

利用台灣金線連無菌播種根莖誘導多倍體研究¹

夏奇鈺^{2,5} 黃健覃³ 陳威臣² 曹進義² 梁淑惠² 蔡新聲⁴

摘 要

夏奇鈺、黃健覃、陳威臣、曹進義、梁淑惠、蔡新聲。2009。利用台灣金線連無菌播種根莖誘導多倍體研究。台灣農業研究 58:302–309。

本研究以台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 無菌播種不同週齡之根莖 (rhizome) 作為培植體，並以流式細胞儀檢測新生芽體之倍體數，探討秋水仙素濃度、處理時間及固、液體處理方式對多倍體誘導之影響。比較固態或液態培養基添加 0、0.025、0.125 及 0.625 mM 秋水仙素培養 2 週，對 12 週齡根莖培植體誘導多倍體之效果，結果顯示以 0.625 mM 秋水仙素液態培養者，多倍體誘導率為 44.8% 最佳。以 10、11 及 14 週齡之根莖培養於含 0、0.025、0.25 及 2.5 mM 秋水仙素之固態培養基中 3 天，其中以 14 週齡根莖培植體在 2.5 mM 秋水仙素培養下，多倍體誘導率達 42.4% 最佳，且因其新芽成活率高，獲得之多倍體植株數亦最高。以 10 週齡根莖於含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基中培養 16、24、48 及 72 小時，結果顯示培養 16 小時即可誘得多倍體，但以培養 24 小時之 4 倍體誘導率 45.5% 最高。綜合本研究之結果，顯示利用金線連無菌播種長出之根莖作為培植體，具有數量眾多且成活率高的優點，選擇適當週齡之根莖進行秋水仙素處理，例如以 10 週齡根莖在含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基中培養 24 小時，各種多倍體誘導率最高可達 54.6%。

關鍵詞：金線連、微體培養、秋水仙素、倍數體、流式細胞儀。

前 言

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為蘭科、金線連屬多年生草本植物，是台灣民間珍貴之藥材，經過農業國家型計畫支持及學者的長期研究，已證實金線連不具毒

性且具優越之藥理特性 (Liang *et al.* 1990; Liu *et al.* 1998)，目前利用台灣金線連生產保肝相關健康食品已進入申請階段，宣示金線連已由農產品進入保健食品及植物新藥開發的新紀元，未來為配合各式功能性產品的生產開發，預期對於金線連原物料的需求將持續增加，而

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2379 號。接受日期：98 年 12 月 9 日。
 2. 本所生物技術組副研究員、助理研究員、聘用助理研究員、計畫助理。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 3. 國立中興大學農藝學研究所研究生。台灣 台中市。
 4. 朝陽大學生化科技研究所教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 5. 通訊作者，電子郵件：hsia@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

原物料的供應若受限，將有礙台灣金線連產品在市場上之競爭力。回顧過去台灣金線連雖有手工栽培，但產業因病害相關問題未能解決而未見擴大，利用育種改良選育抗病、高產之優良品種，雖為根本解決之道，但台灣金線連面臨缺乏抗病種原及蘭科植物育種所需時間過長的限制，亟思以其他方法突破此一困境。

多倍體主要是指染色體數目較正常 2N 倍加之植株，與正常倍數體之植株相比較，其差異有：植物營養器官的增大或數量的增加，如葉面積、氣孔、根數、花朵以及花瓣數 (Osborn 2003)；可用於克服二倍體花粉雜交不親合性，或生產不孕 (無子) 之三倍體植株 (Poehlman 1987)；提高植物二次代謝物產量及對逆境抵抗能力的提升 (Dhawan & Lavania 1996)。Chakraborti *et al.* (1998) 指出利用秋水仙素在試管內 (*in vitro*) 或稱為離體培養誘導多倍體的形成率遠高於直接處理在植物體 (*in vivo*)，原因為離體培養植物之生理狀態及環境的控制較佳所致，對於台灣金線連利用離體培養誘導多倍體之研究，鮮少見學者提出 (Huang 2007)，由於自然界自發性染色體倍加的頻率非常低，本研究選擇以無菌播種長出的不同週齡根莖 (rhizome) 作為培植體，以秋水仙素處理誘導多倍體產生，試驗因子包括藥劑濃度、處理時間以及處理培養基之物相，並以流式細胞儀 (flow cytometry) 對新生芽體之葉片進行倍體數分析。

材料與方法

無菌播種

台灣金線連授粉 60 天後之果莢，以 75% 乙醇表面消毒 1 分鐘，再以 1% (v/v) NaOCl (稀釋自 Clorox Bleach, USA) 添加數滴 Tween 20 搖動消毒 10 分鐘，續以無菌水清洗 3 次，消毒完成後於無菌操作檯內切開果莢，夾取種子均勻接種在固體培養基上。固體培養基以 1/2 MS

(Murashige & Skoog 1962) 無機鹽類添加 1 mL/L 花寶觀葉植物液 N-P₂O₅-K₂O：6-3-3 (HYPONex, Japan)、1 g/L Peptone、3% 蔗糖及 9 g/L Bacto agar (Huang 2007)。固體培養容器為直徑 90 mm、高度 15 mm 的培養皿，每皿置 25 mL 培養基。

秋水仙素處理試驗

以 12 週齡之台灣金線連根莖為培植體，培養於添加 0、0.025、0.125 及 0.625 mM 秋水仙素之前述固體培養基或液體培養基，固體處理於每一培養皿內置 30 個培植體，共有 6 皿。液體培養基除不添加 Bacto agar 外，其餘成分與固體培養基相同，液體培養基裝入 125 mL 三角瓶，每瓶裝 10 mL。液體培養處理於瓶內置 180 個培植體，以 60–90 rpm 震盪培養。固、液態秋水仙素處理均經 2 週培養後，繼代於不含秋水仙素固體培養基，以後每 4 週繼代一次，8 週後調查成活率。倍體數檢測則在培植體新芽之第一片葉展開後，切取葉片進行檢測。另外以無菌播種 10、11 及 14 週齡根莖為培植體，於添加 0、0.025、0.25 及 2.5 mM 秋水仙素之固體培養基中培養 3 天，每一培養皿置 30 個培植體，共 6 皿。繼代方法及調查同上述試驗。又以無菌播種 10 週齡根莖為培植體，接種於含 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基中，培養時間分別為 16、24、48 及 72 小時，繼代方法及調查同上述試驗。

染色體之倍體數分析

在新芽之第一片葉展開後，切取面積約 1 cm² 葉片，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Germany)，以刀片將組織切碎後過濾，再於濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B，靜置染色 3 分鐘。每個芽體取樣 2 次，以流式細胞儀 (Partec PA, Germany) 分析，每一樣品共檢測 5000 個細胞核。

統計分析

培植體存活率百分比先經 arcsine 角度轉換，其餘調查數據直接以 SAS 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析及最小顯著性差異 (least significance difference, LSD) 測驗。

結 果

將無菌播種 12 週齡之根莖培養於含有不同濃度秋水仙素之液體或固體培養基中 2 週，再繼代於不含秋水仙素培養基後，培植體之存活率隨秋水仙素濃度上升而下降。在相同濃度處理下，固、液相培養基相較，培植體之存活率差異不顯著，僅 0.125 mM 秋水仙素在液體培養者大於培養於固體培養基 (表 1)。以流式細胞儀所測之再生新芽葉片的倍體數表現如表 1 所示，培養於不含秋水仙素或含 0.025 mM 秋水仙素的固體或液體培養基者，皆未見多倍體產生。多倍體植株誘導率在固、液體培養基中，皆以含 0.625 mM 濃度較佳，但液態培養之多倍體誘導率達 44.8%，其中 37.9% 為 4 倍體，6.9% 為 8 倍體；而固體培養之誘導率僅 30.0%，其中 4 倍體植株佔 20.0%，10.0% 為 8 倍體。

比較不同週齡 (10–14 週) 之根莖培植體，於含有 0–2.5 mM 秋水仙素之固體培養基中，培養 3 天對多倍體誘導的影響。結果顯示，對照組 (0 mM) 及 3 種週齡低濃度 0.025 mM 處理者，雖然存活株數較多，但多倍體比率偏低，因此只逢機取 20 株樣品進行檢測 (表 2)，在 0.25 及 2.5 mM 兩處理則依實際存活株數進行檢測。3 種週齡之培植體相較，以 14 週齡之根莖培植體較 10 及 11 週齡者有較高之芽數存活數。各週齡根莖及秋水仙素濃度處理所得之多倍體誘導比率如表 2 所示，在濃度影響方面，3 種週齡根莖在對照組及低濃度 0.025 mM 秋水仙素處理，僅 10 週齡根莖組有 20.0% 多倍體出現，11 及 14 兩週齡皆未檢出多倍體；在 0.25 mM 秋水仙素組，3 種週齡根莖之二倍體比率介於 69.2–75.0% 之間，其他倍數體的出現比率在 10.7–16.6% 之間，多倍體出現比率偏低，嵌合體比率在 8.3–15.4% 之間；高濃度 2.5 mM 處理組中以 10 及 14 週齡根莖之多倍體誘導率較佳，皆為 42.4%，因 14 週齡根莖新芽的成活率較高，總共產生 44 株四倍體，而 10 週齡根莖僅得 8 株 (表 2)。

表 1. 在固態或液態培養中之秋水仙素濃度對台灣金線連 12 週齡根莖誘導多倍體之影響

Table 1. Effect of colchicine in a solid or a liquid medium for two weeks culturing on polyploidy induction of 12-week-old rhizomes of *A. formosanus*

Medium type	Colchicine (mM)	Survival rate (%) ^z	No. of plants analyzed	Polyploidy (%)			
				2C	4C	8C	Chimera
Liquid	0.0	62.0 a	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	0.025	28.7 b	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	0.125	35.3 b	31	90.3	6.5	3.2	0.0
	0.625	24.0 c	29	44.8	37.9	6.9	10.3
Solid	0.0	67.3 a	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	0.025	30.7 b	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	0.125	24.0 c	28	82.1	14.3	0.0	3.6
	0.625	15.3 c	10	60.0	20.0	10.0	10.0

^z Percentage data was analyzed after arcsine transformation. Means in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by LSD test.

表 2. 在固態培養中使用之秋水仙素濃度對不同週齡台灣金線連根莖多倍體誘導之影響

Table 2. Effect of age of rhizomes of *A. formosanus* and concentration of colchicine in the solid medium on induction of polyploidy shoot^z

Age of rhizome (weeks)	Colchicin (μ M)	No. of plants analyzed ^y	Polyploidy (%)					
			2C	3C	4C	7C	8C	Chimera
10	0.0	20	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.025	20	80.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0
	0.25	12	75.0	8.3	8.3	0.0	0.0	8.3
	2.5	26	50.0	7.7	30.8	0.0	3.9	7.7
11	0.025	20	80.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
	0.25	13	69.2	15.4	0.0	0.0	0.0	15.4
	2.5	39	84.6	7.7	2.6	0.0	0.0	5.1
14	0.025	20	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.25	168	74.4	0.6	10.1	0.0	0.0	14.9
	2.5	139	45.3	0.7	31.7	5.0	5.0	12.2

^z Rhizomes were incubated in the medium containing colchicine for 3 days.^y Total treated rhizomes for each treatment were 180.

以無菌播種 10 週齡根莖培植體經 2.5 mM 秋水仙素液體培養基中培養 16、24、48 及 72 小時，結果顯示各處理之存活率介於 63.3%至 72.2%之間，隨培養時間超過 24 小時，存活率有下降趨勢 (表 3)。整體而言，部分根莖因生長受到藥劑之影響逐漸褐化，但亦有部份培植體長出新生之芽體 (圖 1C, 1D)。以流式細胞儀檢測再生植株的倍體數表現 (表 3)，顯示經 2.5 mM 秋水仙素培養 16 小時即有多倍體被誘導，但以經 24 小時培養者，其 4 倍體比率佔 45.5% 最高。繼續延長培養時間至 48 或 72 小時，多倍體植株比率並未增加，但嵌合體比率有增加之趨勢。

討 論

多倍體植物於自然界中發生的機率並不高，秋水仙素是人工多倍體誘導最常被使用之藥劑 (Osborn 2003)，人工多倍體誘導可選擇於田間或利用離體培養 (*in vitro*) 方式進行，離體培養之影響因子除藥劑濃度、處理方法外，培植體的選擇與培養條件的配合對於多倍體的誘

導亦相當重要 (Chakraborti *et al.* 1998)。台灣金線連種子在無菌播種約 6 週後，可以觀察到胚突破種皮形成根莖，並可經由根莖進行增殖 (Chang 1999)。本研究利用播種長出之根莖作為離體培養誘導多倍體的材料，根莖之優點除本身具備有高度生長分化的能力外，在可取得數量上亦具有優勢；但因蘭科種子為未成熟胚體積甚小，播種初期在藥劑處理及數據調查執行上有困難，而本研究採用播種後 10 週齡已具備根莖型態之培植體，有利於試驗之操作 (圖 1B)。在培植體不同生理年齡的影響方面，本研究中所使用之 10–14 週齡根莖，其中除 11 週齡根莖多倍體誘導率較低 (10.3%) 原因不明外，其他各週齡多倍體誘導率介於 42.4–54.6% 之間，表示這些週齡培植體都具有生長分化之能力，是誘導多倍體的適當材料；其中 14 週齡培植體在芽體成活數上明顯較高 (表 2)，推測原因可能是較高週齡之根莖對於秋水仙素的耐受性提高，間接有助於提高多倍體植株數量的獲得。此外，在各週齡培植體皆有一定比率之嵌合體形成，其中以 10 週齡最低 (表 2)，嵌合

表 3. 以含 2.5 mM 秋水仙素液體培養基處理台灣金線連 10 週齡根莖不同時間對多倍體誘導之影響

Table 3. Effect of duration of incubation in the liquid medium containing 2.5 mM colchicine on the induction of polyploidy from 10-week-old rhizomes of *A. formosanu*

Culture period (h)	Survival rate ^{z,y} (%)	No. of plants analyzed	Polyploidy (%)			
			2C	3C	4C	Chimera
16	72.2 a	12	66.7	0.0	16.7	16.7
24	68.9 a	11	36.4	9.1	45.5	9.1
48	63.8 b	10	70.0	0.0	0.0	30.0
72	63.3 b	22	63.3	9.1	0.0	27.3

^z Percentage data was analyzed after arcsine transformation. Means in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by LSD test.

^y Means in the column with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by LSD test.

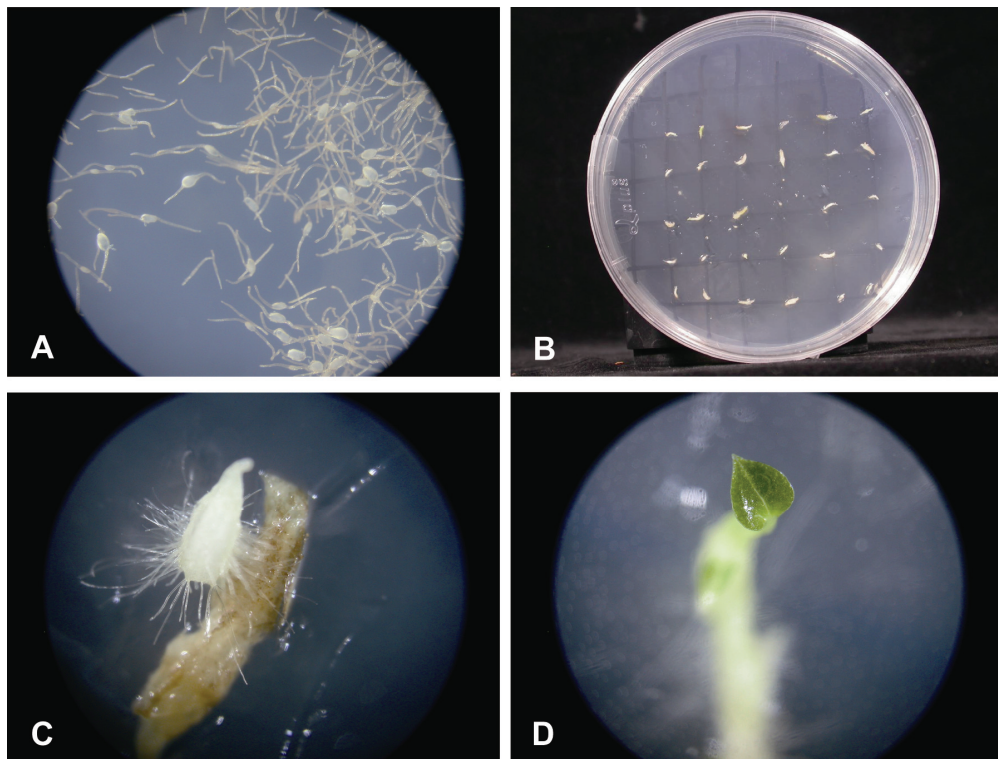


圖 1. 台灣金線連種子發芽、秋水仙素處理後之根莖及其再生芽體生長分化之情形。(A) 無菌播種 1 週後之種子；(B) 經 2.5 mM 秋水仙素液體處理一天後之 10 週齡根莖於固體培養基中生長之情形；(C) 新芽自秋水仙素處理後之根莖長出；(D) 新芽葉片展開之情形。

Fig. 1. *A. formosanus* showing germination of seeds (A) and regeneration of shoot and leaf from colchicine-treated rhizome (B–D). (A) Sterilized seeds germinated one week after sowing; (B) Growth of 10-week-old rhizomes on the solid medium after treatment for 1 day in the liquid culture containing 2.5 mM colchicine; (C) A regenerated shoot derived from the colchicine-treated rhizome; (D) Formation of a leaf from the shoot.

體的出現是否與培植體分化愈趨成熟有關，值得進一步研究。除利用無菌播種根莖作為培植體外，莖節培植體亦常被用來作為增殖台灣金線連之用，其作為多倍體誘導材料與根莖培植體的優劣比較，將另撰文討論。

秋水仙素使用濃度的高低會影響多倍體的誘導率，但一般而言，培植體的生長會因秋水仙素濃度增加而受到抑制，嚴重者會導致芽體死亡 (Gao *et al.* 1997; Roy *et al.* 2001)，因此適當濃度的秋水仙素除有效誘導多倍體外，必需兼顧培植體的成活率，才能得到總量較高的多倍體植株。此外，多倍體誘導效果會受秋水仙素濃度與處理時間的共同影響，Kadota & Niimi (2002) 以洋梨 (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui) 芽體培養於 0、0.25、2.5 mM 秋水仙素中 1、2、4 及 8 天，結果以 0.25 mM 秋水仙素處理 2 天對於多倍體誘導效果最佳。Redha *et al.* (1998) 使用小麥花藥為材料，以 0.25 和 2.5 mM 秋水仙素配合 0、1、3 及 5 天處理時間，發現 0.25 mM 及 2.5 mM 秋水仙素處理分別在處理 5 天及 1 天後可產生雙單倍體。這些試驗結果皆顯示，多倍體的誘導需要秋水仙素濃度配合適當的處理時間方能達成。在本研究中以 2.5 mM 秋水仙素在液態培養 16 小時處理，即可誘導多倍體植株的產生，但多倍體誘導率則在秋水仙素 24 小時培養達最高 (54.6%)；而在本研究另一試驗中以低濃度 0.625 mM 固體培養處理時間長達 2 週，雖然多倍體的誘導率表現亦佳 (44.8%)，但因處理時間過長，導致培植體的成活率偏低 (20.4%)。此外，本研究中在含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養處理 0-72 小時，發現處理時間延長至 48 小時後，多倍體的比例不再隨之增加，但觀察成活率有下降及嵌合體比率有提高之趨勢，這些現象是否與秋水仙素處理時間的延長有關，值得進一步研究。

除了秋水仙素濃度與時間的配合外，本研究在秋水仙素處理的物相形式方面，比較了

固、液態兩種培養方式，結果發現液體培養在秋水仙素濃度提高時，培植體成活率與多倍體比率表現皆較固體培養為佳，這可能與液體培養在各種物質的交換性較佳有關。

綜合以上試驗結果顯示，培植體的生長發育狀態、秋水仙素處理濃度、處理時間及固、液相培養方式，不僅對培植體的成活率有影響，對多倍體誘導率及嵌合體的形成率亦有相關。以本研究為例，選擇 10 週齡之根莖作為培植體，以 2.5 mM 秋水仙素利用液態培養方式進行 24 小時培養，多倍體的誘導率可達 54.6%，培植體的成活率高並且嵌合體的出現比率較低，是最適當的處理組合。

誌 謝

本研究經費來源為農業生物技術國家型計畫所提供，計畫編號 96-2317-B-055-008 特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. N. Roy, and S. M. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep.* 17:799-803.
- Chang, N. W. 1999. Mass Propagation of *Anoectochilus formosanus* through Tissue Culture. Master thesis. Chung Hsing Univ., Taichung, Taiwan. 82 pp. (in Chinese with English abstract)
- Dhawn, O. P. and U. C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy. *Euphytica* 87:81-89.
- Gao, S. L., D. N. Zhu, Z. H. Cai, and D. R. Xu. 1997. Autotetraploid plants from colchicines-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47:73-77.
- Huang, J. T. 2007. Colchicine on Polyploidy Induction of *In Vitro* *Anoectochilus formosanus* Hayata. Master thesis. Chung Hsing Univ., Taichung, Taiwan. 61 pp. (in Chinese with English abstract)
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep.* 21:282-286.

- Liang W. L., R. C. Chen, Y. J. Chiang, C. H. Su, L. L. Yang, and K. Y. Yen. 1990. Study on *Anoetochilus formosanus* species I. study on the physiological activities of Jin-Xian-Lian. *Formosan Sci.* 43:47–58.
- Liu, S. Y., T. W. Chang, J. Y. Wang, A. H. Chang, and S. C. Wang. 1998. Studies on the varietal characters and acute toxicity of *Anoetochilus* spp. *J. Agric. Res. China* 47:242–258 (in Chinese with English abstract)
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Osborn, T. C., J. C. Pires¹, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, Hyeon Se Lee, L. Comai, A. Madlung, R. W. Doerge, V. Colot, and R. A. Martienssen. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19:141–147.
- Poehlman, J. M. 1987. *Breeding Field Crops*. 3rd ed. Van Nostrand Reinhold, New York. 724 pp.
- Redha, A., T. Attia, B. Büter, S. Saisingtong, P. Stamp, and J. E. Schmid. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicines application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 17:974–979.

In Vitro Induction of Polyploidy from Rhizomes of *Anoectochilus formosanus*¹

Chi-Ni Hsia^{2,5}, Jian-Tan Huang³, Uei-Chern Chen², Chin-Yi Tsao², Shu-Hui Liang²,
and Shin-Sheng Tsay⁴

Abstract

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In Vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309.

This study was conducted to investigate effects of concentration, exposure duration of colchicine and treating colchicine with liquid or solid agar medium on *in vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. Ploidy of shoots derived from rhizome explants were analyzed using a flow cytometry. When the 12-week-old rhizome explants were cultured for two weeks in a solid agar medium or in a liquid medium containing 0, 0.025, 0.125, and 0.625 mM colchicine, the induction rate of polyploidy was the highest (44.8%) for the regenerated shoots in the liquid culture containing 0.625 mM colchicine. When the 10-, 11-, and 14-week-old rhizome explants were cultured for 3 days on a solid agar medium containing 0, 0.025, 0.25, and 2.5 mM colchicine, the induction rate of polyploidy (42.4%) was the highest in the samples of 10-week-old and 14-week-old rhizomes on the medium containing 2.5 mM colchicine. Moreover, the 14-week-old rhizomes produced higher number of polyploidy plants than that of 10-week-old rhizomes because the former had a higher survival rate. When the 10-week-old rhizomes were cultured for 16, 24, 48, and 72 hours in a liquid medium containing 2.5 mM colchicine, the earliest polyploidy shoots showed in the treatment of 16 hour but the highest rate of tetraploid was found in the treatment of 24 hour (45.5%). This study reveals that the 10-week-old rhizomes of *A. formosanus* are suitable explants for *in vitro* production of polyploidy plants as they produced high rate (54.6%) of polyploidy plants after treating for 24 hour in the liquid culture containing 2.5 mM colchicines.

Key words: *Anoectochilus formosanus*, Micropropagation, Colchicine, Polyploidy, Flow cytometry.

-
1. Contribution No.2379 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: December 9, 2009.
 2. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Project Assistant, Biotechnology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Graduate student of National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Professor, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.