

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學系

碩士論文

Department of Horticulture
College of Bio-Resources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

臺灣草莓染色體倍增及其與栽培種草莓之種間雜交
Studies on Chromosome Doubling of *Fragaria hayatae*
Makino and Interspecific Hybridization with
Fragaria × *ananassa* Duch.

徐 瑾

Chin Hsu

指導教授：陳右人 博士

Advisor: lou-Zen Chen, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

誌謝

承蒙恩師 陳右人老師的指導，除了課業上的解惑與試驗上給予寶貴意見，更在為人處事與做事應對進退上為我指點迷津，終身受用。感謝輔導委員 李金龍老師、口試委員 鄭正勇老師及 阮素芬老師在百忙之中撥冗斧正本論文，使之能更臻完善。感謝 許圳塗老師、張祖亮老師、張耀乾老師、彭鏡毅老師、河野淑子 研究員及 董桂書老師提供器材上的協助，本試驗才得以順利完成。感謝 陳天香老師的皮拉提斯課程，讓我的碩班生涯保持身心愉快。

感謝常綠果樹室的大家庭：曾玲蓉阿姨對學生的關心讓我備感溫馨、蘇美玲小姐的細心及開朗讓人如沐春風；朝窗學長教我配電系統的購置，組培室才得以運作；書妍學姐有條不紊的建立實驗室規範，方能有效率的執行試驗；柏安學長提供試驗上邏輯思考及統計方面的協助，使我受益匪淺；慈慧學姐嚴謹且紮實的實驗態度，一直是我學習的標竿；感謝晉璋、銘至及世宗學長擔負司機的重責大任陪同出差；懷恩學長傳承的小紅紀錄板督促我用心做實驗；多謝娜娜學姐載我購買啟動器及毓翔學長於新生訓練時的指導；小鯉魚的積極、聰明還有與荔枝伯的鬥嘴讓我碩班過得順利且開心；嘉琦的陪伴讓我收到許多人的欣羨眼光；爽朗的大寶總是耐心地為我解惑實驗室大小事，有妳們當同學實在相當幸福；也謝謝真如、河童和昶毅，祝你們的碩班生涯也一切順利。感謝精密溫室實驗室的 Lulu 學姐、宜靜學姐、婉婷和心怡。感謝 許圳塗老師實驗室的春賓及顥正學長，不厭其煩的指導我組織培養及染色體壓片技術。感謝孟慈、進學學長、子耀學長、之穎、美琴、瑜家及茜婷於實驗上的討論與協助。

感謝我摯愛的家人：最疼我的爺爺、奶奶、叔叔、嬸嬸、兩位可愛的弟弟凡凱和瑋晟、不時對我機會教育的哥哥；父親 徐仲玄先生教會我獨立負責；母親 鄭春梅女士的大智慧是我讀再多書也學不來的，謝謝你們對我的包容與鼓勵。謹以此書獻給最偉大的母親

徐瑾 2010.6.9 於台北

中文摘要

臺灣草莓(*Fragaria hayatae* Makino)為原生於臺灣之二倍體草莓，因果實較小，如欲利用，必須育出含臺灣草莓基因的多倍體，或將臺灣草莓與八倍體栽培種草莓*F. ×ananassa* Duch.進行正反交，期能得到五倍體雜交後代，以便進一步獲得十倍體之個體。為達此目的，本文初步進行臺灣草莓與栽培種草莓之種間雜交，以及臺灣草莓染色體倍增。

*F. hayatae*與*F. ×ananassa*互交之組合中，以臺灣草莓為母本雜交者結果率較高，以栽培種草莓為父本之單果，獲得種子數較多，而種間雜交獲得後裔不易。為提高雜交後代之存活率，進行臺灣草莓與雜交之種子的發芽試驗。臺灣草莓種子以濕冷層積處理者最早發芽，播種30天後，濕冷層積與對照處理者皆超過90%發芽率。雜交種子以濕冷層積與刻傷處理後萌芽率皆低，原因是無效種子比例過高，可能是*F. hayatae*與栽培種草莓雜交後，胚與胚乳發育存有障礙。

以根尖壓片法檢測草莓之染色體數。臺灣草莓染色體數為 $2n = 2x = 14$ ，而*F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae*後代中，4株為非整倍體數植株，染色體數介於44~53條，5株具56條染色體，一株為六倍體植株。雜交後代中，仍存在八倍體者，可能由於人工授粉時花粉受到汙染或是發生無融合生殖現象；另外有5株後代為非整倍體數植株，推測為雜交親本配子減數分裂異常所致。

莖頂培養臺灣草莓，初代培養基以 $1/2$ MS 搭配 $BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 生長情形最好，適合之增殖培養基為 $1/2$ MS + $NAA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + $BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，分株移入去除 BA 之增殖培養基中，促進生根。培養基中處理秋水仙素 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 者存活 8 株； $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 者存活 1 株。檢測 7 株誘變存活植株中之 4 株，根尖壓片之染色體數為 $2n = 2x = 14$ ，無成功誘變為四倍體臺灣草莓者。

Abstract

Taiwan strawberry (*Fragaria hayatae* Makino) is a diploid strawberry with small fruit and some pest resistant characteristics native in Taiwan. Polyploids and interspecific hybridization should be made for this species's further use. Reciprocal crosses were made between *F. hayatae* and *F. ×ananassa* Duch. in order to obtain pentaploids, and were *F. hayatae* treated with colchicine, in expecting to get tetraploid plants.

In the combination of Taiwan strawberry × cultivated strawberry, higher percentage of fruit set was obtained, and seed number /fruit set was higher. Progenies of the reciprocal cross between *F. hayatae* and *F. ×ananassa* were fewer than expected. To improve the survival rate of the offspring, germination test for *F. hayatae* and the hybrid seeds was made. Germination rate was promoted in stratified *F. hayatae* seeds. The seeds of stratification treatment and control of *F. hayatae*, both had more than 90% germination rate after sowing for 30 days. The effect of stratification and scarification were about the same in interspecific hybridization seeds. Low survival rate of interspecific hybridization seedlings was caused by low fertility seeds, especially the seeds with hollow heart might be the evidence of barrier in embryo and endosperm development.

Chromosome number of root tip in *F. hayatae* was investigated, which was $2n = 2x = 14$, and in the 10 offsprings of *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* 4 of them were aneuploid, with the chromosome number ranging from 44 ~ 53, 5 of them were octoploid, and one plant was hexaploid. The octoploid hybrid progenies might be due to pollen contamination or apomixis. The other five aneuploidy plants suggest that there were due to disorder during meiosis.

In meristem culture of *F. hayatae*, primary medium by 1/2 MS with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA was the best growth conditions for the proliferation medium was 1/2 MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA. Cultured plants subcultured into the proliferation medium with BA removed, could promote rooting.

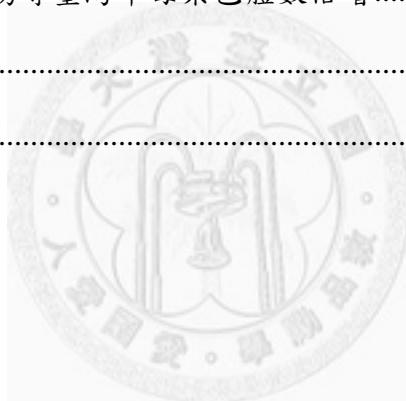
Eight plantlets were obtained from a tissue culture test, which used the culture medium as further mentioned with $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine added. But the chromosome number of all of them were $2n = 2x = 14$.



目 錄

口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	iv
目 錄	- 1 -
圖目錄	- 3 -
表目錄	- 3 -
第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	2
第一節 草莓之分類	2
第二節 草莓之育種方法	5
第三節 臺灣之草莓育種	9
第四節 草莓之多倍體化	10
第五節 草莓倍數體之檢測	11
第六節 草莓種子之發芽	12
第七節 草莓之組織培養	13
第三章 材料與方法	16
第一節 材料來源與管理	16
第二節 臺灣草莓與栽培種草莓之種間雜交	17
第三節 種間雜交種子與臺灣草莓開放授粉種子發芽試驗	17
第四節 染色體數檢測	19
第五節 臺灣草莓之組織培養與秋水仙素誘變	20
(一) 臺灣草莓之莖頂組織培養	20

(二) 誘導臺灣草莓之癒傷組織.....	20
(三) 秋水仙素誘導臺灣草莓染色體數倍增.....	21
第四章 結果與討論.....	22
第一節 臺灣草莓與栽培種草莓之種間雜交.....	22
第二節 臺灣草莓開放授粉之種子與種間雜交種子發芽試驗.....	24
第三節 染色體數檢測.....	28
第四節 臺灣草莓之組織培養與秋水仙素誘變.....	29
(一) 臺灣草莓之莖頂組織培養.....	29
(二) 誘導臺灣草莓癒傷組織.....	30
(三) 秋水仙素誘導臺灣草莓染色體數倍增.....	31
第五章 結論.....	33
參考文獻.....	49



圖目錄

圖 1. 以濕冷層積、刻傷及直播處理之紅莖臺灣草莓種子累積發芽率。.....	34
圖 2. 以濕冷層積、刻傷及直播處理之綠莖臺灣草莓種子累積發芽率。.....	35
圖 3. 刻傷處理之臺灣草莓種子發芽情形。箭頭所指為發芽不正常之種子及發霉處。.....	36
圖 4. 根尖壓片染色體數目。(a) <i>F. hayatae</i> (紅莖) $2n = 2x = 14$ (b) <i>F. hayatae</i> (綠莖) $2n = 2x = 14$	36
圖 5. <i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3' × <i>F. hayatae</i> (紅莖)之雜交後代中，非整倍體數染色體之根尖壓片。(a) #3 ($2n = 53$) (b) #4 ($2n = 46$) (c) #6 ($2n = 46$) (d) #15($2n = 44$).....	37
圖 6. <i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3' × <i>F. hayatae</i> (紅莖)雜交後代中，具 56 條染色體之根尖細胞。(a) #5 ($2n = 56$) (b) #7 ($2n = 56$) (c) #8 ($2n = 56$) (d) #12 ($2n = 56$) (e) #13 ($2n = 56$).....	38
圖 7. <i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3' × <i>F. hayatae</i> (紅莖)雜交後代 #11 之根尖壓片細胞，染色體數為 $2n = 6x = 42$	39
圖 8. 草莓花粉粒之外觀 (a)桃園三號草莓 (b)臺灣草莓。箭頭所指處為較大之花粉粒。.....	39
圖 9. 種間雜交後裔六倍體 #11，(a)生長勢弱且(b)不易結果。.....	40
圖 10. BA 濃度對紅莖與綠莖臺灣草莓成活率之影響。.....	40
圖 11. BA 濃度對紅莖與綠莖臺灣草莓褐化之影響。.....	41
圖 12. 綠莖臺灣草莓瓶內增殖情形。.....	41
圖 13. 臺灣草莓以不同培養基配方之癒傷組織發生率。.....	42
圖 14. 以 $1/2 MS + NAA 0.2 mg \cdot L^{-1} + BA 0.25 mg \cdot L^{-1}$ 誘導之臺灣草莓癒傷組織。.....	43

表目錄

表 1. 2009 年臺灣草莓與桃園三號草莓互交結果.....	44
表 2. 2010 年臺灣草莓與栽培種草莓互交結果.....	45
表 3. 紅莖與綠莖臺灣草莓種子發芽之 90%發芽所需日數、95%發芽所需日數及 90%與 95%平均發芽日數.....	46
表 4. 濕冷層積與直播處理臺灣草莓與桃園三號草莓互交之種子發芽數.....	47
表 5. 刻傷處理與直播對 <i>F. hayatae</i> (紅莖) × ‘ Taoyuan No. 3’之種子發芽率和存活 率.....	48
表 6. 臺灣草莓莖頂處理秋水仙素之結果.....	48



第一章 前言

草莓是薔薇科(Rosaceae)草莓屬(*Fragaria*)植物的泛稱，屬於多年生草本植物，目前經濟生產以鳳梨草莓(*Fragaria ×ananassa* Dach.)為主。依染色體倍數，可將草莓分類為二倍體群、四倍體群、五倍體群(Lei et al., 2005)、六倍體群、八倍體群及十倍體群(Hummer et al., 2009)六個族群。目前發現原生於臺灣的唯一個種，稱為臺灣草莓(*Fragaria hayatae* Makino)，屬於二倍體群，分佈於海拔2000公尺，向陽且日照充足之高山地區(李, 2008)。

臺灣草莓果形小，如要應用生產，必須透過種間雜交與染色體倍增技術。草莓二倍體與八倍體種間雜交(Li et al., 2000; Marta et al., 2004)及染色體倍增(Dermen and Darrow, 1938)均有成功的案例。臺灣草莓與栽培品種間的雜交，可改良草莓品種和具有擴大其遺傳背景之潛力。臺灣草莓花芽分化所需的短日與低溫條件，是臺灣高海拔地區草莓夏季生產之必須性狀，也可能是平地冷藏苗或盆栽草莓生產必備的要件；同時，有作為倍數體育種親本潛力。

染色體倍增處理後，為確認染色體數目倍增與否，可以以形態外觀判別作為基礎，再以細胞學觀察、染色體數目及分子技術作精確的確定。草莓染色體數目鑑定，因其倍數體複雜($x = 7$, $2n = 14, 28, 35, 42, 56, 70$)，且染色體小及有絲分裂細胞體積小而不易觀察。染色體數鑑定方法中，最常使用根尖壓片，再以顯微鏡觀察體細胞之染色體數。

本論文的目的是在測試臺灣草莓經由染色體倍增與種間雜交之可能性。透過於培養基中加入秋水仙素之方式來使染色體倍增。種間雜交則是與鳳梨草莓中的‘桃園一號’(‘Taoyuan No. 1’)與‘桃園三號’(‘Taoyuan No. 3’)作互交，希望能開啟臺灣草莓的利用途徑。

第二章 文獻回顧

第一節 草莓之分類

草莓是薔薇科(Rosaceae)草莓屬(*Fragaria*)植物的泛稱，與其親源性近的有蛇莓屬(*Duchesnea*)與翻白草屬(*Potentilla*)植物(Hancock,1999)。雖然 *F. vesca*, *F. virginiana* 及 *F. chiloensis* 都曾經被經濟栽培過，但目前經濟生產以鳳梨草莓(*Fragaria × ananassa* Dach.)為主，因而前述三個種轉成為僅供趣味栽培用，其他種大多為野生種草莓。草莓的屬名 *Fragaria* 是由法語 *Fragrans* 芳香之意衍生而來，栽培種的種名 *ananassa* 則是形容其果實像鳳梨的意思。

Darrow (1966)及 Hancock (1999)整理出三種草莓分類法，分別為果型分類、光週期反應分類及染色體倍數分類法。

一. 依果型分類

Darrow (1966)依草莓果實之外型分為八類，分別為扁圓形(oblato)、球形(globose)、球狀圓錐形(globose conic)、圓錐形(conic)、長圓錐形(long conic)、具有頸部的(necked)、長楔形(long wedge)及短楔形(short wedge)。

二. 依開花所需之光週分類

草莓花芽之形成，受光週期與溫度相互作用之影響。依照對光週期的反應，可將草莓分為短日型(short day type)、日中型(day neutral type)及長日型(long day type)三類。其中，短日型草莓在日長短於臨界日照 14 小時，或溫度低於 15°C 時下，適合行花芽分化；溫度高於 15°C，則所需日長時間依品種而異，約在短於 8~12 小時之間。日中性型草莓是由 *F. virginiana* ssp. *glauca* 的一個自然繁殖系衍生而來(Powers, 1945; Bringham and Voth, 1984)，其不受光週期影響，走莖苗在種植三個月後，即能開花且冠芽能進行分蘖，但高溫會抑制其花芽分化。長日型草莓在日長 12 小時以上才能行花芽分化，對溫度需求中等(Hancock, 1999)。由於對光週的反應使草莓結果習性差異很大，故再依草莓結果習性可分為，一

年僅結果一次之 June-bearing 型，及一年內可在生長季多次結果，即不間斷開花之 Everbearing 型。June-bearing 型的草莓，主要是休眠性較深的短日型(short day type)草莓，適合高緯度地區種植。不間斷開花型的 *F. vesca* 被認為是歐洲早期八倍體 everbearing 性狀的始祖(Richardson, 1914)。Everbearing 早期依光週分為日中性型(Day-neutrals)和長日型(Long-day)兩類，目前則增加休眠性淺的超短日型(Infra-short-day)草莓。長日型的 everbearing 型草莓適合在高溫長日下花芽分化，對低溫長日無反應(Nishiyama et al., 2002)，不過在無長日下，對低溫敏感。日中性草莓之花芽分化對低溫敏感。超短日草莓是臨界短日超過 12 小時，但休眠性淺的品種。這些品種會在日長超過 12 小時，溫度較高的環境下及一定低溫下行花芽分化，故一年可開多次花。

三. 依染色體倍數分類

依染色體倍數可將草莓分類為，二倍體群、四倍體群、五倍體群(Lei et al., 2005)、六倍體群、八倍體群及十倍體群(Hummer et al., 2009)六群。

草莓屬中分布最廣且適應力最強的 *F. vesca* L. 為二倍體，原生於歐、美、亞及非洲，植株直立，株高約 15~30 公分，花為兩性花，多數為短日型植物，但少數品型(form)為日中性型(*F. vesca* f. *semperflorens*)，其中包含具有不產生走莖及白色果實性狀的品種(Hancock, 1999)。 *F. viridis*, *F. mandshurica* Staudt, *F. pentaphylla* Lozinsk, *F. nilgerensis* Schlecht 及 *F. hayatae* Makino 等同樣為二倍體草莓。 *F. viridis* 原生於歐洲及西伯利亞，植株葉緣鋸齒狀較 *F. vesca* 之鋸齒狀小，只產生少數的走莖，但果實比 *F. vesca* 的果型大。 *F. mandshurica*, *F. pentaphylla* 及 *F. nilgerensis* 皆原生於中國， *F. mandshurica* 土生於滿洲，漿果味酸； *F. pentaphylla* 生長在海拔 1000~2000 公尺，具五小葉與彎曲的萼片； *F. nilgerensis* 植株生長勢強健且遍布絨毛，果實小，瘦果數量多，密生且凹陷。

F. hayatae Makino，原生於台灣海拔 2000 公尺以上之高山，曾被歸類為 *F. nilgerensis* 的一個變種或特有亞種(Staudt, 1999)，中文名為臺灣草莓或早田氏草

莓；李等(2009)依據花之型態與分子標誌的差異，認為本種應為臺灣之特有種。臺灣草莓最早之文獻記載為 1908 年早田文藏(Buneco Hayata)之「Montana Formosae 台灣高山植物誌」，早田文藏於 1905 至 1924 年間，多次到台灣調查植物，並從事分類之工作，1906 年於玉山與塔山採集臺灣草莓樣本，但未採集到開花植株，因此標本不完全。直到 1911 年才在「台灣植物圖譜」中將其命名為 *Fragaria vesca* L. var. *minor* Hayata，但不符合國際植物命名法規。1912 年由牧野富太郎(T. Makino)再發表，為紀念早田文藏先生，以其姓氏給予種名，重新命名為 *F. hayatai* Makino，故臺灣草莓又稱早田氏草莓。此種草莓全株披毛，葉片為三小葉成闊倒卵形，葉緣鋸齒粗，葉柄長且葉脈深刻。花單生或數朵成總狀花序，花瓣為白色，具有五枚萼片。果實成熟時多呈紅色，瘦果多且小(郭, 1997; 陳, 1995)；台灣大學園藝系常綠果樹實驗室於小雪山地區，觀察到有別於紅色果實臺灣草莓之植株，其葉柄與走莖為綠色，花瓣與果實成熟時皆為白色，以 RAPD 分子標誌分析之結果，顯示此種草莓與臺灣草莓親緣關係接近(相似距離= 0.94)，推測其為臺灣草莓之變種(李, 2009)。

四倍體草莓有 *F. moupinensis* French.、*F. corymbosa* 與 *F. orientalis*。*F. moupinensis* French. 原生於中國西部的雲南、西藏東部，果實顏色呈橙紅色，果肉海棉質且風味淡，瘦果極凹陷，與 *F. corymbosa* 同為雌雄異株(dioecious)。*F. orientalis* 為三性異株(tridioecy)，原生於歐洲、西伯利亞西部的森林、山坡地區，適應多石的土壤，因原生於亞洲乾冷地區，因此頗具耐寒及耐旱的特性(Hancock, 1999)。

Brighurst et al. (1963；1966)在美國加州混合種植 *F. chiloensis* 和 *F. vesca* 的田間，觀察到自然的五倍體後代，命名為 *F. brighurstii* (Staudt, 1999)；Lei 等(2005)在中國吉林省也觀察到自然的五倍體後代，稱之'Jilin 4'，'Jilin 4' 分布的區域附近有 *F. mandschurica*, *F. vesca*, *F. orientalis* 與 *F. moschata* 等草莓。

六倍體草莓僅 *F. moschata* Duch. 一種，原生地分布範圍西自北歐斯堪地維

亞地區、歐洲大西洋海岸，向東到中歐及東歐、俄國和西伯利亞。植株生長勢旺盛，高於許多 *F. virginiana* 和 *F. chiloensis* 的品系，株高約 10~40 公分，原生種為雌雄異株或雌雄同花，而栽培種常為完全花。果實較 *F. vesca* 者大，帶有強烈的葡萄酒或麝香香氣，瘦果突起。

八倍體草莓有原生於美洲的 *F. virginiana* 和 *F. chiloensis*，及前述兩者自然雜交而得之栽培品種 *F. ×ananassa* Duch.。三者皆為三性花植物(Hancock, 1999)。歐洲目前並未發現原生之八倍體草莓，在亞洲原有一種原生之八倍體草莓，稱之 *F. iturupensis*，但後來經 Hummer 等(2009)以根尖壓片及流式細胞儀檢測，證實 *F. iturupensis* 為十倍體草莓。

第二節 草莓之育種方法

無性繁殖果樹之品種改良方法可採用引種、營養系選種、實生選種、雜交育種、誘變育種及多倍體育種等方法。其中，草莓之雜交育種，由於可以用無性繁殖繁衍後裔，故雜交第一代如有優良的基因組合，無需經過分離純化，可以經由無性繁殖穩定地傳遞，不產生分離重組，雜種優勢也可以穩定地保持下去。而雜交育種成敗的關鍵，在於根據性狀遺傳規律，科學地選配親本(徐, 1990)。

(一)親本選擇

以優良的親本雜交，得到優良草莓品種的機率較高。因此，選出好的親本是重要的工作(Meulenbroek et al., 1997)。親本之性狀遺傳力高時，可用表現型作為選擇的基礎；然而對於一些遺傳力較低的性狀，比較適合用後裔檢定(progeny testing)方法，來當作雜交組合的參考依據(Meulenbroek et al., 1997)。一般而言，育種者會選擇最好的品種作為雜交組合，例如將兩個具有大果的品系雜交，可以得到大果的後裔(Faedi et al., 2002)。另外，也有從野生種的草莓導入特定的性狀，例如從 *F. virginiana* spp *glauca* 導入日中性結果的特性(Faedi et al., 2002)。

(二)育種策略

在育種上，常用的方法有，品種間雜交、近親交配、種間雜交(Interspecific Hybridization)、屬間雜交、倍數體育種與誘變育種等。草莓為高度異質結合的作物，但具有用無性繁殖保存優良性狀的優點，因此育種時，一次雜交後即可選種，是極易育種之植物。草莓在過去二十多年有大量的品種育成(Faedi et al., 2002)，多以雜交育種的方式為主。雜交育種即將草莓異質結合品系雜交後，即篩選出具有最好農業性狀的品系，而一個品種需經過選拔程序約 8 年，增殖約 3 年，因此推出一個新品種共需 10-12 年的時間(Betvelsen et al., 1997)。

1. 品種間雜交或近親交配

由於草莓可以由走莖檢測和保存高異質性的基因型，因此生產自交系的好處似乎不多，然而自交系仍能成功的得到一些特別的基因性狀。Jones 與 Singleton (1940)及 Anstey 與 Wilcox (1950)最早研究近親交配。Morrow 與 Darrow (1952)發現，自交一代之選系比親本生育力弱、低產且果實小。但 Spangelo 等(1971)觀察到'Howard 17'自交系生產的第五代'Howard 17'產量高於親本，另外將不同品系的草莓自交後裔彼此雜交，可得到超越親本的後代，如'Albritton'即為兩個自交選系間雜交育成(Morrow and Darrow, 1952)。自交選系間雜交之優點是將欲得到的性狀集中，缺點是自交系維持不易。有不少栽培種為自交產生，如'Reiko'和'Aliso'。Craig 等(1963)觀察到自交改善了植株直立性、葉的生長健康，同時葉和果實外觀較均一。

2. 屬間雜交

翻白草屬 *Potentilla* 與草莓屬植物性狀相似，兩者之單套染色體數皆為 7 條($x = 7$)。Bentham 與 Hooker (1982)建議應將兩者合併為同一屬，Kalkman (1968)同意上述觀點，並指出維持現狀是因為已慣用現有之學名。雖然分屬於兩屬，但兩者親緣關係近，且能產生雜交後代，因此 *Potentilla* 被視為草莓育種之材料，並且能將新的種質(germplasm)帶入草莓屬植物中。

兩者屬間雜交最早之文獻為 Mangelsdorf 與 East (1927)，將 *F. vesca* (2x) 與 *P. nepalensis* (6x) 雜交，其後代無法順利成株。Ellis (1962) 將 *Fragaria* 與 *Potentilla* 屬間雜交，16 個雜交組合中有 7 個獲得雜交幼苗，其中 4 個生長至成熟開花，*F. ×ananassa* × *P. fruticosa* (2x) 雜交後代為不稔之五倍體；*F. ×ananassa* × *P. palustris* (6x) 雜交後代為七倍體，雌稔性但雄不稔，但生育旺盛；十倍體之 *Fragaria* 與 *P. fruticosa* 雜交後代為不稔之六倍體；4x 之 *F. vesca* 與 *P. fruticosa* 雜交後代為不稔之三倍體。

3. 種間雜交

種間雜交後代變異大，在創造新種、新類型與新品種方面具有獨特之處。八倍體草莓屬之種間雜交，後裔通常具稔性，可改良栽培品種的特性。在抗病、耐寒性、抗立枯病與耐毒素病等育種上，多半以八倍體的 *F. virginiana* 及 *F. chiloensis* 與現有栽培種 *F. ×ananassa* 行回交育種，以 *F. ×ananassa* 作為回交親。例如現有的日中性(Day-neutral)結果特性是從 *F. virginiana* spp *glauca* 導入至現有栽培種而成。Bauer (1993) 用 *F. vesca* 和 *F. ×ananassa* 雜交後，再倍增其後代染色體數，培育出 10 x 之‘森林鳳梨草莓’ (*F. ×vescana*)，並從中選出一個品種‘Florika’，‘Florika’果實比栽培品種小，但香味較濃(Bauer, 1993)。Noguchi 等 (1997) 用 *F. ×ananassa* ‘豐香’與 *F. nigerrensis* 雜交，再行染色體倍增，得到 10 倍體的‘久留米 IH1 號’。‘久留米 IH1 號’最大果可達 20 g，具有濃郁的桃香味，極早熟，溫室栽培時連續抽生花序能力強，缺點為果實太軟(Noguchi et al., 1997)。

4. 倍數體育種與誘變育種

二倍體與其他倍數體間自然雜交的研究很多(Bringhurst and Khan, 1963; Bringhurst and Senanayake, 1966; Bringhurst and Gill, 1970; Lei et al., 2005; Noguchi et al., 1997)，其中 Lei 等(2005)於中國發現自然五倍體草莓；Bringhurst and Khan (1963)也觀察到自然雜交產生的六倍體與九倍體植株。人工雜交得到的草莓有三倍體、四倍體、五倍體、六倍體、八倍體、十六倍體(Dermen and Darrow,

1938)及 32 倍體(Darrow, 1966)。

誘導草莓多倍體研究已進行多年，Dermen 和 Darrow (1938) 利用秋水仙素處理 *F. vesca* L. 種子，得到四倍及十六倍體的草莓植株。雷等(1999)採用組織培養，並結合秋水仙素誘導多倍體的方法，獲得五葉草莓(*F. pentaphylla*)的染色體數加倍植株。其中也有為了減少變異性，不使用組織培養技術，而直接以秋水仙素浸漬草莓走莖，得到多倍體草莓的作法(Ahokas, 1998)。

不同倍數體間雜交較困難，相同倍數體間雜交則易成功。Evans (1974)以二倍體*F. vesca*, *F. viridis*, *F. nubicola*, *F. nilgerrensis*及*F. (vesca × viridis)*當母本與六倍體*F. moschata*當父本，雜交43朵花後，僅得2粒種子發芽，且皆未能成株；Bors與Sullivan (2005a)以*F. moschata*當母本與*F. viridis*當父本雜交，每次授粉平均得到1.4株後代；以*F. viridis*為母本與父本*F. moschata*雜交，每次授粉平均得到1.1株後代；以*F. nubicola*當母本與*F. moschata*當父本雜交，每次授粉平均得到3.3株後代，較Evans (1974)得到較多的雜交後代，推測為胚與胚乳發育受阻。Bors與Sullivan (2005a)使用組織培養技術，使胚或胚乳發育不良之種子得以成株。

二倍體與八倍體間雜交存有障礙(Evans, 1974; Li et al., 2000; Marta et al., 2004)；以*F. ×ananassa* 'Honeoye' × *F. vesca* 'Changsen'，結果後取得種子，由303顆種子得到84個雜交後代，得到後代機率不高。推測可能因*F. vesca*的花粉在*F. ×ananassa*柱頭上萌發率低、有的花粉管萌發不正常，或是胚與胚乳發育不良造成(Li et al., 2000)。利用雜交形成多倍體時，後代大有稔實性的問題，如*F. vesca*與栽培種草莓雜交後代無法結果 (Dogadkina, 1941 ; Fedorova, 1934, 1946a; Ichijima, 1926, 1930; Mangelsdorf and East, 1927; Nilsson and Johansson, 1944; Schiemann, 1943; Yarnell, 1931)。Scott (1951) 利用秋水仙素誘導*F. vesca*之同源四倍體與栽培種草莓雜交，得到可以些微結實的雜交六倍體；Niemirowicz-Szczytt等(1986) 將雜交植株，以莖頂培養技術，於MS培養基中加入25、50及75 mg · L⁻¹秋水仙素，處理48小時，以改善其稔性。因此，可使用秋

秋水仙素倍增染色體，作為克服稔實性問題之方法。

Evans (1977)利用 2x、4x 和 6x 草莓間雜交，並且配合使用秋水仙素以育成八倍體，此種利用倍數體間雜交，將低倍體草莓之基因轉殖入八倍體草莓之育種系統，稱之為 SO (synthetic octoploid)系統。延續此種方法，陸續有學者利用不同的草莓材料育出多倍體草莓 (Bors and Sullivan, 2005a; Bors and Sullivan, 2005b; Noguchi et al., 2002)。

第三節 臺灣之草莓育種

臺灣之草莓育種進行過引種、營養系選種、實生選種及雜交育種等。民國 23 年，曾引種試作在陽明山高冷地帶，民國 37 年，前台北區農業改良場再引進‘福羽’，蘆洲農友亦引進‘Marshall’進行試種，至民國 49 年，金山農場從事大規模草莓栽培，引起當時臺灣草莓栽培之熱潮(王, 1966)。民國 58 年，陳培昌研究員進行草莓雜交育種的試驗，以‘阿美利加’、‘福羽’、‘愛利收’等品種雜交，選出三優良品系，但未推廣(陳, 1977)。民國 62 年，新竹區農業改良場引入‘春香’、‘大石四季成’、‘芳玉’、‘久留米 32 號’及‘久留米 103 號’等五個品種，經比較試驗及區域試驗後，選出‘春香’推廣種植。民國 69 年後李窓明研究員重新接續雜交育種工作(李, 1995; 李, 2004)，民國 79 年推出‘桃園一號’（‘豐香’），後於民國 82 年推出‘桃園二號’（‘豔紅’），並在民國 87 年推出‘桃園三號’（‘狀元紅’）。

誘變育種及多倍體育種的部分則較少進行。李(2009)首次利用原生於台灣之二倍體草莓，*F. hayataea* 作為倍數體育種之親本材料。由於 *F. hayataea* 花芽分化所需的短日及低溫的條件，為台灣高海拔地區草莓生產所必須之性狀，也可以是平地冷藏苗或盆栽草莓生產必備的要件(李等, 2007)，故有作為倍數體育種親本之潛力。以 *F. hayataea* 與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’進行種間雜交，得到 21 株成活後代(李, 2009)。

第四節 草莓之多倍體化

Winker (1916) 將龍葵 *Solanum nigrum* 與番茄 *Solanum lycopersicum* 嫁接，從其癒傷組織得到了四倍體植物，首先引入了多倍體這一概念。植物之染色體倍數，原則上是以染色體組為單位，當染色體數達 3 組或 3 組以上者，稱為多倍體。多倍體可由自然發生或人為誘變產生。由同一物種染色體組增加而來的，稱之同質多倍體 (autopolyploid)，由不同物種雜交所得之多倍體，稱為異質多倍體 (allopolyploid)。天然多倍體的發生頻率雖低，但常為育種材料的重要來源。因自然突變而得之實用品種中，以柑橘類最多，如溫州蜜柑、葡萄柚、甜橙與檸檬等，均具有變種。Blakeslee 和 Avery (1937) 用秋水仙素誘變多倍體成功，則標誌著人工創造多倍體時代的開始。

經由種子而產生之染色體變異個體，大多是因減數分裂之異常，產生倍數性配偶子受精而得。Einset (1948) 以蘋果之 'Northern Spy', 'Delicious', 'Macoun', 'Cortland', 'Mc Intosh' 等，共 13 個品種為材料，進行 $2x \times 2x$ 之雜交，在其雜交後代 6825 株中，有 19 株為 $3x$ ，3 株為 $4x$ ，3 株為 $2x-4x$ 鑲嵌個體。其中， $3x$ 個體可能來自於，減數分裂異常之二倍性配偶子，與正常配偶子受精。 $4x$ 個體可能來自於，減數分裂異常之雌、雄配偶子相互受精。而 $3x$ 出現頻度約為 $2x$ 之 $1/300$ 。綜觀蘋果之栽培品種中約有 25% 為 $3x$ ，可知 $3x$ 比 $2x$ 更具優異性。如此自然發生染色體數之變異情形除了蘋果外，尚有梨屬及葡萄屬等。

草莓屬植物演化出多種倍數體，與其配子不行減數分裂有關 (Federova, 1934, 1946; Scott, 1951; Islam, 1960; Ellis, 1962; Staudt, 1952, 1967; Bringham et al., 1970)。相較於其他植物，*Fragaria* 配子不行減數分裂的現象常見 (Dogadkina, 1941; Yarnell, 1931)。

Yarnell (1930) 研究整倍體與非整倍體之草莓屬植物，利用兩種二倍體草莓雜交，F1 後代再自交得到的後代中，得到四倍體草莓。檢視其花粉母細胞之減數分裂，發現相當不規律。接著以此四倍體草莓與八倍體進行雜交，後代植株

中，具有 42 及 40 條染色體者；此四倍體草莓自交後代中，也有 35 條染色體的植株產生。

第五節 草莓倍數體之檢測

確認植株之倍數體，可以以形態外觀判別為基礎，再以細胞學觀察、染色體數目及分子技術來確定。Blakeslee and Avery (1937)以秋水仙素誘導曼陀羅 (*Datura stramonium*)形成多倍體時，觀察其花朵隨著染色體倍數增加而變大；Jaskani 等(2005a)以化學誘變劑倍增植物染色體數時，觀察到染色體數倍增之西瓜葉片變寬及葉形指數變小；Yang 等(2006)使用秋水仙素誘導葡萄體胚染色體數倍增時，以氣孔密度來進行初步判斷；Jaskani (2005b)觀察到染色體數倍增的四倍體西瓜花粉粒較二倍體西瓜大，且具有四個花粉萌發溝孔，多於二倍體西瓜之花粉萌發溝孔數。

草莓染色體數目鑑定，因其多倍體的狀態複雜、染色體小及有絲分裂細胞體積小而有難度(Iwatsubo and Naruhashi, 1989)，其染色體數目直到 Ichijima (1926)、Kihara (1926)及 Longley (1926)才有較突破性之進展，Longley (1926)指出草莓染色體單套數目為 7 條($x = 7$)。Yarnell (1928)以 *F. collina*, *F. maxima* 及 *F. nilgerrensis* 之根尖，用 Flemming's 溶液固定，切片厚度為 6 到 8 微米，使用染劑為 Haidenhain's iron-haematoxylin，發現草莓染色體直徑大約相同，但長度不同，以測微計將 14 條染色體長度分為七類，即 1.7；1.5；1.4；1.3；1.2；1；0.9 微米。

確認草莓染色體數目，最常使用其根尖壓片，再以顯微鏡觀察體細胞之染色體數。Bringhurst 與 Kahn (1963)將雜交後代之五倍體草莓，根尖以 *p*-dichlorobenzene 作前處理，固定液為 3 ethanol:1 propionic acid，染劑為 alcoholic hydrochloric acid carmine，根尖浸於染劑存放於 0°C 下至少一星期。Niemirowicz-Szczytt and Zakrzewska (1981)檢測 *F. ×ananassa* 之根尖染色體，是

以 Carnoy's fluid [95% ethanol : chloroform : acetic acid = 6 : 3 : 1 (Darlington and La Cour, 1962)] 固定細胞，然後以醋酸洋紅(acetocarmine)在 4°C 下染色一星期。也有以 8-hydroxyquinoline 進行前處理，Farmer's fluid [3 ethanol 95%:1 acetic acid (Berlyn and Miksche, 1976)] 固定，接著以不同染劑，檢測草莓染色體染色情形者 (Iwatsubo and Naruhashi, 1989)。Owen 與 Miller (1993) 觀察栽培種草莓染色體，樣品於 14°C 下使用 α -bromonaphthalene 浸泡 5 小時為前處理，再以 Farmer's fluid 固定，接著使用 1N HCl 於 60°C 下處理 15 分鐘後，最後以 altered carbol fuchsin (Martens and Reisch, 1988) 染色觀察之。Preeda 等(2007)於傍晚取根，將材料浸於 2 mM 8-HQ 中，再以 Farmer's fluid 固定後，置於 1N HCl 下 2 小時，接著於 42°C 下處理酵素 4% cellulose + 0.3% pectolyase + 2.1% macerozyme 25 分鐘，以軟化根尖，最後以 60% 醋酸浸泡 5 分鐘後，以 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 染色。

第六節 草莓種子之發芽

草莓種子從播種 10 到 140 天之間發芽，發芽不規律而且變異大，為育種上一大限制因素(Bringhurst et al., 1957; Scott et al., 1948; Scott et al., 1966; Scott et al., 1970; Scott et al., 1973)。

影響草莓種子發芽率的因素很多，品種是重要因子之一 (Adam et al., 1967; Clark, 1931; Fadeeva et al., 1962; Melville et al., 1980; Scott et al., 1955; Scott et al., 1975)，Darrow (1933) 觀察 *F. virginiana* 播種後短時間內即可發芽，而 *F. chiloensis* 則發芽緩慢且不整齊。

草莓果實成熟後採收，洗淨乾燥之種子置 1~4°C 下儲藏 23 年以上仍可保持高的活力 (Scott et al., 1970)。種子發芽介質可用濾紙或水苔，促進草莓種子發芽可用硫酸處理 (Jonkers, 1958; Zoubov and Avhipoy, 1969)；Negi 與 Singh (1972) 以 0.25% 硝酸或用過氧化氫浸泡種子 24 小時，發芽率比未處理者提高；但也有

以濃硫酸處理無顯著提升發芽率之結果 (Scott and Ink, 1948 ; 邱, 1971)

光線對草莓種子發芽率亦有影響，Scott 與 Draper (1967)觀察到，草莓種子在光下之發芽率高於置黑暗者；邱(1971)研究蛇莓及臺灣草莓種子之發芽，指出兩者之發芽皆需要光。

低溫下後熟，可提高發芽率(李, 1982 ; Adam et al., 1967 ; Henry, 1935 ; Scott et al., 1973 ; Thompson, 1969) ; Bringhurst 及 Vote (1957)用濕冷層積的方法處理草莓種子促其發芽，認為需三個月以上才有效；Thompson (1969)觀察草莓種子經 2°C 處理 6~8 週後再播種，可提高發芽率，但以 GA 及 Thiourea 等化學藥劑，處理八倍體的草莓種子，促進發芽之效果不佳。也有不經處理直接洗淨播種，亦得良好發芽率之情形(李, 1982 ; Henry, 1935)。

Jonkers (1958) 使用 'Climax', 'Jucunda' 及 'Deutsch Evern' 等品種，其開放授粉取得之種子，存放低溫乾燥下八個月後，再進行試驗，經 3~5°C 處理 16 天後發芽率低，他認為，草莓種子的發芽不整齊及發芽率低，是因為其種皮不透性，而非種子後熟不完全。Miller 等(1992)使用 'Catskill' 草莓不同成熟度之種子，分別進行直播和刻傷處理，其中完熟瘦果之發芽情形最好，另外不論何種成熟度，刻傷處理者之發芽率相較直播者為高。

為提高草莓雜交種子之發芽率，使用組織培養的方法，切開瘦果的表面，再放入 MS 培養基中促進種子發芽，七天內發芽率可達 60% 以上。

第七節 草莓之組織培養

草莓多用匍匐莖或分蘖繁殖，但長期無性繁殖會造成品種退化、果實品質下降、產量降低，且易受病毒的侵染危害，透過組織培養的方法可快速繁殖，提高育種效率，和得到去病毒植株。最早使用組織培養增殖草莓的文獻為 Boxus (1974)；由於植物細胞具有全能性(Totipotency)，故各部分器官理論上皆可做為組織培養之材料(George et al., 1984)；草莓作為培植體部分有葉片(Passey et al.,

2003; Yonghua et al., 2005)；葉柄、托葉與根(Passey et al., 2003)；莖段(Graham et al., 1995)；走莖(Liu and Sanford., 1988)；花藥(Owen and Miller., 1996)等。一般研究顯示以莖頂為培植體者，不但大量繁殖之效果較其他組織佳，且可得到去病毒之健康種苗(Kassanis, 1957；Lai et al., 1983)，Boxus (1974)首先建立草莓無病毒健康種苗試管繁殖體系。另外，蔡(1994)以莖頂培養，研究熱處理對草莓植株生理及生長之影響，由試驗得知，經 38°C 熱空氣處理 2-8 週之組織培養苗，再取莖頂培養，其初期生長快，生長勢較佳，且有較高的側芽發生率，發根情形則以熱處理 4 週者最早；Bolton (1966)以 35°C 熱處理 12 日，可使 mottle, veinbanding 及 latent-C 等毒素失去活性。除熱處理外，生長點組織培養為去病毒可行方法之一(王等, 1975; Leu, 1972; Mori, 1971; Vine, 1968)。

莖頂培養過程中不定芽的誘導與生根，易受培養基中植物生長激素種類與濃度(Murashige et al., 1972; 蔡, 1994)、培植體來源、種類與大小等因素影響。植物生長調節劑中，對植物生長與分化影響最大者為 Auxin 與 Cytokinin (Murashige, 1974)。Auxin 在組織培養之利用，其主要目的為促進芽體之生長及誘導癒合組織之產生。常用之 Auxin 類為 IAA、NAA 及 2,4-D。2,4-D 誘導癒傷組織之效果顯著，但因易引起染色體之變異，故莖頂培養時大多利用 NAA (George et al., 1984)。Cytokinins 具有抑制植物頂芽優勢，促進側芽生長及不定芽形成之能力(Hussey, 1976)，一般常用之 Cytokinin 為 2ip 及 BA，因 2ip 較昂貴，故常用 BA(Murashige, 1974)。Skoog 和 Miller (1957)指出，Cytokinin 和 Auxin 使用之比例可決定癒合組織形成器官的能力，Murashige(1977)綜合前人之研究推論出，Auxin/Cytokinin 之比，高時產生根，低時產生不定芽，相等時則產生癒傷組織。許多作物進行莖頂培養時，BA 一定要和 NAA 共同使用，才能形成大量之不定芽。

組織培養也可增強誘變劑處理之效果，Niemirowicz-Szczytt 等(1986)在增殖草莓雜交個體時，使用 MS 培養基中加入秋水仙素 25、50、75 ppm，處理 48 小

時，以改善雜交後代之稔性。雷等(1999)於培養基中加入秋水仙素，觀察草莓莖頂外形的變化，有效誘導之植株具葉柄粗、生長慢及生根晚等表現。誘導體胚發生與植株再生的系統雖已建立，並以之成功得到轉植株(Donnoli et al., 2001; El Mansouri et al., 1996; James et al., 1990; Mezzetti et al., 2004)，但仍有體胚發生後植株再生率偏低的問題(Donnoli et al., 2001)，這與品種、植物生長激素濃度、培植體與光週期等有關。



第三章 材料與方法

第一節 材料來源與管理

本論文所使用之材料有栽培種草莓‘桃園一號’(*F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 1’)、‘桃園三號’(*F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’)與臺灣草莓(*F. hayatae* Makino); 臺灣草莓依莖段顏色性狀，又分為紅色與綠色莖段兩種。

‘桃園一號’與‘桃園三號’草莓穴管苗皆選購自關西農友張盛能先生之育苗圃。‘桃園一號’為 2009 年購買之植株，再移至七吋分離盆後作為實驗材料；‘桃園三號’草莓則為 2006 年購得之植株，經本實驗室自行以走莖繁殖之後代，作為試驗材料。臺灣草莓採集自台中東勢鎮大雪山國家森林遊樂區，及合歡山地區。

採集時取整棵植株並放置於封口袋中，以 GPS 進行採集區之定位。於大雪山國家森林遊樂區取紅莖及綠莖臺灣草莓各 15 至 20 株，採集地區之經緯度座標為 N 24°16' 48.7" E 121°01'41"及海拔高度為 2600 m；合歡山地區採集紅莖臺灣草莓 15 至 20 株，採集地為南投合歡山台 14 甲 24.5 K 處。

上述之試驗材料，皆栽種於臺灣大學園藝系 2531 研究室室外。栽培種草莓之栽培容器為黑色七吋分離盆，臺灣草莓栽培容器為三吋塑膠盆，介質皆為泥炭苔：根基旺 = 1:1，再加 5% 有機質。施肥部分為半年施用一次 180 日緩效性肥料(好康多一號 N:P₂O₅:K₂O = 14:12:14，台和園藝企業股份有限公司)、兩週施一次液肥(Wonder grow, N:P₂O₅:K₂O = 20:20:20)及微量元素 3000 倍(獅馬牌福翠農一號[®]，臺灣巴斯夫股份有限公司出品)；防治病蟲害約兩週施用一次藥劑，使用藥劑有玉田地公司出品之窄域油 300 倍(一路順[®])、辣椒精油(久芳興業有限公司)及稀釋 200 倍之碳酸氫鉀(Nihon Shiyaku Reagent, Japan)。

第二節 臺灣草莓與栽培種草莓之種間雜交

將二倍體($2n = 2x = 14$)臺灣草莓與八倍體($2n = 8x = 56$)栽培種草莓分別作為父母本，於 2009 和 2010 年共進行兩次互交試驗，以臺灣草莓為母本者雜交 35~70 朵花；栽培種草莓為母本之組合雜交 5~20 朵花。採集與儲藏花粉流程為：於花苞微露白色花瓣時摘除萼片及花瓣，以鑷子小心取下花藥，避免花藥碰觸其雌蕊柱頭，取下之花藥在室溫條件放置 1~2 天使其開裂，散出的花粉收集小鉢中，小鉢置於盛有乾燥劑的玻璃培養皿中，培養皿以膠帶密封後，於培養皿外貼上標示來源及採集日期之標籤，接著存放於 4°C 下，直至下次授粉時取出使用。採集完花粉之花苞，使用毛筆沾父本之儲藏花粉塗抹於其柱頭，再以秤藥紙摺成適當大小後，將授粉後之小花套袋，以塑膠標牌標示雜交親本及授粉日期，同一小花連續授粉三日。另外對 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 1’ 及 ‘Taoyuan No. 3’ 各去雄 10 朵花後套袋作為對照，以觀察去雄效果。種間雜交之套袋果實於授粉後 15~20 天去袋，試驗結束後調查雜交結果率及計算平均單果收穫種子數。

第三節 種間雜交種子與臺灣草莓開放授粉種子發芽試驗

(一) 種間雜交種子發芽試驗

將 2009 年以 *F. hayatae* 與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ 正反交獲得之果實，於成熟時採收。採收得之果實，使用鑷子將果實上之瘦果挑出，總共收集 1168 粒種子。將收集到的種子進行四種處理，分別為刻傷、對照、濕冷層積下 4 週及 8 週。刻傷部分是以解剖刀將種子表面進行刻劃；濕冷層積處理是以擦手紙包覆種子後以水沾濕，放入封口袋中，接著置於 4°C 之冰箱冷藏。

2010 年將紅莖 *F. hayatae* × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ 之種子，先以 1% 漂白水處理 30 分鐘後用滅菌水沖洗三次，再進行發芽試驗。發芽試驗放置處與擺放種子之培養皿，先以 1% 漂白水浸泡一分鐘，再以清水洗淨，並且以鑷子夾取瘦果，測試種子是否空胚，將空實者去除後，開始進行發芽試驗。首先將培

養皿鋪上一層滅菌紙，以無菌水潤濕後，將種子整齊排列且不相互碰觸，以減少發霉種子間真菌的傳播，最後以石蠟膜(parafilm, GREENWICH, CT. 06836, American National Can Company)密封，放入 25/20°C、光強度為 8000 lux 與光照 16 小時之生長箱中。

將上述完成前處理之種子，進行刻傷與對照兩種處理，處理種子數分別為 30 與 53 粒。2010 年除紅莖 *F. hayatae* × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’者，其餘雜交組合獲得之種子，皆使用相同步驟之前處理後，以直播進行發芽試驗。發芽試驗共進行一個半月，試驗開始後第五天觀察第一次，之後每星期觀察一次，種子胚根露出者即視為發芽種子，但子葉先萌發或生長不正常者，不列入正常發芽種子，正常發芽種子播種於三吋盆中。計算各雜交組合之空實率、發芽試驗結束後一周計算發芽率與存活率。

(二) 臺灣草莓開放授粉種子之發芽試驗

由於雜交種子發芽率低且發芽不整齊，故再檢測親本臺灣草莓紅莖與綠莖開放授粉種子之發芽情形。

種子收集地點為臺灣大學園藝系 2531 室室外，收集時間為 2010 年 2 月至 4 月。採集之種子分別進行刻傷、對照與濕冷層積一個月三種處理，每種處理之臺灣草莓，紅莖種子 145 粒與綠莖 85 粒，三種處理之試驗環境條件，與試驗前種子之處理如 2010 年雜交種子發芽試驗所述。

此發芽試驗共進行一個半月，試驗開始後第五天觀察第一次，之後每兩天觀察一次。種子發芽之標準與觀察項目與 2010 年雜交種子發芽試驗相同。由萌發之種子數，計算紅莖與綠莖臺灣草莓，90%所需發芽日數、95%所需發芽日數，作為發芽整齊度之指標。另外計算 90%及 95%平均發芽日數，作為發芽勢之指標。

第四節 染色體數檢測

使用根尖壓片法觀察染色體數目，檢測的對象有紅莖與綠莖之臺灣草莓、*F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 1’, *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’, *F. hayatae* × *F. ×ananassa* 雜交後代(李, 2009)及以秋水仙素誘變之臺灣草莓植株。

取紅莖與綠莖之臺灣草莓、*F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 1’及 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’之走莖處新萌發出一公分左右之根尖為材料，取根時間為 8~21 點間，每兩小時取一次，每一時間點取三個以上根尖；雜交後代及秋水仙素誘變植株取植株本體之幼嫩根尖，分別於 8~9 時、12 時及 17 時取根，每一時間點取三個以上根尖，進行製備及壓片。

根尖的製備流程為，將取下之根尖盛於 2 mM 8-HQ (8-hydroxyquinoline) 瓶中，於 18°C 下存放 8 小時。接著，置換到 Farmer’s 液(95%酒精:冰醋酸= 3:1)中固定 8 小時，處理至此階段之根尖，可進行製片的工作；存放一星期以上再製片之根尖，須置換到 70%酒精中，於 -20°C 下保存。製片時，從固定液或保存液中取出根尖，置於濾紙上吸收多餘液體，而後浸於溶劑為 1N HCl 之 2% Acetic orcein 溶液中 3 天，之後將根尖取出放到載玻片(SuperFrost®, Thermo Fisher Scientific Inc.)上，為了避免根尖乾燥，添加少許染劑潤濕之，於解剖顯微鏡(SD-2PL, Kyowa Optical Co., Ltd.)下以解剖針除去根尖上染成深紅色以外的根尖端，並將留下根尖端之表皮組織輕輕剔除，以拭鏡紙擦去剔除之組織和多餘染劑後，再添加少許染劑於根尖，此載玻片置於底部沾濕之容器中 1~2 小時後，取擦拭乾淨之 22×22 mm 蓋玻片，以 45° 傾斜角蓋住根尖的部分，用酒精燈微微加熱後，以竹筷子之頓端垂直輕敲蓋玻片，將根尖細胞壓散，加熱及敲打的步驟重複 2~3 次後，以濾紙覆蓋蓋玻片上方，拇指頭輕壓數下，完成之玻片以光學顯微鏡(Nicon Eclipse E600)觀察之，有良好影像之細胞以 1000X 油鏡觀察並拍照。

第五節 臺灣草莓之組織培養與秋水仙素誘變

(一) 臺灣草莓之莖頂組織培養

以不同培養基配方，測試臺灣草莓走莖之初代與增殖培養基。

試驗材料為：田間取下約 3 公分臺灣草莓紅莖與綠莖之新生走莖段，以清水沖洗三分鐘，再以 1% 漂白水添加少許 Tween 80，將莖段滅菌 20 分鐘，於操作台前以滅菌水沖洗走莖三到五次後，放置滅菌紙上備用。殺菌後之繁殖體以解剖刀除去走莖外葉，再以解剖刀背剔除莖段之絨毛，最後截取約 1 公分長之莖段入瓶。

初代與增殖培養基配方皆以 1/2 MS 為基本培養基，基本培養基中含 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖和 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的洋菜，pH 值調至 5.6~5.7，分裝於高 8 公分，直徑 3 公分之平底試管，瓶蓋附上錫箔紙轉緊，置於滅菌釜中以 121°C ，滅菌 20 分鐘後取出備用。培養環境為溫度 $22\sim 26^\circ\text{C}$ ，光照 16 小時。測試初代培養基配方共設 3 個處理，以基本培養基中分別加入 0.5 、 1 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之 BA，每處理接種臺灣草莓紅莖與綠莖莖頂培植體各 10 個，35 天後調查發霉率、褐化率及存活率。測試增殖培養基配方共設 17 個處理，包含以基本培養基中分別加入 0.05 、 0.1 、 0.5 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 與 0.25 、 0.5 、 1 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 之組合，及只含 1/2MS 之對照組，每處理接種臺灣草莓紅莖與綠莖莖頂培植體 10 個，35 天後調查發霉率、褐化率及存活率。以二項式分布進行褐化率及存活率之統計分析。

(二) 誘導臺灣草莓之癒傷組織

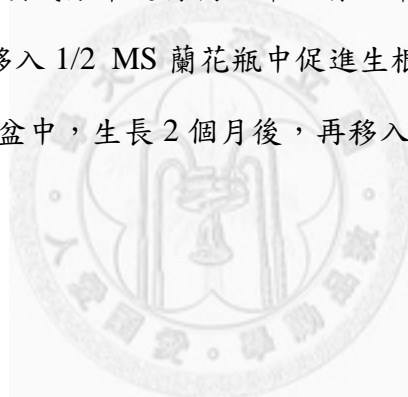
使用之基本培養基與培養溫度跟莖頂組織培養者相同，培養初期約 2 週，於黑暗下進行培養，之後再移至 16 小時光照下培養。測試誘導癒傷組織之配方，共設 9 個處理，以培養基中分別加入 0.1 、 0.2 、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 與 0.25 、 0.5 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 之組合，培養容器規格為直徑 9 公分，高 1.6 公分之塑膠培養皿，一個塑膠培養皿中放入 10~15 個培植體，一處理二重複。培植體為臺灣草莓莖頂組織培養瓶苗中葉片的部分。於操作台前，用解剖刀將小葉分割成 $5 \times 5 \text{ mm}$

之大小，葉背處平貼培養基表面排放。試驗期間一星期觀察一次，共觀察兩個月，調查發霉率、癒傷組織發生數及褐化率。

誘導之癒傷組織，選取 5 mm 左右之團粒，分別移入以 0.5 、 1 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 與 0.25 、 0.5 、 1 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 相組合的培養基中，以測試誘導不定芽與不定根之培養基。以二項式分布進行褐化率及存活率之統計分析。

(三) 秋水仙素誘導臺灣草莓染色體數倍增

使用之培植體為臺灣草莓走莖，共設 3 個處理，基本培養基中分別配置含秋水仙素 50 、 100 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，每處理接種臺灣草莓紅莖莖頂培植體各 18 個，處理 7 天後轉入不含秋水仙素的 $1/2 \text{ MS}$ 培養基中培養，兩個月後調查發霉率、褐化率及存活率，並以二項式分布進行褐化率及存活率之統計分析。存活植株於 2009 年 12 月 27 日，移入 $1/2 \text{ MS}$ 蘭花瓶中促進生根，待根系生長完全，開始馴化出瓶，移植到三吋盆中，生長 2 個月後，再移入七吋盆中培養。



第四章 結果與討論

第一節 臺灣草莓與栽培種草莓之種間雜交

於2009和2010年進行臺灣草莓與栽培種草莓種間雜交試驗。種間雜交之對照，即桃園三號'之去雄不授粉者，結果率為零(表1)。表1為2009年種間雜交之結果，小雪山紅莖*F. hayatae* × *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3'共雜交47朵花，結果率為47%，平均一個果實得到25粒種子，共收穫555粒種子，播種後有6粒種子發芽；綠莖臺灣草莓*F. hayatae* × *F. ×ananassa* 'Taoyuan No.3'共雜交36朵花，結果率為72%，平均一個果實得到21粒種子，收穫556粒種子，播種後無發芽者。兩者反交分別雜交10及5朵花，結果率皆為40%。以合歡山紅莖為母本，'桃園三號'為父本者，雜交3朵花，著果率66.7%，共獲得25個種子，每朵花平均收到12.5個種子，播種後有2粒發芽。以栽培種為母本之單果，得到的種子數皆少於十粒，低於以二倍體作為母本之種子數。

造成此種結果之原因，推測是因*F. hayatae*之花朵較小，收集花粉不易，改作為父本時，花粉之集團效應不佳所致。另外，草莓於台北栽培時，其獲取光照量較低，因此造成臺灣草莓營養狀況較差，進一步導致花粉量降低。於授粉時花粉量的不足或不均勻沾附，造成母本*F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3'之單果種子數偏低。改善臺灣草莓花粉量不足，可於6~8月花期時，至其原生地採集花苞，帶回平地再進行花粉採集；或是平地栽培者，施與肥料次數增加，以增進其生長，以期得到較多之花粉量。

F. ×ananassa 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* (紅莖)收穫25粒種子中，播種後僅1粒發芽，*F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3'與綠莖*F. hayatae*收穫之種子無發芽者。此年度發芽之種子，均未能成活(表1)。

有鑑於臺灣農民主要栽種品種為'桃園一號'，因此2010年新增*F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 1'為親本，與臺灣草莓行正反交。與2009年相同，兩個八倍體親本

除雄未授粉者，均未結果或獲得種子。以小雪山紅莖與小雪山綠莖分別作為父本，和‘桃園一號’為母本，各雜交5朵及4朵花，僅後者著果1顆，獲得2個種子；‘桃園一號’為父本，小雪山紅莖為母本，雜交1朵花，結果率100%，獲得16個種子，其中11個空實，但三個雜交組合之種子均未萌芽。而紅莖 *F. hayatae* × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ 雜交29朵花，結果率為19%，收穫168粒種子中，播種後21粒發芽，其中有14株成活；綠莖 *F. hayatae* × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ 雜交34朵花，結果率為18%，收穫45粒種子中，播種後10粒發芽，8株成活。*F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ × *F. hayatae* (紅莖) 雜交70朵花，結果率為10%，收穫28粒種子，播種後皆未發芽(表2)。

比較兩次雜交結果，2009年種間雜交之結果率為70~40%，較2010年25~10%為高，2010年之臺灣草莓，觀察到其開花較往年晚，且當年自野外採集之植株開花率僅12%，較前一年由野外採集之植株，開花率為74%，明顯偏低，應當為此一年度之氣候異常，造成其生長異常而使著果率偏低。又兩次的結果皆顯示，以臺灣草莓為母本雜交者結果率較高，而栽培種草莓為父本之單果，獲得種子數較多。綜合兩個年度的試驗結果，*F. hayatae*與*F. ×ananassa*雜交獲得後代之比例偏低。

Dermen and Darrow (1938)觀察到草莓不同倍數體間雜交時，高倍數體者當父本，低倍體數者作為母本較容易成功，此與本試驗的結果一致。李(2009)以 *F. hayatae* × *F. ×ananassa* 進行種間雜交，同樣以 *F. hayatae* 作為母本時，結果率較高。

第二節 臺灣草莓開放授粉之種子與種間雜交種子發芽試驗

於 25/20°C 之生長箱，栽培環境光強度為 8000 lux，光照 16 小時下，檢測臺灣草莓紅莖與綠莖，於開放授粉下所得種子之發芽。試驗前將種子以殺菌劑浸種後，再分別進行對照、刻傷與 4°C 濕冷層積一個月，總共三種處理。

試驗結果顯示，臺灣草莓紅莖與綠莖個體之種子，以濕冷層積、刻傷與對照處理，最終發芽率分別為 95 ± 1.81 、 80 ± 3.32 、 $89\pm 2.6\%$ (圖 1) 與 91 ± 3.1 、 82 ± 4.17 及 $98\pm 1.52\%$ (圖 2)。觀察紅莖與綠莖之臺灣草莓，濕冷層積處理者於第五天開始發芽，發芽率分別為 7% 與 33%，在三種處理中最早發芽；播種後 9 天，兩者之萌芽率已分別超過 50% 及 80%；其中，紅莖臺灣草莓在播種後 18 天，萌芽率即超過 90%，而綠莖臺灣草莓雖然初期萌芽率較高，但到 27 日萌芽率才超過 90%。於第 14 天，不論紅莖與綠莖之臺灣草莓，三種處理皆達 50% 發芽率；其中，直播的紅莖臺灣草莓達到 50% 發芽率，費時 10 日，綠莖之臺灣草莓則需 12 日；刻傷處理之種子萌發最遲，兩者皆需 14 日。發芽試驗進行一個月，濕冷層積與對照皆超過 90% 發芽率，刻傷處理的發芽率最低，觀察到刻傷處理於試驗期間之發霉情形較嚴重，且不正常發芽種子出現的頻率高於其餘處理，推測因有傷口，真菌易侵入感染，且刻傷處理時力道拿捏不易，因此造成胚受傷，所以無法正常發芽(圖 3)。

如果以最終種子萌芽率之 90% 作為臨界萌芽水準，在紅莖臺灣草莓上，濕冷層積、直播及刻傷者之臨界萌芽率分別為 85.5%、80.1% 及 72%，濕冷層積與直播皆費時 20 天，刻傷者則為 23 天；而綠莖臺灣草莓，則三者分別為 10、18 及 16 日。

若以最終種子萌芽率之 95% 為發芽終點時，在紅莖臺灣草莓上，三者分別費時 23、27 及 31 日，而綠莖臺灣草莓則分別為 14、20 及 16 日。

再以 90% 萌發水準計算平均發芽日數，在紅莖臺灣草莓上之、刻傷與對照處理，則三者分別需 10、12 及 11 日；而綠莖臺灣草莓，則濕冷層積者為 7 日

及刻傷與對照為 12 日(表 3)。而 95% 萌發水準計算平均發芽日數，在紅莖臺灣草莓上之、刻傷與對照處理，則三者分別需 10、13 及 12 日；而綠莖臺灣草莓，則三者分別需 10、12 及 13 日(表 3)。

由圖 1 與圖 2 中可看出濕冷層積處理後之種子萌芽整齊，通常在一個月以內，幾乎無新萌發之種子。而對照組，無論紅莖或綠莖臺灣草莓，在播種一個半月後，仍會陸續有種子萌出；在綠莖臺灣草莓上，刻傷處理者萌發很快即達到平衡，而紅莖臺灣草莓刻傷種子之萌發趨勢，則相當接近對照。

將 2009 年獲得之種間雜交種子發芽，進行四種處理，分別為刻傷、對照、濕冷層積 4°C 下 4 週及 8 週。濕冷層積 4 週者共處理 208 粒種子，其中僅 *F. hayatae* (紅莖) × *F. ×ananassa* 有 6% 之發芽率；以濕冷層積處理 8 週者，共處理 203 粒種子，其中 *F. ×ananassa* 與 *F. hayatae* (紅莖) 雜交種子，4 粒種子中 1 粒發芽；以濕冷層積處理 4 週者，共處理 208 粒種子，其中 *F. hayatae* (紅莖) × *F. ×ananassa* 雜交種子中，98 粒裡有 6 粒發芽。直播處理者，186 粒 *F. hayatae* (紅莖) × *F. ×ananassa* 雜交種子中，有 2 粒發芽，其餘雜交組合總共 203 粒種子，皆未萌芽；而刻傷處理 368 粒種子皆未萌芽(表 4)。

此年度收集之種子，處理前未先消毒，試驗過程中發霉情形嚴重，造成發芽率偏低；於發芽試驗結束後，將始終未發芽之種子以解剖刀剖半，置於解剖顯微鏡下觀察，發現雜交種子中，有空胚或胚褐化萎縮之情形。因此，2010 年度之雜交種子，先以 1% 漂白水處理 30 分鐘後用滅菌水洗淨，並且以鑷子將空胚種子剔除後，再進行發芽試驗。由於雜交種子數量，以紅莖 *F. hayatae* × *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' 為多，因此分別進行對照與刻傷處理，處理種子數分別為 30 與 53 粒，發芽率分別為 23 與 26%，存活率為 43 與 42% (表 4)，顯示刻傷處理與對照間差別不大。其餘雜交組合獲得種子皆以直播處理，*F. hayatae* × *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' 為母本之雜交組合，本身收集之種子數較 *F. hayatae* 為母本者少，又其空實率高(86%)，因此 2010 年僅 *F. hayatae* 為母本之雜交組合，

得到雜交後代。此年度僅紅莖與綠莖之 *F. hayatae* 與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ 雜交種子順利發芽，存活率分別為 67 與 80% (表 2)。2010 年度結果率雖不佳，但雜交後代存活率較前一年有所提升。

以往之研究顯示，促進草莓種子發芽方法有濕冷層積 (Bringhurst and Vote, 1957; Thompson, 1969)，以硫酸浸漬 (Jonkers, 1958; Zoubov and Avhipoy, 1969) 硝酸或過氧化氫 (Negi and Singh, 1972) 處理，也有不經處理直接洗淨播種，亦得良好發芽率 (李, 1982; Henry, 1935)。本試驗於 *F. hayatae* 種子發芽試驗也觀察到同樣情形，雖然綠莖臺灣草莓直播之發芽率為 98%，高於濕冷層積者，但在紅莖臺灣草莓上則以濕冷層積者較高。同時，以濕冷層積可提早其發芽天數，並提高萌芽整齊度。由種子萌發的趨勢看，無論紅莖或綠莖臺灣草莓種子，均存在一定之休眠性，而綠莖臺灣草莓之休眠性似乎略高於紅莖臺灣草莓。紅莖臺灣草莓濕冷層積與對照之 95% 萌芽所需日數差距為 4 日，綠莖臺灣草莓者為 6 日，以及濕冷層積與對照之 95% 平均發芽日數差距，紅莖臺灣草莓為 2 日，綠莖臺灣草莓為 5 日來看，種子之休眠性並不深。

此外，此種植物之種殼，顯然應無或甚少物理性阻礙。導致對照與刻傷處理雖較慢發芽，且不整齊，但兩者後期發芽率仍達 80% 以上。因此濕冷層積可加速 *F. hayatae* 之發芽，但無法提高其發芽率。李 (1982) 指出以濕冷層積處理者，較儲放於室溫下的乾燥種子，可提高栽培種草莓種子之發芽率，因此，栽培種草莓種子或許在新鮮時休眠性甚淺，在通過逆境時，或可引發其中部分種子之休眠性；這種現象或許是綠莖臺灣草莓之種子，經低溫濕冷層積後，最終萌發率會低於對照之原因。比對此種草莓之原生地環境，在其種子成熟初期，先進入乾早期 (9 月以後)，繼而進入低溫期。由李 (1982) 對乾燥種子之研究結果可以推估，或許乾燥與脫水，會引發其休眠，以度過寒冬，於低溫引發之休眠，在此類植物中，或許比較不明顯。依據 2009 年種間雜交種子發芽試驗可知，濕冷層積處理之發芽種子數高於其餘處理，由其親本 *F. hayatae* 以濕冷層積處理可提

早其平均發芽天數，以及濕冷層積處理者可提高栽培種草莓種子之發芽率，推測兩者雜交之種子以濕冷層積處理，可提早其種子發芽，避免了後期真菌之感染，而較其餘處理發芽種子數多。

Jonkers (1958)認為草莓種子的發芽不整齊及發芽率低，是因為其種皮不透性，而非種子後熟不完全。Miller 等(1992)所提及以草莓種子，分別進行直播和刻傷處理，以刻傷處理提高了種間雜交種子之發芽率。而本試驗之刻傷處理種子發霉情形嚴重，對本身發芽勢佳之 *F. hayatae* 促進效果不顯著，且使整體發芽率下降。試驗之雜交種子因倍數體間雜交之障礙，難以發芽，刻傷處理未能達到 Miller 等(1992)之效果。

以濕冷層積與刻傷處理雜交種子效果皆有限，因此除種皮不透性及種子後熟問題外，應有其他因素影響其發芽率。Li 等(2000)以 *F. ×ananassa* ‘Honeye’ 與 *F. Vesca* ‘Changsen’ 雜交，發現不易獲得後代，推測原因之一為胚與胚乳發育不良造成。2009 年種間雜交種子，於發芽試驗後，將未發芽種子剖開檢視，觀察到種子中空無胚及胚萎縮成褐色之情形相當普遍。而 *F. hayatae* (紅莖) 與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 1’ 獲得之種子，經測試得知空實率為 69%；與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ 為 39%；*F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ × *F. hayatae* (紅莖) 獲得之種子，空實率更高達 86% (表 2)，顯示 *F. hayatae* 與栽培種草莓雜交，亦不易獲得有效種子，或許亦可能是種子胚與胚乳發育方面有障礙所致。Bors 與 Sullivan (2005a) 與 Miller 等(1992)使用組織培養技術，使胚或胚乳發育不良之種子得以成株，以及提高草莓雜交種子之發芽率。

本試驗也嘗試了以 1% 漂白水消毒 30 分鐘後，使用組織培養促進種間雜交種子發芽，但因種子消毒不易或未抓到最佳的處理方法與時間，處理 3~5 天後皆發霉，若需確定此法是否可提高種間雜交種子之發芽率，尚須克服組織培養之技術門檻。因此，針對促進 *F. hayatae* 與栽培種草莓雜交種子發芽，尚待進一步研究。

第三節 染色體數檢測

早在 1926 年，即有以草莓根尖壓片檢測染色體之研究(Ichijima, 1926)，但時至今日，草莓根尖壓片之方法仍不斷改進，這與其多倍體的狀態、染色體小及有絲分裂細胞體積小，因而觀察上有難度(Iwatsubo and Naruhashi, 1989)有關。再者，因草莓屬植物種類多，針對不同材料衍生出不一樣的處理方法，以得到最清楚的染色體影像。會影響根尖壓片效果的因素有，根尖狀態、取根時節與時間、前處理、固定、軟化與染色之藥劑等。因草莓種子小，所以冒出之胚根細小，後續壓片較困難，與植株直接取根相比，後者較有機會觀察到染色體。

F. hayatae 走莖數多，由走莖採取根尖較直接由母株取根有效率。由健壯走莖以鑷子取下初萌出 1 公分左右之嫩白根尖，是最佳之材料；而春季相對冬季與夏季摘取之根尖最易觀察到染色體。又一天之中以早晨 8 到 9 點，採取 *F. hayatae* 之根尖最佳，正午及傍晚取根，觀察到染色體之頻率較早晨者低。高倍數體之草莓因染色體數較多，但有絲分裂細胞小，因此染色體在顯微鏡鏡頭下常堆疊在一起，較難觀察；據 Preeda 等(2007)之研究顯示，使用酵素如 cellulose、pectolyase 或 macerozyme，相互組合使用，有助於鑑定染色體數目。

本試驗使用 2% Acetic orcein 為染劑。*F. hayatae*、以秋水仙素誘變 *F. hayatae* 之植株和大部分的 *F. hayatae* 與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’雜交後代為材料之根尖，染色 2~3 天即可觀察。栽培種草莓之根尖以相同方法染色，染色體染色情形不佳，且一天之中最佳取根時間，與前述之材料不同，於春季早晨 8~9 時採根，並未觀察到可供計算之中期染色體影像，反而於晚間 9 時，取根有觀察到較多中期染色體，但同一時間取根製作的三枚玻片，僅有一片有此情形，故栽培種草莓之染色體觀察較 *F. hayatae* 困難。改善栽培種草莓染色體之觀察，使用酵素處理再搭配不同種染劑，如 Giemsa 及 DAPI 進行染色，但尚未觀察到滿意之成效。

經檢測得知紅莖與綠莖臺灣草莓染色體數 $2n = 2x = 14$ (圖 4)，檢測 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ × *F. hayatae* 之雜交後代 10 株，並分別給予代號。其中#3、#4、#6 與#15 株為非整倍體數植株，染色體數目分別為 53、46、46 與 44 條(圖 5)；#5、#7、#8、#12 與#13 株，共 5 株為 56 條染色體(圖 6)；#11 染色體數 42 條，為六倍體(圖 7)，草莓染色體之長度介於 1.8~0.7 μm 。

檢測後代植株中有 5 株仍為八倍體，可能由於人工授粉時花粉的刺激，發生無融合生殖現象。另外，有 4 株後代為非整倍體數植株，推測可能為雜交親本配子發生不減數分裂造成。進一步觀察 *F. hayatae* 與 *F. ×ananassa*，兩者之花粉粒，大小均約為 20~15 μm ，但在顯微鏡下觀察到，其中有較大花粉粒的存在(圖 8)，其中紅莖臺灣草莓之花粉粒大小更是不整齊，Lei (1997)於 *F. orientalis* 之花粉粒觀察到相同的情況，他推測可能為未減數分裂之配子。後代植株中有 1 株為六倍體，推測有 2 種可能，第一種為 *F. hayatae* 配子發生不減數分裂(2x)，然後與配子減數分裂正常之栽培種草莓(8x)配對造成。第二種可能情形為，配子減數分裂正常之 *F. hayatae* (1x)，與減數分裂不正常之栽培種草莓(5x)配對造成。此六倍體植株外觀與母本，‘桃園三號’類似，生長勢稍弱，具開花能力但結實率不佳(圖 9)。由於 Dogadkina (1941)與 Yarnell (1931)指出，相較於其他植物，*Fragaria* 配子不行減數分裂的現象常見。至於未獲得 5 倍體之原因，則仍需進一步觀察受粉、受精與胚發育後，才能有明確之結論。

第四節 臺灣草莓之組織培養與秋水仙素誘變

(一) 臺灣草莓之莖頂組織培養

預備試驗使用 MS、1/2 MS 及 1/4 MS 進行臺灣草莓之莖頂培養，然三種培養基處理間，臺灣草莓生長勢相當，因此最終使用草本植物常用之 1/2 MS，作為基本培養基。

莖頂培養以紅莖與綠莖臺灣草莓初生之走莖為材料，初代培養基以 1/2 MS

搭配 BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 時生長情形最好，紅莖、綠莖及整體成活率分別為 63%、56%、58%，高於單純添加 1/2 MS 以及 1/2 MS 搭配 BA 1 及 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之成活率(圖 10)。不過，紅莖臺灣草莓，不加 BA 之對照與 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理間，植株成活率差異不大，而 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理者明顯優於 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理者；而綠莖臺灣草莓則 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 與 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理者之間差異不顯著，但均顯著優於 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理者。隨著 BA 濃度的增加，兩種材料的褐化率都跟著提升，添加 BA 0.5、1、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之整體褐化率，分別為 30%、50%與 95% (圖 11)；初代培養 10~15 天，培植體有 1~2 片葉展開時，移入增殖培養基中，可誘導其產生叢生芽(圖 12)。培植初期，培植體底部週遭之培養基，會逐漸變成黑褐色，推測為草莓莖段分泌之代謝物造成，此現象使得培植體生長勢緩慢，甚至造成褐化死亡，於培養基中加入木炭，以吸收酚類等有害物質，或增加移植的次數或可改善此情形。

測試增殖培養基之 17 個處理中，有三種配方可促使不定芽發生，分別為 1/2 MS + NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；1/2 MS + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 1/2 MS + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。發生不定芽所需時間分別為兩個月、一個半月及 18 天。其中以 1/2 MS + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 配方進行增殖，能最快促發不定芽產生。不定芽由培植體底部萌發，一個培植體約可增殖出 5~8 個植株(圖 12)。繼代培養時，將之分株並移入去除 BA 之增殖培養基中，可促進培植體生根，繼代後約 4~7 天開始生根，待根系生長完全即可馴化出瓶。出瓶時，需留意洗淨根部之培養基，因為培養基殘留會增加發霉的風險，降低出瓶之存活率。出瓶培養初期，栽培環境須維持一定的濕度，本試驗使用透明塑膠袋蓋住三吋盆容器，以維持濕度，袋口不密封以保持通風。

(二) 誘導臺灣草莓癒傷組織

懸浮培養臺灣草莓之癒傷組織，於培養基中加入誘變劑，可增加誘變之效率。因此，測試適合誘導臺灣草莓癒傷組織之培養基。預備試驗中，培植體之

來源，為戶外栽培之臺灣草莓葉片，但試驗期間發霉情形嚴重，推測因臺灣草莓葉片上覆有絨毛，因而易藏匿微生物，且消毒不易所致。若延長消毒時間，葉片組織易褐化，但消毒時間過短，則達不到滅菌之效。後選用組織培養瓶中臺灣草莓葉片，作為培植體，發霉情形即獲得改善。另外，亦使用幼嫩葉柄作為培植體。葉片與葉柄皆能形成癒傷組織，但因葉片獲得量較多，因此最終選用葉片部分作為培植體。

成功誘導出癒傷組織之培養基配方，分別為 $1/2\text{ MS}$ 、 $1/2\text{ MS} + \text{NAA } 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1/2\text{ MS} + \text{NAA } 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1/2\text{ MS} + \text{NAA } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $1/2\text{ MS} + \text{NAA } 0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五種，其癒傷組織發生率分別為 77、33、34、73 及 17%(圖 13)。癒傷組織由葉片靠近葉柄之基部產生，外觀為白色，且質地緻密(圖 14)。將誘導之癒傷組織移入以 0.5 、 1 、 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 與 0.25 、 0.5 、 1 、 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 相組合的培養基中，皆無順利分化成不定芽或不定根者，且癒傷組織最終皆褐化死亡。據馬等(2007)指出，當草莓之癒傷組織，外觀為綠色或淺黃色且質地緻密者，分化能力較其他狀態之癒傷組織佳。本試驗未能從癒傷組織再分化為植株，可能因臺灣草莓基因型、葉片年齡或生長調節劑種類等因素，而導致誘導之癒傷組織分化能力不佳。

為得到分化情形較佳之癒傷組織，重新測試培養基配方，以 $\text{NAA } 0.1$ 、 0.5 、 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 與 $\text{BA } 0.25$ 、 0.5 、 1 、 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 相互組合，以及將 NAA 替換成 0.5 、 1 、 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 與 $\text{BA } 0.25$ 、 0.5 、 1 、 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 相組合，一處理二重複。試驗結果顯示，除 $1/2\text{ MS}$ 仍有緻密之癒傷組織形成外，其餘組合一個月後皆無癒傷組織產生，且將此癒傷組織移至不同培養基中培養，但無生長情形，可能是未能找到良好之培養條件，或此種類型之癒傷組織不易再生。

(三) 秋水仙素誘導臺灣草莓染色體數倍增

本試驗於 $1/2\text{ MS}$ 中加入 50 、 100 、 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素，植入臺灣草莓走

莖進行誘變培養。添加秋水仙素 50、100、200 mg · L⁻¹ 者，褐化率分別為 22、39、61%，存活率為 39、5、0%。顯示秋水仙素濃度增加時，褐化率隨之提高，成活率隨之下降(表 6)。處理秋水仙素 50 mg · L⁻¹ 者存活 8 株；100 mg · L⁻¹ 者存活 1 株；200 mg · L⁻¹ 無存活者，存活株於 2010 年 3 月出瓶，出瓶培養期間，以 100 mg · L⁻¹ 誘導者與一株以 50 mg · L⁻¹ 誘導者死亡，共計 7 株健化成功而成活。觀察誘變存活植株，未觀察到與一般臺灣草莓組培瓶苗外形有所差異者，唯處理秋水仙素之瓶苗生長較緩慢。試驗期間觀察到不正常生長現象，如展開小葉數小於三枚、葉色參差不齊或植株矮小之瓶苗，最後皆無法成活。檢測出瓶成功 7 株中之 4 植株，根尖壓片之染色體數為 2n = 2x = 14，皆為二倍體，尚無成功誘變為四倍體者。誘變失敗一方面為處理之植株數量較少，另一方面，處理秋水仙素 50 mg · L⁻¹ 者存活率雖然較高，但此濃度未能達到誘變效果。雷等(1999)提出，不同材料、處理時間與誘變劑濃度，對莖頂培養之存活率有影響，二倍體草莓對秋水仙素致死濃度的忍耐力較弱，五倍體材料居中，而八倍體草莓則有較強之忍耐力，並指出二倍體 *F. pentaphylla*，以秋水仙素 100~200 mg · L⁻¹ 處理，染色體數加倍效果較好，濃度低於 50 mg · L⁻¹ 者，不易得到染色體數倍增之植株。與本試驗中同為二倍體之 *F. hayatae* 以 50 mg · L⁻¹ 秋水仙素，誘變效果不佳，有相同的情形。本試驗中以秋水仙素 100 mg · L⁻¹ 誘導者，尚有 5% 存活率，因此若提高處理植株數，可增加獲得存活植株之數目。另外，直接以種子浸漬秋水仙素或為另一可行方案(Evans, 1977)。

第五章 結論

以臺灣草莓為母本，栽培種草莓為父本之雜交組合結實率較高、獲得種子數較多且種子空實率較低。紅莖 *F. hayatae* × ‘Taoyuan No. 3’ 收穫種子中14株成活；綠莖 *F. hayatae* 與 ‘Taoyuan No. 3’ 雜交，收穫種子中8株成活。以栽培種草莓為母本之雜交組合，雜交後代無順利存活者。

檢測 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ × *F. hayatae* (紅莖) 雜交後代中，4株染色體數為53~44條，5株為56條染色體，後代中仍為八倍體者，可能由於人工授粉時花粉受到汙染或是發生無融合生殖現象；另外有5株後代為非整倍體數植株，推測為雜交親本配子發生不減數分裂造成。

為改善雜交後代存活率，檢測親本與種間雜交後代之種子發芽情形。觀察到臺灣草莓種子，以濕冷層積處理者最早發芽，試驗30天，濕冷層積與對照皆超過90%發芽率，而刻傷處理之發芽率最低。雜交種子以濕冷層積與刻傷處理效果皆有限。因此，排除種子後熟不完全，與種皮不透性之原因，經過解剖雜交種子後，發現有空胚或胚褐化情形。推測 *F. hayatae* 與 *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 1’ 及 ‘Taoyuan No. 3’ 間，由於低倍體數與高倍體數間雜交，易存在有雜交障礙，應是由於胚與胚乳發育不良，造成不易獲得雜交後代。故使用組織培養技術，配合秋水仙素，誘導 *F. hayatae* 成為四倍體後，再與八倍體草莓雜交，期望能提高育種效率，得到較多雜交後代。

為達上述目的，建立 *F. hayatae* 莖頂培養之流程，其初代培養基以 1/2 MS 搭配 BA 0.5 mg · L⁻¹ 生長情形最好，適合之增殖培養基為 1/2 MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + BA 0.5 mg · L⁻¹，分株移入去除 BA 之增殖培養基中促進生根。培養基中處理秋水仙素 50 mg · L⁻¹ 者存活 8 株；100 mg · L⁻¹ 者存活 1 株。檢測 7 株誘變存活植株中之 4 株，根尖壓片之染色體數為 2n = 2x = 14，無成功誘變為四倍體者。

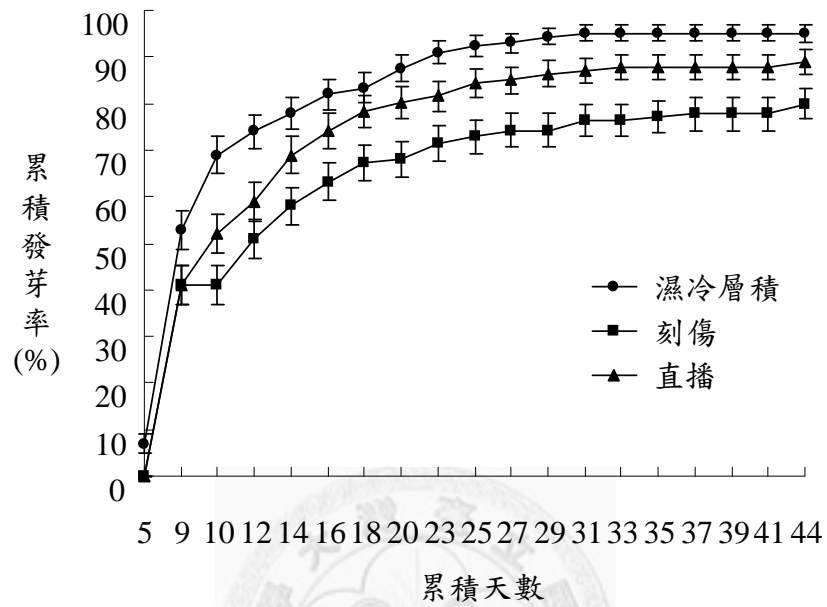


圖 1. 以濕冷層積、刻傷及直播處理之紅莖臺灣草莓種子累積發芽率。

Fig. 1. The accumulated germination rate of *F. hayatae* (red stem) in control, stratification and scarification treatments. Values are means \pm S.E. of 145 plants.

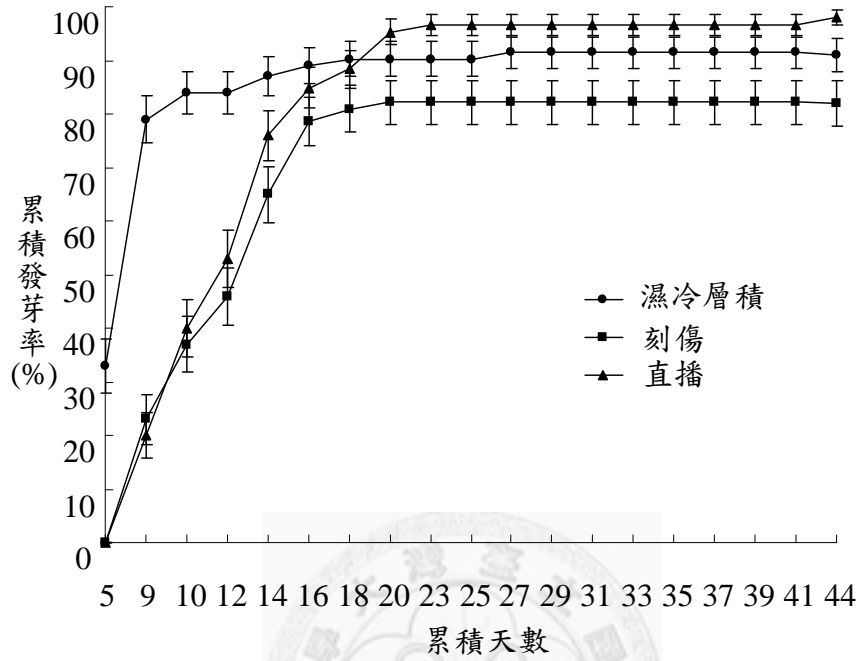


圖 2. 以濕冷層積、刻傷及直播處理之綠莖臺灣草莓種子累積發芽率。

Fig. 2. The accumulated germination rate of *F. hayatae* (green stem) in control, stratification and scarification treatments. Values are means \pm S.E. of 85 plants.

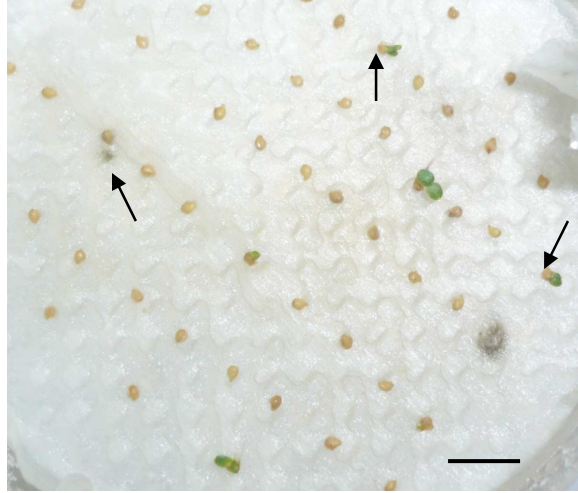


圖 3. 刻傷處理之臺灣草莓種子發芽情形。箭頭所指為發芽不正常之種子及發霉處。Scale = 5 mm.

Fig. 3. The germination of *F. hayatae*. An abnormal germinated seedling and a contaminated site (arrows). Scale=5 mm.

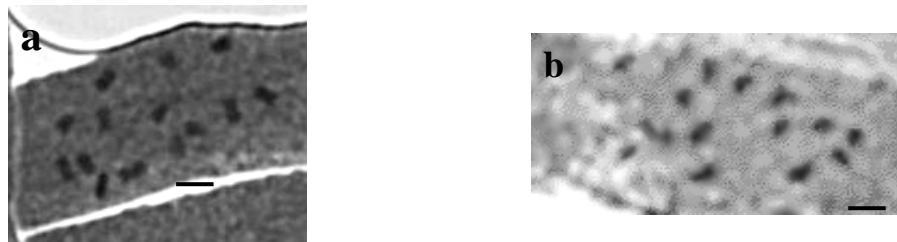


圖 4. 根尖壓片細胞染色體數目。(a) *F. hayatae* (紅莖) $2n = 2x = 14$ (b) *F. hayatae* (綠莖) $2n = 2x = 14$. Bar = 2 μm .

Fig. 4. The number of chromosomes in root tip cells. (a) *F. hayatae* (red stem) $2n = 2x = 14$ (b) *F. hayatae* (green stem) $2n = 2x = 14$. Bar = 2 μm .

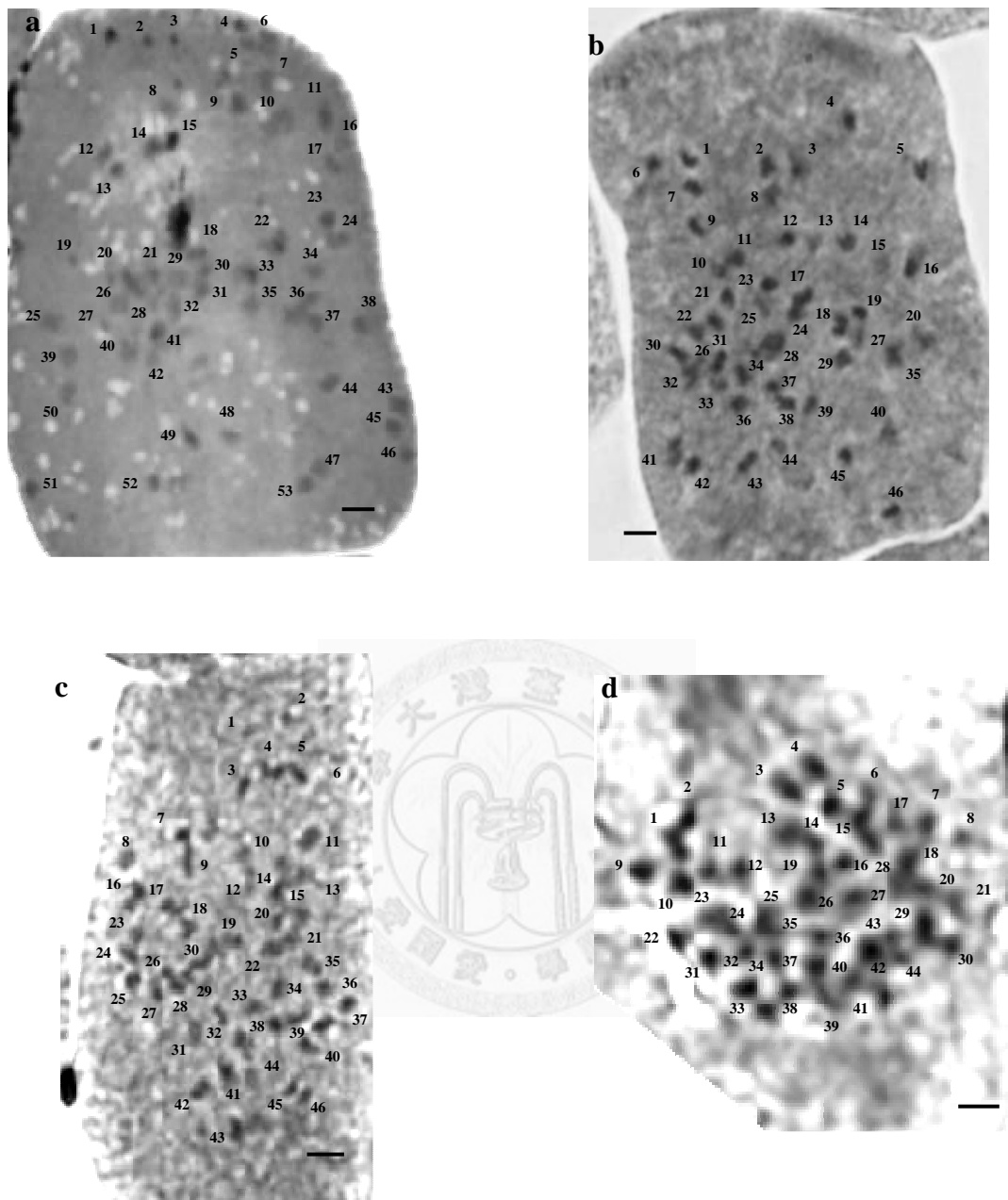


圖 5. *F. xananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* (紅莖) 之雜交後代中，非整倍體數染色體之根尖壓片。(a) 後代#3 ($2n = 53$) (b) 後代#4 ($2n = 46$) (c) 後代#6 ($2n = 46$) (d) 後代#15 ($2n = 44$). Bar = 2 μm .

Fig. 5. The number of chromosomes in root tip cells of *F. xananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* hybrids which were aneuploid. (a) progeny #3 ($2n = 53$) (b) progeny #4 ($2n = 46$) (c) progeny #6 ($2n = 46$) (d) progeny #15 ($2n = 44$). Bar = 2 μm .

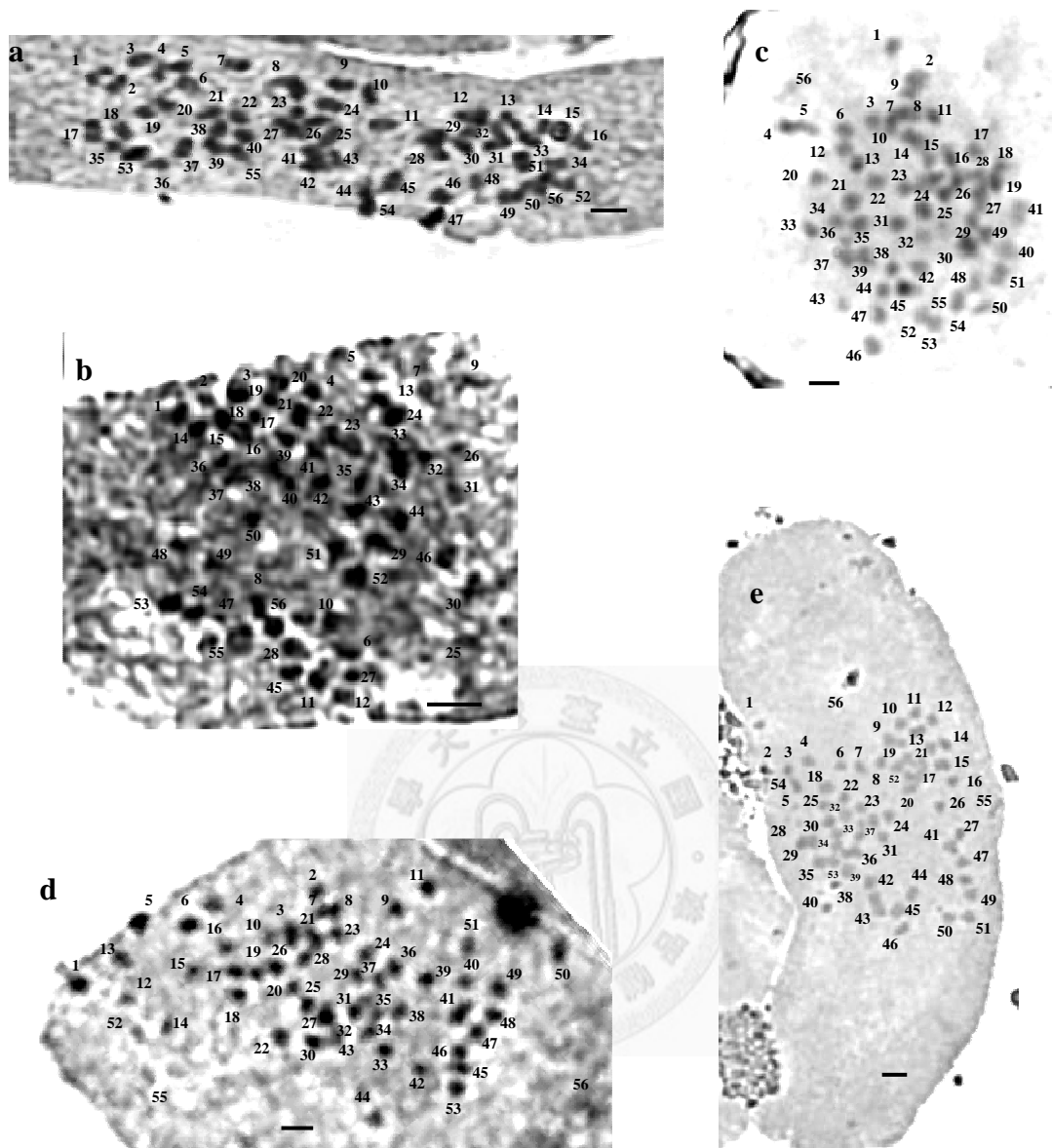


圖 6. *F. xananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* (紅莖) 雜交後代中，具 56 條染色體之根尖細胞。(a) 後代#5 ($2n = 56$) (b) 後代#7 ($2n = 56$) (c) 後代#8 ($2n = 56$) (d) 後代#12 ($2n = 56$) (e) 後代#13 ($2n = 56$). Bar = 2 μm .

Fig. 6. The chromosome numbers of root tip cells of *F. xananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* hybrids which were octoploid. (a) progeny #5 ($2n = 56$) (b) progeny #7 ($2n = 56$) (c) progeny #8 ($2n = 56$) (d) progeny #12 ($2n = 56$) (e) progeny #13 ($2n = 56$). Bar = 2 μm .

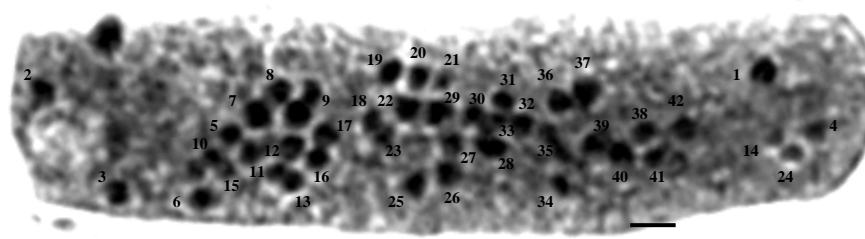


圖 7. *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' × *F. hayatae* (紅莖) 雜交後代 #11 之根尖壓片細胞，染色體數為 $2n = 6x = 42$. Bar = 2 μm .

Fig. 7. The chromosome numbers of root tip cell of *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' and *F. hayatae* hybrids #11 was $2n = 6x = 42$. Bar = 2 μm .

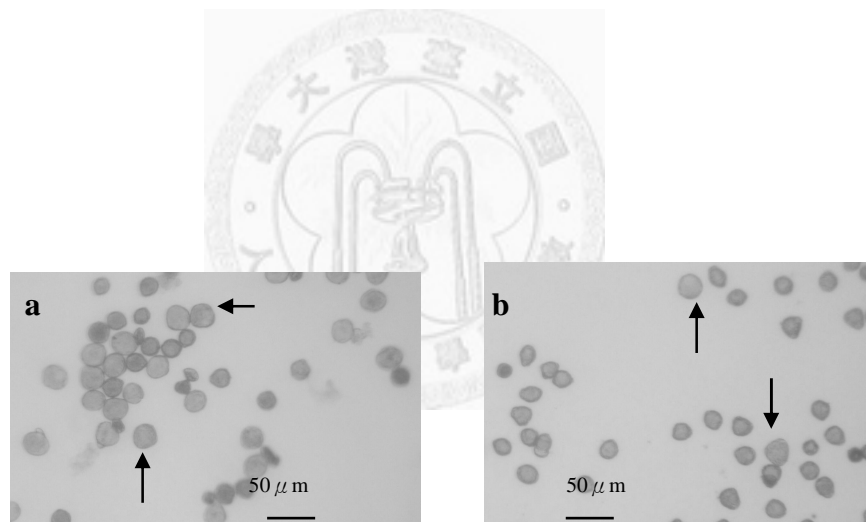


圖 8. 草莓花粉粒之外觀 (a)桃園三號草莓 (b)臺灣草莓。箭頭所指處為較大之花粉粒。Bar = 50 μm .

Fig. 8. Pollen grains of strawberry (a) *F. ×ananassa* 'Taoyuan No. 3' (b) *F. hayatae*. Bar = 50 μm .

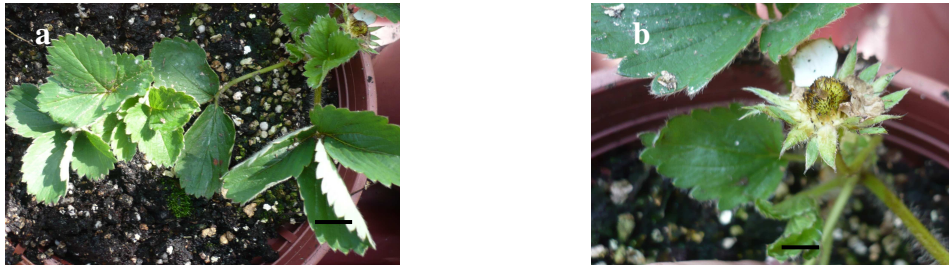


圖 9. 種間雜交後裔六倍體 #11，(a)生長勢弱且(b)不易結果。Bar = 5 cm.

Fig. 9. The appearance of hexaploid hybrid #11 which was weak in vigor (a) and poor in fruit set (b). Bar = 5 cm.

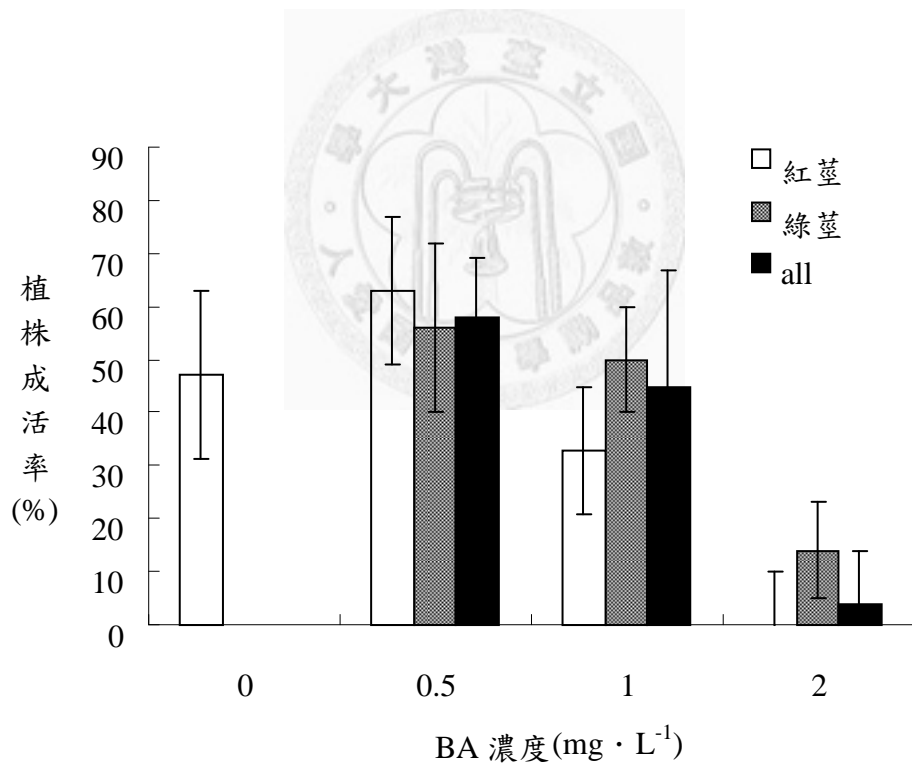


圖 10. BA 濃度對紅莖與綠莖臺灣草莓成活率之影響。

Fig. 10. The effect of BA concentration to *F. hayatae* in vitro survival rate. Bar means \pm S.E.

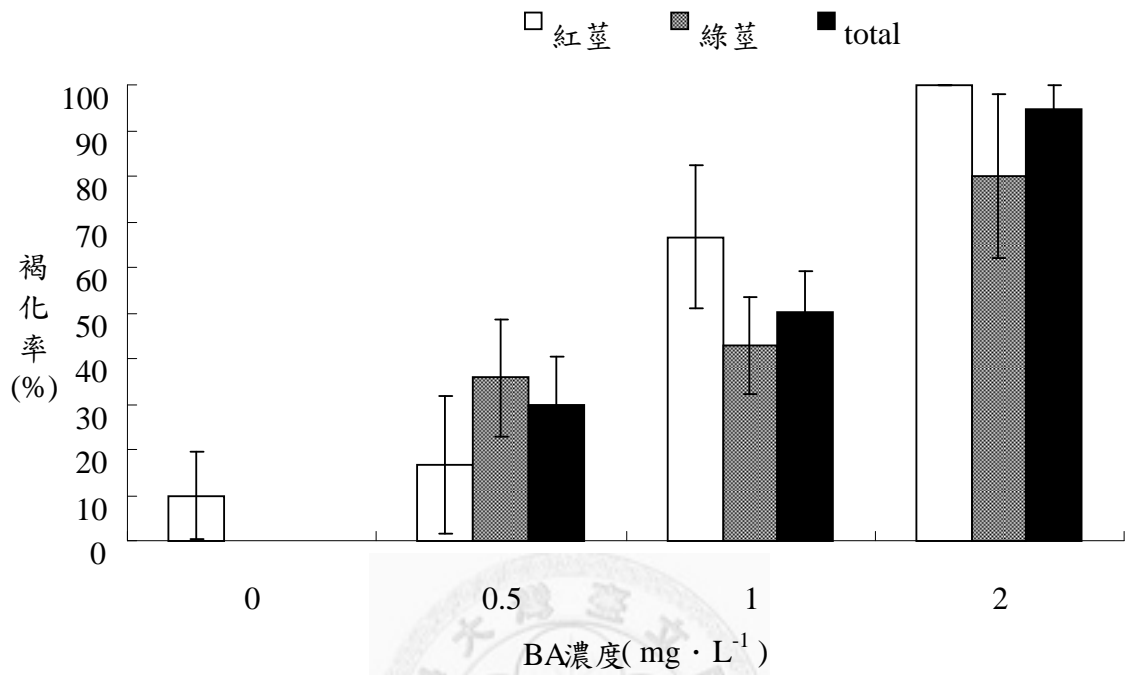


圖 11. BA 濃度對紅莖與綠莖臺灣草莓褐化之影響。

Fig. 11. The effect of BA concentration to *F. hayatae* in vitro browning rate. Bar means \pm S.E.

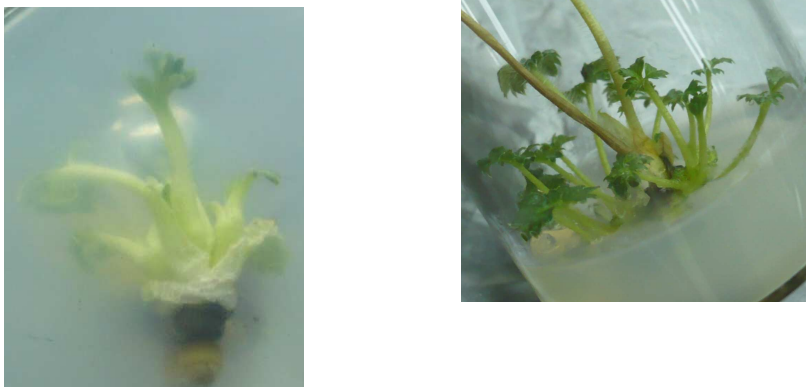


圖 12. 綠莖臺灣草莓瓶內增殖情形。

Fig. 12. The multiple shooting of *F. hayatae* (green stem) in vitro.

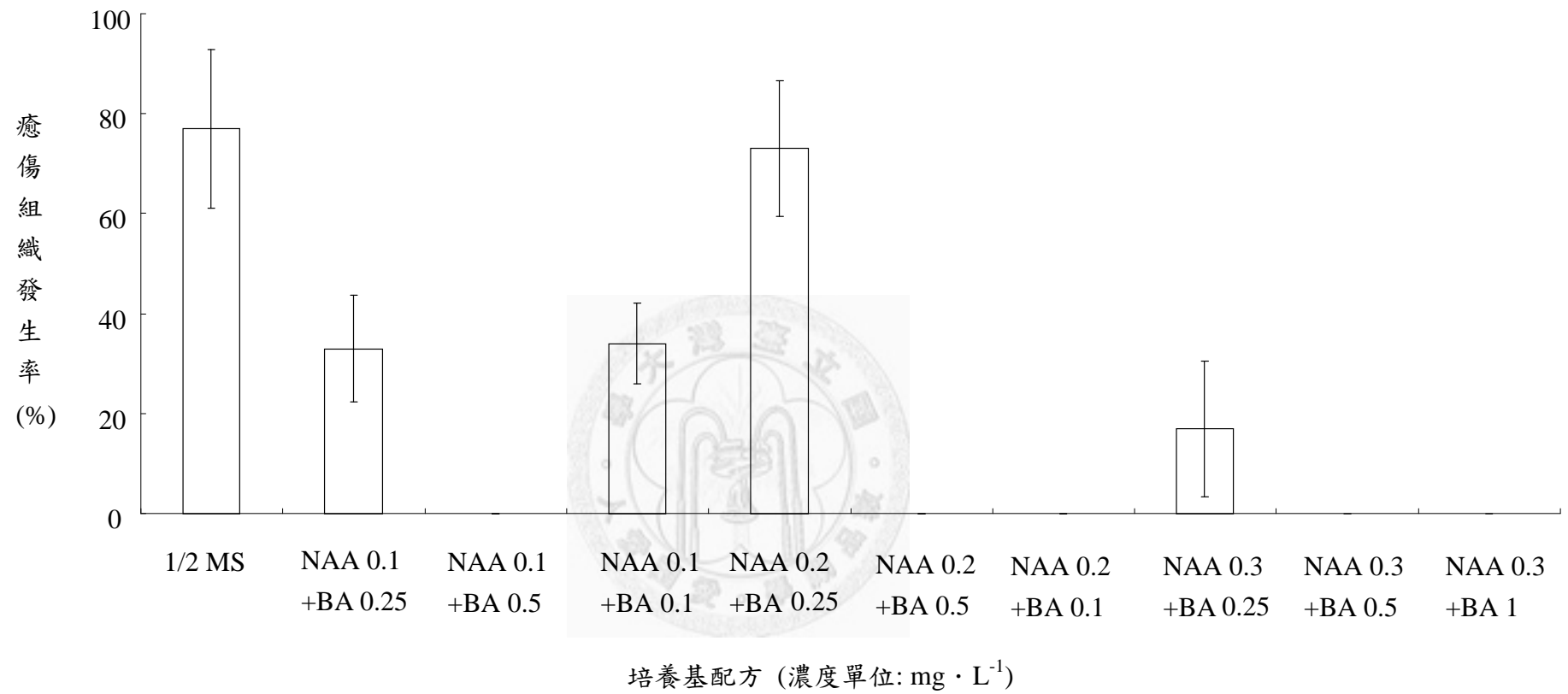


圖 13. 臺灣草莓以不同培養基配方之癒傷組織發生率。

Fig. 13. The callus formation rate of *F. hayatae* in different medium. Bar means \pm S.E.

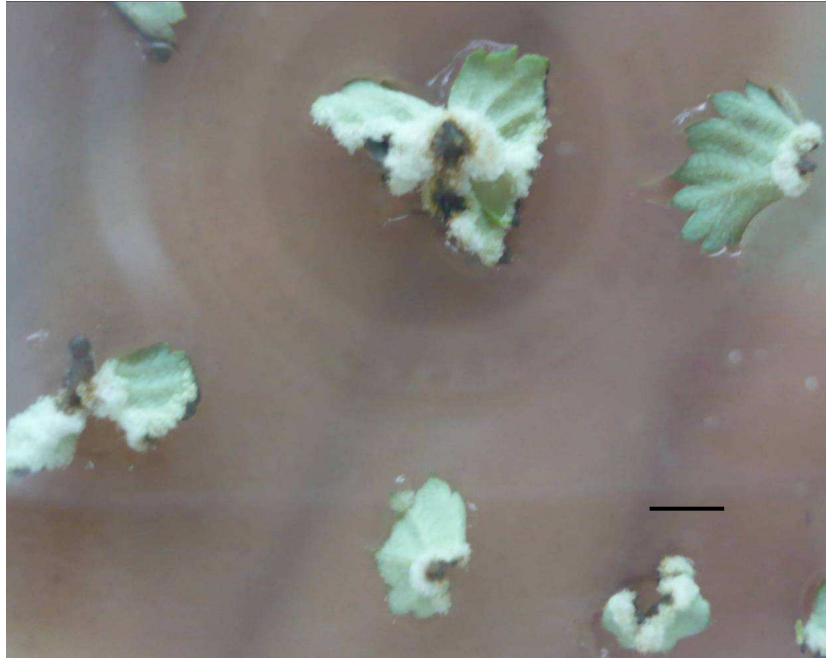


圖 14. 以 $1/2$ MS + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 誘導之臺灣草莓癒傷組織。

Fig 14. Induced callus of *F. hayatae* in vitro with $1/2$ MS + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA. Bar = 1 cm.

表 1. 2009 年臺灣草莓與桃園三號草莓互交結果表現。

Table 1. The reciprocal crosses between *Fragaria hayatae* Makino and *F. ×ananassa* Duch. ‘Taoyuan No. 3’ in 2009.

雜交組合	雜交 花朵數	著果數	雜交 結實率(%)	單果 種子數	收穫 種子數	播種 發芽數
<i>F. hayatae</i> (合歡山紅莖) × <i>F. ×ananassa</i> ‘Taoyuan No. 3’	3	2	67	13	25	2
<i>F. hayatae</i> (小雪山紅莖) × <i>F. ×ananassa</i> ‘Taoyuan No. 3’	47	22	47	25	555	6
<i>F. hayatae</i> (小雪山綠莖) × <i>F. ×ananassa</i> ‘Taoyuan No. 3’	36	26	72	21	556	0
<i>F. ×ananassa</i> ‘Taoyuan No. 3’ × <i>F. hayatae</i> (小雪山紅莖)	10	4	40	6	25	1
<i>F. ×ananassa</i> ‘Taoyuan No. 3’ × <i>F. hayatae</i> (小雪山綠莖)	5	2	40	4	7	0
<i>F. ×ananassa</i> ‘Taoyuan No. 3’ ^z	10	0	0	--	--	--

^z除雄套袋未授粉

表 2. 2010 年臺灣草莓與栽培種草莓互交表現結果。

Table 2. The reciprocal crosses between *F. hayatae* and *F. ×ananassa* Duch. in 2010.

雜交組合	雜交 花朵數	著果數	著果率 (%)	單果 種子數	收穫 種子數	空實數	空實率 (%)	播種 發芽數	存活率 (%)
<i>F. hayatae</i> (紅莖) × <i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 1'	1	1	100	16	16	11	69	0	--
<i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3' × <i>F. hayatae</i> (紅莖)	29	3	10	9	28	24	86	0	--
<i>F. hayatae</i> (綠莖) × <i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3'	34	6	18	7	45	10	22	9	80
<i>F. hayatae</i> (紅莖) × <i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3'	70	13	19	13	168	66	39	21	67
<i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 1' × <i>F. hayatae</i> (紅莖)	5	0	0	--	--	--	--	--	--
<i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 1' ^z	10	0	0	--	--	--	--	--	--
<i>F. ×ananassa</i> 'Taoyuan No. 3' ^z	10	0	0	--	--	--	--	--	--

^z除雄套袋未授粉

表 3. 紅莖與綠莖臺灣草莓種子發芽率達 90%所需日數、95%所需日數及 90%與 95%平均發芽日數。

Table 3. The days need for 90% germination rate, 95% germination rate and mean germination day of *Fragaria hayatae* (red and green stem).

	90% 發芽所需日數	95% 發芽所需日數	平均發芽日數	
			90 %	95 %
紅莖				
濕冷層積	20	23	10	10
刻傷	23	31	12	13
直播	20	27	11	12
綠莖				
濕冷層積	10	14	7	8
刻傷	16	16	12	12
直播	18	20	12	13

表 4. 濕冷層積與直播處理臺灣草莓與桃園三號草莓互交之種子發芽表現。

Table 4. Germination numbers of *Fragaria hayatae* × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ seeds after different treatments.

雜交組合	收穫 種子數	濕冷層積 4 weeks		濕冷層積 8 weeks		直播		刻傷	
		處理 種子數	發芽數	處理 種子數	發芽數	處理 種子數	發芽數	處理 種子數	發芽數
		<i>F. ×ananassa</i> × <i>F. hayatae</i> (紅莖)	25	0	--	4	1	21	0
<i>F. ×ananassa</i> × <i>F. hayatae</i> (綠莖)	7	2	0	0	--	5	0	0	--
<i>F. hayatae</i> (紅莖) × <i>F. ×ananassa</i>	580	98	6	104	0	186	2	192	0
<i>F. hayatae</i> (綠莖) × <i>F. ×ananassa</i>	556	108	0	95	0	177	0	176	0

表 5. 刻傷處理與直播對 *F. hayatae*(紅莖) × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’之種子發芽率和存活率。

Table 5. Germination and survival rates of *Fragaria hayatae* × *F. ×ananassa* ‘Taoyuan No. 3’ seeds in different treatments.

處理	播種數	發芽數	發芽率(%)	存活數	存活率(%)
直播	53	14	26	11	42
刻傷	30	7	23	3	43

表 6. 以秋水仙素處理臺灣草莓莖頂之結果。

Table 6. Chromosome doubling with colchicine treatment in shoot tip explants of *Fragaria hayatae*.

秋水仙素濃度(mg · L ⁻¹)	入瓶數	褐化率 (%)	存活率 (%)
50	18	22	39
100	18	39	5
200	18	61	0

參考文獻

- 王進生. 1966. 草莓 農業要覽 第八輯 第二篇 第五類 第二十章 臺灣省政府農林廳 p. 570-581.
- 王博仁、黃麗春. 1975. 草莓莖頂培養. 中國園藝 21(5):239-241.
- 李窓明、洪立. 1982. 草莓栽培品種、溫度、儲藏與果實採收後天數，對種子發芽之影響. 中國園藝 28:36-44.
- 李窓明. 1995. 台灣草莓種苗繁殖與育種研究. 蔬菜育種研討會專刊 p.97-122.
- 李窓明. 2004. 草莓桃園三號之育成. 桃園區農業改良場研究彙報 39:1-17.
- 李慈慧、吳紹宏、林書妍、陳右人、彭思錦、黃朝窗、廖于瑩、鄭正勇. 2007. 臺灣具有成為栽培果樹潛力之原生樹種. 林業研究專訊 14(4):17-19.
- 李慈慧. 2009. 台灣草莓(*Fragaria hayatae* Makino)之植物性狀及其與‘桃園三號’草莓(*Fragaria ×ananassa* Duch.)之種間雜交. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 邱寶玲. 1971. 促進台灣野生草莓(*Fragaria hayatai*)及蛇莓(*Duchesnea Indica*)種子發芽的處理試驗. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 徐信次. 1990. 果樹育種概論. 園藝作物育種講習會專刊 p.359-379.
- 陳玉峰. 1995. 臺灣植被誌第二卷:高山植被帶與高山植物(下). 晨星出版. 臺中. p. 492-494.
- 陳培昌. 1977. 草莓優良品種之育種(一). 新竹區農業改良場研究報告 33:10-20.
- 雷家軍、吳祿平、代漢萍、胡文玉、葛會波. 1999. 草莓莖尖染色體加倍研究. 園藝學報 26(1):13-18.
- 蔡幸玲. 1994. 熱處理對草莓植株生長之影響. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
- Adam, J. and D. Wilson. 1967. Factors affecting the germination of strawberry seed. A. R. Long Ashton. Agric. Hort. Res. Stat., 1966, 1967 pp. 90-95 (Horticultural Abstracts 38:494).
- Ahokas, H. 1998. A method to induce polyploids from adult strawberry plants, *Fragaria* spp., avoiding tissue culture in vitro. Plant Breeding 117:500-502.
- Anstey, T. H. and A. N. Wilcox. 1950. The breeding value of selected inbred clones of strawberries with respect to their vitamic C content. Scientific Agriculture 30:367-374.
- Bauer, A. 1993. Progress in breeding decaploid *Fragaria × vescana*. Acta Horticulture 348:60-63.
- Bentham, G. and J. D. Hooker. 1982. Handbook of British Flora. 6th ed. L. Reeve and Co,

Ashford, Kent.

- Berlyn, G. P. and J. P. Miksche. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- Betvelsen, G. C. M., E. Bouw, and J. E. Veldhuyzen van Zanten. 1997. Breeding strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) from seed. *Acta Horticulture* 439:149-153.
- Blakeslee, A. F. and A. G. Avery. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants - By treatment with colchicine. *Journal of Heredity* 28:393-411.
- Bolton, A. T. 1966. The inactivation of veinbanding and latent-C. viruses in strawberry by treatment. *Canadian Journal of Plant Science* 47:375-380.
- Bors, R. H. and J. A. Sullivan. 2005a. Interspecific hybridization of *Fragaria moschata* with two diploid species, *F. nubicola* and *F. viridis*. *Euphytica* 143:201-207.
- Bors, R. H. and J. A. Sullivan. 2005b. Interspecific hybridization of *Fragaria vesca* subspecies with *F. nilgerrensis*, *F. Nubicola*, *F. pentaphylla*, and *F. viridis*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130:418-423.
- Boxus, P. H. 1974. The production of strawbeey plants by *in vitro* micropropagation. *Journal of Horticultural Science* 49:209-210.
- Bringhurst, R. S. and T. Gill. 1970. Origin of *Fragaria* polyploids. II. Unreduced and double unreduced gametes. *America Journal of Botany* 57:969-976.
- Bringhurst, R. S. and V. Voth. 1957. Effect of stratification on strawberry seeds germination. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 70:144-149.
- Brighurst, R. S. and D. A. Khan. 1963. Natural pentaploid *Fragaria chiloensis* - *F. vesca* hybrids in coastal California and significance in polyploidy *Fragaria* evolution. *America Journal of Botany* 52:658-661.
- Brighurst, R. S. and Y. D. A. Senanayake. 1966. The evolutionary significance of natural *Fragaria chiloensis* × *F. vesca* hybrids resulting from unreduced gametes. *America Journal of Botany* 57:969-976.
- Bringhurst, R. S. and V. Voth. 1984. Breeding octoploid strawberries. *Iowa State University Journal of Research* 58:371-381.
- Clark, J. H. 1931. Length of the fruit development period of strawberry varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 28:211-215.
- Craig, D. L., L. E. Aalders, and C. J. Bishop. 1963. The genetic improvement of strawberry progenies through recurrent reciprocal selection. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 5:33-37.
- Darlington, C. D. and L. F. La Cour. 1962. The handling of chromosomes. 4th ed. Hafner

Publishing Co., New York.

- Darrow, G. M., G. F. Waldo, and C. E. Schuster. 1933. Twelve years of strawberry breeding. A summary of the strawberry breeding work of the United States Department of Agriculture. *Journal of Heredity* 24:391-402.
- Darrow, G. 1966. *The strawberry*. Holt, Rinehart and Winston, New York, New York, USA.
- Darrow, G. M. (ed). 1966. *The strawberry: history, breeding, and physiology*. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Delmen, H. and G. M. Darrow. 1938. Colchicine induced tetraploid and 16-ploid strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 36:300-301.
- Dogadkina, N. A. 1941. A contribution to the question of genome relations in some species of *Fragaria*. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 30:166- 168.
- Donnoli, R., F. Sunseri, G. Martelli, and I. Greco. 2001. Somatic embryogenesis, plant regeneration and genetic transformation in *Fragaria* spp. *Acta Horticultureic* 560:235-240.
- Edahiro, J. I. and M. Seki. 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(1):8-13.
- El Mansouri, I., J. A. Mercado, V. Valpuesta, A. J. M. Lopez, A. F. Pliego, and M. A. Quesada. 1996. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports* 15(8):642-646.
- Einset, J. 1945. The spontaneous origin of polyploidy apples. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 46:91-93.
- Ellis, J. R. 1962. *Fragaria-Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria*. *Proceedings of the Linnean Society of London* 173:99-106.
- Evans, W. D. 1974. Evidence of a crossability barrier in diploid \times hexaploid and diploid \times octoploid crosses in the genus *Fragaria*. *Euphytica* 23:95-100.
- Evans, W. D. 1977. Use of synthetic octoploids in strawberry breeding. *Euphytica* 26:497-503.
- Fadeeva, T. S. and A. L. Djatlova. 1962. The rate of germination of the achenes in reciprocal strawberry hybrids. *Zurnal* 47:1190-1194 (*Horticultural Abstracts* 33:4675).
- Faedi, W., F. Mourgues, and C. Rosati. 2002. Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. *Acta Horticulture* 567:51-59.
- Fedorova, N. 1934. Polyploids inter-specific hybrids in the genus *Fragaria*, *Genetica* 16:525-541.
- Fedorova, N. J. 1946. Crossability and phylogenetic relations in the main European species of *Fragaria*. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 52:545-547.

- George, E. F. and P. D. Sherringgon. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Eastern Press. Reading, Berks. England.
- Graham, J., R. J. McNicol, and K. Grieg. 1995. Towards genetic based insect resistance in strawberry using the Cowpea trypsin inhibitor gene. *Annals of Applied Biology* 127:163-173.
- Gonelli, S., P. Rosati, and M. Mazzara. 1996. Long-term cell suspension culture and regeneration of single-leafed strawberry *Fragaria vesca* monophylla. *Journal of Science, Food and Agriculture* 72:196-200.
- Hancock, J. F. 1999. Strawberries. CAB International, New York.
- Henry, E. M. 1935. The germination of strawberry seeds and the technic of handling the seedling. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 32:431-433.
- Hummer, K. E., P. Nathewet, and T. Yanagi. 2009. Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 96:713-716.
- Hussey, G. 1976. In vitro release of axillary shoot from apical dominance in monocotyledonous plantlets. *Annals of Botany* 40: 1323-1325.
- Ichijima, K. 1926. Cytological and genetic studies on *Fragaria*. *Genetics* 11:590-604.
- Ichijima, K. 1930. Studies on the genetics of *Fragaria*. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs Vererbungslehre* 55:300-347.
- Iwatsubo, Y. and N. Naruhashi. 1989. Karyotype of three species of *Fragaria* (Rosaceae). *Cytologia* 54:493-497.
- James, D. J., A. J. Passey, and D. J. Barbara. 1990. Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria ×ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Science* 69:79-94.
- Jaskani, M. J., S. W. Kwon, and D. H. Kim. 2005a. Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. *Euphytica* 145:259-268.
- Jaskani, M. J., S. W. Kwon, and D. H. Kim. 2005b. Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. *Pakistan Journal of Botany* 37(3):685-696.
- Jones, D. F. and W. R. Singleton, 1940. The improvement of naturally cross pollinated plants by selection in self fertilized lines. 3. Investigations with vegetatively propagated fruits. Strawberry and raseberry hybrids. Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin 435:325-347.
- Jonkers, H. 1958. Accelerated flowering of strawberry seedlings. *Euphytica* 7:41-46.

- Kalkman, C. 1968. *Potentilla*, *Duchesnea* and *Fragaria* in Malcsia (Rosaceae). *Blumea* 16:325-354.
- Kassanis, B. 1957. The use of tissue cultures to produce virusfree clones from infected potato varieties. *Annals of Applied Biology* 45:422-427
- Kihara, H. 1926. Ueber die Chromosomenverhältnisse bei *Fragaria elatior*. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs Vererbungslehre* 41:41-42.
- Lai, P. C., L. J. Chen, M. M. Hsu, and H. S. Tsay. 1983. Studies on shoot tip culture of asparagus. *Journal of Agricultural Research of China* 32(1):23-31.
- Lei, J. J. 1997. Studies on chromosome double and wild crosses in strawberry (in chinese). PhD diss. Shenyang Agriculture University.
- Lei, J. J., Y. H. Li, G. D. Du, H. P. Dai, and M. Q. Deng. 2005. A natural pentaploid strawberry genotype from the Changbai Mountains in northeast China. *Hortscience* 40:1194-1195.
- Leu, L. S. 1972. Freeing sugarcane from mosaic virus by apical meristem culture and tissue culture. *Report of the Taiwan Sugar Experiment Station* 57:57-63.
- Li, Y., X. Hou, L. Lin, S. Jing, and M. Deng. 2000. Abnormal pollen germination and embryo abortion in the interspecific cross, *Fragaria* × *ananassa* × *F. vesca*, as related to cross incompatibility. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 69:84-89.
- Liu, Z. R. and J. C. Sanford. 1988. Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner culture. *HortScience* 23:1056-1059.
- Longley, A. E. 1926. Chromosomes and their significance in strawberry classification. *Journal of Agricultural Research* 32:559-568.
- Mangelsdorf, A. J. and E. M. East. 1927. Studies on the genetics of *Fragaria*. *Genetics* 12:307-339.
- Marta, A. E., E. L. Camadro, J. C. Diaz-Ricci, and A. P. Castagnaro. 2004. Breeding barriers between the cultivated strawberry, *Fragaria* × *ananassa*, and related wild germplasm. *Euphytica* 136:130-150.
- Martens, M. H. R. and B. I. Reisch. 1988. An improved technique for counting chromosomes in grapes. *HortScience* 23(5):896-899.
- Melville, A. H., G. J. Galletta, and A. D. Drader. 1980. Seed germination and early seedling vigor in progenies of inbred strawberry selections. *HortScience* 15(6):749-750.
- Meulenbroek, E. J., E. A. J. Hessel, and C. P. J. van de Lindeloof. 1997. Parent selection in strawberry. *Acta Horticulture* 439:107-113.
- Mezzettim, B., E. Costantini, F. Chionchetti, L. Landi, T. Pandolfini, and A. Spena. 2004. Genetic transformation in strawberry and raseberry for improving plant productivity and

- fruit quality. *Acta Horticultureic* 649:107-110.
- Miller, A. R., J. C. Scheerens, P. S. Erb, and C. K. Chandler. 1992. Enhanced strawberry seed germination through in vitro culture of cut achenes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117:313-316.
- Mori, K. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. *Japan Agricultural Research Quarterly* 6:1-7.
- Morrow, E. B. and G. M. Darrow. 1952. Effect of limited inbreeding in strawberries. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 59:269-276.
- Murashige, T., M. N. Shabed, P. M. Hasegawa, F. H. Takatori, and J. B. Jones. 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97:158-161.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annals of Research of Plant Physiol* 25:135-166.
- Negi, S. P. and R. Singh. 1972. Effect of different chemicals on germination of strawberry seeds. *Indian Journal of Horticulture* 29:265-268 (*Horticultural Abstracts* 44:9386).
- Noguchi, Y. and T. Mochizuki. 1997. Interspecific hybrids originated from crossing Asian wild strawberry (*F. nilgerrensis* and *F. iinurnae*) to *F. ×ananassa*. *HortScience* 32:439.
- Noguchi, Y., T. Mochizuki, and K. Sone. 2002. Breeding of a new aromatic strawberry by interspecific hybridization *Fragaria × ananassa × F. nilgerrensis*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 71:208-213.
- Niemirowicz-Szczytt, K. and Z. Zakrzewska. 1981. *Fragaria × ananassa* anthers cultures. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie des Sciences Biologiques* 28(5):341-347.
- Niemirowicz-Szczytt, K., P. Wyka, and B. Ciupka. 1986. In-vitro colchicine treatment of interspecific sterile *Fragaria l.* Hybrid meristems and screening of regenerated plants for fruiting ability. *Genetica Polonica* 27:315-324(abstr.).
- Nilsson, F. and E. Johansson. 1944. Nya typer och hybrider inom släktet *Fragaria*. *Sverig. Pomol. Fören. Årsskr.* 45:146-151.
- Nishiyama, M. and K. Kanahama. 2002. Effect of temperature and photoperiod on flower bud initiation of day-neutral and everbearing strawberries. *Acta Horticulture* 567:253-255.
- Owen, H. R. and A. R. Miller. 1993. A comparison of staining techniques for somatic chromosomes of strawberry. *HortScience* 28(2):155-156.
- Owen, H. R. and A. R. Miller. 1996. Haploid plant regeneration from anther cultures of three North American cultivars of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Plant Cell Reports*

15:905-909.

- Passey, A. J., K. J. Barrett, and D. J. James. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria ×ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Reports* 21:397-401.
- Powers, L. 1945. Strawberry breeding studies involving crosses between the cultivated varieties (*Fragaria ×ananassa*) and the native Rocky Mountain strawberry (*F. ovalis*). *Journal of Agricultural Research* 70:95-122.
- Preeda, N., T. Yanagi, K. Sone, S. Taketa, and N. Okuda. 2007. Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries. *Scientia Horticulturae* 114:113-137.
- Richardson, C. W. 1914. A preliminary note on the genetics of *Fragaria*. *Journal of Genetics* 3:171-177.
- Schiemann, E. 1937. Artkreuzungen bei *Fragaria* (II). *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 73:375-390.
- Scott, D. H. and D. P. Ink. 1948. Germination of strawberry seed as affected by scarification treatment with sulfuric acid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 51:299-300.
- Scott, D. H. 1951. Cytological studies on polyploids derived from tetraploid *Fragaria vesca* and cultivated strawberries. *Genetics* 36(4):311-31.
- Scott, D. H. and D. P. Ink. 1955. Treatments to hasten the emergence of seedlings of blueberry and strawberry. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 66:237-242.
- Scott, D. H. and A. D. Draper. 1966. Germination of seeds of blueberries and strawberries as influenced by light. *Proceedings of the 17th International Horticultural Congress* 1, Abstr. 276.
- Scott, D. H. and A. D. Draper. 1970. A further note on longevity of strawberry seed in cold storage. *HortScience* 5:439.
- Scott, D. H., G. M. Darrow, and F. J. Lawrence. 1973. Strawberry varieties in the United States. U. S. Dept. of Agri, Farmers' Bulletin No. 1043.
- Scott, D. H. and F. J. Lawrence. 1975. Strawberries, pp. 71-97. In: J. Janick and J. N. Moore (eds.). *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, USA.
- Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11:118-130.
- Spangelo, L. P. S., C. S. Hsu, S. O. Fejer, and R. Watkins. 1971. Inbred line × tester analysis and the potential of inbreeding in strawberry breeding. *Canadian*

- Journal of Genetics and Cytology 13:460-469.
- Stadler, L. J. 1928. Genetic effects of x-rays in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences 14(1):69-75.
- Staudt, G. 1999. Notes on Asiatic *Fragaria* species: *Fragaria nilgerrensis* Schltdl. ex J. Gay. Botanische Jahrbuecher fuer Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 121:297-310.
- Staudt, G. 1999. Systematics and geographic distribution of the American Strawberry Species: Taxonomic studies in the genus *Fragaria* (Rosaceae: Potentillieae). University of California Publications in Botany. Vol. 81. Berkeley, Calif.
- Thompson, P.A. 1969. The use of chilling and chemical treatments to promote rapid germination of strawberry achenes. Journal of Horticultural Science 44:201-210.
- Vine, S. J. 1968. Improved culture of apical tissue for production of virus-free strawberries. Journal of Horticultural Science 43:293-297.
- Winkler, H. 1916. Ober die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. Zeitschr f. Bot. viii. 417-531.
- Yang, X. M., Z. Y. Cao, L. Z. An, Y. M. Wang, and X. W. Fang. 2006. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica 152:217-224.
- Yarnell, S. H. 1931. Genetic and cytological studies on *Fragaria*. Genetics 16:422-454.
- Yonghua, Q., Z. Shanglong, S. Asghar, Z. Lingxiao, Q. Qiaoping, C. Kunsong, and X. Changjie. 2005. Regeneration mechanism of 'Toyonoka' strawberry under different color plastic films. Plant Science 168:1425-1431.
- Zoubov, A. A. and J. B. Avhipoy. 1969. Methods of increasing the germination of strawberry seeds. Trudy cent. Genet. Lab. I. V. Micurina. 10:72-77 (Horticulture Abstracts 41:6123).