

# 台糖蝴蝶蘭之品種改良

陳文輝 謝瑞旻 蔡娟婷 吳俊謙 邱明森 傅仰明

台灣糖業研究所園藝系

## 摘要

蝴蝶蘭花形優美花期長，是世界上高價值花卉之一，目前已成爲台糖公司多角化企業經營之一種重要花卉作物，蝴蝶蘭品種改良因而列爲糖研所一項重要研究工作。品種改良首重優良的種原，本所已廣泛地自國內外收集到 29 種原生種及 873 個優良雜交種，並以此爲品種改良種原。利用親代系譜電腦分析及細胞遺傳的研究了解兩性雜交不和合性之導因及協助擬定育種計畫。建立不定芽及擬芽球體微體繁殖技術來大量生產健康分生苗。應用 DNA 增幅指紋與同功酵素帶分子生物技術來保護台糖新品種之專利權。另外，亦利用 DNA 增幅指紋篩選遺傳標誌，俾加速育種效率。應用染色體倍加技術，自三倍體優良親本如 *Phal. Golden Emperor 'Sweet'* 獲得六倍體植株；並自 *Dor. pulcherrima* 獲得同質四倍體，這些異質或同質偶數倍數體蘭株將有助於育成更優異的蘭花品種或生產價廉而均一的蘭苗。此外亦研究蝴蝶蘭原生質分離、融合及培養技術，俾於引進遠緣植物有用的遺傳質進入蝴蝶蘭。

優良雜交親本經由電腦分析提供系譜及重要園藝性狀資料，供育種人員擬定雜交組合，每一年期共約雜交二百至三百個組合，並經由無菌播種、育苗等一般栽培程序，每一組合培育 100~1,000 株植株，供評估族群的優劣。目前共選出 TSC146 等 35 個優良雜交組合生產果莢，提供生產單位培育 100 萬蘭苗出售及生產盆花或切花。並以台糖公司 (Taisuco) 爲命名首字在英國皇家園藝協會 (RHS) 登錄 33 種。另外，也從所雜交培育之蘭株中選拔蝴蝶蘭優良品種，進行大量的分生繁殖，及參加世界性的蘭展。屢次的獲獎肯定台糖蝴蝶蘭之育種成果：1990 年 TSC1 及 TSC6 曾在名古屋國際蘭展獲得日本蘭農協會 (JOGA) 銅牌；1992 年 TSC11、TSC12、TSC13、TSC19 在臺灣第 6 屆及第 7 屆國際蝴蝶蘭展，分獲美蘭藝協會 (AOS) 之評審讚賞獎 (JC)、栽培獎 (CCM) 及銀牌 (AM)。TSC20 在 1993 年日本東京巨蛋蘭展得銅牌。最近，*Phal. Taisuco Kaaladian "TSC27"* 在 1993 年英國第 14 屆世界蘭展獨得大會銀牌、分組冠軍獎、優良品種第一獎及大白花分組第一獎。

**關鍵字：**蝴蝶蘭、育種、組織培養、細胞遺傳、同功異構酶、細胞融合、DNA 增幅指紋。

## 前言

蝴蝶蘭爲具高經濟價值的園藝作物，近幾年來其遺傳育種上之研究逐漸受到重視，但由於蝴蝶蘭生育期甚長（由交配至開花至少須兩年以上）且播種育苗方式繁瑣，故國內外極少學術研究機構從事相關之遺傳育種研究，目前商業品種大多由趣味者憑本身經驗選擇親本交配，因而產生後代變異大之族群，致使種苗生產業費時費力又不合經濟效益，爲了解決這些問題，從根本上了解蝴蝶蘭種原間類緣關係及重要經濟性狀之遺傳模式，擬定雜交方式並配合生物技術的開發，相信可提高蝴蝶蘭育種的效率。

雜交育種可聚合不同品種（品系）之優良遺傳質於新品種；利用分生繁殖技術可迅速大量繁殖優良品種的健康苗；染色體倍加技術的建立可幫助複二元體或同質四元體的產生及育成大花形美之多倍體蝴蝶蘭；原生質體融合有助於育成新奇而具特色之新品種；染色體核型及同功異構酶分析可幫助了解蝴蝶蘭種原間類緣關係；利用 DNA 分子遺傳標誌可迅速追蹤重要性狀，縮短育成新品種之年限，以上研究可提昇品種改良的效率，必須積極加以研究。

Baggett及Kean<sup>(6)</sup>認為十字花科植物 Broccoli的開花遺傳係受累加性因子之控制；Borchers<sup>(9)</sup>也指出其早開花因子為顯性或具雜種優勢。由於蝴蝶蘭為異交作物，經系譜分析現有的商業品種大多為三至五種原生種經十數代交配產生的合成品種，所以開花及其他重要性狀之遺傳行為較少有深入研究報導可供育種參考，為此，除進行一般栽培生產用之雜交外，也同時就花色、香味及抗病蟲害等特性以族群為育種目標進行雜交與分析。

利用微體繁殖(micropropagation)技術，加速繁殖健康種苗，穩定生產品質，是生物技術提昇農業生產之重要成果之一，其在園藝花卉作物更具成效<sup>(17)</sup>。蝴蝶蘭為單莖性蘭科植物，植株上很少發育側枝，故而組織培養是建立蝴蝶蘭快速無性繁殖的重要手段，西元 1949 年 Rotor首先成功地在試管中培養出蝴蝶蘭花梗苗<sup>(65)</sup>，而開啓了蝴蝶蘭微體繁殖的研究，利用擬原球體(proto-corm-like-body)可達到快速且大量無性繁殖的目的<sup>(51)</sup>，擬原球體可經由莖頂<sup>(24)</sup>、根尖<sup>(49)</sup>、葉片<sup>(51)</sup>、花梗節間<sup>(22,30)</sup>等植體誘導，誘導方法之困難度也有所差異，所以建立分生繁殖技術以保存種原及大量生產高品質分生苗，為當務之急的工作。

經由人為的方式誘導蝴蝶蘭染色體倍加之最早報導是 1981 年 Griesbach 利用含 50 ppm 秋水仙精(colchicine)液體培養基處理種子發育的原球體，其中有 46% 產生四元體。1985 年又利用含 0.5 ppm 秋水仙精固體培養基自三倍體 *Phal. Golden Sand'Canary'* 誘導六元體植株<sup>(21)</sup>。另外，Kamemoto<sup>(28)</sup>亦將染色體倍加技術應用在石斛蘭切花品種之育種上，將含不同基因組(genome)之異質二元體經染色體倍加產生複二元體，此複二元體可經由雜交產生品質均一之實生苗後代。

近年來，應用原生質體培養改良作物之生物科技，已受到植物育種家的重視。其應用範圍包括：(1)利用原生質體再生植株之變異性選育突變個體<sup>(42)</sup>；(2)經由原生質體融合獲得體細胞雜種，解決種間雜交不和合性問題<sup>(18)</sup>及(3)利用原生質體直接吸取 DNA 技術，將特定之有用基因轉移於栽培品種，縮短育種年限及開發新種原<sup>(14)</sup>。然而，此方面的研究在雙子葉的茄科植物已有重大進展<sup>(18)</sup>，但在單子葉的蘭科植物卻鮮有成功報導<sup>(49)</sup>，有待積極開發。

根據外部形態分類，蝴蝶蘭大致可分為九個亞屬(section)及 44 個種(species)<sup>(48)</sup>，而多數原生種為具 38 條染色體之二元體植株，根據早期細胞遺傳學家的觀察，蝴蝶蘭屬的染色體形態大致可分為兩群：長度在 1.5 微米之小型染色體及長度在 2~3.5 微米之大型染色體<sup>(5)</sup>，兩者之間的染色體組亦有不同程度之配對情形，由染色體的核型分析及種間雜交 F1 染色體配對情形可了解品種間類緣關係，進而探討雜交不孕性的問題，此部份研究在許多作物已有報告<sup>(31, 37)</sup>，雖然蘭科植物(*Orchidaceae*)早期亦有學者進行拖鞋蘭(*Paphiopedilum*)<sup>(27)</sup>、文心蘭(*Oncidium*)<sup>(46)</sup>、石斛蘭(*Dendrobium*)<sup>(5)</sup>、蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)<sup>(45)</sup>等之染色體核型分析，但其分析方法較為古老且應用性較小。現今利用染色體環帶染色，除可更肯定地比較同物種核型內及不同物種核型間染色體之差異外，並能探討物種之演化<sup>(36)</sup>。因此，若能發展新的蝴蝶蘭染色體製片技術，了解蝴蝶蘭各原生種間的染色體核型，並配合種間雜種 F<sub>1</sub> 花粉母細胞(pollen mother cell, PMC)染色體配對及種子稔實性，可了解各原生種間基因組(genome)親合性，提供將來育種材料之參考<sup>(1)</sup>。

將同功異構酶應用在植物的研究上，逐漸受到重視，除可探討植物演化及分類外，由於其生成受遺傳基因的控制，故可當做一種遺傳指標 (genetic marker)，並應用於研究作物基因的遺傳行為<sup>(15,26, 33,38)</sup>、生理特性<sup>(18,53)</sup>、代謝調節作用<sup>(59)</sup>及篩選抗病抗蟲植株<sup>(43)</sup>。另外，利用不同同功異構酶圖譜亦可預先選擇具有較佳雜交組合之親本<sup>(52)</sup>。有關蝴蝶蘭同功異構酶的研究，在1983年 Santiago等人曾利用過氧化酶 (peroxidase) 活性及總蛋白 (total protein) 環帶分佈相似性 (similarity index) 來分析比較 *Phal. equestris* 七種花色不同之亞種，以了解親緣關係。在生理研究方面，1971年 Trippi 探討了四種同功異構酶與蝴蝶蘭花瓣萎凋的關係，發現受粉後五天的花瓣中只有過氧化酶含量明顯增加，其餘三種同功異構酶則減少。至於其它方面的研究則極少。

DNA 多形性最早被應用於人類個體的確認及親緣關係之鑑定<sup>(16, 35)</sup>，其後，利用限制酶切 DNA 片段多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的特性，除可做為物種辨認之標誌外，更廣泛的應用於動植物基因圖譜的構築，以及性狀遺傳標誌的建立，Tanksley 等<sup>(52)</sup>甚至認為限制酶切 DNA 片段多型性分析技術在未來對作物育種將扮演一個重要角色，近年來 RFLP 應用於研究作物之品種分類、演化及育種的例子非常多，如利用葉綠體 DNA 片段多形性研究品種分類及系統演化的有大麥<sup>(6)</sup>、珍珠粟<sup>(13)</sup>、水稻<sup>(25)</sup>等；利用細胞核 DNA 片段多型性做品種分類者有十字花科<sup>(47)</sup>及大豆<sup>(32)</sup>。在育種上，利用 RFLP 當遺傳標誌可直接在 DNA 層次上幫助育種者追蹤所要轉移的主效基因 (major gene) 以及控制複雜性狀的微效基因 (polygene)，因其不受環境影響且數目眾多，故可達成早期選拔效果，省去回交前之自交世代而縮短育種年限，如玉米隱性基因 *rhm*<sup>(4)</sup> 及蕃茄之 *Tm-2a* 基因<sup>(52)</sup> 之引入而育成抗病品種。但由於 RFLP 在實際應用上常受限於有效探針的取得，而使其對大多數物種尤其是基本遺傳研究較欠缺的園藝作物之應用性降低。近年來由於聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術的快速發展，分子生物學家可利用任意寡核苷酸序列為引子 (primer)，利用 PCR 技術自生物 DNA 模板增生不同片段遺傳物質，並經膠體電泳分離成不同環帶而顯示出 DNA 增幅指紋 (DNA amplification fingerprinting, DAF) 之多形性。Williams 等<sup>(60)</sup> 最早以 DAF 多形性作為遺傳的標誌，由於 primer 片段不需特別資訊，使用上簡單方便，故在短短幾年中廣受重視，其後 Welsh 等人<sup>(58)</sup> 以玉米雜交種為對象鑑別子代親緣關係，陸續地其它如大麥、小麥、水稻等作物亦分別應用 DAF 做為品種的依據，其它如對不同品系鏈球菌的區分，以及 Paran 等人<sup>(69)</sup> 利用萬苣近源系找出與抗露菌病連鎖的 DAF 標誌等，皆顯示其應用方面發展頗快，因此在育種上頗具發展潛力。

## 內 容

### 一、種原收集與保存<sup>(11)</sup>

#### (一) 種原收集

根據後裔表現性狀，自國內外收集適宜切花或盆花，以及具有花期不同、香味、抗病蟲害及易栽培等特性之優良雜交親本，作為雜交育種材料，記錄其園藝特性，並以電腦進行貯存、編序工作及協助擬定雜交組合，目前共收集保存 873 個蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭的優良雜交種 (表一)。另外，在原生種的收集方面，根據 Sweet<sup>(48)</sup> 所記載的九個亞族 (section) 44 個種 (species) 本所也積極地自國內外進行收集，目前已收集保存其中七個亞族 25 個種 193 個品系 (表二)，以及三個種間自然雜交種 (*Phal. intermedia*、*Phal. leucorrhoda*、*Phal. gersenii*)，至於 1985 年所分類出在形態上與 *Phal. modesta* 類似的 *Phal. venosa* 以及朵麗蘭屬

(*Doritis*)之 *Dor. pulcherrima* 也同時收集保存於本所種原庫。

#### (二)種原保存

選擇重要雜交親本以組織培養無性繁殖方式保存親本植株，繁殖方法利用本研究室研發的無性繁殖系統，誘導花梗休眠芽產生不定芽，並以不定芽增殖方式將各植株繁殖30株保存，目前共繁殖保存249個重要雜交親本。並參加本國國家作物種原庫，維護蝴蝶蘭資源，促進花卉生產。

#### (三)系譜資料電腦化

將1854年以後登錄於 Sander's List of Orchid Hybrids 中之蝴蝶蘭雜交種名稱及其親本資料約15,000筆鍵入電腦，利用 dBaseIII Plus 建立資料庫及有效軟體，並採交談式 (interactive) 之方式，將所需之資料表示出來，其分析功能包括：(1)迅速查詢一個品種的親本，(2)列印一個品種所雜交之後代名錄，(3)分析一個品種系譜資料，及(4)列示原生種在系譜中交配情形。應用這些分析資料可迅速選到適宜優良雜交親本擬定雜交組合。

#### (四)種原庫應用情形

至1993年為止所收集的種原已應用了327個品種為母本，及278個品種為父本，約雜交1200多個組合並育成 TS146 等16個優良雜交種，提供台糖公司烏樹林育苗中心生產蝴蝶蘭種苗外銷日本、美國、荷蘭等國。

## 二、育種程序之建立

由於蝴蝶蘭為異交作物，一般使用於經濟栽培的商業品種，經由電腦系譜分析，大多由3~5個原生種經十數代的交配產生，故而在進行育種時較難掌握其重要遺傳性狀，本研究室除利用所收集的二倍體原生種進行遺傳性狀分析外，對於經濟品種則以族群為育種目標，其程序如下：

表一、台糖研究所種原庫收集保存之蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭優良品種數

Table 1. The germplasm of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* collected and conserved by TSRI

Colors	Varieties	Percentage
White	255	29.2
Pink	308	35.3
White with red lip	46	5.3
Red with white lip	2	0.2
Stripe	60	6.9
Spot	158	18.1
Pure yellow	27	3.1
Green with stripe	1	0.1
Orange	7	0.8
White with red spray	7	0.8
Yellow with red spray	2	0.2
Total	873	100.0

(一) 交配

分別依切花、盆花、花期、花色、香味等不同育種目的，藉電腦分析選擇適當親本雜交，並調查各雜交組合種子稔實率。

(二) 育苗

種子利用本研究室研發的播種程序進行無菌播種，養苗則依台糖公司編印的‘蝴蝶蘭栽培手冊’培育實生苗，每一雜交組合栽植100至1,000株左右，以供選拔及族群評估使用。

表二、台糖研究所收集保存之蝴蝶蘭原生種  
Table 2. The wild species of *Phalaenopsis* collected  
by TSRI

Species	Clones
Sect. PHALAENOPSIS	
<i>Phal. amabilis</i>	42
<i>Phal. aphrodite</i>	7
<i>Phal. sanderiana</i>	5
<i>Phal. schilleriana</i>	4
<i>Phal. stuartiana</i>	9
Sect. STAUROGLOTTIS	
<i>Phal. equestris</i>	56
<i>Phal. lindenbergii</i>	2
<i>Phal. celebensis</i>	3
Sect. FUSCATAE	
<i>Phal. viridis</i>	1
Sect. AMBOINENSIS	
<i>Phal. amboinensis</i>	10
<i>Phal. javanica</i>	1
<i>Phal. gigantea</i>	5
<i>Phal. micholitzii</i>	2
Sect. POLYCHILOS	
<i>Phal. cornu-cervi</i>	5
<i>Phal. manni</i>	5
Sect. PARISHIANAE	
<i>Phal. parishii</i>	4
Sect. ZERBRINAE	
<i>Phal. corningiana</i>	1
<i>Phal. fasciata</i>	1
<i>Phal. lueddemanniana</i>	6
<i>Phal. mariae</i>	6
<i>Phal. modesta</i>	3
<i>Phal. pulchra</i>	6
<i>Phal. speciosa</i>	1
<i>Phal. sumatrana</i>	4
<i>Phal. violacea</i>	4

### (三) 族群評估與選拔

除了於各不同苗期觀察評估苗的生長速度，以供選拔易栽培或幼苗期短的組合外，並於開花期就各種不同雜交目的，評估其後代表現情形，表現優良者，則經育種小組命名為 TS 雜交種 (hybrid)，並重覆交配果莢提供本公司育苗中心作企業化生產蘭苗銷售，目前共推薦 35 個組合供生產單位生產商業用種苗 (表三)。在單株選拔方面，就雜交目的從族群裡選拔出聚合最多優良性狀的單株，除了以本研究室研發的無性繁殖技術大量繁殖外，並以其為親本與其他親本進行交配，期能聚合更多優良性狀。台糖公司育成之蝴蝶蘭實生苗雜種以 TS 編號，分生苗品種以 TSC 編號。本公司培育之優良蝴蝶蘭品種，已有 33 個以台糖公司 (Taisuco) 為命名首字在英國皇家園藝協會 (RHS) 登錄 (表四)。

### (四) 蝴蝶蘭優良品種歷年參展成績

本公司培育之蝴蝶蘭優良品種曾多次參與國內外蘭展，分別獲得多項大獎，提昇本公司產品之國際知名度。1990 年第一次參加名古屋國際蘭展 (NIOS '90) 即以 TSC1 及 TSC6 分別獲得大會銅牌獎，1992 年參加台灣國際蝴蝶蘭展 (IPSOT '92) 計有 12 個品種獲得 16 面獎牌，其中 TSC11、TSC12 及 TSC 13 分得美國蘭花協會 (AOS) 之評審讚賞獎 (JC)、栽培獎 (CCM) 及銀牌 (AM)。1993 年曾參加國內外五個蘭展，亦分別獲得多項大獎。日本東京巨蛋蘭展 (JGPIOF '93) 以 TSC20 得到大會銅牌獎；1993 年台灣第七屆國際蘭展 (IOSOT '93) 計有 17 個不同品種獲得 20 面獎牌，其中 TSC8 及 TSC19 得到美國蘭藝協會 (AOS) 銀牌獎，1993 年英國第十四屆世界蘭展 (14WOC '93) 計有 10 個品種獲得 13 面獎牌，其中大白花品種 *Phal. Taisuco Kaaladian* 'TSC27' 獨得大會銀牌獎、分組冠軍獎、優良品種第一獎及大白花分組第一獎。另外，在台北華南銀行蘭展及台南蘭協全國蘭展亦分別有一品種得到優等獎及 2 個品種得到佳獎。

表三、台糖公司培育之優良蝴蝶蘭實生苗雜種

Table 3. *Phalaenopsis* hybrids bred by TSC

Color	No. of crosses	Hybrids for commercial products
White	9	TS62、67、72、154、156、193、281、303、339
Pink	10	TS146、159、179、191、208、244、329、333、245、271
White with red lip	5	TS190、293、331、368、369
White (small type)	3	TS97、256、290
Red (small type)	4	TS233、298、330、349
Spot	2	TS224、TS254
Stripe	2	TS379、380
Total	35	

表四、台糖蝴蝶蘭與朵麗蝶蘭於英國皇家園藝協會登錄名錄

Table 4. *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* hybrids of TSC registered in Sander's List of Orchid Hybrids at RHS

Color	Grex registered	Parents
White	<i>Phal</i> . Taisuco Snow	<i>Phal</i> . (Mount kaala×Waterboushi)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Kochdian	<i>Phal</i> . (Kochs Schneestern×Meridian)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Kaaladian	<i>Phal</i> . (Mount Kaala×Taisuco Kochdian)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Windain	<i>Phal</i> . (Winter Kaala×Taisuco Kochdian)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Moon	<i>Phal</i> . (Mount Kaala×Snow Mist)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Bright	<i>Phal</i> . (Winter Kaala×Grand City)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Clouds	<i>Phal</i> . (Hawaiian Clouds×Taisuco Bright)
White	<i>Phal</i> . Taisuco Doll	<i>Phal</i> . (Taisuco Bright×amabilis)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Beauty	<i>Dtps</i> . (Phal.New Eagle×Ta Bei Chou)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Hatarot	<i>Phal</i> . (Keiko Hatano×Zauberrot)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Apple	<i>Phal</i> . (Pinlong Davis×Lien-Hung Rose)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Candy	<i>Phal</i> . (Morgenrose×equestris)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Perherz	<i>Phal</i> . (Pinlong Perfection×Lippeherz)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Lienhung	<i>Phal</i> . (New Eagle×Lien-Hung Rose)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Eagle	<i>Phal</i> . (Taisuco Lienhung×New Eagle)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Rose	<i>Phal</i> . (Zauberrose×Pinlong Perfection)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Roseherz	<i>Phal</i> . (Zauberrose×Lippeherz)
Pink	<i>Phal</i> . Taisuco Lady	<i>Phal</i> . (Lien-Hung Pink×Taisuco Gaster)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Pink	<i>Dtps</i> . (Phal.Mount Kaala×Taisuco Beauty)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Sweet	<i>Dtps</i> . (Happy Valentine×Taisuco Beauty)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Honey	<i>Dtps</i> . (Phal.Taisuco Hatarot×Taisuco Beauty)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Redwine	<i>Dtps</i> . (Phal.Taisuco Lienhung×Taisuco Beauty)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Red	<i>Dtps</i> . (Phal.Taisuco Hatarot×Happy Valentine)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Precocity	<i>Dtps</i> . (Hama Lip×Phal.Taisuco Hatarot)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Star	<i>Dtps</i> . (Kyoto×Phal.Cassandra)
Pink	<i>Dtps</i> . Taisuco Ruby	<i>Dor</i> . pulcherrima×Phal.Taisuco Gaster
White with red lip	<i>Dtps</i> . Taisuco Truelip	<i>Dtps</i> . (Phal.True Lady×Hama Lip)
White with red lip	<i>Dtps</i> . Taisuco Redlip	<i>Dtps</i> . (True Lady×Dalín Beauty)
White with red spray	<i>Phal</i> . Taisuco Blacea	<i>Phal</i> . (Taisuco Bright×violacea)
White with red spray	<i>Phal</i> . Taisuco Smile	<i>Phal</i> . (Taisuco Bright×equestris)
Orange	<i>Phal</i> . Taisuco Riosan	<i>Phal</i> . (Rio's Golden Ho×Cassandra)
Yellow	<i>Phal</i> . Taisuco Lemon	<i>Phal</i> . (Lemon Pie×Golden Amboin)
Strip	<i>Phal</i> . Taisuco Gaster	<i>Phal</i> . (Gaster×Pinlong Davis)

### 三、遺傳性狀之研究

#### (一)種間雜交

經由電腦系譜分析顯示現有的蝴蝶蘭雜交種，大都經數種原生種多代的交配而來，因此對一些重要性狀很難由現有商業雜交種了解其遺傳機制，緣此，我們利用原生種為材料進行種間雜交，以了解這些性狀的遺傳行為。初步由 *Phal. amabilis* × *Phal. stuartiana* (S79-97)、*Phal. amabilis* × *Phal. schilleriana* (S78-5) 及 *Phal. stuartiana* × *Phal. schilleriana* (S78-43) 三個種間雜交組合的 F<sub>1</sub> 族群性狀調查，顯示花部性狀為介於兩親本間的中間型，而葉片性狀 S78-5 與 S78-43 組合個體株間具有不同程度的葉斑，S79-97 則葉片的性狀與母本相同不具葉斑。

另外，在香味的調查方面，*Phal. amboinensis* 'W2-2' 為具濃郁香味的淡黃底噴點臘質花，自交後代花形及香味性狀與母株相同無分離現象，但與 *Phal. amabilis* (無香味無臘質花) 交配之 F<sub>1</sub> 後代，部份具淡香味而花瓣為乳白色臘質花 (大部份花瓣基部有極細斑點)。

#### (二)種內雜交

在花卉的育種上，花色是一項重要的園藝性狀。對蝴蝶蘭紅花育種而言，近緣的朵麗蘭屬 (*Doritis*) 之紅花貢獻極大，為了解其花色遺傳機制，本研究室於 78 年曾以 *Dor. pulcherrima* 二倍體紅花與白花行種內雜交，81 年 F<sub>1</sub> 第一次開花花色偏於紅色，推測花色可能為完全顯性、上位性或基因互補作用所影響，目前正進行 F<sub>2</sub> 的育苗工作，希望能由 F<sub>2</sub> 後代分離情形幫助了解朵麗蘭紅色花之遺傳機制。

### 四、無菌播種系統的建立<sup>(64)</sup>

由於蘭科種子為不完全胚，不具胚乳或子葉等供應胚發育所需養分的器官，所以必須由外界提供養分幫助有效胚的發芽與發育，利用組織培養的方式行無菌播種為一促使蘭科種子發芽的有效方法。

本研究室利用 15 個雜交組合為材料，分別播種於含不同鹽類成分及馬鈴薯泥之培養基 (表五)，以探討培養基成分對蝴蝶蘭種子發芽發育的影響，發現大部分組合種子在四種培養基

表五、蝴蝶蘭無菌播種之培養基成份

Table 5. The composition of media used for germination and growth of *Phalaenopsis* seeds

	VWpc	KCpc	MSc	MSpc
Inorg. salt <sup>1</sup>	VW	K	1/4MS	1/4MS
Tryptone(g/l)	1	1	1	1
Sucrose(g/l)	20	20	20	20
Potato(g/l)	65	65	-	65
Charcoal(g/l)	1	1	1	1
Agar(g/l)	8.5	8.5	8.5	8.5
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

<sup>1</sup> VW: Vacin and Went(1949). K: Knudson C(1946).  
MS: Murashige and Skoog(1962).



中的發芽情形差異不大，但對於原球體的發育則產生差異（表六），原球體於含馬鈴薯之培養基可維持正常發育生長成幼苗，且不受鹽類成分及播種密度的影響。另外，根據觀察原球體於KCpc培養基經六個月後仍有90%以上之存活率，至於在其它三種培養基幾乎全部死亡，因此利用KCpc培養基可短期貯存原球體，縮短供苗銷售之育苗期限。

表六、培養基對蝴蝶蘭種子發育生長之影響

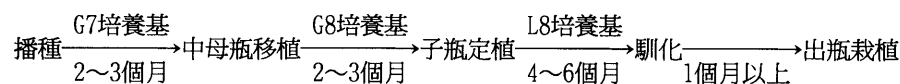
Table 6. Abortion rate (%) of *Phalaenopsis* seeds cultured on different media

Crosses	Color	Fertility (%)	Culture medium			
			VWpc	KCpc	MSc	MSpc
S1991-1	W	60	3	3	6	3
S1991-2	W	87	3	2	4	2
S1991-3	W	90	<1	<1	83	2
S1991-4 <sup>1</sup>	R	95	3	0	27	2
S1991-5	R	89	0	0	1	<1
S1991-6	R	94	<1	<1	13	<1
S1991-7	WR	73	<1	<1	72	<1
S1991-8	WR	27	<1	<1	<1	<1
S1991-9	WR	79	7	9	21	<1
S1991-10	WR	90	<1	<1	<1	<1
S1991-11 <sup>2</sup>	WR	82	2	1	100	1
S1991-12 <sub>1</sub>	SP	83	2	4	58	2
S1991-13	SP	68	<1	<1	50	1
S1991-14	ST	78	15	3	21	1
S1991-15	ST	82	1	0	28	1

<sup>1</sup> Crosses between two wild species.

<sup>2</sup> Self-pollination.

目前已建立無菌實生苗的培育系統，自播種至出瓶約需9~12個月，其程序如下：



## 五、分生繁殖技術之建立

蝴蝶蘭為單莖性蘭科植物，花梗休眠芽為其經常使用的無性繁殖體，本研究室於77年積極的建立蝴蝶蘭的無性繁殖系統，一方面以不定芽的方式保存重要的種原，另一方面利用不定芽的葉片誘導擬原球體(protocorm like body, P.L.B.)以供大量生產高品質分生苗。

### (-)不定芽的誘導與增殖

花梗休眠芽在含 1/2 MS+6 ppmBAP+1 ppmNAA+10% 椰子水培養基的誘導下可發育產生不定芽，並可利用含 1/2 MS+2 ppmBAP+0.2 ppmNAA+10%椰子水的培養基使不定芽繼續增殖，但利用此方式的增殖倍率較低且培養空間大，若要應用於大量生產則較不合經濟效益，由於蝴蝶蘭不定芽的變異性較少，所以本研究室利用此方式進行種原保存。

## (二) 葉片擬原球體的誘導

爲了迅速達到大量無性繁殖的目的，所以擬原球體的誘導爲一重要工作。本研究室發現利用 VW+0.4 mM  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +2 ppm Adenine+2 ppm BAP+0.5 ppm NAA+1.5%蔗糖+2%椰子水液體培養基處理葉片十天後，以 VW+0.4mM  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +10 ppm Adenine+10 ppm BAP+3 ppm NAA+0.5%蔗糖+10%椰子水之固體培養方式，可自不定芽葉片誘導出衍生物（如癒傷組織、不定芽、擬原球體等），再經由 KCpc 培養基可使非擬原球體的衍生物轉化爲擬原球體，利用此擬原球體可大量增殖分生苗體。

## 六、蝴蝶蘭多倍體的誘導

染色體數目的增加，往往伴隨著育種上重要性狀之變化，如花徑、花形、抗病性、品質及顏色等，尤其在園藝作物之果樹及花卉上，多倍體育種提供一條相當有效之途徑。

### (一) 蝴蝶蘭六倍體的誘導

*Phal. Golden Emperor 'Sweet'* 爲一純黃花瓣，且花形優美的品種，但由於其染色體數目爲三倍體，所以不易經由交配獲得後代，提供進一步做品種改良。本所利用人為誘導的方式，先由葉片誘得擬原球體，將擬原球體分別以 100 ppm、150 ppm、200 ppm 及 250 ppm 不同濃度的秋水仙精處理，結果當秋水仙精濃度爲 200 ppm 及 250 ppm 時，擬原球體雖分別有 71.8% 及 47.5% 存活率，但無法分化產生植株，最後死亡，其餘處理之存活芽體，取分化植株之根尖鏡檢體細胞染色體數，發現當秋水仙精濃度爲 100ppm 時有兩個六倍體植株，而對照組及其餘處理則仍爲三倍體植株（表七）。

表七、不同濃度秋水仙精對 *Phal. Golden Emperor 'Sweet'* 擬原球體生長發育及多倍體誘導的情形

Table 7. Induction of hexaploid from *Phal. Golden Emperor 'Sweet'* using colchicine

Colchicine concentration (ppm)	No. of P.L.B. treated	Survival rate (%)	Plant regenerated	
			Triploid	Hexaploid
0(Check)	57	89.5	45	0
100	52	90.4	24	2
150	38	86.8	5	0
200	55	71.8	0	0
250	40	47.5	0	0

### (二) 朵麗蘭多倍體誘導<sup>(3)</sup>

雜交育種的目的是爲了要合併兩品種或數品種之優良特性於一品種，但往往吾人所希望之優良遺傳因子在近緣品種間不易取得，必須自類緣稍遠之品種甚或他屬取得，因而進行遠緣雜交，但此種情形常造成後代不稔現象。在蝴蝶蘭栽培種中大白花親本多爲四倍體，而且常有易罹病、葉片下垂等缺點，育種常利用朵麗蘭進行屬間雜交以改良其缺點，但往往此屬間雜種—朵麗蝶蘭 (*Doritaenopsis*) 具高度不孕性，無法進一步雜交產生後代，若能誘導朵麗蘭產生四倍體，再利用此四倍體植株與四倍體蝴蝶蘭親本雜交，以產生可稔之複二元體 (amphidiploid)，應爲朵麗蝶蘭育種之一有效途徑。

將 *Dor. pulcherrima* 'alba' 自交系行無菌播種後，發育不同大小之原球體，分別以 50 ppm、75 ppm、100 ppm 及 125 ppm 不同濃度之秋水仙精處理，結果發現當原球體大小在 1.0 mm ~ 1.2 mm 者有 42.6% ~ 59.3% 原球體可分化植株，而原球體大小在 0.7 mm ~ 1.0 mm 者植株分化率只有 20.7% ~ 39.2% (表八)。在染色體倍加率方面，經秋水仙精處理後之原球體很明顯的有染色體倍加現象，大、小兩種原球體在已分化植株中分別誘出 46% 及 44% 之四倍體 (表九)。

表八、秋水仙精濃度對朵麗蘭大小不同原球體生長之影響

Table 8. Effect of colchicine concentrations on the growth of different sizes of protocorms of *Doritis pulcherrima*<sup>1</sup>

Colchicine concentration (ppm)	Survival rates of protocorms(%)		Differentiation rates of plants(%)	
	0.7-1.0mm	1.0-1.2mm	0.7-1.0mm	1.0-1.2mm
0(Check)	81.0	90.2	63.0	84.8
50	71.2	81.5	32.4	59.3
75	58.5	81.0	20.7	51.4
100	66.7	58.8	39.2	48.1
125	69.6	54.7	32.2	42.6

<sup>1</sup> Data obtained 300 days after the treatment

表九、秋水仙精濃度對朵麗蘭不同大小原球體染色體倍加頻率之影響

Table 9. Effect of colchicine concentrations on the frequency of chromosome doubling in different sizes of protocorms of *Doritis pulcherrima*

Protocorm size (mm)	Colchicine concentration (ppm)	Chromosome doubling frequency(%)			
		2X	3X	4X	6X
0.7-1.0	0(Check)	100	0	0	0
	50	56	19	19	6
	75	50	17	33	0
	100	47	20	20	13
	125	44	12	44	0
1.0-1.2	0(Check)	100	0	0	0
	50	61	4	31	4
	75	61	23	12	4
	100	60	10	30	0
	125	39	8	46	7

經由染色體倍加技術的建立，除可應用於將不稔的奇倍數體植株轉變為偶倍數體，以改良一些重要性狀外，另可應用於兩個具染色體不親合性品系之雜交 $F_1$ 後代，使產生同質或異質四倍體，再選拔具優良性狀者當做親本，進行雜交以生產後裔均一化之實生苗，此技術已應用於本公司的育種計畫，提供將來經濟生產均一之高品質實生苗。

## 七、蝴蝶蘭原生質體之研究<sup>(12)</sup>

### (一)大量活性原生質體之分離

自蝴蝶蘭花瓣或無菌分生苗嫩葉及根尖，以1/2 E4酵素混合液處理四小時(27°C)後，發現每公克葉片組織可得 $3.5 \times 10^6$ 個原生質體，但根尖及花瓣只能獲得約 $7.5 \times 10^5$ 個原生質體。此外，來自葉片、根尖及花瓣的原生質體大小亦有差異，其平均直徑分別為31.15微米、36.44微米及31.12微米。清洗後之原生質體經Fluorescence diacetate染色及螢光檢定，發現原生質體存活率來自葉片者約70%，來自唇瓣者約62%，而來自翼瓣者只約51%。

### (二)原生質體之電融合

為辨識雜種細胞，我們自白花和紅花兩種花瓣分離原生質體，經0.6M蔗糖液純化及0.5M mannitol清洗後，兩種原生質體以1:1混合在0.5 M mannitol溶液( $10^5$  cells/ml)。利用自行研製電融合儀<sup>(10)</sup>，將原生質體懸浮液放在1mm寬平行銅絲(1 mm dia.)電極室裡，在倒立顯微鏡觀察下，探求原生質體電融合條件。當70V RMS/cm高頻率(800 KHZ)交流電通過原生質體懸浮液時，原生質體即游動，在1分鐘內排列成對，若原生質體密度過高，多數原生質體會排列在一起而成珠串狀；原生質體懸浮液若含有鈣鎂離子，則會延遲原生質體排列，陽離子濃度高於10 mM時，原生質體甚至不易游動排列在一起。排列接觸在一起的原生質體，若用2,500 V/cm，2毫秒短脈衝直流電打擊一次，鄰接的原生質體會迅速融合，並於4分鐘內融合成雜種細胞，蝴蝶蘭原生質體電融合所需直流電壓及脈衝時間比甘蔗原生質體電融合高而長，甘蔗原生質體較適宜條件為1,350 V/cm之0.5毫秒短脈衝直流電，但此條件不易使蝴蝶蘭原生質體發生融合。另外，亦發現不同批分離原生質體，其適宜電融合條件，每批皆稍有差異，必須稍加調整。

### (三)原生質體培養

試管裡分生苗葉片所分離之原生質體，經0.6M蔗糖純化及Kp3培養液清洗後，以每毫升 $6.5 \times 10^5$ 個原生質體濃度滴養或平板培養於1.2%(W/V) agarose-Kp8培養基，放置於27°C暗室培養五天後，原生質體再生細胞壁並呈橢圓形，培養5天後，有些細胞開始進行第一次細胞分裂，培養10天後，少數細胞進入第二次細胞分裂生成四個細胞團，培養21天後，只有極少數細胞繼續分裂生長形成小細胞團。繼續培養細胞團轉褐停止生長，有待進一步探討原因，找出適宜的培養基，培養方法及培養條件使細胞團繼續生長成癒合組織，並進而再生蝴蝶蘭植株。蝴蝶蘭原生質體若滴養於低濃度(0.6%) agarose-Kp8培養基，多數原生質體液泡增大而致細胞擴大，最後細胞破損而亡。在1.2% agarose-Kp8培養10天之原生質體，若將a- garose塊浴養於Kp3液體培養基，則原生質體亦會擴大而致破損死亡。自花瓣或根尖分離之原生質體，依上述方法滴養於1.2% agarose-Kp8培養基，尙未見其分裂生長。

## 八、蝴蝶蘭細胞遺傳之研究

以酵素火燄法製備蝴蝶蘭前中期(premetaphase)體細胞染色體，並進行Giemsa環帶的染色，再經由影像處理系統(Image analyzer)進行核型分析，初步由 *Phal. amabilis* (屬短型染色體)

、*Dor. pulcherrima* (屬長型染色體) 兩品系的核型資料，發現部分同源染色體環帶分佈有差異，此現象推測可能為(i)染色體倒置(inversion)或轉座(translocation)所致，或(ii)蘭科植物易受環境的影響而改變其遺傳質，究竟原因何在?我們將進一步比較相同種內(interspecies)不同clone間之染色體核型，並配合形態分析(根據Sweet,1980所描述)、同功異構酶分析及DNA增幅指紋分析，探討其原因。

#### 九、蝴蝶蘭同功異構酶輿圖之分析<sup>(23)</sup>

取下生長旺盛植株之不同部位如：葉片、根部及花瓣等各約2公克，以1/3萃取液(1 M sucrose, 56 mM 2-mercaptoethanol, 0.01 mM antipain, 0.01 mM leupeptin溶於0.2 M tris-HCl, pH=8.5中)萃取酵素，在2°C下以15,000 rpm離心20分鐘，取上清液，以Bromophenol blue當追蹤劑，採直立式平板操作儀(HOEFER, SE600)，以7.5%之聚丙烯醯胺不連續性膠體進行電泳，電泳槽緩衝液參照Shield等人1983年之配方，在4°C之恆溫水浴中以200伏特定電壓進行泳動3小時，各同功異構酶之活性染色法則參照Vallejos<sup>(53)</sup>所列之配方，本實驗共嘗試Peroxidase (PEX)，Esterase (EST)，Superoxide dismutase (SOD)，Malate dehydrogenase (MDH)，Acid phosphatase (ACP)，Aspartate aminotransferase (AAT)，Shikimic dehydrogenase (SDH)等七種酵素，結果只有SOD、MDH、SDH及AAT有較清楚的環帶可供分析，進一步比較此四種酵素在(i)不同器官(ii)不同發育期(iii)不同葉片及(iv)不同品種的表現，結果顯示AAT較易受材料及環境影響，而SDH則較不易受環境影響。進一步我們利用相同發育期植株之相同部位葉片為材料進行下列研究：

##### (一)品種的鑑定

重要經濟品系在進行大量繁殖或移植時經常有混雜的情形發生，品種的正確性往往為育種者所重視，緣此我們利用此四種酵素進行品種的鑑定，結果顯示SOD、SDH及AAT都可為很好的鑑定酵素，尤其AAT及SDH。

##### (二)台灣原生種蝴蝶蘭 *Phal. amabilis* var. *formosa* 的分類地位

*Phal. amabilis* var. *formosa* 為兩種台灣原產蝴蝶蘭之一，原產於恆春半島中央東西兩側的山脈(大武種)，以及台東之綠島、蘭嶼之離島(蘭嶼種)，其具有易栽培、多花等特性，故頗受世界育種者及養蘭者的賞識。但在分類上它究竟屬於 *Phal. amabilis* 或 *Phal. aphrodite* 則至目前為止仍混淆不清，根據 Shimadzu<sup>(44)</sup> 的報告認為台灣原生種蝴蝶蘭為 *Phal. amabilis* 的一變種，所以他將之稱為 *Phal. amabilis* var. *formosa*；但 Sweet<sup>(48)</sup> 卻認為台灣應為 *Phal. aphrodite* 的分佈區，林<sup>(12)</sup> 曾比較本省所產蝴蝶蘭與上述兩種之差異，發現其形態介於兩種之間，所以其分類地位有待進一步探討。除了形態上的觀察外，我們配合酵素的分析希望能找出幫助了解本省所產蝴蝶蘭分類地位的證據，初步結果顯示無論大武種或蘭嶼種在所使用的四種酵素之環帶中均與收集自爪哇之 *Phal. amabilis* var. *grandiflora* 不同，是否應屬於 *Phal. aphrodite* 或兩者的異質結合體(Heterozygous)，此點有待進一步探討。

##### (三)原生種間的比較

初步應用此四種酵素進行品種間的比較，由各品種的酵素輿圖顯示，品種間有差異，在亞族(section)間相同亞族內不同品種有較類似的環帶分佈，但 section Amboinenses 之 *Phal. amboinensis* 的 SOD 環帶則與 section Polychilos 類似，但仍可由 AAT 及 SDH 來區分。故而配合兩種以上的酵素可清楚的區分蝴蝶蘭品種，目前正進一步了解各酵素基因的特性以及其在各品種的表現。

## 十、分子生物技術在蝴蝶蘭分類及育種上的應用

### (一) DNA增幅指紋(DNA amplification fingerprinting, DAF)分析技術之建立

#### 1. 蝴蝶蘭DNA之抽取與純化

利用修正過的Gawel等<sup>[16]</sup>方法抽取蝴蝶蘭DNA，在0.3 g蝴蝶蘭葉片中約可抽取到50~100  $\mu$ g DNA，若以限制酶處理及電泳分析，可看出用此方式抽取之DNA相當完整一致(23.6 kb以上)，且可有效地被限制酶切割，而所需時間只要4~6小時，可減少DAF分析的時間及步驟，加速蝴蝶蘭DAF分析的時效。

#### 2. 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)條件之設定

PCR反應成功與否的主要關鍵在於反應條件的設定，不同的PCR條件，其所產生DNA條帶數、長度、位置皆有所不同，一般而言，反應溶液的成份濃度變化不大，而影響最直接的條件乃是反應溫度之設定，以所購置之10-mer random primer為例，其GC所佔比率雖皆為60%，就蝴蝶蘭原生種進行DAF分析，結果在annealing溫度為40°C時，某些primer有明顯圖譜產生，某些則無圖譜產生，當溫度降至38°C時，則皆有圖譜產生，且條帶數亦有增加趨勢，顯示annealing溫度影響圖譜表現頗大，至於循環數則在45~55循環時即有明顯圖譜出現。

#### 3. agarose電泳分析(EtBr染色)及polyacrylamide電泳分析(銀染色)

對DAF分析而言，利用agarose電泳分析本應足夠簡單分析之使用，但對於DNA量較少時，或DNA條帶較繁複且長度大小接近，則其解析度極易受影響，此項因素對於親緣關係較接近之蝴蝶蘭植株(如兄弟株)的分析，將增加其困難度，故而本研究室在初期即進行polyacrylamide電泳分析—銀染色技術之建立，以做為往後個體植株微細差異鑑定依據之用，以增加DAF圖譜之解析度。

首先嘗試以Bassam方法<sup>[7]</sup>進行銀染色，以經PCR反應後之不同量樣品1、2、4、6、8、10  $\mu$ l，經電泳後再以Bassam方法進行銀染色分析，結果顯示雖然每一個樣品皆有條帶產生，但其中以1~2  $\mu$ l的背景較低，解析度較佳，可以更清楚的觀察到條帶的產生，而經由agarose電泳分析—EtBr染色，樣品的使用量約須10  $\mu$ l。另外，在比較polyacrylamide電泳—銀染色及agarose電泳—EtBr染色產生之條帶數時，發現polyacrylamide電泳—銀染色可以比agarose電泳—EtBr染色分辨更多條帶，以S77-2雜交組合蘭株為例，當以OPJ-20為primer時，其圖譜經agarose—EtBr染色約可分辨出6條，且條帶模糊不清，但當利用polyacrylamide電泳—銀染色則可清楚分辨出23~29條，此現象表示在分析條帶多且主要條帶不是很明顯的圖譜，銀染色法應可發揮其高解析度的偵測功能。

### (二) DAF在品種鑑定及花色性狀標誌之應用

#### 1. 原生種的區分

經由收集來的蝴蝶蘭原生種，本研究室除根據Sweet<sup>[48]</sup>所記載的蝴蝶蘭形態特徵，進行分類鑑定外，並輔以染色體核型分析及同工酶圖譜進行類緣關係的探討，進一步由於DAF分析技術的建立，更幫助原生種類緣關係在DNA分子層次的瞭解。

首先以七種原生種的DNA為模版(template)，分別以20 mer及10mer的引子(primer)進行測試，以做為各原生種的區分標誌，結果顯示不論以20 mer或10 mer核苷酸為引子之下，雖其annealing溫度有所不同(10 mer 36~38°C，20 mer 40~42°C)，皆可找出區分原生種的primer，例如在以OPF-1 (10-mer Operon kit F)及S-4 (20-mer)做為引子的DAF分析中

生種的 primer，例如在以 OPF-1 (10-mer Operon kit F)及 S-4 (20-mer)做爲引子的 DAF 分析中，顯示此七種原生種的遺傳質差異相當大，故而其形成之圖譜差異亦大，表示可利用此方式有效的分辨各原生種。

## 2. 同種不同品系分辨

與種間差異性比較，同種內之不同品系其遺傳質差異較小，因而更難選擇適當的引子來分辨其間之差異性，本研究室初期曾分析比較存在於姬蝴蝶蘭 (*Phal. equestris*) 八種不同品系間的差異性，結果顯示在以 OPF-5 及 OPF-6 爲引子之 DAF 分析下，此八種姬蝴蝶蘭不同品系的主要條帶類似性較高，但亦有部份差異性存在，此差異性應可提供做爲品系間親疏相關性探討的之依據。

## 3. 花色性狀標誌之篩選及子代親本之關係

由於蝴蝶蘭的花色爲一明顯且重要的園藝性狀，所以初期在育種的應用上即以花色爲目標，進行適當引子的篩選。初步利用多倍體的生產用白花與紅花雜交組合 (S77-2) 爲試驗材料，其子代可產生不同程度粉紅及純白色的花瓣，當以 10-mer 核酸序列 (OPF-1、OPJ-20) 及 20-mer (S-1) 爲引子，進行 DAF 分析，由圖譜中可找出能區分此兩類不同花色之 DNA 片段，例如 OPJ-20 的 200bp、OPF-1 的 1,000 bp 及 S-1 的 700 bp 等條帶，由於其 F1 後代間除花色外，其餘遺傳質應類似，故依花色分類篩選圖譜有差異者，其標誌差異可能與紅色花色基因有關，但由於 S77-2 爲一栽培品種，其遺傳背景複雜且花色分散，故以此結果尚無法推斷這些條帶位置的 DNA 是否爲紅色花色之決定基因或爲與之連鎖的標誌，但不同花色品系可由 DAF 圖譜上之差異性而加以分辨，顯示花色性狀遺傳標誌應可依此模式進行探討。

另外，同時利用 DAF 圖譜分析子代與親本之關係，由 OPF-1 引子所得的圖譜可明顯看出，父本在 550、270 bp 位置有條帶產生，母本則在 1,000、900、550、450 及 270 bp 位置有條帶產生，雖然子代的各植株條帶數不盡相同，但仍可觀察到其主要條帶皆介於兩親本之間，顯示利用 DAF 分析應可追蹤其子代與親本之關係。經由電腦系譜分析發現父本的系譜具有 *Phal. amabilis* 多代血緣，母本雖爲一粉紅花但同樣也具 *Phal. amabilis* 血緣，在比對相同條件下原生種的圖譜，*Phal. amabilis* 最明顯的兩條帶爲 550 及 270 bp，此與父本的唯一兩條帶相同，而母本也同時具有此兩條帶，由此可看出利用此方法可初步了解雜交品系之原生種來源及可能之親本。

## 結 論

育種爲一項長期性的工作，而蝴蝶蘭的育種在缺乏基礎研究的背景下，使得其成效較爲緩慢，本研究室除應用傳統雜交育種技術培育市場急需品種外，亦發展生物技術輔助傳統雜交育種，以提昇育種效率加速育成新奇品種，以領導市場，爲台灣的花卉產業盡一份力量。

## 誌 謝

本研究承蒙國科會及農委會部份經費補助，謹此致由衷之謝意。

## 參考文獻

1. 陳尤佳 吳信淦 1982 稻屬六物種核型的比較 中央研究院植物學彙刊 23 : 163~183。
2. 林讚標 1977 台灣蘭科植物 南天書局出版 p.280~285。
3. 謝瑞旻 陳文輝 吳俊謙 蔡媚婷 邱明森 1991 朵麗蘭多倍體之誘導 台灣糖業研究所研究彙報 132 : p13~118。
4. 齊延三 1990 應用RFLP在玉米育種上的實例 農學RFLP技術研習會(國科會),台北。
5. Arends, K. C. 1970. Cytological observation genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 41 : 88-110.
6. Baggett, J. R. and D. Kean. 1986. The inheritance of days to flowering in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Euphytica* 35 : 97-102.
7. Bassam, B.J., G.C. Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196 : 80-83.
8. Baum, B.R., and L.G. Bailey. 1989. Species relationships in the *Hordeu murinum* aggregate viewed from chloroplast DNA restriction fragment patterns. *Theor. Appl. Genet.* 78 : 311-317.
9. Brochers, E.A. 1971. Yield, uniformity of heading and maturity of broccoli inbreds, hybrids and varieties. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 93 : 352-355.
10. Chen, W.H., S.J. Tsay and W.S. Lin. 1989. Studies on the electrofusion conditions of sugarcane protoplasts. *Proc. Intern. Sugar Cane Technol.* 20 : 618-623.
11. Chen, W.H., R.M. Hsieh, W.T. Tsai and C.C. Wu. 1990. Application of biotechnology in the improvement of *Phalaenopsis*. *Proc. of Nagoya Intern. Orchid Show '90*. pp.90-94.
12. Chen, W.H., W.T. Tsai, C.C. Wu and R.M. Hsieh. 1991. Electrofusion and cell division of *Phalaenopsis* protoplasts. *Taiwan Sugar.* 38(2) : 14-18.
13. Clegg, M. T., JR Y. Rawson and K. Thomas. 1984. Chloroplast DNA variation in pearl millet and related species. *Genetics.* 106 : 449-461.
14. Cocking, E.C. and M.R. Davey. 1987. Gene transfer in cereals. *Science* 236(4806) : 1259-1262.
15. Feramnez, J. A. and N. Jouce. 1987. Chromosomal location of structural genes controlling isozymes in *Hordeum Chilense* 1. 6-phosphogluconate dehydrogenase and malate dehydrogenase. 73 : 433-439.
16. Gawel, N.J. and R.L. Jarret. 1991. Chloroplast DNA restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in *Musa* species. *Theor. Appl. Genet.* 81 : 783-786.
17. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Exegetics Ltd., Hants., England.
18. Gleba, Y. Y. and K.M. Sytnik. 1984. Protoplast fusion: Genetic Engineering in High Plants. Springer-Verlag, Berlin.
19. Gordon, J.C. 1971. Changes in total nitrogen, soluble protein and peroxidases in the expanding leaf zone of eastern cotton wood. *Plant Physiol.* 47 : 595-599.
20. Griesbach, R.J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 1 : 103-107.
21. Griesbach, R.J. 1985. Polyploid in *Phalaenopsis* orchid improvement. *Jour. of Hered.* 76 : 74-75.



22. Homma Y. and T. Asahira. 1983. Adventitious PLB formation on in vitro cultured internode section excised from upper parts of *Phalaenopsis* flower-stalks. Abstr. Japan Soc.Hort.Sci. Autumn Meet. p.368– 369.
23. Hsieh, R. M., W. H. Chen, W. T. Tsai, M. S. Chou and C. C. Wu. 1992. Electrophoretic pattern of isozymes in *Phalaenopsis* spp. p.319 – 329. In: Hung, S.C., S.C. Hsieh and D.J. Liu (eds.). Proceeding of SABRAO International Symposium on Impact of Biological Research on Agricultural Productivity. Taichung, Taiwan.
24. Intuwong, O. and Y. Sagawa. 1974. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. Am. Orchid Soc. Bull. 43 : 893– 895.
25. Ishii, T. and K. Tsunewaki. 1988. Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA from A-genome diploid species of rice. Japan J. Genet. 63 : 523– 536.
26. Jarret R.L. and R.E. Litz. 1986. Isozymes as genetic markers in Bananas and plantains. Euphytica 35 : 539– 549.
27. Kamemoto, H., R. Sagarik, and S. Dientrakul. 1963. Karyotypes of orchids in Hawaii. Univ. Hawaii Agri. Exp. Sta. Bull. 127 : 1– 28.
28. Kamemoto, H. 1985. Seed-propagated amphidiploid dendrobium cultivars. Hort Science 20 : 1– 2, 63.
29. Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 15 : 214– 217.
30. Lin, C.C. 1986. In-vitro culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Lindleyana 1 : 158– 163.
31. Linde-Laursen I. and S. Frederiksen. 1989. Giemsa C-banded Karyotypes of three subspecies of *Taeniatherum caput-medusae* and of two intergeneric hybrids with *Psathyrostachys* spp.(*Poaceae*). Hereditas 110 : 283– 288.
32. Menancio, D.I., A. G. Hepburn and T. Hymowitz. 1990. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of wild perennial relatives of soybean. Theor. Appl. Genet. 79 : 235– 240.
33. Morden, C. W., J. F. Doebley and K. F. Schertz. 1988. Genetic control and subcellular localization of Aconitase isozymes in Sorghum. J. Heredity 79 : 294– 299.
34. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473– 497.
35. Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell and R. Wolf. 1986. Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for human gene mapping. Science 235 : 1616– 1622.
36. Natarajan, A. T. and N. P. Sarma. 1974. Chromosome banding patterns and the origin of the B genome in wheat. Genet. Res. 24 : 103– 108.
37. Noda, K. and K.J. Kasha. 1978. A modified Giemsa C-banding technique for *Hordeum* species. Stain. Tech. 53 : 155– 162.
38. Orton, T. J. 1983. Application of isozymes technology in breeding crossed pollination crops. p.363– 376. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding Part A. Elsevier, Amsterdam.

39. Paran, I., R.Kesseli and R. Michelmore. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplification polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34 : 1021 – 1027.
40. Sajise, J.U., H.L. Valmayor and Y. Sagawa. 1990. Some major problems in isolation and culture of orchid protoplasts. p.84– 89. *Proc. of Nagoya Intern. Orchid Show '90*.
41. Santiago, F.S. and T.L. Rosario. 1983. Peroxidase activity and prote banding pattern in the orchid *Phalaenopsis equestris* Kalikasan, Philip. *J. Biol.* 12(1/2) : 51 – 60.
42. Secor, G.A. and J.F. Shepard. 1981. Variability of protoplast-derived potato clones. *Crop Sci.* 21 : 102 – 105.
43. Seevers, P. M., J. M. Doly and F. F. Catedral. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physioll.* 48 : 353 – 360.
44. Shimadzu. 1921. *Orchid Rev.* 29 : 68.
45. Shindo, K. 1963. Karyotype analysis of some species of *Phalaenopsis*. *Cytologia* 28 : 390 – 398.
46. Sinoto, Y. 1964. A Karyotype of *Oncidium manum* Lindl. *Chromosome. Inf. Serv.* 5 : 15 – 16.
47. Song, K., T.C. Osborn and P.H. Williams. 1990. *Brassica* taxonomy bases on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *Campestris*). *Theor. Appl. Genet.* 79 : 497 – 506.
48. Sweet, H.R. 1980. The genus *Phalaenopsis*. By Day Printing corp. Pomon California. 91776, U.S.A.
49. Tanaka, M., Y. Senda and A. Hasegawa. 1976. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 45 : 1022 – 1024.
50. Tanaka, M. and Y. Sakanish. 1977. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf issue culture. *Am. Orchid Soc. Bull.* 46 : 733 – 737.
51. Tanaka, M. 1990. Micropropagation of *Phalaenopsis* through leafsegment culture. p.113 – 118. *Proceed. of the Nagaya Inter. Orchid Sym.*
52. Tanksely, S. D. and C. M. Rick. 1980. Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57 : 161 – 170.
53. Trippi, V. S. 1971. Changes in the Pattern of some isoenzymes of the corolla after pollination in *Phalaenopsis amabilis* Blume. *Plant Physio* 48 : 506 – 508.
54. Tsai, W. T., W. H. Chen, R. M. Hsieh, M. S. Chou and C. C. Wu. 1992. An important factor affecting the germination and growth of *Phalaenopsis* seeds. p.219 – 229. In: Hung, S.C., S.C. Hsieh and D.J. Liu (eds.). *Proceeding of SABRAO International Symposium on Impact of Biological Research on Agricultural Productivity*. Taichung, Taiwan.
55. Wang, H. 1989. Rapid clonal propagation of *Phalaenopsis* by tissue culture. *Acta Hort. Sincica* 16 : 73 – 77.
56. Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110 : 605 – 613.
57. Vallejos, C.E. 1983. Enzyme activity staining. p.469 – 516. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. Elsevier, Amsterdam.
58. Welsh, J., R.J. Honeycutt, M. McClell and B.W.S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82 : 473 – 476.

- 59 Weng, J.H. and C.Y. Chen. 1987. Carbondioxide exchange rates and isozyme patterns of some indica and japonica rice varieties. p.143 – 150. Proceedin of Crop Exploration and Utilization of Genetic Resources.
- 60 William, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livake, J. A. Rafalski and S. V. Tingey 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18 : 6531 – 6535.

# Breeding of *Phalaenopsis* in Taiwan Sugar Corporation

W.H. Chen, R.M. Hsieh, W.T. Tsai, C.C. Wu, M.S. Chyou and Y.M. Fu

Dept. of Horti., Taiwan Sugar Res. Inst., Tainan, Taiwan, R.O.C.

## ABSTRACT

*Phalaenopsis* is one of the most valued floriculture in the world because of its graceful colors and attractive appearance. Taiwan Sugar Corporation (TSC) has developed an enterprise system for the management of *Phalaenopsis* business since 1988. The Department of Horticulture at Taiwan Sugar Research Institute (TSRI) is responsible for the R&D works, such as breeding of superior varieties from the good parents collected from domestic and overseas nurseries. TSRI has collected 29 wild species (ca. 193 clones) and 873 superior varieties for the improvement of *Phalaenopsis* and production of commercial seedlings. Cytogenetic studies and computer analysis of the pedigree of parental varieties have been carried out to understand sexual incompatibility and to design the breeding program. Micropropagation of *Phalaenopsis* via adventitious buds and/or protocorm-like-bodies was developed for massproduction of superior varieties selected. Molecular techniques such as isozyme patterns and DNA amplification fingerprinting (DAF) have been used to protect the patent right of our new varieties in TSC. DAF technique is also being undertaken to screen genetic markers to increase breeding efficiency. The technique of chromosome doubling was established to create hexaploids from triploid plant of *Phal*. Golden Emperor 'Sweet' and autotetraploid from *Dor. pulcherrima* which was useful to breed superior hybrids with high homogeneity. Studies on isolation, Fusion and culture of *Phalaenopsis* protoplasts were also undertaken to transfer other useful genome into *Phalaenopsis*.

Breeders made 2-3 hundred crosses every year after horticultural analysis of parents via computer data base. One hundred to one thousand seedlings were raised from each cross using aseptic culture for the evaluation of population. Up to date, 35 hybrids e.g. TS146 etc. have been selected and released to produce one million commercial seedlings for overseas and domestic markets. Thirty-three of these hybrids were registered in Sander's List of Orchid Hybrids at Royal Horticultural Society using "Taisuco" (Taiwan Sugar Corporation) as an initial name. On the other hand, superior varieties were also selected from different crosses

of plants for micropropagation of mericlones and exhibition in several international orchid show. The achievement of *Phalaenopsis* breeding in TSC is confirmed by numerous awards gained in the following show: *Phal.* Taisnco Bright'TSC1'BM/JOGA and *Phal. amabilis* 'TSC6' BM/JOGA in Nagoya Intern. Orchid Show, 1990; *Phal.* Mahalo 'TSC11'JC/AOS, *Phal.* Atien Nasu 'TSC12'CCM/AOS and *Phal.* Taisuco Windian 'TSC13'AM/AOS in Intern. *Phal.* Show of Taiwan, 1992; *Phal.* Stone Pinto 'TSC19'AM/AOS in Intern. Orchid Show of Taiwan, 1993; *Phal.* Stone Pinto 'TSC20'BM/JGPIOF in Japan Grand Prix Intern. Orchid Festival, 1993; *Phal.* Taisuco Kaaladian 'TSC27' won AM, Trophy, 1st place in excellent white hybrid in 14th World Orchid Conference, 1993.

**Key words:** *Phalaenopsis* , breeding, tissue culture, cytogenetic isozyme, cell fusion, DNA amplification fingerprinting.