

行政院所屬各機關因公出國人員出國報告書

(出國類別：研究)

荷蘭之百合育種與新品種保護

服務機關：行政院農委會種苗改良繁殖場

出國人 職 稱：助理研究員

姓 名：楊佐琦

出國地區：荷蘭

出國期間：中華民國八十九年九月十六日至十二月十三日

報告日期：中華民國九十年二月二十八日

70/
08905276

荷蘭之百合育種與新品種保護

目 次

壹、目的	1
貳、過程	1
參、心得	2
一、百合育種	2
二、百合鱗莖之繁殖	8
三、百合調製與儲存	10
四、切花生產	12
五、百合材料病原檢定認證	18
六、植物新品種保護	21
七、轉殖基因植物面面觀	39
八、參訪單位、人員與花卉研究資訊	42
肆、結論與建議	52
伍、參考文獻	55

壹、目的

百合 (*Lilium L.*) 是多年生球根花卉作物，屬於單子葉亞綱百合科。主要發源地在喜馬拉亞山地區，後來成為歐洲、亞洲及北美洲喜愛之花卉品種 (Comber, 1949)。百合屬約含 80 個品種並分為七大類，主要之商業化品種為七大類中之亞洲型、東方型與鐵砲型。此三大類原生於中國與日本，亞洲型百合大多來自 *Sinomartagon* 類中異種雜交，東方型百合則由 *Archelirion* 類中之五大種雜交而成，至於鐵砲百合則屬於 *Leucolirion* 類之 *L. longiflorum*。百合栽培於七大地區：北美、澳洲、紐西蘭、荷蘭、南非、歐洲少數國家與包含台灣之東北亞等國家。荷蘭是世界馳名之花卉王國，其百合生產量僅次於玫瑰、菊花與鬱金香，位居第四位之切花種類。過去 35 年來，荷蘭百合種球栽培面積，由 1965 年之 100 公頃增加至 1999 年之 4503 公頃(表 1)。其中亞洲型約佔 45%，東方型約佔 40%，而鐵砲百合只佔 5%，新的鐵砲亞洲雜交型(LA hybrids)約佔 7%。總計約有 12 億百合種球繁殖栽培供切花生產用，85%荷蘭生產之百合種球外銷至各國，15%做為國內市場之切花栽培用。1999 年荷蘭溫室之百合栽培面積增至 249 公頃(表 2)，但 80%生產之切花亦外銷。種球生產之總值約超過 1 億 8 千萬歐元(Euro) (資料來源: BKD/CBS/PT/VBN, 2000)，至於切花生產總值約為 20 億 8 千 3 百萬歐元(表 3)。

本場與荷蘭之植物育種及繁殖中心(CPRO-DLO)簽訂百合育種合作計畫，擬藉由此次研習機會，收集與學習其球根花卉育種、繁殖、品種保護與品質認證等多方面之成功經驗(圖 2)，謹將此次見聞詳述於後，分享攸關業者與研究單位。

貳、過程

此次研習地點主要在荷蘭之國際植物研究所(Plant research International)之遺傳與育種組(Business Unit of Genetics and Breeding)與生物多樣性與鑑定組(Business Unit Biodiversity and Identity)。另外參觀瓦赫尼罕大學(Wageningen University)、植物育種家權利委員會(Board of Plant Breeders' Rights ; RAAD VOOR HET KWEKERSRECHT)、球根花卉研究中心(Bulb

Research Center, LBO)、球根花卉檢測服務中心(Flower Bulb Inspection Service, BloembollenKeuringsDienst, BKD)與私人機構或公司等。

日期		地點	活動內容
月	日		
9	16-17	台北-阿姆斯特丹-瓦赫尼罕	啟程並抵達研習地，位於瓦赫尼罕(Wageningen)之國際植物研究所
9-10	18-11	國際植物研究所	研習百合育種相關技術、品種保護與資料收集
10	12	瓦赫尼罕	植物育種家權利委員會(Board of Plant Breeders' Rights ; RAAD VOOR HET KWEKERSRECHT)
10	13-31	國際植物研究所	研習百合育種相關技術、品種保護與資料收集
11	1-4	阿姆斯特丹、Hillegom	參加 2000 年國際花卉貿易展與園藝資材展(International Flower Trade Show and International Horti Fair)與參觀私人公司等
11	5-14	國際植物研究所	研習百合育種相關技術、品種保護與資料收集
11	15	Hillegom 與 Lisse	球根花卉研究中心(LBO)、球根花卉檢測服務中心(BKD)
11	16-30	國際植物研究所	研習百合育種相關技術、品種保護與資料收集
12	1-11	國際植物研究所	整理與撰寫出國報告
12	12-13	瓦赫尼罕-阿姆斯特丹-台北	回程返國

參、心得

一、百合育種

種原收集 (Germplasm Collection) 種原收集與保存是維持生物、基因多樣性是一項重要工作之一，可供育種、研究與瀕臨滅種之物種保護。國際植物研究所(Plant research International，為原先之 AB (農業生物及土壤肥力研究所)、CPRO (植物育種及繁殖研究所)及 IPO (與植物保護研究所) 合併而成之私人研究機構)維持許多作物之種原收集與保存工作，同時進行相關育種與其他科技研究，此百合種原收集中心已收藏超過 1000 種百合基因型，其中包括不同之遺傳性狀與其他重要特性，例如花色、花形、耐低光照性、花期、開花促成或抗病性等物種 (Bonnier, 1997)。

傳統育種 (Conventional breeding) 傳統育種方法一直是球根花卉市場上新品種或栽培種育成之主要來源，而育成不同產品提供消費者選擇乃是成功育種

之證明。許多良好的表現型例如花色、花形、葉色、葉形、抗蟲性或抗病性、植株活力與香味等一直是育種者選育之目標。不同百合類型間之交配育種可增加不同種間重要特性之遺傳多樣性，尤其是導入抗病毒病、基腐病(bulb rot 由 *Fusarium oxysporum* 所引起)、或灰黴病(*Botrytis elliptica* 所引起)，耐不佳栽培環境(例如低光照、高或低溫等)，特殊花色與花形等優良性狀，皆為當今育種之主要目標 (Van Tuyl *et al.*, 1988; 1991)。組織培養技術與授粉技術亦被廣為應用在基因庫之擴展和百合不同類型間之育種(Van Creij *et al.*, 1993; Van Tuyl *et al.*, 1991)。鐵砲與亞洲型之交配育成鐵砲—亞洲雜交型('LA' hybrids)，鐵砲與東方型之交配育成鐵砲—東方雜交型('LO' hybrids)，最困難之雜交組合東方—亞洲雜交型則從兩種重要商業百合群—亞洲型與東方型之交配育成('OA' hybrids)，此新雜交型之育成則是百合育種上之最新突破(Van Tuyl *et al.*, 2000)。

雜交育種之障礙、阻擾種間雜交之問題可區分成受精前與受精後二種，對百合而言，切花柱法(cut style method)可克服受精前障礙(pre-fertilization barriers) (Van Tuyl *et al.*, 1988)。授粉交配障礙則可以染色體倍加或多倍體技術(polyploidization techniques)恢復種間二倍數體雜交種之稔性(fertility) (Van Tuyl, 1989; Van Tuyl *et al.*, 1990, 1992)。受精後障礙 (post-fertilization barriers)通常因胚乳(endosperm)之退化而致使胚不孕性(abortion of the embryo)，此項困難可由胚拯救技術(embryo-rescue methods)來克服 (Van Creij *et al.*, 1990; Van Tuyl *et al.*, 1991)。

授粉方法(Pollination Methods) Janson (1992)研究在完整花與瓶內授粉(in vitro pollination)中，授粉後花粉管與雌蕊之相互反應。花粉於清晨收集，最好立即用來授粉，否則放在含有矽膠之乾燥器中，室溫(17-20 °C)下保存。保存後之花粉，於 22 °C 下、100% RH 環境下回濕(rehydrated) 2 小時，母本於開花前 1 天行去雄處理。去雄處理約 2 天後，柱頭上可行授粉，正常授粉後或切去花柱授粉後之表面，鋁箔紙帽套上以避免其他花粉之黏著(Van Tuyl *et al.*, 1991)。

一般授粉法(**normal pollination** , NP) ，將花粉直接沾在柱頭上即可。切花柱法(**cut-style method** , CSM)則是以刀片在子房上方 1-2 mm 處將花柱

切除，然後鐵炮百合柱頭分泌物放於切口處，立即沾滿花粉授粉。嫁接花柱法 (**grafted style method**, GSM) 係將花粉置於親合性百合品種之柱頭上一天，將含已發芽花粉之花柱從子房上方 1-2mm 切除，以充滿鐵炮百合柱頭分泌物之吸管片段黏貼至另一株之子房上。授粉應於溫室中進行，待子房膨大成熟，授粉後 35 天(DAP)檢查果莢內胚是否存在。

胚拯救技術(Embryo-Rescue Methods) 胚拯救技術可以配合上述三種不同授粉方法進行育種，子房先以 70% 酒精表面消毒 1 分鐘再以 2% 次氯酸% 那消毒 15 分鐘，最後以無菌蒸餾水漂洗三次。

子房切片培養(**Ovary-slice culture**) 於授粉後 5-28 天，將子房依 3-4 mm 厚度橫切 6-8 段，再按順序放置於培養基中培養，每 4 段切片放在直徑 9 cm 的培養皿裡，MS 培養基中加入 9% sucrose、1.0 mg/L NAA 與 0.7% bacteriological agar (濕熱消毒前之 pH 為 6.0)為最常用之配方，子房切片培養一般在 25°C 黑暗下培養。胚珠培養(**ovule culture**)約在授粉後 30 至 52 天進行，取出胚珠(ovules)並進行培養，培養基則於 MS 培養基中加入 5% sucrose、0.1mg/L NAA 與 0.7% bacteriological agar (濕熱消毒前之 pH 為 5.5)，在直徑 9 cm 的培養皿裡最多裝入 80 粒種子，胚珠於 17°C 黑暗中培養。初長之小植株則移至胚培養培養基(embryo culture medium)中，直至形成可移植之小鱗莖。

胚培養(**Embryo culture**)則於授粉後 40 天，從胚珠中取出胚，培養在含培養基之培養皿中，一般用 MS 培養基加入 2% sucrose、1 µg/L NAA 與 0.7% bacteriological agar(濕熱消毒前 pH 為 5.0) (Asano and Myodo, 1977)，於 17°C 黑暗中培養。經過 8-10 週之 5°C 處理誘導休眠期，小鱗莖於介質中養成正常之開花株。

染色體倍加(Chromosome Doubling) 通常以紡錘體抑制劑秋水仙素 (colchicine) (Blakeslee and Avery, 1937, Emsweller and Brierley, 1940) 或 oryzalin (Van Tuyl et al., 1992)浸泡處理百合之營養繁殖體如鱗片，可造成人為之染色體倍增，此項技術已成功的應用於不同類型之百合雜交育種。

細胞流動測量儀測定(Flow Cytometry) DNA 含量之測定乃是從花粉、葉片、鱗片或根等組織中製取之細胞核，以細胞流動測量儀(flow cytometer ICP-22；Ortho Diagnostic Systems, Beerle, Belgium)來測定的。此螢光訊號與細胞核中之 DNA 量成正比，再依多段分析儀(multichannel distribution analyzer 2130；Ortho Diagnostic Systems)測定螢光訊號之強弱，最後轉化成柱狀圖之 C-值(C-values)來代表細胞核內 DNA 量 (Van Tuyl *et al.*, 1989; Van Tuyl and Boon, 1997)，瞭解百合各品系間染色體之倍數，可增加育種之成功率。

抗基腐病(*Fusarium Basal Rot*)之檢定 評估抗百合基腐病等級，一般在每一基因型中選用 3 個百合鱗莖或是以 4X5mm 鱗片形成之小鱗莖，栽培於已接種有 *F. oxysporum* f. sp. *Lilii* 病土之素燒或塑膠盆中(約 60,000 病菌/每克土壤)，置放在溫室中進行抗病分級選拔。種植後 15 週後依下列發病面積比例進行分級：1= 健康，2 = <5% 基腐，3= 5-15% 基腐，4= 15-50%基腐，5 =>50% 基腐。無論是二倍體或四倍體之‘Connecticut King’及‘Orlito’亞洲型百合對基腐病皆有抗性 (Straathof and Van Tuyl, 1990)。Straathof *et al.*(1993)也開發一套抗基腐病之篩選技術，在正常狀況下，16 測試種亞洲型百合之抗病性。

82 種百合基因型之抗百合基腐病遺傳變異亦被深入研究，亞洲型百合(section Sinomartagon)具較高之抗病性，鐵砲百合 (section Leucolirion)次之，而東方型(section Archelirion)只有中等抗性。在 Sinomartagon 類別中以 *L. dauricum* 為最抗病品種。利用種間雜交，將具抗基腐病之百合品種導入新品種中亦被探討(Straathof and Van Tuyl, 1994; Loffler *et al.*, 1996)。

抗灰黴病(*Botrytis Blight*)之檢定 在自然狀況下，測試 44 種亞洲型百合對 *B. elliptica* 之抗感性，依據感染之情形分成五級：0 = 健康，1 = 輕微罹病，2 = 中度罹病，3 = 非常罹病，4 = 非常嚴重罹病。測試結果有 20.5% 品種屬於健康或高抗性，而 6.8% 品種則屬非常罹病並且造成經濟損失。‘Red Carpet’、‘My JoAnn’、‘Jumparava’、‘Vishenka’、‘Teika’、‘Skriveri’、

'Baltails'、'Venta'與'Flaming Giant'等品種，在自然狀況下對 *B. elliptica* 皆有抗性(Balode, 1999)。

原位雜交(In situ Hybridization) 原位雜交是一項功能性很強之技術，可增強檢視在生體中核酸探針標定組織、細胞、細胞核或染色體之雜交位置。此項技術廣泛被用來構築染色體之物理性圖譜、分析染色體及基因組之結構、鑑定或分析病毒及細菌之核酸序列、決定性別、定位轉殖基因之位置、以及鑑定植物育種之染色體重組(Leitch et al., 1994)。

基因組原位雜交(Genome in-situ hybridization ; **GISH**) 乃原位雜交技術中之一種，可做為區分父母本之染色體來源、在屬間或種間雜交有用性狀之選用及百合育種用 (Karlova et al., 1999; Lim 2000; Lim et al., 2000)。此技術較複雜，包括染色體製備、DNA 探針、與原位雜交。結果可以用上位螢光顯微鏡配合濾光鏡觀察 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)、FITC (fluorescein isothiocyanate)或 PI (propidium iodide)之雜交呈色反應。

分子育種(Molecular Breeding)

基因標誌(Genetic Markers) 基因標誌一直用來快速偵測一個成功的轉形植物，通常它被黏接在科學家感到興趣之基因上，利用生物技術同步轉形至植物中。最常用之二個標誌為抗 kanamycin，主要是含合成酵素 neomycin phosphotransferase (NPTII) 之基因可分解 kanamycin，另外為 β -glucuronidase (GUS)。一般用生物分析法(M3)測定 NPTII 之存在，以組織化學法測定 GUS 之表達。當 GUS 酵素於轉殖植物細胞中表達時，與組織化學之反應基質 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide (X-gluc) 起作用產生藍色色素。另外亦有人使用螢火蟲之螢光素酵素(luciferase)當作標誌以求快速偵測轉殖基因，luciferase 會催化光激發產生螢光反應。從水母(*Aequorea victoria*)分離之綠色螢光蛋白(green fluorescent protein; GFP) 也被使用偵測異源生物轉形細胞之成功表達。建立一個良好標誌基因之表達方法、系統為成功進行有用基因轉形之基礎。

分子標誌被認為特殊性狀間接選拔之有效工具，尤其表現不受環境變化之影響，可利用來加速育種選拔(例如 苗期檢定)及繁殖緩慢且幼年性較長作物

之遺傳研究(如球根花卉)。Straathof *et al.* (1996) 利用 RAPD 標誌選定亞洲型百合抗 *Fusarium* 基腐病之抗病性以及構築性狀連接圖譜。OPQ-0805 是隱性等位基因，而 OPV-02-01 為顯性等位基因與抗病性有高相關性，二種分子標誌會從'Connecticut King'百合之配子間分離。

轉殖植物之插入性狀 近年來生物技術之迅速發展，許多轉殖植物已成功商業化上市（例如玉米、棉花等），其中一般新植物品種中導入之性狀如表 5 所示，包括抗殺草劑、耐蟲、耐病、花色、雄不稔、代謝產物之改造、耐旱、耐氧化逆境、耐熱(寒)或耐鹽性等。

百合之轉形 傳統育種過程需耗時多年，最終育成品系(種)常含有育種需要或不需之特性存在。基因轉形技術可克服有限的基因庫、持續之回交過程，只需要能穩定地將基因物質轉移至植物細胞基因組中，並能再分化形成為完整之植株。球根花卉中最常被轉形之作物是屬切花植物，而且利用農桿菌轉形技術 (*Agrobacterium*-mediated gene transfer) 是多數球根花卉最常被應用之技術(表 4)。除此之外，粒子槍轉形技術(microprojectile-mediated gene transfer 或 bombardment 或 biolistic)、電穿孔法(electroporation)、微量注射法(microinjection)等也被研究，以求開發新的球根花卉品種。

農桿菌轉形法(*Agrobacterium*-mediated transformation) 迄今只有二篇報告是以農桿菌轉形法將標誌基因轉移至百合組織細胞中，Cohen and Meridith (1992) 成功地將 C58 品系之農桿菌轉形至'Nelli White'鐵砲百合之鱗片段內，腫瘤組織能合成 nopaline，但只顯示了短暫表達階段。1995 年 Langveld *et al.* 測試五種品系之農桿菌轉形至'Harmony'亞洲型百合能力，結果發現只有 C58 品系在特定百合組織中具有較高之轉形成成功率，同時 C58-C1 只有一個轉形細胞。但是二者研究皆無法成功重新長成鐵砲百合植株。雖然如此至少證明農桿菌能轉形至'Nelli White'鐵砲百合，未來可尋求侵染力更高之農桿菌，以及從轉形組織再分化形成百合植株的更佳方法。

微投射（粒子槍）轉形法(Microprojectile-mediated Transformation)

1992 年 Leede-Plegt *et al.* 測試 4 種不同啟動子(promoters-CaMV 35S, LAT52, chiA PA2 及 TR2')轉形至鐵砲百合花粉之效率，利用 GUS 標示基因構築這四種啟動子基因，再以粒子槍打入百合花粉中，結果 CaMV 35S 啟動子在百合花粉中不活動，LAT52 啟動子在菸草中有活力但在百合花粉中不活動，chiA PA2 啟動子亦與 LAT52 啟動子之效率相同，TR2' mannopine synthase 啟動子則在茄科植物及百合花粉中皆有活力。後來 Tribulato *et al.* (1997)發現 'Star Gazer' 與 'Snow Queen'百合在含 diacamba picloram 之培養基中易形成癒傷組織，'Snow Queen'在液體培養時可形成粉末狀之癒傷組織團。同時他們亦發現水稻 *Act* 與 CaMV 35S 啟動子適用於鐵砲百合細胞懸浮液之轉形。Watad *et al.* (1998) 更發表從微投射（粒子槍）轉形之百合癒傷組織中成功地再生為百合植株，所用之載體中含有 *uidA* reporter 與 *PAT* 選擇性標誌基因，再生之小植株除能耐殺草劑'bialaphos'，亦由 PCR 增幅分析及南方墨點法之分析確定 *PAT* 選擇性標誌基因之持續表達。

二、百合鱗莖之繁殖

有許多方法可以用來量產百合，包括用種子、鱗片、鱗莖分生、莖生小鱗莖、莖生株芽、或是組織培養等方法生產百合鱗莖，這些方法分別簡述如下 (Bryan, J. 1998)。

種子繁殖(Propagation by Seed) 種子繁殖之方式可以從病毒感染株中分離生產出無病毒種苗，商業栽培者利用此優點每年生產許多鐵砲、亞洲型與東方型百合之無病毒雜交品系(種)，將這些親本隔離栽培於無蚜蟲之溫室中。種子繁殖是大量繁殖喇叭型百合(Trumpet lilies)之最便宜之方式，親合性組合生產之單一種莢約含有 200 粒以上有活力之種子。但大多數之百合為自交不親合，換言之，從同一植株授粉之種莢無法形成有活力之種子，因此必須靠蜜蜂或人為雜交方式異株授粉方能成功繁殖種子。種莢或是蒴果在轉褐或裂開前採收，最好於乾燥天氣下，選用無病徵之植株中採收種子，尤其須注意灰黴病的感染。商業栽培者大量生產時常用種子清理機，確保種子發芽率，亦可在光箱下檢視種子中有否胚之存在。一般建議將採收之種子存放於低於結冰之溫度狀態下，

在此狀態下種子可保存 35 年以上之活力。家庭式栽培者可將種子密封於容器中，冰箱下保存。

百合之發芽方式有二種：上位型(epigeal)與下位型(hypogea)，大多數之上位發芽型百合立即出芽，環境適宜下第二栽培季即可養成開花球，亞洲型與喇叭型百合(trumpet hybrids)如 *L. amabile*、*L. concolor*、*L. longiflorum*、*L. pumilum* 及 *L. wallichianum* 等屬於此類；而下位發芽型百合，如東方型百合則先於種子邊形成小鱗莖，延遲至下季才出芽。

一旦小鱗莖充實飽滿、根系形成，穴盤移至較冷之生長箱中(10 °C) 約三週，再移送至冷房 (1 °C)下春化處理 12 週。待上位葉老化採收小鱗莖，包裝於乾的泥炭苔(sphagnum peat)中保存在冷房 (1 °C)下隔年春季再種植。不管是上位發芽型或是下位發芽型，栽種百合種子時需注四個條件：1. 種植於排水性良好之土壤介質中，例如蛭石與泥炭苔之混合介質；2. 於萌芽階段小心澆水，確勿讓介質含水量飽和或太乾旱；3. 太熱狀況下使用 60% 遮蔭網；4. 定期噴灑藥劑預防灰黴病與蚜虫。

鱗片繁殖(Propagation by Bulb Scales) 鱗片無性繁殖是最快速且最經濟之百合繁殖方法，但須要選用無基腐病、線虫等感染之鱗莖作為繁殖材料。商業栽培者使用適當之殺菌劑如腐絕(thiabendazole、TBZ、Mertect)與蓋普丹(captan)混合藥劑粉衣或浸漬處理鱗片，以防止鱗片受基腐病與 *Cylindrocarpon* 感染。鱗片堆積於含薄層濕介質之穴盤或箱子中，在 15 至 21°C 之通風良好之生長箱(室)直到小鱗莖與根系發育完全。培養期依品種而定，亞洲型只需 6 至 8 週，喇叭型則需 8 至 10 週，而東方型須要需 12 至 14 週。在適合發育環境下，鱗片上形成較大之小鱗莖。由培養室內移出長有小鱗莖之穴盤或箱子，儲放 4 °C 至 10 °C 下 3 至 4 週，再送到 1°C 下春化處理打破休眠，亞洲型至少需 6 週，東方型須要需 12 至 14 週，喇叭型則不需要低溫打破休眠，但仍須要放置在較高溫度下(2°C) 一段時間(Bryan, J. 1998)。

在荷蘭尚有另一套鱗片繁殖系統，鱗片剝離後消毒，25°C 下放置 8 週，17°C 下 4 週，然後 2-5°C 下在蛭石或泥炭苔裡放置 6-12 週。小鱗莖以不定芽方式長在鱗片基部，於溫室或田間栽培，小鱗莖可長至商業球等級(Bonnier, 1997)。

莖生小鱗莖(Propagation by Stem Bulblets) 亞洲型百合可於地下部稍高於鱗莖處之莖部長出許多小鱗莖，這些莖生小鱗莖只要是產自健康母株，可以儲存供繁殖用，然而此方式已被鱗片無性繁殖所取代。

莖生株芽繁殖(Propagation by Stem Bulbils) *L. bulbiferum*、*L. sulphureum* 及 *L. lancifolium* 等品種或雜交種，莖部常生長許多直徑 1-2 公分之暗紫色株芽。開花前去除花芽或將莖壓倒性埋在土裏皆能誘導株芽之形成。株芽亦可依上述方法栽培在含排水性良好之介質的穴盤、籃子、盆子裡。

組織培養繁殖(Propagation by Tissue Culture) 組織培養繁殖方式是目前商業化快速量產新品種或良好無性繁殖體之最佳方法。在二年內，單株可以在瓶內產生 2 百萬小鱗莖，但是此項技術所耗費之成本比鱗片繁殖者高，只有在生產高品質、無病毒或稀有無性繁殖體前題下，才選用此法量產百合鱗莖。含 0.03 mg/L NAA 及 45 至 60 g/L 蔗糖之 MS 培養基最常被用來組織培養量產百合，小鱗莖形成之後期，培養基中之蔗糖量可提高至 90 g/L，幫助小鱗莖之快速肥大。一般於黑暗、20 °C 至 24°C 下培養，每 8-10 週移植一次，增殖至直徑約 0.5 至 1 公分之小鱗莖形成。另一方面，小鱗莖亦可切分各小鱗片再來繁殖，但需要更長之增殖時間。最後之鱗莖形成培養基中不添加任何植物生長調節劑，並將蔗糖量可提高至 90 g/L，培養 10 至 16 週可形成高品質之小鱗莖。當小鱗莖從培養容器中移出，先用流動之清水洗淨，再浸於腐絕與蓋普丹混合藥劑中，防止土壤傳播性病害之發生。小鱗莖置於含有乾泥炭苔與濕蛭石混合介質之塑膠袋中，儲放在 12 °C 下至少 8 週(亞洲型)，9 °C 下 12 週(東方型)，最後於春季溫室中，種植在含消毒之介質的植床或穴盤中。

三、百合調製與儲存(Lily Processing and Storage)

在荷蘭百合種球生產，通常於三、四月栽種田間並在十、十一月間採收種球。田間栽種時期球根花卉檢測服務中心(Bulb Inspection Service ; BKD)定期前往田檢，如果合格即予發證，採收時皆用機械化方式，並立即送至處理場

卸貨，保持在冷氣調控狀態下用各種機械進行種球分級、清洗、目視品管、浸藥劑處理(通常是腐絕與蓋普丹混合液)、堆放於含泥炭苔之塑膠籃，最後用堆高機運往不同溫度下儲藏，一般在 2-5 °C 下冷藏 6-10 週以打破休眠。各類型百合之儲藏溫度與目的如下所示，經適當之儲藏處理後，荷蘭生產之百合種球可送往各國或國內作切花週年栽培。

條件	調製、儲藏處理
2 °C	種球運達之冷藏
-2.0° / -1.5° / -1.0 °C	長期冷凍(東方型、亞洲型、喇叭型)
24° / 20° / 17° / 5 °C	百合鱗片繁殖用
2° / -0.5° / -1 °C	塑膠籃儲存百合種植材料
ULO	長期儲藏

ULO (Ultra Low Oxygen)代表超低氧下儲存在緊密艙槽中，以特殊比例之氧氣與二氧化碳控制。

長期儲存(Long-term storage) 為了長期冷凍儲藏百合種球達一年以上，-1.5°C 至 -2°C 之條件可使東方型、亞洲型或喇叭型百合足以供應切花之週年生產。但是有時，有些品種在-2°C 狀態下會損傷新芽(Beattie and White, 1993)。此外 Bonnier (1997) 測試在-2°C 狀態下，百合種球於濕泥炭苔中之最大儲藏期，依鱗莖或鱗片之再生結果，五個亞洲型百合可儲存 2.9 至 4.0 年，‘Star Gazer’、‘Gelria’ 東方型百合與 ‘Snow Queen’ 東方型百合則可保存 2.0 至 2.4 年。測試鱗片之內測離子滲漏(ion leakage)，除了‘Enchantment’ 與 ‘Mont Blanc’ 亞洲型百合外，其餘品種經儲藏 3 年後之離子滲漏皆增加。因此 Bonnier 結論出在 -2 °C 濕泥炭苔中，百合之有效儲存應為 2 年。將鱗片生小鱗莖保存於-2°C 下、聚乙烯塑膠袋中，最低之離子滲漏與最高之出芽率皆以 2 年為上限 (Bonnier, 1997)。

至於在組培瓶內之百合長期儲存， $\frac{1}{4}$ 濃度 MS 培養基加 9% 蔗糖，經 28 月之儲存後得到最高之抑制出芽與種球增長，以及最高活力與再生長。於 25 °C 培養下，所有 10 個測試之百合品種皆能存活 28 月。至於儲存 -2°C 下，亞洲型與東方型百合品種皆能存活 28 月，至於 *L. longiflorum* 及 *L. henryi* 只能存活 6 個月，超出此限即死亡(Bonnier, 1997)。

百合分生組織之冷凍保存可能是為未來長期儲存之適當方法，目前然仍屬試驗階段。根據 Bouman and De Klerk (1990)之研究，*L. speciosum* 分生組織先以 dimethyl sulfoxide (DMSO)處理再放到液態氮下儲存，只有 8% 以下之存活率。最近 Matsumoto *et al.* (1995)之研究，*L. japonicum* 之頂端分生組織透過一種玻璃質化技術 (vitrification) 成功地冷凍保存組織苗，4 週超低溫冷藏後，芽體形成率仍有 80%。

四、切花生產(Cut Flower Production)

1999 年，荷蘭百合切花生產之栽培面積已增加至 249 公頃 (表 2)，主要於溫室內栽培，有些於室外栽培。夏季利用溫室促成開花系統，但必須有良好之通風設備與加熱系統，溫暖時遮蔭是保持栽培氣候之必要設施。

百合可在不同土壤下栽種，但是排水必須良好，重質壤土與黏土較不適宜，若無法選擇則添加腐敗良好之粗有機質來改善土壤結構與增加土表 30 公分之通氣性；中性酸鹼度之土壤是理想之狀況。土壤蒸氣消毒為控制土傳 *Fusarium* 與 *Pythium* 病害以及雜草之最好方法，蒸氣維持在 80°C 下注入土壤約 25 公分至少需 30 分鐘以上。

百合種球若未經過冷凍 (新種球)，應於冷藏後直接移出種植；至於冷凍種球則須移至 10 °C 至 15°C 下並打開覆蓋之塑膠布，緩慢退冰。若情況允許，種球最好直接以 30 公分深之箱植或塑膠籃種植，種植密度視土壤形態、季節、品種與種球大小而定。種球若種植於穴盤，則於種球下 1 公分、上方 8 公分處放置土壤或介質。年初，種球需於 9°C 下處理 4 週促進根系發展，保存至年底則只需 2 週即可。百合低溫促成栽培可確保莖強韌與切花品質，亞洲型 14 至 17°C 最為理想，東方型及鐵砲型則以 17 至 19 °C 為佳。土壤溫度最好能保持低溫，遮蔭是很好之方式亦可配合適當之澆水。

百合易受氯之為害，尤其在酸性土壤下造成不同情程度之葉燒。含氯之肥料，例如過磷酸鹽(superphosphate)及過磷酸三鹽(triple superphosphate)最好不要使用。上方噴灌系統能均勻供應水量並洗掉作物上之灰塵，生長期間更需謹慎控制許多病蟲害。

最後莖葉從莖基部 10 公分上方切取、分級裝上塑膠袖套，放置於含些許水之容器中，2 至 3 °C 下儲放、包裝運往荷蘭如 Aalsmeer (VBA) 之拍賣場或外銷至全世界。



圖 1. 荷蘭百合種球之調製、儲藏系統
上：百合種球之採收、裝籃運送至調製場
中：自動覆蓋塑膠袋送交冷藏
下：ULO (Ultra Low Oxygen) 長期儲藏

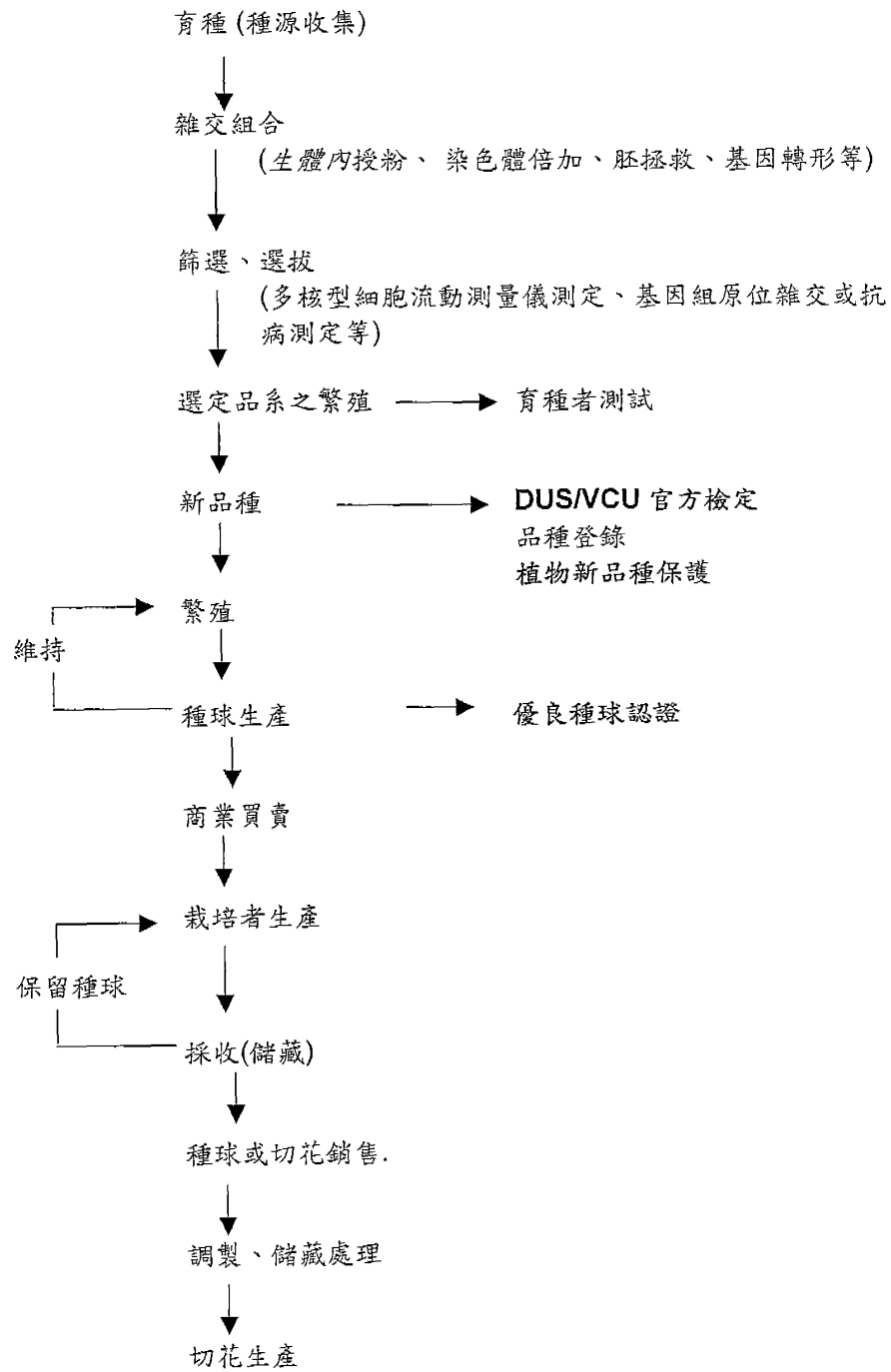


圖 2. 荷蘭百合商業品種之誕生

DUS= 顯著性(distinctness)、一致性(uniformity)與穩定性(stability)； VCU= 栽培及使用價值(value for cultivation and use)

表 1. 1994 至 1999 年荷蘭球根花卉室外栽培面積

作物 \ 年	(公頃)					
	1994	1995	1996	1997	1998	1999
鬱金香 Tulips	7,468	8,031	8,747	9,393	10,050	10,099
百合 Lilies	3,114	3,298	3,289	3,407	3,831	4,503
唐菖蒲 Gladioli	1,857	1,846	1,569	1,680	1,903	2,027
喇叭水仙 Daffodils	1,326	1,405	1,473	1,532	1,589	1,769
風信子 Hyacinths	920	980	1,067	1,099	1,184	1,158
鳶尾 Irises	738	720	677	664	664	724
番紅花 Crocus	-	-	-	-	602	675
其他	1,685	1,807	1,828	1,889	1,531	1,761

* 資料來源：Statistics Netherlands, Voorburg/Heerlen, 2000 and CBS.

* <http://www.cbs.nl/en/figures>

表 2. 1994 至 1999 年荷蘭球根花卉溫室內生產切花之栽培面積

作物 \ 年	(公頃)					
	1994	1995	1996	1997	1998	1999
玫瑰 Roses	926	919	913	906	931	950
菊花 Chrysanthemums	769	772	745	747	757	813
小菖蘭 Freesias	282	277	279	251	241	232
百合 Lilies	216	212	227	218	238	249
非洲菊 Gerberas	195	194	208	212	219	235
蘭花 Orchids	196	208	197	204	206	201
康乃馨 Carnations	213	191	164	139	119	109
百合水仙 Alstroemeria	109	118	115	113	117	124
火鶴花 Anthurium	72	72	78	88	83	85
洋桔梗 Eustoma	-	-	-	76	78	
滿天星 Gypsophila	79	54	44	35	30	
納麗石蒜 Nerine	25	25	22	20	19	
其他	587	628	691	636	602	730

* 資料來源：Statistics Netherlands, Voorburg/Heerlen, 2000 and CBS.

* <http://www.cbs.nl/en/figures>

表 3. 荷蘭花卉拍賣總產值(單位：百萬歐元)

(包括進口)

拍賣中心	切花		盆栽植物	
	1998	1999	1998	1999
Aalsmeer Flower Auction (VBA)	894	884	369	374
Holland Flower Auction (BVH)	769	766	306	324
Flora Auction (incl. Eelde)	350	356	18	17
South-East Netherlands Auction (ZON)	39	43	15	17
East Netherlands Auction (VON)	18	18	15	15
Vleuten Flower Auction	16	16	5	5
總計	2086	2083	730	752

資料來源：Association of Dutch Flowers Auction (VBN)

表 4. 球根花卉中已發展轉基因之種類與方式

作物科學名稱	普通名稱	方式	參考文獻
<i>Alstroemeria</i>	百合水仙	Bio	Lin <i>et al.</i> , 2000
<i>Gladiolus</i>	唐菖蒲	At	Graves and Goldman, 1987
		Bio	Kamo <i>et al.</i> , 1995
		At	Kamo, 1997
<i>Iris germanica</i> cv. Skating Party	鳶尾	At	Jeknic <i>et al.</i> 1999
<i>Lilium longiflorum</i>	百合	At	Cohen and Meridith, 1992
<i>Lilium longiflorum</i>			Langeveld <i>et al.</i> , 1995
<i>Lilium</i> 'Harmony'		Bio	Nishihara <i>et al.</i> , 1993
<i>Lilium longiflorum</i>			Van der Leede-Plegt <i>et al.</i> , 1992, 1997
<i>Lilium longiflorum</i>			Tribulato <i>et al.</i> , 1997
<i>Lilium longiflorum</i>			Watad <i>et al.</i> , 1998
<i>Tulipa gesneriana</i>	鬱金香	Bio	Wilmink <i>et al.</i> , 1994

At = 農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* ; Bio = 粒子槍微射法 Biolistic

表 5. 轉基因植物導入之性狀

目標	策略或方法
抗或耐殺草劑	耐 Glyphosphate
	耐 Glufosinate
	耐 Bromoxynil
	耐 ALS-抑制物質
耐蟲	Bt 毒質
	蛋白質分解酵素抑制物
	澱粉酵素抑制物
	Lectin 蛋白質
耐病毒	鞘蛋白
	衛星核酸
	複製酵素
	逆意(antisense) RNA 或 DNA
	缺失性干擾 RNA
	順向活化元素(Cis-acting elements)
	移行蛋白
	核糖酵素(Ribozymes)
耐真菌	植物防禦素(Phytoalexins)
	核糖體不活化蛋白質(Ribosome inactivation proteins)
	幾丁質分解酵素(Chitinases)與 glucanases
耐細菌	Lysozymes 溶菌酵素
	Lytic peptides
	毒質
	過氧化氫
花色	Flavonoid 色素
雄不稔	Robonuclease
	Glucanase
改變代謝產物	氨基酸與蛋白質
	脂肪
	碳水化合物
	疫苗
耐旱	Proline
	Betain
	Fructans
耐氧化逆境	Superoxide dismutase
	Glutathione reductase
耐寒	Glycerol-3-phosphate
耐鹽	Mannitol-phosphate dehydrogenease

五、百合材料病原檢定認證 (Certification Scheme of Pathogen-Tested Lily Material)

百合健康種苗認證程序乃依據「歐洲暨地中海地區植物保護組織」(EPPO)提出之球根花卉病原測試認證程序，並經由委員會認可採用(OEPP/EPPO, 1991)。

在任何情況下，經認證之出口用百合種球必須符合進口國家之檢疫法規，特別是一些特定檢疫病蟲害。在百合檢查流程中可清楚區隔母本(nuclear stock)、一代繁殖體(皆必須隔離栽植於防蚜蟲之溫網室中)、田間之原種、或採種(OEPP/EPPO, 1993)。

繁殖材料之篩選 選用繁殖之植株必須具備有良好生長勢、無病毒病徵、品質佳、花色無變異以及正常開花時期等特性。一般已上市之品種若有病毒，須經莖頂分生組織培養去除下列主要病毒：百合隱徵病毒(lily symptomless carlavirus；LSV)、鬱金香條斑病毒(tulip breaking potyvirus；TBV)、百合斑駁病毒(lily mottle potyvirus；LMOV)以及百合X病毒(lily virus X potexvirus；LVX)。

母本之增殖 (Production of Nuclear Stock) 選用之母本植物必須在隔離、特別指定、防蚜蟲之溫室中保存，若為國外引進者必先行隔離檢疫。選用之百合鱗莖必須栽種於無土或無菌之介質中，並預防各種病蟲害之發生，尤其需定期噴灑殺蟲劑防治蚜蟲。這些植株應定期目視檢查病毒病徵，至少於二個栽培季節中完成三次檢定下列病毒：

芥子菜嵌紋病毒 arabis mosaic nepovirus (ArMV)

胡瓜嵌紋病毒 cucumber mosaic cucumovirus (CMV)

百合隱徵病毒 lily symptomless carlavirus (LSV)

百合X病毒 lily X potexvirus (PVX)

菸草響葉病毒 tobacco rattle tobnavirus (TRV)

鬱金香條斑病毒 tulip breaking potyvirus (TBV or LMOV)

任何植株只要出現病毒病徵或以血清法檢出為正反應者都應以去除，剩留植株只要在一年內無變異、無病徵、血清法測試為負反應者，皆可發予健康母

本合格證書。如果無合乎上述條件之植株，應利用熱療法或莖頂分生組織培養技術獲得健壯、活力之植株，而且後裔也須通過相同條件，方能獲發健康母本合格證。此外，農藝及開花等性狀亦須檢查合格(品質與原性狀無異)。

母本之維持(Maintenance of the Nuclear Stock) 母本必須維持在上述生長條件下，但於不同溫室中，確保無其他潛伏感染源及其他開花認證期之材料。病蟲害必須定期預防，尤其是蚜蟲，栽培介質必須是無土的且不含傳播病毒之線蟲。每年，所有母本植株必須測試除二種線蟲傳播病毒外之上述病毒。

溫室內之繁殖材料(Multiplication of the Material in the Glasshouse)、一代繁殖球(Propagation Stock I) 母本材料通常在控制狀況下繁殖一次(但有時許多次)，接著在田間增殖。百合通常於溫室中以鱗片繁殖，衛生與生產條件嚴格控管下執行，如器具之消毒、培養環境與品系鑑定等。組織培養微體繁殖也是百合繁殖之適用方法，但繁殖之材料也是以相同時期之流程控管。生產一代繁殖體所要求之栽培環境亦與母本增殖相同，但病毒檢查只行逢機測試，推薦之認證條件如表 6 與表 7。

田間增殖(Multiplication in the field)、二代繁殖球(propagation stock II) 在溫室增殖之材料可以直接在田間繁殖採種或以鱗片於田間繁殖約 6 個季節，每一不同來源之品系(clone)應分別記錄，因此不同母本衍生之種球授予不同代數、品系之合格許可證。病蟲害應定期防治，植株應目視檢查各種病蟲害，並縫機抽測 LVX、TBV (LMoV) 與 LSV 等病毒，確保符合檢查標準。

採種球之生產(Production of certified stock) 從一代繁殖球生產之鱗莖或二代繁殖球生產之鱗莖做為生產最後採種球之栽培條件，都與二代繁殖球生產之環境及認證標準相同。

經由如此程序生產之繁殖球或採種球，品種純度或可能之變異皆須通過檢查。

表 6、建議之百合母本、一代繁殖球、二代繁殖球與採種球病毒容許量

病毒	栽培期檢查			乾球檢查 (ELISA 測試)		
	母本	一代繁殖球	二代繁殖球 與採種球	母本	一代繁殖球	二代繁殖球 與採種球
LSV	無病徵	無病徵	<1.5% 病徵	0	<1% (<2% 東方型)	<10% (<20% 東方型)
TBV	無病徵	無病徵	<1.5% 病徵	0	0	<1%
LVX	無病徵	無病徵	<1.5% 病徵	0	0	<1%
CMV	無病徵	無病徵	<1.5% 病徵	0	-	-
ArMV	無病徵	無病徵	<1.5% 病徵	0	-	-
TRV	無病徵	無病徵	<1.5% 病徵	0	-	-

表 7、建議之百合母本、一代繁殖球、二代繁殖球與採種球非病毒之病蟲害容許量

病蟲害	栽培期檢查	乾球檢查 (ELISA 測試)
<i>Rhizoctonia tuliparum</i>	如有發現行乾球檢查	0
真菌(個別)		1%
真菌(總計)		1.5%
<i>Rhizoglyphus</i> spp.		1%
<i>Liothrips raneeckeii</i>	-	0
<i>Rhodococcus fascians</i>	0 (或溫湯處理)	0 (或溫湯處理)
線蟲	0.1% (或溫湯處理)	0.1% (或溫湯處理)
種球受損	-	1%
目視品種變異	0.5%	0.5%

六、植物新品種保護(Plant Variety Protection ; PVP)

荷蘭育種與新品種保護之沿革(History of the Dutch Breeding and PVP System)

荷蘭有系統之植物育種約於 1900 年開始，許多重要之里程碑如表 8 所列，一直到 1967 年，以國際植物新品種保護聯盟(UPOV Convention ; International Convention for the Protection of New Varieties of Plants) 為依據之新法規—荷蘭種苗法(Dutch Seed and Plant Act)通過實施，才是真正的落實新品種保護。1938 至 1967 年間之育種家酬勞金基金會系統，成功地扮演荷蘭新品種育成研究風氣之最佳推動單位，以 1955 年為例，此基金會付給荷蘭育種家約一百萬荷盾之酬勞金。

荷蘭植物育種家權利(Plant Breeders' Rights)之一般申請程序如圖 3 所簡介，顯然荷蘭之植物新品種保護乃屬於集中型檢定系統(centralized-DUS testing system) (表 14)，由專家群進行顯著性、一致性與穩定性測定(DUS)。自 1987 至 1999 年間，荷蘭申請植物新品種保護與發證之統計資料如表 9，一般以花卉部門最多，每年平均約有 800 個申請件數，其次為農藝作物、蔬菜作物與果樹等。

國際植物新品種保護聯盟(UPOV) 1961 年 12 月 2 日，國際植物新品種保護聯盟於巴黎成立，為植物新品種之智慧財產權之國際保護體系，於 1968 年立法公告實施。後來法案分別於 1972 年 12 月 10 日、1978 年 10 月 23 日及 1991 年 3 月 19 日在日內瓦修改國際植物新品種保護法。

為何須要修法(Why was revision necessary)? 1978 年聯盟通過之法案已施行良好並廣受植物育種者支持，但於 1991 年修正法中有些許不同點如表 10 所列。利用傳統育種技術一般需要 10 至 15 年方能育成一個新品種，然而以實驗室基因轉殖方式，或許只需幾個月即可產生一個新品種。實質衍生品種 (**essentially derived variety** ; EDV)原來是指一個品種之天然變異，於 1991 年修正法中特別重視此議題，一個新品種是由一個已存在之保護品種中衍生而來，如果具有顯著性、一致性與穩定性，仍可受新品種保護，但若非經原始品種擁有者之授權，則不能用作商業使用。

何謂植物品種保護(What is Plant Variety Protection) 植物品種保護也就是植物育種家權利(plant breeders right; PBR)，乃是對新品種育成者授予其使用植物新品種之專利權，為一種智慧財產權，好比是專利權、著作權、商標權、或工業設計權等。然專利權與植物品種保護權之比較如表 11，根據國際植物新品種保護聯盟之統計，自 1961 年成立以來，在各會員國中約有 10 萬個品種已被授權保護，每年預計仍有 9,000 個案件申請授權保護。

植物品種保護與貿易相關智慧財產權協定(PVP and the TRIPS Agreement) 世界貿易組織(World Trade Organization; WTO)之協定中包含貿易相關智慧財產權協定(Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights; TRIPS Agreement)，依第 1 條 12 款規定，協定包括所有的如專利權、著作權、商標權、或工業設計權等之智慧財產權。然而植物品種保護權並未提及，但在 27(3)條文中指出，將植物及動物排除於專利權項目之外，卻仍規定各會員國對植物新品種提供專利或一個有效的特別法，或是兩者兼併。在世界貿易組織協定實施生效四年後應重新檢討相關法規，貿易相關智慧財產權協定創立一個植物新品種之保護規定，許多國家依據 UPOV 規定建立特別法系統以符合此項權利。

為何要成為國際植物新品種保護聯盟會員國? (Why becoming a member of UPOV?) 國際植物新品種保護聯盟之會員國提供本國植物育種者也可能獲得其他會員國之品種保護權，同時提供外國育種者來本國領土內從事植物育種及種子生產之獎勵或誘因。若有植物新品種保護之重要資產，國際貿易間一可吸引國外投資，二來是贏取消費市場之重要資源，最後各會員國可透過 UPOV 共享經驗、為植物育種之提昇與增進植物新品種保護體系而貢獻一己之力。

國際植物新品種保護聯盟會員國(Member States of UPOV) 2000 年 2 月 16 日之統計，44 個國家加入成為國際植物新品種保護聯盟之會員國，國際植物新品種保護聯盟可幫助各會員國間交換資訊，並解決各項爭端或問題。更進一步，已建立保護品種名冊之會員國可以用實際經驗幫助其他會員國建立國

家新品種檢定系統，以及簽署雙方協定幫助進行新品種檢定(UPOV, 2000)(表 12)。

顯著性、一致性與穩定性檢定(DUS Tests) 國際植物新品種保護聯盟在其系統中建立 3 個檢定原則，即 DUS 標準—顯著性(distinctness；D)、一致性(uniformity；U)與穩定性(stability；S)測定，通常於溫室或田間執行此項技術檢定，檢查形態、生理或園藝特性等。因為檢定準則之特色調查深受環境與人為判定之影響，因此進行 DUS 檢定時須特別小心謹慎，防止誤判帶來之訴訟及紛爭。

荷蘭進行球根花卉之 DUS 檢定，送交材料之必要條件與檢定地點如表 13 所列。

抗病特性(Disease Resistance Characteristics) 多年來，抗病育種是許多新品種選育之主要目標之一，因此除了顯著性、一致性與穩定性測定外，品種之抗病特性是描述新品種性狀之另一重要項目。為進行 DUS 測定，若抗病性狀能明顯的被確認與描述，一致性與穩定性之結果也須要符合要求。測試抗病特性之標準方法包含下列要項：1. 品系之維持(中等或特殊條件)；2. 執行方法包括植物栽培條件(溫度、光照、栽培方式)；3. 病原接種方法；4. 測試時期(從種植到接種、從接種到判讀)與測試株數；5. 標準品種：罹病、抗病等。上述條件只適合單基因顯性抗病之調查，至於單基因隱性抗病或多基因抗病則使用不同時期之抗病觀察。

影像分析(Image Analysis) 物體形狀之影像或相片、器官之長與寬、花瓣或葉片之顏色等皆被保存，當作「參考收集」(reference collections)用以檢定新品種用。於不同階段之 DUS 檢定記錄或育種者申請保護時書面送審時之相片，可給審查專家一些檢定參考、實際量測記錄物體用、以及出版保護品種雜誌時之參考資訊。

利用數位相機拍攝高解析度之數位影像作為分析標準，將來必然日愈普遍，但是必須設立標準化條件，例如閃光燈、相機裝置、背景以增加對比、尺度對照、顏色對照、相機至物體之固定距離、光照條件、俯視或側視、數位相機品牌或機型等。

檢定準則(Test Guidelines) 每種作物之檢定準則是由技術工作委員會之專家群所建立的草案(目前約有 150 檢定準則供參用)，經補充或修改後由國際植物新品種保護聯盟技術委員會通過並出版使用。每一檢定準則皆含有十個章節：主旨、準則、須要材料、檢定之執行、方法及觀察、品種分類、特性與特徵、性狀表、文獻與技術性問卷調查。例如一般執行新品種 DUS 檢定之準則是參考 TG/1/2 (1979 年 11 月 14 日，UPOV，日內瓦)，馬鈴薯之新品種 DUS 檢定準則是參考 TG/23/5 (1986 年 11 月 21 日，UPOV，日內瓦)，百合之新品種 DUS 檢定準則是參考 TG/59/6 (1991 年 10 月 18 日，UPOV，日內瓦)。

申請植物新品種保護時，申請人詳填之技術性問卷調查是縮短時效非常重要之要件，標準之技術性問卷調查則可參考 TGP/15。

植物新品種保護之施行(Implementing a PBR Scheme) 依據 UPOV 精神立法施行是每個國家執行品種保護之重要第一步，國家立法是否符合 UPOV 法規是成為 UPOV 會員國前之重要審查關鍵點。後續之植物新品種保護流程之建立與實施、合格授權等議題皆較為複雜。因此，許多 UPOV 會員國根據國情與未來之貿易夥伴採用適合本國之制度，然而不同檢查制度亦決定植物新品種保護之架構與人員編制、檢查地點、額外資源與收費標準等。對於候選新品種之 DUS 檢定，申請人因不同之檢查制度而有不同之參與程度，通常分成四級：1. 集中檢查型(Centralized testing)：申請人不用參與，許多歐洲國家採用此 UPOV 模式，申請人寄交檢驗材料至檢驗機關即可；2. 育種者栽培及官方檢查型(Breeder Testing with Official Examination)：申請人高度參與(例如澳洲、加拿大、阿根廷與其他國家)，申請人依據 UPOV 之技術準則安排或執行栽培試驗，再由植物新品種保護審查官員確定申請人記錄之相關性狀資料；3. 混合檢查型(集中檢查與申請人檢定混合型)：申請人參與程度不一定，公告的植物屬種由國家官方機構檢查，其他種類則由申請人栽種申請檢驗；4. 育種者檢測(Breeder Testing with no Official examination)：如美國之專利制度，育種者栽培、描述性狀並不經官方檢查，此四種檢查制度之其他特性比較如表 14 所示。

百合品種保護發證之數量(Number of lily PBR certificates issued) 自 1960 年至 1998 年，百合登錄之品種約有 7,000 栽培種(Leslie 1982)。從 1988

年至 2000 年荷蘭植物育種家權利委員會發證之百合栽培種，迄今尚有 508 個被商業使用，甚至於 1979 年五月八日登錄保護之‘Jolanda’亞洲型百合品種，目前仍舊商業生產中。根據荷蘭植物育種家權利委員會之資料顯示，2000 年計有 92 個百合栽培種登錄保護，而從 1997 年至 1999 年，每年約有 47 栽培種登錄(表 17)。

利用生物技術或分子技術鑑定栽培種(Bio-or Molecular Techniques Used to Identify Cultivars)

利用分子標誌描述與管理參考收集品種在未來品種鑑定上愈加重要，因此對於分子生物技術在遺傳學分子標誌選定、轉殖基因等領域之發展必須多加留意。此外，有關此項技術應用在植物育種家權利保護之可行性，亦值得重視。

同功異構酵素分析(Isozyme analysis) 同功異構酵素分析之比對分析一直被用來輔助進行品種鑑定，例如玫瑰之品種鑑定 (Kuhns and Fretz, 1978; Millan *et al.*, 1995) 及康乃馨品種鑑定 (Messeguer and Arus, 1985)。雖然如此，同功異構酵素可能是組織專一的，有時組織採樣時須在特定生理期方能獲得一致、且具再現性之條帶。尤其，有限之同功異構酵素分析點或許不足夠鑑定許多栽培種(Murphy *et al.*, 1990)。

二次代謝產物分析(Secondary metabolite analysis) 如 flavonoids 二次代謝產物之差異等曾被應用分析、區別球根花卉品種(Asen, 1979, 1984)，不幸的是在栽培種層次，許多代謝產物之差異性多屬定量的，有時則是實驗誤差或環境所引起的。

分子標誌(Molecular markers) 過去十年來，分子遺傳技術一直用來做品種鑑定，以分子標誌偵測栽培種間 DNA 序列之差異性，也發展每一栽培種之 DNA 指紋法(DNA fingerprints)以資品種鑑定。雖然目前 UPOV 認為分子標誌法不應用於 DUS 測試，然而基因改造生物(genetically modified organisms ; GMO)或實質衍生品種(EDV)之普遍增加，意謂著如何鑑定 GMO 與非 GMO 產品日趨重要。

以 DNA 分析或分子標誌鑑定品種具有下列優點：1. 巨大之植物基因組可供分子標誌設計用來區別品種；2. 植物各器官之 DNA 皆相同；3. 環境因子不影響 DNA 序列；4. DNA 分析可以高度之自動化及客觀之評定；5. 可以利用國際標準化、透明化方法建立之 DNA 資料庫；6. 可以輕易的增加新品種資訊於已存之資料庫；7. DNA 分析可於作物之生長初期進行，不必等到成熟期之形態性狀表現(Preston *et al.*, 1999)。有關 DNA 印刷技術(DNA printing techniques)與特性分述於後 (Preston *et al.*, 1999, Rajapakse and Ballard, 1997)(表 15):

限制片段長多型性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism ; RFLP) 限制片段長多型性分析包括 DNA 分離，以特定限制酵素分解特定 DNA 序列片段，序列片段再行凝膠電泳法分開條帶，轉印至膜上再以特定之探針雜交。Aintworth 與 Sharpe (1989)評論利用 RFLP 技術鑑定品種之可行性，確定於許多種類之植物上多可應用。基因組之選殖體(clone)比 cDNA 之選殖體較適合以 RFLP 鑑定菊花品種(Wolff *et al.*, 1994)。

隨機擴增多型性 DNA 分析(Random Amplification of Polymorphic DNA ; RAPD) 隨機擴增多型性分析利用一小段 (通常為 10-鹽基) 引子來搜尋基因組之 DNA 之配對位置，再以聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)行擴增，再以凝膠電泳法分開條帶分析。依照選定之條件，可分離 5-30 條帶產物。RAPD 法比 RFLP 法具有下列之優點：簡單、速率高、多型性高、低廉及部份過程可自動化(Rajapakse and Ballard, 1997)。因此許多研究皆以 RAPD 進行球根花卉之品種指紋鑑定 (表 16)。RAPD 與 AFLP 一樣，RAPD 很少應用在穀類作物之品種鑑定上，主要是穀類作物含巨大之基因組，以及較低層次之多型性。無再現性、微弱或分叉形之條帶等缺點使得結果更不易判定 (Prestomn *et al.*, 1999)。

簡單重覆序列(Simple Sequence Repeats ; SSR) 利用設計可黏接兩側已知序列之一對引子，進行聚合酵素連鎖反應分析，其中一種技術稱為微衛星(microsatellite；亦謂之簡單重覆序列)分析，真核生物的基因組中之微衛星

區域中普遍存在連續重覆之 2 至 5 個核苷酸如 (GT)_n 或 (GATA)_n，微衛星增幅即利用兩端可黏接在微衛星附近共同保留區域之引子，行 PCR 做觀察。微衛星標誌已經使用於一些植物如小麥、大麥、甘藍、向日葵、香蕉與萵苣等之品種鑑定及性狀描述(Mosagges and Friedt, 1994; Rajapakse and Ballard, 1997; Prestomn *et al.*, 1999)。

特定基因標誌(Gene specific markers : GSM) 這類之標誌乃直接增幅已知基因序列之多型性分析，可圖譜化基因及追蹤變異地區。此技術之優點是以多型性基因序列及能表現重要經濟特性之植物基因為基礎來鑑定栽培種，加上因許多植物特定表達之基因解序程式已成功之發展，標誌之獲得更容易。

單核苷酸多型性分析(Single Nucleotide Polymorphism : SNP) 這類之標誌廣泛應用在人類基因與特定遺傳疾病相關性之研究，基本上此技術在鑑定於特定位置單一鹽基對之改變，然後設計可行之 PCR 增幅步驟行多型性分析。此項標誌將來在植物品種之鑑定可能會被廣為開發。

增幅片段長多型性分析(Amplified Fragment length Polymorphism ; AFLP) 增幅片段長多型性分析是以 PCR 為基礎之多點指紋分析方式，結合了上述之 STS、RFLP 與 RAPD 技術。AFLP 指紋分析包括 (1) 以限制內核酸酵素(restriction endonucleases)將基因組 DNA 切開分解成二段；(2) 將 DNA 連接頭(DNA adapters)黏接至 DNA 切開端；(3) 一組限制切開片段做選擇性增幅；(4) 凝膠電泳法分析。因為 DNA 連接頭之黏接，此項指紋分析方法不須事先知道核酸序列，Law *et al.* (1998)針對此技術應用在植物育種者保護權進行綜合分析。

表 8、荷蘭育種與植物品種保護之沿革

年	里程碑
1900	只有少數育種者
1912	成立植物育種研究所(Institute for Plant Breeding ; IVP)
1924	植物育種研究所首次描寫及推薦植物品種名單
1932	成立荷蘭一般檢查發證中心(General Dutch Certification Agency ; NAK)
1936	NAK 收取田間檢查費用，作新穀類及豌豆品種之持有人補償費用
1938	成立育種者補償基金會(Breeder Remuneration Fund)—功能為鼓勵育種與馬鈴薯品種檢定，形成私人育種之快速成長。
1941	育種者條款(Breeders' Decree)之立法—新品種育成之普遍增加
1961	國際植物新品種保護聯盟(UPOV convention)成立
1967	種苗法(Seed and Plant Act)立法施行

表 9、自 1987 年至 1999 年荷蘭申請植物品種保護與發證數量之調查

年	申請數					註冊數	
	農藝	花卉	蔬菜	果樹	總計	總計/年	總計*
1987	198	970	156	21	1345	480	2600
1988	221	785	110	23	1139	794	3029
1989	211	900	110	27	1248	870	3338
1990	229	1012	183	31	1455	812	3674
1991	251	953	203	24	1431	855	3832
1992	276	1034	54	37	1401	973	4122
1993	236	1173	39	36	1484	1283	4646
1994	226	1190	103	22	1541	948	4761
1995	196	846	118	23	1183	1050	5061
1996	174	779	44	8	1005	1131	5331
1997	153	594	23	3	773	776	5053
1998	204	660	19	10	893	751	4962
1999	180	700	8	13	901	555	4696

*自 1966 年至當年年底之登錄發證品種總合。

資料來源：Dutch Board for Plant Breeder's Rights。

表 10、UPOV 之 1978 年修正法及 1991 年修正法中主要法規項目比較

	UPOV 1978 修正法	UPOV 1991 修正法
育種免責權	+	+
實質衍生	-	+
保護範疇	只限繁殖材料	所有材料包括收穫產品與終產物(可選擇的)
農民免責權	農民留種不在保護範圍	+
保護植物種類	>24	所有的
保護期限	15-18 年	20-25 年
雙重保障	-	+

資料來源：PVP, APSA workshop Asian Seed, Volume4, No.2, April 1997, p-3 and p7.

表 11、以專利法及植物品種保護法保護植物新品種之比較

	專利法	植物品種保護法
I. 保護主要項目	工業發明	植物品種
II. 保護要件		
1. 文件審查	必須	必須
2. 田間(實地)審查	不需要	必須
3. 測試植物材料	不需要(也許需要存放)	必須
4. 保護條件	a. 新穎性 b. 工業實用性 c. 普通性 (unobviously) (發明階段) d. 可授權之發現(an enabling disclosure)	a. 商業新穎性 b. 顯著性 c. 一致性 d. 穩定性 e. 適當之命名
III. 保護範疇		
1. 保護範疇之決定	由申請專利者決定	由各國法規決定(或依國際植物新品種保護聯盟之法規辦法理)
2. 使用保護品種做為育成新品種材料	或許需要專利者之授權	不需要權利擁有者之授權(研究免責權/育種免責權)
3. 農民使用保護品種留種做為同一塊地之連續種植材料	或許需要專利者之授權	不需要權利擁有者之授權(農民免責權)
IV. 品種命名	不需要	必須
V. 保護期間	自申請後 20 年	果樹與藤蔓植物 25 年，其他植物(荷蘭則分別為 30 及 25 年)

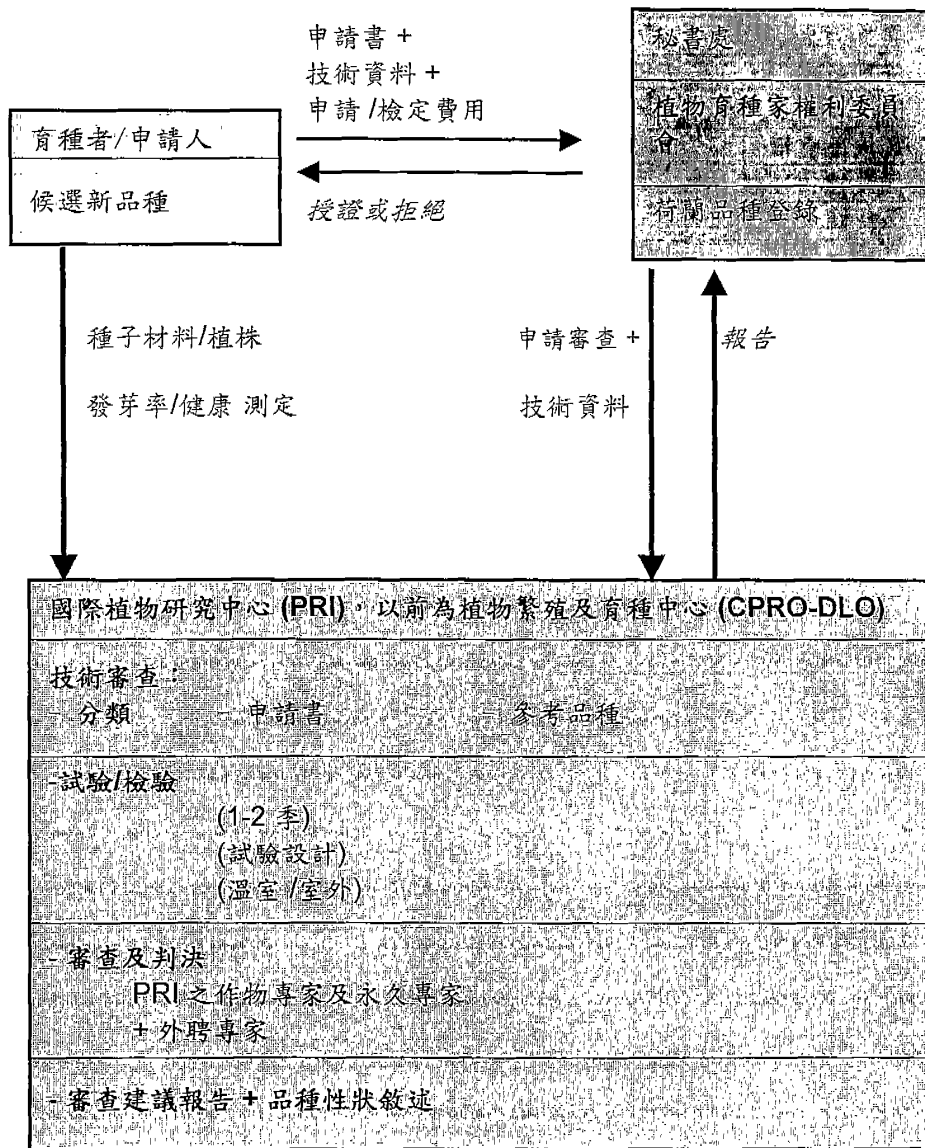


圖 3. 荷蘭之植物品種保護之一般申請程序

表 12、已建立花卉種類的品種審查實際技術知識或國家檢定準則之國家

花卉種類之拉丁名	會員國
Alstroemeria L. 百合水仙	JP a, b, IL, IT, NL, a, PL a
Amaryllis (Hippeastrum) 孤挺花	NL a
Anthurium Schott 火鶴花	JP b, NL a, PL a
Begonia L. 秋海棠	IT, JP a, b, PL a
Begonia-Hybridae 雜交之秋海棠	DE a, b
Bromeliaceae Juss. Partim 觀賞鳳梨	FR, NL a, NZ
Caladium Vent. 彩葉芋	JP a, b
Cattleya Lindl. 嘉德利亞蘭	JP b
Chrysanthemum L. 菊花	CZ a, b, GB a, IL, IT, PL a
Cyclamen L. 仙客來	CZ a, b, FR a, IT, JP a, b, NL a
Dahlia 大理花	GB a
Dendrobium Sw. 石斛蘭	JP b, NL a
Dianthus L. 石竹	CZ a, ES a, b, FR, IL, IT, JP a, b, NL
Dieffenbachia Schott 黛粉葉	FR, IT
Euphorbia pulcherrima Willd. 聖誕紅	DK a, IL, IT, JP b
Eustoma Salisb. 洋桔梗	JP a, b
Freesia Eckl. 小蒼蘭	IL, IT, JP a, b, NL, a, b, PL a
Gerbera L. 非洲菊	IL, JP a, b, NL a
Gladiolus L. 唐菖蒲	CZ a, b, IL, IT, JP a, b, NL a, PL a
Gloriosa L. 嘉蘭	NL a
Gypsophila L. 滿天星	IL, JP a, b, ZA a
Hibiscus L. 扶桑	DE a, b, GB, a, IL, JP b
Hydrangea L. 繡球花	FR, GB a, JP b, NZ a, b
Impatiens L. 鳳仙花	FR, IL, JP b, PL a
Jasminum L. 茉莉花	NL a
Lilium L. 百合	CZ a, IL, IT, JP, NL a, b, PL, ZA a
Lilium (garden varieties) 百合(庭院 品種)	GB a
Lisianthus L. (Eustoma Salisb.) 洋 桔梗	IL a, b, DE a
Lycoris Herb. 石蒜	JP b
Nerium L. 納麗石蒜	FR, JP b
Oncidium Sw. 文心蘭	JP b, NL a
Orchidacea Juss. 蘭科	NL a
Pelargonium L. 天竺葵	GB a, IL, JP b, PL a
Phalaenopsis Bl. 蝴蝶蘭	JP b, NL a
Philodendron Schott corr. Schott 蔓綠絨	JP b, NL a, b
Rhododendron L. 杜鵑	CZ a, DE a, FR a, GB a, JP a, b, NZ a, b

Rosa L. 玫瑰	CZ a, DE a, ES a, b, FR, GB a, HU a, b, IL, IT, JP, a, b, NL a, b, PL a, ZA a
Sandersonia aurantiaca Hook 宮燈百合	NZ a, b
Spathiphyllum Schott 白鶴芋	DK a, JP a, b, NL a, ZA a, b
Syngonium Schott 合果芋	IL a, b, NL a, NZ a, b
Tulipa L. 鬱金香	CZ a, JP a, b, NL a
Vanda Jones 萬代蘭	JP b
Zantedeschia Spreng. 彩色海芋	JP a, b, NL a, NZ a, b, ZA a, b

- a. 依據現在或過去實際經驗所建立品種審查實際技術知識之國家
- b. 已建立國家品種檢定準則之國家
- c. UPOV 44 個會員國之 ISO 標準縮寫:

AR = Argentina 阿根廷, AT = Austria 奧地利, AU = Australia 澳洲, BE = Belgium 比利時, BG = Bulgaria 保加利亞, BO = Bolivia 玻利維亞, BR = Brazil 巴西, CA = Canada 加拿大, CH = Switzerland 瑞士, CL = Chile 智利, CN = China 中國, CO = Columbia 哥倫比亞, CZ = Czech Republic 捷克共和國, DE = Germany 德國, DK = Denmark 丹麥, EC = Ecuador 厄瓜多爾, ES = Spain 西班牙, FI = Finland 芬蘭, FR = France 法國, GB = United Kingdom 英國, HU = Hungary 匈牙利, IE = Ireland 愛爾蘭, IL = Israel 以色列, IT = Italy 義大利, JP = Japan 日本, KE = Kenya 肯亞, MD = Republic of Moldova, MX = Mexico 墨西哥, NL = Netherlands 荷蘭, NO = Norway 挪威, NZ = New Zealand 紐西蘭, PA = Panama 巴拿馬, PL = Poland 波蘭, PT = Portugal 葡萄牙, PT = Paraguay 巴拉圭, RU = Russian Federation 俄羅斯, SE = Sweden 瑞典, SI = Slovenia 斯洛伐尼亞, SK = Slovakia 斯洛法克, TT = Trinidad and Tobago 千里達. 托貝哥, UA = Ukraine 烏克蘭, US = United States of America 美國, UY = Uruguay 烏拉圭, ZA = South Africa 南非。

表 13、荷蘭申請花卉植物育種權繳交材料之必須注意條件

拉丁名	普通名	地區代號	申請截止日期	收件截止日期	數量	備註
Alstroemeria L.	百合水仙	NL2	9月1日	10月1日至31日	5株商業標準之幼株	
Alstroemeria L.	百合水仙(種子繁殖)	NL2	9月1日	10月1日至31日	10克種子及25株商業標準之幼株	
Araceae Juss	火鶴花(盆栽用)	NL2	1月15日	3月1日至31日	6株商業標準之幼株	至少含1朵花/花芽
Araceae Juss	火鶴花(切花用)	NL2	1月15日	備索取(on request)	6株商業標準之幼株	至少含1朵花/花芽
Araceae Juss	觀音蓮屬	NL2	1月15日	3月1日至31日	25株商業標準之幼株	
Araceae Juss	彩色海芋	NL2	1月15日	3月1日至31日	30塊莖	開花球
Araceae Juss	黛粉葉	FR4	1月15日	3月1日至31日	20株商業標準之幼株	
Araceae Juss	合果芋	NL2	1月15日	3月1日至31日	25株商業標準之幼株	
Araceae Juss	蔓綠絨	NL2	1月15日	3月1日至31日	25株商業標準之幼株	
Aster L.	翠菊	IL1	5月15日	7月15日至18日	50株未發根之扦插苗	
Begonia L.	秋海棠	DE1	12月15日	-4月15日	30未成熟株	尚未花芽分化之頂端芽插
Capsicum annum L.	觀賞番椒	NL1	1月15日	-2月1日	10克種子	50%發芽率
Chrysanthemum L.	菊花	GB2		備索取	25株未發根之扦插苗	
Chrysanthemum L.	巴黎雛菊	DE1	1月15日	-3月1日	20株商業標準之幼株	無摘心
Chrysanthemum Maximum Ram.	濱菊	NL2	1月15日	3月1日至31日	25株商業標準之幼株	已可田間種植
Crocus L.	番紅花	NL4	9月1日	10月1日至31日	30個球莖	開花球
Curcuma L.	薑荷花	NL2	1月15日	4月15日至5月15日	25株商業標準之幼株	
Cyclamem L.	仙客來	NL1	12月1日	-12月15日	2500種子	50%發芽率
Dahlia Cav.	大理花	GB2	2月1日	3月3日至7日	20株發根之扦插株	
Dianthus L.	康乃馨	NL2	10月15日	2月7日至15日	60株發根之扦插株	85%無病毒 (carnation mottle virus and/or carnation etched ring virus)

Eucomis L'Herit.	Eucomis	NL2	1月15日	4月1日至30日	30球根	開花球
Euphorbia pulcherrima Willd. Ex Klotzsch	聖誕紅	DK2	1月1日	3月1日至7日	10株發根之扦插苗	
Freesia Eckl. Ex Klatt	小薑蘭	NL2	5月15日	6月15日至月15日	30球莖	大於5號球並無任何處理
Gerbera Cass.	非洲菊	NL2	3月31日	5月1日至9日	12株商業標準之幼株	非岩棉栽培
Gladiolus L.	唐菖蒲	NL2	1月15日	3月1日至31日	30球莖	開花球
Gloriosa L.	嘉蘭	NL2	1月15日	3月1日至31日	25球莖	開花球(商業標準)
Gypsophila L.	滿天星	IL1	8月15日	備索取	30株未發根扦插苗	
Hibiscus L.	朱槿	DE1		備索取	30株商業標準之幼株	無摘心
Hippeastrum Herb.	孤挺花	NL2	11月1日	12月11日至15日	20球根	開花球
Hydrangea L.	繡球花	FR3	10月15日	-11月30日	至少5株發根之扦插苗，冷凍室中移出及未染藍色	對照品種3株發根之扦插苗，條件相同。
Impatiens L.	新幾內亞鳳仙花	DE1	12月15日	-3月15日	20株商業標準之幼株	無摘心、盆栽
Impatiens L.	新幾內亞鳳仙花(種子繁殖)	DE1	12月15日	-3月15日	2.50克種子(5X 0.50克種子)	
Iris L.	荷蘭鳶尾	NL4	9月1日	10月1日至31日	30鱗莖	開花球
Iris L.	鳶尾	NL2	9月1日	10月1日至31日	25根莖	已可田間種植
Jasminum L.	茉莉花	NL2	1月15日	3月1日至31日	25株商業標準之幼株	
Kalanchoe Adans.	長壽花	DE1	2月15日	-4月15日	40株未發根扦插苗	
Lilium L.	百合(亞洲型)	NL2	12月1日	1月5日至15日	30鱗莖，無任何處理；14-16種球	90%無LSV, 95%無TBV；鱗莖只有1繁殖點
Lilium L.	百合(東方型)	NL2	12月1日	1月5日至15日	30鱗莖，無任何處理；16-18種球	同上條件
Lilium L.	百合(鐵砲型)	NL2	12月1日	1月5日至15日	30鱗莖，無任何處理；16-18種球	同上條件
Lilium L.	百合(L-O)	NL2	12月1日	1月5日	30鱗莖，無	同上條件

				至 15 日	任何處理； 16-18 種球	
Lilium L.	百合(其他)	NL2	12 月 1 日	1 月 5 日 至 15 日	30 鱗莖，無 任何處理；商 業標準種球	同上條件
Limonium Mill.	星辰花	NL2	1 月 15 日	5 月 1 日 至 15 日	25 株商業標 準之植株	已可田間 種植
Lycopersicon lycopersicum (L.) Karsten ex Farwell	觀賞番茄(營養 繁殖)	NL2	1 月 15 日	3 月 1 日 至 31 日	25 株商業標 準之幼株	
Narcissus L.	喇叭水仙	GB2	6 月 30 日	8 月 25 日 至 31 日	20 鱗莖	目視健康 之開花 球，無任 何處理
Narcissus L.	喇叭水仙	GB2	1 月 30 日	7 月 25 日 至 31 日	20 鱗莖	目視健康 之開花 球，無任 何處理
Nerine Herb.	粉紅納麗石蒜 (N. bowdenii)	NL2	3 月 1 日	5 月 1 日 至 15 日	30 鱗莖	12-14 球， 適合馬上 種植
Nerine Herb.	紅色納麗石蒜 (N. sarniensis)	NL2	5 月 1 日	9 月 1 日 至 15 日	30 鱗莖	12-14 球， 適合馬上 種植
Nerine Herb.	其他 納麗石蒜	NL2	5 月 1 日	備索取	30 鱗莖	12-14 球， 適合馬上 種植
Ochidiacea Juss.	蘭花	NL2	1 月 15 日	備索取	10 株商業標 準之植株	有花芽但 未開花
Ochidiacea Juss.	蝴蝶蘭	NL2	1 月 15 日	12 月 1 日 至 2 月 1 日	10 株商業標 準之植株	有花芽但 未開花
Ochidiacea Juss.	石斛蘭	NL2	1 月 15 日	備索取	10 株商業標 準之植株	有花芽但 未開花
Pelargonium L. 'Herit. Ex Ait.	長春藤葉型之 天竺葵(種子繁 殖)	DE1	8 月 1 日		300 種子	85%發芽 率
Pelargonium L. 'Herit. Ex Ait.	長春藤葉型之 天竺葵(營養繁 殖)	DE1	7 月 1 日	10 月 1 日	15 株商業標 準之幼株	無摘心、 盆栽
Rhododendron L.	杜鵑(Azalea)	DE5	10 月 15 日	-11 月 15 日	30 株幼株	摘心二次
Rhododendron L.	石楠 Rhododendron	DE6	9 月 1 日	-10 月 1 日	3 株(至每一 檢查站)	至少有 3 個花芽
Rosa L.	玫瑰(室外或盆 栽)	DE3	2 月 15 日	3 月 1 日 至 31 日	10 株	嫁接在 R. Canina 或 其他砧木 或自己之 根系
Rosa L.	玫瑰(溫室-, 實 生苗)	NL2	12 月 31 日	2 月 1 日 至 15 日	10 嫁接植株	嫁接在 R. Canina
Rosa L.	玫瑰(溫室-, 變	NL2	12 月 31 日	2 月 1 日	20 嫁接植株	嫁接在 R.

	異)			至 15 日		Canina
Rosa L.	Rambler 玫瑰	DE3	12 月 1 日	2 月 1 日 至 15 日	10 嫁接植株	嫁接在 R. Canina 或 其他砧木 或自己之 根系
Rosa L.	玫瑰(砧木)	NL2	12 月 31 日	3 月 1 日 至 15 日	10 株商業標 準之叢枝灌木	夠健壯可 運輸
Spathiphyllum Schott	白鶴芋	NL2	1 月 15 日	3 月 1 日 至 31 日	25 株商業標 準之幼株	
Syringa L.	紫丁香	NL2	1 月 15 日	3 月 1 日 至 31 日	10 株商業標 準之叢枝灌木	
Tulipa L.	鬱金香	NL4	9 月 1 日	10 月 1 日 至 31 日	30 鱗莖	開花球
Xanthosoma Schott emend.	黃牙芋屬	NL2	12 月 1 日	備索取	30 根莖或 30 發根之芽插苗	
Zinnia l.	百日草(種子繁 殖)	NL1	1 月 15 日	-2 月 1 日	2.5 克種子	50%發芽 率

繳交檢定材料之地點：

DE1 Bundessortenamt, Prufstelle Gartenbau Osterfelddamm80 D-30627 Hannover D
(Germany)

DE3 Bundessortenamt, Prufstelle Rethmar Hauptstrasse1-5 D-31319 Sehnde D

DE5 Lehr-und Versuchsanstalt fur Gartenbau und Landwirtschaft der landwirtschaftska
Rostrup Hogen Kamp D-26260 BAD Zwischenahn D

DE6 Botanischer Garten und Rhododendron Park Marcusallee 60 D-28359 Bremen D

DK2 Afdeling for Prydplanter Kritinebjergvej 10 DK-5792 Aarslev DK (Denmark)

FR3 ENITHP 2 rue le Notre F-49000 Angers F (French)

FR4 GEVES Route des Celles F-06410 BIOT F

GB2 NIAB, Ornamental Plant Section Cambridge GB (United Kingdom)

IL1 Bar-Te PBC-The Volcani Center P.O.Box 6 BET-DAGAN 50 250 IL (Israel)

NL1 Vaste Deskundige Raad v/h Kwekersrecht PRI Droevendaalssteeg 1 6708 PB

Wageningen NL (the Netherlands)

NL2 Vaste Deskundige Raad v/h Kwekersrecht PRI Bornsesteeg 10 6721 NG Bennekom NL

NL4 Vaste Deskundige Raad v/h Kwekersrecht Vennestraat 22 2161 LE Lisse NL (LBO)

表 14、不同植物新品種保護權利(PBR)審查程序之重要特性比較

	集中審查	育種家審查	混合法	專利型審查
申請人參與度	低	高	可變的	高
成本	高	低	可變的	低
行政程序	高	低	中等	非常低
下屬機構層次	高	低	中等	低
授證發生錯誤之危險性	低	低	低	高
申請人之彈性	低	高	可變的	高

表 15、鑑定栽培種之 DNA 技術與特性比較

	RFLP	RAPD	Micro-satellite	GSM	SNP	AFLP
DNA 樣品量	多	少	少	少	少	少
PCR 為基礎	不是	是	是	是	是	是
完成時間	數天	數小時	數小時	數小時	數小時	數小時
簡單或複雜之方式	簡單	複雜	簡單	簡單	簡單	複雜
標誌之優勢	共同-優勢	優勢	優勢	依狀況而定	共同-優勢	優勢
目標 DNA 序列之瞭解	須要	不必要	須要	須要	須要	不必要
再現性	高	有問題的	高	高	高	高
多型性層次	中等	高	高	低	依狀況而定	高

RFLP: Restriction Eragment Length Polymorphism. 限制片段長多型性分析

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA. 隨機擴增多型性分析

Microsatellite: polymorphic repeat region flanked by conserved DNA sequences. 簡單重覆序列

GSM: Gene Specific Marker. 特定基因標誌

SNP: Single Nucleotide Polymorphism. 單核甘酸多型性分析

AFLP: Amplified Eragment Length Polymorphism. 增幅片段長多型性分析

表 16、利用 RAPD 技術鑑定花卉栽培種

花卉	研究目標	參考文獻
玫瑰	專利保護	Torres <i>et al.</i> , 1993
	基因圖譜	Deberner, 1995
		Millan <i>et al.</i> 1995
		Rajapakse <i>et al.</i> , 1995
		Deberner and Mattiesch, 1999
基因多樣性	Reynders-Aloisi and Bollereau, 1995	
種源分析	Jan <i>et al.</i> , 1999	
菊花	基因多樣性	Wolff and Peters-van Rijn, 1993
	種源分析	Dai <i>et al.</i> , 1999
向日葵	近親交配品系之特色分析	Teulat <i>et al.</i> , 1994
杜鵑	一般	Rayburn <i>et al.</i> , 1993
	栽培種鑑定	Handa <i>et al.</i> , 1998
百合	品種鑑定	Yamagishi, 1995
	分類	Lee <i>et al.</i> , 1996
	<i>Fusarium</i> 抗性	Straathof <i>et al.</i> 1996
	遺傳變異	Persson <i>et al.</i> , 1998, Wen and Hsiao, 1999
紫丁香	確定雜交種之起源	Marsolais <i>et al.</i> , 1993
Buffalograss 水牛草	專利保護	Wu and Lin, 1994
	數量遺傳變異	Huff <i>et al.</i> , 1993
鳶尾	遺傳區分	Zhuravlev <i>et al.</i> , 1998
蘭花	雜交種鑑定	Handa <i>et al.</i> , 1998

表 17、從 1988 至 2000 年荷蘭植物育達家保護委員會發予百合品種保護證書之數量

登錄年	到 2000 年仍有登錄數量
1988	15
1989	14
1990	31
1991	20
1992	34
1993	67
1994	17
1995	41
1996	34
1997	47
1998	49
1999	47
2000	92
Total	508

資料來源: Annual report 1999 of the Dutch Board for Plant Breeders' Rights

七、轉殖基因植物面面觀

過去二十餘年來的努力研究下，世界各地已陸續開發出許多種促進植物基因改良之相關技術與方法，這些技術能使植物在其染色體內擁有從植物、動物或微生物等外來的多餘基因，基因改進植物(Genetically modified plants)是在目標植物之未確定位置之基因組內，插入已知有用的外來基因，由於這些外來有用基因的表現，植物能表達對人類生活有助益之一些農業特性，例如抗蟲性、抗病性、耐旱性或耐鹽性等。除此之外，品質、健康提昇、植物粗物質之量與質等各方面之研究亦被開發與改良。

1994 年第一個轉基因作物已被商業化販售，由於對於基因改造植物或轉基因作物之爭議性議題層出不窮，因此我們可從下列幾個方面來討論、思考、尋求更好的解決方法。

(一)、大眾媒體面：

1. 經過一段時間以來，有限相關轉基因作物資訊的移轉、釋出，媒體報導帶給大眾一些有關基因改造植物之認知與關切。
2. 長期以來，科學界缺乏主動告知大眾媒體的興趣。
3. 一般而言，科學家並未經過利用新聞媒體告知大眾新資訊的特殊訓練。
4. 有關科學性可靠的資訊，一般只經過雜誌發表或學術研討會之公開演講方式，提供給少數的大眾而已。
5. 有時，有關基因改造植物的科學研究過程之媒體報導，常是誇大其詞或是資訊錯誤的。
6. 有時，基因改造植物的可行性及優勢常被擁護者過度吹噓，常忽略了介紹其可能造成的負面影響或是反效果。
7. 有時，基因改造植物的可能發生之危險性，也被反對者誇大其詞，報導中通常缺少有關危險性內容，解決或避免危險性主要方法。

我們深信植物科學界與媒體傳播界應以公開化、透明化、科學為基礎之可靠方式，向大眾告知有關基因改造植物及相關產品之研究，利用優勢與可能危險性等資料。

(二)、經濟面：

1. 基因改造植物可以開發永續性農業及食品健康產業的新前景，並且領導開發符合消費者需求的高品質與具健康特質之新植物。
2. 全世界基因改造植物之商業種植面積：1997 年有 1100 萬公頃，1998 年有 2800 萬公頃，1999 年到達 4000 萬公頃，但在美國，2000 年之成長率可能會減少 30%。
3. 除少數特例

外，歐洲並不准許商業栽培轉基因作物。4. 西元 2000 年，由基因改造植物衍生的農產品之商業總值估計約有 50 億美元。5. 在美國、加拿大、少部份的歐洲國家及日本，基因改造植物之發展、上市與行銷，已經提供公司、大學及研究機構相當數量與良好的就業機會。6. 基因改造植物之研發成果應被肯定並給予經費支持，俾能更一步持續發展相關研究。7. 智慧財產權保護發明者，只有少數育種者或農民對於基因改造植物之保護有認知與興趣，必須加強此方面之宣導。然而若將專利權加入育種產品內，可能對小規模的植物育種者及農民有威脅性。8. 獨佔性地控制全球種子市場是不被期望的。9. 可能會危及全球糧食安全的獨佔性控制或相關技術是無法被接受的。10. 全球只有 5-10 家大型的生命科學及植物生技公司，操控主要的基因改造植物之智慧財產權。

由於上述主各項原因，我們應該要（1）加強基因改造植物及相關產物之研究與應用，以提昇社會的經濟發展及民眾的健康福祉。（2）植物的基因改造應用專利權或植物品種保護權來規範之，更應以負責的態度來面對，包括尋求新的解決途徑期能避免對小規模的育種者及農民有負面的影響，應該避免智慧財產權的專賣性集中而排除其它單位的研究使用。

（三）、道德面：

1. 基因改造技術提供了改變生物遺傳物質組成的新途徑。2. 基因改造技術可將一種類的 DNA 併入另一種種類的 DNA 中。3. 因為宗教信仰或哲學上的特質，有些社會反對任何改造過的生物基因物質。4. 植物的基因改造技術可引領在量（糧食充份供應）與質（新藥物、健康的有效成份、永續農業等）上對社會群眾有利益之新產品之開發。5. 科學界與社會大眾皆有責任去尋求解決問題與各種不同需求之途徑。

針對上述各項考量我輩認為（1）任何反對生物基因改選之想法與個體，應被尊重與認知。（2）資訊自由化是必須的，經選擇的自由化應被接納或忍受。

（3）對社會有益的產品（包括對世界糧食供應的安全性、消費者或病患的健康性等）之開發，基因改造技術是一項重要的達成方法，只要這項技術被審慎的規範與控管，其發展的優點也應被考量。基因改造植物或產品的開發、使用，不應該因為少數人以片面的道德理由而阻礙其發展。

（四）、環境影響面：

1. 基因改造技術可產生對永續性農業有貢獻之新改良作物。
2. 使用抗病及抗蟲之基因改造植物可明顯地減少農藥的使用量，減少對非防治目標生物與環境的傷害。
3. 使用抗殺草劑之基因改造植物可能增加一些殺草劑種類之使用量。
4. 在抗蟲及抗病之基因改造植物中產生的一些化合物可能對其它生物有傷害。
5. 我們不希望看到微生物、昆蟲、植物或動物等生物多樣性，因基因改造植物之商業栽培而危害減少，農業生態系之生物多樣性應被維持。
6. 抗生素之選擇性標誌物等非興趣之基因，常隨著基因改造植物中商業化栽植而被釋放在大自然中。
7. 其他種選擇性標誌及不用選擇性標誌之其它方法已在開發中。
8. 較詳細的風險評估研究已被陸續報導，田間評估試驗亦在評估當中。
9. 生態的風險評估研究已被執行，然而有關基因改造植物與其它生物間之生態交互影響之研究仍是有限。
10. 由於許多植物種類間之授粉活力已被瞭解，在此基礎上，基因改造植物成為商業品種之有效立法，已在評估中。

依上述不同的考量，國內的轉殖基因作物管理當局可依不同作物類別，不同性狀基因，作物生產之生理或生態狀況之不同等，謹慎地制定法規來評估基因改造植物對環境之整體影響。在將基因改造植物引入環境前，實際利益是必須被證明的，風險評估亦是需經確定為沒有問題的。

(五)、食物及消費面：

1. 食物是人類維繫生命與生存的基本物質。
2. 一些經改良農藝特性如耐旱、耐鹽、耐金屬的作物，是確保 21 世紀全球糧食安全供應的重要一環。
3. 消費者深深考慮到食用基因改造食物的生命安全風險。
4. 基因改造微生物（例如胰島素及一些重組酵素等）之產品已廣泛被接受。
5. 基因改造之新或改良食物、產品，必須先進行食物風險評估研究，在某特定情況下，必須針對食物安全風險進行調查。
6. 基因改造植物衍生的商業產品，目前尚未有科學證明對人類或動物有毒害或不良效應。
7. 增加或增強營養價值、風味、口感、外觀及貯存壽命等食物特性之基因改造植物可能對消費者有利。
8. 經由新藥品發展，減低癌症發生、降低膽固醇、減少心臟血管疾病等之研究及改進，含有這些特性之基因改造食物將能提供消費者更實質性之健康。

更進一步改良或使用基因改造植物，可提供更有價值、價格低廉的產品給消費者，甚至提昇人類生命的品質，但是有關改善健康之論點應經更確實的科學證明。基因改造糧食作物是滿足社會所需之健康食物及滿足未來全世界糧食

安全供應之重要環節，唯經過實際與單純的食品安全研究，確保其對人類與動物無傷害之虞，再以嚴謹的法規規定上市地點，通過層層保護後再將新的基因改造食品推出，市場接受性將可大大提高。

八、參訪單位、人員與花卉研究資訊

- l. 國際植物研究中心(Plant Research International, **PRI**): 約有 800 餘位員工。從事植物各方面之研究，理論與產業實務緊密結合之私人研究機構。 <http://www.plant.wageningen-ur.nl>
- Dr. Jaap M. van Tuyl, 球根花卉植物資深研究員，遺傳與育種組 (Business Unit of Genetics and Breeding)。
j.m.vantuyl@plant.wag-ur.nl
 - Dr. A. P. M. (Ton) den Nijs, 遺傳與育種組經理 (Manager of Business Unit of Genetics and Breeding)。
A.P.M.denNijs@plant.wag-ur.nl
 - Dr. N. G. Hogenboom, 總經理。
n.g.hogenboom@plant.wag-ur.nl
 - Ir. Ronald C. Snijder, 球根花卉植物研究員，彩色海芋抗軟腐病育種。
r.c.snijder@plant.wag-ur.nl
 - Dr. R.J. Bino, 細胞電腦學組經理 (Business Unit of Cell Cybernetics),
r.j.bino@plant.wag-ur.nl
 - Dr. Huub J.M. Löffler, 非糧食作物資深研究員。
h.j.m.loffler@plant.wag-ur.nl
 - Dr. Ki-Byung Lim, 球根花卉植物研究員，百合種間雜交育種。
k.b.lim@plant.wag-ur.nl
 - Ir. Joost Barendrecht, 植物育種家權利委員會永久性專家 (Permanent Expert-Board for Plant Breeders' Rights) 暨生物多樣性與鑑定組資深研究員 (Business Unit Biodiversity and Identity)。
c.j.barendrecht@plant.wag-ur.nl
 - Dr. Chris Kik, 蔥蒜育種、轉基因研究專家。
C.Kik@plant.wag-ur.nl
 - Dr. Jurriaan J. Mes, 轉基因唐菖蒲、百合研究。

J.J.Mes@plant.wag-ur.nl

- Dr. Peter B. Visser, 菊花與玫瑰育種、轉基因研究專家。

P.B.Visser@plant.wag-ur.nl

- Dr. Andrzej A. Przybyla, 水仙百合(Alstroemeria)與蘋果育種專家，墨西哥大學教授 Universidad Autonoma Chapingo

A.A.Przybyla@plant.wag-ur.nl, andrzej@taurus1.chapingo.mx

瓦赫尼罕大學 Wageningen University:

- 陳煜焜先生(Mr. Yukun Chen), 水仙百合病毒研究。

Yk.Chen@viro.DPW.WAU.NL

- 張松彬先生(Mr. Song-Bin Chang), 馬鈴茄(Pomato)細胞遺傳研究。

Tommy.Chang@genetics.DPW.WAU.NL

- Ms. Stela Stoianova Iazarova, 線蟲生態、分類研究。保加利亞科學院(Bulgarian Academy of Sciences, Central Laboratory of General Ecology)

stella_n@ecolab.bas.bg

II. 植物育種家權利委員會(Board of Plant Breeders' Rights ; RAAD VOOR HET KWEKERSRECHT):

- Mr. K.A. Fikkert-秘書長(Secretary of Dutch Board of Plant Breeders' Rights)

k.a.fikkert@akr.agro.nl

III. 南韓參加國際花卉貿易展與園藝資材展團員(International Flower Trade Show and International Horti Fair, 中華民國十一月一日至十一月四日於 Amsterdam, RAI)

- Dr. Kyung-Ae Hong, Cheju National University,

hongka@cheju.cheju.ac.kr

- Dr. Young-Jin Kim, Research Scientist of Division of Research Coordination, Rural Development Administration, kyoj@rda.go.kr

- Mr. Hae-Ryong Cho, National Horticultural Research Institute, R.D.A., hort2438@rda.go.kr

<http://www.nhri.go.kr>

IV. 球根花卉研究中心(Bulb Research Center, LBO):

-Dr. Geert-Jan de Klerk, 組織培養專家, 植物組織培養系主任。

Geert-Jan.de.Klerk@lbo.agro.nl

-Dr. Han Bouman, 組織培養專家

han.bouman@lbo.agro.nl

- 約有 110 員工。
- 探討不同作物之最適宜生長、繁殖條件之培養基。
- 研究一些特定植物之液體培養。
- 生物反應器尚未商業上量產, 主要能克服體胚形成之同步化與大小一致性, 未來仍大有前途, 目前則可用於樹種繁殖用。
- 研究熱處理抑制瓶苗內生污染(Endogenous contamination)。
- 研究百合之冷凍保存法(液態氮, -196 C), 百合鱗片或鱗莖以 PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% (w/v) dimethyl sulfoxide) 或 PVS3 (50% sucrose + 50% glycerol) 處理, 再經冷凍保存法保存種原。

-Ir. (Toon) A.F.L.M. Derks, 球根花卉植物病毒專家(Virologist),

toon.derks@lbo.agro.nl

- 彩色海芋上發現至少有三種馬鈴薯 Y 屬病毒—芋頭嵌紋病毒(DsMV), 菜豆黃化嵌紋病毒(ByMV)及山芋頭嵌紋病毒(yam mosaic virus)。胡瓜嵌紋病毒(CMV)與番茄輪點萎凋病毒(TSWV)在荷蘭不常發生。低溫狀況下最適宜病毒病徵之發展, 病毒濃度亦較高。
- 血清學法(Serology), 電子顯微鏡法(TEM)與聚合酵素連鎖反應法(PCR)是較常用之病毒檢測方法。
- 百合斑駁病毒(lily mottle potyvirus)與鬱金香條斑病毒在血清學與分子生物學上可區別。百合斑駁病毒可感染圓葉菸草(*N. benthamiana*) 但回接至百合上會缺失一些片段。同時於荷蘭也發現一些百合 X 病毒(LVX)之單獨感染。
- 胡瓜嵌紋病毒-品系 1(CMV-1)在日本及溫帶國家常發生, 在一些百合品種之花瓣上出現明顯病斑。

- 菸草響葉病毒(tobacco rattle tobavirus)是鬱金香檢疫上之重要病毒。

V. 球根花卉檢測服務中心 (Flower Bulb Inspection Service, BloembollenKeuringsDienst, **BKD**):

-Dr. A. R. (Ton) van Schadewijk, 植物病毒專家(Virologist),

TON.VAN.SCHADEWIJK@BLOEMBOLLENKEURINGSDIENST.NL

- BKD 是由農民出資、獨立運作之國際貿易用球根花卉種球之檢查機構，約有 100 位員工但有些是臨時短工。除了進行百合、鬱金香、唐菖蒲等球根花卉之田間與室內檢查，亦供售病毒抗血清。
- 每年利用 ELISA 法檢查約 2 百萬種球以上，其中以百合為最大宗之檢查作物。
- ELISA 檢查法是室內乾球病毒檢查(dry-bulb tests)之標準檢查法，包含樣品自動填加機(automated sample-filling machine)、洗盤機(washing machine)與連接抗體或基質自動填加機(conjugate- or substrate-filling machine)，以減少人力與增加時效。大多數結果以 A_{405nm} 讀值大於 0.15 為正反應判定，但仍以肉眼觀察顏色反應作雙重確定。結果若有疑慮，再以 PCR 技術分析成果作雙重確定。
- 研發簡併型引子(degenerated primers)可鑑定 15 種馬鈴薯 X 屬病毒(potexviruses)。
- 荷蘭最近三年來無病毒百合種球體系之推動，百合隱微病毒(LSV)與鬱金香條斑病毒(TBV)在亞洲-鐵砲雜合型(LA)、亞洲型(Asiatic)、鐵砲(Longiflorum)與東方型(Oriental)百合上之發生率降至 5% 以下。
- 同時研發真菌或細菌性病害之快速與簡易診斷方法如逢機增殖多型性 DNA(RAPD)或選擇性培養基等技術。

VI. Van Zanten Flower Bulbs:

-Mr. Ing. Walter de Wit, 百合育種。

百合水仙(*Alstroemeria*)、菊花(*chrysanthemums*)、小菖蘭(*freesias*)、百合(*lilies*) 與鬱金香(*tulips*)等之育種、繁殖及銷售。有 1300 員工，每年 1 千 2 百

萬百合種球外銷至美國、日本與台灣等國家。百合產業幾乎以機械自動化為主，包括自動種植機、收穫機、清洗機與農藥處理機、種球選別機、包裝機、大型溫控儲藏室、與輸送機等。

<http://www.vanzanten.nl>

VIII. C. Steenvoorden B.V.

-Mr. Willem-Jan van Graas，經理，Mr. Kees Steenvoorden，董事長。

steenvoorden@flowerbulb.nl

主要育成、繁殖及銷售百合、鬱金香、唐菖蒲、鳶尾等球根花卉。每年外銷 6 千萬種球。

<http://www.steenvoorden.nl>

IX. Zabo Plant B.V. (百合種球外銷)

-Mr. C. T. M. Kneppers-董事長。

-Mr. Arjan Sneekes, Far East Area Manager

<http://www.zaboplant.nl>

X. B.T. Lelies-百合育種公司

-百合雜交育種, 生產與種球批發

<http://www.btlelies.nl>

XI. P.O. Onings Holland

種球與發根植物之進出口貿易，主要產品為百合、鬱金香、小菖蘭、風信子(Hyacinths)、鳶尾、唐菖蒲、番紅花(Crocus)、孤挺花等。

Mr. Evert van Zanten, <http://www.onings.nl>

XII. Lico Export B.V.

-150 百合品種(大多為舊品種及原生種)

<http://www.licoexport.nl>

XIII. CNB B.V.

- Mr. D. J. Komen

- 提供球根花卉儲存或準備之容器。

- 百合自動化包裝、清洗、消毒等。
- 超低氧(ultra low oxygen,ULO) 儲存各式種球。

<http://www.cnb.nl>

<http://www.bulbprep.nl>

XIV. Kapiteyn (Speciale Culturen)

- 百合、鬱金香、彩色海芋(*Zantedeschia*)、風信子等種球之育種、生產與外銷。

-Mr. Peter Kok

<http://www.kapiteyn.nl>

XV. Global lilies B.V.

- 百合外銷。

-Mr. Ton van Rooden, Director

info@globallilies.nl

XVI. Calla Bulbs International B.V.

- 彩色海芋種球外銷。

Info@callabulbs.com

XVII. Plant Alliance

- Fisher: 香葉草(*Geranium*)、聖誕紅(*Poinsettia*)、矮牽牛(*Petunia*)、鳳仙花(*Impatiens*)之育種、生產。

<http://www.pelfi.de>

- Schmulling: 花壇植物與菊花苗。

- Kloor: 穴盤生產與種苗功應。

XVIII. Anthura B.V. (火鶴花 *Anthurium* 栽培與育種，蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 育種)

<http://www.anthura.nl>

XIX. Florist (Florist de Kwakel B.V.) – 非洲菊(*Gerbera*)育種、生產

<http://www.gerbera.com>

- XX. Terra Nigra B. V. (非洲菊與玫瑰育種、生產)
<http://www.terrannigra.com>
- XXI. Preesman B.V. (非洲菊與玫瑰育種)
<http://www.preesman.com>
Starplant B.V.
<http://www.starplantbv.nl>
- XXII CBA (菊花育種協會，Chrysanthemum Breeders Association)
<http://www.cba-nv.nl>
- XXIII F.G.B. (Fides Goldstock Breeding)
-菊花育種
Info@fidesstraathof.nl
- XXIV Norwa Tissue Culture laboratory—組織培養代工、研究
Vitro@peryt.net.pl
- XXV. D. Kooij & Zonen B.V.
-康乃馨(Carnation)育種與繁殖
<http://www.kooij.nl>
carnation@kooij.nl
- XXVI. Meilland Star Rose (玫瑰)
<http://meilland.com>
- XXVII. Van Staaveren (百合水仙 *Alstroemeria* 育種)
<http://www.vst.kvzg.com>
- XXVIII. Van Staaveren aalsmeer
百合水仙、不凋花(*Limonium*)、小菖蘭等育種，非洲菊與夏日花卉之選育。
<http://www.vanstaaveren.nl>

XXIX. Floricultura (蘭花育種)

Orchids@floricultura.com

XXX. Koppert Biological Systems (昆蟲天敵防治)

<http://www.koppert.nl>

荷蘭花卉研究相關部門(Information of Flower sectors in the Netherlands):

荷蘭農、漁、自然、管理部(Dutch Ministry of Agriculture, Nature, Management and Fisheries)

貿易與產業組(Department for Trade and Industry)

<Http://www.minlnv.nl/international>

農業技術研究所 Agrotechnological Research Institute (ATO)

<http://ato.wagening-ur.nl>

農業與環保研究所 Institute of Agricultural and Environmental Engineering (IMAG)

<http://www.imag.wageningen-ur.nl>

設施園藝承包與裝配業者協會 The Association of Contractors and Fitters in Glasshouse Horticulture (AVAG)

<http://avag.nl>

荷蘭花卉委員會 Flower Council of Holland (BBN)

<http://bbn.nl>

DLV Adviesgroep

<http://dlv.nl>

國立農業資訊中心 National Reference Center for Agriculture

Info@eclnv.agro.nl

國際農業中心 International Agricultural Centre (IAC)

<http://www.iac.agro.nl>

國際球根花卉中心 The International Flower Bulb Centre (IBC)

<http://www.bulbsonline.org>

發明與實習中心 Innovation and Practice Centre (IPC Ede)

<http://ipcagro.nl>

農民服務中心 LTO Groeiservice

<http://www.groeiservice.nl>

Milieu Programma Sierteelt (MPS)

<http://www.st-mps.nl>

園藝作物檢測服務中心 Inspection Service for Horticulture

<http://naktuinbouw.nl>

Nederlandse Vereniging van Plantenhwekers (NVP)

<http://ltonet.nl>

荷蘭種子貿易協會 The Dutch Seed Trade Association (NVZP)

<http://www.nvzp.nl>

植物保護服務中心 Plant Protection Service

<http://www.minlnv.nl/international>

園藝商品委員會 Commodity Board for Horticulture

<http://www.tuinbouw.nl>

花卉園藝、設施蔬菜試驗場 Research Station for Floriculture and Glasshouse
Vegetables (PBG)

<http://www.agro.nl/appliedresearch/pbg>

Vereniging van Bloemenveilingen in Nederland (VBN)

<http://www.vbn.nl>

Vereniging van Groothandelaren in Bloemkwekerijproducten (VGB)

<http://www.vgb.nl>

瓦赫尼罕大學及研究中心 **Wageningen University and Research Centre**

<http://www.wageningen-ur.nl>

- Wageningen University (瓦赫尼罕大學，教育與研究)
- Wageningen Research Center (瓦赫尼罕研究中心)包含九個原屬農部之不同研究機構(-DLO):
 - ALTERRA (the Rural Area and Nature Research，鄉村地區與自然研究所)
 - ATO (Agrotechnology，農業科技)
 - ID-HS (Animal Research，動物研究)
 - IMAG (Agricultural and Environmental Engineering，農業與環境保護)
 - LEI (Agricultural economics，農業經濟)
 - Plant Research International** (plant Productions and Plant Protection 植物生產與植物保護)
 - AB (Research Institute for Agrobiolgy and Soil Fertility 農業生物及土壤肥力研究所)
 - IPO (Research Institute for Plant Protection 植物保護研究所)
 - CPRO** (Centre for Plant Breeding and Propagation Research 植物育種及繁殖中心)
 - PUDOC (Electronic Publishing 電子期刊)
 - RIKILT (Food and Quality 食物及品質)
 - RIVO (Fishery Research 漁業研究)

參加論文口試與會議:

1. 博士論文口試 (The Ph.D. Thesis defense held in AULA, Wageningen) :

-Dr. J.J.M. van der Meulen-Muisers, Genetic and physiological aspects of postharvest flower longevity in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* L.) (亞洲型百合採收後花期之遺傳與生理研究), Sept. 27, 2000.

-Dr. Si-Jun Zheng, Toward onion and shallots (*Allium cepa* L.) resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner) by transgenesis and conventional breeding(利用基因轉殖與傳統育種技術抗蒜與蔥之甜菜葉蛾), Nov. 20, 2000. S.Zheng@plant.wag-ur.nl

-Dr. Ki-Byung Lim, Introgression breeding through interspecific polyploidization in lily: a molecular cytogenetic study(百合種間雜交：分子細胞遺傳研究), Nov.27, 2000.

-Dr. Sizolwenkosi Mlotshwa, The helper component-proteinase of cowpea aphid-borne mosaic virus (豇豆蚜媒嵌紋病毒之傳播輔助蛋白-蛋白質酵素, Dec. 8, 2000.

2. The International Flower Trade Show and International Horti Fair (國際花卉貿易展與園藝資材展), Nov. 1-Nov. 4, 2000 held at Amsterdam, RAI.

肆、結論與建議

荷蘭百合育種家權利遵循如專利或著作權生產之體系，荷語稱為“kwekersrecht” (育種家權利)。申請者填寫申請表格送交位於瓦赫尼罕之荷蘭植物育種家權利委員會，育種者再將鱗莖送給國際植物研究中心(Plant Research International, 由以前之 CPRO-DLO, AB-DLO 及 IPO-DLO 合併)，栽種於溫室中進行 DUS 檢定評估，一旦登錄發證，每一品種可保護 25 年，栽培農民使用該品種生產種球得付育種者權利金(royalties)。由百合品種之品種保護登錄情形，可一窺荷蘭百合產業之消長與穩定發展。

Bryan(1998)書中記載，亞洲型百合之申請數由 1984 年之 15 件，至 1988 年之 69 件，但於 1995 年降至 29 件；東方型百合則由 1988 年之 6 件，1991 年最高峰為 60 件，但 1996 年降至 38 件；鐵砲百合每年維持 3 至 5 個申請件。自 1992 年開始，LA 雜交種之申請量每年增加，1996 年已有 14 件。

自 1960 年至 1998 年，百合栽培種之登錄術約有 7,000 個 (Leslie 1982)，然從 1988 年到 2000 年間登錄之品種，508 個品種至 2000 年仍然持續付費保護中，有些品種之保護則撤銷或被終止。1979 年 5 月 8 日登錄保護之品種 'Jolanda' 亞洲型百合，迄今仍舊商業生產。因此消費市場之接受度，決定一個百合品種之商業壽命。

由於荷蘭百合育種技術之不斷提昇，新雜交組合之問市，據荷蘭植物育種家權利委員會之統計資料，至 200 年 11 月截止，2000 年仍高達 92 個新品種獲得保護授權 (Publikatieblad van de Raad Voor het Kwekersrecht)。

依國際植物新品種保護聯盟(UPOV)目前之論點，分子標誌相關技術尚未使用在 新品種之 DUS 檢定，然而國際市場上基因改造生物(GMO) 或實質衍生物種之不斷上市，欲如何鑑定基因改造生物或非因改造生物可能日形重要。需解決此新重要課題，分子生物技術則將扮演更重要之角色，近年來植物之 DNA 指紋鑑定技術已在學術界中快速研發，將來如何應用於商業或法律辨識為新之挑戰。RFLP 與 SSR 雖提供非常可靠之標誌，但是卻非常耗勞力的，SSR 技術雖然未完全開發應用於花卉品種鑑定，因在植物上具有高度之多型性，非常有潛力作為花卉之 DNA 指紋鑑定技術。RAPD 法比 RFLP 更簡易且較高之多型性，缺點為再現性較差。

百合種球品質之認證上，依據 OEPP/EPPO 檢查規定，球根花卉檢測中心 (Bulb Inspection Service ;BKD)每年利用 ELISA 法檢測至少 2 百萬種球，其中大多為百合鱗莖。ELISA 法大多應用於病毒之乾球檢測，多數之結果依目視顏色反應，有時以 A_{405nm} 吸收值大於 0.15 為正反應，嘗有疑慮時再以 PCR 增幅技術再行確定結果。近三年來，荷蘭政府推動種植無病毒百合種球，田間百合之 LSV 與 TBV 之發生率已驟降中 (Drs. Ton van Schadewijk 私人資料)。

有關轉基因植物之研究與使用，筆者歸納出下列五點結論：1. 基因改造植物之開發與應用是一種策略挑戰，同時也是植物領域之擴展。2. 基因改造植物的產生提供一個獨特且重要的途徑來開發對社會及消費者有益處（包括未來全球食物安全供給、生活品質及食物產品品質）之新產品。3. 對基因改造食物應採取更嚴苛的法律規定及遵循方法，避免基因改造植物非法釋放於自然環境中。4. 消費者有權利決定拒絕使用基因改造植物產品，但是單純以道德因素而拒絕基因改造的少數人，不應防礙基因改造植物或產品之開發與利用。5. 新的

基因改造技術及基因改造產品的利益與風險，政府應以公開、透明、科學基礎、互信的方式與大眾和消費者做充分溝通。

此次赴荷蘭研習與參觀，主要建議事項如下：

1. 荷蘭球根花卉產業之總體發展體系健全，無論是民間或研究機構之育種技術發達且不斷創新，加上荷蘭育種家權利體系良好，導致每年皆有新品種之登錄，開創或佔領國際間之球根花卉新市場，深值我國學習。當務之急，應健全我國之育種家權利體系，建立適合我國國情與主要外銷植物之品種保護審查制度與技術，可激勵國內種苗業者開發新品種，進軍國際種苗市場，再創「種苗王國」美譽。
2. 積極爭取加入國際植物新品種保護聯盟(UPOV)成為會員國，除了提供本國植物育種者也可能獲得其他會員國之品種保護權，同時提供外國育種者來本國領土內從事植物育種及種子生產之獎勵或誘因。若有植物新品種保護之重要資產，國際貿易間一可吸引國外投資，二來是贏取國外消費市場之重要資源，最後各會員國可透過 UPOV 共享經驗、為植物育種之提昇與增進植物新品種保護體系而貢獻一己之力。
3. 加強中荷農業雙方合作計畫，透過外交溝通管道，建立資料與技術交流之機制，委請荷方辦理一些植物新品種之技術檢定，以提昇我國新品種檢定之效率與保護品種之範疇。
4. 建立如球根花卉檢測中心 (Bulb Inspection Service ; BKD)之品質認證機構與各類作物種苗之病蟲害容許標準，加強開發病蟲害之檢定技術，促進種苗品質之提昇，減少病蟲害於國內之發生及增加國外市場之競爭力。

伍、參考文獻

- Ainsworth, C. C. and Sharp, P. J. 1989. The potential role of DNA probes in plant variety identification. *Plant Varieties and Seeds* 2:27-34.
- Asano, Y. and Myodo, H. 1977. Studies on crosses between distantly related species of lilies. I. For the intrastylar pollination technique. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 46:59-65.
- Asen, S. 1979. Flavonoid chemical markers in *Poinsettia* bracts. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 104:223-226.
- Asen, S. 1984. High pressure liquid chromatographic analysis of flavonoid chemical markers in petals from *Gerbera* flowers as an adjunct for cultivar and germplasm identification. *Phytochemistry* 23:2523-2526.
- Balode, A. 1999. A study of lily *Botrytis* resistance. *Lily Yearbook North Amer. Lily Soc.* 52:63-65.
- Barendrecht, C. J. 1999. The concept of grouping in UPOV-guidelines focused on ornamentals. *Plant Varieties and Seeds* 12:143-148.
- Beattie, D.J. and White, J.W. 1993. *Lilium*-hybrids and species. In: De Hertogh, A.A. and Le Nard, M (eds.) *The physiology of flower bulbs.* Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pp423-454.
- Blakeslee, A.F. and Avery, A.G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with chochicine. *J. Heredity* 28:393-411.
- Bonnier, F.J.M. 1997. Long term storage of clonal material of lily (*Lilium* L.) Ph.D. Thesis of Wageningen Agricultural University, pp.111.
- Bouman, H. and De Klerk, G.J. 1990. Cryopreservation of lily meristems. *Acta Horti.* 266:331-337.
- Bryan, J. 1998. *Lilies- a guide for growers and collectors.* Timber Press, Portland, Oregon. P317-318.
- Buschmann, J.C.M. 2000. *Lily Picture Book.* International Flower Bulb Centre, Hillegom, Holland. pp.67.
- Cohen, A. and Meridith, G.P. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium*. *Acta Horti.* 325:611-618.
- Comber, H. F. 1949. A new classification of the Genus *Lilium*. *The Lily Year-Book of the Royal Hort. Soc.* 13:86-105.

- Dai, S.L., Chen, J.Y., and Li, W.B. 1999. Application of RAPD analysis in the study on the origin of Chinese cultivated chrysanthemum. *Acta Bot. Sinica*. 40:1053-1059.
- Deberner, T. 1995. Genetic and molecular analysis in wild and cultivated roses. In: Abstracts of Contributed Papers: 2nd International Rose Symposium, Antibes, France. pp.IV-C1.
- Deberner, T. and Mattiesch, L. 1999. Construct of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genetic*. 99:891-899.
- Emsweller, S.L. and Brierley, P. 1940. Colchicine-induced tetraploidy in *Lilium*. *J. Heredity* 31:223-230.
- Grave, A.C.F. and Goldman, S.L. 1987. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the monocot genus *Gladiolus*: detection of express of T-DNA encoded genes. *J. Bacteriol*. 169:1745-1746.
- Handa, T., Iwahori, S., Kano-Murakami, Y., Shinkai, S., Sugiyama, N., and Askiyama, R. 1998. Utilization of molecular markers for ornamental plants. *J. Japan. Hortic. Sci.* 67:1197-1199.
- Huff, D. R., Peakall, R., and Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among natural population of outcrossing buffleograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] *Theor. Appl. Genet.* 86:927-934.
- Jan, C.H., Byrne, D.H., Manhart, J., and Wilson, H. 1999. Rose germplasm analysis with RAPD markers, *HortScience* 34:341-345.
- Janson, J. 1992. Pollen tube-pitil interaction and fertilization in *Lilium longiflorum*. Ph. D. Thesis of Wageningen Agricultural University. pp.145.
- Jeknic, Z., Lee, S.P., Davis, J., Ernst, R.C., and Chen, T.H.H. 1999. Genetic transformation of *Iris germanica* by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 124:575-580.
- Kamo, K. 1997. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gusA expression and opine synthesis in gladiolus. *Pl. Cell Reports* 16:389-392.
- Kamo, K., Blowers, A. Smith, F., van Eck, J., and Lawson, R. 1995. Stable transformation of gladiolus using suspension cells and callus. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 120:347-352.
- Karlov, G. I., Khrustaleva, L. I., Lim, K. B., and Van Tuyt, J. M. 1999. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific

- hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studies by genome *in situ* hybridization (GISH). *Genome* 42:681-686.
- Kuhns, L. J. and Fretz, T. A. 1978. A study of potential use of electrophoresis in distinguishing rose cultivars. Research Bulletin 1094, Ohio Agricultural and Developmental Center, Wooster. pp.1-33.
- Law, J. R., Donini, P., Koebner, R. M. D., Reeves, J.C., and Cooke, R.J. 1998. DNA profiling and plant variety registration-III-the statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102:335-32.
- Lee, J.S., Lee, P.O., Lim, Y.P., Shin, E.M., Park, S.Y., and Roh, M.S. 1996. Classification of lilies using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Acta Hort.* 414:137-144.
- Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D., and Leitch. I.J. 1994. *In situ* hybridization: a practical guide. Bios Scientific Publisher Ltd. pp.109.
- Leslie, A.C. 1982. The international lily register. 3rd edition including 17 additions (1984-1988). The Royal Hort. Soc., London.
- Lim, K. -B. 2000. Introgression breeding through interspecific polyploidization in lily: a molecular cytogenetic study. Ph.D. Thesis of Wageningen University. pp116.
- Lim, K. -B., Chung, J.-D., van Kronenburg, B. C. E., Ramanna, M. S., De Jong J. H., and Van Tuyl, J. M. 2000. Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L. longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F1 hybrid, BC1 and BC2 progenies. *Chromosome Research* 8:119-125.
- Lim, K.-B., Van Tuyl, J.M., Karlov, G.I., Khrustaleva, L.I., and De Jong, J.H. 2000. Introgression of interspecific hybrids of lily using genomic *in situ* hybridization (GISH). *Acta Hort.* 508:105-111.
- Lin, H.-S, De Jeu M.J, Jacobsen, E., and Cadic, A. 2000. Development of a plant regeneration system applicable for gene transformation in the ornamental *Alstroemeria*. *Acta Hort.* 508:61-67.
- Loffler, H.J.M., Meijer, H., and Straathof, T.P. 1996. Segregation of *Fusarium* resistance in an interspecific cross between *Lilium longiflorum* and *Lilium dauricum*. *Acta Hort.* 414:203-208.

- Marsolais, J.V., Pringle, J.S., and White, B.N. 1994. Assessment of random amplified polymorphic DNA (RAPD) as genetic markers for determining the origin of interspecific lilac hybrids. *Taxon* 42:531-537.
- Matsumoto, T., Sakai, A., and Yamada, K. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of lily by vitrification. *Pl. Cell Tissue Organ Culture* 41: 237-241.
- Messeguer, R. and Arus, P. 1985. Electrophoretic identification of carnation cultivars. *HortScience* 20:372-373.
- Millan, T., Torres, A. M., and Cubero, J. I. 1995. Varietal identification in *Rosa* by using isozyme and RAPD markers. In: Abstracts of Contributed Papers: 2nd International Rose Symposium, Antibes, France. pp.IV-C3.
- Mosges, G. and Freidt, W. 1994. Genetic 'fingerprinting' of sunflower lines and F1 hybrids using isozymes, simple and repetitive sequences as hybridization probes, and random primers for PCR. *Pl. Breeding* 113:114-124.
- Murphy, R. W., Sites, J. W. Jr., Buth, D. G. and Haufler, C. H. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. In: Hillis, D. M. and Moritz, C. (eds), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sanderland, Massachusetts. pp. 45-126.
- Nasahiro, M., Ito, M., Tanaka, I., Kyo, M., Ono, K., Irifune, K., and Morikawa, H. 1993. Expression of β -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and Peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Pl. Physiol.* 102:357-361.
- OEPP/EPPO. 1991. Recommendations made by EPPO Council. General scheme for the production of certified pathogen-tested vegetatively propagated ornamental plants. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 21: 757.
- OEPP/EPPO. 1993. Certification scheme for pathogen-tested material of lily. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 23:215-224.
- Persson, H.A., Lunquist, K., and Nybom, H. 1998. RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's-cap lily (*Lilium martagon* L.). *Hereditas-Landskrona* 128:213-220.
- Preston, L. R., Harker, N., Holton, T., and Morell, M. K. 1999. Plant cultivar identification using DNA analysis. *Plant Varieties and Seeds* 12:191-205.

- Rajapakse, S. and Ballard, R. E. 1997. Cultivar identification using molecular methods. In: R.L. Geneve, J. E. Preece, and S. A. Merkle (eds), *Biotechnology of ornamental plants* CAB International, Cambridge, UK. p153-164.
- Rajapakse, S., Abbott, A. G. and Ballard, R. E. 1995. DNA markers in rose and their use for cultivar identification and genomic mapping. In: *Abstracts of Contributed Papers: 2nd International Rose Symposium*, Antibes, France. pp.IV-C4.
- Rayburn, A. L., Iqbal, M. J., and Paden, D. W. 1993. Positive identification of rhododendron through DNA fingerprinting. *J. Amer. Rhododendron Soc.* 1993:137-138.
- Reynders-Aloisi, S., and Bollereau, P. 1995. Characterization of genetic diversity in genus *Rosa* by RAPD. In: *Abstracts of Contributed Papers: 2nd International Rose Symposium*, Antibes, France. pp.IV-C2.
- Straathof, T.P. and Van Tuyl, J.M. 1990 Breeding for resistance against *Fusarium* in tetraploid *Lilium*. *Lily Yearbook North Amer. Lily Soc.* 43:23-27.
- Straathof, T.P. and Van Tuyl, J.M. 1994. Genetic variation in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* in the genus *Lilium*. *Ann. Appl. Biol.* 125:61-71.
- Straathof, T.P., Jansen, J, and Löffler, H.J.M. 1993. Determination of resistance to *Fusarium oxysporum* in *Lilium*. *Phytopathology* 83:568-572.
- Straathof, T.P. ,Van Tuyl, J.M. , Dekker, B., Van Winden, M.J.M., and Sandbrink, J.M. 1996. Genetic analysis of inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* in Asiatic hybrids of lily using RAPD markers. *Acta Hortic.* 414:209-218.
- Teulat, B., Zhang, Y. X., and Nicolas, P. 1994. Characteristics of random amplified polymorphic DNA markers discriminating *Helianthus annuus* inbred lines. *Agronomie* 14:497-502.
- Tribulato, A., Remotti, P.C., and Loffler, H.J.M. 1997. Lily regenerative callus and cell cultures for transformation. *Acta Hortic.* 430:299-306.
- Torres, A. M., Millan, T., and Cubero, J. I. 1993. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* 28:333-334.

- UPOV. 2000. List of species in which practical technical knowledge has been acquired or for which national guidelines have been established. Report of the 36th session of Technical Committee. TC/36/4. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Geneva.
- Van Creijl, M.G.M., Van Raamsdonk, L.W.D., and Van Tuyl, J.M. 1993. Wide interspecific hybridization of *Lilium*: preliminary results of the application of pollination and embryo-rescue methods. *The lily Yearbook North Amer. Lily Soc.* 43:28-37.
- Van der Leede-Plegt, L.M., Van de Ven, B.C.E., Bino, R.J., Van der Salm, T.P.M., and Van Tunen, A.J. 1992. Introduction and differential use of various promoters in pollen grains of *Nicotiana glutinosa* and *Lilium longiflorum*. *Pl. Cell Reports* 11:20-24.
- Van der Leede-Plegt, L.M., van der ven Kronenburg, Franken, J., Van Tuyl, J.M., van Tunen, A.J., and Dons, H.J.M. 1997. Transgenic lilies via pollen-mediated transformation. *Acta Hort.* 430:529-530.
- Van Tuyl, J.M. 1989. Research on mitotic and meiotic polyploidization in lily breeding. *Herbertia* 45:97-103.
- Van Tuyl, J.M. and Boon, E. 1997. Variation in DNA-content in the genus *Lilium*. *Acta Hort.* 430: 829-835.
- Van Tuyl, J.M., de Vries, J.N., Bino, R.J., and Kwakkenbos, T.A.M. 1989. Identification of 2n-pollen producing interspecific hybrids of *Lilium* using flow cytometry. *Cytologia* 45:737-745.
- Van Tuyl, J.M., Van de Sande, K., Van Dien, R., Straathof, D., and Van Holsteijn, H.M.C. 1990. Overcoming interspecific crossing barriers in *Lilium* by ovary and embryo culture. *Acta Hort.* 266:317-322.
- Van Tuyl, J.M., Straathof, T.P., Bino, R.J., and Kwakkenbos, A.A.M. 1988. Effect of three pollination methods on embryo development and seedset in intra- and interspecific crosses between seven *Lilium* species. *Sex. Plant Repro.* 1:119-123. 1989.
- Van Tuyl, J.M., Van Dien, M. P., Van Creijl, M.G.M., Van Kleinwee, T.C.M., Franken, J., and Bino, R.J. 1991. Application of in vitro pollination, ovary rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Science* 74:115-126.

- Van Tuyl, M.J., Meijer, B., and Van Dien, M.P., 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in-vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Hortic.* 325:625-630.
- Van Tuyl, J.M., Van Dijken, A., Chi, H.-S., Lim, K.-B., Villemoes, S., and van Kronenburg, B.C.E. 2000. Breakthroughs in interspecific hybridization of lily. *Acta Hortic.* 508:83-88.
- Watad, A.A., Yun, D.-J., Matsumoto, T., Niu, X., Wu, Y., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. 1998. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Pl. Cell Reports* 17:262-267.
- Wen, C.S. and Hsiao, J.Y. 1999. A study on the taxonomic relationship of *Lilium longiflorum* Thunb. var. *scabrum* Masamune and *L. longiflorum* Thunb. var. *formosanum* Baker based on isozyme, RAPD, and morphological characters. *J. Chinese Soc.Hortic. Sci.* 45: 293-302.
- Wilmink, A. Van de Ven, B.C.E., and Dons, H.J.M. 1994. A transformation procedure for tulip. Ivth International Congress of Plant Molecular Biology 19-24 June, Amsterdam, the Netherlands, Abstract 2038.
- Wolff, K. and Peters-Van Rijn, J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71:335-341.
- Wu, L. and Lin, H. 1994. Identifying buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] cultivar breeding lines using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 119:126-130.
- Yamagishi, M. 1995. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl. Genet.* 91:830-835.
- Zhuravlev, Y.N., Kozyrenko, M.M., Artyukova, E.V., Reunova, G.D., and Ilyushko, M.V. 1998. Fingerprinting genomes of the Far Eastern species of the genus *Iris* L. by RAPD-PCR. *Genetika-Moskva* 34:368-372.