

# 倍體化在作物育種上之應用

陳葦玲

## 摘 要

倍體化是作物育種的重要方法及研究方向，其主要包括單倍體化(haploidization)和多倍體化(polyplodization)。單倍體植株經染色體加倍處理後獲得的個體基因型呈高度純合，較傳統育種需經多代自交才能獲得純系可縮短育種的年限，通過花藥、小孢子及胚珠為培植體培養育成的各類作物品種已應用在商業生產上。另多倍體在表現型上有巨大型效應，生理特性上也有可利用的優良性狀，透過化學藥劑和自體本身誘導產生多倍體，選育可利用的優良遺傳資源為另一個植物育種的一個重要途徑。

## 前 言

種間雜交(interspecific hybridization)和倍體化(ploidization)在作物育種上扮演著重要角色，種間雜交不僅為變異性重要來源、獲得雜種優勢(hybrid vigor)、亦具有提升質量或數量性狀表現的潛力；倍體化更是作物育種的重要方法及研究方向，其主要包括單倍體化(haploidization)和多倍體化(polyplodization)<sup>(1)</sup>，而多倍體化有可分為無性及有性多倍體化兩種。

## 內 容

### 一、單倍體化(haploidization)

單倍體(haploid)是指含有正常作物一半染色體數的個體，在自然界中，單倍體植物發生頻度非常低，約在 0.001~0.01%間。幼年期長、遺傳性狀具高度異質結合性且自交不親和性強之作物可利用單倍體培養獲得同質系(homozygous line)，以加速育種的流程。其主要培養的途徑可分為小孢子培養(microspore culture)及胚珠培養(ovule culture)兩類，分別經由雄核發育(androgenesis)及雌核發育(gynogenesis)成單倍體植株。

四倍體黃龍果 (*Selenicereus megalanthus*,  $2n=4x=44$ ) 及二倍體火龍果 (*Hylocereus polyrhizus*,  $2n=2x=22$ ) 其花藥培養於含 10 mg/L picloram 之培養基中對於胚及癒傷組織誘導有較佳的效果，培養 21~27 天後即有圓球期胚產生，體胚發育(embryogenesis)再經由魚雷期、心臟期及子葉期再生成單倍體植株(圖 1)，而二倍體火龍果(*H. undatus*)其花藥則需先以 4°C 前處理才有癒傷組織的生成<sup>(5)</sup>。白鶴芋 (*Spathiphyllum wallisii*) 胚珠培養於含 1  $\mu$ M TDZ 之培養基中有較佳的胚性癒傷組織誘導率，利用流式細胞儀可快速檢測植株染色體倍數，以確定單倍體植株(圖 2)，此外再生植株亦可觀察到雙單倍體(diploid)，表示在雌核發育(gynogenesis)過程中，其染色體數會自發性的加倍<sup>(4)</sup>。

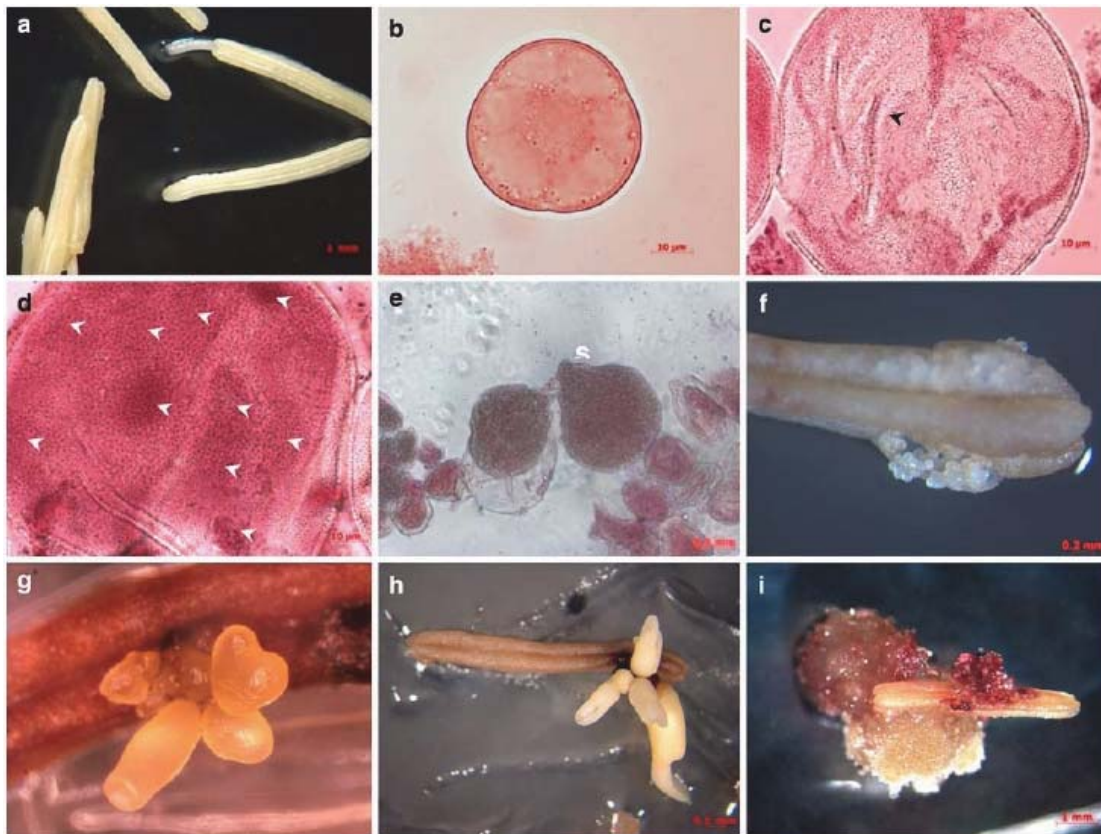


圖 1.黃龍果花藥培養小孢子雄核發育不同階段。

Fig. 1. Different stages of androgenesis in the vine cactus *S. megalanthus*.

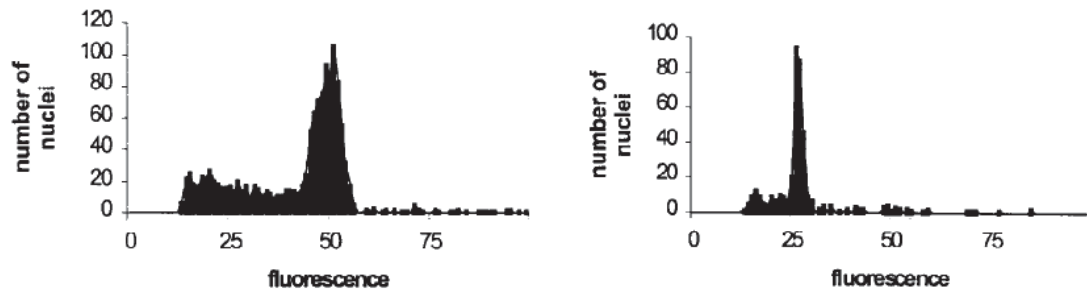


圖 2.利用流式細胞儀檢查白鶴芋胚株培養單倍體植株倍體數。

Fig. 2. Histograms obtained after flow cytometric analysis of a plantlet obtained through ovule culture of *Spathiphyllum* showing the number of nuclei per channel as a function of relative fluorescence intensity after staining of the nuclei with DAPI.

影響單倍體植株誘導培養效率之因素包括植株生長狀態、培植體前處理、培養基及培養環境等，其中花粉小孢子發育階段為其培養成功之主要因素之一，已知十字花科蔬菜以單核晚期(late-uninucleate)及雙核期(binucleate)所誘導效率較高<sup>(2)</sup>。*B. juncea* 和 *B. rapa* 小孢子胚培養時，花蕾長 2~3 mm 之單核晚期小孢子對於胚形成有較佳的反應，*B. napus* 和 *B. rapa* 也有相似的結論。*B. oleracea* L.則是在花蕾 4 mm 之單核晚期小孢子所誘導之癒合組織率較高<sup>(1)</sup>。

## 二、多倍體化(polyploidization)

多倍體(polyploid)是指體細胞中擁有多餘兩套之染色體組的植物個體，這種情形廣泛存在於植物中，開花植物中約 30~70% 以上是多倍體，其中以蕨類比例較高約有 95%，其他如禾本科中有 75%，豆類中有 18%。多倍體化為植物演化的動力，多倍體植株通常都有較佳的生長勢和性狀表現。多倍體化亦為恢復雜交  $F_1$  後代稔實性及克服雜交障礙之方法，其包含了無性多倍體化(mitotic polyploidization)和有性多倍體化(meiotic polyploidization)。

無性多倍體化方法包含植株本身自然的多配體產生，為一體細胞的變異，體細胞在有絲分裂的過程中，染色體經複製後未繼續完成分裂過程，造成染色體的倍加，例如結合子(zygote)的生長點細胞發生複製但不分裂，因此有多倍體芽的產生<sup>(7)</sup>。此外，體細胞染色體的內複製(endoduplication)，常見於正在快速發育的器官

如胚乳及子葉，藉以迅速增大組織。如蘭科中 *Dendrobium spp* , *Phalaenopsis spp* , *Oncidium varicosum* , *Vanda* 和 *Spathoglottis plicata* 有觀察到內多倍性型細胞。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。

除自然產生多倍體外亦可利用物理或化學方法誘導，物理方法包括溫度的變化、 $\alpha$  或  $\gamma$  射線的輻射誘變，但一般而言物理誘導的效率偏低。因此抗微管 (anti-microtubule) 藥劑如秋水仙素 (colchicine) 、歐拉靈 (oryzalin) 、三福林 (trifluralin) 、amiprofos-methyl 及  $N_2O$  等，其中以秋水仙素最常被使用，而近年 oryzalin 逐漸取代 colchicine 使用，石斛蘭屬及齒唇蘭屬原球體及擬原球體 (PLBs) 浸泡在  $14.4 \mu M$  oryzalin 下 6 天、樹蘭屬浸泡在  $57.7 \mu M$  oryzalin 下 6 天、蝴蝶蘭浸泡在  $14.4 \mu M$  oryzalin 下 3 天誘導出多倍體效果較佳<sup>(10)</sup>。

多倍體通常因細胞的加大而有增厚的葉子、寬大葉型、大花及果實、芽變粗、節間變短、較大的分叉角度，稱之巨大化 (gigas)<sup>(3)</sup>。玫瑰 (*Rosa hybrida* Hort.) 莖頂處理  $5 \mu M$  oryzalin 14 天後培養於固態培養基中有較佳的四倍體誘導率，所誘導之四倍體植株葉片明顯較二倍體植株大、花瓣數較多且花粉活性也較佳<sup>(8)</sup>。觀音蓮 (*Alocasia micholitziana*) 以 0.01% oryzalin 處理 24 及 48 小時所獲得之四倍體植株較多，其性狀和二倍體植株相比較則有較高的葉寬長比和較大的保衛細胞<sup>(10)</sup>。但矮牽牛 (*Petunia hybrida*) 其營養生長則因染色體倍體數增加而受到抑制，且經由四倍體和二倍體植株雜交後代花朵性狀觀察，可知其花瓣數和花朵大小並和倍體數無一致的相關性<sup>(6)</sup>。

上數巨大化的特徵有助於多倍體的鑑別，另亦可藉助顯微鏡檢根尖染色體數、花粉大小、氣孔大小及氣孔保衛細胞內葉綠體數等特徵。近年流式細胞儀 (flow cytometry) 的應用只需少量植物 DNA 即可鑑定，大為提升多倍體篩選的效率與準確度。

有性多倍體化依其減數分裂時期又可分為 first division restitution (FDR) 、second division restitution (SDR) 、intermediate restitution (IMR) 和 post meiotic restitution (PMR) ，主要為產生未減數的配子 ( $2n$  gamete)<sup>(9)</sup>。

表 1. 不同倍體數觀音蓮葉片型態及氣孔堡為細胞大小

Table 1. Variation in leaf characteristic among 2x, 4x, 2x+4x plants of *Alocasia micholitziana*

Ploidy level	No. of plants examined	Ratio of leaf width to leaf length (No±SE)	Leaf shape	Size of guard cells (length × width) (µM±SE)
2x	20	0.57±0.01 a*	Elongated-heart	23.56±0.1 b × 9.20±0.1 a
4x	20	0.84±0.02 c	Round-heart	35.22±0.2 d × 9.90±0.1 a
2x+4x	20	0.65±0.01 b	Intermediate, asymmetric	25.56±1.0 c × 9.52±0.1** a

\*Different letters in the row represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5%; \*\* value is the mean of 30 plants.

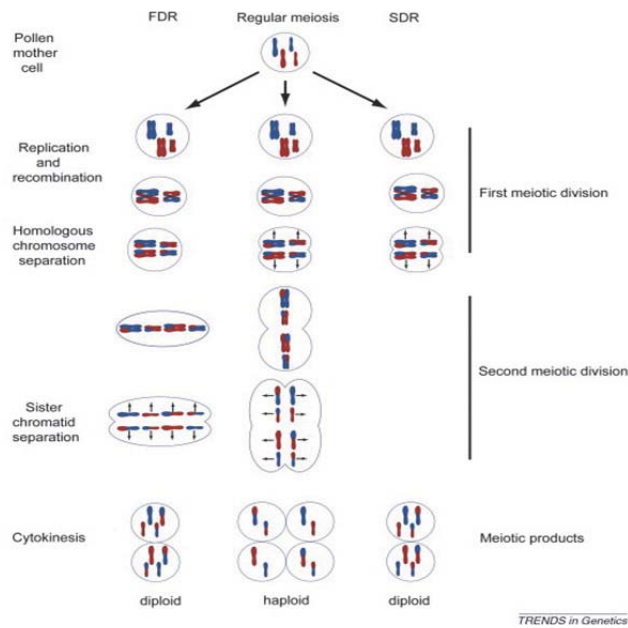


圖 3. First division restitution (FDR)和 second division restitution (SDR)減數分裂配子體產生模式。

Fig. 3. A model for the origin of nuclear restitution by first division restitution (FDR) and second division restitution (SDR).

## 結 語

倍體化雖為作物育種上常應用之技術，但目前仍夠不完善，更有效率的誘導方法、嵌合體現象的克服、快速倍體數檢測等問題仍需解決，以提高其在育種上之應用性。

## 參考文獻

1. 張有明、劉邦基、蕭吉雄 1996 甘藍及青花菜之花藥培養 I. 品系、發育期及培養基與再生之關係 中華農業研究 45: 35-46。
2. Cao, M. Q., F. Charlot and C. Dore. 1990. Embryogenesis and plant regeneration of *Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* in vitro microspore culture. Acad. Sci. Paris. Series III. 310: 203-209.
3. Debenher, T. 1999. Genetic analysis of horticulturally important morphological and physiological characters in diploid roses. Gartengauwissenschaft. 64: 14-20.
4. Eeckhaut, T., S. Werbrouck, J. Dendauw, E. V. Bockstaele, and P. Debergh. 2001. Induction of homozygous *Spathiphyllum wallisii* genotypes through gynogenesis. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 67: 181-189.
5. Garcia, R. B. and B. Schneider. 2009. Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (Cacaceae). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 96: 191-199.
6. Guo, G. N., X. P. Shi, H. R. Hu, Y. Yan, and M. Z. Bao. 2009. Development of a range of polyploidy lines in *Petunia hybrida* and the relationship of ploidy with the single-/double-flower trait. HortScience. 44: 250-255.
7. Karlov, G. I., L. I. Khrustaleva, K. B. Lim, and J. M. Van Tuyl. 1999. Homoeologous recombination in 2n-gamete producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic *in situ* hybridization (GISH). Genome 42: 681-686.
8. Kermani, M. J., V. Sarasan, A. V. Robert, K. Yokoya, J. Wentworth, and V. K. Sieber. 2003. Oryzalin induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. Theo. Appl. Genet. 107: 1195-1200.

9. Ramanna, M. S. and E. Jacobsen. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement.- A review. *Euphytica*. 113: 3-18.
10. Thao, N. T. P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki, and H. Okubo. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicines and oryzalin treatments. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 19-25.
11. Van Tuyl, J. M. and K. B. Lim. 2003. Interspecific hybridization and polyploidization as tools in ornamental plant breeding. *Acta Hort.* 612: 13-22.