

耐熱金線連之篩選與菌根利用 (III)

The screening of heat-resistant *Anoectochilus formosanus* lines and the use of orchid mycorrhiza (III)

計畫編號：NSC 89-2317-B-002-009

張喜寧 周玲勤 李國基

Doris C.N.Chang Ling-Chin Chang Guo-Chi Lee

摘要

台灣金線連不同品系在 35/30°C 及 30/25°C 下，皆以台東種對溫度的耐熱性較佳，溫度越高對病蟲害的抵抗能力越弱。蘭菌族群分析除相同菌種彼此間可相互融合外，R.05 與 R.04、R.06 及 R.09 間亦可相互融合。本研究室所分離之蘭菌與標準菌株進行融合，大部分菌株皆屬於 AG-6 融合群。以 RAPD 進行遺傳相似度分析，R.04、R.06 及 R.07 屬於 AG-6 HGI 而 R.05 與 R.09 屬於 AG-6 GV，此試驗結果與標準菌株融合比對相似。封閉式栽培時施用不同速效性肥料，結果以施用花寶三號對植株有較佳的生長表現，調整強生溶液中不同比例的硝酸態氮或氨態氮，以全量的生長勢較佳。

前言

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為蘭科多年生草本植物，為台灣名聞極為珍貴之藥材，在民間有「藥王」之稱。台灣金線連味甘性涼、清涼退火、祛傷解鬱、開中氣滋養強壯之功。主治五臟六腑虛而有熱，退心火、肝火、治肝病等 (何等，1987；張，1988；陳，1996)。目前台灣金線連的栽培管理，主要利用組織培養進行大量繁殖 (許，1994；蕭等，1996)，之後移植出瓶後種植於不同的栽培介質，但在高溫下易有病蟲害危害如莖腐病、基腐病及紅蜘蛛的感染等 (莊，1990；顏等，1996)，使的農民在栽培過程中，常因為病蟲

害的危害而血本無歸，因此希望經由耐熱品系的篩選，尋找出耐熱且較耐病蟲害品系的供民間栽培，期望以此解決目前產業上栽培所面臨的問題，達到周年栽培的效果。

由本研究室所發展出的金線連新式栽培法，可以使金線連提高移植存活率，達到省時、省工、減少農藥的施用及病蟲危害等功用，但對於封閉式栽培的最佳肥料施用量並無相關報導，故希望經由本試驗的進行，對於肥料的施用量做更進一步的確認。

本研究室取蘭科植物根部，進行分離、純化、鑑定及致病性分析等試驗，並將無致病性的菌種進行接種試驗（陳，1995），結果台灣金線連接種蘭菌具有明顯促進作用（蔡，1997），而且有效菌種都屬絲核菌屬（*Rhizoctonia* spp.），但尚無法誘導有性世代的產生，故希望利用各國研究絲核菌學者所接受，利用標準菌株進行菌絲融合的方法，以此辨別有效的蘭菌屬於何種菌絲融合群，進行蘭菌族群分析。另外隨著分子生物技術的進步，已可以 DNA 分子間雜交程度，充分表現瞭解生物種內的遺傳相關性，而絲核菌屬的鑑定，則利用 DNA / DNA 雜交值大小做出各融合群 DNA 相關性樹狀圖（Vilgalys, 1988）。隨著隨機擴增多型性 DNA（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）技術的出現，成為目前在絲核菌屬鑑定方法中，方法簡單、成本低、敏感度高等功能。故希望以此方法將本研究室所分離之菌種進行 RAPD 分析，建立蘭菌分類及鑑定之分子標誌。

材料與方法

一、金線連植株溫度篩選與耐熱性馴化

選用十種不同品系(L1、L3、P、T、C2-C7)，大小約 6 公分的金線連組織培養植株，以 TKS2 為栽培介質種植於三吋半白色軟盆，並裝入市售透明 OPP 封口塑膠袋 (46 × 34.5 cm) 內，置於 35/30、30/25°C(日/夜溫) 之生長箱中培養，每一處理 20 重複，觀察金線連植株的生長情形。

二、蘭菌族群分析

本試驗供試之菌種為研究室由各地所收集、分離並純化之菌種，純化後將菌種置於 PDA 培養基於室溫下培養，另將菌種移入 PDA 培養基試管中，於 5°C

黑暗中進行菌種保存。菌絲融合群鑑定修改自陳(1985)所述，將所分離之蘭菌菌株及供測試的標準菌株(多核絲核菌標準菌株，由農試所謝廷芳博士提供)個別培養於 PDA 上 2~3 天後，取菌落前緣菌絲塊，置於水洋菜(water agar, 18g/l)培養基中或玻片上，在 25°C 黑暗下以對峙培養 24~48 小時，兩菌落開始重疊時，以光學顯微鏡觀察兩菌絲交接處是否有菌絲融合現象。

三、利用 RAPD 建立蘭菌分類、鑑定之分子標誌

基因組 DNA 抽取方法修改自 Lee 及 Taylor(1990)，由三角瓶中取出菌絲塊，並以去離子水清洗瀝乾，置於研鉢以液態氮研磨，將菌絲粉末移入離心管中加入 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol)，在 65°C 反應一小時，加入 chloroform/phenol 然後搖動混合，在室溫下以 10,000×g 離心 15 分鐘，取上層液加入 3M NaOAc 及 isopropanol，搖盪混合，以玻璃鈎將 DNA 勾出，分別於 70% 及 95% 的酒精中清洗，晾乾後以 TE 溶解存於 4°C 中備用。DNA 濃度及純度以 UV spectrophotometer (A₂₆₀) 測定。

RAPD 之操作分析技術參考 Rafalaski 等(1993)之方法。每一個反應中放入一個引子(primer)，引子的長度為 10 個核苷酸(10 mers)。PCR 反應總體積為 25 μ l，其中包括 1 倍緩衝液、各 0.1mM dNTP、0.2 μ M primer(Operon)、0.5mM MgCl₂、0.2 units Taq polymerase 及 20 ng 模版 DNA。以 Perkin-Elmer Cetus DNA-Thermocycler 進行反應，反應條件為 94°C 下 30 秒，30 秒的 37°C 及 1 分鐘的 72°C 為一反應循環，計進行 35 個循環反應。反應產物以 2% 的 TAE agarose 膠體電泳分析。

數據分析依 2% agarose 膠體電泳出現的 DNA 片段計為「1」，未出現的計為「0」進行統計，並以 NTSYS-PC 軟體進行相似度的推算，及以其中的 UPGMA 程序構建遺傳相關樹狀圖譜。

四、金線連封閉式栽培施肥法之試驗

取植株大小約 8 公分的金線連，進行施用不同濃度磷肥與氮肥試驗，以調整強生溶液 (Johnson solution) 內不同成分為肥料進行相關試驗，例如施用將強生溶液中使用全量硝酸態氮、胺態氮、1/2NO₃⁻、1/4NO₃⁻、1/2 NH₄⁺、1/4 NH₄⁺等進

行試驗。

另以移植出瓶大小約 5-6 公分的金線連植株，種植於 TKS2 介質中，加入不同濃度或廠牌的速效性肥料，例如栽培介質每升含三克的花寶一號、花寶二號、花寶三號或 Peters (20-20-20) 等，並將種植好得植株套入 OPP 塑膠袋中，以此探討金線連封閉式栽培法，施用市售速效性肥料對植株生長的影响，每一處理 30 重複，觀察植株的生長情形。

結果與討論

一、金線連植株溫度篩選與耐熱性馴化

選用十種不同金線連品系進行耐熱試驗，在 35/30°C 下植株仍舊無法抵抗高溫，容易受病蟲害危害最後植株就會死亡（表一），但是每一品種的耐熱能力會有所差別，例如於 35/30°C 栽培 40 天時 T 及 L1 品系各有 87% 及 85% 的存活率，但種植 50 天後其存活率分別為 75% 及 52%，到 70 天只剩 50% 及 0%，種植三個月所有植株全部無法存活，由此可知金線連對高溫的耐熱性會因品種不同而有所差異，如能進行相關耐熱馴化，將可使金線連在平地度過炎熱的夏天達到週年栽培。

植株於日/夜溫 30/25°C 下的存活率就比 35/30°C 為高，且所有參試品種中仍以台東種對溫度的耐熱性較高。此外金線連在栽培過程中容易受紅蜘蛛、莖腐病及基腐病危害等，移植出瓶後栽培管理不易，目前僅能以塑膠袋栽培法、噴灑農藥等方式進行防治，無法有效解決病蟲害的問題。而且在 35°C 的持續高溫下一段時間之後，在此高溫下袋內的微氣候非常適合病原菌的發病，植株如果可以耐過這一段好發病的時期，通常就可順利存活，但溫度持續高於 30°C 的情形下，植株栽培仍有待更深入瞭解其生理變化，以期克服持續高溫植株不易存活的問題。

二、蘭菌族群分析

蘭菌以水洋菜培養時，菌絲數目與分枝數明顯比 PDA 少，如此便有利於顯微鏡下進行辨識對峙生長的結果，判別參試菌株是否為同一融合群，經對峙生長後的結果如表二。其中除相同蘭菌外，尚有 R.03 與 R.08，R.04 與 R.05，R.05

與 R.06，R.04 與 R.09，R.05 與 R.09 間可相互融合。

將蘭菌與 12 個 *R. solani* 融合群(AG-1~AG-BI)，共 19 株標準測試菌株(test isolate)(含融合群的次融合群菌株)進行菌絲融合試驗分析，結果顯示 R.04、R.05、R.06、R.07 及 R.09 與 AG-6 有融合的現象，因此這 5 株菌應屬這一融合群；另外 R.01 與 R.02 未發現與標準菌株融合，推測因其屬雙核絲核菌所致。

故將蘭菌 R.04、R.05、R.06、R.07 與 R.09 與 AG-6 HGI 及 AG-6 GV 兩群之標準菌株進行融合群之頻度分析，結果顯示 R.04、R.06 及 R.07 三菌株與 AG-6 HGI 群的融合頻度大於與 AG-6 GV(表三)；另一方面，R.05 及 R.09 與 AG-6 GV 的菌絲融合頻度較大，由此可結果可知，R.04、R.06 及 R.07 屬 AG-6 HGI，R.05 及 R.09 則屬 AG-6 GV (表四)。

三、利用 RAPD 建立蘭菌分類、鑑定之分子標誌

本試驗共篩選 20 個 RAPD 引子，共獲得 9 個可供參試樣品分析之引子(表五)，篩選率達為 45%。篩選出的 5 個隨機引子，其 GC 之含量為 60%或 70%，在理論上引子中 GC 含量較高，有助於引子的鍵合。本試驗之引子篩選均經重複試驗，得到再現性穩定性高的條帶進行分析。

蘭菌 RAPDs 分子標識之指紋分析，將篩選出的 9 個引子分析 9 種由台灣地生蘭分離之蘭菌，依 RAPDs 分析所得的條帶(圖 1,2)，轉換之矩陣出現條帶以「1」代表，反之以「0」代表，以此可用來分析供參試金線連品系進行指紋分析。將 9 個引子總條帶數合併計算，共計有 177 個條帶，平均每個引子可獲得 19.7 個條帶，多型性的比例均為 100%。因此要區分參試的蘭菌可用單一引子進行 RAPD 分析即可。

以 RAPDs 分析蘭菌之遺傳相似度，將 9 個引子所得之結果合併計算，並以 NTSYS-PC 估算參試的 9 株蘭菌之遺傳相似度。相似度最高的為 R.03 與 R.08 達 0.98；最低者為 R.01 與 R.08，僅有 0.53。若除 R.03 及 R.08 之外，R.05 與 R.09 有達 0.9 的高相似度，而以 R.01 與 R.02 的 0.57 相似度最低。

將 117 個 RAPDs 分子標識經 UPGMA 叢群分析，建立蘭菌之遺傳相似度之樹狀圖如圖 3。由整個遺傳相似度樹狀圖顯示，參試的蘭共生菌株大致可分為四群，第一群 R01 自成一類，與其他菌株相似度較遠；第二群 R.02 與 R.04；第三

群為 R.04、R.05、R.07 與 R.09；第四群則為相似度極高的 R.03 與 R.08。

四、金線連封閉式栽培施肥法之試驗

調整強生溶液中不同濃度的硝酸態氮或氨態氮（圖四、五），結果以施用全量的強生溶液較佳，而使用二種不同形態的氮素，以施用後對金線連植株的生長並無太大的差異，但是若將濃度減量則植株的生長較差，故使用不同濃度試驗中，以全量的強生溶液對植株的生長較減量為佳。

使用市售不同品牌的速效性肥料進行試驗，結果已使用花寶三號植株的生長勢較佳，而含有同樣 N-P-K:20-20-20 的花寶二號與 Peters 比較，則以 Peters 的生長勢較花寶二號為佳（表六）。由此試驗結果可知，不同濃度不同品牌的肥料施用，對金線連的生長具有不同的效果，故在金線連的栽培過程中，選用適當的肥料進行施用，對金線連的生長良好與否具有明顯的差異性。

結論

台灣金線連不同品系耐熱篩選以台東種對溫度的耐熱性較佳，隨著栽培溫度高於 30°C 以上，植株對病蟲害的抵抗能力越來越弱。菌種族群分析可經由菌絲融合群的鑑定，大都屬於 AG-6 融合群。利用以 RAPD 進行遺傳相似度分析，試驗所用菌種大都屬於 AG-6，在經 AG-6 次融合群分析，結果 R.04、R.06 及 R.07 屬於 AG-6 HGI 而 R.05 與 R.09 屬於 AG-6 GV。由此可知無論是利用菌絲融合群或 RAPD 分析皆可得到相似的結果。金線連封閉式栽培時，不同速效性肥料以施用花寶三號生長勢較佳，強生溶液中調整硝酸態氮或氨態氮濃度，以全量的生長勢較佳。經由耐熱篩選、肥料試驗或在到生物技術的檢測等，將可了解並解決部分金線連栽培過程中所遇到的瓶頸及困難。

參考文獻

1. 何正坤、張淑華、陳振榮. 1987. 金線蓮之組織培養與馴化栽培. 臺灣農業 23 (2): 77~88.
2. 張清標. 1988. 台灣金線蓮的繁殖技術改進之研究. 私立文化學院實業計畫研究所博士論文. 123 頁.
3. 莊維仁. 1990. 金線蓮莖腐病與基腐病病原學及防治之研究. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文 150 頁
4. 許嘉烈. 1994. 菌根對胡蘿蔔體胚苗與台灣金線蓮組織培養生長之影響. 國立台灣大學園藝研究所碩士論文. 95 頁.
5. 陳智信. 1995. 台灣土壤中的雙核絲核菌. 國立臺灣大學植物病蟲害研究所植物病理組碩士論文. 64 頁.
6. 陳榮五、黃勝忠、許謙信、陳彥睿. 1996. 花卉組織培養實用技術手冊. 台中區農業改良場編印. p29~31.
7. 劉新裕、蔡新聲、黃漢津、胡敏夫、葉常青. 1987. 金線蓮大量繁殖與栽培之生育性狀、種間比較及營養成分研究. 中華農業研究 36: 357~366.
8. 蔡靜怡. 1997. 蘭菌及溫度對台灣金線蓮生長之影響. 國立台灣大學園藝所碩士論文. 80 頁.
9. 蕭翌柱、陳威臣、呂佳宜、蔡新聲. 1995. 台灣金線蓮之組織培養 I: 改進種子萌芽率之研究. 中華農業研究 44 (3): 279~286.
10. 顏東敏、陳幸琴、廖正雄. 1996. 金線蓮繁殖技術. 東港鎮農會出版. 294 頁.
11. 譚琦、嚴培蘭、詹才新、郭力剛、王南、賀冬梅、凌霞芬、陳明杰、潘迎捷. 1999. 利用 RAPD 技術對不同地理環境下柳松菇菌株親緣關係的分析. 上海農學報. 15:18-21.
12. Cheng, K.T., L.C. Fu, C.S. Wang, F.L. Hsu, and H.S. Tsay. 1998. Identification of *Anoectochilus formosanus* and *Anoectochilus koshunensis* species with RAPD markers. *Planta Medica* 64:46-49.
13. Lee, S.B. and J.W. Taylor. 1990. In: PCR protocols. A guide to method and applications. Academic Press, Inc. pp.315-322.
14. Rafalski, J.A., S.V. Tingey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *TIG* 9: 275-280.

15. Sneh, B., L. Burpee, and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, Minnesota. 133pp.
16. Vilgalys, R. 1988. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA-DNA hybridization. *Phytopathology* 78 : 698-702.

表一、台灣金線連使用塑膠袋栽培在日/夜溫 (35/30 及 30/25°C) 中生長三個月之存活率

Table1. Survival rates (%) of ten *Anoectochilus formosanus* Hayata plants lines grown in 35/30 and 30/25°C temperatures for 3 months

Survival rates	Days	C2	C3	C4	C5	C6	C7	L1	T	W
		(%)								
30/25°C	10	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	30	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	60	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	70	100	100	89	100	100	97	100	100	95
	80	99	95	73	89	87	78	98	100	82
	90	94	90	65	69	70	67	92	98	70
35/30°C	10	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	30	100	100	98	86	95	96	100	100	90
	40	81	90	57	67	76	71	85	87	47
	50	67	71	43	52	43	66	52	75	28
	60	19	23	14	14	24	43	35	57	9
	70	0	0	0	0	0	0	0	5	0
	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0

20 replicates were tested for each treatment

Means in each column followed by the different letters were significantly different ($p=0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Lines of *Anoectochilus formosanus* Hayata from various origin : C:Pu-Lee Chiu's 、L1:Yu-Chyr Lai's#1 、T:Tai-Tung's cultivar 、W: wild grown.

表二. 蘭菌之菌絲融合群分析

Table 2. Hyphal anastomosis reactions of orchid mycorrhizal fungi

菌種	R.01	R.02	R.03	R.04	R.05	R.06	R.07	R.08	R.09
R.01	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R.02	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R.03	-	-	+	-	-	-	-	+	-
R.04	-	-	-	+	+	-	-	-	+
R.05	-	-	-	+	+	+	-	-	+
R.06	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R.07	-	-	-	-	-	-	+	-	-
R.08	-	-	+	-	-	-	-	+	-
R.09	-	-	-	+	+	-	-	-	+

+ : with hyphal fusion. - : no hyphal fusion.

表三. 蘭菌與多核絲核菌標準菌株融合群分析

Table 3. Hyphal anastomosis between orchid mycorrhizal fungi and test isolates of

Rhizoctonia solani

菌種編號	融合群	蘭菌						
		R01	R02	R04	R05	R06	R07	R09
ATCC76121	AG-1 IA	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76122	AG-1 IB	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76123	AG-1 IC	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76168	AG-2-1	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76124	AG-2-2 IIIB	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76125	AG-2-2 IV	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76167	AG-3	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76126	AG-4 HGI	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76127	AG-4 HGII	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76128	AG-5	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76129	AG-6 HG-I	-	-	+	+	+	+	-
ATCC76130	AG-6 GV	-	-	-	+	-	-	+
ATCC76131	AG-7	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76106	AG-8	-	-	-	-	-	-	-
ATCC90331	AG-9	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76106	AG-10	-	-	-	-	-	-	-
ATCC76132	AG-BI	-	-	-	-	-	-	-

+: with hyphal fusion. -: no hyphal fusion.

表四. 蘭菌與多核絲核菌 AG-6 標準菌株之融合頻度

Table 4. Hyphal anastomosis frequency between orchid mycorrhizal fungi and tester isolates in AG-6 of *Rhizoctonia solani*

Isolate	Hyphal fusion (%)	
	AG 6 HGI (ATCC 76129)	AG 6 GV (ATCC 76130)
R.04	16–30	0–10
R.05	0–15	36–70
R.06	43–71	0–10
R.07	47–75	0–10
R.09	0–10	41–72
AG 6 HGI (ATCC 76129)	68–85	12–30
AG 6 GV (ATCC 76130)	10–26	72–84

表五、篩選出用於 RAPD 分析蘭菌之引子

Table 5. Primers used for RAPD analysis of orchid mycorrhizal fungi

Primer	Sequence (5'-3')	GC content(%)
OPD-01	ACCGCGAAGG	70
OPD-05	TGAGCGGACA	60
OPD-06	ACCTGAACGG	60
OPD-07	TTGGCACGGG	70
OPD-08	GTGTGCCCCA	70
OPD-10	GGTCTACACC	60
OPD-11	AGCGCCATTG	60
OPD-12	CACCGTATCC	60
OPD-14	CTTCCCCAAG	60

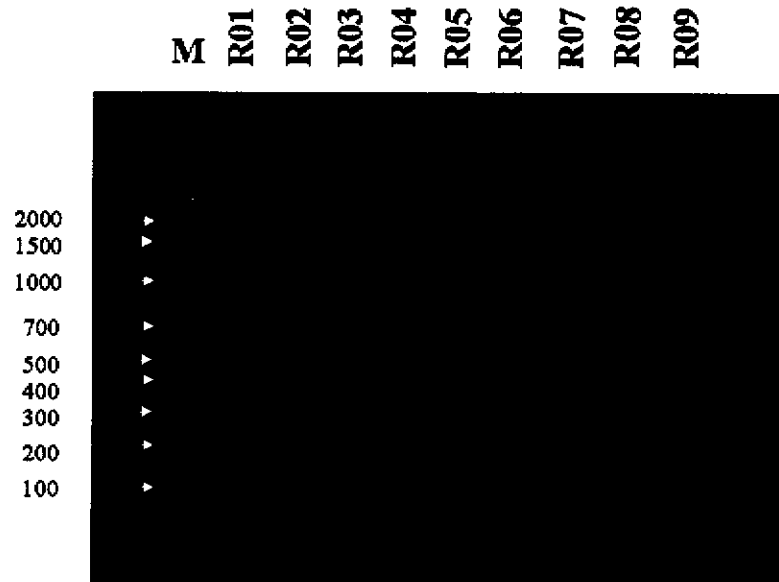


圖 1. 蘭菌以 OPD-05 為引子之 RAPD 分析圖譜。

Fig. 1. RAPD profile of DNA from orchid mycorrhizal fungi using primer OPD-05.

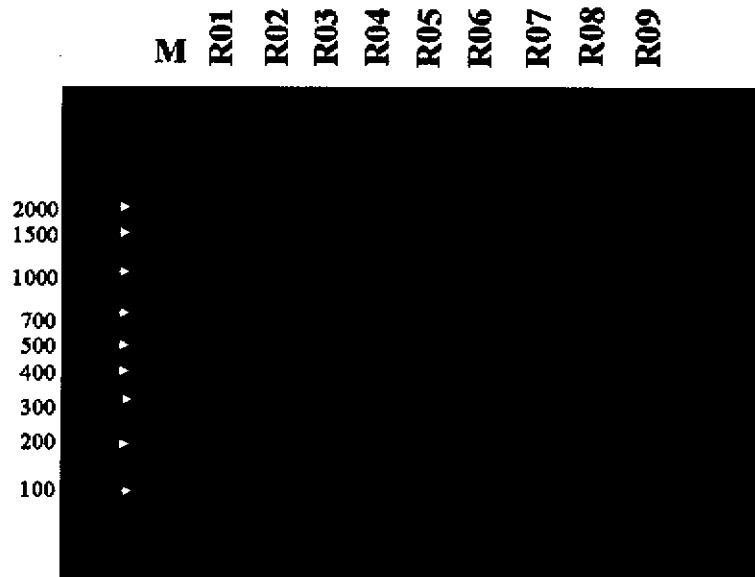


圖 2 蘭菌以 OPD-10 為引子之 RAPD 分析圖譜。

Fig. 2. RAPD profile of DNA from orchid mycorrhizal fungi using primer OPD-10.

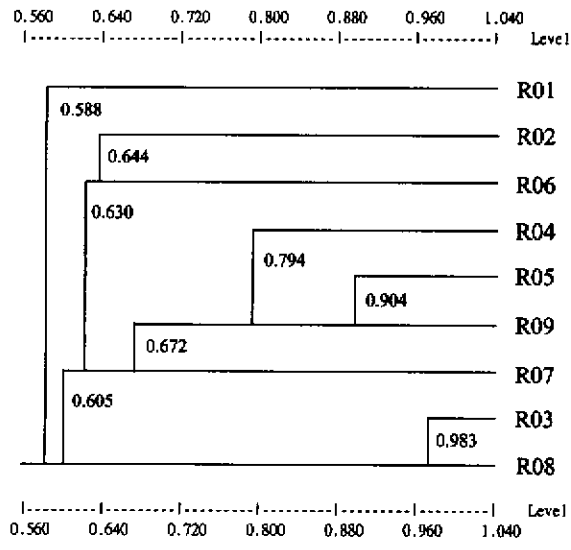
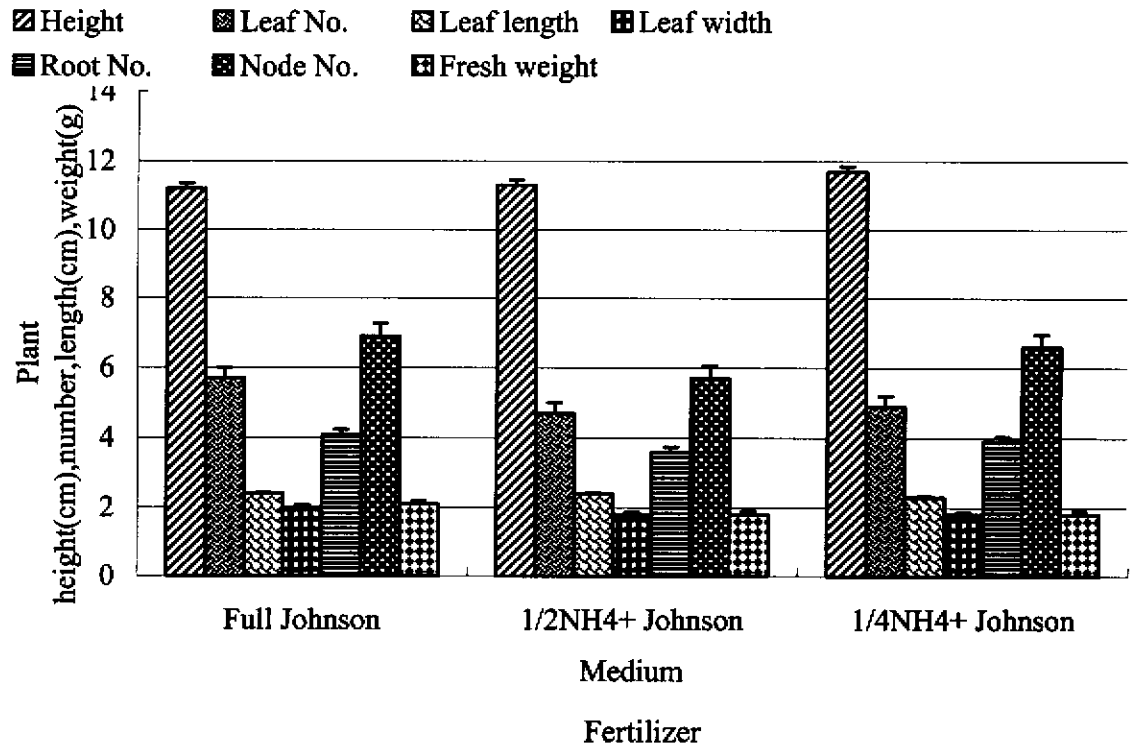


圖 3. 以 RAPD 分析蘭菌遺傳相似度樹狀圖。

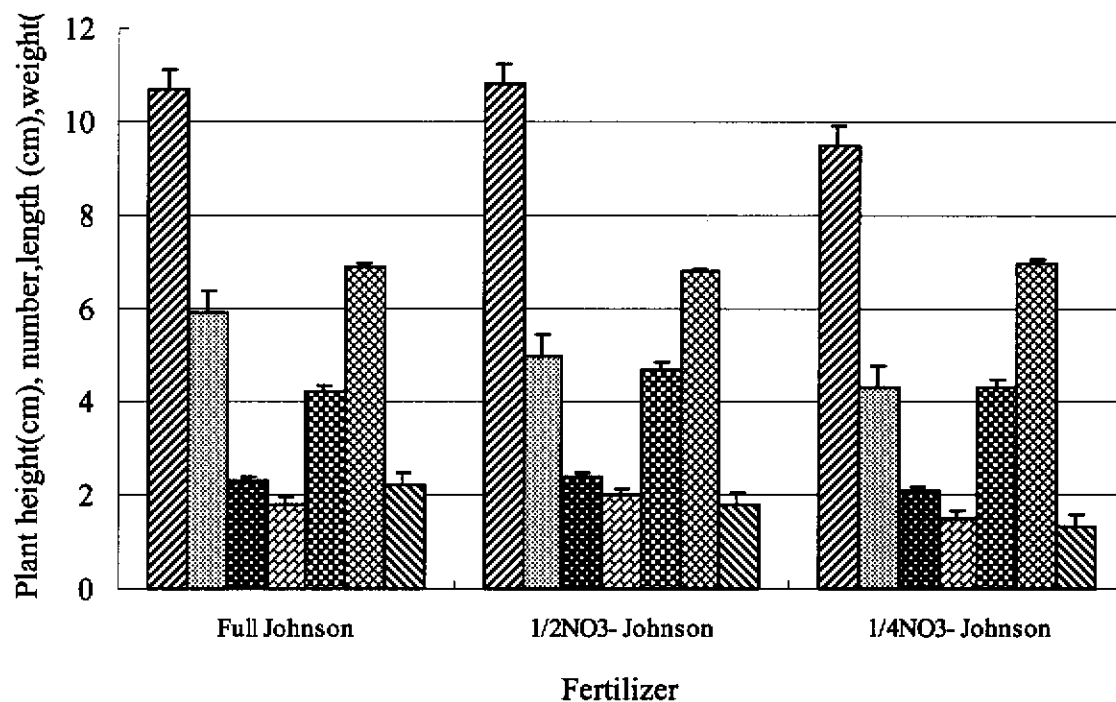
Fig. 3. Dendrogram of 9 orchid mycorrhizal fungi genotype calculated from RAPD data using UPGMA clustering.



圖四、金線連 (P) 生長於 TKS2 栽培介質，使用塑膠袋栽培並施用不同濃度氣態氮態氮對植株生長四個月之生育調查

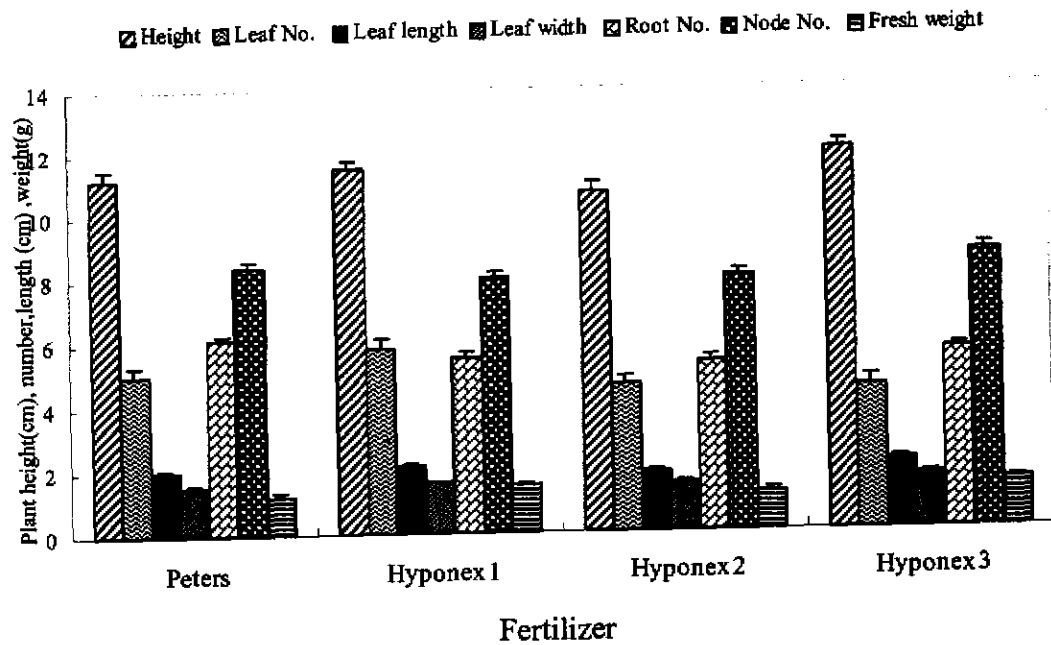
Fig 4. Growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata for 4 months *in vivo* as affected by various NH₄⁺ concentration in TKS2 growth medium.

▨ Height ▩ Leaf No. ■ Leaf length ▩ Leaf width ■ Root No. ▩ Node No. ▨ Fresh weight



圖五、金線連 (P) 生長於 TKS2 栽培介質，使用塑膠袋栽培並施用不同濃度硝酸態氮對植株生長四個月之生育調查

Fig 5. Growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata for 4 months *in vivo* as affected by various NO₃⁻ concentration in TKS2 growth medium.



圖六、金線連 (C2) 生長於 TKS2 栽培介質，使用塑膠袋栽培並施用四種不同肥料對植株生長四個月之生育調查

Fig 6. Growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata for 4 months *in vivo* as affected by four various fertilizer in TKS2 growth medium.

參加南澳第三屆國際菌根大會(ICOM3)報告書

張喜寧 台大園藝系教授

計劃名稱：藥用及保健植物-耐熱金線連之篩選與菌根利用(3/3)

計劃編號：NSC 89-2317-B-002-009

計劃出席大會及出發：因為本人在國家型計劃中有參加國際會議的預算十萬元，所以早在數月前，即積極規劃參加此次在南澳阿德來得(Adelaide；ALD)將舉辦的第三屆國際菌根大會(ICOM3)。會期為民國 90 年 7 月 8-13 日，曾與多家旅行社商討的結果，決定搭乘國泰航空公司由台灣飛香港，再轉飛阿德來得的班機，因為在七月十四日國泰無班機回航，而星航雖有當日回航班機，卻必須在新加坡自費過夜，仍需在十五日才能返抵台灣，故安排十四日留在當地參觀阿德來得大學及其附近相關植物園等地，於十五日搭國泰班機返國，票價約三萬元。

出發前聽說國泰機組人員醞釀罷工，本想改搭新加坡航空公司班機，但是不同旅行社都保證屆時國泰航空公司一定會做妥善安排，加上在出發前，台灣及香港都遭受尤特颱風波及，出發當天抵達中正機場才知道國泰雖有飛香港班機，卻已經停飛當夜香港到阿德來得班機(CX 105)。不得已必須改搭華航班機(CI 051)前往雪梨，再轉澳航(Quantas)飛阿德來得，所以讓我抵達會場時已經是七月九日下午兩點多，已是我展示壁報(poster)的時間，當日因為華航不肯幫我把行李直掛阿德來得，必須在雪梨入關，而同行的胡教授行李卻直掛阿德來得，又需等他出關，使得抵達會場時間已是下午兩點多，必須趕貼壁報，而非常慌亂。

大會實況：本大會以「Diversity and Integration in Mycorrhizas」為主題，在 Adelaide Convention Centre 召開大會，共有數百人參加，但是能被大會安排上台報告的東方人寥寥幾人而已，幾乎全部是白人的天下，台灣代表至今已經參加屆，從無人有資格上台做演講，這是我們該努力的方向。

本大會最多論文報告的主題是利用生物技術去鑑定菌種及菌根的形成，例如利用 RAPD, RFLP, DGGE, 18S rDNA, ITS-RFLP, ISSR-PCR 等作各種孢子的分類，論文可說數以百計，而以研究菌根幫助植物吸收養分的機制研究為副主題，尤其以 H⁺ATPases 的重要性，屢被提及。注意到與會人士在近幾年發展出許多較新的研究技術，而能進展頗快。甚至還有幾篇論文已經使用雷射共軛焦距顯微鏡(Laser confocal microscopy)做菌根觀察，更有數篇論文提及內生菌根構造含有 Arum-type 及 Paris-type 兩類構造，由他們的解釋，使我對從前所做內生菌根的觀察與了解，必須做適當的修正。非常遺憾的是園藝上的應用及蘭菌的研究論文都非常稀少，使我此行想當面向世界蘭菌權威討教的希望落空。所幸認識日本女孩 Uetake Yukari 博士介紹其日本老師 Naito Shigeo 教授，他收集有許多世界雙核蘭菌菌種，可以跟他聯絡。壁報展示部分，大多數人都做成一大張壁報帶來，所以

張貼容易，但攜帶不便。而本人用護貝膜將 A4 紙張套住，以稍大於 A4 的護貝照片與文字張貼，攜帶容易，卻不如大張壁報美觀，將來仍需改善。

本大會期間只招待上、下午各一次的飲料（茶或咖啡）及餅乾，其餘各餐全部必須自費，顯得非常寒酸，比不上國內小型研討會的點心招待。

在會場上碰到的外國名教授們能互相打個招呼的已算不錯，難得 University of Western Australia 的 Lynn K. Abbott 教授主動來和我寒暄，說我們在 1992 年 Perth 的菌根會議上見過，當時她是大會主席，辦得有聲有色，比這次還高明。也有兩位印尼博士（男女各一），說他們聽了我在那次大會上演講「園藝菌根」而記得我。澳洲的 J. R. Thompson M. N. Hunter 博士也都過來打招呼，都是在那次大會或在亞洲菌根大會所見，可見上台做報告的重要性，台灣代表應該努力。

住宿：大會安排的住宿由一夜數百元到數十元都有，我所住地點離開會地點需步行近半小時才得以到達，所以一早出門，一直待在會場，晚上在大學裡還有各種 workshop，所以要很晚才回大會安排住宿的 St. Ann's College。但 St. Ann's College 的管理員卻只在早上九點到下午五點才上班，使得早出晚歸的我們碰不到面，他們又不收信用卡，我們必須換澳幣支付，所以連付個房租都困難重重，依當初租約該處必須供應早餐，但菜色天天不變，更糟的是到了星期六與星期日卻變成只供應午、晚餐（另需付費），造成不便，而宿舍房間抽屜，塞滿前一住宿女學生的衣物及用品，讓我們只有衣櫥騰空，可以使用，而房內連一盒衛生紙也不供應，公用衛浴設備更是男女不分，洗澡水也忽冷忽熱，種種跡象都顯得管理上有諸多缺失，或太自由的作風所導致。倒是宿舍設有公共廚房，其內設有微波爐、冰箱、燒開水的水壺、烤箱、熨斗及燙衣架、排油煙機等，所以可以買回食物加熱而食用。星期日的早餐因為我去餐廳詢問而有著落，所以只要有理，就可以去找他們商量而得到補償。在當地看到算是很先進的設備是公共地方的燈具，在人們走近時，都自然會亮起來，過後自然會關上，倒是在台灣較少見，應可引進。

中共及台灣代表：看論文名單大陸代表共約有十人，而在會場我們與北京的李曉林、畢銀麗，南京土研所的朱永官，現在在東京大學的周志華，及目前正在阿德來得大學當訪問學者的李惠英，武漢的趙斌，中國林科院熱帶林業研究所的陳應龍，及一直在紐西蘭的王雲等八人則常可友善交談或一起拍照留念。而台灣代表則僅有中研院的邱子珍，及台大的胡弘道與本人共三人而已。

晚宴：每人必須購票才得以參加，每人收費 75 元（澳幣），但除了飯前酒與點心有多樣素食外，大會對我答應的素食主餐卻因被餐廳指定必須依所坐桌數前往取用食物，而輪到我時，已經沒有素食主餐，因為已經被非素食者取走，所以當夜只有烤馬鈴薯、麵包及沙拉等可以食用，這是素食者常需面對的問題：交費一樣，可食之餐點卻常常非常稀少或簡陋。所以以後應該要求餐廳讓素食者先行

取用其食物，以免被非素食者取走而無主食可供食用。此次看到多數與會代表都不打招呼，難得近十年以前在泰國亞洲菌根大會相識的澳洲代表 Malcolm N. Hunter 博士，竟然會邀我與他及 Oregon State University 來的 Linderman 博士，及 USDA 的 Carolyn F. Scagel 女士同桌，大家相談甚歡。

會後參觀：本人登記每人收費 45 元的紅樹林 (Mangrove)，一路上司機先生不斷講笑話，顯得甚有喜劇天份。看到他們視為珍寶的一大片紅樹林，走一圈要花約一小時，想到台北紅樹林的水筆仔沒去看過，而來南澳參觀，回國後應去看看。在巴士上，發覺與會之人並不友善，從前認識的都裝做不認識，連招呼也不打，所以沒有同伴的我及另一墨西哥女代表各坐一位，參觀時我特別去和她聊幾句。下車時，巴士停在一個小城，叫我們自行前去自購午餐。在小麵包店碰到第三車巴士的紅樹林參觀者，餐後上車卻等不到墨西哥女代表，竟然全車除我以外，無人知道她是誰，等了十分鐘仍未見人，車子就開走了，讓我再次見識澳洲主辦單位的冷漠，車上帶隊女孩說她根本不知道這個人去了哪裡，也沒有想在該鎮找一找的意圖，就開車走了，而此人的外套丟在巴士上，希望她最好是搭上第三台巴士回去了，否則自行由當地回阿德來得的車程約需兩小時，將有得受的。下午參觀 Seppelt Barossa Valley 的製酒場，大家參觀了這間在一百多年前由德國（當今波蘭）帶著三個小於三歲小孩的移民，來此開創的葡萄園及大酒廠，酒廠規模之大，葡萄園管理的良善，都讓人嘆為觀止！他們採用的葡萄棚架為籬笆式，可惜葡萄果實已在六月之前採收完畢，最奇怪的是整車菌根專家，沒有一位要求在葡萄園照一張相片者，所以沒有葡萄園的影像可留下，其實葡萄是跟內生菌根有密切相關的作物。

感想與建議：許多與會的中國代表都說第二屆在瑞典所舉行的大會辦得比此屆好太多，可見主辦單位的用心與地位很重要。瑞典主辦者在皇宮接待與會代表，而本屆主席是當地大學的 Sally Smith 博士，看來就是粗線條作風，本屆大會似乎只幫忙訂旅館或 residential college，及借場地開會，其他接待都似乎談不上，但卻大權在握地決定何人可上台報告，何人只能做壁報展示，也不分內生、外生、杜鵑、或蘭花菌根，全部混成兩大間會堂宣讀論文。而台灣的菌根研究，在他們眼中，根本不成氣候！這是我們必須迎頭趕上的。

本大會有一半以上的論文都在討論使用生物技術來做研究，也有不少論文討論菌根的作用機制，但非常顯然幾乎毫無進展的是菌根的實用性研究，及對蘭花菌根的毫不重視，難怪不久以後將在 University of Western Australia 舉辦一場蘭花研討會，可惜我已經沒有經費可以前往。

三屆 ICOM 大會，本人共參加兩屆，有如下幾點感想：

1. 日本人在十幾年前對菌根研究非常稀少，但從此次菌根名錄上發覺其菌根研究登錄者已經將近三十人！可見其重視菌根的情形。反觀台灣菌根研究者，由將近十人縮減為三人登錄者，且菌根經費也非常不穩定，都使人心寒。

2. 大陸菌根研究者日漸增加，且多與美國、澳洲、法國等知名研究室合作，或派人去留學，或進行合作計劃，這是目前台灣所無法望其項背的。其實台灣的菌根研究已有約二十多年歷史，卻因不受重視而日見衰微，只靠少數幾位研究者在硬撐，本人剛在今年畢業的博士班學生，已經使用生物技術方法進行菌根研究，並未落後世界趨勢太遠，但所完成的研究報告，卻苦於難以被國外知名雜誌接受而苦惱，據新加坡的覃鳳儀女士告訴我，她個人送出去發表的論文也不易被人接受，但與法國學生共同發表的論文，卻容易被接受，所以證實我對外國雜誌看不起我們的菌根研究，而常被退稿的感受相同。
3. 由此次大會看來，台灣、日本、中國大陸、泰國及新加坡等地應該密切合作，努力發表研究論文，才能在目前全被白人所掌控的世界菌根研究界出頭，建議應加緊對菌根的實用性多加研究，這是目前白人較弱的菌根研究專門所在，因為菌根研究的最終目的就是在農業生產的實際應用上，而目前白人的大部分精力還只停留在理論研究而已。

收穫：在此次大會又碰到泰國代表 Chiang Mai Univ. 的 **Saisamorn Lumyong (Dept. of Biology,)** 及 Pipob Lumyong (Dept. of Plant Pathology) 教授夫婦，他們熱誠地邀請我去青邁參加 The 3rd World Congress on edicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III, 2003 年 2 月 3-7 日)。也碰到多年前參加世界柑桔大會時遇到的日本柑桔教授門屋一臣博士（愛媛大學），新加坡的覃鳳儀博士則做蘭花菌根的生物技術研究，證實其向世界菌種中心所購買的蘭菌菌種多以 AG-5 或 6 為主，而本研究室剛鑑定出的本土菌種則屬 AG-6 一群。也有日本的年輕助理教授 Yamada Akiyoshi 博士則表示我做的台灣金線連研究很有趣，他會和我保持聯絡。而加拿大的 Larry Peterson 博士則勸我把金線連菌根發芽部分投稿到園藝雜誌或美國的 Lindleyana 蘭花雜誌，較能被接受。但與會人員有數人都告訴我不要投稿到每期只登幾篇論文，且似乎被某少數人所控制的 Mycorrhiza 雜誌。據 Linderman 教授推薦的園藝雜誌則有(1.)Acta Horticulturae, (2)Hort. Technology, (3) Can. J. Bot. (4) New Phytologist 及 (5) Amer. J. Hort. Soc. 其中 Acta Horticulturae, Hort. Technology 及 Lindleyana 似乎皆不屬於國科會所要求的 SCI 期刊，嘆園藝人能投稿的外國 SCI 雜誌並不多啊！

下次會期及地點：在大會結束前，全體與會人士共聚一堂，投票選擇第四屆(ICOM 4)開會地點，共有 Northern Arizona University (Flagstaff)及加拿大的 Montreal 爭取主辦，結果以 Montreal 獲得壓倒多數，將在 2003 年 8 月舉辦。

帶回資料：(1) ICOM 3 3rd International Conference on Mycorrhizas Program and Abstracts 一冊；(2) New Phytologist 2001, Vol. 150 (3), 778 pp.一冊；(3) The 3rd World Congress on edicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III, 2003 年 2 月 3-7 日) 海報一張。

New Cultivation Methods for *Anoectochilus formosanus* Hayata

Doris C.N. Chang, L.C. Chou and K.C. Lee

Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC
(10617)

Introduction

Anoectochilus formosanus Hayata is a beautiful native terrestrial plant of Jewel's orchid grown in the forest of Taiwan. It has been used for ornamental and medical purposes, such as curing cancer, diabetes, and liver diseases. These plants were collected and sold at the price for more than 300 US\$/kg in fresh weight. Now they were mass propagated by micropropagation. But the plants were highly susceptible to *Fusarium*, *Pythium* spp. and mites *in vivo*. So how to mass propagate this orchid without applying pesticide and insecticide became primarily important.

Purposes

1. To enhance the growth of this orchid by the inoculation of *Rhizoctonia* spp.
2. To prevent the infection of pathogens and insects by using plastic bag cultivation method (PBCM)

Conclusion

The inoculation of binucleate (R.02) and multinucleate (R.04) *Rhizoctonia* could highly enhance the seed germination rate and the growth of *A. formosanus*.

The use of plastic bag cultivation method (PBCM) not only could protect the plants from the infection of diseases and insects, but also could highly increase the growth of this orchid. For CO₂ uptake, this plant will change from CAM (without bag) to C3 (with bag) by the PBCM.

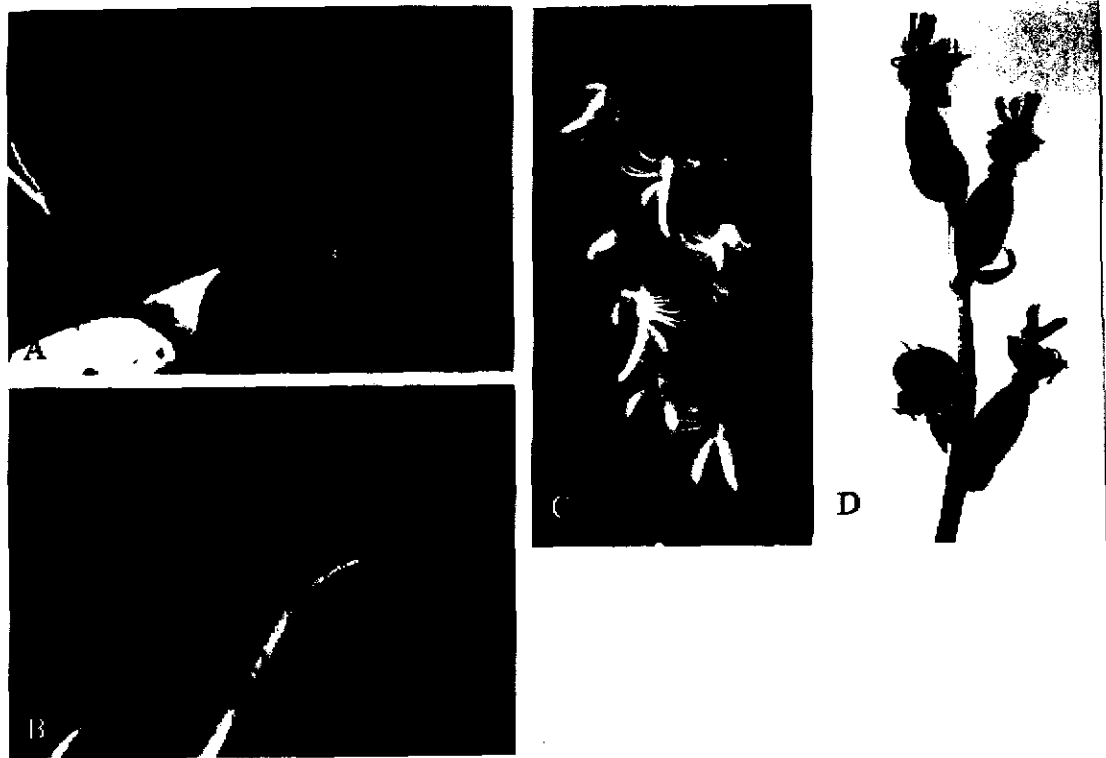


Fig.1 Morphology of *Anoectochilus formosanus* Hayata. Note the red stems (A) and leaf lower surfaces (B); Flowers (C), and seed capsules (D).

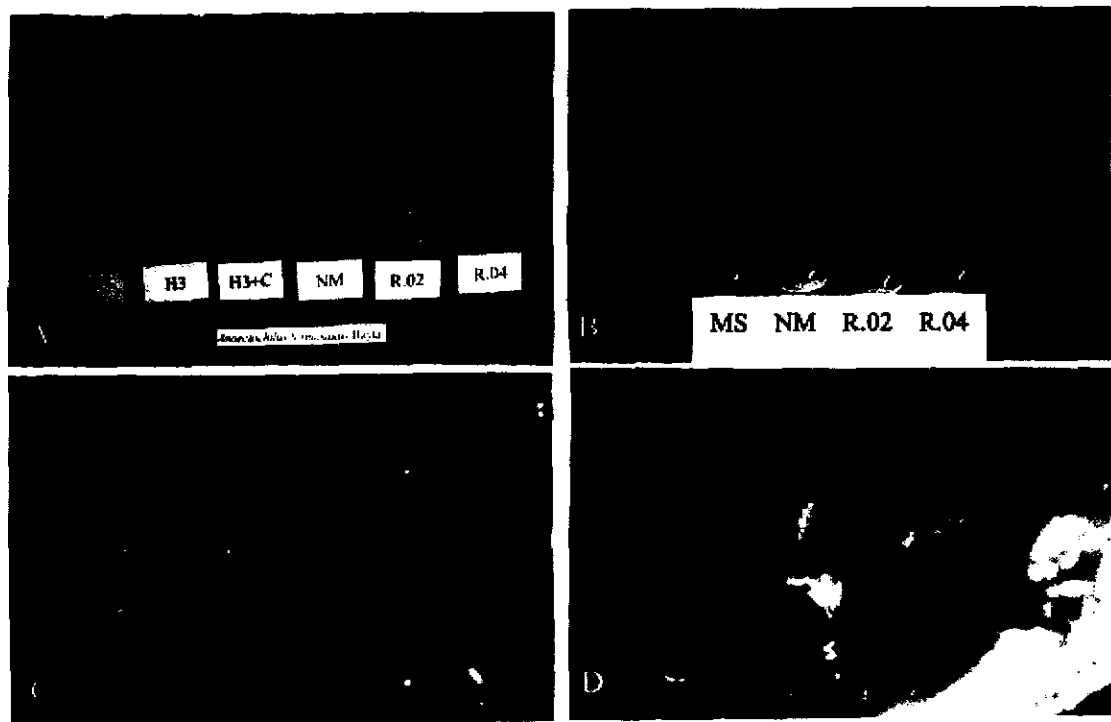


Fig. 2 The inoculation of OMF could enhance the germination and growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata .

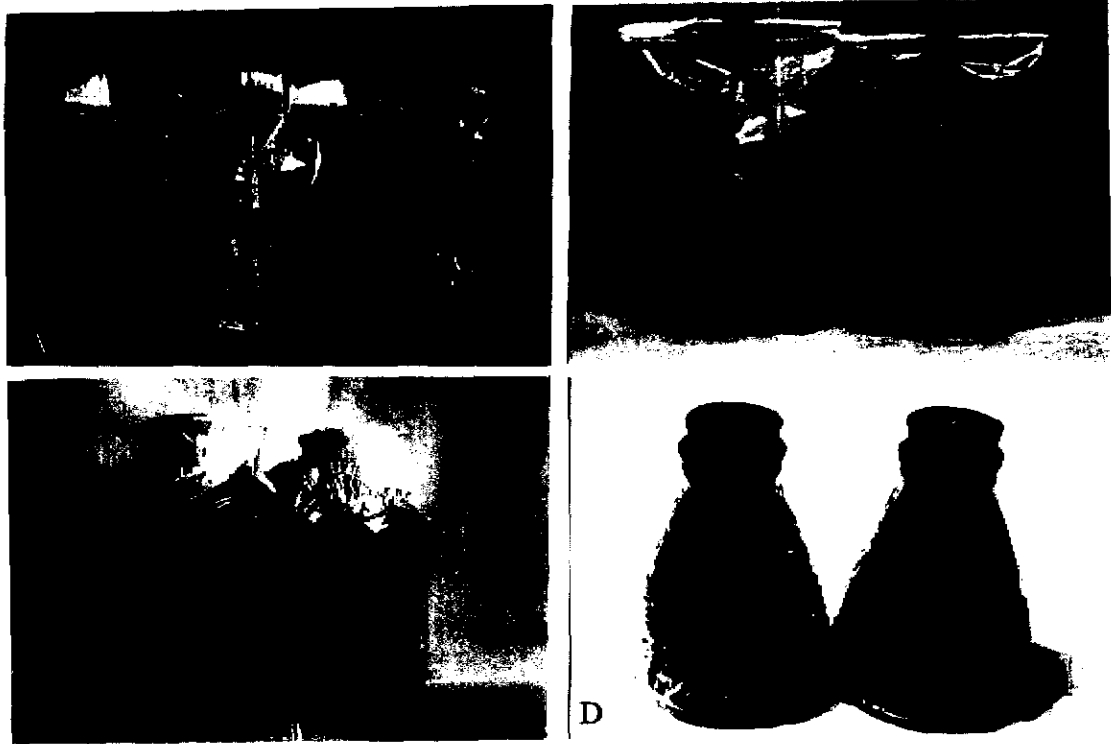


Fig.3 The *Anoectochilus formosanus* Hayata can be propagated by micropropagations.

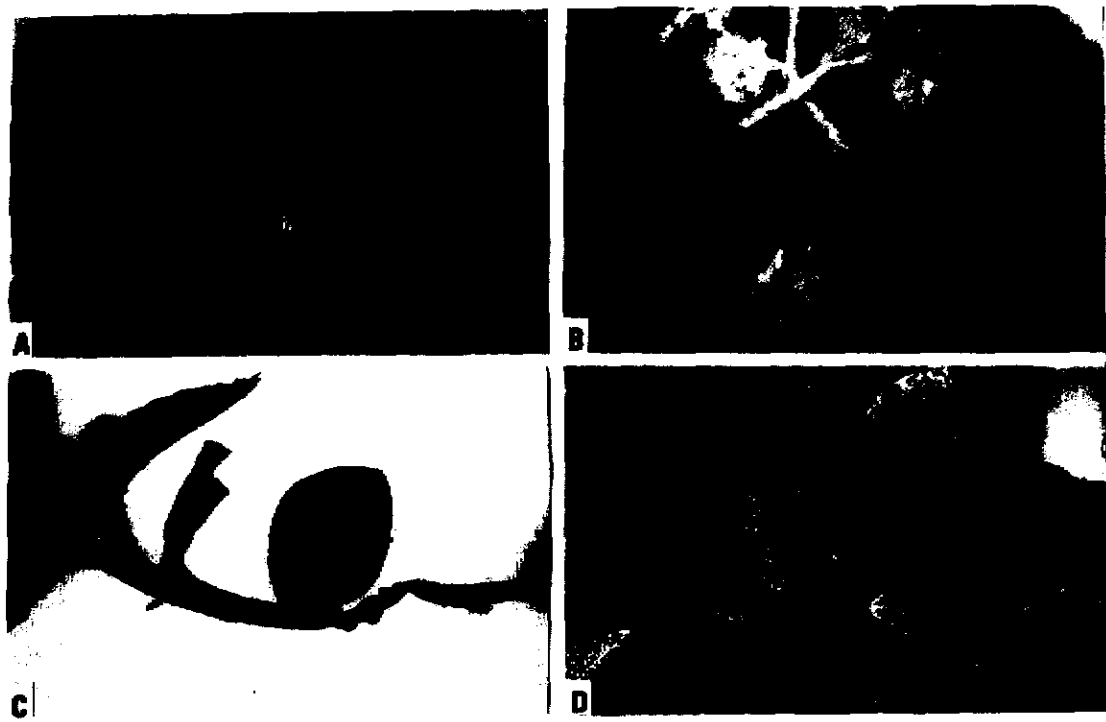


Fig. 4 The *Anoectochilus formosanus* Hayata plants are highly susceptible to stem rots, root rots and mites.

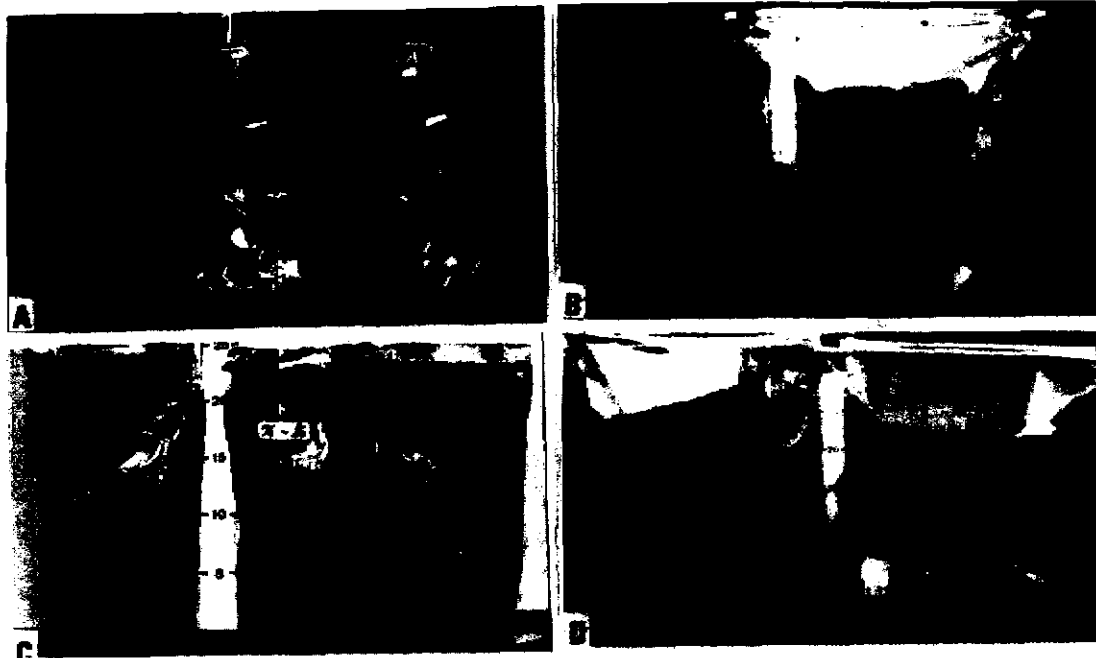


Fig.5 Methods for preventing the need of insecticides and pesticides for *Anoectochilus formosanus* Hayata:

A. Using large glass jars (2.7 L)

B-D. Plastic bag cultivation methods (PBCM)

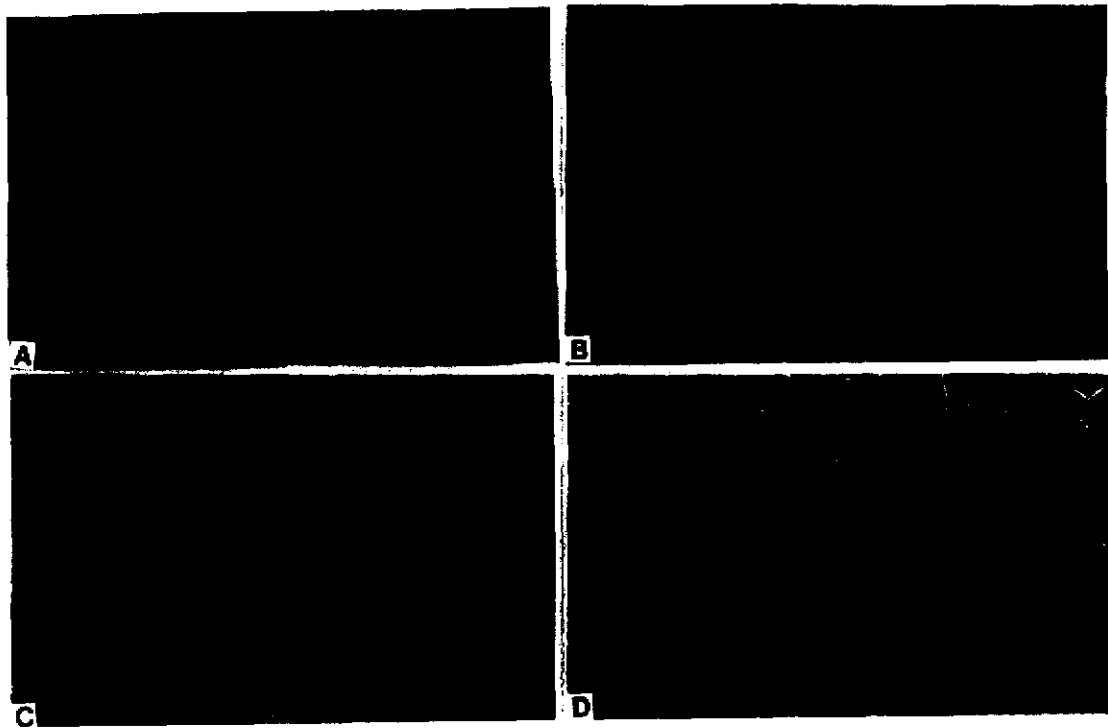


Fig.6 Morphogy of *Rhizoctonia* spp. (A:binucleate; b & multinucleate; m)and orchid mycorrhiza (B-D) of *Anoectochilus formosanus* Hayata.

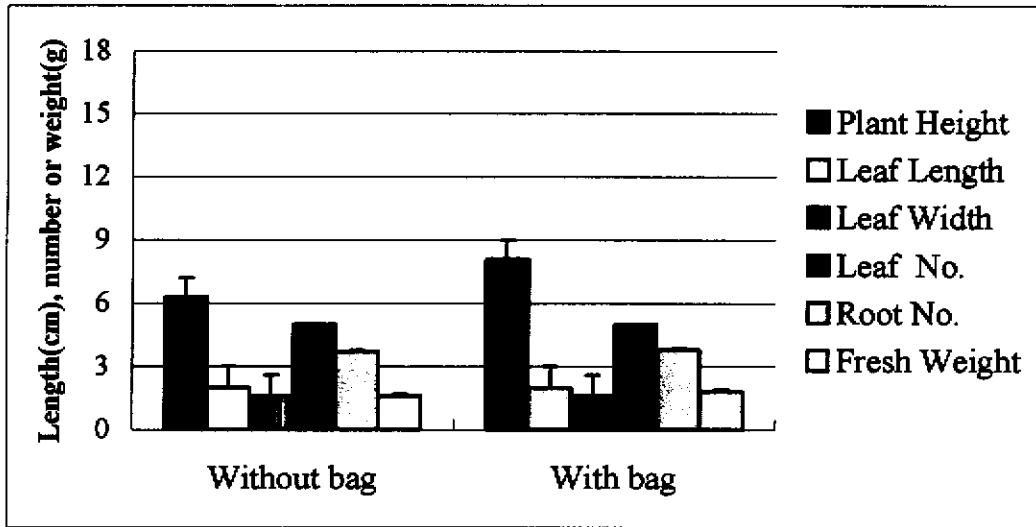


Fig 7. Influence of plastic bag cultivation method on the growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata in Bay-Chu-Hai medium for 4 months

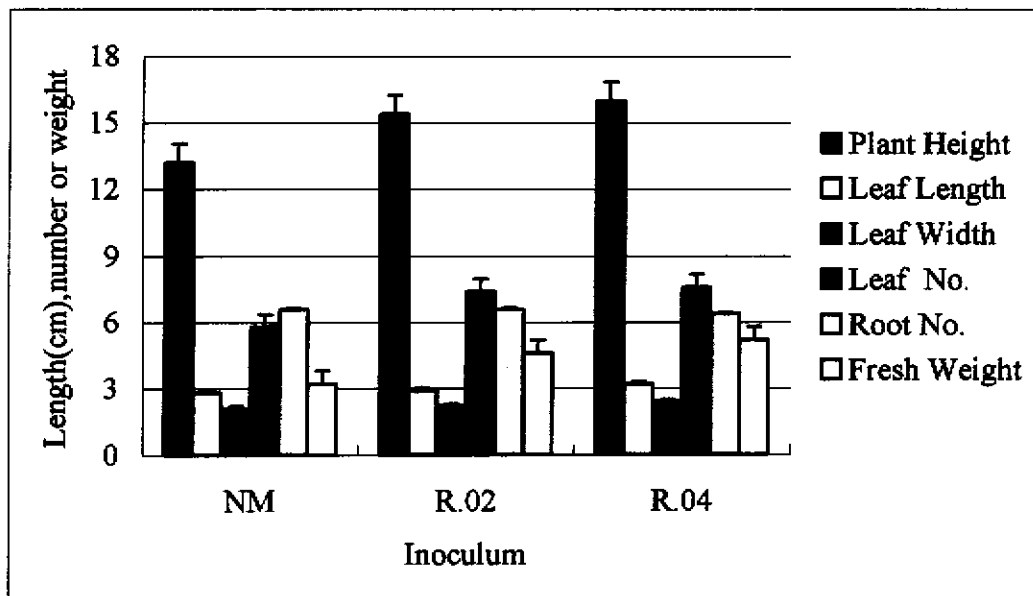


Fig 8. Growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata plants in plastic bag cultivation method and orchid mycorrhiza fungal inoculation in Bay-Chu-Hai medium for 6 months.

References

- Chang, D.C.N. 1986. Sterilized plastic soft bags- new vessels for tissue culture. *Agric. Weekly* 12: 21.
- Chang, D.C.N. and L.C. Chou. 2001. Seed germination of *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and the use of mycorrhizae. *Symbiosis* 30: 29-40.
- Du, X.M. T. Yoshizawa and Y. Shoyama. 1998. Butanoic acid glucoside composition of whole body and in vitro plantlets of *Anoectochilus formosanus*. *Phytochemistry* 49: 1925-1928.
- Gua, T.G. D.D. Chang, Y.C. Chern, C.C. Chen, F.T. Yeh, Y.S. Chang, M.T. Hsieh, N.Y. Chu, and H.S. Tsay. 1993. Rapid clonal propagation of Chinese medicinal herbs by tissue culture. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* 15: 300-304.
- Lee, G.C. 2001. Identification and improvement of production techniques for *Anoectochilus formosanus* Hayata and orchid mycorrhizal fungi. Ph.D dissertation, Institute of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC. 189 pp.
- Lin, J.M. C.C.Lin, H.F. Chiu, J.J. Yang, S.G. Lee. 1993. Evaluation of the inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma Lucicum* and *Gynostemma Pentaphyllum* in rats. *Amer. J. Chinese Medicine* 21: 59-69.
- Liu, S. Y., T. W. Chang, J. Y. Wang, A. H. Chang, and S. C. Wang. 1998. Studies on the varietal characters and acute toxicity of *Anoectochilus* spp. *J. Agric. Res. China* 47: 242-258.
- Mak, O.T. D.D. Huang and R.C.S. Law. 1990. *Anoectochilus formosanus* Hay. Contains substance that affect arachidonic acid metabolism. *Phyther. Res. PTR* 4: 45-48.
- Shiau, Y. J., U. C. Chen, C. Y. Lu, and H .S. Tsay. 1995. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata I. Studies on the improvement of seed germination. *J. Agric. Res. China* 44: 279-286.
- Shiau, Y. J., U. C. Chen, and H .S. Tsay. 1998. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata III. The influence of seed maturity and pretreatment on seed germination and seedling development. *J. Agric. Assoc. China* 183:69-78.
- Tang, Q. J., J. Y. Ding, and L. M. Zhu, 1996. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hay. and nutritional constituent analysis of cultural seedlings. *J. Plant Res. Environ.* 5: 23-27.
- Tsai, C. Y. 1997. Effects of *Rhizoctonia* spp, and temperature on the growth of plantlets of *Anoectochilus formosanus* Hayata. Master's thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC. 80 pp.