光合作用速率與光量進行曲線迴歸 ($y = y^0 + a [1 - e^{(-bx)}]$)。曲線計算該葉片測得的最大淨光合作用速率 (A_{max})數值乘以95%為光飽和光合作用速率 (light saturated rates of photosynthesis, A_{sat})，該數值對應之光量即為光飽和點 (light saturation point, LSP)。計算公式如下所列：

$$A_{\text{sat}} = [y^0 + a \cdot (1 - 0)] \cdot 0.95$$

$$\text{LSP} = \ln[1 - (A_{\text{sat}} - y^0)/a] / (-b)$$

$$\text{LCP} = y^0/a$$

四、統計分析

本試驗採隨機完全區集設計 (Randomized Complete Block design, RCBD) 四種光照強度，每處理3重複，每重複6株。試驗之數據以統計軟體SAS (version 9.0, Cary, NC, USA)

進行分析，以ANOVA (analysis of variance)變方分析判別顯著性，並以LSD (least significant difference)進行多重比較。

結 果

一、遮光程度對荷蘭薄荷植株形態之影響

遮光處理43天後，荷蘭薄荷莖長及節間長隨遮光程度提高而增加，0%遮光處理後其株高為31.83 cm，34%、51%及77%遮光處理後莖長分別為41.27、60.40及73.60 cm (表1)，各處理間有顯著差異。節間長的變化趨勢與莖長相同，0%遮光處理後其節間長為1.26 cm，77%遮光處理後節間長最長，為5.26 cm，各處理間有顯著差異 (表1)。各處理期間薄荷之莖長變化如圖1所示。不同遮光處理之植株全株形態之差異如圖2所示，於遮光77%下薄荷莖為匍匐生長。

葉片之長、寬及葉面積一樣隨著遮光程度增加而提升 (表1、圖3)，遮光0%之葉面積為3.19 cm²，遮光34%、51%及77%之葉面積分別為7.82、10.39及11.39 cm²，遮光後葉面積顯著高於對照組，且各處理間成顯著差異 (表1)。葉片厚度則是在遮光0%下最厚，為1.28 mm，隨著遮光程度增加葉片厚度減少，34%、51%及77%遮光處理之葉片厚度分別為0.96、0.75及0.45 mm，各處理間成顯著差異 (表1)。結果顯示遮光後之葉片SPAD-502值高於遮光0%之數值，51%遮光處理下薄荷葉片有最高之SPAD-502值，數值為32.67 (表1)。不同遮光處理之葉片形態之差異如圖3所示。

表 1. 遮光程度對荷蘭薄荷處理 43 天後植株形態之影響。

Table 1. Effect of different shading percentage on plant growth of *Mentha spicata* after treatments for 43 days.

Shading level(%)	Stem length (cm)	Node length (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf thickness (mm)	Leaf area (cm ²)	SPAD-502 value
0	31.83 d ^z	1.26 d	3.45 d	1.99 d	1.28 a	3.19 d	29.97 c
34	41.27 c	1.92 c	3.94 c	2.59 c	0.96 b	7.82 c	31.57 b
51	60.40 b	3.04 b	4.88 b	3.16 b	0.75 c	10.39 b	32.67 a
77	73.60 a	5.26 a	5.60 a	3.74 a	0.45 d	11.39 a	31.63 b

^z different letters indicate significant differences between treatment by Fisher's least significant difference at $p \leq 0.05$.

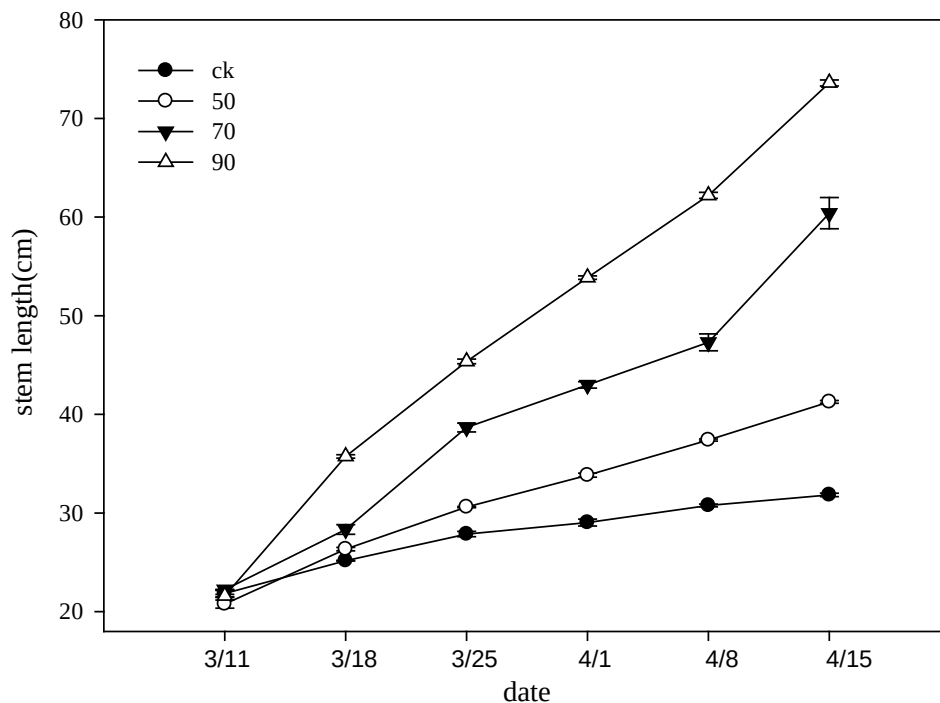


圖 1. 不同遮光程度下荷蘭薄荷莖長變化。

Fig. 1. Variation of stem length of *Mentha spicata* under different shading degree.

鮮重隨遮光程度提升呈先增加後減少的趨勢，遮光 0%、34%、51%及 77%之鮮重分別為 37.20、38.92、45.25 及 23.21 g，遮光 34%及 51%之鮮重顯著高於對照組，但乾重則是遮光 0%數值最高，為 10.20 g(表 2)。葉片電解質滲漏率則隨遮光程度增加而減少，遮光 0%時值最高，為 53.52%，遮光 51%及 77%之葉片電解質滲漏率分別為 42.73%及 42.83%，兩者間無顯著差異 (表 2)。

二、葉片光合作用曲線之影響

遮光處理 43 天後，荷蘭薄荷之葉片淨光合作用值在光度 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以下隨光度增加而快速增加，接著漸漸增加並達到最大值，未觀察到光抑制反應。荷蘭薄荷於遮光 34% 下其 Pn 值最高，其次是遮光 0%及 51%，遮光 77%時 Pn 值最低(圖 4)。結果顯示薄荷在遮光 34%時有最高之 LSP，為 $667.1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，其餘處理之 LSP 位於 $432\sim553 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之間，最大光合作用速率同樣是遮光 34%之處理最高，為 $12.12 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，顯著高於其他處理。各處理下光量子效率則介於 $0.040\sim0.047 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$ 之間，顯著高於遮光 77%之光量子效率 $0.023 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$ (表 3)。

表 2. 遮光程度對荷蘭薄荷處理 43 天後地上部鮮、乾重及葉片電解質滲漏率之影響。

Table 2. Effect of different shading percentage on shoot fresh weight, shoot dry weight, electrolyte leakage in *Mentha spicata* after treatments for 43 days.

Shading level(%)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Electrolyte leakage (%)
0	37.20 b ^z	10.20 a	53.52 a
34	38.92 b	6.45 b	45.58 b
51	45.25 a	6.45 b	42.73 c
77	23.21 c	2.19 c	42.83 c

^z different letters indicate significant differences between treatment by Fisher's least significant difference at $p \leq 0.05$.

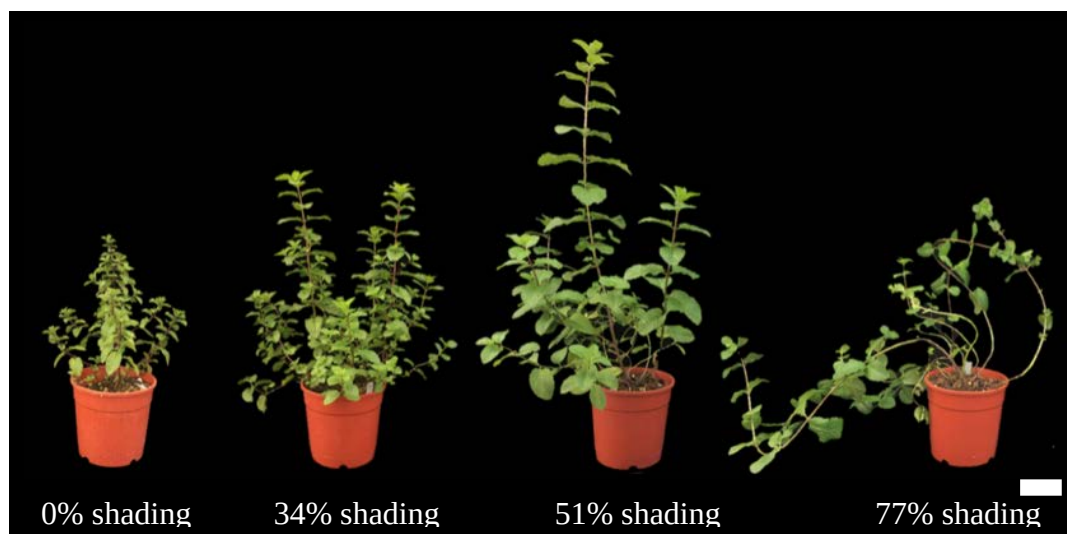


圖 2. 遮光程度對荷蘭薄荷植株形態之影響。

Fig. 2. Effect of shading level on the plant morphology of *Mentha spicata*. (bar = 5 cm).

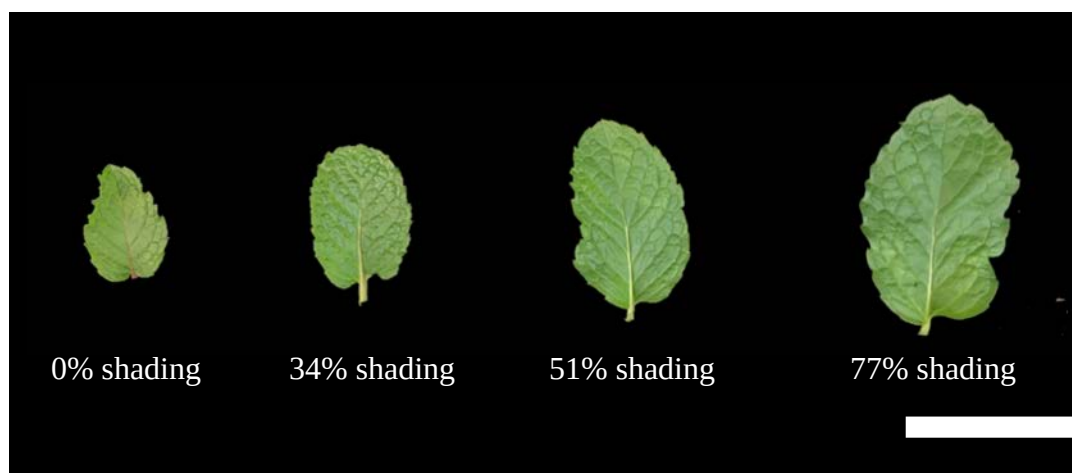


圖 3. 遮光程度對荷蘭薄荷葉片形態之影響。

Fig. 3. Effect of shading level on the leaf morphology of *Mentha spicata*. (bar = 5 cm).

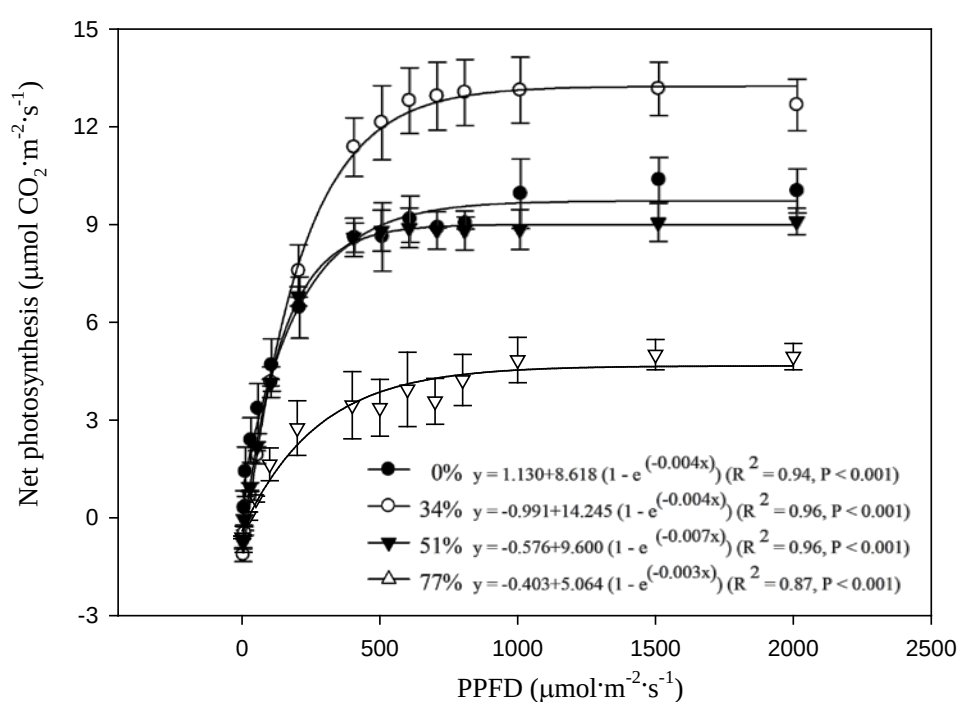


圖 4. 不同遮陰程度對荷蘭薄荷處理 43 天後光合作用曲線之影響。

Fig. 4. Effect of different shading degrees on photosynthesis curves of *Mentha spicata* treated for 43 days. Bars indicate standard error of the mean and were not visible if smaller than the symbol. (Experimental duration: 2019/5/31-2019/6/3).

表 3. 遮光程度對荷蘭薄荷之光補償點、光飽和點、最大光合作用速率、暗呼吸速率及光量子效率之影響。

Table 3. Effect of different shading percentage on light compensation points (LCP), light saturation point (LSP), light saturated rates of photosynthesis (Asat), dark respiration rate (Rd), and quantum yield (Φ) on *Mentha spicata*. (Experimental duration: 2019/5/31-2019/6/3).

	LCP	LSP	Asat	Rd	Φ
Shading level(%)	($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$)
0	0.91 d ^z	553.2 ab	9.26 b	1.05 a	0.040 a
34	15.10 b	667.1 a	12.12 a	-0.67 b	0.047 a
51	11.08 c	432.1 b	8.78 b	-0.48 b	0.046 a
77	26.70 a	437.8 b	4.20 c	-0.63 b	0.023 b

^z different letters indicate significant differences between treatment by Fisher's least significant difference at $p \leq 0.05$.

討 論

光是影響植物生長與發育的重要環境因子之一，為適應不同的光強度，會改變植株形態以獲取更多光源，達到最大光能使用 (Dou *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Zheng and Labeke, 2017)。本試驗結果顯示荷蘭薄荷莖長隨遮光程度增加而增加，於遮光77%時植株明顯較柔弱易倒伏。這種莖及節間長之增加可能原因為光線不足使植株徒長，或是在弱光環境中，植物為獲取充足的陽光，會增加莖部生長速度，從而引起節間明顯延長(Han *et al.*, 2015; Valladares and Niinemets, 2008)。另外隨遮光程度增加，參試植物之葉面積增加，此種變化有利於增加受光面積及便於光穿透葉綠體 (Han *et al.*, 2015; Zheng and Labeke, 2017)。

荷蘭薄荷葉片厚度有隨遮光程度上升而減少之情形，Son等 (2018)進行大白菜葉片結構的觀察時發現，在光照條件 $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 處理49天後，植株之葉片柵狀組織發育良好，細胞排列整齊緊密，柵狀組織形態呈矩形；在 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 之條件下，葉片柵狀組織形態異常或呈圓形，海綿組織細胞間隙明顯大且鬆散。此外，葉片厚度和柵狀薄壁組織的長度與光強度呈正相關。當PPFD從 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 增加到 $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 時，柵狀組織的長度和細胞數量增加。本次試驗結果與前人研究相似，在低光處理時植物之葉面積較大，但葉片厚度減少，這種變化為適應性的形態學特徵，可以減少植物於較高光強度下的水分喪失 (Deng *et al.*, 2012a; Han *et al.*, 2015; Zheng and Labeke, 2017)。

使用葉綠素讀值計 (SPAD-502)測量葉片之相對葉綠素含量及綠色程度，隨遮光程度增加葉片SPAD-502之值增大，推測是為了增進光利用效率，於適度遮光下之葉片葉綠素含量增加，造成葉片綠色程度提升 (Deng *et al.*, 2012b；Scuderi *et al.*, 2012)。這種葉色改變為光馴化(Light acclimation)現象，植物會調適其光合作用結構的構造及功能 (Valladares and Niinemets, 2008)。

試驗中荷蘭薄荷之鮮重測量結果顯示，適度遮光有利植株鮮重提升，荷蘭薄荷之鮮重隨光強度的下降呈增加後減少的趨勢，於遮光51%之鮮重最重。遮光會使株高及節間長明顯增加，影響葉片大小及厚度，而上述變化使植株易倒伏且柔軟脆弱，間接造成乾鮮重降低，另外過度遮光後植株因光合作用下降，乾物質累積不足導致生長緩慢，也是造成植株乾重下降的原因之一。

葉片電解質滲漏率為反應植物細胞膜受損程度的一項基本指標 (李和謝, 2012)。試驗結果顯示，荷蘭薄荷於遮光0%時其葉片電解質滲漏率為42%，顯著高於其他處理。說明在遮光0%全日照環境下之光強度或溫度環境對上述兩種作物而言過高，超出其光飽和點為一逆境，葉片電解質滲漏率是反映植物膜系統狀況的一個重要生理生化指標，強光及高溫皆可能造成荷蘭薄荷之細胞膜受損，膜蛋白受傷害因而使細胞質的胞液往外滲漏，導致膜通透性增大，進而使葉片電解質滲漏率增加。

植物為適應不同光環境除改變自身形態，其植株整體光合作用能力也有所改變，瞭解植株於不同光度下之光合作用反應為研究其對光適應性的生理基礎 (Deng *et al.*, 2012b)。由荷蘭薄荷之光合作用曲線得知，於遮光34%之Pn值大於遮光0%。Son等 (2018)在大白菜的實驗中提到，高光照引起了光抑制，比在低光度下更讓植物不適應，這種現象可能是由於過量光照造成氣孔暫時關閉，使光合作用能力下降。Fu等(2012)之萵苣實驗中提出，600及800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 使其Fv / Fm值下降，在100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 處理中反而沒有處於逆境的反應，表示強光會給予植物逆境，尤其在萵苣生長前期，植株處於逆境的環境下，Fv/Fm值下降代表PS II反應中心光傷害或是螢光消散增加，兩者為逆境干擾植物生理的指標。

本試驗中，荷蘭薄荷其光補償點隨遮光程度增加而增加，光飽和點及最大光合作用速率於遮光34%下最高，暗呼吸速率隨遮光程度增加而下降。通常耐陰能力較強的植物具有較低的光補償點以及較小的暗呼吸速率，這是因為在低光環境中，植物為保證自身能大量的積累有機物，及正常生命活動的進行，會降低光補償點以提高植物利用弱光的能力，同時降低呼吸速率，減少因呼吸而消耗有機物 (Deng *et al.*, 2012ab)。

食用盆栽作物兼具觀賞及食用價值，故其產量及外觀品質良好與否的主要指標，由試驗結果推薦荷蘭薄荷於遮光 34~51%下栽培，因此光度下生長之植株生長勢佳且不倒伏，且鮮重高，產量佳。

參考文獻

- 吳衛華、沈群。2010。庭園園藝-城市市區發展都市農業的最佳模式。農產品加工創新版 2010: 78-80。
- 李芸嫣、謝慶昌。2012。番木瓜葉片高溫逆境指標之比較。興大園藝 37: 13-23。
- 李雅君。2016b。都市導入可食地景策略與現況探索-以新北市為例。逢甲大學景觀與遊憩系碩士論文，臺北。139pp。
- 劉黃碧圓、李亭頤、洪進雄、許文燦。2014。都市農耕居家綠活園藝。科學研習 53: 16-23。
- 謝田富。2018。試述可食地景在園林景觀中的應用。綠色環保建材 1: 247-247。
- Castro, J., S. K. Ostoić, P. Cariñanos, A. Fini, and T. Sitzia. 2018. "Edible" urban forests as part of inclusive, sustainable cities. *Unasylva* 69: 59-65.
- Deng, Y., C. Li, Q. Shao, X. Ye, and R. Tang. 2012b. Differential responses of double petal and multi petal jasmine to shading: II. Morphology, anatomy and physiology. *Scientia Hort.* 144: 19-28.
- Deng, Y., C. Li, Q., Shao, X. Ye, and J. She. 2012a. Differential responses of double petal and multi petal jasmine to shading: I. Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol. Biochem.* 55: 93-102.
- Dou, H., G. Niu, M. Gu, and J. G. Masabni. 2018. Responses of sweet basil to different daily light integrals in photosynthesis, morphology, yield, and nutritional Quality. *HortScience* 53: 496-503.
- Fu, W., P. Li, and Y. Wu. 2012. Effects of different light intensities on chlorophyll fluorescence characteristics and yield in lettuce. *Scientia Hort.* 135: 45-51.
- Fujita, S. 2001. Construction method and assignment of rooftop and wall-surface greening. *J. Japan Soc. Reveget. Tech.* 27: 407-412.
- Han, S., J. Jiang, H. Li, A. Song, S. Chen, and F. Chen. 2015. The differential response of two chrysanthemum cultivars to shading: photosynthesis, chloroplast, and sieve element-companion cell ultrastructure. *HortScience* 50: 1192-1195.
- Leslie, R. P. 2003. Capturing the daylight dividend in buildings: why and how? *Build. Environ.* 38: 381-385.
- Li, A., S. Li, X. Wu, J. Zhang, A. He, G. Zhao, and X. Yang. 2016. Effect of light intensity on leaf photosynthetic characteristics and accumulation of flavonoids in *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun. (Fagaceae). *Open J. For.* 6: 445-459.
- Scuderi, D., F. Giuffrida, S. Toscano, and D. Romano. 2012. Growth, physiological response, and quality characteristics of weeping fig in response to shading levels and climatic conditions.

- HortScience 47: 1586-1592.
- Son, I. C., K. H. Moon, E. Y. Song, S. H. Wi, H. H. Seo, Y. E. Moon, V. Reddy, J. Yang, R. Sicher, and S. Oh. 2018. Growth and physiological responses of chinese cabbage to different light intensity until leafy head formation. Hort. Sci. Technol. 36: 151-160.
- Song, X. P., H. T. Tan, and P. Y. Tan. 2018. Assessment of light adequacy for vertical farming in a tropical city. Urban For. Urban Green. 29: 49-57.
- Taib, N., Z. Ali, A. Abdullah, F. S. Yeok, and R. Prihatmanti. 2019. The performance of different ornamental plant species in transitional spaces in urban high-rise settings. Urban For. Urban Green. 43: 126393.
- Tan, P. Y. and M. R. B. Ismail. 2014. Building shade affects light environment and urban greenery in high-density residential estates in Singapore. Urban For Urban Green 13: 771-784.
- Valladares, F. and Ü. Niinemets.. 2008. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 39: 237-257.
- Zheng, L. and M. C. Van Labeke. 2017. Chrysanthemum morphology, photosynthetic efficiency and antioxidant capacity are differentially modified by light quality. J. Plant Physiol. 213: 66-74.

Effects of Shading on Photosynthesis and Growth of *Mentha spicata*.

Wun-Jie Jian¹⁾ Chin-Mu Chen²⁾

Key words : Shading, Photosynthesis, *Mentha spicata*

Summary

Mentha spicata L. is a common potted plant in Taiwanese homes. In this experiment, a 5-inch potted spearmint plant was used as the material and subjected to shading treatment and the open air as a control. The shading was 0%, 34%, 51% and 77%, respectively. In comparison, the stem length, internode length and leaf area of spearmint increased by 2.3 times, 4.1 times and 3.5 times respectively after being treated with 77% shading for 43 days. The leaf thickness is the thickest under 0% shading, which is 1.28 mm, the thickness of the leaf decreases with the increase of shading degree, and the leaf electrolyte leakage decreases with the increase of shading degree. The value is the highest at 0% shading, which is 53.52%. The SPAD-502 value first increases and then decreases with the increase of shading degree. Under the condition of shading 34%, the spearmint has the highest maximum photosynthesis rate of $12.12 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, which is higher than the open-air control group of $9.26 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

興大園藝

第四十五卷 第四期

- 控釋肥與有機質複合肥肥效釋放之研究
.....楊曜謙 宋 好..... 1
- 塑膠地膜覆蓋對花胡瓜生長及產量之影響
.....戴俊成 黃三光.....15
- 香石竹倍數性與植物特徵及細胞膜熱穩定之相關性
.....陳政宏 陳彥銘.....29
- 鐵炮型百合地被品種回交選育
.....陳亭霈 邱冠榮 李佩芳 張 正.....43
- 金門產野百合種原蒐集及栽培特性評估
.....石珮萱 楊璧瑜 楊慧明 鍾立偉 張 正.....55
- 轉殖調控春化作用之相關基因 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*
到春石斛蘭之研究
.....張家銘 潘怡君 陳良築 曾夢蛟.....69
- 臺灣南仁山低地雨林二十年林隙動態
.....許天耀 吳振發 趙國容.....85

國立中興大學園藝學系編印

中華民國一〇九年十二月

控釋肥與有機質複合肥肥效釋放之研究

楊 曜 謙¹⁾ 宋 妤²⁾

關鍵字：控釋肥、有機質複合肥、電導度、酸鹼度、氮釋放情形

摘要：將台肥 43 號 (即溶性化肥)1.7 g、台肥黑旺特 43 號 (有機質複合肥)1.7 g 和妙妙旺 (裹聚合物控釋型肥料)1.5 g，各放入肥料釋放袋內並分別埋入砂質壤土或泥炭土中，並放入日夜溫 30/25 °C 之生長室進行實驗，於 2、4、8、16、30、60、90 和 120 天採集砂質壤土與泥炭土，調查電導度、酸鹼度與無機態氮含量，結果顯示於砂質壤土中，台肥黑旺特 43 號其釋放之情形類似台肥 43 號，但以台肥黑旺特 43 號其電導度較高介於 3.3-4.4 mS cm⁻¹，妙妙旺在 30/25 °C 下，60 天電導度即維持平衡在 2.2-2.9 mS cm⁻¹，且氮的釋放線性期大約落於 16-60 天。於泥炭土中，台肥黑旺特 43 號與台肥 43 號之無機態氮含量由大約 3000 ppm 隨著時間下降，妙妙旺處理幾乎維持在 500 ppm 含量。

前 言

蔬菜生長需肥料供給營養要素，為要穩定蔬菜生產，農民常會施用過量化學肥料，肥料種類有速效性與緩效性，施用速效性肥料可能使土壤養分分布不均，或者鹽類於土壤累積過多的情況發生。緩效型肥料有許多種類，其中控釋型肥料外包裹疏水或隔水材料，施用後緩慢溶解，透過擴散作用、滲透壓釋放內部有效成分為核心肥料，最後包膜的瓦解對流釋放出所有養份。相較於即溶性化肥，因其緩慢釋放營養成分的特性，降低人力成本外，常作為盆栽植的肥料來源，配合不同灌溉模式、施放位置和施用量可以更有效的改善植物

1) 國立中興大學園藝學系研究生

2) 國立中興大學園藝學系教授、通訊作者

生長與品質，增加肥料利用效率並降低肥料的損失，減少淋洗的發生。土壤或介質中水分会影響到控釋肥養分釋放，溫度是主要影響控釋肥釋放速率的因素，溫度提升會增加其養分釋放量造成釋放期縮短。台灣年均溫大約 25°C，設施內夏季最高溫可能高於室外 5-6°C，且氣溫與土溫有高度正相關性，可能會造成控釋型肥料提早放出大量營養成分，縮短可利用時間，為控制肥效以控釋肥方式研究其釋放情形。

有機質複合肥如黑旺特為化學肥料添加有機質，其有機質可間接或直接改善土壤物化結構如孔隙度或保水力，並間接提供植株養分與改善作物根系環境，有研究顯示施用有機質肥料較化學肥料能有效提高西瓜甜度。氮素的提供對葉菜類作物非常重要，較高的氮含量的堆肥有相對較高的氮礦化作用，4-8 週就有 60-80% 氮釋放出來，不同之有機質肥料其氮素礦化情形皆有所不同，而對於化學肥料添加有機質之氮礦化作用相對了解甚少，不知其氮的釋放是有如化學肥料還是堆肥釋放情形。

本研究主要調查台肥 43 號 (即溶性化肥)、台肥黑旺特 43 號 (有機質複合肥) 和妙妙旺 (裹聚合物控釋型肥料) 於土壤或泥炭培養土中其釋放情形，以建立不同肥料在土壤或無土介質的施用技術基礎。

材 料 方 法

一、試驗肥料：

- (一)、複合型控釋肥：妙妙旺 ($N : P_2O_5 : K_2O = 17 : 17 : 17$ ，恒欣股份有限公司)
- (二)、有機質複合肥：黑旺特 43 號 ($N : P_2O_5 : K_2O : MgO : OM = 15 : 15 : 15 : 4 : 50$ ，台灣肥料股份有限公司)
- 3. 速效型複合肥：台肥 43 號 ($N : P_2O_5 : K_2O : MgO = 15 : 15 : 15 : 4$ ，台灣肥料股份有限公司)

二、試驗介質與土壤：

- (一)、無土介質：以泥炭土 (廠牌：jiffy)、珍珠石及蛭石 8:1:1 比例混合，進行實驗前將無土介質放入籃中並澆滿水，籃子上方蓋上塑膠袋擺於溫室中，2 天後秤取 100 g 裝入 6 號夾鏈袋中。
- (二)、土壤：此實驗於 2020 年 1 月於中興大學園藝試驗場之蔬菜溫室內，利用土鑽採 0-30 公分之土壤，經自然陰乾後用 5 mm 之篩網進行過篩以供實驗所用。進行實驗前秤取 100 g 裝入 6 號夾鏈袋中並加入 25 mL 之去離子水，以達 1/3 bar 的水分含量。

三、肥料釋放處理

- (一) 肥料釋放袋：使用 Miracloth (孔隙 22-25 μm ，Calbiochem®) 剪裁成 3 x 5 cm 的長方形，折成長方形袋，肥料置入，四周以訂書針釘，放入介質或土壤。

(二)試驗日期及地點：2020 年 1 月至 5 月中旬於中興大學放在日夜溫 30/25°C 生長箱內進行實驗。

(三)釋放實驗：

以供試肥料之全氮含量作為依據，根據不結球白菜之作物施肥手冊中最大推薦用量 (N:P₂O₅:K₂O=250:75:150 kg/ha) 推算肥料施用量並乘以 100 倍為方便秤取肥料，並將供試肥料妙妙旺 1.5 g、黑旺特 43 號及台肥 43 號 1.7 g 分別置入肥料釋放袋中，將肥料釋放袋放入無土介質或土壤並完全覆蓋住肥料釋放袋，一袋一包肥料，最後使用打洞機在夾鏈袋外靠近頂部 3 公分處打直徑 0.5 cm 的孔，避免厭氧的情況發生。並於 2、4、8、16、30、60、90 和 120 天進行採集，每處理四重複。

四、調查項目與方法

(一)溫度調查：以 HOBO Temperature/Relative Humidity Data Logger 及 HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger 記錄室溫、濕度及光度。

(二)介質分析

- 1.介質採樣：夾鏈袋中之土壤或無土介質倒出陰乾，以 5 mm 之篩網過篩，磨碎保存。
- 2.介質 EC 與 pH 值測定：秤取介質 5 g 於 80 mL 的燒杯中，以 1:5 方式加入 25 mL 的去離子水，以 150 rpm 震盪一小時後，再以濾紙 Whatman No.1 過濾至 30 mL 之試管，測定 EC 值和 pH 值。

3.介質元素測定：

(1).介質氮元素萃取液製備：

根據土壤分析手冊中土壤氮的製備方法 (方, 1995) 秤取 10 g 之介質於 100 mL 之燒杯中並加入 50 mL 之 2 N KCl，以 150 rpm 震盪 1 小時後，靜置使懸浮液直至澄清，再以濾紙 Whatman No.42 過濾至 PE 瓶中低溫保存。

(2).銨態氮與硝酸態氮之測定：

根據 micro-Kjeldahl (Bremner and Mulvaney, 1982) 之測定方式，從 PE 瓶中吸取 15 mL 至蒸餾瓶中，並加入 1 mL 之 2% sulfamic acid 以破壞 NO₂⁻ 搖晃數秒後，依序各加入 0.2 g MgO 和 Devarda 合金，利用 micro-Kjeldahl 裝置通蒸氣使其氨化，並用含指示劑之 2 % Boric acid 20 mL (紫色) 接收氨氣與氨水達至總體積 50 mL (綠色)。最後以 0.005 N 的 H₂SO₄ 滴定回紫色並記錄滴定的數值。

帶入以下公式計算出銨態氮加硝酸態氮含量：

土壤氮素 (ppm) = (A-B) × 0.07 × f × 100 / 土壤樣品 (g) × 1000 / 濾液數 (mL) × k

A=樣品的硫酸滴定量 (mL)

B=空白的硫酸滴定量 (mL)

f=標準硫酸液當量濃度之校正係數

k=風乾土/乾土重 (105°C 乾燥)

五、統計分析

以上試驗採完全隨機試驗設計 (Completely randomized design, CRD)，數據採用 SAS 套裝軟體 9.4 版 (SAS. Institute, Cary NC) 中的 ANOVA (Analysis of variance) 進行變方分析 ($\alpha = 0.05$)，以 Fisher's LSD 進行各處理平均值的比較。

結 果

一、EC 值、pH 值

台肥 43 號 1.7 g、黑旺特 43 號 1.7 g 和妙妙旺 1.5 g 施用於砂質壤土 (圖 1) 或泥炭土 (圖 2) 對其 EC 變化影響，結果顯示在砂質壤土 EC 值 (圖 1)，黑旺特之處理於施用後第 2 天即顯著高於台肥 43 號和妙妙旺處理，EC 值大約維持在 $3.3-4.4 \text{ mS cm}^{-1}$ ，但施用 120 天後與台肥 43 號處理相比無顯著差異。台肥 43 號之處理組於第 4 天 EC 平均值才超過 2.5 mS cm^{-1} ，並於之後 EC 值維持在 $2.3-3.4 \text{ mS cm}^{-1}$ 。妙妙旺處理值則緩慢上升，大約於施用後 60 天後，維持在 $2.2-2.9 \text{ mS cm}^{-1}$ 。

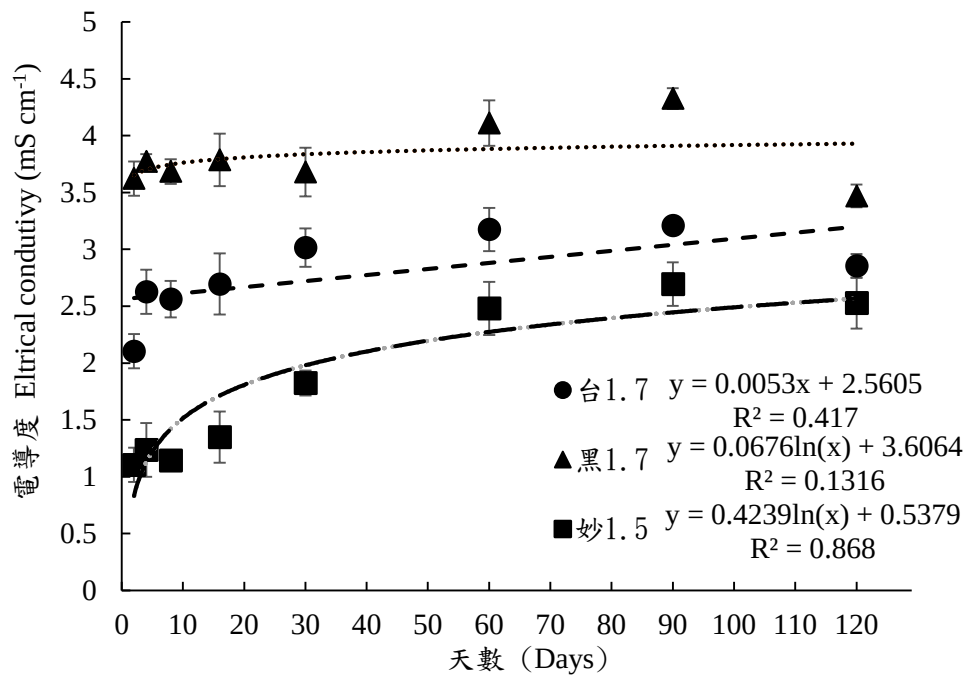


圖 1. 沙質壤土施用妙妙旺(■妙 1.5)、台肥 43 號(●台 1.7)和黑旺特 43 號(▲黑 1.7) 120 天之電導度變化情形 I= means $\pm$ SD。

Fig. 1. Electrical conductivity on Sand loam applied Multicote (■ control-released fertilizer 1.5 g), No. 43 (● Instant Water Soluble Fertilizer 1.7 g) and No. 43 'Hey Wong' (▲ nitrophosphate organic compound fertilizer 1.5 g) in 120 days, respectively. I= means $\pm$ SD.

在泥炭土 EC 值部份 (圖 2)，黑旺特處理顯著高於妙妙旺處理，且 2-60 天與第 120 天皆顯著高於其他組處理，大約於第 8 天開始 EC 值維持在 12.5-15.9 mS cm⁻¹。台肥 43 號處理顯著高於妙妙旺處理，且在第 16 天和 90 天 EC 值分別為 9.5-10.1 和 12.7-14.1 mS cm⁻¹。妙妙旺處理顯著低於其他處理組，並緩慢上升大約於施用 60 天後 EC 值維持在 9.2-11.9 mS cm⁻¹。

台肥 43 號、黑旺特 43 號和妙妙旺施用於砂質壤土 (圖 3)或無土介質 (圖 4) 對其 pH 值變化影響，結果顯示在砂質壤土 pH 值部份 (圖 3)，台肥 43 號處理於 8-120 天之 pH 值皆顯著高於其他處理組，在 4 天後 pH 值超過 7.2，並於 4-90 天維持在 7.2-7.4，但於 120 天後下降至 7。黑旺特處理隨著天數增加，pH 值從 6.9 下降至 6.3。妙妙旺處理初期先上升至大約 pH 值 7，隨著天數增加，pH 值開始下降，於施用 120 天後 pH 值大約 6.1。

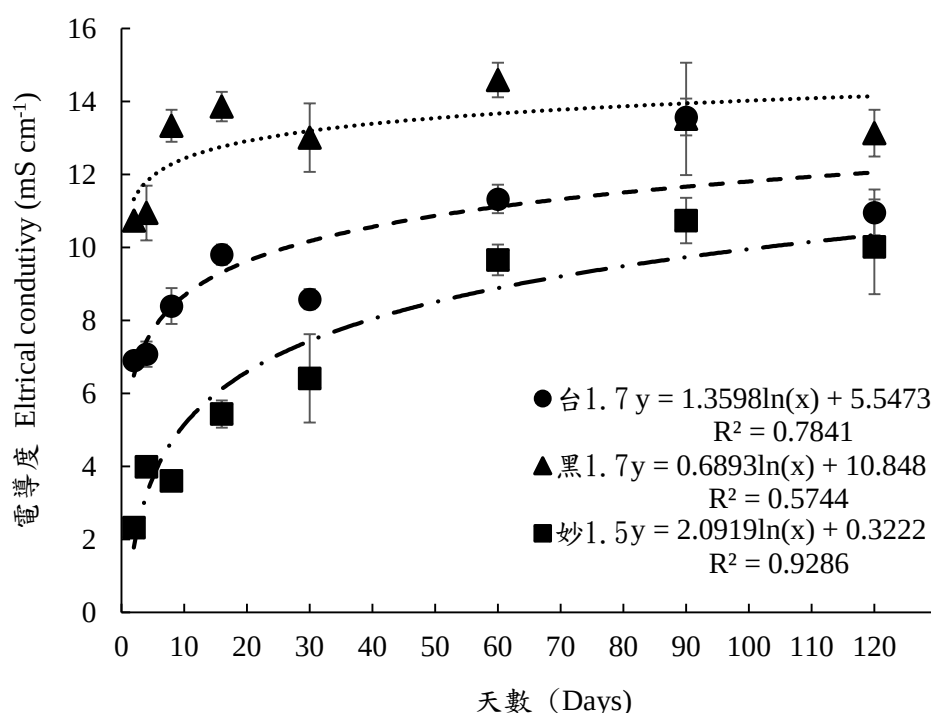


圖 2. 泥炭土施用妙妙旺(■ 妙 1.5)、台肥 43 號(● 台 1.7)和黑旺特 43 號(▲ 黑 1.7) 120 天內之電導度變化情形 I= means ± SD。

Fig. 2. Electrical conductivity on peat moss applied Multicote (■ control-released fertilizer 1.5 g), No. 43 (● Instant Water Soluble Fertilizer 1.7 g) and No. 43 'Hey Wong' (▲ nitrophosphate organic compound fertilizer 1.5 g) in 120 days, respectively. I= means ± SD.

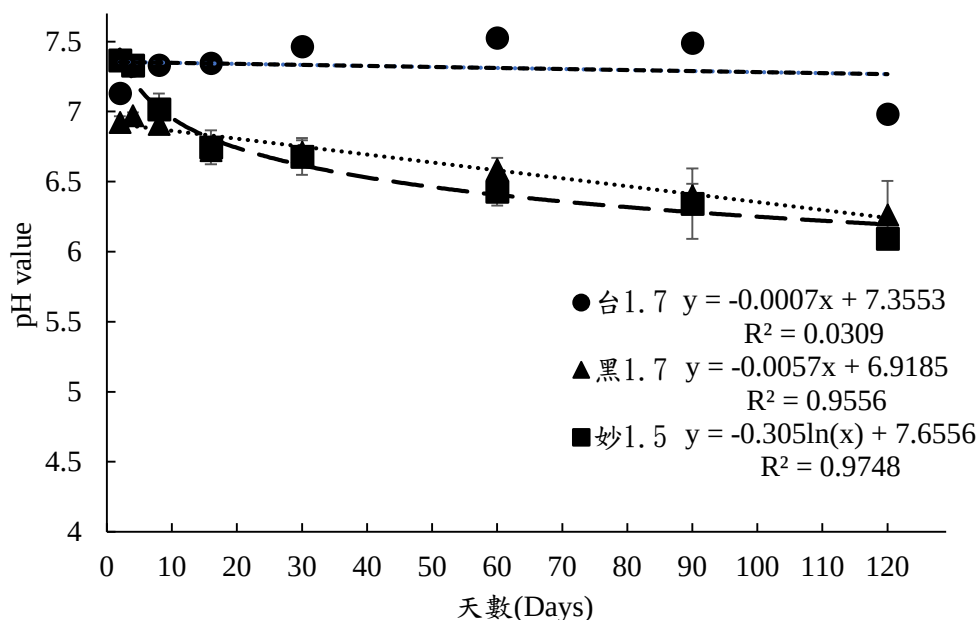


圖 3. 沙質壤土施用妙妙旺(■ 妙 1.5)、台肥 43 號(● 台 1.7)和黑旺特 43 號(▲ 黑 1.7) 120 天之酸鹼度變化情形 I= means $\pm$ SD。

Fig. 3. pH value on Sand loam applied Multicote (■ control-released fertilizer 1.5 g), No. 43 (● Instant Water Soluble Fertilizer 1.7 g) and No. 43 'Hey Wong' (▲ nitrophosphate organic compound fertilizer 1.5 g) in 120 days, respectively. I= means $\pm$ SD.

在泥炭土 pH 值部分 (圖 4)，台肥 43 號處理在施用後 4、16 和 30 天其 pH 值顯著高於其他處理組，初期 0-4 天上升至 7，隨著天數增加則下降至 4.3。黑旺特處理在施用後 2 和 4 天 pH 值顯著最低，於 30 天顯著高於妙妙旺，隨著時間增加 pH 值由 6 下降至 4.4。妙妙旺之處理在施用後第 2 和 4 天 pH 值顯著高於黑旺特處理，於第 4 天 pH 值達到 6.3，之後隨著天數增加 pH 值下降，第 30 天 pH 值顯著低於其他處理組，第 120 天下降至 4.3。

二、無機態氮

台肥 43 號 (台 1.7)、黑旺特 43 號 (黑 1.7)和妙妙旺 (妙 1.5)施用於砂質壤土 (圖 5) 或無土介質 (圖 6) 對其無機態氮(NO_3^- -N + NH_4^+ -N)變化影響，結果顯示在砂質壤土無機態氮(NO_3^- -N + NH_4^+ -N)部份 (圖 5)，台肥 43 號處理於 60-120 天皆顯著高於其他處理組，並於 30 天後之無機態氮含量維持在 1500 ppm。黑旺特處理大約在第 4 天無機態氮含量達到 1400 ppm，其後下降維持在 1200 ppm 附近。妙妙旺處理隨著天數的增加，砂質壤土中無機態氮含量也增加，在第 90 天達至 1300 ppm 顯著高於黑旺特處理，但在第 120 天時下降至 1200 ppm。

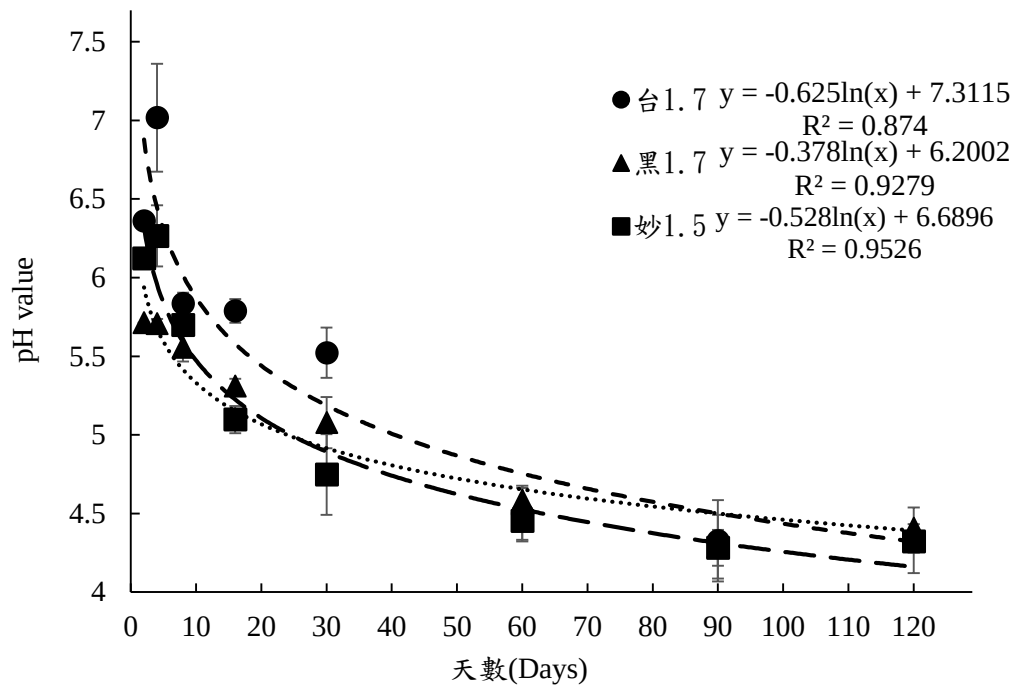


圖 4.泥炭土施用妙妙旺(■ 妙 1.5)、台肥 43 號(● 台 1.7)和黑旺特 43 號(▲黑 1.7) 120 天內之酸鹼度變化情形 I= means ± SD。

Fig. 4. pH value on peat moss applied Multicote (■control-released fertilizer 1.5 g), No. 43 (● Instant Water Soluble Fertilizer 1.7 g) and No. 43 'Hey Wong' (▲nitrophosphate organic compound fertilizer 1.5 g) in 120 days , respectively. I= means ± SD.

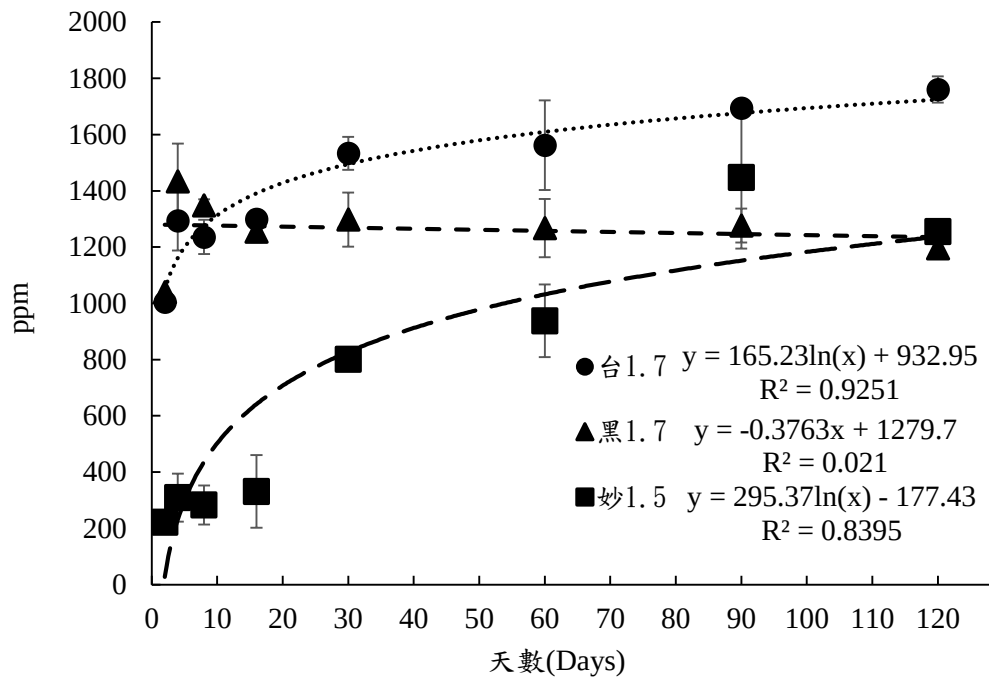


圖 5. 砂質壤土施用妙妙旺(■妙 1.5)、台肥 43 號(●台 1.7)和黑旺特 43 號(▲黑 1.7) 120 天內之無機態氮(NO_3^- -N + NH_4^+ -N)連續釋放情形 I= means $\pm$ SD。

Figure 5. Inorganic nitrogen (NO_3^- -N + NH_4^+ -N) on sand loam applied Multicote (■ control-released fertilizer 1.5 g), No. 43 (● Instant Water Soluble Fertilizer 1.7 g) and No. 43 'Hey Wong' (▲ nitrophosphate organic compound fertilizer 1.5 g) in 120 days, respectively. I= means $\pm$ SD.

在泥炭土無機態氮(NO_3^- -N + NH_4^+ -N)部份(圖 6)，台肥 43 號處理在初期 30 天內無機態氮含量達至高點介於 3000-3500 ppm，隨著時間增加無機態氮的含量也下降至大約 1300 ppm，並於 60 天後無土介質之無機態氮含量與第 90 和 120 天相比並無顯著差異，因其各別無機態氮含量差異較大。黑旺特處理在初期 16 天內達至高點 3000-3200 ppm，隨著時間增加反而無機態氮含量降低，在第 120 天顯著低於其他處理達至大約 500 ppm。妙妙旺處理在第 4 天達至 1600 ppm，隨後第 8 到 90 天無機態氮含量下降維持在大約 500 ppm，在 60 天內妙妙旺處理皆顯著低於其他處理組，在第 120 天上升至 800 ppm 並顯著高於黑旺特處理。

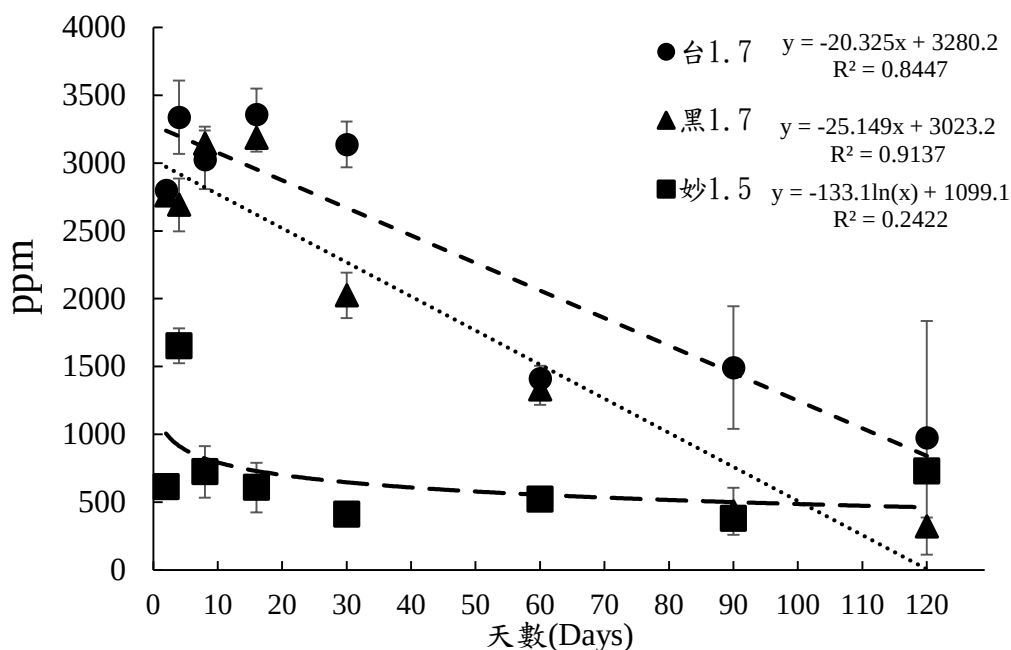


圖 6. 泥炭土施用妙妙旺(■ 妙 1.5)、台肥 43 號(● 台 1.7)和黑旺特 43 號(▲ 黑 1.7) 120 天內之無機態氮(NO_3^- -N + NH_4^+ -N)連續釋放情形 I= means $\pm$ SD。

Fig. 6. Inorganic nitrogen (NO_3^- -N + NH_4^+ -N) on peat moss applied Multicote (■ control-released fertilizer 1.5 g), No. 43 (● Instant Water Soluble Fertilizer 1.7 g) and No. 43 'Hey Wong' (▲ nitrophosphate organic compound fertilizer 1.5 g) in 120 days, respectively. I= means $\pm$ SD.

討 論

本研究選用台肥 43 號 (即溶性化肥)、黑旺特 43 號 (有機質複合肥)和妙妙旺 (裹聚合物控釋肥)，比較其在砂質壤土或泥炭土中連續釋放情形。此次溫度設定在 30/25 °C 為模擬台灣夏天炎熱之天氣，以了解肥料在此溫度情況下之釋放情形，Carson (2014a, 2014b, 2014c)等人提及氣溫與土溫有高度相關性，或許可以透過氣溫得知土溫如何影響控釋型肥料釋放養分。由於控釋型肥料會受到土溫的影響，溫度較高會造成其釋放速率提升，Gandeza (1991)等人之研究結果顯示土溫從 10-30 °C 中，每上升 10 °C 控釋肥其氮釋放量會呈倍數增加。在蔬菜栽培生產中，土溫可以被視為重要的影響控釋肥釋放養分因素(Carson *et al.*, 2013)，且控釋型肥料廠商皆會提供特定溫度下其控釋肥之釋放周期，通常溫度越高釋放期會縮短 (Husby *et al.*, 2003; Yeager and Cashion., 1993)。

放置肥料釋放袋為更了解肥料釋放之情形，Carson 和 Ozores-Hampton (2012)與 Carson (2014c)等人也使用類似之方式，將控釋肥放入玻璃纖維袋中，埋入有塑膠布覆蓋或無覆蓋之畦內，並於特定時間中移出，測定釋放袋中控釋肥之氮含量以得知其氮釋放情形，雖說可得知肥料氮的釋放量情形，但實際上土壤或介質之氮含量變化卻了解較少，且此次實驗之土壤或介質體積大小不如盆栽或田區，可能會在取樣的過程中取到肥料本身，造成實際上之釋放情形並不準確，所以肥料釋放袋有其必要性。肥料釋放袋的孔徑大小也會影響到釋放情形，Wilson (2009)等人提及釋放袋 1.2 mm^2 的孔隙比抑草蓆做成的釋放袋孔隙 0.07 mm^2 有較好的氮釋放量。此次製作之肥料釋放袋之孔徑較小只有 $22\text{-}25 \mu\text{m}$ ，造成肥料的釋放並無全部釋放到介質或土壤中，還有殘留物於肥料釋放袋中，尤其黑旺特 43 號之處理比較明顯，可能其含有有機質之關係，釋放時將肥料釋放袋之孔隙堵塞。

在砂質壤土與泥炭土的部分，台肥 43 號與黑旺特 43 號的電導度皆高於妙妙旺處理，因台肥 43 號與黑旺特含有氧化鎂的成分，所以造成電導度的提升，電導度的增加會受到離子含量的影響 (陳, 2005)。錢與高 (2017)研究設施蔬菜介質重複利用的方法，多數農戶栽培後介質電導度常高過 $2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ ，會造成多數作物生長不良，其中以鉀、鈉、鎂、鈣等陽離子累積最常見。台肥 43 號與黑旺特 43 號之速效性可及時提供作物生長，使用此兩種肥料須注意土壤或介質中鎂元素的含量，長期施用會增加土壤或介質中鎂元素含量而造成電導度的提升影響作物生長。在砂質壤土或泥炭土中，黑旺特 43 號處理之電導度皆高於台肥 43 號與妙妙旺處理，Ozlu 和 Kumar (2018)施用有機質肥料與化學肥料於玉米與大豆的輪作中，結果顯示施用有機質肥料的情況下，土壤中的有機質含量不僅增加，其電導度也較施用化學肥料之處理較高。妙妙旺廠商所提供之釋放期，在 21°C 處理下釋放期大約 5-6 個月，實驗結果顯示 $30/25^\circ\text{C}$ 下，不管是砂質壤土或泥炭土大概在 60 天後電導度維持數值，可以了解於台灣的天氣下，控釋型肥料於夏天之釋放情形只會更加縮短其釋放時間。Husby (2003)等人研究也顯示隨溫度提升，控釋肥釋放於水溶液中的可溶性鹽類、硝酸態氮和銨態氮也隨之提升。

土壤水分含量會影響土壤中的物理和化學反應和養分離子的擴散(朱等, 2008)，無土介質比砂質壤土之電導度要高的原因，推測為泥炭可保有更多含水量，其可吸收自身 4-20 倍重量之水分 (Puustjarvi and Robertson, 1975)，黃 (1988)等人調查不同栽植資材之理化性質，泥炭之容水量 (重量%)與保水力 (容積%)為土壤的 12 倍與 2 倍。Bigelow (2000)等人將泥炭添加入土壤中，可以使土壤孔隙與保水能力增加並降低其單位容積重 bulk density。泥炭本身由有機質所組成，所以有機質越多保水能力會提升 (Taskila *et al.*, 2015)。因泥炭土含水量較多之情況下使肥料釋放出較多的養分外，製備的過程中磨入蛭石，蛭石富含礦物元素尤其鎂與鉀 (王, 1994)，皆有可能造成其電導度高於砂質壤土者。

在砂質壤土部分的酸鹼度中，以黑旺特 43 號和妙妙旺之曲線較相似，並隨著時間酸鹼度下降，此兩種肥料之氮素型態為硝酸態氮與銨態氮，台肥 43 號之氮素型態為尿素態氮和銨態氮，初期時肥料溶解使酸鹼度上升，但隨著時間銨態氮轉換成硝酸態氮會產生氮

離子，使砂質壤土中的酸鹼度降低，Jeong 和 Atland (2017)與 Zaccheo (2013)等人皆有提到施用控釋肥於介質中隨時間，酸鹼度下降的現象。在泥炭土部分的酸鹼度中，因石灰的溶解增加使初期酸鹼度提升，商業用的泥炭土皆會透過石灰來調整酸鹼度以達到適合作物生長之條件 (王，1994)，Carlile (2004)提及加入栽培介質中的苦土石灰，隨時間會逐漸溶解使介質酸鹼度提升。但因泥炭含有較多的含水量，使得銨態氮轉換成硝酸態氮較快，使泥炭土中的酸鹼度下降迅速。

台肥 43 號和黑旺特 43 號含有之氮素型態有所不同，分別為尿素態氮和銨態氮與銨態氮和硝酸態氮，從圖 3 可以得知不管在砂質壤土或泥炭土中，有機質肥料黑旺特 43 號其氮素的釋放情形跟化學肥料台肥 43 號較類似。此次試驗依照比例換算使施用黑旺特 43 號、台肥 43 號與妙妙旺之氮含量皆相同，結果顯示在砂質壤土部分的無機態氮含量中，台肥 43 號為尿素態氮與銨態氮，於 30 天前無機態氮含量較低，可能與尿素態氮需轉換成銨態氮有關。黑旺特 43 號較台肥 43 號低，可能與肥料釋放袋之孔隙大小有關，有機質將肥料釋放袋之孔隙堵塞，袋中還有許多未溶解釋放於土壤中。妙妙旺處理之無機態氮大概呈現一個鐘形曲線，大約 16 天前為延遲期，16-60 天為線性期，於 60 天後進入衰退期，因 60 天之標準差開始有急遽的差距，可能包膜開始瓦解造成對流釋放，造成無機態氮含量差距較大。

在泥炭土部分的無機態氮含量中，台肥 43 號與黑旺特 43 號釋放於土壤之無機態氮含量隨著時間下降，妙妙旺處理與台肥 43 號和黑旺特 43 號相比，幾乎呈現較低之無機態氮含量。在溫度和水分含量較高的情況下，微生物活性會增加，硝化作用旺盛使銨態氮轉換成硝酸態氮，使硝酸態氮含量提升，Dickinson 和 Carlile (1995)使用泥炭土加入化學肥料並貯放一年，結果顯示 20°C 相比 10°C，其銨態氮的含量下降較快，硝酸態氮的含量較快上升。在貯存的期間水分含量會也影響介質之品質與養分釋放，Selmer-Olsen 和 Gislerod (1986)以 30-75%之水分含量試驗評估介質品質，結果顯示 75%水分含量之泥炭其硝化作用速率較 30%水分含量之泥炭快。Saddi (2010)等人研究顯示以有機資材製成的堆肥保存在 55-65%之水分含量中，其微生物活性比 15-35%水分含量之處理要高。泥炭土其保水量較一般土壤高，假使長期使泥炭土處於高含水量時，推測可能發生厭氧的情形，銨態氮轉換成硝酸態氮，硝酸態氮在無氧的情況下，造成脫氮的情形發生，造成肥料的利用效率降低。雖說夾鏈袋外有打洞，可是內部可能含水量較多，又因為泥炭土之體積較大造成其換氣不足，所以厭氧的發生，造成泥炭土其無機態氮含量下降迅速與保持低含量之情形發生，建議進行此實驗時裝介質之包裝袋可以大於介質體積至少 2 倍，以利內部是處於通風可換氣的狀態，或者再降低介質其含水量以降低肥料釋放速率。

參考文獻

- 方英傑。 1995。 氮。土壤分析手冊。219-250pp。
- 王才義。 1994。 設施環境管理技術-栽培介質。 農業試驗所特刊 47:53-59。
- 朱利平、衛樹銀、任冬生和張玉玲。 2008。 包膜肥料的研究進展。 河北農業科學 12(6):40-42。
- 陳鴻堂。 2005。 設施栽培之合理化施肥技術。 合理化施肥專刊 121:147-165。
- 黃光亮、黃達雄。 1988。 國內盆栽植物栽培介質及利用。 花卉生產體栽培介質研討會專輯 p.29-41。
- 錢昌聖、高德錚。 2017。 設施蔬菜栽培介質重複利用之研究。 臺中區農業改良場特刊 133:109-119。
- Bigelow, C. A., D. Bowman, and K. Cassel. 2000. Sand-based rootzone modification with inorganic soil amendments and sphagnum peat moss. USGA Green Section Record. 38(4): 7-13.
- Bremner, J. M. and C. S. Mulvaney. 1982. total nitrogen. In: methods of soil analysis, A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeny, (eds.), Amer. Soc. Agron. Soil Sci. Soc. Amer., pp. 1129-1123.
- Carlile, W. R. 2004. Changes in organic growing media during storage. Acta Hort. 648: 153-159.
- Carson, L. C. and M. Ozores-Hampton. 2012. Methods for determining nitrogen release from controlled-release fertilizers used for vegetable production. HortTechnology 23: 553-562.
- Carson, L. C., M. Ozores-Hampton, and K. T. Morgan. 2013. Nitrogen release from controlled-release fertilizers in seepage-irrigated tomato production in southern Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 126: 131-135.
- Carson, L. C., M. Ozores-Hampton, K. T. Morgan, and J. B. Sartain. 2014a. Nitrogen release properties of controlled-release fertilizer during tomato production. HortScience 49: 1568-1574.
- Carson, L. C., M. Ozores-Hampton, K. T. Morgan, and S. A. Sargent. 2014b. Effect of controlled-release and soluble fertilizer on tomato production and postharvest quality on seepage irrigation. HortScience 49: 1-7.
- Carson, L. C., M. Ozores-Hampton, K. T. Morgan, and S. A. Sargent. 2014c. Effect of controlled-release fertilizer nitrogen rate, placement, source, and release duration on tomato grown with seepage irrigation in Florida. HortScience 49: 798-806.
- Dickinson, K. and W. R. Carlile. 1995. The storage properties of wood-based peat-free growing media. Acta. Hort. 40: 89-96.
- Gandaza, A. T., S. Shoji, and I. Yamada. 1991. Simulation of crop response to polyolefin-coated

- urea: I. Field dissolution. Soil Sci. Amer. J. 55: 1462-1467.
- Husby, C. E., A. X. Niemiera, J. R. Harris, and R. D. Wright. 2003. Influence of diurnal temperature on nutrient release patterns of three polymer-coated fertilizers. HortScience 38(3): 387-389.
- Jeong, K. Y. and J. E. Alland. 2017. Initial substrate moisture content affects chemical properties of bagged substrates containing controlled release fertilizer at two different temperatures. HortScience 52(10): 1429-1434
- Ozlu., E. and S. Kumar. 2018. Response of soil organic carbon, pH, electrical conductivity, and water stable aggregates to long-term annual mineral and inorganic fertilizer. Soil Sci. Soc. Amer. J. 82: 1243-1251.
- Puustjarvi, V. and R. A. Robertson. 1975. Physical and chemical properties. In: Peat in horticulture, D. W. Robertson. and J. G. D. Lamb (eds.), Academic Press. pp.23-38.
- Saadi, I., Y. Laor, S. Medina, A. Krassnovsky, and M. Raviv. 2010. Compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* was not reduced after one-year storage under various moisture and temperature conditions. Soil Biol. Biochem. 42: 626-634.
- Selmer-Olsen, A. R. and H. R. Gislerod. 1986. Storage of fertilized peat. Acta. Hort. 178:163-172.
- Taskila, S., R. Särkelä, and J. Tanskanen. 2015. Valuable application for peat moss. Biomass Convers. Biorefine. 6(1): 115-126.
- Wilson, M. L., C. J. Rosen, and J. F. Moncrief. 2009. A comparison of techniques for determining nitrogen release from polymer-coated urea in the field. HortScience 44: 492-494.
- Yeager, T. and G. Cashion. 1993. Controlled-release fertilizers affect nitrate nitrogen runoff from container plants. Hort. Technol. 3(2): 174-177.
- Zaccheo, P., L. Crippa, and C. Cattivello. 2013. Effect of controlled-release fertilizers on chemical parameters of two growing media during 12 months storage. Acta Hort. 1013: 327-332.

Study on the Fertilizer Release Efficiency of Control-Released Fertilizer and Organic Compound Fertilizer

Yao-Chien Yang¹⁾ Yu Sung²⁾

Key words : Control-released fertilizer 、 Organic compound fertilizer 、 Electrical conductivity 、 pH value 、 Nitrogen release changes

Summary

In this study, put No. 43 (Instant Water Soluble Fertilizer) 1.7 g, No. 43 'Hey Wong' (nitrophosphate organic compound fertilizer) 1.7 g and control-released fertilizer 'Multicote' 1.5 g were put into fertilizer released bag and were buried into the bag which contained sand loam or peatmoss, respectively. Placed the bag in growing chamber which set the day/night temperature was 30/25°C, and collected the sand loam or peatmoss sample at 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90 and 120 days for investigating electricity conductivity, pH value and inorganic nitrogen content. The results showed 'Hey Wong' released condition was similar with No. 43 in loam. However, the electricity conductivity of 'Hey Wong' value was the highest, 3.3-4.4 mS cm⁻¹. In 30/25°C, the electricity conductivity of Multicote sustained in 2.2-2.9 mS cm⁻¹ at 60 days, therefore, its released linear period of nitrogen was around 16-60 days. As time went by, the inorganic nitrogen content of 'Hey Wong' and No. 43 in peatmoss decreased from 3000 ppm, and the inorganic nitrogen content of Multicote treatment almost sustained in 500 ppm.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

塑膠地膜覆蓋對花胡瓜生長及產量之影響

戴 俊 丞¹⁾ 黃 三 光²⁾

關鍵字：花胡瓜、地膜覆蓋、可銷售產量

摘要：本研究探討利用順昶塑膠股份有限公司生產之優系 (Usii) 農用膜與一般銀黑色塑膠膜進行地面覆蓋對花胡瓜 (*Cucumis sativus*) 生長、產量及果實營養成分之影響。花胡瓜品種為農友種苗公司之'翠姑'，在網室中進行栽培。試驗處理分成優系農用膜覆蓋、銀黑色塑膠膜覆蓋及無覆蓋等三處理。結果顯示植株葉片數於三處理之間無顯著差異，果實之果長、果寬及鮮果重於各處理間亦無顯著差異，而單株可銷售產量以優系農用膜及銀黑色塑膠膜覆蓋處理高於無覆蓋對照組，分別增產 26.81% 及 13.10%，營養分析顯示大量元素及微量元素於各處理組間皆無顯著差異。綜合上述，塑膠地膜覆蓋對花胡瓜生育性狀及果實營養成分無顯著之影響，但能夠增加花胡瓜單株可銷售產量，而單位面積下優系農用膜所使用之塑膠原料較銀黑色塑膠膜少，使用上可降低塑膠製品對環境之危害。

前 言

地面覆蓋是栽培時常用的方法，因其具有調節土壤溫度、減少土壤水分散失、增加水分利用效率、防止土壤養分流失及降低雜草生長等益處，近年來使用量逐年上升 (Zhang *et al.*, 2018)。地面覆蓋所使用之材料以塑料最為常見，但在操作及回收時會產生環境污染的問題 (Dong *et al.*, 2015)。本研究選用優系農用膜與市售銀黑色塑膠布為地面覆蓋材料進行試驗，優系農用膜為順昶塑膠股份有限公司生產，據該公司所提供資訊，其主成分與黑色塑膠布相同為聚乙烯 (PE)，但因添加其他配方且製程不同，所使用之塑化原料較銀黑色塑膠膜來的低，使用上無正反面之分，且因透氣性良好，具有減緩土壤溫度上升的功効。另一方面花胡瓜於台灣栽培面積大且栽植時會使用地面覆蓋 (劉, 2008)，而目前地面覆蓋多以銀黑色塑膠布為主 (田, 2014)，本試驗之目的乃藉由評估優系農用膜應用於花胡瓜地膜覆蓋栽培的可行性，期望能提供農民另一種地膜覆蓋的選擇，並達環保減塑之目的。

1) 國立中興大學園藝學系研究生。

2) 國立中興大學園藝學系副教授、通訊作者。

材 料 方 法

一、試驗材料

(一)、植物材料

本試驗採用'翠姑'花胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 為實驗材料，種子購買自農友種苗股份有限公司。

(二)、覆蓋材料

1. 銀黑色塑膠布：銀黑色塑膠布一面為反光銀色面，另一面為不透光黑色面。主成分為聚乙烯(PE)，覆蓋時銀面朝上可反射光線，趨避昆蟲，黑面朝下可防止光線透過，減少覆蓋面下雜草生長。

2. 優系農用膜：由順昶塑膠股份有限公司生產，兩面皆為銀色，無正反面之分，主成分亦為聚乙烯(PE)，然優系產品因添加其他配方及使用不同的製程，塑化原料用量較銀黑色塑膠膜來的低。且優系農用膜具有 $8000/\text{m}^3/24\text{ hr}$ 的透氣度，能夠有效減緩土壤溫度的上升(順昶塑膠股份有限公司，2017)。

二、試驗方法

本試驗之畦面覆蓋處理共有三種，分別為銀黑色塑膠布覆蓋處理 (B)、優系農用膜覆蓋處理 (U)及無覆蓋之對照組 (CK)，每處理一畦，共三重複，每畦長 7 公尺，寬 60 公分，共九畦，試驗設計採用隨機完全區集設計 (RCBD)，花胡瓜先於中興大學溫室進行育苗，待約 2-3 片時進行移植，試驗採單行植，株距 50 公分，每畦種植 13 株，植株採直立式栽培並以尼龍繩固定。種植日期為 2019 年 6 月 14 日，並於 2019 年 7 月 11 日開始採收，採收至 2019 年 8 月 14 日為止。

整地前施用農友牌台肥硝磷基 43 號有機質複合肥料 (N:P:K=15:15:15) 40 公斤/分地當作基肥，並分別於始花期及採收期中進行兩次追肥，追肥與基肥相同使用台肥 43 號，兩次用量皆為 40 公斤/分地，採用畦溝施肥的方式平均撒施於溝中，並視葉片營養狀況配合葉面施肥。

植株在移植後前三週使用根部澆灌的方式給水，視表土濕潤情形每 1 至 2 天給水一次，三週後使用畦溝灌溉之方式給水，視表土濕潤情形每週灌水 1 至 2 次。

幼苗於 3 至 4 片本葉展開且稍有倒伏之情形時，將其旋繞於尼龍掛繩上並以瓜夾固定，日後採單幹整枝之方式管理植株，疏除第六節位以下之所有側枝及花芽，保留第六片本葉生長節位以上之花芽，側枝留一葉摘心，當植株生長至 22-24 節後去除頂芽。

病蟲害防治則遵照植物保護手冊推薦使用藥劑及稀釋倍數，掌握防治時機及要領噴灑於植株，選擇合適藥劑，達到花胡瓜病蟲害防治之效果，並注意農藥安全採收期於採收前停藥，因花胡瓜為連續採收之作物，於開始採收後即停用化學藥物，改採施用亞磷酸、油劑等非化學農藥類型之防治方法 (郭和曾，2016)。

採後調查花胡瓜果長、果徑、果周徑及果重，並計算花胡瓜總可銷售產量 (每畦之可

銷售產量)及單株可銷售產量。此外，亦針對葉片及果實營養元素濃度進行分析，氮濃度測定以凱氏定氮法(Kjeldahl method)進行；磷濃度以鉬黃法 (Vanadate-Molybdate Yellow Method)進行測定；鉀、鎂、鈣、銅、錳、鋅及鐵以原子吸收光譜儀 (atomic absorption spectrophotometer, Hitachi Z-2300)進行濃度測定。

試驗期間之土壤溫度使用 HOBO 土溫紀錄器 (HOBO Data Logger, MX2303 2x ext temp, USA)進行紀錄，將外接溫度探針埋於土表下 15 公分處，每 30 分鐘記錄溫度一次，定期讀取紀錄器中之數據後彙整之。

試驗期間之氣溫測量以 HOBO 溫濕紀錄器 (HOBO Data Logger, U23-001 HOBO Pro v2 Temp/RH, USA)於栽培期間記錄種植網室內溫度變化。

結 果

一、花胡瓜種植期間溫室內之氣溫及不同地膜覆蓋下之土壤溫度

本試驗花胡瓜種植期間各項溫度調查由 2019 年 6 月 15 日起至 2019 年 8 月 16 日為止，種植期間溫室內氣溫逐漸變熱，日均溫由 6 月份的 29.07℃ 逐漸提升至 7 月及 8 月的 29.71℃，平均日最高溫在種植末期的 8 月份最高達 37.98℃，在種植初期的 6 月份較低但仍有 35.87℃，平均日最高溫皆高於 35℃ 以上；平均日最低溫隨月份增加逐漸升高由 6 月份的 24.51℃ 逐漸提升至 8 月份的 25.65℃，7 月分高低溫差最大，溫差為 12.79℃ (表 1)。

花胡瓜種植期間畦面覆蓋土下 15 公分處每月的平均溫度在銀黑色塑膠布覆蓋處理皆高於優系農用膜覆蓋處理組及對照組，約高出 1.5-2.0℃。種植期平均土壤月均溫以銀黑色塑膠布覆蓋處理組為最高，優系農用膜覆蓋處理組次之，而以對照組為最低；土壤平均日最高溫方面每個月也是以銀黑色塑膠布覆蓋處理組最高，6、7 月比其他兩處理高出約 2-3℃，8 月高出約 2℃；土壤平均日最低溫每個月也是以銀黑色塑膠布覆蓋處理組最高，高出優系農用膜覆蓋處理組及對照組約 1-2℃，優系農用膜處理次之，而對照組為最低。試驗結果顯示銀黑色塑膠布覆蓋處理易導致土壤溫度上升，在土下 15 cm 之土壤月均溫、平均日最高溫及最低溫皆高於優系農用膜覆蓋處理組及對照組，平均日最高溫及平均日最低溫之溫差也最大，平均溫差為 4℃；優系農用膜覆蓋處理組月平均土溫稍高於對照組，6 月之平均日最高溫以對照組高於優系農用膜處理組；種植期各月平均日最低溫皆以銀黑色塑膠布覆蓋處理最高，優系農用膜覆蓋處理次之，對照組最低 (表 1)。

二、不同地膜覆蓋下花胡瓜之葉片數

花胡瓜幼苗於 2-3 片本葉時進行移植，移植當天 (2019 年 6 月 14 日)幼苗葉片數於各處理間無顯著差異，皆介於 2.2-2.4 片葉之間，爾後每 7 天進行花胡瓜葉片數調查直至花胡瓜採收期結束 (2019 年 8 月 14 日)為止，結果顯示花胡瓜葉片數於各週各處理組間皆無顯著差異。種植期間花胡瓜生長至 22-24 節後即進行摘心打頂，並將底部老葉摘除，所以在移植約 30 天後花胡瓜葉片數並不會再持續增加，平均最多約生長至 20 片葉左右 (表 2)。

表 1. 花胡瓜種植期間之溫室氣溫及不同覆蓋處理組土下 15 公分之月均溫、平均日最高溫及平均日最低溫之比較。
Table 1. The air temperature inside the greenhouse and the monthly average, average daily maximum and average daily minimum soil temperature recorded from 15 cm below soil surface among different mulching treatments during cultivation period of cucumber.

	6 月 ^z			7 月 ^y			8 月 ^x		
	月均溫 (°C)	平均日最 高溫(°C)	平均日最 低溫 (°C)	月均溫 (°C)	平均日最 高溫 (°C)	平均日最 低溫 (°C)	月均溫 (°C)	平均日最 高溫 (°C)	平均日最 低溫 (°C)
B	31.49	34.00	29.18	31.30	33.79	29.80	30.08	31.88	28.67
U	29.41	30.99	27.97	29.37	30.69	28.15	28.81	29.84	27.90
CK	29.34	31.46	27.45	29.14	30.65	27.75	28.49	29.75	27.42
溫室氣溫	29.07	35.87	24.51	29.71	37.73	24.94	29.71	37.98	25.65

^z2019 年 6 月 15 日-2019 年 6 月 30 日

^y2019 年 7 月 1 日-2019 年 7 月 31 日

^x2019 年 8 月 1 日 -2019 年 8 月 16 日

表 2. 覆蓋材料對花胡瓜移植至採收期間葉片數之影響。

Table 2. Effect of mulching materials on total number of leaves per plant in cucumber from transplanting to harvest.

移植後天數(天)	B	U	CK
0	2.2 a ^z	2.4 a	2.2 a
7	5.0 a	5.2 a	5.2 a
14	10.2 a	10.4 a	10.2 a
21	15.2 a	14.8 a	15.4 a
28	18.8 a	18.4 a	18.6 a
35	19.4 a	19.8 a	20.0 a
42	19.6 a	19.8 a	20.2 a
49	19.4 a	19.4 a	19.8 a
56	19.0 a	19.4 a	19.2 a

^zMeans in a row with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

三、不同地膜覆蓋下花胡瓜果實之性狀

本試驗花胡瓜採收期於 2019 年 7 月 11 日開始至 2019 年 8 月 14 日結束，當花胡瓜果實長至約 20 cm 時進行採收。由表 3 可看出果實各性狀在三個處理之間皆無顯著性的差異，果長介於 23.19 cm 至 23.60 cm 之間；果寬介於 2.88 cm 至 2.93 cm 之間；果實周徑介於 11.13 cm 至 11.25 cm 之間；果實重量在 174.77 g 至 188.20 g 之間，可見不同地面覆蓋對果實大小並無顯著的影響。

在產量方面，有使用覆蓋的銀黑色塑膠膜處理及優系農用膜處理在總可銷售產量上皆比對照組顯著較佳，分別是 17.02 kg 及 17.75 kg，而對照組僅有 12.91 kg；因試驗中發現對照組植株的存活率較差，是以在每畦產量上表現較為不好，為進一步釐清地膜覆蓋處理對單株產量之影響，接續以每畦存活植株總數為分母計算出單株花胡瓜可銷售產量，結果仍以對照組表現顯著較差，每株產量為 1182.22 g，而銀黑色塑膠膜處理及優系農用膜處理皆較對照組有較高的單株可銷售產量，分別為 1337.13 g 及 1499.23 g，兩處理組間無顯著差異 (表 4)。

表 3. 覆蓋材料對花胡瓜果實性狀之影響。

Table 3. Effects of mulching materials on fruit traits of cucumber.

處理	果長 (cm)	果寬 (cm)	周徑 (cm)	果重 (g)
B	23.24 a ^z	2.91 a	11.25 a	178.95 a
U	23.60 a	2.93 a	11.23 a	188.20 a
CK	23.19 a	2.88 a	11.13 a	174.77 a

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

表 4. 覆蓋材料對花胡瓜果實可銷售產量之影響。

Table 4. Effects of mulching materials on total marketable yield and marketable yield per plant of cucumber fruits.

處理	總可銷售產量 (kg)	單株可銷售產量 (g)
B	17.02 a ^z	1337.13 a
U	17.75 a	1499.23 a
CK	12.91 b	1182.22 b

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

四、不同地膜覆蓋下花胡瓜果實之營養元素濃度、醣類、硝酸鹽及抗壞血酸含量

本試驗採用花胡瓜果實約中段部位含果皮及未熟種子進行營養分析。果實大量元素方面，花胡瓜果實的氮濃度在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組間並無顯著差異，分別為 2.38%、2.58%及 2.37%；磷濃度於上述三處理間同樣無顯著差異，分別為 0.53%、0.58%及 0.53%；而鉀濃度、鈣濃度及鎂濃度同樣在三個處理間無顯著差異，鉀濃度分別為 4.45%、4.70%及 4.43%，而鈣濃度分別是 0.36%、0.30%及 0.32%，鎂濃度則分別為 0.35%、0.37%及 0.32% (表 5)。

花胡瓜果實微量元素方面，鐵濃度在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組三處理間無顯著差異，分別為 40.00 ppm、40.23 ppm 及 38.85 ppm；錳濃度在三處理間同樣無顯著差異，依序為 23.21 ppm、24.93 ppm 及 23.88 ppm；鋅濃度於三處理間也無顯著差異，分別是 30.19 ppm、31.82 ppm 及 34.07 ppm；銅濃度同樣在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組間無顯著差異，分別是 6.60 ppm、6.70 ppm 及 6.05 ppm (表 6)。

如表 7 所示，花胡瓜果實全可溶性糖含量在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組間無顯著差異，分別為 10.05%、10.27%及 10.45%；澱粉含量於三處理間同樣無顯著差異，分別是 2.40%、2.44%及 2.27%；硝酸鹽含量在銀黑色塑膠布覆蓋處理、優系農用膜覆蓋處理及對照組三組間亦無顯著差異，分別為 199.44 $\mu\text{g/g}$ 、170.56 $\mu\text{g/g}$ 及 185.56 $\mu\text{g/g}$ ；抗壞血酸含量在三處理間同樣無顯著差異，含量分別為 26.63 mg/100 g FW、29.34 mg/100 g FW 及 29.46 mg/100 g FW。

表 5. 覆蓋材料對花胡瓜果實大量元素濃度之影響。

Table 5. Effect of mulching materials on the macronutrient concentration in cucumber fruit.

處理	N(%)	P(%)	K(%)	Ca(%)	Mg(%)
B	2.38 a ^z	0.53 a	4.45 a	0.36 a	0.35 a
U	2.58 a	0.58 a	4.70 a	0.30 a	0.37 a
CK	2.37 a	0.53 a	4.43 a	0.32 a	0.32 a

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

表 6. 覆蓋材料對花胡瓜果實微量元素濃度之影響。

Table 6. Effect of mulching materials on the micronutrient concentration in cucumber fruit.

處理	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)
B	40.00 a ^z	23.21 a	30.19 a	6.60 a
U	40.23 a	24.93 a	31.82 a	6.70 a
CK	38.85 a	23.88 a	34.07 a	6.05 a

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

表 7. 覆蓋材料對花胡瓜果實醣類、硝酸鹽及抗壞血酸含量之影響。

Table 7. Effect of mulching materials on the content of sucrose, nitrate and ascorbic acid in cucumber fruit.

處理	全可溶性糖 (%)	澱粉 (%)	硝酸鹽 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	抗壞血酸 (mg $\cdot$ 100 g ⁻¹ FW)
B	10.05 a ^z	2.40 a	199.44 a	26.63 a
U	10.27 a	2.44 a	170.56 a	29.34 a
CK	10.45 a	2.27 a	185.56 a	29.46 a

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

(五)、不同覆蓋處理下花胡瓜葉片之營養元素濃度

本試驗採用花胡瓜植株成熟葉片 (摘心後由上往下數5至7片葉)進行營養元素分析。葉片大量元素方面，氮濃度在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組間無顯著差異，分別為 4.48%、4.24%及 4.50%；磷濃度於上述三處理間同樣無顯著差異，分別為 0.39%、0.43%及 0.39%；而鉀濃度、鈣濃度及鎂濃度同樣在三個處理間無顯著差異，鉀濃度分別為 2.85%、2.94%及 2.89%，而鈣濃度分別是 2.73%、2.30%及 2.48%，鎂濃度則分別為 0.76%、0.70%及 0.71% (表 8)。

花胡瓜葉片微量元素方面，鐵濃度在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組三處理間無顯著差異，分別為 132.28 ppm、115.95 ppm 及 121.44 ppm；錳濃度在三處理間同樣無顯著差異，依序為 216.22 ppm、212.93 ppm 及 207.44 ppm；鋅濃度於三處理間也無顯著差異，分別是 53.97 ppm、48.31 ppm 及 49.48 ppm；銅濃度同樣在銀黑色塑膠布覆蓋處理組、優系農用膜覆蓋處理組及對照組間無顯著差異，分別是 10.33 ppm、9.50 ppm 及 10.99 ppm (表 9)。

表 8. 覆蓋材料對花胡瓜葉片大量元素濃度之影響。

Table 8. Effect of mulching materials on the macronutrient concentration in cucumber leaf.

處理	N(%)	P(%)	K(%)	Ca(%)	Mg(%)
B	4.48 a ^z	0.39 a	2.85 a	2.73 a	0.76 a
U	4.24 a	0.43 a	2.94 a	2.30 a	0.70 a
CK	4.50 a	0.39 a	2.89 a	2.48 a	0.71 a

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

表 9. 覆蓋材料對花胡瓜葉片微量元素濃度之影響。

Table 9. Effect of mulching materials on the micronutrient concentration in cucumber leaf.

處理	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)
B	132.28 a ^z	216.22 a	53.97 a	10.33 a
U	115.95 a	212.93 a	48.31 a	9.50 a
CK	121.44 a	207.44 a	49.48 a	10.99 a

^zMeans in a column with the same letter are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

討 論

一、溫度與花胡瓜生長之關係

試驗選用大小相似的花胡瓜幼苗進行移植，移植時花胡瓜植株葉片數於各處理組間並無顯著差異，可降低幼苗期差異對後續花胡瓜生長、結果之影響。隨種植時間增長花胡瓜外葉數也逐漸增加（表 2），移植後之 28 天內花胡瓜植株營養生長快速，各處理間並無顯著差異，每週約增長 5 片葉，至 28 天後開始摘心促使養分回流以利花胡瓜果實生長，摘心亦使得花胡瓜葉片數於生育後期保持一定數目而不會持續增加，此外，於栽植期間隨時疏除黃化老葉，這也是造成總葉片數於調查後期略微下降之原因。花胡瓜栽培期間溫室氣溫約在 29-30℃（表 1），符合花胡瓜生長適溫 25-30℃之要求。另一方面，前人研究顯示花胡瓜根部最適生長溫度在 20-25℃之間（錢和蕭，2016），過高的土溫會使植株生育過於旺盛，容易老化，本試驗不同處理組土下 15 cm 之土壤均溫皆高於 28℃，銀黑色塑膠布覆蓋處理土壤均溫更達到 30℃上（表 1），皆高於根部適溫，但為期兩個月的栽培試驗並無明顯觀察到植株老化的現象，可能與品種及調查時期有關，關於土壤溫度過高對“翠姑”花胡瓜生長及老化之影響仍有待進一步之研究。

二、不同地膜覆蓋對花胡瓜果實採收後性狀及產量之影響

根據農友種苗公司提供之資料，'翠姑'花胡瓜的果長約 24 cm，果寬約 2.5 cm，果重約 120 g。本試驗於花胡瓜果實長至約 20 cm 時進行採收，除去黃化、生病及過老的果實，並根據台北農產運銷公司花胡瓜分級標準，將色澤良好，果面平滑或刺疣完整，質尚幼嫩，果身內側彎度不超過 2 cm，無嚴重病蟲害及其他傷害的花胡瓜果實定義為可銷售的果實，並依此計算花胡瓜產量。試驗結果顯示，各處理間花胡瓜果實差異不大（表 3），在果長、果寬、果實周徑及果重皆無顯著差異，果長介於 23.19 cm 至 23.60 cm 之間，與農友種苗公司提供資訊接近；各處理果寬在 2.88 cm 至 2.93 cm 之間，稍大於農友種苗公司提供之資訊；周徑方面三個處理介於 11.13 cm 至 11.25 cm，與許及李（2011）種植之'夏笛'花胡瓜果實周徑 9 cm 至 10 cm 相比，本試驗種植之'翠姑'品種花胡瓜果實周徑較大；果重上，優系農用膜覆蓋處理有最大的單果果重，重量為 188.20 g，銀黑色塑膠布覆蓋處理次之，重量為 178.95 g，對照組較輕，果實重量為 174.77 g，三組處理間並沒有顯著差異，而三處理之果實重量皆較農友種苗提供之資訊 120 g 來的重。綜合上述，本試驗所採收花胡瓜果實較重，未來或許可提早採收時間，以採收重量較符合市場需求之花胡瓜果實。

銀黑色塑膠布覆蓋處理及優系農用膜覆蓋處理的總可銷售產量皆高於對照組（表 4），分別較對照組高出 31.84%及 37.49%，但因每畦的花胡瓜植株存活率不同，於是將總可銷售產量再除以存活株數，計算出單株花胡瓜可銷售產量，結果顯示單株可銷售產量同樣以未覆蓋的對照組顯著低於其他兩個處理組，對照組之單株可銷售產量僅有 1182.22 g，而銀黑色塑膠布覆蓋處理及優系農用膜覆蓋處理單株可銷售產量上分別較對照組高出 13.10%及 26.81%，優系農用膜覆蓋處理組比銀黑色塑膠布覆蓋處理組之單株可銷售產量多出

162.1 g，但兩組處理間並無顯著性的差異。

花胡瓜植株存活率於對照組表現較差，僅 82%，其餘兩覆蓋處理存活率皆有 90% 以上 (data no shown)，植株的死亡多在移植後幾個禮拜內發生，皆為發生病害所導致，在過去的報導有指出栽培時使用覆蓋能夠降低葫蘆科作物之罹病率 (Stapleyon and Summers, 2002)，與本試驗觀察結果相符。此外，在栽植期間亦觀察到對照組的花胡瓜植株較容易出現葉片缺水萎凋的症狀，水分缺乏或許也是導致對照組存活率較低的原因之一。

綜合上述，花胡瓜果實的生長性狀在各個處理之間並無顯著差異，在果長、果寬、果心周徑及果重上均呈現相似的數值，這可能與本試驗於花胡瓜果實達到相同之採收標準才進行採收有關，使得各處理間所採收的花胡瓜果實性狀呈現類似的趨勢，但在產量上就有顯著的差異性，由於對照組的存活率較低所以導致其總可銷售產量顯著低於其他兩組處理，但於計算單株可銷售果產量後發現對照組仍顯著較其餘兩組處理來的低，由於畦下土溫在優系農用膜覆蓋處理及對照組之間數值相當，是以因畦下土溫不同而導致對照組果實產量較低的可能性不大，推測其較低的原因可能與水分及營養吸收有關，花胡瓜是典型的連續性採收作物，夏季栽種開花結果期約 1 個月，在各個節位上會持續開出雌花並結果，在水分及養分的需求上相當高 (錢和蕭, 2016)，在有覆蓋的處理組水分保留效果較佳，使有覆蓋處理的花胡瓜植株對於水分的利用效率較高，此論點與 Yaghi 等 (2013) 之研究結果相符。此外，未覆蓋的對照組雜草生長的情形也較為明顯，在 Amador-Ramirez (2002) 提及當不去抑制雜草的生長會導致甜椒收穫時產量損失高達 97%，雜草會與植株進行水分及養分的競爭，這或許也是造成對照組花胡瓜在果實產量方面較其餘兩組有覆蓋處理來的差的原因。

三、不同地膜覆蓋對花胡瓜葉片與果實營養元素濃度及果實品質之影響

花胡瓜果實大量及微量元素濃度分析顯示，在各個處理組之間並沒有顯著的差異 (表 4、5)，代表不論是覆蓋的有無或是覆蓋材料的不同，對於花胡瓜果實的大量元素濃度及微量元素濃度並沒有顯著的影響，而本試驗所調查的花胡瓜果實營養元素濃度結果與前人所調查的濃度相近 (鍾, 2012; Jilani *et al.*, 2009)。

在果實品質方面，可溶性糖含量於各處理之間並無顯著差異，含量介於 10.05%-10.45% 之間；澱粉含量同樣於各處理間無顯著差異，含量在 2.27%-2.44% 之間；硝酸鹽含量也於各處理之間無顯著差異，含量介於 $170.56 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ - $199.44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之間；抗壞血酸含量同樣在三組處理之間沒有顯著差異，含量在 26.63 mg/100 g - 29.46 mg/100 g 之間 (表 7)。本試驗花胡瓜可溶性糖、澱粉及抗壞血酸含量的調查結果同樣與前人的研究結果相近 (蔡和李, 2007)，不過硝酸鹽含量有較低的趨勢，在高 (2010) 的研究中將花胡瓜果實的硝酸鹽含量歸類於濃度低於 500 mg/kg 之項下，本試驗各處理組的花胡瓜果實硝酸鹽含量皆低於 $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，相較更低了一些，但高 (2010) 於文中也有提及硝酸鹽的含量會隨施用肥料種類 (Mahmoud *et al.*, 2009)、環境因子 (Chang *et al.*, 2013a)、採收時間 (Chang *et al.*, 2013b) 及儲藏時間 (柯, 2005) 的不同而有很大的變化，在柯 (2005) 的實驗中，花胡瓜果實儲藏 3

天後硝酸鹽含量最多會下降約 53%，於貯藏第 7 天硝酸鹽含量會下降至約 $111 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，因本試驗花胡瓜果實約於儲藏 2-3 天後才進行硝酸鹽含量測定，可能因此而導致硝酸鹽含量略低於前人研究之數值。

花胡瓜葉片營養調查顯示，不論是在大量或微量營養元素濃度方面，各個處理之間皆無顯著差異（表 8、表 9）並與前人研究結果相近（Mils, 1991），代表覆蓋的有無及本試驗所使用塑膠覆蓋物材料的異同並不會顯著地影響花胡瓜植株對營養元素的吸收，推測對照組及處理組產量上的差異並非因營養元素的失衡所導致，而對照組產量低於兩覆蓋處理組的原因可能是由於對照組的雜草生長未如覆蓋處理組一樣受到抑制，使得對照組的雜草與花胡瓜植株產水分及養分之競爭所致。雜草競爭導致產量下降亦曾在番椒之研究上被報導過（Amador-Ramirez *et al.*, 2007；Isik *et al.*, 2009）。

由本試驗結果得知覆蓋的使用能夠增加花胡瓜之產量，這或許與覆蓋物增加土壤水分的保留以及減少雜草的生長有關，讓作物能夠利用的水、養分增加，使得產量進一步的提升。現行作物生產地面覆蓋的使用以塑膠薄膜居多，由於操作方便及帶來的效益使其用量持續增加，據估計台灣每公頃農地所使用的覆蓋用塑膠布約為 210 kg（田，2014），而覆蓋用塑膠布由於田間操作、更換及自然風化等原因破損並殘留於田間當中，對田間或者是環境會造成危害，過去有報導指出當塑膠殘體殘留於土壤中會導致棉花（Dong *et al.*, 2015）及小麥（Qi *et al.*, 2018）的產量下降，塑膠微粒也會更進一步汙染水域及土壤環境。本研究結果顯示使用優系農用膜覆蓋效果不亞於農民常用之銀黑色塑膠布，期盼未來能推廣優系農用膜供農民參考使用，降低塑料殘留對作物以及環境的危害。

參 考 文 獻

- 田雲生。2014。塑膠資材之應用與發展。臺中區農業改良場特刊 122: 115-119。
- 柯佳惠。2005。氧和二氧化碳處理對有機栽培之小白菜及小黃瓜品質及硝酸鹽含量之影響。國立嘉義大學園藝學系碩士論文。54pp。
- 高德錚。2010。影響蔬菜中硝酸鹽含量之探討。臺中區農業改良場特刊 105: 234-239。
- 許韻聲、李文汕。2011。有機養液栽培對胡瓜'夏笛'植株生育及果實品質之影響。興大園藝 36(2): 21-36。
- 郭雅紋、曾宥紘。2016。花胡瓜合理化施肥技術。臺中區農業改良場技術專刊 195: 21-28。
- 順昶塑膠股份有限公司。2017。Usii 優系產品介紹〈<https://www.usiilife.com/product-2.html>〉。
- 劉敏莉。2008。高屏地區小胡瓜生產管理技術。高雄區農計報導 90 期。
- 蔡正宏、李文汕。2007。鈣、鉀元素養液栽培對胡瓜'夏笛'植株生長及果實品質之影響。興大園藝 32(2): 63-78。
- 錢昌聖、蕭政弘。2016。花胡瓜栽培管理技術。臺中區農業改良場技術專刊 195: 7-20。

- 鍾其展。2012。養液氮、鉀濃度及畦面覆蓋對胡瓜'夏笛'生長發育及果實品質之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。117pp。
- Amador-Ramirez, M. D. 2002. Critical period of weed control in transplanted chilli pepper. *Weed Res.* 27:203-209.
- Amador-Ramirez, M. D., F. Mojarro-Davila and R. Velasquez-Valle. 2007. Efficacy and economics of weed control for dry chili pepper. *Crop Prot.* 26: 677-682.
- Chang, A. C., T. Y. Yang, and G. L. Riskowski. 2013a. Ascorbic acid, nitrate, and nitrite concentration relationship to the 24 hour light/dark cycle for spinach grown in different conditions. *Food Chem.* 138: 382-388.
- Chang, A. C., T. Y. Yang, and G. L. Riskowski. 2013b. Changes in nitrate and nitrite concentrations over 24 h for sweet basil and scallions. *Food Chem.* 136:955-960.
- Dong, H., T. Liu, Z. Han, Q. Sun, and R. Li. 2015. Determining time limits of continuous film mulching and examining residual effects on cotton yield and soil properties. *J. Environ. Biol.* 36: 677 – 684.
- Isik, D., E. Kaya, M. Ngouajio and H. Mennan. 2009. Weed suppression in organic pepper (*Capsicum annum* L.) with winter cover crops. *Crop Prot.* 28: 356-363.
- Jilani M. S., A. Bakar, K. Waseem and M. Kiran. 2009. Effect of different levels of NPK on the growth and yield of cucumber (*Cucumis sativus*) under the plastic tunnel. *J. Agric. Soc. Sci.* 5: 99-101.
- Mils, H. A. and J. B. Jones, Jr. 1991. Plant analysis handbook II. MicroMacro Publishing, Inc. America.
- Qi Y., X. Yang, A. M. Pelaez, E. H. Lwanga, N. Beriot, H. Gertsen, P. Garbeva, and V. Geissen. 2018. Macro- and micro- plastics in soil-plant system: effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Sci. Total Environ.* 645: 1048-1056.
- Stapleyon, J. J. and C. G. Summers. 2002. Reflective mulches for management of aphids and aphid-borne virus diseases in late-season cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *Cantalupensis*). *Crop. Prot.* 21: 891-898.
- Yaghi, T., A. Arslan, and F. Naoum. 2013. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) water use efficiency (WUE) under plastic mulch and drip irrigation. *Agric. Water Management* 128: 149-157.
- Zhang, L., H. Y. Sintim, A. I. Bary, D. G. Hayes, L. C. Wadsworth, M. B. Anunciado, and M. Flury. 2018. Interaction of *Lumbricus terrestris* with macroscopic polyethylene and biodegradable plastic mulch. *Sci. Total Environ.* 635: 1600-1608.

Effect of Plastic Mulch Film on the Growth and Yield of Cucumber

Jun-Cheng Dai¹⁾ San-Gwang Hwang²⁾

Key words: Cucumber (*Cucumis sativus*), Mulch, Marketable yield

Summary

The effect of Usii mulch film produced by Swanson Plastic Corporation (Taipei, Taiwan) and traditional silver-black plastic film on the growth, yield and fruit nutrient status of cucumber (*Cucumis sativus* L.) was investigated in this study. Cucumber 'Cuigu' (Known-You Seed Corporation, Taiwan) was cultivated in a plastic house. Two ground cover treatments including Usii mulch film and silver-black plastic film were compared with no ground cover control. Our results showed that the number of leaves per plant had no significant difference among the three treatments. There was no significant difference in fruit length, fruit width and fruit fresh weight among all treatments including control. The marketable yield per plant in Usii mulch film cover and silver-black plastic film cover treatments was better than that of control, with 26.81% and 13.10% increase, respectively. Nutritional analysis indicated that there is no significant difference in the concentration of fruit macro elements and micro elements among all treatments including control. Taken together, ground covers used in this study had no significant effect on the growth phenotype and nutrient status of cucumber fruit, however, ground cover may increase the marketable yield of cucumber on per plant basis. The content of plastic material per unit area was lesser in the Usii mulch film than that in the silver-black plastic film which may in turn result in less pollution to the environment.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

香石竹倍數性與植物特徵及細胞膜熱穩定之相關性

陳 政 宏¹⁾ 陳 彥 銘²⁾

關鍵字：香石竹、流式細胞儀、倍數性、保衛細胞、花粉、細胞膜熱穩定性

摘要：本研究利用流式細胞儀評估不同香石竹品種之倍數性，建立香石竹倍數性與植物器官之關連性，以進行早期簡易選拔，並檢測不同品種之電解質滲漏率以計算相對傷害值 (relative injury, RI)，探討倍數性與細胞膜熱穩定性。流式細胞儀試驗材料共評估 23 個市場流通品種，結果指出二倍體有 14 品種、三倍體有 2 品種、四倍體有 5 品種，並具非整倍體 2 品種，其中二倍體、三倍體、四倍體其葉片保衛細胞長度與倍數性呈現正相關性，寬度無關係性。多數香石竹品種皆具大/小花粉，二倍體品種大小花粉長寬直徑為 51.05-60.67/40.28-52.99 μm 、四倍體為 65.14-69.62/42.10-60.54 μm 、非整倍體為 54.26/45.11 μm ，而三倍體未具花粉。細胞膜熱穩定性結果顯示不同倍數性香石竹品種於 55°C 下葉片之 RI 值無顯著差異，相對傷害曲線中點溫度為 50.3-51.4°C，熱致死溫度介於 50.4-51.9°C。

前 言

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 屬於石竹科 (Caryophyllaceae) 石竹屬 (*Dianthus*) 之花卉作物，其在溫帶地區可週年栽培，哥倫比亞、肯亞、中國及歐洲之高冷地為主要產區 (Nimura *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2017)，而香石竹在台灣之主要產區為彰化縣、宜蘭縣、南投縣和嘉義市等地區亦有栽培(魏，2005)。根據我國農業統計資料顯示，民國 89 年產值高達 3 億新台幣，但近 20 年生產面積和產量急劇下滑，至 107 年產值不到 1 億新台幣 (行政院農業委員會，2020)。探究其原因，香石竹栽培種多由溫帶國家引進，不能完全適應本土氣候，因此於台灣進行香石竹耐熱育種將對其產業復興有所助益。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

然而進行雜交育種，已知雜交獲種率與育種材料倍數性有其關聯性，根據胚乳平衡數 (Endosperm Balance Number, EBN) 之假說，種間雜交母本和父本於胚乳中之配子貢獻需為 2:1，因此雜交成功與否取決於親本之倍體數，故於早期選拔及釐清親本倍數性極為重要 (Johnston and Hanneman, 1980)。植物倍數性檢測可透過根尖染色體計數方式進行，但相較費時，因此近年多藉由流式細胞儀快速測定細胞核內 DNA 含量，可有效率評估植物倍數性，而此儀器已於石竹屬物種 (Balao *et al.*, 2009; Yagi *et al.*, 2009) 及其他物種廣泛應用於分析倍數性 (Aragane *et al.*, 2014; Ishizaka *et al.*, 2009)。

此外為瞭解植物對高溫逆境之耐受性，現已知可透過植物組織經高溫處理，造成細胞膜之通透性增加引起電解質滲漏，藉以計算高溫對其相對傷害植 (relative injury, RI)，釐清細胞膜熱穩定性 (cell membrane thermostability, CMT)，作為區別耐高溫之逆境指標，目前已應用於如菊花和石竹等花卉作物之耐熱篩選 (曾, 1990; 黃, 2017; Yeh and Lin, 2003)，然而迄今尚未有香石竹文獻探討其耐熱性與膜滲透之關連性。此外倍數性亦影響植物耐侯性，如四倍體聖誕紅與二倍體相比有較佳的 SPAD 值和細胞膜穩定性 (廖, 2019)，現今僅八木等 (2007) 探討不同香石竹栽培種的倍數性和氣孔大小之間探討，未比較不同倍數性及之逆境耐受性進行比較及描述。

因此，本篇研究調查不同香石竹栽培種的倍數性、植株性狀、氣孔和花粉大小，以及細胞膜熱穩定性，期能了解各因素之相關性以提供香石竹耐熱育種之篩選指標。

材 料 與 方 法

一、植株材料

本試驗材料使用香石竹 12 種單朵大花型 (Standard type) 品種，9 種多花型 (Spray type) 品種，以及 Selecta one 公司的 2 種 Dianthini carnation。植株於西元 2017 年 12 月進行採穗繁殖，待插穗發根後定植。保衛細胞大小於西元 2018 年 3 月取第一片完全展開葉測量，而在 5-7 月期間花朵開放時調查花粉大小。

二、流式細胞儀估算倍數性

本試驗以香石竹 'Festival'、'Butterfly' 和蘭嶼秋海棠 (*Begonia fenicis*) 作為對照之標準品，藉以估算不同香石竹栽培種之相對 DNA 含量。取試驗材料未展開之新鮮葉片約 0.25 cm²，置於含有 400 µl Solution A 溶液 (Nuclei Extraction Buffer, Partec GmbH, Münster, Germany) 之玻璃培養皿中，以刀片將葉片剁碎後加入 1600 µl Solution B 溶液 (Staining Buffer, Partec GmbH, Münster, Germany)，再以網目 30 µm 之尼龍網過濾葉片及雜質，獲得澄清樣品後靜置一分鐘，以流式細胞儀 (CyFlow[®] Cube 6, Ploidy Analyzer, Partec GmbH, Münster, Germany) 進行測定。

三、根尖染色體觀察

修改李 (2019)之方法，取香石竹'Festival'之新鮮根尖 0.3 cm，加入 1 ml DI water、2.5 μ l BrNa 和 3.5 μ l DMSO 進行預措處理，於常溫避光環境下靜置五小時，移除預措液後加入 800 μ l 固定液 (酒精：冰醋酸 = 3:1)，之後置於 4°C 避光環境下 24 小時，取出固定液後進行軟化處理，以 500 μ l 1N HCl 浸泡 10 分鐘，移除 HCl 後再加入 500 μ l 1N HCl 於 60°C 水浴槽中處理 10 分鐘，去除 HCl 後以 DI water 清洗根尖兩次，然後加入 50 μ l feulgen 在 4°C 避光環境下放置 1 小時後移除 feulgen，再加入 100 μ l 1% pectinase 於常溫避光環境下靜置 1 至數小時，爾後取二至三個根尖以醋酸洋紅染色，將根尖搗碎並壓製成染色體玻片，於光學顯微鏡下計算染色體數目，以及拍照記錄。

四、保衛細胞和花粉測量

(一)保衛細胞觀察

試驗材料取用參試栽培種第一片完全展開之葉片中段進行保衛細胞觀察，以解剖刀將葉片下表皮取下置於載玻片上，滴上去離子水再蓋上蓋玻片，隨即於光學顯微鏡 (Axioskop2, CARL ZEISS, Germany) 下觀察，並以攝影機 (ProgRes® CF scan, Jenoptik, Germany) 和相機軟體 ProgRes® CapturePro 2.8 (Jenoptik, Germany) 測量氣孔長寬及拍照。

(二)花粉觀察

取當日開裂之新鮮花粉，均勻撒於含有花粉培養基之雙凹載玻片上。隨即於光學顯微鏡 (Axioskop2, CARL ZEISS, Germany) 下觀察，並以攝影機 (ProgRes® CF scan, Jenoptik, Germany) 和相機軟體 ProgRes® CapturePro 2.8 (Jenoptik, Germany) 測量花粉大小及拍照。花粉培養基以 Brewbaker 和 Kwack (1963) 之配方作為基底，其中每公升含有 0.3 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g H_3BO_3 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 0.1 g KNO_3 ，另外添加 15% 蔗糖，並調整 pH 值至 6.0。

五、細胞膜熱穩定性

植株於定植兩個月後放入人工氣候生長箱 (恆溫 20°C 光週期 8 小時) 中兩星期，爾後進行細胞膜熱穩定性之評估，檢測方法參考黃 (2017) 之方法。取第 3 至第 5 對之葉片，以去離子水清洗數次，再以直徑 2 mm 之鑽孔器取下葉片，放入含 20 ml 去離子水之試管中，每支試管有 15 片。將試管放入水浴槽處理 25 (對照組)、30、35、40、45、50、55、60、65、70°C 30 分鐘，每支試管為一重複，每處理三重複。待試管冷卻後以電導度計測定破壞前之 EC 值，之後將試管以高溫高壓 (121°C、1.2 kg $\cdot$ cm⁻²) 處理 20 分鐘破壞細胞膜，冷卻後再以電導度計測定破壞後之 EC 值，此後計算熱相對傷害值 (relative injury, RI)，計算方式參照 Martineau 等 (1979) 之公式： $\text{RI}(\%) = \{1 - [1 - (T_i/T_F)] / [1 - (C_i/C_F)]\} \times 100$ 。T 和 C 分別為處理組和對照組 (水浴 25°C)，I 和 F 則表示破壞前及破壞後之 EC 值。最後以 Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 繪製相對熱傷害值反應曲線。

六、統計分析

試驗採完全隨機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，試驗數據以軟體 CoStat 6.1 (CoHort software, Minneapolis, USA) 以最小顯著差異測驗法 (Fisher's least significant

difference test)，比較 5%差異性顯著。

結 果

一、相對 DNA 含量估算和根尖染色體觀察

本試驗利用流式細胞儀檢測和計算香石竹相對 DNA 含量，十二個單朵大花(Standard type)品種相對 DNA 含量可分成三區間，分別為 2.02-2.08、2.99-3.01 和 3.98-4.08 units，推測二倍體有 5 品種、三倍體具 2 品種，及 5 品種為四倍體；九個多花型 (Spray type)品種，經流式細胞儀測定後皆為二倍體，相對 DNA 含量為 1.96-2.01 units (表 1)。以蘭嶼秋海棠作為標準品，進一步確認香石竹'Optimistic'、'Kleos'和'Bizet'，皆為不同倍數體(圖 1J-L)。此外，檢測出非整倍體之品種'Barbados'和'Butterfly'(Dianthini carnation)，其相對 DNA 含量分別為 4.34 和 4.46 units (表 1)。香石竹'Festival'因其相對 DNA 含量最小，進行香石竹'Festival'根尖染色體計數，染色體數量為 30，確認為二倍體品種 (圖 2)。

二、植物器官評估：花朵、保衛細胞和花粉大小

單朵大花品種，花朵大小並未隨著倍數體增加(圖 1A-C)。不同倍數性香石竹葉片保衛細胞長寬分別為 35.89-43.50/28.84-33.83 μm (二倍體)、38.47-47.60/32.23-38.27 μm (三倍體)、及 46.86-56.69/34.00-42.58 μm (四倍體)，二倍體和三倍體保衛細胞大小相似(圖 1D&E)，四倍體較大(圖 1F)。所有香石竹栽培種花粉皆具大/小花粉，二倍體花粉為 51.05-53.37/43.20-45.80 μm 、四倍體為 65.14-69.62/42.10-60.54 μm ，而三倍體未產生花粉(圖 1H)；多花型品種，保衛細胞長/寬為 37.81-43.26/26.72-34.50 μm ，大/小花粉為 51.16-60.67/40.28-52.99 μm (表 1)；非整倍體品種'Barbados'和'Butterfly'，保衛細胞長/寬分別為 49.50/30.66 μm 和 44.34/30.77 μm 。'Barbados'未產生花粉，'Butterfly'之大/小花粉為 54.26/45.11 μm (表 1)。

三、水浴溫度對不同倍數性香石竹栽培種 RI 值之影響

將三個不同倍數性栽培種之葉片以 25-70°C 之水浴溫度處理 30 分鐘後，檢測電解質滲漏率計算相對傷害值 (Relative Injury, RI)，結果顯示三個香石竹品種之葉片相對傷害值隨著水域溫度增加呈 S 曲線變化 (圖 3)。「Optimistic」、「Kleos」和'Bizet' 55°C 下葉片之 RI 值分別為 72.9、73.8 和 74.9%；相對傷害曲線中點溫度分別為 50.3、50.3 和 51.4°C；熱致死溫度分別為 50.4、50.5 和 51.9°C (表 2)。

表 1. 不同香石竹栽培種其倍數性與葉片保衛細胞和花粉大小之相關性^z。Table 1. The correlation between polyploidy level and blade's guard cells and pollen size in carnation cultivars^z.

類型/栽培種 Type/Cultivars	相對 DNA 含量 Relative DNA content (units)	推定倍數 Estimation of ploidy levels	保衛細胞長 Length of guard cells (μm)	保衛細胞寬 Width of guard cells (μm)	大花粉 Size of large pollens (μm)	小花粉 Size of small pollens (μm)
Standard type						
Optimistic	2.02	2x	39.19 jk	33.63 de	52.21 fg	43.44 g
Lajoy	2.03	2x	35.89 m	28.84 k	53.37 ef	45.80 ef
日本王冠	2.04	2x	41.55 i	31.81 gh	-	-
Relax	2.06	2x	36.35 m	29.69 jk	51.05 g	43.20 g
Ajax	2.08	2x	43.50 gh	33.83 de	-	-
Tingva	2.99	3x	47.60 f	38.27 c	-	-
Kleos	3.01	3x	38.47 kl	32.23 fg	-	-
Unknown Peach I	3.98	4x	56.69 a	37.60 c	65.14 b	54.40 b
Yellow Viana	4.01	4x	54.88 b	42.58 a	-	-
Eloah	4.03	4x	51.06 d	37.66 c	-	-
Bizet	4.03	4x	52.77 c	41.59 b	69.62 a	60.54 a
Black Heart	4.08	4x	46.86 f	34.00 d	-	42.10 h
Spray type						
Tia Maria	1.96	2x	41.31 i	33.66 de	-	-
Scaplet Aneen	1.97	2x	43.09 h	32.48 fg	60.67 c	52.99 c
Natila	2.00	2x	38.14 l	26.72 l	-	-
Tarantella	2.00	2x	39.88 j	32.58 fg	-	43.33 g
Festival	2.00	2x	43.26 h	32.99 ef	51.16 g	45.89 ef
Unknown Red I	2.01	2x	37.81 l	29.64 jk	-	46.22 e
Celine	2.01	2x	37.88 l	31.07 hi	58.00 d	48.93 d
Unknown Orange I	2.01	2x	38.38 kl	34.50 d	53.21 ef	43.10 g
Unknown White Purple I	2.01	2x	41.86 i	30.43 ij	53.61 ef	40.28 i
Dianthini carnation						
Barbados	4.34	4.3x	49.50 e	30.66 i	-	-
Butterfly	4.46	4.5x	44.34 g	30.77 i	54.26 e	45.11 f

^z：同行英文字母相同者表示經 Fisher's 最小顯著差異性測驗在 5%水準之差異不顯著。

^z：Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference test.

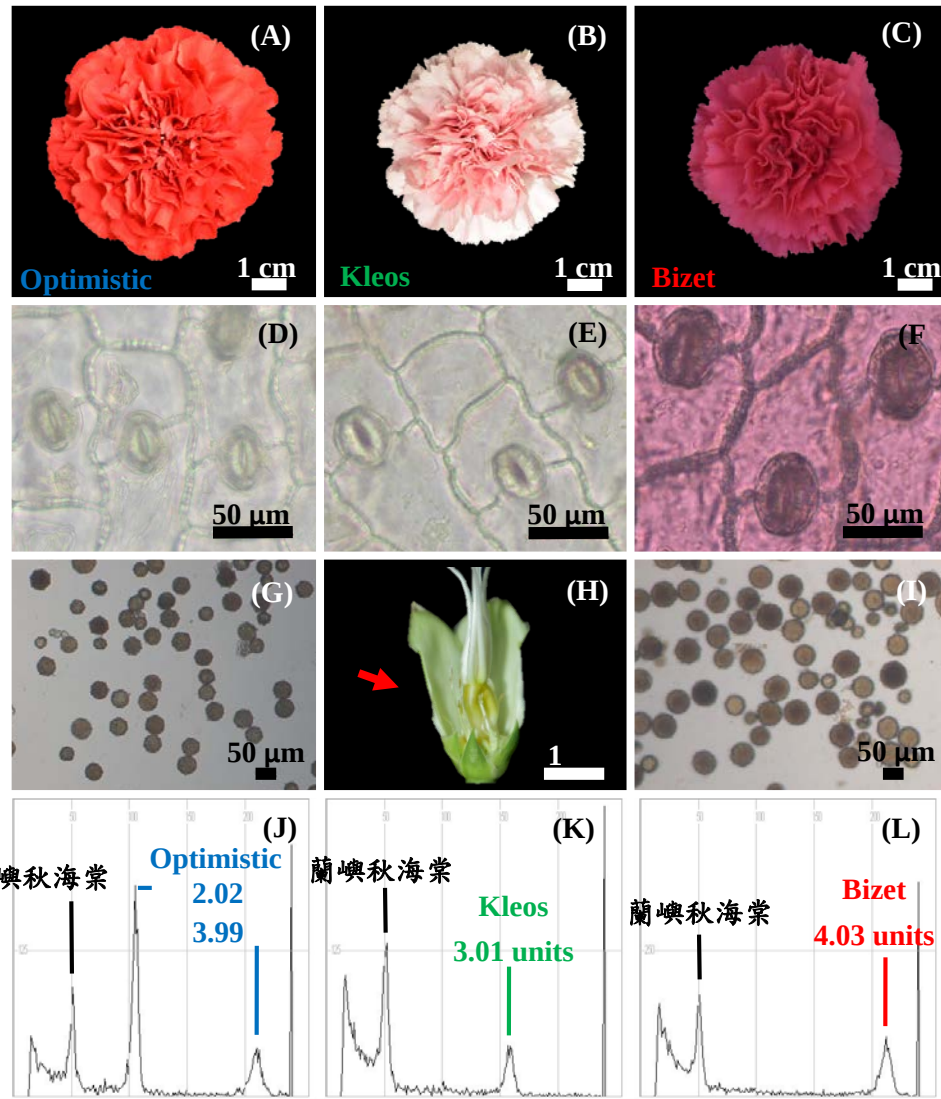


圖 1. 不同倍數性香石竹栽培種之花朵、保衛細胞、花粉及流式細胞儀分析。(A) 二倍體栽培種'Optimistic'。(B) 三倍體栽培種'Kleos'。(C) 四倍體栽培種'Bizet'。(D)-(F) 保衛細胞。(G)、(I) 花粉。(H) 'Kleos'皺縮花藥。(J)-(L) 流式細胞儀分析，標準品：蘭嶼秋海棠，Gain：514，Speed：0.4。

Fig. 1. Flower characteristic, guard cells, pollen grain and flow cytometric analysis of different ploidy level carnation cultivars. (A) Flower of diploid cultivar 'Optimistic'. (B) Flower of triploid cultivar 'Kleos'. (C) Flower of tetraploid cultivar 'Bizet'. (D)-(F) Guard cells. (G) and (I) Pollens. (H) Depauperate anther of triploid cultivar 'Kleos'. (J)-(L) Relative DNA content estimated by flow cytometric analysis. Standard: *Begonia fenicis*. Gain: 514. Speed: 0.4.

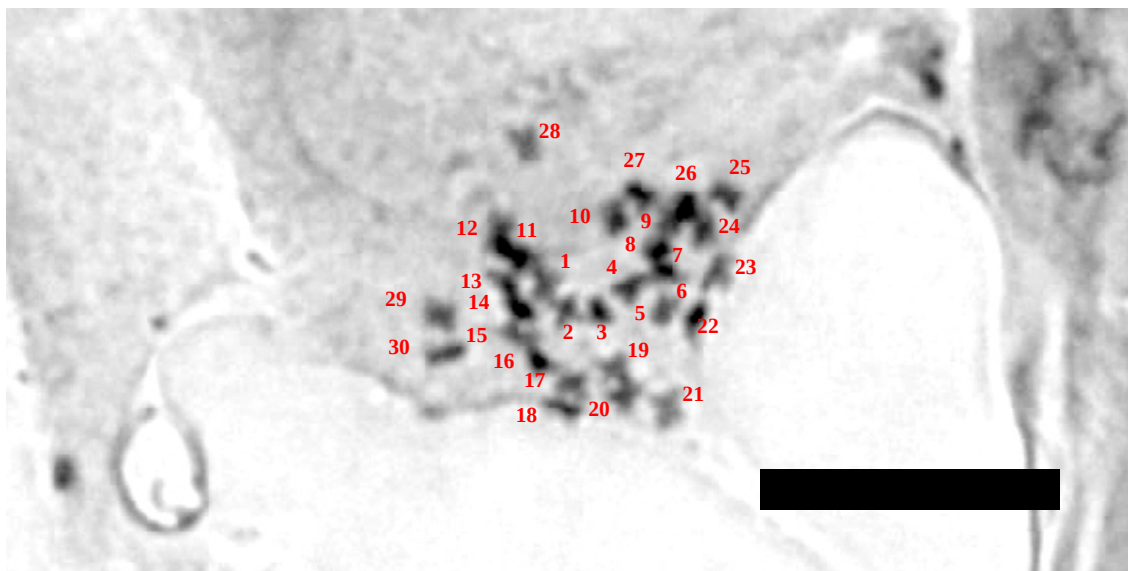


圖 2. 香石竹'Festival'之根尖染色體圖。2n=2x=30。Bar = 1 mm。

Fig. 2. The chromosome numbers of *D. caryophyllus* 'Festival'. 2n=2x=30. Bar = 1 mm.

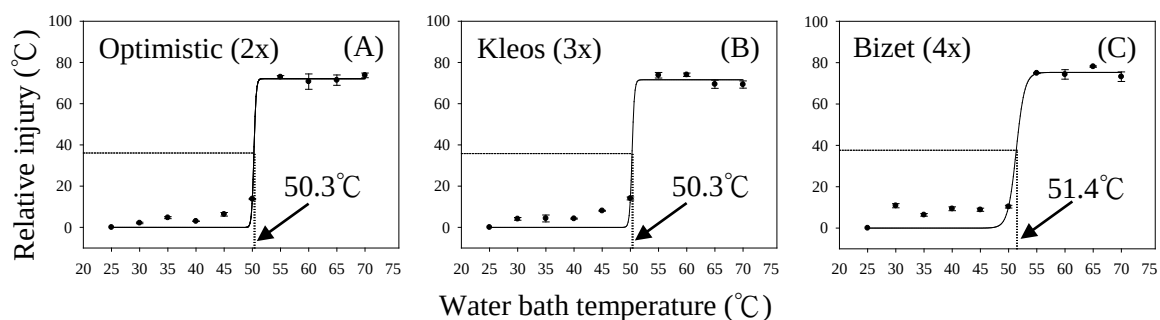


圖 3. 水浴溫度對不同倍數性香石竹栽培種相對熱傷害值之影響。(A) 二倍體栽培種'Optimistic'。(B) 三倍體栽培種'Kleos'。(C) 四倍體栽培種'Bizet'。誤差線代表平均值的標準誤，如果小於標記，則看不見。虛線指出 S 曲線中點溫度之葉片相對傷害值。

Fig. 3. Effect of water bath temperature on relative injury of leaves in different ploidy level carnation cultivars. (A) Diploid cultivar 'Optimistic'. (B) Triploid cultivar 'Kleos'. (C) Tetraploid cultivar 'Bizet'. Error bars represent standard error of the mean and are not visible if smaller than the symbol. Dash line indicated leaf RI at midpoint temperature of the sigmoid curves.

表 2. 不同倍數體香石竹葉片之相對傷害值、S 曲線中點溫度及熱致死溫度。

Table 2. Relative injury (RI) values at 55°C water bath, midpoint temperature (Tmid) of the sigmoid curves, and lethal temperature in different ploidy levels carnation cultivars.

栽培種 Cultivars	相對傷害值 ^z RI(%) at 55°C ^z	相對傷害曲線中點溫度 Tmid (°C)	熱致死溫度 Lethal temperature (°C)
Optimistic (2x)	72.9 a ^y	50.3	50.4
Kleos (3x)	73.8 a	50.3	50.5
Bizet (4x)	74.9 a	51.4	51.9

^z : RI (%) = {1-[1-(T_I/T_F)]/[1-(C_I/C_F)]}×100。

^y : 同行英文字母相同者表示經 Fisher's 最小顯著差異性測驗在 5%水準之差異不顯著。

^z : RI (%) = {1-[1-(T_I/T_F)]/[1-(C_I/C_F)]}×100.

^y : Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference test.

討 論

本試驗將近年市場上流通之 23 個香石竹品種以流式細胞儀檢測相對 DNA 含量，推測有 14 個為二倍體 (1.96-2.08 units)、2 個為三倍體 (2.99 和 3.01 units)、5 個為四倍體 (3.98-4.08 units) 和 2 個為非整倍體 (4.34 和 4.46 units) (表 1)，這結果與八木等 (2007) 研究結果雷同，該試驗結果指出多數香石竹品種為二倍體佔 97.7% (297/304)，少數為多倍體，三倍體約 0.1% (3/304)，四倍體約為 1.3% (4/304)。由於多倍體香石竹通常具晚花的特性，此特性不符合商業生產的期待，因此多倍體香石竹可能於選拔過程中遭淘汰 (Onozaki, 2018)。此外本研究亦發現非整倍體品種 ('Barbados' 和 'Butterfly') (表 1)，此結果與八木等 (2007) 不同，該篇文獻以流式細胞儀檢測 307 個香石竹栽培種並未發現非整倍體，推測其可能原因，由於香石竹雜交背景複雜 (Onozaki, 2018)，近年來為改善香石竹之缺點，已有香石竹與石竹屬物種種間雜交之研究 (小野崎等, 2002; 小野崎等, 2011; 小野崎等, 2013; Nimura *et al.*, 2003; Nimura *et al.*, 2006; Nimura *et al.*, 2008)，又石竹屬物種相對 DNA 含量範圍廣泛 (牛尾等, 2002)，故推測本試驗中非整倍體品種 'Barbados' 和 'Butterfly' 可能為香石竹種間雜交所獲得。

本試驗結果亦發現僅單朵大花之品種可區分成不同倍數體，且二倍體品種保衛細胞長度介於 35.89-43.50 μm，三倍體品種保衛細胞長為 38.47 和 47.60 μm，四倍體品種範圍為 46.89-56.69 μm，保衛細胞寬度並未看出明顯趨勢 (表 1)。八木等 (2007) 調查不同倍數體香石竹氣孔長度的結果顯示，三倍體和四倍體氣孔長度相似且大於二倍體，建議可依氣孔長度初步區分二倍體和多倍體，但本試驗中三倍體品種 'Kleos' 保衛細胞長度與二倍體品種

相近，因此利用保衛細胞長度判斷現今流通之香石竹品種倍數性仍需保守評估。因此本試驗輔再透過建立花粉大小資訊，得知單朵大花二倍體品種大/小花粉直徑分別為 51.05-53.37/43.20-45.80 μm ，四倍體為 65.14-69.62/42.10-60.54 μm ，具明顯差異 (表 1)。然而八木等(2007)並未調查香石竹倍數性和花粉之相關性，先前已發現二倍體雜交石竹(*D. caryophyllus* L. $\times$ *D. japonicus* Thunb.)之花粉大小較其四倍體秋水仙素誘變株小 (Nimura *et al.*, 2006)，又植物三倍體植株通常不具稔性 (Sattler, 2016)，故本研究建議可用花粉大小及型態初步判別香石竹品種之倍數性。此外本試驗供試 23 個品種中，有 14 品種可產生花粉其中有 11 品種出現大小花粉，推測大花粉為未減數配子 (表 1)。已知未減數配子對於物種演化 (Mason and Pires, 2015)及育種 (Younis *et al.*, 2014)扮演重要角色，玫瑰花(El Mokadem *et al.*, 2002)、百合 (Chung *et al.*, 2013)、秋海棠 (Dewitte *et al.*, 2009)和香石竹 (Zhou *et al.*, 2015)已證實具有大小孢子現象。通常未減數分裂配子產生與逆境相關，如玫瑰花發現處理 30°C 以上高溫，會提升未減數配子發生的比率 (Pécirix *et al.*, 2011)。因此推測本試驗大部分有產花粉之香石竹品種具有未減數配子的原因可能為 5-7 月高溫環境導致 (Zhou *et al.*, 2015)。然而本試驗中，'Unknown Red 1'並未發現大花粉，先前的研究亦發現香石竹並非所有栽培種均會產生未減數配子，且未減數配子形成比率與每個品種間有所不同，推測品種間是否形成未減數配子與遺傳差異相關 (Zhou *et al.*, 2015)。

將三個不同倍數性品種處理不同水浴溫度檢測電解質滲漏率計算 RI 值，其中 55°C 下葉片之 RI 值沒有顯著差異 (表 2)，顯示這三種香石竹不同倍數性品種其耐熱性可能相似。與其他石竹屬物種比較，黃 (2017)指出石竹屬物種 55°C 水浴處理，葉片 RI 值為 11.7-73.5%，相對傷害曲線中點溫度為 51.7-55.6°C，熱致死溫度為 52.2-56.1°C，其參試物種中於馬祖採集的長萼瞿麥 (*D. superbus* L. var. *longicalycinus*)有最佳的細胞膜熱穩定性 (黃，2017)。而本試驗三個不同倍數性香石竹品種 55°C 下葉片之 RI 值較高為 72.9-74.9%，相對傷害曲線中點溫度較低為 50.3-51.4°C，熱致死溫度較低為 50.4-51.9°C (表 2)，結果顯示不同倍數性香石竹品種高溫水浴處理仍與其他石竹屬物種類表現不同，但與實際高溫耐候性仍須後續研究比較證實。

總結，試驗結果指出現今流通之香石竹品種倍數性與保衛細胞及花粉大小呈正相關趨勢，三倍體品種不具花粉，未來可透過測量保衛細胞和花粉大小進行初步篩選，並透過流式細胞儀再次確認，此研究方法建立可有效節約流式細胞儀高額檢測藥材耗品使用，並為香石竹倍數性評估及育種工作提供基礎資訊建立。此外本篇文獻提供不同倍數性香石竹細胞膜熱穩定性之結果，未來本篇研究結果將可結合高溫環境逆境，比較對其香石竹生長量之影響及表現，以建立其相關性。

參考文獻

- 八木雅史、藤田祐一、吉村正久。2007。フローサイトメトリーによるカーネーション栽培品種の倍数性の網羅的推定。花き研究所研究報告 7: 9-16。
- 小野崎隆、池田広、山口隆、姫野正己、天野正之、柴田道夫。2002。萎凋細菌病抵抗性中間母本'カーネーション農1号'の育成とその特性。園芸学研究 1: 13-16。
- 小野崎隆、八木雅史、藤田祐一、棚瀬幸司。2011。花持ち性の優れるカーネーションとカワラナデシコとの種間雑種および戻し交雑系統の特性。園芸学研究 10: 161-172。
- 小野崎隆、八木雅史、棚瀬幸司。2013。カーネーション、カワラナデシコ種間雑種および戻し交雑系統における開花の早晩性と日長反応性ならびに早生性の遺伝性。園芸学研究 12: 351-359。
- 牛尾亜由子、小野崎隆、柴田道夫。2002。フローサイトメーターによる *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性測定。花き研究所研究報告 2: 21-26。
- 行政院農業委員會。2020。農產品生產量值統計。農業統計資料查詢。
<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>。
- 李誠紘。2019。玉米雄配子發育時期之 B 染色體相關 cDNA-AFLP 標誌篩選與分析及玉米變異 B 染色體-Btd 之分析。國立中興大學農藝學系碩士學位論文。126pp。
- 曾夢蛟。1990。溫度逆境生理在園藝育種上之應用。園藝作物育種講習會專刊。臺灣省農業試驗所。pp. 69-79。
- 黃智暉。2017。花壇用種間雜交石竹之選育。國立台灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系碩士論文。114pp。
- 廖晨皓。2019。不同倍数性聖誕紅之生理性狀評估及育成。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。116pp。
- 魏芳明。2005。香石竹。台灣農家要覽-農作篇 (二) (增修訂三版)。行政院農業委員會。pp. 691-694。
- Aragane, M., D. Watanabe, J. Nakajima, M. Yoshida, M. Yoshizawa, T. Abe, R. Nishiyama, J. Suzuki, T. Moriyasu, D. Nakae, H. Sudo, H. Sato, A. Hishida, N. Kawahara, S. Makabe, I. Nakamura, and M. Mii. 2014. Rapid identification of a narcotic plant *Papaver bracteatum* using flow cytometry. J. Nat. Med. 68: 677-685.
- Balao, F., R. Casimiro-Soriguer, M. Talavera, J. Herrera, and S. Talavera. 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. Ann. Bot. 104: 965-973.
- Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. 50: 859-865.
- Chung, M. Y., J. D. Chung, M. Ramanna, J. M. Van Tuyl, and K. B. Lim. 2013. Production of

- polyploids and unreduced gametes in *Lilium auratum* × *L. henryi* hybrid. *Int. J. Biol. Sci.* 9: 693-701.
- Dewitte, A., T. Eeckhaut, J. Van Huylenbroeck, and E. Van Bockstaele. 2009. Meiotic aberrations during 2n pollen formation in *Begonia*. *Heredity*. 104: 215-223.
- El Mokadem, H., L. Crespel, J. Meynet, and S. Gudin. 2002. The occurrence of 2n-pollen and the origin of sexual polyploids in dihaploid roses (*Rosa hybrida* L.). *Euphytica*. 125: 169-177.
- Ishizaka, H., T. Oku, K. Mishiba, M. Mii. 2009. Identification of ploidy level of *Cyclamen rohlfsianum* plants through flow cytometric and cytological analysis of *C. rohlfsianum*, *C. purpurascens* and their hybrid. *Cytologia*. 74: 457-465.
- Johnston, S. A. and R. E. Hanneman. 1980. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am. Potato J.* 57: 7-14.
- Martineau, J. R., J. E. Specht, J. H. Williams, and C. Y. Sullivan. 1979. Temperature tolerance in soybeans I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.* 19: 75-78.
- Mason, A. S. and J. C. Pires. 2015. Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends Genet.* 31: 5-10.
- Nimura M., J. Kato, M. Mii, and K. Morioka. 2003. Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1164-1170.
- Nimura, M., J. Kato, H. Horaguchi, M. Mii, K. Sakai, and T. Katoh. 2006. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicas* Thunb. *Breed. Sci.* 56: 303-310.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii, and K. Ohishi. 2008. Cross-compatibility and the polyploidy of progenies in reciprocal backcrosses between diploid carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and its amphidiploid with *Dianthus japonicus* Thunb. *Sci Hortic.* 115: 183-189.
- Onozaki, T. 2018. *Dianthus*. In: *Ornamental Crops*, Johan Van Huylenbroeck (eds.), Springer. pp. 349-381.
- Pécix, Y., G. Rallo, H. Folzer, M. Cigna, S. Gudin, and M. Le Bris. 2011. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *J. Exp. Bot.* 62: 3587-3597.
- Sattler, M. C., C. R. Carvalho, and W. R. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 243: 281-296.
- Yagi, M., T. Kimura, T. Yamamoto, and T. Onozaki. 2009. Estimation of ploidy levels and breeding backgrounds in pot carnation cultivars using flow cytometry and SSR markers. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 78: 335-343.

- Yeh, D. M. and H. F. Lin. 2003. Thermostability of cell membranes as a measure of heat tolerance and relationship to flowering delay in chrysanthemum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 656-660.
- Younis, A., Y. J. Hwang, and K. B. Lim. 2014. Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. *Plant Cell Rep.* 33: 215-223.
- Zhou, X. H., X. J. Mo, M. Gui, X. W. Wu, Y. L. Jiang, L. L. Ma, Z. M. Shi, Y. Luo, and W. R. Tang. 2015. Cytological, molecular mechanisms and temperature stress regulating production of diploid male gametes in *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Physiol. Biochem.* 97: 255-263.
- Zhou, X., Y. Su, X. Yang, Y. Zhang, S. Li, M. Gui, and J. Wang. 2017. The biological characters and polyploidy of progenies in hybridization in 4x-2x crosses in *Dianthus caryophyllus*. *Euphytica*. 213: 118.

The Correlation between Polyploidy Level and Plant Characteristics and Cell Membrane Thermostability in Carnation

Zheng-Hong Chen¹⁾ Yen-Ming Chen²⁾

Key words: Carnation, Flow cytometry, Ploidy level, Guard cell, Pollen, Cell membrane thermostability

Summary

In present study, the ploidy levels of various carnation cultivars were analyzed by flow cytometry to establish the correlation between ploidy levels and plant characteristics for early selection. In addition, the cultivars were investigated the electrolyte leakage and calculated relative injury (RI) to evaluated the relationship between polyploidy level and cell membrane thermostability. The results indicated 14 cultivars were diploid, 2 cultivars were triploid, 5 cultivars were tetraploid, and 2 cultivars were aneuploidy among 23 commercial cultivars by flow cytometry. The length of guard cells of diploid, triploid, and tetraploid exhibited a positive correlation with the ploidy levels, but the width were no relationship. Most carnation cultivars had large/small pollen grains. Pollen size (large/small) of diploids, tetraploids, and aneuploidys were 51.05-60.67/40.28-52.99 μm , 65.14-69.62/42.10-60.54 μm , and 54.26/45.11 μm , and triploid cultivars without pollen. The cell membrane thermostability indicated that relative injury (RI) values of different ploidy cultivars at 55°C were no significant difference, midpoint temperature (T_{mid}) of the sigmoid curves were 50.3-51.4°C, and lethal temperature were 50.4-51.9°C.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.

鐵炮型百合地被品種回交選育

陳 亭 霈¹⁾ 邱 冠 融²⁾ 李 佩 芳³⁾ 張 正⁴⁾

關鍵字：鐵炮型百合、地被品種、回交

摘要：以 3 個 F₁ 單株為父本，其父本為鐵炮百合商業品種‘白天堂’，母本為新北市瑞芳區南雅里海蝕平台鐵炮百合產的實生苗特殊單株，與母本‘白天堂’(輪迴親)進行回交，其中父本可於播種後 1 年內開花，且株型矮小。在 2019 年 06 月 01 日進行雜交授粉，8 週後採綠熟果進行無菌播種，在同年 10 月 23 日陸續出瓶，在 2020 年 2 月 10 日開始有植株抽莖，3 個月後有第 1 株開花株。以早熟、矮生、莖軸硬挺、鱗莖圓且緊實為目標進行篩選，共選拔出 2 株 F₁BC₁，編號為 F108001-4 與 F108001-8，前者於 5 月 17 日開花，株高 35.8 cm，莖軸直徑 6.0 mm，花瓣厚度 0.56 mm，母鱗莖圓形且肥大；後者在 5 月 27 日開花，株高 36.5 cm，植株直挺且莖軸直徑為 6.4 mm，花瓣厚度 0.63 mm，鱗莖方面僅存 3 顆莖生小鱗莖，外型有圓形與橢圓形。本次選育出之鐵炮百合地被品種可於未來繼續雜交或栽植推廣，建立具亞熱帶適應性的鐵炮百合本土品種。

前 言

鐵炮百合 (*Lilium longiflorum*) 為臺灣重要且具特色的原生百合屬種質資源，是世界上重要的球根花卉，在日本、美國與歐洲都有發展出盆花與切花的產業 (許等, 2002)。臺灣每年自國外進口大量百合種球，行政院農業委員會農糧署統計報告指出，主要來源國家為荷蘭，智利、法國以及少量輸入的紐西蘭 (行政院農業委員會農糧署, 2021)。

臺灣百合 (*L. formosanum*) 與臺灣鼻頭角產的鐵炮型百合具早熟性 (許, 1984；

1) 國立中興大學園藝系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系碩士班前研究生。

3) 輔英科技大學生物科技系助理教授。

4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者(Email: chenchang@dragon.nchu.edu.tw)。

Mojtahedi *et al.*, 2013a)與耐熱性 (許, 1984; Mojtahedi *et al.*, 2013b)等, 是育種上具有優勢的種原。

然而國內農業市場多以國外進口種球進行生產與販售, 尚無運用臺灣自身豐富的鐵炮型百合資源, 發展出屬於本土之品種於市場上流通銷售。

新北市瑞芳區南雅里海蝕平台的原生百合族群具有矮生及葉片寬短的特徵, 且部分個體有早熟特性 (邱; 2019; 張, 2016), 早熟性可縮短育種年限, 加速育種進度, 而矮生的特性具有作為盆花或地被品種的潛力。本實驗室先前在南雅棲地採種後, 於田間栽植選拔具有早熟與矮生的單株, 將其與具有觀賞性的鐵炮百合商業品種'白天堂' (*L. longiflorum* 'White Heaven')進行雜交。本試驗從 F_1 中挑選 3 個選拔株與'白天堂'進行 BC_1 , 期望能從中篩選出保有早熟矮生, 且莖軸硬挺不易倒伏的植株, 並引入商業品種花型與種球圓整緊實的特性, 使其較適於商業儲運, 培育出可用於地景栽培、適應亞熱帶氣候的臺灣本土鐵炮型百合新品種, 增加臺灣原生生物資源的開發與利用。

材 料 與 方 法

一、試驗材料

以鐵炮百合商業品種'白天堂' (*L. longiflorum* 'White Heaven') (編號: L670⁵⁾)作為輪迴親, 而非輪迴親為來自新北市瑞芳區南雅里海蝕平台上採集之鐵炮百合種子 (編號: L408S)播種後具有矮性、早熟性狀的後代實生苗 L621, 其株高 9.4 cm, 花筒長 15.6 cm。於 F_1 雜交時, 以 L621 為母本, L670 為父本, 從後代中挑選有導入母本早熟矮生特性的 3 株選拔株, 編號為 F107003-1、F107004-1、F107004-2⁶⁾。並以此 3 個 F_1 選拔株為父本與 2016 年金門植物園原生植物栽培計畫, 種植於金門縣林務所金門植物園河道旁之'白天堂'植株進行 BC_1 。

二、試驗方法

(一)回交

於父本 F107003-1、F107004-1、F107004-2 之花朵開放時 (分別為 2019 年 5 月 21、20 與 28 日)以鑷子將花粉取下, 以硫酸紙包覆並裝於放有乾燥矽膠粒之離心管中, 保存於 5°C 備用。本試驗以混合花粉進行授粉, 三株父本的花粉存放於同一個硫酸紙包裝中。同年 05 月 31 日在金門植物園挑選尚未開花之'白天堂'植株, 且有花苞已轉白色, 有機會於隔天開放之花苞 (圖 1A), 以鑷子夾除雄蕊 (圖 1B), 並以 4x4 cm² 鋁箔紙套住柱頭 (圖

5) 本實驗室建有百合種原庫, 將收集或育種之種原進行編號, 以 L 代表 *Lilium*, 數字為納入種原庫時之流水號, S 代表 seed。

6) 雜交組合編號說明: 以 F 代表 *formolongi*, 前 3 碼代表授粉民國年度, 接續的 3 碼為授粉組合流水號, 槓號後為該組合之選拔株序號。

1C)。於隔天取出預先貯藏欲進行授粉的花粉置於玻片上，放入墊有濕潤濾紙的培養皿內回濕 1 小時。利用鑷子將花粉均勻授於柱頭上 (圖 1D)，再將鋁箔紙包回柱頭上，於標牌上記錄雜交

親本資訊以及授粉日期，固定於小花梗上。

於 2019 年 07 月 17 日採綠熟果 (圖 1E) 共 14 顆，並取 3 顆果實計算種子數與有胚數。於 2019 年 07 月 18-20 日進行綠熟果無菌播種， F_1BC_1 以授粉代號 F108001 代號之。培養基的製備是以血清瓶裝 $8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Agar (Trade Mark, Taiwan) 經高溫高壓滅菌，在無菌操作台內倒入無菌塑膠培養皿 (直徑 9 cm) 達半滿高度，在培養基凝固後以石蠟膜封口，放回原包裝塑膠袋中 (20 皿/袋) 備用。將果實以清水清洗後，以市售 6% 漂白水 (Clorox, USA) 加一滴 Tween 20 滅菌 20 分鐘，進到無菌操作台後以無菌水漂洗 3 次。以解剖刀切除果實頂端及末端，沿蒴果腹縫線切開果皮，夾取有線胚單粒種子到水洋菜培養基上，以將培養基表面鋪滿，但種子不重疊為原則 (圖 1F)。操作完畢後進行石蠟膜封口。放置在培養室黑暗環境下使其發芽。

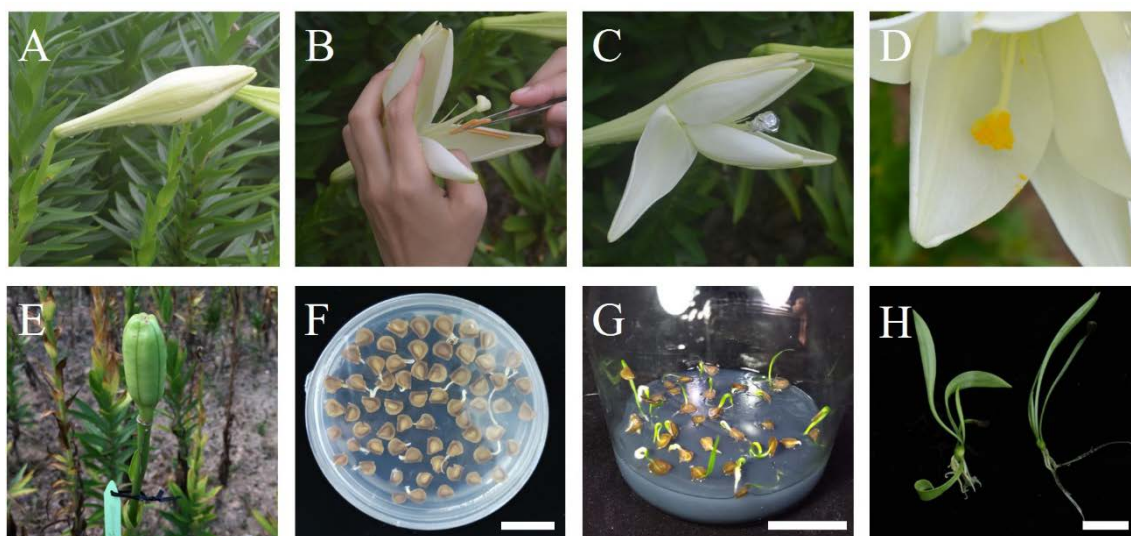


圖 1. 鐵炮型百合回交之授粉方法與播種育苗流程。

Fig. 1. The pollination, nursery and sowing process of Longiflorum-type lily backcross.

(A) Choose the flower buds that will bloom in the next day (B) Emasculate by tweezers (C) Wrap the stigma with aluminum foil after pollination (D) Stigma covered with pollen after pollination (E) Green ripening fruit used for *in vitro* seed germination (F) Seeds sowed in petri plate with water agar (Bar=2 cm) (G) Subculture the seedling into culture medium after germination (Bar=3 cm) (H) The seedling which subcultured for 2 months (Bar=2 cm).

種子發芽後繼代到發根培養基中培養 2 個月 (圖 1G)，而發根培養基配法為 MS 基礎鹽類配方 (Murashige and Skoog, 1962) 添加 $170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Hayashi Pure Chemical Ind., Co., Ltd. Japan)、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ myo-inositol (Sigma-Aldrich Co., USA)、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Casein Hydrolysate (Sigma-Aldrich Co., USA)、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA(α -naphthalene acetic acid) (Sigma-Aldrich Co., USA)、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose (Taiwan sugar Coporation, Taiwan)、 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Agar (Trade Mark, Taiwan)、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Charcoal (高純度活性炭素，臺灣炭素工業股份有限公司，臺灣)，以 1N HCl 及 1N NaOH 將 pH 值調整至 5.7。以蘭花瓶裝 100 ml 培養基，再以洞口塞有棉花的橡皮塞封口，以高溫高壓滅菌釜於 121°C 、 $1.2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 條件下滅菌 20 分鐘，冷卻後備用。

出瓶前將瓶苗 (圖 1H) 移至國立中興大學園藝系花卉研究室精密水牆溫室馴化 2 週。種植介質使用泥炭土 BVB (A18014 peatmoss 7HP0351941, Bas Van Vuuren B.V., De lier Netherland): 珍珠石 (南海珍珠石 2 號, 臺灣): 蛭石 (南海蛭石 3 號, 臺灣) = 1:1:1 (v/v/v)。出瓶時種植於 2 吋黑軟盆中，在觀察到盤根時陸續換盆至 3.5 吋黑軟盆與 5 吋紅盆。

(三) BC_1 世代選拔與調查

從最初播種後 1 個月時淘汰未發芽之種子，在有第 1 株開花株出現後開始進行植株選拔，並篩選其後 1 個月內有開花之早熟 F_1BC_1 ，接著從中保留株高低於 37.3 cm 者，進行最後評選，剔除植株會倒伏，與花朵不對稱或畸形者。於選拔時，進行開花特性與莖、葉片與花朵的性狀調查，並在 2020 年 08 月 21-23 日地上部逐漸枯萎時，進行收球調查。將植株脫盆後清除介質與剪根，以清水洗淨鱗莖，進行鱗莖性狀調查。

結 果

一、回交及育苗栽培

本實驗於 2019 年 06 月 01 日進行雜交授粉，授有 16 朵花。在 2019 年 07 月 17 日，約 1.5 個月後果實發育正值綠熟果期，共採得 14 顆果實 (長度約 8.5 cm，寬約 2.5 cm)。採果後隔天開始進行綠熟果無菌播種，有胚率 43.1%，平均一顆果實有 134 顆有胚種子，共播有 1876 粒種子於水洋菜培養基。在 2-3 個禮拜後開始有種子陸續發芽，並移至發根培養基中培養 2 個月，僅挑選播種後一個月內有發芽之實生苗，共 223 株。在發根培養基培養 6 週後，移至國立中興大學園藝系花卉研究室精密水牆溫室馴化 2 週，在 2019 年 10 月 23 日至 11 月 18 日依照種子發芽快慢分 4 批出瓶種植於 2 吋黑軟盆。

F_1BC_1 於 2 吋黑軟盆中種植，在 4 週左右會開始盤根，在 2019 年 11 月 18 日之後陸續換至 3.5 吋黑軟盆，接著同樣約於 3-4 週後有盤根情形，在 2019 年 12 月 11 日開始漸次換至 5 吋紅盆。在 F_1BC_1 出瓶時觀察到出瓶苗的葉數最多可達 5 片，以 3 片數量最多；根數最多可到 8 根，大部分介於 3-6 根。而且出瓶之時，已有 11 株有抽莖，然而這些抽莖

株的地上部莖軸相當之細且軟，栽培觀察到最後多有中途枯萎或未開花者，不過少數會在 2-3 月後進行第 2 次抽莖。 F_1BC_1 出瓶後 1 個月，最高葉數為 9 片，而 2-3 個月後最高葉數都為 11 片葉，在出瓶後 4 個月則達 17 片。在 2020 年 02 月 10 日已有第一個植株抽莖，2020 年 05 月 07 日有第 1 株開花株。於同年 08 月 21-23 日進行收球，最終存活株數為 142 株。

二、 F_1BC_1 地被選種

從最初播種 1876 粒種子，接著淘汰無法於播種後 1 個月內發芽之種子，僅留下 11.9% 的出瓶苗共 223 株，在 2020 年 05 月 07 日有第 1 株開花株出現後開始進行植株選拔，此時的存活株數為 142 株，其中共有 112 株抽莖，抽莖率為 79%，從有抽莖的植株中挑選在 2020 年 05 月 07 日後 1 個月內有開花之早熟植株。接著從中保留株高低於 37.3 cm 者，進行最後評選，共得 9 株 F_1BC_1 候選株，分別為 F108001-1~F108001-9，最後再剔除植株會倒伏，與花朵不對稱或畸形者，選擇 F108001-4 及 F108001-8 作為選拔株。

F108001-4 (圖 2) 從抽莖至開花需 75 天，花期為 8 天 (表 1)，植株矮且莖軸粗，花莖長與直徑分別是 35.8 cm 與 6.03 mm。葉序互生，葉面斜上發展不軟垂，葉片披針形且大，莖上葉長 11.0 cm，莖上葉寬 2.6 cm，葉端尖且葉緣平滑。花筒顏色為乳白色，且花瓣卷曲，花筒長 15.0 cm，花橫徑 16.8 cm，花瓣厚度 0.56 mm，花粉為黃色，花粉發芽率為 $34 \pm 3\%$ 。鱗莖部分，母鱗莖肥大且近圓形，鱗莖周徑 13.3 cm，鱗莖高度 3.3 cm，鱗片包覆緊密且貼合，鱗片頂端尖形 (表 2)。

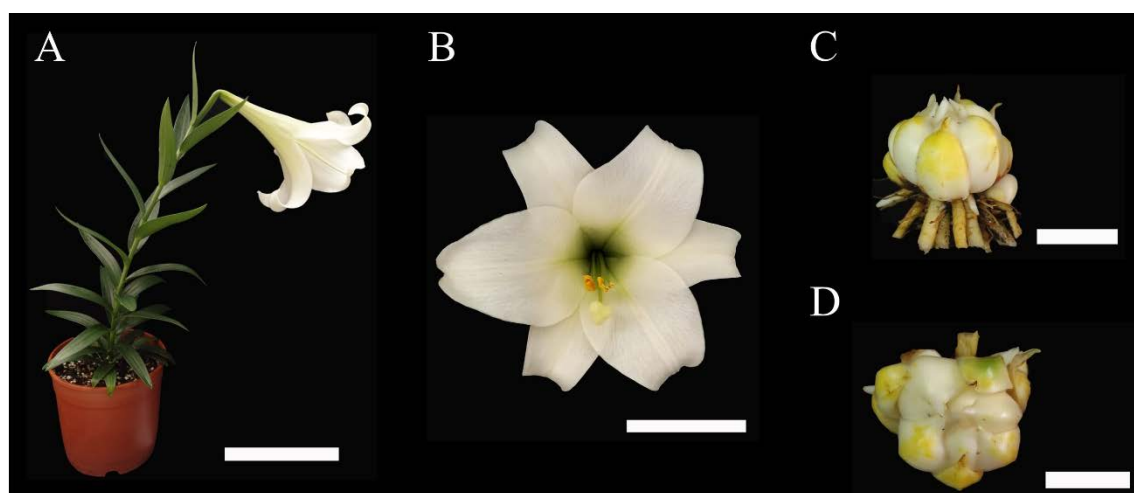


圖 2. 鐵炮型百合雜交後代選拔株 F108001-4 植株照片。

Fig. 2. Image of selected individuals from Longiflorum-type lily hybrids F108001-4.

(A) Whole plant (Bar=10 cm) (B) Flower (Bar=5 cm) (C) Side view of bulb (Bar=3 cm) (D) Top view of bulb (Bar=3 cm).

表 1. 西元 2020 年鐵炮型百合雜交後代選拔株之開花特性。

Table 1. The flowering characteristic of selected individuals from Longiflorum-type lily hybrids in 2020.

Accession No.	Stem		Stem leaf		Flower		Perianth thickness (mm)	Bulb	
	height (cm)	diameter (mm)	length (cm)	width (cm)	length (cm)	width (cm)		diameter (cm)	height (cm)
F108001-4 ^z	35.8	6.03	11.0	2.6	15.0	16.8	0.56	13.3	3.3
F108001-8	36.5	6.40	10.0	2.2	15.2	15.6	0.63	9.2	2.9

z The paternal plants of F108001 hybrid combination are three hybrids possessing precocity and dwarf characteristic which hybrids from Nanya individuals and *L. longiflorum* 'White Heaven'; the maternal plant of F108001 hybrid combination is *L. longiflorum* 'White Heaven'.

表 2. 西元 2020 年鐵炮型百合雜交後代選拔株之植株性狀。

Table 2. The plant characteristic of selected individuals from Longiflorum-type lily hybrids in 2020.

Accession No.	Shoot elongation date (m/d)	Visible bud date (m/d)	Blooming Date (m/d)	Withering date (m/d)
F108001-4 ^z	3/04	4/27	5/17	5/25
F108001-8	3/27	5/11	5/27	6/03

z The paternal plants of F108001 hybrid combination are three hybrids possessing precocity and dwarf characteristic which hybrids from Nanya individuals and *L. longiflorum* 'White Heaven'; the maternal plant of F108001 hybrid combination is *L. longiflorum* 'White Heaven'.

F108001-8 (圖 3)從抽莖至開花經過 62 天，花期約 7 天 (表 1)。莖軸直挺且莖軸粗，花莖長 36.5 cm，花莖直徑 6.4 mm。葉序互生且茂密，葉面斜上發展，葉片披針形且大，莖上葉長 10 cm，莖上葉寬 2.2 cm，葉端尖且葉緣平滑。花朵對稱，花筒顏色為乳白色，花瓣卷曲且內花被卷曲部分呈寬橢圓形，花筒長 15.2 cm，花橫徑 15.6 cm，花瓣厚度 0.63 mm，花粉為黃色，花粉發芽率為 32±3%。母鱗莖無留存，僅存 3 顆莖生小鱗莖，其中有兩顆大小相近，不論從側面或俯視看皆為橢圓形，另一顆則較小，鱗莖近圓形，最大顆的鱗莖周徑為 9.2 cm，高度 2.9 cm，鱗片包覆緊密且貼合，鱗片頂端尖形 (表 2)。

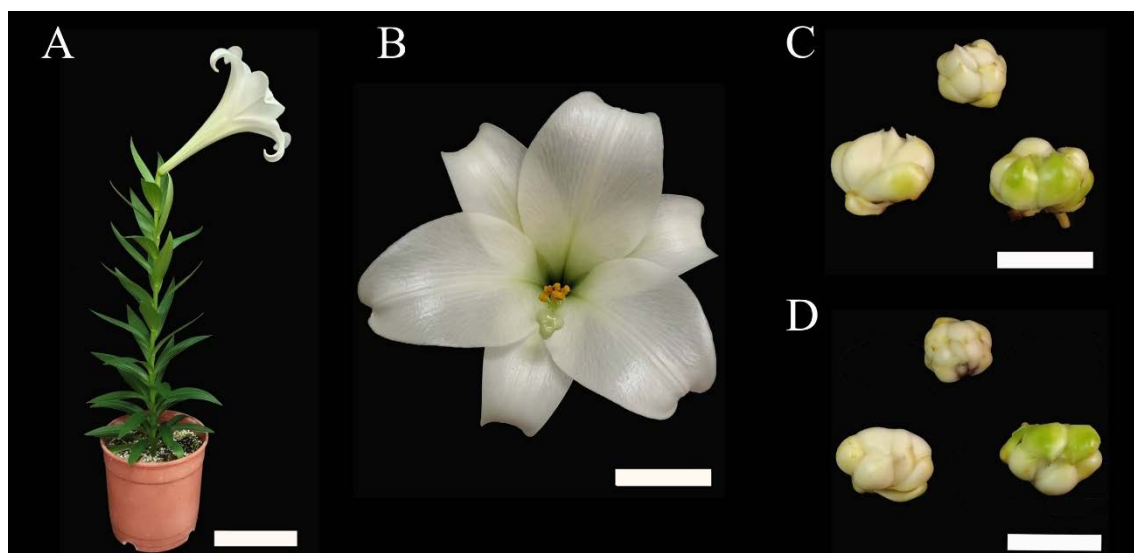


圖 3. 鐵炮百合雜交後代選拔株 F108001-8 植株照片。

Fig. 3. Image of selected individuals from Longiflorum-type lily hybrids F108001-8.

(A)Whole plant (Bar=10 cm) (B)Flower (Bar=5 cm) (C)Side view of bulb (Bar=3 cm) (D)Top view of bulb (Bar=3 cm).

討 論

一、雜交親本

本試驗之父本選用邱 (2019)臺灣新北市瑞芳區南雅原生鐵炮百合與鐵炮百合商業品種'白天堂' (*L. longiflorum* 'White Heaven')雜交所獲得之 F_1 後代 F107003-1、F107004-1 與 F107004-2，其中南雅的原生百合族群具有特殊性，不論是位於棲地或是進行實生苗觀察，皆有矮生特性，而在實生苗的觀察中，有發現可於 1 年內開花，具有早熟性的個體，並且以具有早熟與矮生特性的實生單株進行雜交育種，有選拔株仍保有早熟矮生特性，顯示其為可遺傳的性狀。而且南雅所在的地理位置特殊，與琉球群島中的與那國島僅相距約 130 km，此區的原生百合在實生苗特性的觀察中，發現其同時具有鐵炮百合葉片寬短的外觀，與臺灣百合的早熟性 (邱，2019；張，2016)，此現象與陳 (2021)推測之結果相呼應，南雅族群可能為混合族群，是以鐵炮百合為主，夾雜臺灣百合植株。

而本試驗之母本則選用本實驗室於 2016 年因金門植物園原生植物栽培計畫，種植於金門縣林務所金門植物園河道旁作為地被植物之鐵炮百合商業品種'白天堂'。此區之鐵炮百合可於每年開花，營造花海景觀，顯示鐵炮百合於金門生長狀態優，且植株健壯、營養良好，是以金門植物園河道旁之鐵炮百合商業品種'白天堂'作為雜交之親本。由於父本

F107003-1、F107004-1、F107004-2 的開花日期為 2019 年 05 月 20-28 日，比金門植物園河道旁之鐵炮百合商業品種‘白天堂’盛花期還要早，因此並無法做到互交，僅能作為父本，預先冷藏儲存花粉備用。

二、綠熟果無菌播種

為使種子快速發芽，可以將綠熟果或種子進行無菌播種，使其跳過種子脫水與休眠的發育階段 (邱，2019；錡，2018；Dhyani *et al.*, 2014)。而本試驗於 2019 年第一代回交後，承襲邱(2019)黃熟果無菌播種法，以水洋菜培養基進行綠熟果無菌播種，在水洋菜培養基培養下，可於 2-3 週後開始有種子陸續發芽，如此可節省百合蒴果完全成熟與開裂，以及層積種子所需之時間，大幅縮短育種流程。

此外，於 2019 年 7 月中下旬以綠熟果進行無菌播種，在經過繼代後，可於同年 10 月下旬開始出瓶，鄭與許 (1984)指出相較於 20/15℃ 日夜溫處理，25/20℃ 日夜溫處理鐵炮型百合實生苗生長較旺盛，鱗片葉可達 43.5-59.8 片，而本試驗 F₁BC₁ 出瓶時間恰逢生長適溫，並於 2019 年 12 月至隔年 02 月遇天然低溫刺激來促進植株抽莖生長及花芽分化，在 2020 年 05 月有植株開始開花。因此以綠熟果無菌播種改良鐵炮型百合育種流程，可以在提早播種的方式下，讓雜交後代出瓶時可以接上自然生長季，依照需求調節產期，並在播種一年內開花，完成世代循環與育種選拔。

三、栽培

F108001 之出瓶苗在出瓶後 1-4 個月，最高葉數分別為 9、11、11 與 17 片，此狀態與邱 (2019)描述相似，於出瓶初期鱗片葉生長快速，然中間會有停滯，許 (1984)亦有指出簇生葉經低溫處理會使其中止生長，不過在回溫後可快速恢復生長勢，且葉片伸展率可因低溫處理而大為提升，本試驗出瓶後 2-3 月正值 12 月中至隔年 2 月中，為一年當中氣溫最低的月份。此外，低溫能誘使植物進行生長相的轉變，由簇生期 (營養生長狀態)轉為抽莖期 (生殖生長狀態)(許，1984)，而本試驗正從 2020 年 2 月 10 日開始有植株抽莖。本次試驗在出瓶後 (播種後 3 個月)已可有植株抽莖，然而這些植株的莖軸細軟，皆於中途枯萎或未開花者，應是其養分累積仍不夠充分，不足以支撐植株開花。

四、F₁BC₁ 選拔

本試驗是以具早熟性、矮生、莖軸挺立、種球圓且緊實為重要評斷項目，從最初播種 1876 粒有胚種子，到最終出瓶 223 株苗中，挑選出 2 個選拔株，分別為 F108001-4 (圖 2) 與 F108001-8 (圖 3)。本次回交是在 2019 年 07 月 18-20 日進行播種，而 F108001-4 與 F108001-8 則是分別於 2020 年 05 月 17 日與 27 日開花 (表 1)，皆於 1 年內開花，達早熟標準。相較於東方型 (Oriental type, O)與亞洲型 (Asiatic type, A)需要 2-5 年才具開花能力 (許等，2002)，在育種選拔方面比較耗時，本選拔株可以年年都一世代，有極大的育種潛力，如果與其他型百合進行雜交，導入早熟性，有望可以減少新品種育成所需的時間。

於植株高度上，F108001 的父本 F107003-1、F107004-1 與 F107004-2 花莖長為 37.3、25 與 28.7 cm (邱，2019)。本次 2 株選拔株花莖長分別為 35.8 與 36.5 cm (表 2)，顯示其仍

保有父本矮性的特性。而本育種目標是可作為地被之品種，若植株柔弱易倒伏，整體觀感可能會凌亂不齊，如果要為之立支柱也過於耗費人力資源，因此為使景觀整齊且無需過多維護，莖軸是否直挺為重要關鍵。本實驗室於 2021 年 10 月曾購入鐵炮百合商業品種‘白天堂’周徑 16-18 cm 之種球，並於同年 12 月開花，觀其莖軸直挺，莖軸直徑平均 6.7 mm。本試驗之選拔株 F108001-4 與 F108001-8 花莖硬挺（圖 2；3），直徑也已接近鐵炮百合商業品種‘白天堂’的莖粗度，其中又以 F108001-8 更為筆挺。

種球的狀態也是本次選拔重點，若要作為商品販售運輸，須具備好的球形，以減少儲運時種球的損壞。F108001-4 與父本 F107003-1 及 F107004-2 較相像，母球有形成大鱗莖，且呈圓球形；F108001-8 則與父本 F107004-1 的情況較相似，母鱗莖並無留存，僅著生莖生小鱗莖（邱，2019），不過不同於父本 F107004-1 的是 F108001-8 的莖生小鱗莖較為肥大。此外，觀察本實驗室經由組培繁殖出來（於 2018 年 07 月 16 日進行初代）之 L670（鐵炮百合商業品種‘白天堂’）與 L621 植株，在生長 2 年後觀察其地下部，L670 的母鱗莖仍宿存；L621 則無母鱗莖留存，僅存莖生小鱗莖。顯示 F108001-8 可能還保有 L621 鱗莖生長的方式與特性。

在葉方面，F108001-4 跟 F108001-8 的葉片大小也與本實驗室於 2021 年 10 月購入與種植的鐵炮百合商業品種‘白天堂’相當，後者葉長 12.1 cm，葉寬 2 cm。此外，F108001-4 跟 F108001-8 之葉面均斜上發展，不軟垂，能使得株型看起來較有活力與生氣（圖 2；3）。其中，F108001-8 擁有更茂密的葉序，使觀賞時不易有莖軸裸露，若作為地被也可遮蔽地表土壤，提升整體景觀的綠覆率。

花期上，F108001 雜交後代皆約在一週左右，差異不大，F108001-4 與 F108001-8 為 8 與 7 天。在花朵大小方面，2 個 F_1BC_1 選拔株的花橫徑比父本 9.6-10.3 cm 更寬；花筒長則與父本 (14.0-15.2) 無太大差異；花瓣厚度較父本 (0.17-0.32 mm) 厚（邱，2019）；整體而言，2 個 F_1BC_1 選拔株的花朵大小與父本相似，不過花朵的展幅更大，視覺效果更優，且花瓣更厚。

本試驗促進臺灣原生百合資源的應用與本土鐵炮型百合品種的研發，選出保有南雅特殊單株實生苗早熟矮生特性，且導入鐵炮百合商業品種‘白天堂’的花朵性狀與種球特性的 F_1BC_1 。早熟的特性可應用於未來雜交育種時，縮短育成年限，提升育種效率，而矮生部分則可往地景地被或盆花育種發展，透過本土百合種質的運用，期望在未來臺灣有本土品種流通於國內外市場，且能發展出自行生產種球的百合產業。

參 考 文 獻

行政院農業委員會農糧署。2021。109 年百合種球 (0601100062) 輸入檢疫數量統計表。
<https://www.afa.gov.tw/cht/index.php?code=list&flag=detail&ids=1115&article_id=46

368>。

- 邱冠融。2019。南雅產矮性原生百合之物候期調查與雜交育種。國立中興大學園藝系碩士論文。87pp.。
- 許圳塗。1984。臺灣百合 (*Lilium formosanum* Wall.)與鐵炮百合 (*L. longiflorum* Thunb.)之變異與特性。臺灣省農業試驗所特刊 14: 177-182。
- 許圳塗、金石文、阮明淑。2002。百合實用花卉栽培技術專輯(五)。財團法人臺灣區花卉發展協會。193pp.。
- 陳亭霈。2021。南雅棲地產鐵炮型百合族群遺傳分析與地被品種選育。國立中興大學園藝系碩士論文。73pp.。
- 郭華仁。2015。種子學。國立臺灣大學出版中心。408pp.。
- 張嘉恩。2016。臺灣原生鐵炮型百合種子貯藏、育苗及開花之研究。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。93pp.。
- 鄭免、許圳塗。1984。苗期溫度、低溫及光週處理對臺灣百合抽莖及開花的影響。中國園藝 30: 50-58。
- 錡虹汝、陳俊源、張正。2018。金門產野百合綠熟果播種與育苗。興大園藝 43: 85-94。
- 龍雅宜、張金政、張蘭年。1999。百合——球根花卉之王。金盾出版社。135pp.。
- Dhyani, A., G. Sharma, B. P. Nautiyal, and M. C. Nautiyal. 2014. Propagation and conservation of *Lilium polyphyllum* D. Don ex Royle. J. Appl. Res. Med. Aromatic Plants. 1(4): 144-147.
- Mojtahedi, N., J. I. Masuda, M. Hiramatsu, N. T. L. Hai, and H. Okubo. 2013a. Variation of dormancy and early flowering ability in *Lilium longiflorum* and *L. formosanum* populations in the Ryukyu archipelago and Taiwan. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82: 234-241.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Sakazono, S., M. Hiramatsu, K. L. Huang, C. L. Huang, and H. Okubo. 2012. Phylogenetic relationship between degree of self-compatibility and floral traits in *Lilium longiflorum* Thunb.(Liliaceae). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 80-90.

Vegetation Cultivar Backcross Breeding of Longiflorum-type Lily

Ting-Pei Chen¹⁾ Guan-Rong Chiou²⁾ Pei-Fang Lee³⁾ Chen Chang⁴⁾

Key words : Longiflorum-type lily 、Vegetation cultivar 、Backcross

Summary

Use three selected hybrid offsprings as paternal plant which is crossed with commercial cut flower *Lilium longiflorum* cultivar ‘White Heaven’ and special individual that sowed from lilies located on wave-cut platform in Nanya village, Ruifang district, New Taipei city. Take ‘White Heaven’ as maternal plant and backcross with the paternal plants mentioned above. The paternal plants can bloom within one year after sowing and the plant height is short. Cross pollination conducted on June 1st, 2019, carried out in vitro seed germination after 8 weeks picking up the fruits at the stage of green ripening. We started the treatment of ex vitro in succession on October 23rd in the same year, and there are plants starting to shoot elongation on February 10th, 2020. After 3 months, the first plant bloomed. Take precocity, dwarf, thick stem and round tight bulb as the breeding goal, two of the hybrid offsprings, F108001-4 and F108001-8, are selected. F108001-4 bloomed in May 17th with 35.8 cm plant height, 6.0 mm stem diameter, 0.56 mm perianth thickness and big round mother bulb. F108001-8 bloomed in May 27th with 36.5 cm plant height which is very straight, 6.4 mm stem diameter, 0.63 mm perianth thickness and only exists three stem bulblet with the shape of round and oval. The selected *L. longiflorum* vegetative cultivar can keep crossing or to promote in the future, establishing native cultivar of Longiflorum-type lily with subtropical climate adaptability.

-
- 1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Former graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Assistant professor, Department of Biotechnology, Fooyin University.
 - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author (Email: chenchang@dragon.nchu.edu.tw).

金門產野百合種原蒐集及栽培特性評估

石 珮 萱¹⁾ 楊 璧 瑜¹⁾ 楊 慧 明²⁾
鐘 立 偉²⁾ 張 正¹⁾

關鍵字：鱗片扦插、低溫層積、開花

摘要：於 2019 年 5 月開花期至金門野百合三個棲地評估植株之花序性狀，篩選後進行種原蒐集，於金門植物園採集 10 株、花崗岩醫院旁裸岩採集 3 株以及太武山採集 7 株，共 20 株種原做為金門產野百合繁殖的供體，經袋裝鱗片扦插繁殖，將再生的小鱗莖進行兩個生長季共為期 18 個月的栽培觀察，評估種質資源可利用性，以低溫層積技術連接兩個生長季，避開高溫所造成的百合植株休眠，並順利於第二個生長季獲得兩個種原的開花株，綜合評估後選採集流水號「園十」為早熟種原，其鱗片葉型短寬，苗期生長勢良好，鱗莖穩定生長，周徑 5-7 cm 即可開花，花朵側開，開花植株型態優良，可作為品系試驗或復育之用途。

前 言

野百合為喇叭型百合的種原之一，部分族群具有花色會轉變、花朵具淡香等特性，除了花朵具觀賞價值外，其鱗莖在中國長期作為食藥用，為具發展潛力的珍貴百合種原 (Huang *et al.*, 2009; Hamid and Kim, 2011; Okubo *et al.*, 2012)。金門島擁有豐富的原生動植物資源，其中具特色的原生野百合廣布於太武山群一帶棲地，族群單株間歧異度高，花型花色及植株型態多樣，值得深入研究開發。歷年族群數量約兩千餘株，原生棲地較分散破碎，且因與人為活動地點重疊常受干擾，面臨族群難以增加甚至逐漸減少的危機 (謝，2013; 楊，2014; 錡，2017; 蔡，2020)。本研究以金門產野百合種原蒐集保存及可利用性

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生、專任助理、教授 (通訊作者; chenchang@dragon.nchu.edu.tw)。

2) 金門縣林務所前所長、金門縣林務所所長。

評估為目的，對野生種原進行初步篩選後進行保種複份，評估繁殖效率和兩個生長季的生長情形，以選出具早熟能力的種原為目標，建立快速篩選具經濟利用價值的野百合野生種原流程。

材 料 與 方 法

一、採集金門產野百合種原

於 2019 年 5 月 5 日和 6 日至金門植物園、花崗岩醫院旁裸岩及太武山，三個金門野外原生野百合族群棲地進行勘查及族群數量統計，並收集花被片顏色為白、黃、粉、紫，花藥顏色為橘、深紅，多花，早花，寬葉，莖軸顏色綠色或綠色帶紫紅色條斑、莖軸寬及花朵具香氣等各式性狀之單株作為種原，依採集順序和採集地點進行流水號編列。於植物園棲地採集 10 株編列為園一至園十，花崗岩醫院旁裸岩採集 3 株編列岩一至岩三，太武山棲地採集 7 株編列山一至山七，共收集 20 株作為種原。在棲地對種原植株性狀進行拍照及文字紀錄，接著以植株為中心距離半徑 10 公分向下挖掘土層至看到鱗莖為止，小心取出完整鱗莖，並留 4-5 片鱗片於原地。

二、金門產野百合種原扦插複份繁殖

在採集後的隔天於中興大學園藝學系花卉研究室進行扦插繁殖，剝取鱗莖健康完整鱗片，以清水沖洗掉鱗片表面的泥土，再浸泡 1000 ppm 億力（免賴得）溶液殺菌 30 分鐘後，取出陰乾 2 個小時至表面乾燥。將蛭石（南海蛭石 3 號）與 RO 水以 8:1 (v/v) 混合使之濕潤後進行鱗片袋裝扦插；鱗片數 40 片以上的採集流水號分別與 750 mL 的濕潤蛭石混拌均勻，裝入 7 號夾鏈袋 (200×140×0.035 mm)，鱗片數 40 片以下的採集流水號分別與 450 mL 的濕潤蛭石混拌均勻，裝入 6 號夾鏈袋 (170×120×0.035 mm)，於夾鏈袋上戳 8 個孔通氣，置於恆溫 25°C 的黑暗環境中培養 15 週，接著移至 5°C 冷藏庫 2 週後取出調查鱗片再生小鱗莖的比例與數量。

三、金門產野百合種原扦插複份小鱗莖兩個生長季栽培

於 2019 年 9 月將經 17 週培養的 20 個金門產野百合種原袋裝扦插苗運送至金門林務所內的設施中栽植。將再生的小鱗莖以 45 孔穴盤種植，每孔大小為 4.8×5.0×4.9 cm³。2019 年 12 月將存活之小鱗莖換盆至 3 吋塑膠紅盆種植，2020 年 4 月再次換盆至 4 吋塑膠紅盆種植。

複份扦插苗第一季生長 10 個月後，於 2020 年 7 月植株地上部逐漸枯萎之際採收其地下鱗莖進行低溫層積。將植株自盆內取出，剪去鱗片葉及過長的根，依鱗莖周徑進行分級，每 2 cm 為一級，分為周徑 5 cm 以下、5-7 cm、7-9 cm 及 9-11 cm。將分級好的鱗莖浸泡 1000 ppm 億力（免賴得）及 250 ppm 新殺蟎溶液 30 分鐘後，陰乾 2 小時至表面乾燥。將泥炭土(BVB 7H, Bas Van Buuren B. V., De Lier Netherlands)與自來水以 8:1(v/v)比例混合

使泥炭土濕潤，作為層積之介質備用。在黑色塑膠籃套上塑膠袋，介質與鱗莖交錯層放，最上層及最底層皆為介質，直至鱗莖層積完後，在塑膠袋上戳洞通氣，送入 $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的 $3.5\times 1.8\times 2.6\text{ m}$ 組合式冷藏庫（壓縮機為 Copeland, USA）。

複份扦插苗經 8 週低溫層積後於 2020 年 9 月出庫種植，周徑 5 cm 以下及 5-7 cm 之鱗莖使用 3.5 吋塑膠紅盆種植，7-9 及 9-11 cm 鱗莖使用 6 吋塑膠紅盆種植，並在每公升介質中混入 1.5 g 緩效性粒肥新好康多 1 號 100 天型 (Hi-control, N:P:K=14-11-13, Japan) 作為基肥。

兩季栽植之介質皆為泥炭土 (BVB 7H, Bas Van Buuren B. V., De Lier Netherlands)，種植深度為小鱗莖高度的兩倍深。栽培管理為一週澆水一次，每 4 週以 1000 ppm 的水溶性複合速效肥 (Peters Professional, N:P:K=20:20:20, Scotts, USA) 進行澆水及葉面施肥。

結 果

一、採集金門產野百合種原

金門原生野百合花期為 4-5 月，於 2019 年 5 月 5 日及 6 日調查之金門原生野百合野生族群總株數約為 1382 株，共採集 20 株性狀具差異的植株作為種原，種原植株花朵如圖 1。2019 年 5 月 5 日於金門植物園棲地調查到 412 株開花株與 308 株抽莖株，並從其中挑選 10 株做為種原，流水採集號編號園一到園十。在植物園竹廊道終點觀景平台上發現一株花朵數達 9 朵，株高達 160 cm 之多花單株，流水採集號編為園一，此植株附近多馬纓丹灌木與其同高；流水採集號為園二的植株葉片寬，不過僅抽莖無開花；野百合花朵大多具青草味，在木屑步道中一顆大石頭下發現一株花朵具香氣的單株，經過五位採集同行者一致認定是香味，流水採集號為園三；在球型劇場旁有一株花被片厚，挖掘地下鱗莖後發現其型態完整且緊實的單株，流水採集號為園五；金門原生野百合花藥多呈橘黃色，在環型劇場上方有一大族群，其中一株花藥為深紅色的植株，且葉腋呈現鮮豔的血紅色，極為特殊，將其流水採集號編為園九；亦在環型劇場上方族群發現一株花朵數 6 朵之多花單株，流水採集號為園十。

同一天調查花崗岩醫院旁裸岩之原生野百合族群，此地族群整體花期最晚，花朵大多未開放，共調查到有 106 株開花株及 136 株抽莖株，從中挑選 3 株流水採集號編號岩一到岩三，在下方裸岩區有一株生長在裸岩夾縫處花苞已轉色呈紫色但花朵未開放之植株，流水採集號編號為岩一；在進入下方裸岩區的入口處有一株具淡淡香氣的植株，流水採集號編為岩二；沿著小徑到上方花園區的路旁有一株花被片為白底有紫斑之植株，流水採集號為岩三。花崗岩醫院旁裸岩之野百合族群因生長地多為裸岩夾縫，土層較薄較硬，在挖掘地下鱗莖調查時難以取得完整鱗莖，因此無法收集地下鱗莖緊實程度的資訊。

2019 年 5 月 6 日前往太武山調查，太武山族群有 125 株開花株及 295 株抽莖株，從

中挑選 7 株依流水採集號編號山一到山七。在倒影塔及觀兵奕棋處附近的碉堡上方有一小族群，其中有一株為已結果之植株，表示具早花特性，且其葉片短寬，地下鱗莖緊實，流水採集號編為山三；在鳥瞰圖對面峭壁上有一株植株矮小，生長在木麻黃樹下遮陰處，花朵正面呈現三角型之植株，流水採集號為山五；金門原生野百合植株莖上葉多呈現下垂，在太武山 0.75 m 處路旁有一株莖上葉片挺立之特殊植株，編號為山七。

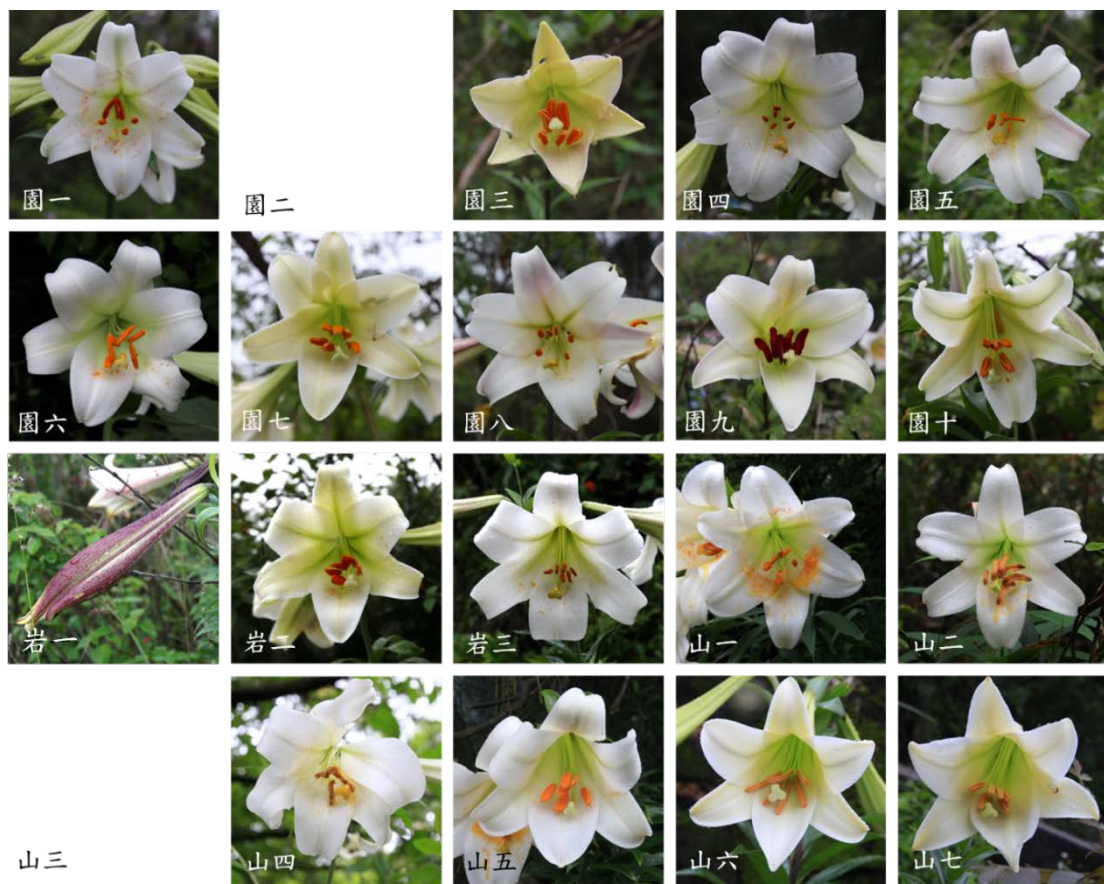


圖 1. 2019 年 5 月 5-6 日於植物園 (編號圖一至圖十)、花崗岩醫院旁裸岩 (編號岩一至岩三)及太武山 (編號山一至山七)棲地採集金門產野百合 20 個種原之花朵型態；圖二植株僅抽莖無花苞；山三植株花朵已凋謝。

Fig. 1. The flower appearance of twenty germplasm resources of Kinmen *L. brownii* which were collected from the Kinmen Botanical Garden habitat with code 圖一-圖十, the bare rock next to the Granite Hospital habitat with code 岩一-岩三 and Taiwu Mountain habitat with code 山一-山七 at May 5th to 6th, 2019. 圖二 only sprouted but had no flower. The flower of 山三 had withered.

二、金門產野百合種原複份扦插繁殖

野外挖取的金門產野百合種原鱗莖鱗片經 17 週的袋裝扦插複份繁殖後，20 個種原共有 19 個成功複份 (表 1)，僅園九扦插之鱗片皆未長出小鱗莖。岩一、岩三、山六的鱗片再生率達 100%，所有的鱗片都長出小鱗莖。鱗片再生率達 90% 以上之種原為園一、岩一、岩二、岩三以及山六。鱗片再生率低於 50% 則有園三、園四、園十及山七。所有種原的鱗片皆再生 1-2 個小鱗莖。

三、金門產野百合種原扦插複份小鱗莖兩個生長季栽培情形

(一) 第一季

金門產野百合種原複份小鱗莖在 45 孔穴盤生長 8 週後，移至 3 吋塑膠紅盆種植，同時調查小鱗莖存活率 (表 1)，雖出葉的小鱗莖數量不多，但小鱗莖大多還宿存在土中，存活率從最低 22% 到最高 100%，存活率為 100% 的種原為園三、園六、園八、山三、山五及山七。於栽植 14 週的調查結果中，園三、園五、岩二、山三、山四出葉率高於 85%。而所有種原之平均鱗片葉數介於 1.0-4.8 片之間，以山二最多有 4.8 片葉。

在生長季中平均鱗片葉數皆有增加，且歷經生長季中冬春季自然的低溫後，在栽植 7 個月後發現有抽莖株。在表 1 栽植 9 個月的調查結果中，有抽莖的種原為山二、山五及山六，其中山六複份繁殖苗共 18 株就有 10 株抽莖株，抽莖率高達 55.6%，抽莖株株高約為 9.5-10 cm；所有抽莖株之莖頂皆有發現苞片構造，視為有花芽分化。

在複份小鱗莖生長 10 個月後，季節進入夏天氣候炎熱，地上部鱗片葉逐漸黃化，於 2020 年 7 月採收其鱗莖並剪去殘存的鱗片葉及根，依周徑進行分級，數量大小如表 2，鱗莖總數與生長季初期的數量相比，大部分皆有增加，增加的數量來自植株生長過程中自然產生的側生鱗莖或莖上小鱗莖，以園四及山六增加率最高，而增加率小於 100% 表示總鱗莖數下降，應是部分小鱗莖死亡了。園四、山一、山二、山五、山六及山七有周徑 7 cm 以上的鱗莖，而山二、山五及山六有最大達 9-11 cm 的鱗莖，其中山二及山五周徑 7 cm 以上比例高，分別為 68% 及 51%。鱗莖經分級、泡藥及陰乾後，送入冷藏庫低溫層積 2 個月。

(二) 第二季

金門產野百合種原扦插複份小鱗莖於 2020 年 9 月移出冷藏庫種植，開始第二季生長。複份小鱗莖第二季之出葉率加抽莖率大多都有 70-100%，而有抽莖株的種原如表 3 所示：園四周徑 7-9 cm 抽莖率有 87.5%；園十周徑 5 cm 以下即有抽莖株 2 株，周徑 5-7 cm 抽莖率 75%，且有一株有花苞成功發育。山二及山六有周徑 9-11 cm 的鱗莖，但山二周徑 9-11 cm 僅有 57.1% 抽莖率，且花芽皆敗育；山六周徑 7-9 及 9-11 cm 有 80% 以上抽莖，且有 3 株露蕾。山七不論周徑大小經兩個月低溫層積後皆抽莖，周徑 5-7 cm 及 7-9 cm 莖頂有花芽分化但敗育。

園十的露蕾株於出庫種植後 86 天開花，而山六的 3 株露蕾株於出庫種植 82-86 天陸續開花 (表 4)。園十花朵側開 (圖 2)，葉片微卷，株高 30 cm，葉數 13 片，葉長 6.5 cm，

葉寬 1.8 cm，花筒長 10.8 cm，花冠橫幅寬 10.3 cm。山六花朵向下開，葉片微下垂，開花株數據為 3 株平均，平均株高 39.2 cm、葉數 18.7 片，葉長 9.8 cm，葉寬 2.4 cm，花筒長 12.5 cm，花冠橫幅寬 9.8 cm。



圖 2. 金門產野百合種原之園十複份小鱗莖第二季開花株 (Bar=3 cm)。

A、植株；B、花朵正面；C、莖軸。

Fig. 2. The flowering plant of regenerated bulblets of the germplasm resources of Kinmen *L. brownii* Yuan 10 in the second growing season. (Bar=3 cm). A、Plant；B、Facade of flower；C、Shoot.

表 1. 金門產野百合種原鱗片扦插繁殖及第一季栽植情形。

Table 1. The scale propagation and first growing season of the germplasm resources of Kinmen *L. brownii*.

Collected Code	Scale regeneration % ^z	Survival % ^y (No.)	Scale leaf emergence % ^x	No. of scale leaves/plant ^w	Sprouted ^v %
園一	92	22.7 (5)	20.0	2.4	0
園二	86	61.1 (4)	36.4	2.8	0
園三	43	100.0 (3)	100.0	4.0	0
園四	47	59.1 (13)	53.8	3.2	0
園五	50	60.0 (15)	86.7	2.8	0
園六	65	100.0 (31)	29.0	1.8	0
園七	89	87.5 (7)	42.9	3.0	0
園八	75	100.0 (34)	38.2	1.2	0
園九	0	-	-	-	-
園十	39	69.2 (9)	33.3	2.6	0
岩一	100	30.0 (7)	66.7	3.4	0
岩二	95	50.0 (9)	100.0	2.4	0
岩三	100	93.9 (31)	35.5	4.4	0
山一	82	87.8 (44)	55.8	2.2	0
山二	69	58.6 (17)	52.9	4.8	5.9
山三	56	100.0 (21)	90.5	1.0	0
山四	78	43.6 (17)	88.2	2.8	0
山五	67	100.0 (40)	70.0	3.8	3.7
山六	100	27.3 (18)	22.2	2.4	55.6
山七	37	100.0 (11)	27.3	3.6	0

^z : The result of scale propagation after 17 weeks.^y : The data represents the survival rate of regenerated bulblets after 14 weeks planting.^x : The data represents the average value of the number of fully expanded scale leaves and the length and width of the largest piece of three plants randomly selected for investigation.^w : The data represents the average of the number of fully expanded scale leaves of five plants randomly selected for investigation which planted after 9 months.^v : The data represents the sprouted rate which counted by No. of sprouted plant/No. of plant.

表 2. 金門產野百合種原複份小鱗莖第一季生長季結束後鱗莖分級之數量。

Table 2. The number of the regenerated bulblets classified by different grade from the germplasm resources of Kinmen *L. brownii* after the first growing season.

Collected Code	Increase % (No.) ^z	Bulb grade ^y (cm)				
		< 5	5-7	7-9	9-11	> 7 % ^x
園一	160 (8)	2	6	-	-	-
園二	175 (7)	2	5	-	-	-
園三	100 (3)	1	2	-	-	-
園四	223 (29)	10	11	8	-	27.6
園五	120 (18)	3	15	-	-	-
園六	139 (43)	22	21	-	-	-
園七	114 (8)	3	5	-	-	-
園八	97 (31)	10	21	-	-	-
園十	111 (10)	2	8	-	-	-
岩一	129 (9)	5	4	-	-	-
岩二	111 (10)	6	4	-	-	-
岩三	107 (32)	27	5	-	-	-
山一	93 (40)	7	24	9	-	22.5
山二	129 (22)	2	5	8	7	68.2
山三	100 (20)	3	17	-	-	-
山四	200 (34)	15	19	-	-	-
山五	107 (29)	2	12	13	2	51.7
山六	222 (40)	11	17	7	5	30.0
山七	109 (12)	1	9	2	-	16.7

^z : No. of total bulb / No. of total survival plantlets (No. of total bulb).

^y : Bulb grade were classified by circumference (cm).

^x : The percentage of bulb grade > 3 % was counted by No. of bulb grade 3+ No. of bulb grade 4/ No. of total bulb.

表 3. 金門產野百合種原複份小鱗莖第二季抽莖與露蕾百分率。

Table 3. The percentage of sprouted and visible bud of the regenerated bulblets of the germplasm resources of Kinmen *L. brownii* in second season.

Collected Code	Bulb grade ^z (cm)	Sprouted ^y % (No.)	VB ^x % (No.)
園四	< 5	10.0 (1)	0.0
	5-7	9.1 (1)	0.0
	7-9	87.5 (7)	0.0
園五	5-7	6.7 (1)	0.0
園六	5-7	4.8 (1)	0.0
園十	< 5	100.0 (2)	0.0
	5-7	75.0 (6)	12.5 (1)
岩三	7-9	20.0 (1)	0.0
山一	7-9	11.1 (1)	0.0
山二	< 5	50.0 (1)	0.0
	7-9	12.5 (1)	0.0
	9-11	57.1 (4)	0.0
山三	5-7	23.5 (4)	0.0
山四	5-7	52.6 (10)	0.0
山五	5-7	25.0 (3)	0.0
	7-9	60.0 (9)	0.0
山六	5-7	23.5 (4)	0.0
	7-9	85.7 (6)	14.3 (1)
	9-11	80.0 (4)	40.0 (2)
山七	< 5	100 (1)	0.0
	5-7	100 (9)	0.0
	7-9	100 (2)	0.0

^z : Bulb grade were classified by circumference (cm).

^y : The data represents the sprouted rate was counted by No. of sprouted plant/No. of plant.

^x : The data represents the VB rate was counted by No. of VB plant/No. of plant.

VB means visible bud.

表 4、金門產野百合種原複份小鱗莖第二季開花株性狀調查。

Table 4. The trait of flowered plant of the regenerated bulblets of the germplasm resources of Kinmen *L. brownii* in second season.

Collected code (Bulb circumference)	Days from plant to flower	Plant ^z		Leaf ^z			Flower ^z	
		No.	Height (cm)	No.	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)
園十 (5-7 cm)	86	1	30.0	13	6.5	1.8	10.8	10.3
山六 (9-11 cm)	83.4 ^y	3	39.2 ^y	18.7 ^y	9.8 ^y	2.4 ^y	12.5 ^y	9.8 ^y

^z : The date of investigation is November 20th, 2019.

^y : Values represent the average of three flowered plant.

討 論

一、採集金門產野百合種原

本章節於 2019 年調查三個棲地的族群數量共計 1382 株，與錡 (2017)調查到 2281 株相比減少很多，其中一個原因是往年各棲地族群分布的位置地形地貌已改變，有些棲地位點新建設施或是因颱風吹襲使地貌變化至人無法徒步到達，導致族群消失或是統計不到，差異最大在花崗岩醫院旁裸岩的棲地，除上述地形地貌改變之因素外，降雨在裸岩上容易流失及蒸散，花崗岩區的淺薄土層保水量也不多，推測以上原因讓 2019 年調查到花崗岩地區族群數量僅 242 株，為三個棲地中族群最少的一區，與錡 (2017)於 2015 年在此區調查到最多 916 株的結果相反，降水量的因素也導致花崗岩區植株多處於花苞尚未開放的狀態，花期又比植物園及太武山區更晚。而本研究在金門植物園調查到數量 720 株與錡 (2017)2015 年調查到 719 株相差不多，是因為本研究新發現環型劇場碉堡上方族群的緣故。

本研究以 1382 株的野生族群數目為基數從中採集了 20 株各式性狀不一且生長勢良好的植株作為種原，自金門植物園的族群 720 株中挑選 10 株，花崗岩醫院旁裸岩族群 242 株中挑選 3 株，太武山族群 420 株中挑選 7 株，採集比例相近，分別為 1.39、1.24 及 1.67%，從各棲地族群中挑選前百分之一的優良單株，篩選基礎紮實。

金門植物園環型劇場碉堡上方為此棲地擁有最密集最多植株的地方，應是因為此地在碉堡上方，需要爬上坡度 45-50°的斜坡才能到達，幾乎無人為活動干擾，所以族群自然繁衍，單株間歧異度高，植物園棲地共採集 10 株，從環型劇場碉堡上方就採集了 4 株。花

崗岩醫院旁裸岩族群花期較晚，植株多尚未開花，可篩選的基礎少。此棲地之野百合植株多受陽光直射，花被片多呈現紫紅色，生長在石縫中僅有淺薄土層及些許植物遮蔭的地方，不利於採集，但因為環境特殊，可預期這裡的族群對高溫強光乾旱等逆境的耐受性高。太武山棲地的族群多分布在太武山步道的路旁，太武山為金門島第一高山，是觀光遊憩的一大景點，因此這裡的族群受到人為干擾程度高，仍從此棲地族群總數 420 株中挑選了 7 株，比例也為三個棲地中最高有 1.67%，可見太武山族群歧異度豐富。

二、金門產野百合種原複份扦插繁殖

20 個種原共有 19 個成功複份，園九可能因鱗莖狀態較不充實，其扦插之鱗片未再生小鱗莖。由結果發現鱗片再生小鱗莖比率 90% 以上之採集流水號園一、岩一、岩二、岩三以及山六，於採集地下鱗莖時，鱗莖狀態已為散的狀態，推測鱗片自鱗莖上脫落後，內部訊號及養分開始產生變化，利於小鱗莖再生。有再生小鱗莖的鱗片皆再生 1-2 個小鱗莖，再生倍率不高，Wu 等人 (2012) 觀察東方型百合母鱗片在開花期間澱粉與脂質含量顯著降低，因開花階段鱗莖為供源的角色負責提供抽莖開花所需養分，而本研究採集地下鱗莖時植株正處於開花期，鱗莖內部養分少，導致再生的小鱗莖數少。

三、金門產野百合種原扦插複份小鱗莖兩個生長季栽培情形

(一) 第一季

在扦插複份的小鱗莖栽植初期，小鱗莖生長強弱快慢應受母鱗片提供的養分多寡影響較大，因此在栽植 14 週後才進行小鱗莖存活率及出葉率之調查，此時小鱗莖已長葉生根獨立生長，評估各採集流水號的種原生長勢較客觀。由表 1 可知，山三小鱗莖存活率為 100%，出葉率 90%，為所有種原複份小鱗莖中生長勢最良好的，且鱗片葉型屬短寬，表示植株葉面積也較大，皆屬於優良性狀，對照採集母株的性狀表，山三在採集時花期已過，在族群中屬於較早開花的單株，可能與苗期生長勢良好有關，在營養生長期間即可累積較多養分供開花所需，另外一方面，早花也表示休眠性較淺，比起其他種原的複份小鱗莖，山三的小鱗莖可以較快進入生長旺盛的時期，因此出葉狀況良好。

在複份小鱗莖第一個生長季中平均鱗片葉數皆持續增加，所有種原之平均鱗片葉數介於 1.0-4.8 片之間。歷經生長季中冬春自然的低溫後，於栽植 9 個月的調查結果中(表 1)，有抽莖株的種原山二、山五及山六，為休眠性較淺的種原，其中山六複份小鱗莖抽莖率高達 55.6%，觀察發現抽莖株之莖頂有苞片構造，推測莖頂應有花芽分化，但可能因生理條件或養分不足而發育失敗。

小鱗莖自 2019 年 9 月栽植至 2020 年 7 月共 10 個月的生長時間，於第一個生長季末期採收鱗莖並依周徑進行分級，結果如表 2，經一季的栽培，金門野百合種原複份小鱗莖最大可達 9-11 cm；其中園六鱗莖總數增加了 12 個，但鱗莖增加率低，周徑大小落在 5 cm 以下及 5-7 cm，應是多將養分用在再生的小鱗莖上，少回流到母鱗莖。岩三鱗莖成長率低，鱗莖總數幾乎沒有增加，周徑多為 5 cm 以下，推測原因一是其鱗片葉數雖多，但葉型屬狹長型，葉面積較小，也可能葉片光合能力較低弱，以及養分回流能力不強，以上原因導

致鱗莖成長緩慢。山二鱗莖增加 5 個，周徑大小達 7 cm 以上鱗莖比例就有 68.2%，表示養分回流充實母鱗莖能力佳。山三在栽植初期生長勢優良，出葉率高，鱗片葉數多，鱗片葉型短寬，但生長季末期鱗莖周徑大小多為 5-7 cm，可能是鱗片葉光合能力不強，或是將養分運移至鱗莖充實能力差。山六鱗莖增加率最高，周徑 7 cm 以上鱗莖比例為 30%，表示此採集流水號自然生成小鱗莖的能力佳，母鱗莖也有持續成長至周徑達 7 cm 以上，園四也為類似的生長狀況。

(二)第二季

Mazor 等 (2021)提出當莖頂分生組織 (stem apical meristem; SAM)已處於成熟期，即可以接受低溫誘導抽莖及花芽分化，在 19 個種原複份小鱗莖經低溫層積 2 個月後的第二季栽植中，有 12 個種原出現抽莖株，表示其 SAM 已處於成熟期，其中園四、園五、園六、園十、山二、山三、山四、山五、山六及山七周徑 7 cm 以下鱗莖有抽莖株出現且莖上葉與鱗片葉共存，顯示在同一生長季，幼年期與營養成熟期接力連續生長，也表明金門產野百合無論周徑大小，當 SAM 處於成熟期即可以接受低溫層積的低溫誘導。另外 Lazare 等(2019)提到甘油會抑制抽莖開花，而周徑小的鱗莖甘油含量較少，抽莖門檻較低。

金門產野百合種原之複份小鱗莖經兩個生長季栽培，流水採集號園十及山六成功在第二個生長季獲得開花株，各有 1 株及 3 株開花，是為早熟的種原。園十及山六第一季苗期鱗片葉皆屬短寬型。在經一季生長後，園十鱗莖周徑最大為 5-7 cm，而山六的鱗莖周徑可達 9-11 cm，山六鱗莖周徑 7 cm 以上才開花，園十鱗莖周徑僅 5-7 cm 就可以開花，開花門檻低，且開花株狀態以園十的花朵側開優於山六花朵向下開。

四、綜合評估

本研究在金門產野百合 1382 株的野生族群中篩選了 20 株生長勢良好且具各式性狀的單株做為種原，經袋裝扦插繁殖後，觀察再生小鱗莖兩個生長季的生長狀況以評估種原的可利用性，在第二季中選出一個周徑 5-7 cm 鱗莖即具成功開花能力的早熟種原「園十」，其鱗片葉型短寬，苗期生長勢良好，鱗莖穩定生長，雖周徑大小表現並無突出，但周徑 5-7 cm 即可開花，開花門檻低，花朵側開，開花植株狀態優良，且依據種原的母株調查性狀，園十母株有 6 朵花，可預期園十更成熟的鱗莖可以開出多朵花。

將已確認花型及株型的野生單株引入再生及栽培流程，在第一季中，鱗片葉生長旺盛是好性狀，可預期營養生長期間能製造較多養分，而是否具備將養分回流至鱗莖的能力更是重要的評估標準。因為在採集種原時就知道多年生植株的性狀，經 18 個月的兩季栽培後即可得知種原不同的生長特性，評估其繁殖及栽培可行性進行篩選，增加目標種原收集的效率，而篩選出的種原可量化增殖利用，如作為育種親本或是地被栽植做景觀的使用。

誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會提供 2019 年「金門原生野百合復育及種園圃建置計畫」及 2020 年「金門原生野百合復育計畫」經費，謝謝蔡安娜小姐及陳筱媛小姐協助實驗進行及溫室栽培管理，謹於此表達衷心的感謝。

參 考 文 獻

- 楊岳翰。2014。金門野百合族群與繁殖之研究。國立中興大學園藝系碩士論文。臺灣:臺中。
- 蔡挹恆。2020。野百合及亞洲型百合育苗技術及品系栽培評估。國立中興大學園藝系碩士論文。臺灣:臺中。
- 錡虹汝。2017。野百合野生族群花卉性狀之評估與雜交育種。國立中興大學園藝系碩士論文。臺灣:臺中。
- 謝妤珊。2013。金門原生百合繁殖、棲地與植物型態調查。國立中興大學園藝系碩士論文。臺灣:臺中。
- Hamid, B. and J. H. Kim. 2011. Cross compatibility between *Lilium x fomolongi* group and *Lilium brownii*. Asian J. Agric. Res. 6(4): 968-977.
- Huang, Y. F., M. X. Yang, H. Zhang, X. Y. Zhuang, X. H. Wu, and W. Xie. 2009. Genetic diversity and genetic structure analysis of the natural populations of *Lilium brownii* from Guangdong, China. Biochem. Genet. 47(7-8): 503-510.
- Lazare, S., D. Bechar, A. R. Fernie, Y. Brotman, and M. Zaccari. 2019. The proof is in the bulb: glycerol influences key stages of lily development. Plant J. 97(2): 321- 340.
- Mazor, I., E. Weingarten-Kenan, and M. Zaccari. The developmental stage of the shoot apical meristem affects the response of *Lilium candidum* bulbs to low temperature. Sci. Hortic. 276: 109766.
- Okubo, H., M. Hiramatsu, J. I. Masuda, and S. Sakazono. 2012. New insight into *Lilium brownii* var. *colchesteri*. Floriculture and Ornamental Biotechnol. 6(2):44-52.
- Wu, S. S., J. D. Wu, X. H. Jiao, Q. X. Zhang, and Y. M. Lv. 2012. The dynamics of changes in starch and lipid droplets and sub-cellular localization of β -amylase during the growth of lily bulbs. J. Integrative Agr. 11(4): 585-592.

Collection and Cultivation Assessment of *Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez Wild Germplasm from Kinmen

Pei-Syuan Shih¹⁾ Bi-Yu Yang¹⁾ Hui-Ming Yang²⁾
Li-Wei Zhong²⁾ Chen Chang¹⁾

Keywords : scale propagation, cooling stratification, flowering

Summary

The purpose of this study was through collecting and preserving methodology to assess the availability of Kinmen endemic *Lilium brownii* germplasm resource. 20 endemic plants of the wild species were screened and collected in the habitat of Kinmen on May 2019, 10 plants were collected from the Kinmen Botanical Garden habitat, 3 plants were collected from the bare rock next to the Granite Hospital habitat and 7 plants were collected from Taiwu Mountain habitat. The bulbs of 20 plants were used as propagule for reproduction by scale propagation through bagged method, and the regenerated bulbs were cultivated and observed for two growing seasons in total 18 months. Cooling stratification technology was used to release the dormancy of lily bulbs, and the flowering plants were successfully obtained in the second growing season. After comprehensive evaluation, the number "Yuan 10" plant was selected as the early-maturing germplasm. Its scales are short and wide, with good growth potential in the seedling cultivation stage. The bulbs grow steadily, and the circumference of 5-7 cm small bulb can bloom in the second growing season. The "Yuan 10" regenerated flowering plants expressed the excellent ornamental characteristic. It can be used for strain test or restoration in the future.

1) Graduate Student, Research Assistant, Professor (Corresponding author), Department of Horticulture, National Chung Hsing University, respectively.

2) Former Director, Director, Kinmen County Forestry Bureau.

轉殖調控春化作用之相關基因 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1* 到春石斛蘭之研究

張家銘¹⁾ 潘怡君²⁾ 陳良築³⁾ 曾夢蛟⁴⁾

關鍵字：春石斛蘭、春化作用相關基因、基因轉殖

摘要：春石斛 (*Nobile-type Dendrobium*) 為石斛蘭屬石斛蘭節 (*Dendrobium* section *Dendrobium*) 內之原種群，為全球性新興盆花，是台灣極具外銷發展潛力的外銷蘭花。穩定的催花技術對於商業化春石斛蘭周年生產之出貨時間與數量相當重要。推測春石斛蘭的春化調控途徑介於穀類作物和阿拉伯芥之間，本研究因此以春石斛蘭的依賴類似 FLC 途徑相關基因 (*VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*)，搭配大量表現 (CaMV35S 或 Ubiquitin) 及酒精誘導表現 (*alcR/alcA* 系統) 之啟動子的轉殖載體，以農桿菌法混合不同載體共同轉殖到春石斛蘭。擬轉殖株 PCR 及 RT-PCR 分析之結果顯示，*VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1* 等轉基因共同或單一存在於轉殖葉片之基因組內並表現其 mRNA。

前 言

春石斛 (*Nobile-type Dendrobium*) 為石斛蘭屬石斛蘭節 (*Dendrobium* section *Dendrobium*) 內之原種群，總狀花序，花側生，具小苞片，是以金釵石斛 (*Den. Nobile* Lindl.) 為主並與其他數十種原種相互雜交後代之總稱。春石斛蘭為全球性新興盆花，具有花朵艷麗、多花、具香氣等特性，其自然花期集中於每年 2 至 4 月之春季，故稱之為春石斛(許，2014)。溫度控制是春石斛蘭花芽分化的重要關鍵，台灣業者目前多利用台灣多高山的特

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝學系副教授。
 - 3) 國立中興大學分子生物學研究所教授。
 - 4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

點進行高冷地低溫春化處理，或以冷房進行春石斛涼溫催花來調控花期。對於商業化春石斛蘭周年生產，穩定的催花技術對於出貨時間與數量相當重要（許，2015；魏，2010）。

植物開花主要分為三個階段：開花誘導 (The floral induction phase)、花原基形成(The floral primordia phase)和花器官發育 (The floral organs development phase)。來自不同途徑的開花基因調控訊號最終整合到開花整合基因，促進花器分生組織被活化，最終引導植物開花 (Zheng *et al.*, 2018)。開花整合基因 *FT* (flowering locus t) 屬於 MADS 家族，FT 蛋白是一種移動開花信號，它與分生組織中的 FD 蛋白結合以活化 *SOC1* 基因。開花整合基因 *SOC1* (suppressor of overexpression of *co1*) 屬於 MADS 家族，在葉片和莖尖分生組織中表達。*SOC1* 基因負責控制花粉調節，整合來自各個開花路徑訊號並調控其他下游花器分生組織基因，如 *AGL24* (agamous-like 24)、*LFY* (leafy)、*SEP* (sepalata)、*FUL* (fruitful) 和 *AP1* (apetala 1)，以決定花器各部位的形成 (Yu *et al.*, 2002；Lee *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2016)。蝴蝶蘭之調節開花相關基因 *AP1*、*FT*、*LFY*、*SOC1* 及春化基因 *VRN2*、*VRN3* 基因也被選殖出來，但無法找到 *CO* 及 *FLC* 基因 (Hsiao *et al.*, 2011)。

春化作用 (Vernalization) 係指部分二年生或多年生植物經歷冬季低溫後，才能從營養生長階段過渡到生殖生長階段的自然現象。運用此一生理現象能夠人工給予低溫進而誘導植物花芽形成。春化作用牽涉到多個基因並與多個途徑均有關聯，瞭解的比較清楚的有阿拉伯芥 (雙子葉植物) 及穀類作物 (禾本科植物，單子葉植物) 的春化基因調控開花的二類模式，推測春石斛蘭的春化調控途徑介於穀類作物和阿拉伯芥之間 (Liang *et al.* (2012)。亦即春石斛蘭可能有二個春化調控途徑：1. 依賴類似 *FLC* 途徑 (*FLC* like dependent pathway) (單子葉植物小麥等之調控途徑)，包括 *VRN3*、*VRN1*、*FT*、*SOC1* 等基因；2. 不依賴 *FLC* 途徑 (*FLC* independent pathway) (阿拉伯芥之調控途徑)，包括 *VIN3*、*AGL19*、*AP1*、*FT* 等基因。

本研究轉殖春石斛蘭春化作用之依賴類似 *FLC* 途徑的相關基因 *VRN3*、*VRN1*、*FT*、*SOC1*，搭配大量表現 (CaMV35S 或 Ubiquitin) 及酒精誘導表現 (alcR/alcA 系統) 之啟動子的轉殖載體，以農桿菌法混合不同載體共同轉殖到春石斛蘭，其目的為探討以基因轉殖技術開發可調控花期之春石斛蘭的可行性。

材 料 與 方 法

一、供試材料

(一)、基因轉殖之植物材料

使用春石斛蘭之 PLB 作為基因轉殖之材料，品種為 '紅皇帝' (Den. 'Red Emperor')。基因轉殖材料來源於本實驗室所培養、誘導與增生之石斛蘭 PLB。每隔 2 個月切芽持續繼代於 PLB 誘導培養基作為轉殖材料。

(二)、基因轉殖之農桿菌與轉殖載體

本研究所使用之農桿菌菌系為 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)。轉殖載體計有：

1. pCAM1301-VRN3 (圖 1A)：啟動子為 *CaMV35S*、目標基因為 *VRN3*、報導基因為 *gusA*、篩選標誌基因為 *hptII*，由輔英科技大學生物科技系李佩芳博士提供。
2. pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1 (圖 1B)：啟動子為 *AlcA* (受到 *AlcR* 蛋白及酒精調控)、*Den. To My Kids 'Smile'* 之 *VRN1*、報導基因為 *gus*、篩選標誌基因為 *bar*，由本實驗室楊舜閔學長所構築 (楊舜閔等，2015)。
3. pMLBart-AlcR-AlcA-PaFT (圖 1C)：啟動子為 *AlcA* (受到 *AlcR* 蛋白及酒精調控)、目標基因為蝴蝶蘭 *FT*、報導基因為 *gus*、篩選標誌基因為 *bar*，中興大學分子生物研究所陳良築教授提供。
4. pMLBart-AlcR-AlcA-PaSOC1 (圖 1D)：啟動子為 *AlcA* (受到 *AlcR* 蛋白及酒精調控)、目標基因為蝴蝶蘭 *SOC1*、報導基因為 *gus*、篩選標誌基因為 *bar*，由中興大學分子生物研究所陳良築教授提供。
5. p1304-35S-VRN1 (圖 1E)：啟動子為 *CaMV35S*、目標基因為 *Den. To My Kids 'Smile'* 之 *VRN1*、報導基因為 *mgfp5-gusA*、篩選標誌基因為 *hptII*，由本實驗室楊舜閔學長所構築 (楊舜閔等，2015)。
6. pCAM1301-Ubi:PaFT (圖 1F)：啟動子為 *Ubiquitin*、目標基因為蝴蝶蘭 *FT*、報導基因為 *gusA*、篩選標誌基因為 *hptII*，由中興大學分子生物研究所陳良築教授提供。
7. pCAM1301-Ubi:PaSOC1 (圖 1G)：啟動子為 *Ubiquitin*、目標基因為蝴蝶蘭 *SOC1*、報導基因為 *gusA*、篩選標誌基因為 *hptII*，由中興大學分子生物研究所陳良築教授提供。

(三)、轉殖組合

1. 使用農桿菌轉殖法，將農桿菌 p1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1 共同轉入春石斛蘭 *Den. 'Red Emperor'* 之擬原球體。
2. 使用農桿菌轉殖法，將農桿菌 p1301-VRN3、p1304-35S-VRN1、pCAM1301-Ubi:PaFT、pCAM1301-Ubi:PaSOC1 共同轉入春石斛蘭 *Den. 'Red Emperor'* 之擬原球體。

二、試驗方法

(一)農桿菌基因轉殖方法

1.農桿菌轉殖法

將含有目標質體之農桿菌預培養於含有適當抗生素之菌盤，28℃培養 2 天後冷藏備用。從菌盤中挑選單一菌落並接種於含有適當抗生素之 5 ml LB 培養液中，於 28℃搖晃培養 2 天。取 2 ml 菌液轉移至 50 ml 離心管以 4℃ 12000xg 進行離心，去除上清液後以 30 ml 感染液 (1/4 MS, Sucrose 2%, Tryptone 0.1%, 金剛砂 0.1%, AS (acetosyringone) 200 μM, pH 5.5) 重新懸浮，接著將春石斛蘭 PLB 放入感染液搖晃培養 30 分鐘(150~160 rpm)。將搖晃完成之離心管放入無菌操作台中，去除感染液後將 PLB 置於無菌擦手紙上吸去多

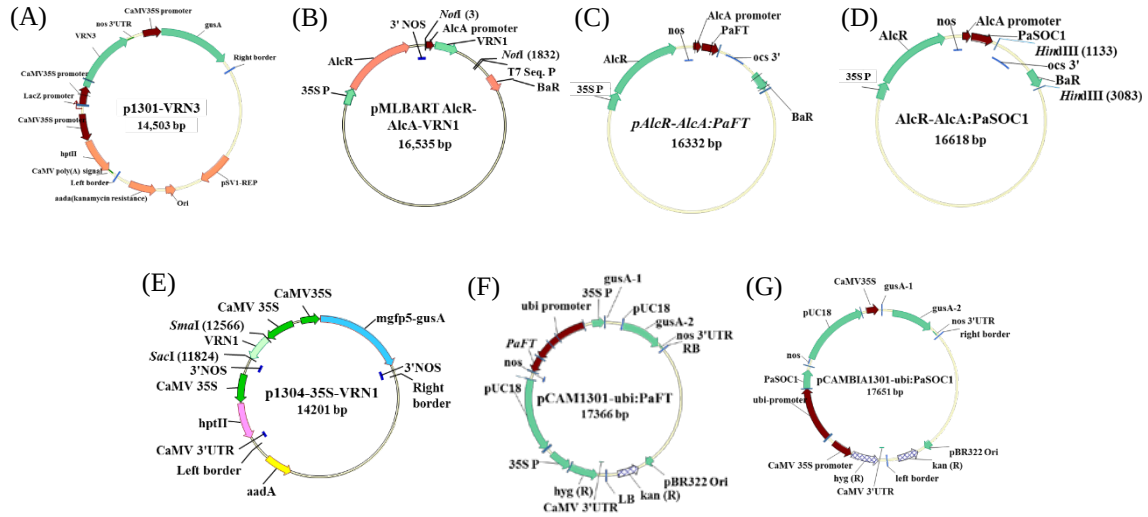


圖 1. 農桿菌轉殖載體 p1301-VRN3 (A)、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1 (B)、pAlcR-AlcA:PaFT (C)、pAlcR-AlcA:PaSOC1 (D)、p1304-35S-VRN1 (E)、pCAM1301-ubi:PaFT (F) 及 pCAM1301-ubi:PaSOC1 (G)之基因圖譜。

Fig. 1. Genetic maps of *Agrobacterium* transformation vectors p1301-VRN3 (A), pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1 (B), pAlcR-AlcA:PaFT (C), pAlcR-AlcA:PaSOC1 (D), p1304-35S-VRN1 (E), pCAM1301-ubi:PaFT (F) and pCAM1301-ubi:PaSOC1 (G).

餘感染液。將植物材料繼代於含有 AS 200 μ M 之 PLB 誘導培養基，於 28°C 黑暗環境共培養兩天。共培養兩天後，在無菌操作台中將共培養完成之 PLB 轉移至乾淨離心管，以 Wash 液 (1/4 MS, Sucrose 2%, Tryptone 0.1%, Cefotaxime 500 ppm)搖晃 10 分鐘後移除 wash 液 (150~160 rpm)，重複此步驟三次。Wash 完成後繼代於含有 Cefotaxime 500 ppm 之 PLB 誘導培養基。

(二)、擬轉殖植株檢測

1. 植物 DNA 萃取

本試驗使用 BioKit Plant Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taiwan) 進行植物 DNA 萃取。取 100 mg 之擬轉殖植株葉片，液態氮研磨至細碎，加入 400 μ l Extraction buffer 和 5 μ l RNase 並轉移到 1.5 ml eppendorf 中，Vortex 5~10 秒混合均勻。將 eppendorf 移至 65°C 水浴鍋中，處理 10 分鐘後上下搖晃 eppendorf 數次促使溶液混合均勻，再處理 65°C 水浴 10 分鐘，共 20 分鐘。水浴完成後加入 100 μ l Precipitation Buffer，搖勻混和後置於冰上 5 分鐘。將 eppendorf 搖晃混勻後以 12,000 $\times$ g 離心 5 分鐘，小心吸取上清液至新的 1.5 ml eppendorf 中，加入 1.5 倍體積之 Binding Buffer 以 pipetting 方式均勻混和。吸取混合液到已裝設 Collection Tube 之 Spin Column 中，4°C 12,000 $\times$ g 離心 1 分鐘後去除

Collection Tube 之廢液。加入 600 μ l Wash Buffer 以 4°C 12,000 $\times$ g 離心 1 分鐘後去除廢液，重複此步驟一次。第二次 wash 去除廢液後，再以 4°C 12,000 $\times$ g 離心 5 分鐘，將殘液完全去除。將 Spin Column 置於新的 1.5 ml eppendorf 中，加入 50~100 μ l 之 Elution Buffer，靜置 2 分鐘後，以 4 °C 12,000 $\times$ g 離心 1 分鐘，獲得所需之 DNA，貯存於-20°C 備用。

2. 植物 Total RNA 萃取

本試驗使用 EBL NC RNA extraction reagent GenePure RareRNA reagent (GenePure, Kaysville, UT, USA)進行植物 RNA 萃取。取約 100 mg 之擬轉植株葉片以液態氮研磨至細碎，加入 1 ml NC RareRNA reagent 與 400 μ l DEPC 水後轉移至 1.5 ml eppendorf 中。劇烈搖晃 10~15 秒後靜置於室溫反應 15 分鐘。4°C 12000 $\times$ g 離心 15 分鐘後，將 1 ml 上清液轉移至 2 ml eppendorf，並加入 1 ml 異丙醇混和均勻以沉澱 RNA。靜置於室溫反應 10 分鐘後以 4°C 12000 $\times$ g 離心 10 分鐘後小心去除上清液，此時 RNA 應沉澱於試管底部。加入 400 μ l DEPC 75%酒精 wash 後以 4°C 12000 $\times$ g 離心 3 分鐘後去除廢液，重複此步驟一次。以 30 μ l 之 DEPC 水回溶 RNA 後貯存於-80°C 備用。

3. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

採用 Biometra TOne Gradient Thermal cyclers (Thermo Scientific, USA) 為反應儀器。PCR 反應物含有 2 $\times$ PCR Master Mix (12.5 μ l)、10 μ M primer (2 μ l)及 100 ng 植物 DNA (1 μ l)，補水至總體積 25 μ l。PCR 增幅反應設定條件如下：第一階段為 94°C、2 分鐘 denaturation (1 循環)；第二階段進行 94°C/30 秒的 denaturation、30 秒的 Annealing(黏合溫度如表一所示)、72°C 的 extension(延長時間依照表一之預期片段大小調整)，第二階段共 40 循環；第三階段為 72°C、10 分鐘(1 循環)，PCR 反應完成後儲存於 4°C 冰箱備用。

4. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

本試驗使用 BIONOVAS HiScript ITM First Strand cDNA Synthesis Kit (Bionovas, Canada) 進行 cDNA 合成。反轉錄 (First strand Synthesis)步驟如下：取 5 μ g-10 μ g 之 RNA，加入 10 μ l 2 $\times$ Fast premix 和 2 μ l Oligo dT，再以 RNase free ddH₂O 補至 19 μ l，於 65°C 作用 5 分鐘，再移到冰上 1 分鐘冷卻。冷卻後加入 1 μ l HiScript I Reverse Transcriptase，於 42 °C 作用 30 分鐘，再移至 85°C 作用 5 分鐘，完成 cDNA 之合成。

5. DNA 電泳

PCR 反應完成之產物，以 1.5%的 Invitrogen Ultrapure agarose，放置於 1 $\times$ TAE buffer (40 mM Tris acetate, pH8.0、1 mM EDTA)中進行 DNA 電泳分離。完成後放入 0.5 μ g/ml 之溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr)溶液中，染色 3~5 分鐘後退染 30 分鐘，再置於 UV 光箱 (Gel logic 200 Imaging system)中檢視膠體上之 DNA 條帶片段，照相並儲存。

6. 酒精誘導

取用 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pMLBart-AlcR-AlcA-PaSOC1 和 pMLBart-AlcR-AlcA-PaFT 共同轉殖之擬轉植株葉片，進行酒精誘導，將葉片浸泡至不含酒精之 PBS

buffer(pH7.4, 50 mM)與含有 2%酒精之 PBS buffer 分別做為對照組與處理組。真空抽氣 5 分鐘，之後放到室溫照光培養。抽取處理 12 小時後葉片之 RNA 分析基因表現。

表 1. 偵測 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、*GUS*、*AlcR*、*hptII*、*bar* 及 *DnActin* 等目標基因之獨特引子。

Table 1. Unique primers for detecting target genes *VRN1*, *PaFT*, *PaSOC1*, *GUS*, *AlcR*, *hptII*, *bar*, and *DnActin*.

目標基因 (Target gene)	引子 (Primer)	序列 (Sequence)	黏合溫度 (Annealing Temp. °C)	預期片段大小 (Predicted size)
<i>VRN3</i>	VRN3-F	5'- GGCAATGAGATGAGGACCTT-3'	52°C	328 bp
	VRN3-R	CACGCTGGCAGTTGAAGTAG		
	VRN3-F	5'- GGCAATGAGATGAGGACCTT-3'	56°C	422 bp
	NOS-R	5'- CATCGCAAGACCGGCAACAGGA-3'		
<i>AlcA-VRN1</i>	AlcA-60F	5'-TGACACACCACTCCTCTCCA-3'	50°C	918 bp
	VRN1	5'-GTGCCTGAGGTGATTCTTCTTC-3'		
<i>AlcA-PaFT</i>	AlcA-60F	5'-TGACACACCACTCCTCTCCA-3'	56°C	519 bp
	PaFT	5'- CTGCCGAATGTTGCTGTTGT-3'		
<i>AlcA-PaSOC1</i>	AlcA-60F	5'-TGACACACCACTCCTCTCCA-3'	567°C	538 bp
	PaSOC1	5'-TCACCCATCAGCTTCCGTTT-3'		
<i>35S-VRN1</i>	CaMV35S-F-HindIII	5'-AAGCTTAGATTAGCCTTTTCAATTCAGGA-3'	54°C	1537 bp
	VRN1	5'-GTGCCTGAGGTGATTCTTCTTC-3'		
	35S 5'UTR	5'-CACGGGGGACTCTAGAGGAT-3'	53°C	706 bp
	VRN1	5'-GTGCCTGAGGTGATTCTTCTTC-3'		
<i>Ubi-PaFT</i>	Ubi-F	5'-AGGGGCGTAAACTGTCTGTC-3'	58°C	979 bp
	PaFT	5'- TTACGAATTGAAGATGATGGATGG-3'		
	Ubi-77F	5'-AGATTATTGAGCTCCGAAA-3'	49°C	470 bp
	PaFT-546R	5'-CTAGTGATTATGGATATGAATAGAG-3'		
<i>Ubi-PaSOC1</i>	Ubi-F	5'-ATGCTCACCTGTTGTTG-3'	55°C	423 bp
	PaSOC1	5'-TCACCCATCAGCTTCCGTTT-3'		
	Ubi-1F	5'-GCATCGGACAAACATGGTGAG-3'	55°C	539 bp
	PaSOC1-539R	5'-AGGTTGTGTGAGGTCCTTGC-3'		
<i>Bar</i>	Bar 103-F	5'-ACATCGAGACAAGCACGGTC-3'	58°C	421 bp
	Bar 523-R	5'-AAGTCCAGCTGCCAGAAACC-3'		
<i>HptII</i>	hptII F	5'-CTATTTCTTTGCCCTCGGACG-3'	54°C	1007 bp
	hptII R	5'-CCGCGACGTCTGTGCGAGA-3'		
<i>GUS</i>	GUS- F	5'-CGTCCTGTAGAAACCCCAACCC-3'	60°C	1800 bp
	GUS- R	5'-TTTGCTCCCTGCTGCGG-3'		
<i>AlcR</i>	AlcR 1029-F	5'-CTGGCGATCGTAGCTTTTGC-3'	54°C	942 bp
	AlcR 1070-R	5'-TGGTGGTACTTCGCTGTCC-3'		
<i>DnActin</i>	<i>DnActin-F</i>	5'-GATGTGCAGAGGTGCTTTTC-3'	50°C	428 bp
	<i>DnActin-R</i>	5'-CCACACACAAGCGTCAAAT-3'		

結 果

一、組合一(依賴類似 FLC 途徑相關基因—酒精誘導表現啟動子為主)：共同轉殖 p1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1

(一)、擬轉殖之擬原球體篩選、再生及增殖

將共轉殖 pCAM1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1 之春石斛蘭 *Den. 'Red Emperor'* 擬原球體繼代於含有 300 ppm Cefotaxime 之 PLB 誘導培養基 (圖 2 A)。培養約 1 個月恢復生長勢後繼代至含有 15 ppm glufosinate & 300 ppm Cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行篩選，篩選過程中持續繼代更新，擬轉殖之擬原球體維持綠色至深綠色外觀，未轉殖成功之擬原球體白化、褐化或死亡 (圖 2 B、C)。約 3~4 個月結束篩選後，將綠色擬原球體繼代於含有 300 ppm Cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行生長勢恢復 (圖 2 D、E)。1~2 個月後將綠色擬原球體繼代於含有 300 ppm Cefotaxime 之催芽培養基 [1/2MS (Murashige and Skoog, 1962)、Sucrose 2%、Tryptone 0.1%、NAA 1 ppm、BA 1 ppm、agar 7.5%、pH 5.5] 進行第一次催芽。約 3~6 個月擬原球體出芽約 0.5~1 公分後，繼代至含有 0.1 ppm NAA 之石斛蘭 T2 培養基[1/2MS (Murashige and Skoog, 1962)、25 g/L banana、20 g/L Sweet potato、Sucrose 2%、Tryptone 0.1%、agar 7.5%、Activated carbon 1%、pH 5.5]誘導培植體發根(圖 2 F~J)。待培植體發根後，將培植體繼代至不含賀爾蒙之石斛蘭 T2 培養基再生成 3 公分以上大小之植株後出瓶(圖 2 L、M)，以滅菌之水苔為介質定植於白色塑膠盆器或 2 吋盆中，移入溫室中生長 (圖 2 N、O)。

(二)、擬轉殖植株基因及 mRNA 表現分析

萃取共 28 棵 pCAM1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1 共同轉殖之擬轉植株葉片 DNA，進行 PCR 反應分析目標基因 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、酒精啟動子基因 *AlcR* 和篩選基因 *Bar*，PCR 結果如圖 3A~G 所示。在 28 個供試樣品中，分別在 12 個擬轉植株偵測到 *VRN3* (422 bp)、5 個擬轉植株偵測到 *VRN1* (918 bp)、5 個擬轉植株偵測到 *PaFT* (519 bp)、5 個擬轉植株偵測到 *PaSOC1* (538 bp)、11 個擬轉植株偵測到 *Bar* (403 bp)、10 個擬轉植株偵測到 *AlcR* (942 bp) 等轉基因，未轉殖對照組 (CK) 則無法偵測到任何基因的表現。28 棵擬轉植株之中，編號 11 號擬轉植株 (S11) 均能偵測到所有轉基因之 DNA 片段；編號 20 號擬轉植株 (S20) 除 *PaSOC1* 外的其他轉基因均偵測到 DNA 片段；編號 21、27 和 28 號擬轉植株 (S20、S27、S28) 除 *VRN3* 和 *PaSOC1* 外的其他轉基因均能偵測到 DNA 片段。

進一步萃取 8 棵擬轉植株葉片 RNA，進行 RT-PCR 分析目標基因 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、酒精啟動子基因 *AlcR* 和篩選基因 *Bar* 之 mRNA 是否表現。在 8 個供試樣品中，分別在 2 個擬轉植株偵測到 *VRN1* (918 bp)、3 個擬轉植株偵測到 *PaFT* (519 bp)、3 個擬轉

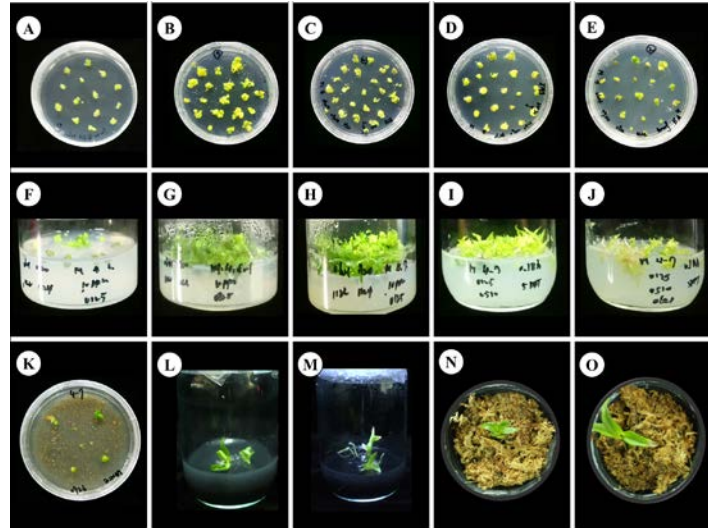


圖 2. 農桿菌法共同轉殖 pCAM1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT 及 pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1 之春石斛蘭 *Den. 'Red Emperor'* 擬轉殖植株的篩選、再生及增殖之情形。(A)轉殖後繼代於含有 300 ppm cefotaxime 之 PLB 誘導培養基。(B~C)將 PLB 繼代於含有 10~15 ppm glufosinate 及 300 ppm cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行篩選。(D~E)將二次篩選後之 PLB 繼代於含有 300 ppm cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行生長勢恢復。(F~J)將 PLB 繼代於含有 50 ppm cefotaxime 之催芽培養基培養基進行催芽。(K)PLB 出芽後移植至發根培養基中誘導發根。(L~M)培植體移植至培植瓶中持續再生。(N~O)擬轉殖株出瓶定植並移至溫室生長。

Fig. 2. Selection, regeneration, and proliferation of putative transformed plants of *Den. 'Red Emperor'* via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pCAM1301-VRN3, pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1, and pAlcR-AlcA:PaFT, pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1. (A) The PLBs were cultivated in 1/2MS medium containing 300 ppm cefotaxime after inoculation with *Agrobacterium*. (B~C) Survived PLBs were cultivated in 1/2MS medium contained 10~15 ppm glufosinate and 300 ppm cefotaxime for selection of transformed PLBs. (D~E) Survived PLBs were cultivated in 1/2MS medium contained 300 ppm cefotaxime to stimulate new growth and vigorous recovery of survival PLBs. (F~J) The PLBs were cultivated in 1/2MS medium contained 50 ppm cefotaxime and 0.1 ppm BA for induction of multiple shoots formation. (K) Plantlets were transferred to culture bottle for induction of roots formation. (L~M) Plantlets were transferred to culture bottle for regeneration continuously. (M~O) Putative transformed seedlings were transfer to pots and grown in greenhouse.

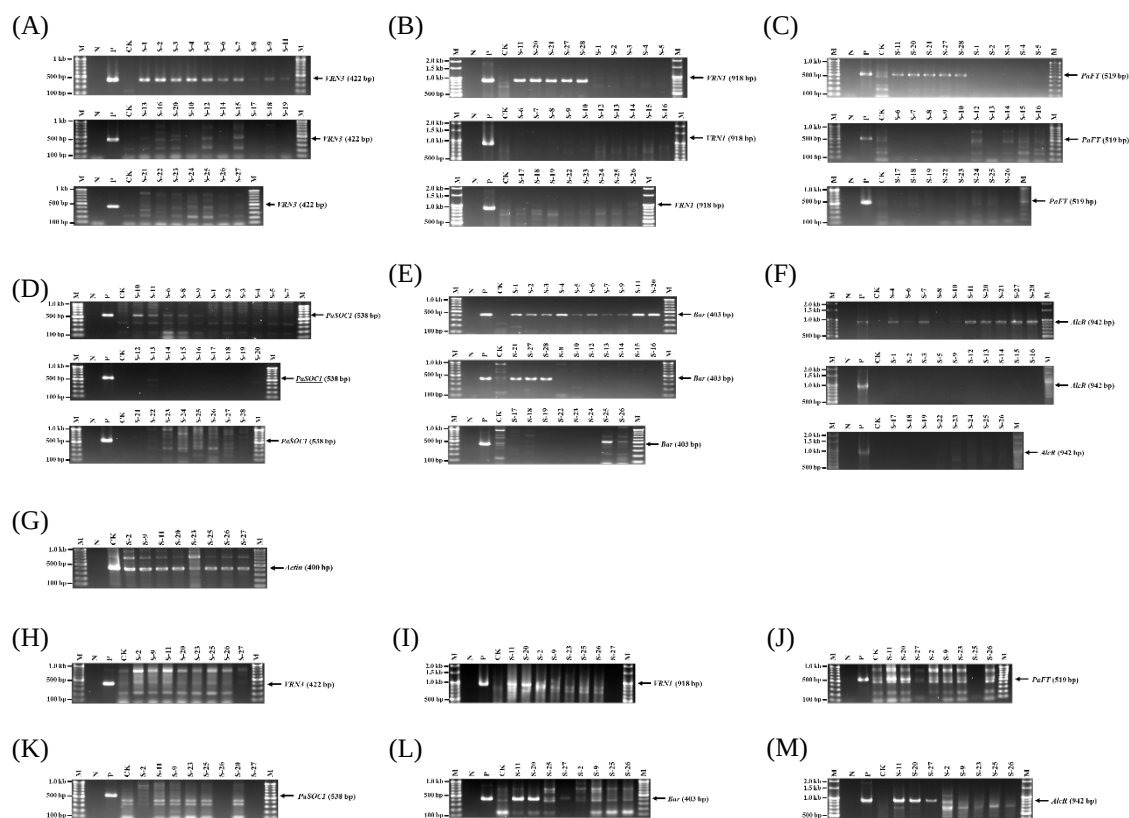


圖 3. 以擬轉殖葉片 DNA 為模板，使用獨特核酸引子進行聚合酵素鏈鎖反應(A~G) 與反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(H~M) 之產物，以電泳膠片分析 *VRN3* (A)、*VRN1* (B)、*PaFT* (C)、*PaSOC1* (D)、*Bar* (E)、*AlcR* (F) 基因，與 *actin*(G)、*VRN3* (H)、*VRN1* (I)、*PaFT* (J)、*PaSOC1* (K)、*Bar* (L)、*AlcR* (M) mRNA 的情形。CK：未轉殖春石斛'紅皇帝'。

Fig. 3. PCR (A~G) and RT-PCR (H~M) analysis of *VRN3* (A), *VRN1* (B), *PaFT* (C), *PaSOC1*(D), *Bar* (E), *AlcR* (F) genes, and *actin*(G), *VRN3* (H), *VRN1* (I), *PaFT* (J), *PaSOC1*(K), *Bar* (L), *AlcR* (M) mRNA in putative transplastomic *Den.* 'Red Emperor'. CK: untransformed *Den.* 'Red Emperor'.

植株偵測到 *Bar* (403 bp)、3 個擬轉植株偵測到 *AlcR* (942 bp)等基因之 mRNA 表現 (圖 3H~M)。並未在任何擬轉植株中偵測到目標基因 *VRN3*(422 bp)和 *PaSOC1* (538 bp) 之 mRNA 表現，未轉殖對照組(CK)則無法偵測到任何基因的表現。8 棵擬轉植株之中，編號 11、20 號擬轉植株(S11、S20)均能偵測到 *VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、*Bar* 和 *AlcR* mRNA 表現；編號 27 號擬轉植株(S27)均能偵測到 *VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、*Bar* 和 *AlcR* mRNA 表現。

二、組合二 (依賴類似 FLC 途徑相關基因—持續表現啟動子為主): 共同轉殖 p1301-VRN3、p1304-35S-VRN1、pCAM1301-Ubi:PaFT、pCAM1301-Ubi:PaSOC1

(一)、擬轉殖之擬原球體篩選、再生及增殖

將共轉殖 p1301-VRN3、p1304-35S-VRN1、pCAM1301-Ubi:PaFT、pCAM1301-Ubi:PaSOC1 之春石斛蘭 *Den. 'Red Emperor'* 擬原球體繼代於含有 300 ppm Cefotaxime 之 PLB 誘導培養基 (圖 4 A)。約 1~2 個月恢復生長勢後繼代至含有 20 ppm hygromycin & 300 ppm Cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行篩選, 篩選過程中持續繼代更新, 擬轉殖之擬原球體維持綠色至深綠色外觀, 未轉殖成功之擬原球體白化、褐化或死亡 (圖 4 B~E)。篩選約 3~5 個月後結束篩選, 將綠色擬原球體繼代於含有 300 ppm Cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行生長勢恢復 (圖 4 F)。1~2 個月後將綠色擬原球體繼代於含有 300 ppm Cefotaxime 之催芽培養基進行催芽 (圖 4 G~J)。約 3~6 個月擬原球體出芽約 0.5~1 公分後, 繼代至含有 0.1 ppm NAA 之石斛蘭 T2 培養基誘導培植體發根 (圖 4 K~L)。待培植體發根後, 將培植體繼代至不含賀爾蒙之石斛蘭 T2 培養基再生成 3 公分以上大小之植株後出瓶 (圖 4 M), 以滅菌之水苔為介質定植於白色塑膠盆器或 2 吋盆中, 移入溫室中生長 (圖 4 N~O)。

(二)、擬轉殖植株基因及 mRNA 表現分析

共萃取 35 棵 p1301-VRN3、p1304-35S-VRN1、pCAM1301-Ubi:PaFT、pCAM1301-Ubi:PaSOC1 共同轉殖之擬轉殖植株葉片 DNA, 進行 PCR 反應, 分析目標基因 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、篩選基因 *hptII* 和報導基因 *GUS*, PCR 結果如圖 5A~G 所示。。在 35 個供試樣品中, 分別在 5 個擬轉殖植株偵測到 *VRN3* (422 bp)、5 個擬轉殖植株偵測到 *VRN1* (1537 bp)、3 個擬轉殖植株偵測到 *PaFT* (979 bp)、12 個擬轉殖植株偵測到 *PaSOC1* (423 bp)、33 個擬轉殖植株偵測到 *hptII* (1007 bp)、25 個擬轉殖植株偵測到 *GUS* (1800 bp) 等轉基因, 未轉殖對照組 (CK) 則無法偵測到任何基因的表現。35 棵擬轉殖植株之中, 編號 10 號擬轉殖植株 (A10) 除 *VRN1* 和 *PaFT* 外的其他轉基因均偵測到 DNA 片段; 編號 5 號擬轉殖植株 (A5) 除 *PaFT* 和 *PaSOC1* 外的其他轉基因均偵測到 DNA 片段。

進一步萃取 11 棵擬轉殖植株葉片 RNA, 進行 RT-PCR 分析目標基因 *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*、篩選基因 *hptII* 和報導基因 *GUS* 之 mRNA 是否表現, RT-PCR 結果如圖 5H~M) 所示。在 11 個供試樣品中, 分別在 2 個擬轉殖植株偵測到 *VRN3* (422 bp)、1 個擬轉殖植株偵測到 *VRN1* (706 bp)、2 個擬轉殖植株偵測到 *PaFT* (470 bp)、3 個擬轉殖植株偵測到 *PaSOC1* (539 bp)、8 個擬轉殖植株偵測到 *hptII* (1007 bp) 等基因之 mRNA 表現。並未在任何擬轉殖植株中偵測到報導基因 *GUS* (1800 bp) 之 mRNA 表現。未轉殖對照組 (CK) 無法偵測到任何基因的表現。

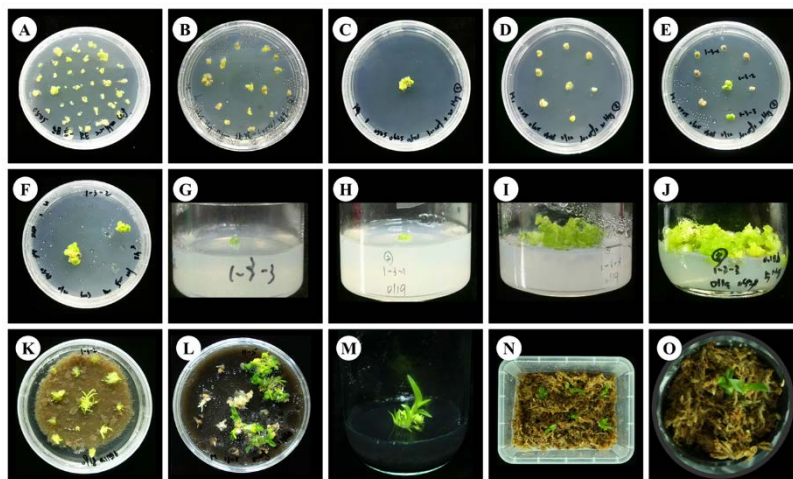


圖 4. 農桿菌法共同轉殖 pCAM1301-VRN3、p1304-35S-VRN1、pCAM1301-Ubi:PaFT 及 pCAM1301-Ubi:PaSOC1 之春石斛蘭 *Den. 'Red Emperor'* 擬轉殖植株的篩選、再生及增殖之情形。(A)轉殖後繼代於含有 300 ppm cefotaxime 之 PLB 誘導培養基。(B~E)將 PLB 繼代於含有 20 ppm hygromycin 及 300 ppm cefotaxime 之 PLB 誘導培養基培養基進行篩選。(F)將篩選之 PLB 繼代於含有 300 ppm cefotaxime 之 PLB 誘導培養基進行生長勢恢復。(G~ J)將 PLB 繼代於含有 50 ppm cefotaxime 之二次催芽培養基進行催芽。(K~L)PLB 出芽移植至發根培養基中誘導發根。(M)培植體移植至培植瓶中持續再生。(N~O)擬轉殖株出瓶定植並移至溫室生長。

Fig. 4. Selection, regeneration and proliferation of putative transformed plants of *Den. 'Red Emperor'* via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pCAM1301-VRN3, p1304-35S-VRN1, pCAM1301-Ubi:PaFT, and pCAM1301-Ubi:PaSOC1. (A) The PLBs were cultivated in MS medium contained 300 ppm cefotaxime after inoculation with *Agrobacterium*. (B~E) The PLBs were cultivated in 1/2MS medium contained 20 ppm hygromycin and 300 ppm cefotaxime for primary selection of transformed PLBs. (F) The PLBs were cultivated in 1/2MS medium contained 300 ppm cefotaxime to stimulate new growth and vigorous recovery of survival PLBs. (G~J) The PLBs were cultivated in 1/2MS medium contained 50 ppm cefotaxime and 0.1 ppm BA for induction of multiple shoots formation. (K~L) plantlets were transferred to culture bottle for induction of roots formation. (M) plantlets were transferred to culture bottle for regeneration continuously. (N~O) Putative transformed seedlings were transfer to pot and grown in greenhouse.

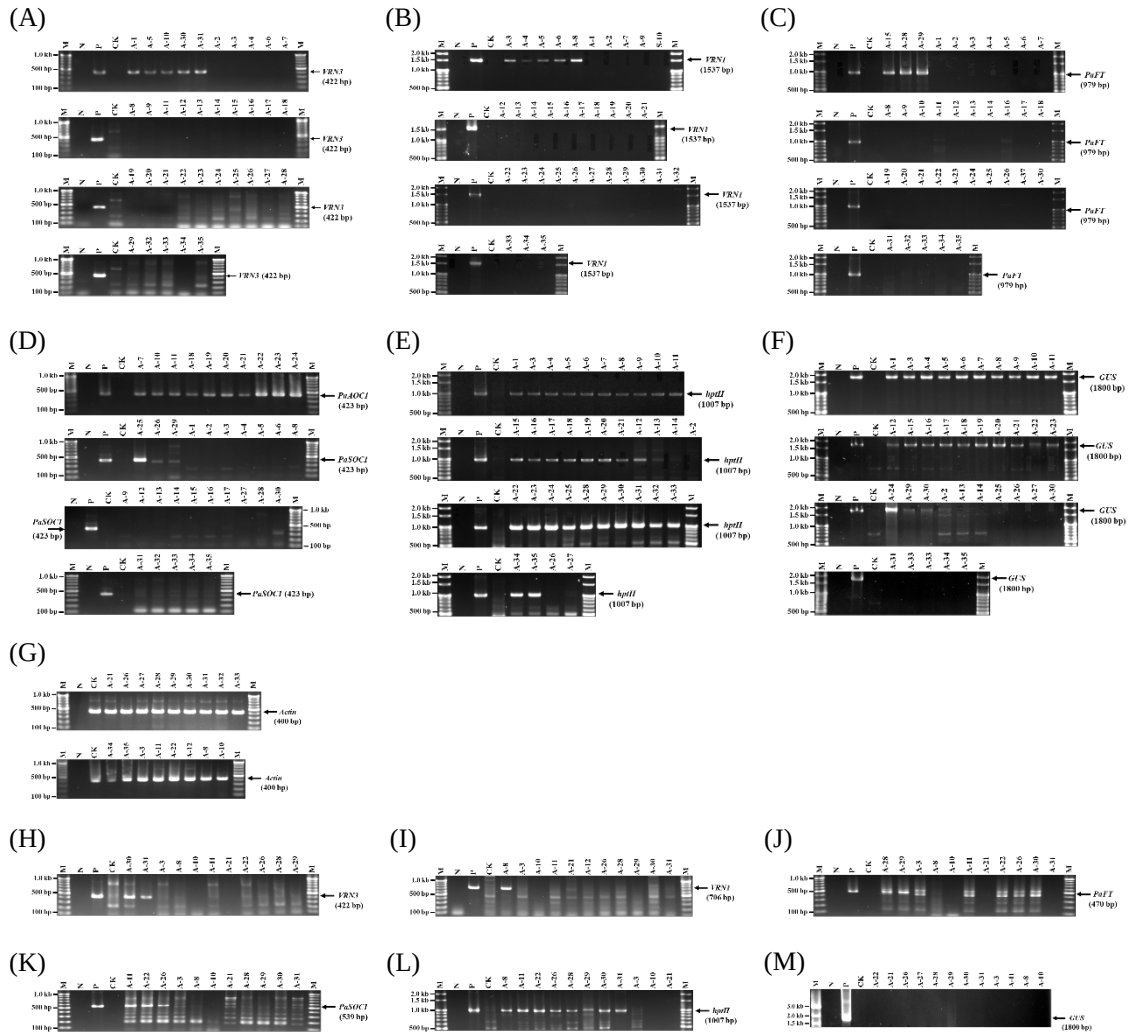


圖 5. 以擬轉殖葉片 DNA 為模板，使用獨特核酸引子進行聚合酵素鏈鎖反應與反轉錄聚合酵素鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *VRN3* (A)·*VRN1* (B)·*PaFT* (C)·*PaSOC1* (D)·*hptII* (E)·*GUS* (F) 基因與 *actin* (G)·*VRN3* (H)·*VRN1* (I)·*PaFT* (J)·*PaSOC1* (K)·*hptII* (L)·*GUS* (M) mRNA 的情形。CK：未轉殖春石斛'紅皇帝'。

Fig. 5. PCR and RT-PCR analysis of *VRN3* (A)·*VRN1* (B)·*PaFT* (C)·*PaSOC1* (D)·*hptII* (E)·*GUS* (F) genes; *actin* (G)·*VRN3* (H)·*VRN1* (I)·*PaFT* (J)·*PaSOC1* (K)·*hptII* (L)·*GUS* (M) mRNA in putative transplastomic *Den. 'Red Emperor'*. CK: untransformed *Den. 'Red Emperor'*.

討 論

一、春石斛'紅皇帝'農桿菌基因轉殖之篩選、再生及增殖

本研究以農桿菌法共同轉殖基因到'紅皇帝'石斛蘭之擬原球體，分為二種轉殖組合且每種組合包含四種農桿菌菌系。本研究使用之篩選藥劑包括 glufosinate (組合一)與 hygromycin (組合二)。「紅皇帝」石斛蘭以 8 ppm glufosinate 篩選效果不理想，與董(2018)所報導的不同。已感染農桿菌之擬原球體於 8 ppm 篩選多個月後即使生長勢減緩，仍維持青綠色至黃綠色外觀，較難通過肉眼判斷 PLB 是否存活。後續改以 10 ppm glufosinate 進行初篩選，接續的繼代將培養基篩選藥劑濃度提高至 15 ppm，提高篩選壓力。提高 glufosinate 濃度使大部分受感染之 PLB 加速黃白化並呈現水浸狀。共同轉殖 pCAM1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1 之擬轉殖株組合，由於 pCAM1301-VRN3 適用之篩選藥劑與其他三種擬轉殖株不同，最後選擇以 glufosinate 做為此轉殖組合之篩選藥劑，並未以 hygromycin 進行篩選。

'紅皇帝'石斛蘭原球體再生芽梢的過程中耗時較長，繼代過程中經常持續再生 PLB 而不產生後續芽、根分化。以 0 ppm BA、1 ppm BA+1 ppm NAA、0.2 ppm BA、0.1 ppm BA 進行誘導原球體發芽培養試驗，最後選定以 1 ppm BA+1 ppm NAA 與 0.1 ppm BA 兩種濃度作為誘導原球體發芽培養基之荷爾蒙濃度，此兩種荷爾蒙濃度誘導發芽的所需時間較短(約三個月)。約再生 3~6 個月後長出芽，出芽後繼代至 0.1 ppm NAA 發根培養基中誘導發根，芽生長的同時誘導發根將會縮短再生時間，約 1~2 個月內陸續發根。擬轉植株成長至一定大小後繼代至石斛蘭 T2 培養基持續再生。擬轉植株成長至一定大小後以水苔做為介質出瓶，出瓶後施以 NAA 持續誘導發根，並以花寶 1 號進行施肥動作。

二、擬轉殖植株之基因及 mRNA 表現分析

(一)、共同轉殖 pCAM1301-VRN3、pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pAlcR-AlcA:PaFT、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1 之擬轉殖株 (組合一)

在 28 個擬轉植株中，僅有 11 個擬轉植株偵測到 *Bar* 轉基因，這可能是因為'紅皇帝'石斛蘭具有抵抗 glufosinate 篩選的能力，因此部分植株從篩選中逃脫。出瓶過程中部分擬轉植株相繼死亡，無法進行後續 RT-PCR 試驗。編號 11 號擬轉植株(S11)於 PCR 試驗中可偵測到 *VRN3* 和 *PaSOC1*，在 RT-PCR 試驗中則沒有偵測到其表現，顯示此二種基因雖成功轉入植株但並未表現 mRNA。編號 11、20 擬轉植株(S11、S20)在 PCR 跟 RT-PCR 試驗中皆偵測到 *VRN1*、*PaFT* 條帶；編號 27 號擬轉植株(S27)在 PCR 跟 RT-PCR 試驗中只偵測到 *PaFT* 條帶，顯示以 2%酒精處理擬轉植株葉片 12 小時後即可有效誘導酒精啟動子表現。未來可進行後續酒精試驗，確認酒精啟動子是否能於活體植株內表現，轉基因是否表現並促進轉殖株提早開花。

總計有 5 株擬轉殖植株同時偵測到目標基因的 DNA 及 mRNA：四種基因為 S11 (*VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1*)，三種基因為 S20 (*VRN3*、*VRN1*、*PaFT*)，二種基因為 S9

(*VRN3*、*PaSOC1*)、S27 (*VRN1*、*PaFT*)，一種基因為 S2 (*VRN3*)。

(二)、共同轉殖 pCAM1301-*VRN3*、p1304-35S-*VRN1*、pCAM1301-Ubi:*PaFT*、pCAM1301-Ubi:*PaSOC1* 之擬轉殖株 (組合二)

編號 10 號擬轉殖株(A10)之 PCR 試驗可偵測到轉基因 *VRN3*、*PaSOC1*、*hptII* 和 *GUS* 之基因片段；編號 21 號擬轉殖株(A21)偵測到轉基因 *PaSOC1*、*hptII*、*GUS*，但是這兩棵轉殖株在 RT-PCR 試驗中則無法偵測到任何條帶，顯示轉基因雖成功導入植株但並未表現 mRNA。幾乎所有擬轉殖株偵測到 *hptII* 與 *GUS* 兩種轉基因，然而在 RT-PCR 試驗中僅部分擬轉殖株偵測到 *hptII* 基因表現，且都無法偵測到 *GUS* 表現。

總計有 11 株擬轉殖植株同時偵測到目標基因的 DNA 及 mRNA：二種基因為 A10 (*VRN3*、*PaSOC1*)，一種基因為 A30、A31 (*VRN3*)，A3、A8 (*VRN1*)，A28、A29 (*PaFT*)，A21、A22、A22、A22 (*PaSOC1*)。

本研究共計已完成 1. 共同轉殖 pCAM1301-*VRN3*、pMLBART-AlcR-AlcA-*VRN1*、pAlcR-AlcA:*PaFT* 及 pMLBART-AlcR-AlcA-*PaSOC1*、2. 共同轉殖 pCAM1301-*VRN3*、p1304-35S-*VRN1*、pCAM1301-Ubi:*PaFT*、pCAM1301-Ubi:*PaSOC1* 等二種組合之農桿菌感染春石斛 PLB、篩選、再生、增殖、出瓶。擬轉殖株 PCR 及 RT-PCR 分析之結果顯示，*VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1* 等轉基因共同或單一存在於轉殖葉片之基因組內，並表現其 mRNA。研究結果顯示共同轉殖調節春化相關基因到'紅皇帝'石斛蘭是可行的，雖然部份轉殖株可偵測的到轉殖基因但並不能偵測到其 mRNA，由於目前轉殖植物尚幼小，尚未到開花期，有待植株成長成株，分析其轉基因之遺傳穩定性及開花特性，方可得知轉殖之基因是否有發揮其預期的效果。

參 考 文 獻

- 許嘉錦。2014。春石斛蘭產業發展與育種方向。臺中區農業專訊。84:4-7。
- 許嘉錦。2015。春石斛蘭之栽培技術臺中區農業專訊。88:4-7。
- 楊舜閔、傳承泰、紀科衡、曾夢蛟。2015。春石斛蘭春化作用相關基因之選殖與構築。興大園藝。40(4): 95 – 108。
- 魏芳明。2010。春石斛蘭研究現況與展望。2010。花卉研究團隊研究現況與展望研討會專刊。63-70。
- Hsiao, Y-Y., Z-J. Pan, C-C. Hsu, Y-P. Yang, Y-C. Hsu, Y-C. Chuang, Y-C. Chuang, H-H. Shih, W-H. Chen, W-C. Tsai, and H-H. Chen. 2011. Research on orchid biology and biotechnology. *Plant Cell Physiol.* 52: 1467-1486.
- Lee J., M. Oh, H. Park, and I. Lee. 2008. *SOC1* translocated to the nucleus by interaction with *AGL24* directly regulates leafy. *Plant J.* 55(5):832-843.
- Liang S., Q. S. Ye, R. H. Li, J. Y. Leng, M. R. Li, X. J. Wang, and H. Q. Li. 2012. Transcriptional regulations on the low-temperature-induced floral transition in an *Orchidaceae* species, *Dendrobium nobile*: an expressed sequence tags analysis. *Comp. Funct. Genomics.* 3:757801.
- Liu X. R., T. Pan, W. Q. Liang, L. Gao, X. J. Wang, and H. Q. Li., and S. Liang. 2016. Overexpression of an Orchid (*Dendrobium nobile*) *SOC1*/TM3-Like ortholog, DnAGL19, in *Arabidopsis* regulates HOS1-FT expression. *Front Plant Sci.* 7:1-12.
- Yu H., S. H. Yang, and C. J. Goh. 2002. Spatial and temporal expression of the orchid floral homeotic gene *DOMADS1* is mediated by its upstream regulatory regions. *Plant Mol. Biol.* 49(2):225-237.
- Zheng S. G., Y. D. Hu, R. X. Zhao, S. Yan, X. Q. Zhang, T. M. Zhao, and Z. Chun. 2018. Genome-wide researches and applications on *Dendrobium*. *Planta.* 248:769-784.

Studies on Transformation of Regulating Vernalization-Related Genes *VRN3*、*VRN1*、*PaFT*、*PaSOC1* into Nobile-Type *Dendrobium* Orchid

Jia-Ming Chang¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Liang-Jwu Chen³⁾ Menq-Jiau Tseng⁴⁾

Key words: Nobile-type *Dendrobium*; Vernalization related genes; Gene transformation

Summary

Nobile-type *Dendrobium* is a section of *Dendrobium* that includes many closely related species and their hybrids. Nobile *Dendrobium* is a new orchid crop to be promoted in Taiwan, and potentials in economic cultivation. Techniques for mass production of planting materials and forcing cultivation, flower induction as well as extending flowering period, are awaiting to be developed. Two types of vernalization pathway in nobile-type *Dendrobium* had been proposed: FLC like dependent pathway and FLC independent pathway. In this study, genes involved in FLC like dependent pathway under the control of the constitutive (CaMV35S or Ubiquitin) or inducible (alcR/alcA system, alcohol induction) promoter were engineered into nobile-type *Dendrobium*, and vernalization-related genes were transformed into the PLB of the nobile-type *Dendrobium*. The results of PCR and RT-PCR analysis of putative transformed plants indicated that the transformed genes were presented in the genome of transformed plants, and expressed its mRNA (*VRN3*, *VRN1*, *PaFT*, *PaSOC1*).

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.

4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

臺灣南仁山低地雨林二十年林隙動態

許 天 耀¹⁾ 吳 振 發²⁾ 趙 國 容³⁾

關鍵字：林隙、物種豐富度、耐陰性、南仁山

摘要：本研究之目的為了解受颱風影響之熱帶森林林隙長期變化的特性，及此特性對當地的物種豐富度之影響。研究樣區位於南仁山自然保護區，是台灣本島僅存的熱帶雨林之一。此地區的林隙動態頻繁，並非始終維持相同狀態，樣區內的新增率與死亡率皆隨著林隙頻度的增加而上升，顯示林隙出現的頻率對森林內的波動有提升的效果。物種豐富度會隨著林隙頻度升高稍許上升，同時樣區內的非耐陰性樹種個體比例增加、中性樹種逐漸下降。此外樣區內大量的中性樹種可能是導致林隙與非林隙區域間，物種豐富度未出現明顯差異的原因，而非颱風頻繁干擾的林下光環境沒有顯著差異。

前 言

林隙 (gap) 又稱孔隙、林冠空隙，指森林中單株樹或多株樹斷折或死亡後，在林冠層所形成的空隙。林隙出現後，造成林下光度的異質性與植物的耐陰性 (shade tolerance)，是林隙能影響森林中樹種多樣性的原因 (胡等，2015；Sharma *et al.*, 2019)。不同的光資源區段，往往有著不同的優勢樹種 (Hubbell *et al.*, 1999)，導致林隙形成時可能使林隙下樹種的多樣性增加 (Brokaw and Busing, 2000)。能在鬱閉林下環境生存繁殖的種類稱為耐陰種 (shade-tolerant species)，屬於演替晚期的非先驅性物種 (non-pioneer species) (胡等，2015)；反之，無法在林下低光環境生存繁殖的種類則稱為非耐陰種 (shade-intolerant species)，屬

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授。

3) 國立中興大學國際農學碩士學位學程副教授，通訊作者。

於演替早期的先驅物種 (pioneer species) (陳凱眉，2011)。

林隙造成資源重新分配時，若能使林隙內的生存資源具有梯度差異、隨著梯度出現不同樹種、並產生不同樹種沿梯度共生的情況，即所謂的「林隙分配假說」(gap partitioning hypothesis) (Brokaw and Busing, 2000)。但在熱帶森林中常因颱風侵襲，森林樹冠層容易破損而有較高的林隙數量與出現頻率，可能使林隙與非林隙區域間缺乏明顯的資源梯度，因此不易在熱帶森林中觀察到林隙對樹種分配的現象 (Lin, 2020)。某些地區的森林甚至出現獨特的生長策略以應付頻繁的外部擾動。例如台灣福山 (Fushan) 地區的森林，當遇到颱風干擾時，會有大量落葉的情形，以避免樹冠層破損。落葉後的樹冠層儘管未出現林隙，但透光度已經增加，林隙區域與林下區域的光資源資源異質性減少，使林隙對於多樣性的影響力下降 (Lin, 2020; Lin *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2019)。

南仁山地區位於台灣的東南角，是台灣本島為數不多的熱帶森林，除了有颱風影響之外，也終年受到夏季的西南季風與冬季的東北季風吹拂，是一座干擾頻繁的熱帶森林 (Chao *et al.*, 2010)。新增率與死亡率可作為森林受干擾程度的判斷依據之一 (陳凱眉，2011)，此地區頻繁的干擾，預期可觀察到較激烈的林隙動態，且新增率與死亡率應會隨林隙頻率增高而上升。林隙的區域較有利於非耐陰性植物建立族群 (胡等，2015；郭與范，2003)，因此當頻繁的干擾使林隙出現次數增加時，應會使非耐陰性植物的數量上升，同時提升了林隙區域的物種豐富度，並在林隙與非林隙區域之間出現不同的物種功能群。

本次研究將分析南仁山地區 20 年間林隙動態與物種多樣性之關聯。林隙動態分成群落動態及樹冠動態，物種多樣性則包含物種豐富度與功能群組成。透過新增率及死亡率了解樣區內的群落動態，樹冠動態則分成分成干擾時間點 (變動歷史) 及次數 (林隙頻度) 做觀察。最後呈現三個主要結果：(1) 南仁山地區林隙二十年間的變化特性、(2) 林隙與物種豐富度之關係，和 (3) 林隙與物種功能群組成之關係。

研究方法

一、樣區概況

南仁山自然保護區位處台灣本島東南角，坐落於屏東縣滿州鄉境內、墾丁國家公園東北方，為一個天然熱帶季風雨林 (Chao *et al.*, 2010)。本次研究選定保護區內的溪谷樣區 I (Nanjenshan Plot I) (120°50'52"E, 22°04'54"N) 做為調查樣區，樣區面積 2.1 ha，海拔高度 224-275 m、年均溫 23°C、年降水量 3300 mm (陳凱眉，2011；陸田奇，2017)。

樣區內林隙定義為樹冠高度低於 5 m，並且樹冠層邊緣垂直投影面積大於 4 m² 的樹冠層破空，該區域若經判定為林隙，則手繪於地圖中 (陸田奇，2017)。利用 QGIS 軟體 (Quantum geographic information system version 2.6.1) 數位化以計算林隙個數，並將所得資料進行套疊，可看出二十年間 (1993 至 2013 年) 林隙變化之情形，並判斷為新林隙或是舊

有林隙。

木本植物資料取自南仁山低地雨林森林動態樣區的每木調查資料，共有 1993 年、2000 年、2008 年以及 2013 年四次調查 (陳凱眉，2011；趙國容，2001；Chao *et al.*, 2010)。以每一小樣方 (5 m × 5 m) 為單位，測量樣方內每株胸高直徑 (DBH, diameter at breast height) ≥ 1 cm 之個體 (包括分枝)，當 DBH 數值大於 1，表示該個體於該次調查時仍為存活狀態；反之若 DBH 數值小於 1，表示該個體於該次調查時呈現死亡或直徑不足 1 cm 之狀態。

二、林隙歷史與頻率

截至 2019 年為止，共有四次調查之林隙資料，分別為 1993、2000、2008、2013 年，每年度分別判定各 (5 m × 5 m) 樣方之林隙狀態，樣方內有出現林隙，以 O 表示；若樣方內完全無林隙面積，以 C 表示，調查期間總計可得 16 種不同的林隙狀態組合，即過去 20 年間的林隙歷史。在依照各組合林隙(O)出現的次數由 0 至 4 次分成五級：I (CCCC，完全鬱閉)、II (如：CCCO)、III (如：CCOO)、IV (如：COOO)、V (OOOO，完全林隙)(表 1)。

三、植物資料

本研究探討森林動態之狀態包含組成、新增、死亡三種類型。組成的篩選條件為該調查年度所有存活的個體；新增為過去年度不存在、但於該年度出現之個體，死亡為前一年度存在、但於該年度消失，並於最後一次調查年度 (2013) 為死亡狀態之個體。

新增率 (μ) (recruitment rate) 與死亡率 (λ) (mortality rate) 係指樣區內所有樹種或者單一樹種在單位時間內個體增加或減少的情況(趙國容, 2001)。本次研究根據 Kohyama *et al.* (2018) 的公式，計算新增率與死亡率。 $\mu = (\ln(N_T/N_S))/T$ ， $\lambda = (\ln(N_0/N_S))/T$ 。 N_T 為時間點 (T) 時的族群數， N_0 為起始時間點的族群數， N_S 為自起始時間點存活至時間點 (T) 時的族群數， T 為調查間距。

四、豐富度與耐陰性

物種豐富度指標以 PAST (PAleontological STatistics, version 3.25) 計算。耐陰性參照 Kuo and Yeh (2015) 之文獻，將樣區內的 114 種木本植物分成「非耐陰性樹種」、「中性樹種」、「耐陰性樹種」。非耐陰樹種主要有咬人狗 (*Dendrocnide meyeniana*)、蟲屎 (*Melanolepis multiglandulosa*)、白匏子 (*Mallotus paniculatus*) 等；中性樹種主要有九節木、雞屎樹、紅果柃木等；耐陰樹種大葉樹蘭、三葉山香圓 (*Turpinia ternate*)、交力坪鐵色等。

結 果

一、南仁山地區林隙二十年間的變化特性

16 種林隙狀態組合 (表 1)，在所有的 840 個 (5 m × 5 m) 樣方中，每種狀態皆有出現至少一次。出現次數最多的為林隙組合 CCCC (後簡稱 CCCC)，共有 464 個樣方，表示此樣區內有過半數 (55.24%) 的森林面積在調查期間始終維持鬱閉狀態。1993 年為林隙、2000 年後皆為鬱閉的樣方 (OCCC) 為第二多數，有 75 個 (8.93%)。2000 年後自鬱閉轉為林隙有 3.21%；(CCOO) 與 2008 年後自鬱閉轉為林隙 (CCCO) 的樣方分居三、四 (61 個、7.26%；46 個、5.48%)。林隙開合交替的類型 OCOC 與 COCO 出現比例偏低，僅有 1.79%，顯示林隙的開合狀態通常可以至少維持兩次調查週期以上。共有 17.4% 的樣方長期保持林隙狀態 (OOOO、CCOO、COOO、OCOO、OOCO、OOOC)，其中始終為林隙狀態 (OOOO) 的樣方而林隙在閉合後能維持兩次調查週期以上鬱閉狀態 OCCC、COCC 與 OCCC 共佔 14.29% (表 1)。

大部分林隙組合的新增率呈現先升後降的狀況，皆在 2008 年達到新增率高峰，2013 年新增率下降且低於 2000 年，僅 OOOO 與 CCOO 在 2013 年的新增率高於 2000 年 (但仍以 2008 年最高)。兩次調查間有經歷過林隙狀態改變 (C 變 O 或 O 變 C) 的組合，在該年的年新增率通常會偏高，各組合間與年間的新增率分別有顯著差異 (two-way ANOVA, gap history $F_{6,21} = 4.092$, $p = 0.018$; year $F_{2,21} = 12.58$, $p = 0.001$) (圖 1)。大部分組合的年死亡率皆隨時間上升，僅有 OCCC 在 2008 年死亡率最高，2013 年又下降；兩次調查間有經歷過林隙狀態改變 (C 變 O 或 O 變 C) 的組合，在該年的年死亡率通常較未變動的組合高。2000 年時大部分組合的年死亡率略高於 1993–2013 年的年死亡率，僅 OOOO 與 CCOO 死亡率較 1993–2013 年低；2013 年時，所有組合的年死亡率皆高於整個調查期間 (1993–2013 年) 的年死亡率，顯示 2008 到 2013 年間有大量個體死亡，各組合間與年間的死亡率分別有顯著差異 (two-way ANOVA, gap history $F_{6,21} = 3.365$, $p = 0.034$; year $F_{2,21} = 8.408$, $p = 0.005$)。

因林隙歷史 (干擾時間點) 與物種豐富度間之關聯並不明顯，故本研究進一步以林隙頻度 (干擾次數) 分析，探討林隙對物種豐富度的影響。而在了解林隙頻度與豐富度的關聯之前，先於下個小節探討林隙頻度對森林動態的影響。

二、林隙頻度

各林隙頻度的數量隨著林隙頻度的增加下降，但年新增率與死亡率皆隨林隙頻度增加呈現上升趨勢，表示林隙頻度越高，樣區內物種動態越劇烈；第 I 和 II 級有較低的新增率與死亡率，顯示其森林狀態相對穩定 (two-way ANOVA, gap frequency $F_{4,10} = 18.95$, $p = 0.007$; rate $F_{1,10} = 20.48$, $p = 0.011$)。優勢樹種以中性樹種為主，有雞屎樹、九節木、火筒樹、紅果柃木、水同木、石苓舅、山刈葉等，其中雞屎樹、九節木、火筒樹、紅果柃木、水同木等五種在每個頻度皆有出現；石苓舅在 IV、V 級並非優勢樹種、山刈葉則只在第 V 級為優勢樹種。非耐陰性樹種則有咬人狗、蟲屎、血桐、白匏仔，咬人狗在每個頻度皆為優勢樹

表 1. 各調查年度林隙狀態。括弧內數字表示該年林隙狀態的樣方數量，斜體字表示該狀態的比例 (%)。

Table 1. Gaps dynamics from 1993 to 2013. Numbers in () are the numbers of quadrats in that year, numbers with *Italic* are the ratio (%) of that gap situation.

1993	2000	2008	2013
O (176) (20.95)	O (57) (3.92)	O (33) (3.21) (0.71)	O (27) C (6)
	C (119) (3.45) (10.71)	C (24) (1.31) (1.55)	O (11) C (13)
		O (29) (2.26) (1.19)	O (19) C (10)
		C (90) (1.79) (8.93)	O (15) C (75)
C (664) (79.05)	O (64) (3.22) (4.41)	O (27) (0.6) (0.6)	O (22) C (5)
	C (600) (10.71) (60.71)	C (37) (3.81) (7.26)	O (5) C (32)
		O (90) (3.45) (5.48)	O (61) C (29)
		C (510) (55.24)	O (46) C (464)

種，其餘三者僅在第V級為優勢樹種。三種耐陰性樹種為：大葉樹蘭、三葉山香圓與交力坪鐵色，在各個頻度都是優勢樹種。

三、林隙頻度與物種豐富度之關係

組成的物種豐富度以第IV級 (黃線)最高、第V級 (藍線)豐富度最低 (圖 2)。新增與死亡個體的豐富度中，林隙頻度I級與其他四個頻度間並未出現區別；所有頻度中以第IV

級的豐富度最高，且與最低的第V級出現稍許差異。

四、林隙頻度與物種功能群組成之關係

樹種耐陰性方面，個體組成的非耐陰性樹種比例隨林隙頻度增加升高，以第V級的23.41%最高；中性樹種比例隨林隙頻度增加而下降，以第V級的48.35%最低；耐陰性樹種比例則無特定變化趨勢 (Chi square test, $p < 0.001$)。新增個體的非耐陰性樹種的比例隨著林隙頻度增加上升，以第V級的24.81%最高、第I級的10.86%最低；耐陰性樹種與中性樹種比例隨著林隙頻度上升而略為減少，第V級同時具有最低的中性樹種比例，僅有48.87% (Chi square test, $p < 0.001$)。死亡個體的非耐陰性樹種比例隨林隙頻度稍微增加，但以第IV級的19.55%最高；耐陰性樹種比例則隨林隙頻度增加而下降，以第II級的31%最高、第V級的22.93%最低 (Chi square test, $p < 0.001$)。

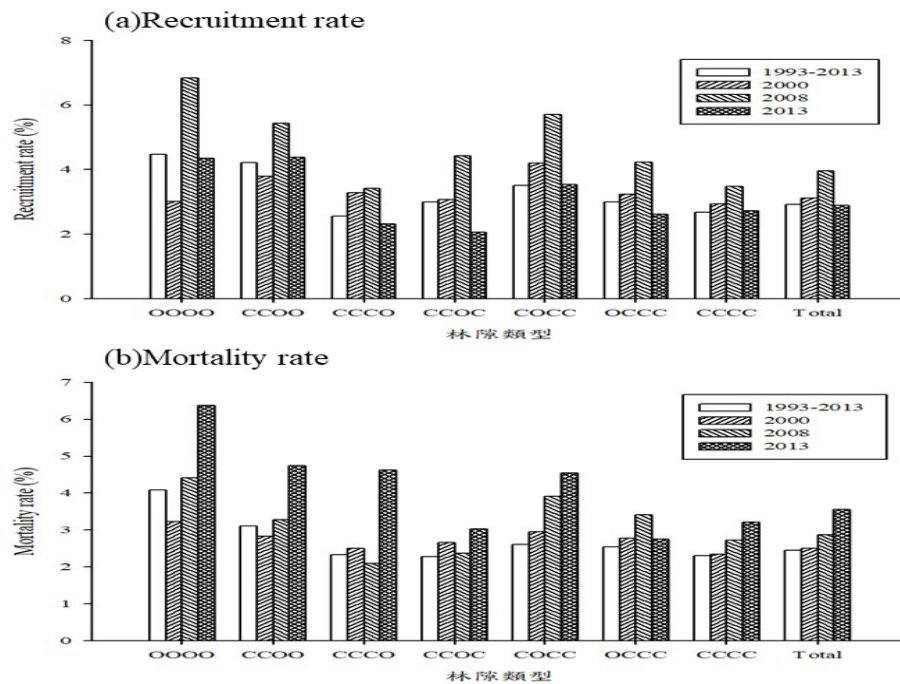


圖 1. 不同林隙類型新增(a)與死亡率(b)。

Fig. 1. Recruitment (a) and mortality (b) rates of different gap dynamic type.

表 2. 2013 年各林隙頻度每 25 m² 個體密度前十名之優勢物種。

Table 2. Density (stems 25 m⁻²) of dominant species in different gap frequency in 2013.

	物種	林隙頻度				
		I	II	III	IV	V
非耐陰性	咬人狗	0.25	0.40	0.25	0.71	0.52
	蟲屎	0.11	0.13	0.16	0.24	0.26
	血桐	—	—	—	—	0.26
	白匏子	—	—	—	—	0.26
中性	雞屎樹	0.99	0.95	0.36	1.03	1.04
	九節木	1.63	1.53	0.72	1.26	0.67
	火筒樹	0.21	0.25	0.34	0.62	0.67
	紅果柃木	0.80	0.81	0.54	0.78	0.63
	水同木	0.33	0.36	0.25	0.52	0.33
	石苓舅	0.41	0.36	0.26	0.19	0.19
	山刈葉	—	—	—	—	0.26
耐陰性	大葉樹蘭	0.70	0.89	0.34	0.88	0.89
	三葉山香圓	0.70	0.71	0.36	0.69	0.48
	交力坪鐵色	0.34	0.37	0.20	0.22	0.30

註：蟲屎、血桐、山刈葉、白匏仔在第V級數量相同，並列第十名的優勢物種，故一併列入第V級的優勢樹種排序。但血桐、山刈葉、白匏仔在其他四級數量不再前十名，故不列入其他四級之優勢種排序。

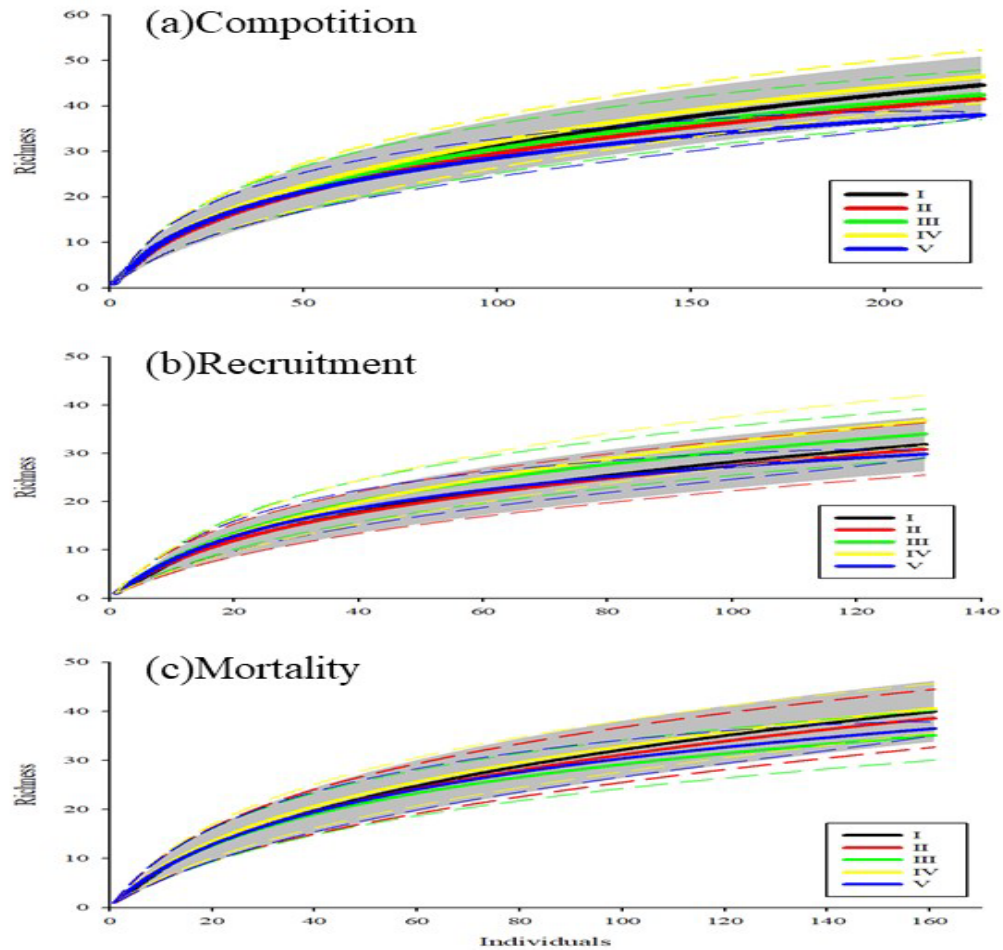


圖 2. 不同林隙頻度組成、新增、死亡個體物種豐富度，組成之個體為 2013 年時存活的所有個體。圖中不同的顏色分別代表不同的林隙頻度，黑色為I、紅色為II、綠色為III、黃色為IV、藍色為V。實線表示各頻度之豐富度、虛線為 95%信賴區間上下限、灰色區塊為I級之信賴區間範圍。

Fig. 2. Species richness of composition (a), recruitment (b) and mortality (c) in different gap frequency. Black, red, green, yellow, blue lines and area indicate frequency I to V, respectively. Solid lines are richness, dotted lines represent 95% confidence interval. Grey area is the 95% confidence interval of frequency I.

討 論

儘管南仁山周邊區域持續有颱風登陸，樣區內大部分的森林依然可以長期維持完整的樹冠層，但持續的干擾也使舊有林隙有不易閉合的趨勢。伴隨林隙狀態改變出現的高新增、死亡率，則顯示此地區的林隙具有短期內變化劇烈的特徵。長期維持鬱閉狀態的組合，年死亡率與新增率較低；林隙維持狀態則有最高的年死亡率與新增率，顯示開放的林隙區域會受到較高程度的干擾，處於鬱閉狀態的森林受到干擾程度較低，是相對穩定的環境。此外兩次調查間有經歷過林隙狀態改變(C 變 O 或 O 變 C)的組合，在該年的新增率與年死亡率通常會偏高，顯示林隙狀態的改變具有森林更新的效果。植株的新增與死亡可視為判定森林受干擾程度的指標之一，樹冠層樹木的死亡與舊林隙邊緣區域的樹木因缺乏遮蔽死亡，直接呈現在死亡率上；林隙出現帶來的森林更新，則反映在新增率的提升(陳凱眉, 2011)。

這也可以說明為何兩次調查間有經歷過林隙狀態改變的組合，在該年會有高新增率及死亡率。林隙頻度上升伴隨的高死亡率可能為造成林隙的大樹凋亡、大樹凋亡使林隙邊緣植株缺乏屏障死亡 (Hubbell et al., 1999; Schnitzer and Carson, 2001)、以及林隙區域高密度生長引起的強烈生存競爭 (陳凱眉, 2011)；高新增率則是林隙釋放出的生長空間以及多餘的光資源 (Zhang et al., 2013)，提供適合的生育環境。

樣區內的年死亡率隨著時間穩定上升，死亡率逐年增加的結果，與 Chao 等人 (2010) 過去提出的觀察相符，可能與近年來南仁山地區受颱風侵襲頻率與強度增加有關(陳凱眉, 2011; 陸田奇, 2017)；年新增率亦有逐年增加的趨勢，但卻是在 2008 年最高，其中差別或許也是觀測時間點的不同。2005 年的研究發現颱風過境後，周邊地區森林的死亡率增加、新增率降低，三年後則觀察到死亡率與新增率皆上升 (Chao et al., 2010)。2008-2013 年間先後有中度颱風莫拉克 (國際編號 0908)、天秤 (國際編號 1214) 分別於 2009、2012 年帶來超越海棠颱風的雨量，因此 2013 年的觀測時間點可能距離干擾太近，而未能觀測到新增率較前一段觀測時間高的現象。

在本研究中，不論是死亡、新增個體或是個體組成，各林隙類型對於物種的豐富度並未出現明顯影響；各林隙頻度間的物種豐富度雖未出現明顯差異，物種豐富度有隨著林隙頻度增加而上升的趨勢。以第IV級豐富度最高、第V級最低，且低於第I級。林隙的出現會吸引生長快速的非耐陰性樹種進駐，增加該區塊的物種豐富度，尤其南仁山地區有白匏子、血桐、咬人狗、山黃麻 (*Trema orientalis*)、野桐 (*Mallotus japonicus*)、白柏 (*Sapium discolor*)、賊仔樹 (*Tetradium glabrifolium*)、雀榕 (*Ficus superba*)、屏東木薑子 (*Litsea akoensis*) 及花蓮鐵莧 (*Acalypha suirenbiensis*) 等 10 種非耐陰性植物，偏好林隙形成早期的生育環境 (趙國容, 2001)。但這些植物生長快速與較短的生命週期，加上第V級為長期維持林隙區域，容易受風雨等外力干擾，反倒容易造成林隙邊緣的植株傷亡，使其不易建立大量的族群，

可能因此產生第V級豐富度最低的現象。

因此適度的閉合，恰巧提供了穩定的生育環境，或許是第IV級有著最高豐富度的原因。過去也有文獻指出，高度干擾或者完全無干擾的森林內，林隙區域與鬱閉區域的物種豐富度並無差異(Lin, 2020)。但如果在鬱閉的森林中，經適當的管理（如：人為疏伐），使林隙出現並閉合，可以有效地增加物種豐富度 (Poudyal *et al.*, 2019)。

儘管林隙組合的變化對物種豐富度無明顯的影響，但由樹種的耐陰性比例可看出，林隙變化對物種功能群的影響。組成與新增個體中，非耐陰性樹種比例隨林隙頻度增加而上升，中性樹種比例隨林隙頻度增加而下降，耐陰性樹種則無明顯變化，表示林隙的存在確實較有利於非耐陰性樹種。

陰性樹種比例大致不變的情形下，隨著林隙頻度提升的非耐陰性樹種比例卻無法使物種豐富度增加，不排除是非耐陰性樹種在樣區內個體數本就遠低於耐陰性樹種與中性樹種所導致。另外南仁山地區大量生長快速的地被植物，如：冷清草 (*Elatostema lineolatum*)、姑婆芋 (*Alocasia odora*)、莎勒竹、台灣水藤 (*Calamus beccarii*)、黃藤 (*Calamus formosanus*) 等，可能也是原因之一。非耐陰性樹種尚未突破林隙區域的樹冠層，就被覆蓋或因生存競爭死亡 (陸田奇, 2017; 趙國容, 2001)。幸運突破樹冠層存活的個體，又可能因林隙空間缺乏遮蔽物，受到南仁山地區頻仍的風雨侵襲而死亡 (李侑儒, 2013)。儘管對極度仰賴光資源的非耐陰性植物而言，林隙的形成對其族群建立較為有利，可預期林隙空間內會有較多的非耐陰性植物存在 (Schnitzer and Carson, 2001)。但南仁山茂密的地被植物，反而影響非耐陰性植物在林隙下的族群建立。

Lin 在 (2011)與 (2020)的文獻亦可提供不同的思考面向：在干擾頻繁的森林中，樹木可能藉由落葉(defoliation)以減輕承受的外力負擔。樹木避免枝條斷折的同時，也降低林隙出現的可能，落葉的同時則使樹冠層的透光度增加，林隙與非林隙區域的資源差異減少 (Lin, 2020)。在終年受風雨侵襲的南仁山森林中，可能因此降低林隙與非林隙區域的光資源落差，使的耐陰性植物能在不同區域維持一定的比例。

但本研究發現林隙頻度的增加可令非耐陰性樹種比例上升，林隙的確對非耐陰樹種的新增有一定的影響力，此結果顯示南仁山地區林隙對物種豐富度的影響，較傾向於林隙分配假說，且不支持 Lin 在 (2011)與 (2020)的結果。儘管林隙對功能群組成有影響，但不同林隙組合內的多樣性差異卻不明顯，此應和樣區內以中性樹種為主，且本研究尺度著重在 5 m × 5 m 有關。大面積的林隙較有利於非耐陰性物種進駐，也能產生較高的物種豐富度 (Hammond *et al.*, 2020; Pourbabaie *et al.*, 2013)，但南仁山地區的林隙面積多低於 50 m² (陸田奇, 2017)，應不符合其他文獻中大面積的定義。林隙面積較小，使非耐陰性樹種對多樣性的正面的增益影響力降低，導致林隙對物種豐富度的影響力不明顯，可能是本研究中，不同林隙組合內多樣性差異不大的原因。

本研究於干擾頻繁的森林地區進行，相較於干擾較少的森林區域，長期且高頻率的觀察較容易紀錄擾動較多的森林內之林隙變化，以及對林隙區域內物種豐富度的影響。未來若於干擾頻繁的區域內進行調查，或許可藉由提高調查頻率，更精確的掌握林隙動態。甚至透過不同的功能群分群（例如耐旱程度，耐風程度等），深入了解林隙對物種豐富度的影響。

參 考 文 獻

- 李侑儒。2013。南仁山低地雨林林隙更新模式。國立中興大學國際農學學位學程碩士論文。46pp.。
- 胡元瑋。2014。熱帶森林的孔隙動態。林業研究專訊。21: 13-20。
- 胡元瑋、陳燕章、曾彥學。2015。樹木的耐陰性。中華林學季刊。48: 97-112。
- 郭耀綸、范開翔。2003。南仁山森林倒木孔隙三年間的更新動態。臺灣林業科學。18: 143-152。
- 陳凱眉。2011。台灣南部南仁山低地雨林樹木的更新。隙與地被植物莎勒竹的影響。國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所碩士論文。55pp.。
- 陸田奇。2017。颱風、地形及莎勒竹對於台灣南仁山熱帶森林中林隙動態之影響。國立中興大學生命科學系碩士論文。87pp.。
- 趙國容。2001。南仁山低地雨林木本植物社會之短期動態。國立臺灣大學植物學研究所碩士論文。150pp.。
- Brokaw, N. and R. T. Busing. 2000. Niche versus chance and tree diversity in forest gaps. *Trends Ecol. Evol.* 15: 183-188.
- Chao, K. J., W. C. Chao, K. M. Chen, and C. F. Hsieh. 2010. Vegetation dynamics of a lowland rainforest at the northern border of the paleotropics at Nanjenshan, southern Taiwan. *Taiwan J. For. Sci.* 25: 29-40.
- Hammond, M. E., R. Pokorný, L. Dobrovolný, M. Friedl, and N. Hiitola. 2020. Effect of gap size on tree species diversity of natural regeneration-case study from Masaryk Training Forest Enterprise Křtiny. *J. For. Sci.* 66: 407-419.
- Hubbell, S., R. B. Foster, S. T. O'Brien, K. E. Harms, R. Condit, B. Wechsler, S. J. Wright, and S.L. de Lao. 1999. Light-gap disturbances, recruitment limitation, and tree diversity in a neotropical forest. *Sci.* 283: 554-557.
- Kathke, S. and H. Bruehlheide. 2010. Gap dynamics in a near-natural spruce forest at Mt. Brocken, Germany. *For. Ecol. Manage.* 259: 624-632.
- Kenderes, K., B. Mihok, and T. Standovar. 2008. Thirty years of gap dynamics in a central

- European beech forest reserve. *For.* 81: 111-123.
- Kohyama, T. S., T. I. Kohyama, and D. Sheil. 2018. Definition and estimation of vital rates from repeated censuses: Choices, comparisons and bias corrections focusing on trees. *Methods Ecol. Evol.* 9: 809-821.
- Kuo, Y. L. and C. L. Yeh. 2015. Photosynthetic capacity and shade tolerance of 180 native broadleaf tree species in Taiwan. *Taiwan J. For. Sci.* 30: 229-243.
- Lin, T. C. 2020. Reevaluating the theory of gap dynamics using studies of typhoon disturbance at the Fushan experimental forest, northeastern Taiwan. *Taiwan. J. For. Sci.* 35: 97-102.
- Lin, T. C., S. P. Hamburg, K. C. Lin, L. J. Wang, C. T. Chang, Y. J. Hsia, M. A. Vadeboncoeur, C. M. M. McMullen, and C. P. Liu. 2011. Typhoon disturbance and forest dynamics: Lessons from a northwest Pacific subtropical forest. *Ecosyst.* 14: 127-143.
- Poudyal, B. H., T. Maraseni, and G. Cockfield. 2019. Impacts of forest management on tree species richness and composition: Assessment of forest management regimes in Tarai landscape Nepal. *Apl. Geo.* 111: 102078.
- Schnitzer, S. A. and W. P. Carson. 2001. Treefall gaps and the maintenance of species diversity in a tropical forest. *Ecol.* 82: 913-919.
- Sharma, L. N., K. B. Shrestha, and I. E. Måren. 2019. Tree regeneration in gap-understory mosaics in a subtropical *Shorea robusta* (Sal) forest. *J. For. Res.* 30: 2061-2068.
- Zhang, M., J. Zhu, M. Li, G. Zhang, and Q. Yan. 2013. Different light acclimation strategies of two coexisting tree species seedlings in a temperate secondary forest along five natural light levels. *For. Ecol. Manage.* 306: 234-242.

Twenty Years of Gap Dynamics in Lowland Rainforest of Nanjenshan, Taiwan

Tien-Yao Hsu¹⁾ Chen-Fa Wu²⁾ Kuo-Jung Chao³⁾

Keywords: Gap, Species richness, Shade tolerance, Nanjenshan

Summary

Gaps might promote forest regeneration and species diversity. However, some researchers found the light environment between canopy and gap area has no distinct difference, especially in the tropical area where frequently affected by typhoon disturbances. Hence, the influence of gap to species diversity may decrease, due to the frequent disturbances. This research aims to understand the characteristics of gap dynamics of a tropical forest affected by typhoons, and how the characteristics influences species richness and composition of functional groups. Our results showed this forest has fast gap dynamics patterns, accompanied by high recruitment and mortality rates, with both rates increased while the increasing frequency of gap formation. Species richness increases slightly with the increase of gap frequency. And there is an increasing pattern of percentage of shade-intolerant species with the increase of gap frequency and a decreasing pattern of percentage of shade-tolerant species. We also found 58% of the species are moderately shade-tolerant species, which can grow well both at gaps and non-gaps. This may be the reason why species richness did not have distinct composition among gap types, and is not due to the undifferentiated light environment caused by the typhoon disturbances.

-
- 1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Associate professor, International Master Program of Agriculture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

