

蘭花多倍體誘導及鑑定

易美秀

摘要

多倍體誘導在蘭花育種雜交改良上扮演重要角色，競爭者和消費者需要生產者透過種間和屬間雜交持續生產新的蘭花品種，然而種間雜交和屬間雜交的雜交種往往具有高度不稔性(Wimber *et al.* 1987; Watrous and Wimber, 1988)。稔性的減少是由於減數分裂第一分裂中期(metaphase)染色體的不適當接合和變異性所造成。誘導多倍體可加倍染色體數目恢復稔性和創造複二元體(allotetraploids)。同源配對的染色體分開可產生平衡的配子(Ranney, 2006)。

早期誘導蘭花多倍體是以秋水仙素處理實生苗、花序和成熟植物的分裂組織。這些通常形成混倍體，其新梢包括2倍體和4倍體組織。Wimber和Van Cott(1966)於Cymbidium用秋水仙素處理液體培養之原球體(protocorms)和擬原球體(PLBS)。秋水仙素處理濃度隨蘭種而異，一般連同培養基一起蒸熱殺菌處理者，0.05%左右就能見效。但採用過濾殺菌只要0.005%濃度即可(Wimber, 1987)。秋水仙素處理時最需要注意的是劇毒問題，秋水仙素對人類具有高毒性，這是由於秋水仙素對動物微小管較植物微小管親和性高，毒性較強。

Oryzalin(歐拉靈)是一種殺草劑也是一種抗微小管劑，可作為秋水仙素的替代物，oryzalin的毒性較低，因其對植物的微小管較具親和性。Miguel和Leonhardt(2011)將14.4、28.9和57.7 μM 之Oryzalin處理3和6天於*Dendrobium*、*Epidendrum*、*Odontioda*、*Phalaenopsis*之PLBS液體培養，可成功誘導多倍體，高濃度和長處理期培植體存活率較低，但多倍體的誘導數較多。最適處理：*Dendrobium*和*Odontioda*以oryzalin 14.4 μM 處理6天，*Epidendrum*以Oryzalin 57.7 μM 處理6天及*Phalaenopsis oryzalin* 14.4 μM 處理3天。

有些植物種類由於核內複製或核內有絲分裂而造成內多倍性(endopolyploidy)細胞的存在。內多倍性細胞在被子植物中帶有小型染色體的種上是常見的。甚至在一種內，內多倍性存在於特別的器官，蘭科有幾個屬和種的不同組織曾經觀察到內多倍性型細胞，例如*Dendrobium spp*，*Phalaenopsis spp*，*Oncidium varicosum*，*Vanda*和*Spathoglottis plicata*。蝴蝶蘭原種的protocorms或PLBS可由水平切的方法產生多倍體植物，而不用使用抗微小管劑，成熟組織較年輕組織之內多倍性的程度高，原球體的基部較頂部具有高程度的內多倍性(Chen *et al.* 2009、2011)。

倍數體的鑑定方法，以往都以植株型態及根尖染色體壓片為判別方法，但以表現型判別並非絕對準確，以根尖壓片需花費甚多人力，現在加入流式細胞儀(flow cytometry)檢測細胞特性可節省人力。

前言

蘭花是台灣具有外銷實力的花卉，為了延續產業發展與保有外銷實績，必須育成自有適地品種，蘭花種間雜交和屬間雜交常遇到不稔性問題，經由多倍體的誘導，可以恢復稔性，以達成育種目標。多倍體誘導大多採用秋水仙素誘導，但目前替代物Oryzalin毒性較低亦可有效誘導蘭科植物的多倍體，蝴蝶蘭若干原種本已具有內多倍性細胞，只須將內多倍性細胞誘導為多倍體植株不經化學藥劑處理則可獲得多倍體，已往多倍體的鑑定大都採用根尖染色體壓片，現由於科技的進步，加入流式細胞儀的檢測，將可大量判別細胞的倍數性(不同倍數體核內的DNA含量不同)，將可節省人力物力，增加倍數體育種的可行性。

內容

一、秋水仙素誘導多倍體

早期誘導蘭花多倍體是以秋水仙素處理實生苗、花序和成熟植物的分裂組織。這些實驗通常形成混倍體新梢包括2倍和4倍體組織。Wimber和Van Cott(1966)於*Cymbidium*以秋水仙素處理液體培養之原球體(protocorms)和擬原球體(PLBS)。蘭花類原球體的誘導形成過程是典型的胚狀體發生發育過程，而且是單細胞起源，這為離體化學誘變提供了方便，單細胞將有利於誘變劑的滲入，也有利於秋水仙素作用後進一步形成純合的多倍體植株，而較少產生嵌合體。

秋水仙素處理濃度隨蘭種而異，一般連同培養基一起蒸熱殺菌處理者，0.05%左右就能見效。但採用過濾殺菌0.005%濃度就有效(Wimber, 1987)。高濃度長處理期會減少存活率，但誘變結果較好，適當的濃度和處理時間需經實驗才能得知，例如台灣金線連多倍體誘導的結果，建議以莖節為培植體於2.5Mm秋水仙素添加於液體增殖培養基中培養效果最佳(黃, 2007)。採用秋水仙素對液體增殖培養中的文心蘭類原球體進行多倍體誘導，結果表明秋水仙素濃度越高，處理時間越長，類原球體受傷害程度越嚴重，再生苗多倍體比例越大，最高誘變率可達46.7%、低濃度，短時間秋水仙素處理易產生嵌合體(崔等人, 2009)。

二、殺草劑誘導多倍體

抗分裂劑例如秋水仙素和oryzalin曾經使用於植物多倍體的誘導，秋水仙素對人類具有高毒性，這是由於秋水仙素對動物微小管較植物微小管親和性高，近來研究抗微小管藥劑oryzalin(一種殺草劑，中文名歐拉靈)，作為秋水仙素的替代物。Oryzalin的毒性較低，因其對植物的微小管較具親和性。Oryzalin可使用於石斛蘭、樹蘭、齒舌蝸瘤蘭和蝴蝶蘭之多倍體誘導。Oryzalin使用結果和秋水仙素一樣，高濃度長時期處理培植體存活率低，但增加多倍體的誘導率。Oryzalin的最適合處理方式依蘭種有所不同，石斛蘭和齒舌蝸瘤蘭是14.4 μ M處理6天、樹蘭是57.7 μ M處理6天、蝴蝶蘭是14.4 μ M處理3天(Miguel et al. 2011)。

三、內多倍性細胞誘導多倍體

內多倍性(endopolyploidy)是指由核內複製或核內有絲分裂造成種組織內存在不同倍數性細胞(Barow 2003)。蘭科有幾個屬和種的不同組織，曾經觀察到內多倍性細胞，例如*Dendrobium spp*、*Phalaenopsis spp*、*Oncidium varicosum*、*Vanda*和*Spathoglorris plicata*。蝴蝶蘭原生種的Protocorms或PLBS可由水平切的方法產生多倍體植物不須使用抗微小管劑，發現成熟組織較年輕組織之內多倍性的程度高，原球體的基部較頂部具有高程度的內多倍性(Chen *et al.* 2009、2001)。

四、倍數體的鑑定方法

倍數體的鑑定方法主要可分為3項，包括(一)流式細胞儀、(二)根尖染色壓片、(三)植株性狀大小、氣孔大小、核大小及位置等。

(一) 流式細胞儀(flow cytometer)是指細胞於流體狀態頭移動時，能夠觀測及記錄細胞特質的儀器。流式細胞儀的發展是在科技演進的歷史過程中逐漸發展出來的。現代流式細胞儀的產生主要來自(1)顯微鏡的技術發展(2)血球計數儀器(3)印表機的噴墨技術等三方面為基石而發展出來的。

流式細胞儀是現代生物學研究不可或缺的利器，除了可鑑定細胞的標記外，還可分析細胞的分裂週期、DNA含量、細胞凋零死亡、細胞內鈣離子的濃度變化、pH值之改變…等等，此外，流式細胞儀更可將細胞篩選出來。

透過流式細胞儀可將細胞之倍數性區別出來，並可統計其各別數量，主要是依據DNA含量判別出倍數性。流式細胞儀可加速倍數性的判別減少鑑定所耗費之人力。

(二) 根尖染色壓片：是最直接的鑑定方法，但需要熟練的技術且較耗費人力，一般常見的為醋酸洋紅染色，可數出染色體的數目，但染色體條帶並不清楚，顯微鏡的物鏡需用到100X的油鏡，接目鏡的倍數和接物鏡的倍數相乘約需1600X以上。一般在染色體顯微鏡製片時所採用的染料均是和染色體上的核酸相作用。但核酸在染色體上的分佈非常不均勻，因此染色體各部位染色的深淺也各不相同，以虐調平芥末(quinacrine mustard)染色後可在紫外線顯微鏡下觀察，DNA含量高的部份為正染質，DNA含量少的部份為異染質，前者染色較深，後者在紫外線下呈透明螢光，染色體上會產生一些明暗粗細不同的染色帶，為Q帶。另外亦可以Giemsa染色，做出G帶，在核酸含量少的地方為暗色，在多的地方為淺色，由此2染色法可以明確將每一條染色體加以辨識。

螢光原位雜交(fluorescent in situ hybridization, FISH)一可用來標誌辨識染色體，利用帶有標記物質的基因探計(DNA or RNA)與玻片上的染色體雜交(鹼基互補配對)後，以顯微鏡觀察標記基因在染色體上的位置。由上述幾種染色方法可將倍數體明確的鑑定出來。

(四) 植株性狀的鑑定：多倍體的蘭花具有大花、圓的花形和色澤明亮，粗莖和厚葉的特性(Maoleod 1947; Kamemoto and Kam 1980)。文心蘭多倍體苗葉片厚實、緊湊、植株較矮、葉片下表皮氣孔張度較大、下表皮細胞核較大且靠近

細胞壁邊緣(崔等 2009、2010)。外表的性狀鑑定只能作為初步輔助鑑定。

結語

倍數體育種可縮短育種期限，解決不稔性問題，增加遠緣雜交的可能性；oryzalin具有誘導多倍體的效果，對動物的毒性低於秋水仙素，使用上對人員相對較為安全，內多倍性細胞依植物種類及器官而異，蝴蝶蘭具有內多倍性細胞，以類原球體及原球體切片培養在許多原生種上可獲得同源多倍體，此方法不須使用秋水仙素等抗微管藥劑，無任何毒害問題；流式細胞儀檢測可節省倍數體鑑定所需之人力。

參考文獻

1. 崔廣榮、張子學、張從宇、胡能兵、隋益虎、李杰勤 2010 文心蘭多倍體誘導及其鑑定 草業學報 19: 184-190。
2. 崔廣榮、上官凌飛、張子學、胡能兵、張從宇、侯喜林 2009 文心蘭類原球莖液體增殖過程中秋水仙素化學誘變 園藝學報36: 1385-1389。
3. 黃健覃 1997 秋水仙素對離體培養台灣金線連多倍體誘導研究 國立中興大學農藝學系碩士論文。
4. Barrow. M. and A. Meister. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematic, organ, life strategy and genome size. *plant cell Environ.* 26 : 571-584.
5. Chen, W. H., C. Y. Tang, T. Y. Lin, Y. C. Weng and Y. L. kao. 2011. Changes in the endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *phalaenopsis aphrodite subsp. formosana* (Orchidaceae). *Plant Science.* 181 : 31-38.
6. Chen, W. H., C. Y. Tang and Y. L. Kao. 2009. Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *phalaenopsis* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 98 : 229-238.
7. Kamemoto, H. and L. N. W. Kam. 1980. Diploid and tetraploid Aranda Wendy Scott from meristem culture. *Hawaii Orchid J.* 9 : 7-12.
8. Macleod, R. 1947. Some effects of colchicine on orchids. *Am. orchid soc. Bull.* 16 : 336-337.
9. Miguel, T. P. and K. W. Lennhardt. 2011. In vitro ployploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia Horticulturae.* 130 : 314-319.
10. Moore, E. T. 1947. The use of colchicine in orchids. *Am. Orchid Soc. Bull.* 16 : 512-513.
11. Ranney, T. G. 2006. Polyploidy : from evolution to new plant development. *Proc. Int. Plant Propagator soc.* 56 : 137-142.

12. Watrous, S. B. and D. E. Wimber. 1988. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. *Lindleyana*. 3 : 177-183.
13. Wimber, D. E. and A. Van cott. 1966. Artificially induced polyploidy in *cymbidiums*. In : Proceeding of the 5th World Orchid Conference, pp. 27-32.
14. Wimber, D. E., S. Watrous and A. J. Mollahan. 1987. Colchicine induced polyploidy in orchids. In : Proceedings of the 5th World orchid conference, pp. 65-69.