

利用莖節培養誘導多倍體台灣金線連之研究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。2010。利用離體培養莖節誘導多倍體台灣金線連之研究。台灣農業研究 59:165–176。

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為台灣特有種，亦為本土重要之草藥。為育種之目的，本研究以微體繁殖之瓶苗莖節為培植體，評估不同抗微管藥劑 (antimicrotubule chemicals)、秋水仙素濃度與處理時間、以及秋水仙素與細胞分裂素 BA 處理配合的程序對多倍體誘導的影響，處理後長出之芽體並以流式細胞儀檢測其染色體之倍體數。莖節培植體在含有秋水仙素、歐拉靈及三福林 25 μM 、100 μM 及 400 μM 三種濃度之液體增殖培養基中培養 2 週，發現多倍體誘導比率以 400 μM 秋水仙素最高，但存活之植株數最少。莖節培植體在含有 0.625–6.25 mM 秋水仙素之液體增殖培養基中培養 3 天，結果顯示除 6.25 mM 濃度處理之芽體生長受抑制外，各濃度皆可誘導多倍體的產生，其中以 2.5 mM 誘導率最高，達 80%。以 2.5 mM 秋水仙素測試處理時間 3–9 天之影響，顯示處理時間長於 3 天，嚴重抑制培植體的生長，芽體平均成活率皆低於 30%。將莖節進一步區分為頂芽及頂芽下一節之節芽作為培植體，以 2.5 mM 秋水仙素縮短處理時間為 1–3 天，發現節芽的生長在不同處理天數皆受到抑制，但頂芽處理 2 天組多倍體誘導率可達 100%。將處理時間固定為 3 天，以 0.625–6.25 mM 濃度之秋水仙素分別處理頂芽及節芽，結果顯示以 1.25 mM 處理之頂芽多倍體誘導率最高，達 88.9%；濃度 0.625 mM 處理之頂芽雖然誘導率較低 (66.2%)，但芽體存活率較高，獲得之多倍體株數亦最高。比較培植體在施用秋水仙素前，先以含有 BA 的增殖培養基進行預培養；或在施用秋水仙素之後，再於含有 BA 之增殖培養基中培養。兩種處理程序中，培植體於秋水仙素處理及增殖培養基中，培養的時間皆相同，但前者之嵌合體比例僅 6.4%，而後者為 23%。綜合本研究之結果，以微體繁殖台灣金線連之莖節進行多倍體誘導，以頂芽較節芽為佳；以較低之秋水仙素 0.625 濃度處理頂芽 3 天，可保持芽體之再生力，多倍體的誘導率最高可達 161% (129 株多倍體/80 個頂芽)，是一種高效率的多倍體誘導方式。

關鍵詞：金線連、抗微管藥劑、秋水仙素、倍數體、流式細胞儀。

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2411 號。接受日期：99 年 9 月 23 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。

前 言

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為蘭科、金線連屬多年生草本植物，是台灣民間極為珍貴之藥材，因面臨抗病種原缺乏且育種所需時間過長的限制，亟思以雜交育種以外之方式克服此一問題 (Huang 2007)。多倍體主要是指相對正常染色體數目 ($2n = 2x$) 倍加之植株，一般多倍體具有之特徵為增大的植物營養器官 (Osborn *et al.* 2003)；可克服雜交不親合性 (Adaniya & Shirai 2001)；生產無子三倍體 (Poehlman 1987)；以及提高植物二次代謝物產量與增加植物對逆境之抗性 (Gao *et al.* 1997)。考察目前台灣金線連種苗商業生產模式，一般皆以組織培養進行種苗大量繁殖，主要以野生或人工授粉之果莢進行無菌播種生產實生苗，此法具有數量上之優勢，但種子經由雜交授粉而來，子代具有較大之差異性 (Shiau *et al.* 1995)；或以金線連植株之莖段為培植體，於添加植物生長調節劑之固態或液態培養基中進行繁殖 (Chang 1999)，此法可針對優良母本加以保存，種苗之整齊性高，缺點為繁殖倍率較前法為低。利用台灣金線連無菌播種之根莖 (rhizome) 作為多倍體誘導之材料，已證實具有良好成效 (Hsia *et al.* 2009)，但若無法取得適當發育期之根莖，或目的為保存母株優良特性，則可利用離體培養瓶苗之莖節作為多倍體誘導之材料。此外，秋水仙素雖是染色體倍加最常用之藥劑，但亦有報告指出，其他抗微管藥劑 (antimicrotubule chemical) 如歐拉靈 (oryzalin)、三福林 (trifluralin) 與秋水仙素 (colchicine) 相較，對於培植體生長的抑制作用較小 (Hansen *et al.* 1998; Kermani *et al.* 2003)。本研究以台灣金線連微體繁殖瓶苗之莖節作為培植體，除評估不同抗微管藥劑及其濃度對多倍體誘導之效果外，並探討秋水仙素的使用濃度與處理時間、以及秋水仙素與含有 benzyladenine (BA) 之增

殖培養基配合使用的程序，對於誘導台灣金線連產生多倍體之影響。

材料與方法

植物材料及離體培養方法

台灣金線連一年生之實生瓶苗 (購自有容生技公司，埔里)，每 3 個月以固體健化培養基繼代 1 次，莖節培植體取自瓶苗植株。頂芽及節芽比較試驗所用之培植體，為農業試驗所自行授粉無菌播種經繼代多次之瓶苗。液體增殖培養基成份為 1/2 MS 基本鹽類配方 (Murashiage & Skoog 1962) 添加 2 mg/L benzyladenine (BA)、0.5 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA)、3%蔗糖 (Chang 1999)。培養容器為 125 mL 三角瓶，每瓶裝 10 mL 培養基，以 70–90 rpm 震盪速率培養。固體健化培養基成分與液體增殖培養基相同，但未添加植物生長調節劑，且另添加 30 g/L 馬鈴薯泥、50 g/L 香蕉泥、1 g/L 活性碳粉及 9 g/L Bacto agar，培養基 pH 調整為 5.7 ± 0.1 。培養容器為 500 mL 蘭花瓶，內裝 100 mL 培養基。培養環境為 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照強度 $30\text{--}35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每日 14 小時光照。

抗微管藥劑溶液配製，秋水仙素 (Sigma, USA) 先以少量乙醇溶解後再以無菌水稀釋成母液；歐拉靈 (Supeco, USA) 與三福林 (Supeco, USA) 則以 100% dimethyl sulfoxide 溶解後再以無菌水稀釋，配製完成之溶液在加入培養基前皆以 $0.22 \mu\text{M}$ 微過濾膜過濾。

不同抗微管藥劑處理

切取瓶苗之莖節段 (不分頂芽及節芽)，培養於含有 $25 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 及 $400 \mu\text{M}$ 三種濃度之秋水仙素、歐拉林和三福林液體增殖培養基中，2 週後繼代於固體健化培養基，之後每 4 週繼代 1 次，芽體成活率於繼代後 4 週調查，芽體長度則於繼代後 8 週調查。每一處理 5 瓶，每瓶置 5 個節段，每一節段含有 3 個節芽。

秋水仙素濃度處理

莖節段(不分頂芽及節芽)培植體培養於含有 0、0.625、1.25、2.5 及 6.25 mM 秋水仙素之液體增殖培養基中, 3 天後繼代於不含秋水仙素之液體增殖培養基續培養 2 週, 此後培養於固體健化培養基, 每 4 週繼代 1 次。芽體增殖率及芽體長度於處理後 10 週調查。每一處理 10 瓶, 每瓶置 3 個節段, 每一節段含有 3 個節芽。

秋水仙素處理時間

莖節段(不分頂芽及節芽)培植體於含有 2.5 mM 秋水仙素之液體增殖培養基中, 培養時間分別為 3、6 及 9 天, 之後繼代於固體健化培養基。芽體增殖率及芽體長度於處理後 8 週調查。每一處理 6 瓶, 每瓶置 5 個節段, 每一節段含 3 個節芽。

秋水仙素濃度處理對頂芽及節芽培植體之影響

將瓶苗之頂芽及其下的節芽(各約 1 cm 長)加以區分, 兩種培植體分別培養於含有 0.625、1.25、2.5 mM 秋水仙素之液體增殖培養基中 3 天, 之後繼代於固體健化培養基, 此後每 4 週繼代 1 次。每一處理 8 瓶, 每瓶置 10 個培植體。處理後 8 週進行調查。

秋水仙素處理時間對頂芽及節芽培植體之影響

將頂芽及節芽培植體於含 2.5 mM 秋水仙素之液體增殖培養基中分別 1、2 及 3 天, 繼代及調查方式同前所述。

BA 配合秋水仙素處理之先後程序

處理一為頂芽培植體於不含生長素之液體培養基中培養 3 天後, 移入含 2.5 mM 秋水仙素及 2 mg/LBA 之液體增殖培養處理 1 天, 之後繼代於液體增殖培養基中 3 天; 處理二為頂芽培植體先於含有 2 mg/LBA 之液體增殖培養基中培養 3 天, 再繼代含秋水仙素及 BA 之液

體增殖培養處理 1 天, 之後繼代於不含植物生長調節劑之液體培養基中培養 3 天。兩組處理在含有 BA 增殖培養基中皆為 4 天(其中 1 天為秋水仙素處理), 在不含植物生長調節劑液體培養基中亦皆培養 3 天, 並同時在第 7 天繼代於固體健化培養基。每一處理 5 瓶, 每瓶置 20 個頂芽培植體, 調查工作同前所述。

染色體的倍體數分析

在新芽之第一片葉展開後切取約 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 分鐘後以流式細胞儀 (Partec PA, Germany) 檢測。每個芽體取樣 2 次, 每一樣品檢測之細胞核數為 5000 個。

統計分析

試驗資料先進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA), 若處理間差異顯著, 再進行最小顯著差異性測驗 (least significant difference, LSD) 比較各處理平均值間之差異性; 其中培植體存活率調查資料, 在進行上述統計分析之前先經 \sin^{-1} 角度轉換。本研究各項分析工作係利用 SAS 統計分析套裝軟體進行。

結 果

台灣金線連瓶苗莖節段培植體於 25 μ M、100 μ M 及 400 μ M 三種濃度之秋水仙素、歐拉靈及三福林液體培養基中共培養 2 週, 3 種藥劑配合 3 種濃度總共 9 種處理及對照組之結果如表 1 所示。與對照組相較, 所有藥劑處理對於芽體的增殖與生長(芽長度)皆有不良影響 ($p < 0.05$) (表 1), 其中以 25 μ M 秋水仙素及 25 μ M、100 μ M 歐拉靈對芽體增殖及生長影響較小。處理中除 25 μ M 三福林之培植體受感染及 100 μ M 濃度秋水仙素無存活之芽體可供調查外, 流式細胞儀檢測各處理之多倍體比率介於

5.6–100%之間，以 400 μM 秋水仙素組最高 (100%)，但僅獲得 3 株倍數體 (處理總芽數為 75)；其次為 100 μM 三福林處理之 27.8%，共獲得 5 株多倍體。流式細胞儀各種倍體數之圖譜如圖 1 所示，嵌合體大多為 2x 與 4x 之混合體。

以含有 0–6.25 mM 秋水仙素之液體增殖培養基處理莖節段培植體 3 天，在 10 週後調查各處理之存活率介於 57–100%之間 (表 2)，但觀察芽體隨著秋水仙素濃度提高，生長受到不同程度之抑制，如芽體僅至隆起階段但停滯生長或逐漸褐化死亡 (圖 2)。成活植株經抽樣檢測，顯示多倍體誘導比率隨著秋水仙素濃度的增加而提高 (8.3–80%)，以 2.5 mM 處理之多倍體誘導比率最高，達 80%，且未有嵌合體出現 (表 2)，而 6.25 mM 濃度處理之芽體生長受嚴重抑制，無展開之葉片可供進行流式細胞儀檢測。

以 2.5 mM 濃度秋水仙素測試延長處理時間 (3–9 天) 對多倍體誘導之影響，結果顯示處

理時間增至 3 天以上時，莖節培植體之成活率、新芽增殖與生長 (每個培植體產生之芽體數及芽長度) 與對照組相較皆明顯降低 ($p < 0.05$)，且隨著處理時間增加而降低，但因處理內個別差異大，3 日以上之各處理間，在統計上之差異並不顯著 (表 3)。由多倍體誘導之結果來看，3 天處理組共有 8 株存活，其中 4 株為多倍體；6 天處理組僅 2 株培植體存活，但皆為多倍體；處理 9 天組則未有芽體生長。

將莖節段區分為頂芽及節芽兩種培植體，以 2.5 mM 秋水仙素處理 1–3 天，結果顯示雖然頂芽與節芽兩種培植體之成活率 (於處理後第 4 週調查) 差異並不顯著 ($p > 0.05$) (表 4)，但隨著培養時間增長，節芽生長明顯受抑制，在 3 種時間處理中皆未有葉片長出，因此無法提供流式細胞儀染色體檢測之數據。頂芽培植體的多倍體誘導率介於 25–100%之間，以 2 天處理之比率最高，達 100% (5 株)，但多倍體總株數以 3 天處理組最高 (7 株)。

表 1. 台灣金線連莖節於固態培養基中施用不同抗微管藥劑及其濃度二週對芽體生長及多倍體誘導之影響

Table 1. Effect of antimicrotubule chemicals and its concentration for 2-week exposure in a liquid medium on shoot growth and polyploidy induction of *A. formosanus* in vitro nodal explants

Chemical	Con. (μM)	No. of shoots/ explant ^z	Shoot length (cm) ^y	No. of survival plants	Polyploidy (%)				
					2C	3C	4C	8C	Chimera
Control	0	1.04 a ^x	1.60 a	10	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Colchicine	25	0.53 b	1.14 b	15	73.3	13.3	0.0	0.0	13.3
	100	0.09 d	0.54 d	0	—	—	—	—	—
	400	0.07 d	0.46 d	3	0.0	0.0	67.0	33.0	0.0
Oryzalin	25	0.47 b	1.26 b	11	81.8	0.0	9.1	0.0	9.1
	100	0.51 b	1.14 b	18	83.3	0.0	0.0	5.6	11.1
	400	0.29 c	0.76 c	47	87.2	2.1	6.4	0.0	4.3
Trifluralin	25	— ^w	—	—	—	—	—	—	—
	100	0.35 c	0.92 c	18	66.7	0.0	27.8	0.0	5.6
	400	0.27 c	0.94 bc	28	64.3	0.0	14.3	0.0	21.4

^z Mean number of shoots per nodal section collected 4-week-culture after treatment.

^y Data collected 8-week-culture after treatment.

^x Means in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^w Explants were contaminated after treatment.

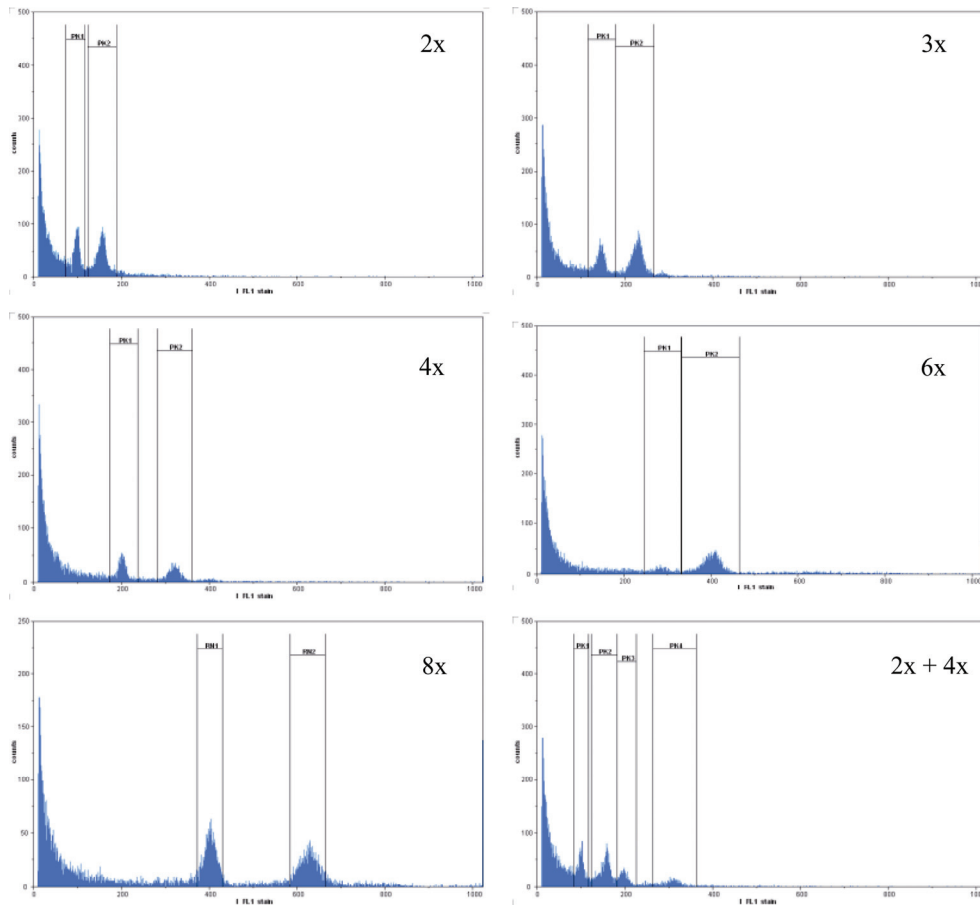


圖 1. 台灣金線連以流式細胞儀分析 2x、3x、4x、6x、8x 和 2x + 4x 各種倍數體之圖譜。

Fig. 1. Flow cytometric histograms of 2x, 3x, 4x, 6x, 8x and 2x + 4x ploidy of *A. formosanus* Hayata plantlets.

表 2. 秋水仙素濃度於液體培養基處理 3 天對台灣金線連瓶苗莖節多倍體誘導之影響

Table 2. Effects of colchicine concentration for 3-day exposure in a liquid culture on polyploidy induction of *A. formosanus* in vitro nodal explants

Colchicine (μ M)	Survival rate ^z (%)	No. of analyzed shoots	Polyploidy (%)				
			2C	4C	7C	8C	Chimera
0	100 a ^y	10	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.625	85.5 ab	24	83.3	8.3	0.0	0.0	8.3
1.25	78.8 abc	10	40.0	20.0	0.0	0.0	40.0
2.5	65.5 bc	10	20.0	20.0	10.0	50.0	0.0
6.25	56.6 c	0	— ^x	—	—	—	—

^z Data collected 8-week-culture after treatment. Data was transformed using \sin^{-1} transformation before statistical analysis.

^y Means in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^x No expansion leaf was found on shoots for analysis.

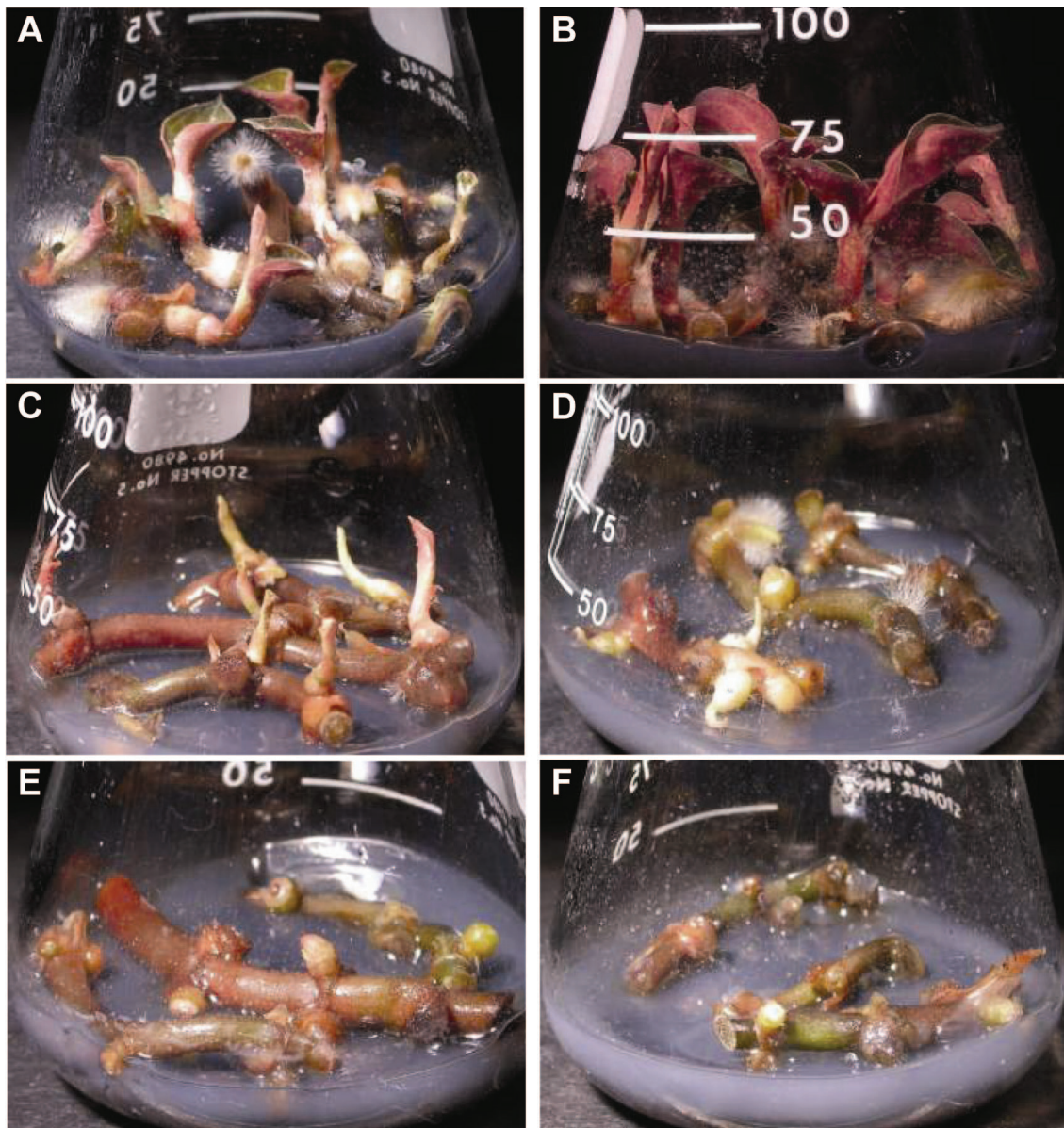


圖 2. 台灣金線連莖節培植體以不同濃度秋水仙素處理 3 天，在處理後 6 週芽體生長之情形。(A) 對照組；(B) 對照組 (處理後 10 週)，芽體伸長且新葉展開；(C) 0.625 mM 秋水仙素處理，可見芽體伸長但葉未展開；(D、E 及 F) 依序為 1.25、2.5 和 6.25 mM 秋水仙素之處理，芽體生長有不同程度之停滯。

Fig. 2. Growth of *in vitro* nodal explants of *A. formosanus* for six weeks of culturing after colchicine treatment. (A) control, shoots elongated with expanded leaves; (B) control shoot grew 10 weeks after treatment; (C) treatment of 0.625 mM colchicine, with elongated shoots only; (D, E, and F) treatments of 1.25, 2.5 and 6.25 mM, respectively. Shoot with different levels of growth retardation.

表 3. 以含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基處理台灣金線連莖節不同天數對芽體存活及多倍體誘導之效果

Table 3. Effects of exposure duration of 2.5 mM colchicine in a liquid medium on shoot growth and polyploidy induction of *A. formosanus* in vitro nodal explants

Exposure duration (d)	Survival rate ^z (%)	No. of shoots/explant	Length of shoot (cm)	No. of analyzed shoots	Polyploid (%)		
					2C	4C	6C
0	100.0 a ^y	1.10 a	1.05 a	10	100.0	0.0	0.0
3	50.0 b	0.38 b	0.07 b	8	50.0	50.0	0.0
6	28.9 b	0.28 b	0.04 b	2	0.0	50.0	50.0
9	20.0 b	0.21 b	0.07 b	0	— ^x	—	—

^z Data was collected 8-week-culture on acclimatization medium. Data was transformed using \sin^{-1} transformation before statistical analysis.^y Means in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).^x No expansion leaf was found on shoots for analysis.

表 4. 以含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基處理台灣金線連頂芽及節芽培植體不同時間對多倍體誘導之影響

Table 4. Effect of exposure duration of 2.5 mM colchicine in a liquid culture on polyploidy induction of *A. formosanus* in vitro shoot tip and nodal explants

Exposure duration (d)	Type of explant	Survival rate (%) ^z	No of analyzed shoots	Polyploid (%)		
				2C	4C	Chimera
1	tip	46.4 ab ^y	20	40.0	25.0	35.0
	nodal	55.3 a	— ^x	—	—	—
2	tip	22.8 b	5	0.0	100.0	0.0
	nodal	28.0 b	—	—	—	—
3	tip	34.6 ab	21	52.4	33.3	14.3
	nodal	40.6 ab	—	—	—	—

^z Data was collected 8 weeks after subculture on the acclimatization medium. Data was transformed using \sin^{-1} transformation before statistical analysis.^y Means in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).^x No expansion leaf was found on shoots for analysis.

將頂芽及其下之節芽培養於 0.625–2.5 mM 不同濃度之秋水仙素液體增殖培養基中 3 天，結果顯示在成活率方面，濃度因子影響顯著 ($p < 0.05$)，培植體因子影響極顯著 ($p < 0.01$)。隨著處理濃度增加，頂芽與節芽培植體成活率皆降低，頂芽成活率在 50–84% 之間，節芽則在 20–72% 之間，但濃度增至 2.5 mM 時，節芽生長已嚴重受抑制。比較兩種培植體對多倍體誘導之效果，頂芽產生多倍體的比率介於 49.1–88.9% 之間，節芽則在 33.4–50% 之間 (表 5)，但在相同濃度下，頂芽皆較節芽有較高之

誘導率。

將頂芽培植體先於含有 BA 之增殖培養基中預處理 3 天後再施以秋水仙素處理；或於不含秋水仙素之液體培養基中培養 3 天後再施以秋水仙素處理及 BA 增殖培養基培養。兩種程序比較含有 BA 之增殖培養基施用在秋水仙素處理前或處理後，對多倍體誘導率的影響。結果顯示前者多倍體誘導比率為 65.9%；後者為 72.1%，但前者之嵌合體比例僅 6.4%，而後者達 22.9% (表 6)，嵌合體以 2x + 4x 或 4x + 8x 較多。

表 5. 比較頂芽及節芽培植體在不同秋水仙素濃度液體培養基中處理 3 天對台灣金線連多倍體誘導之影響

Table 5. Effect of colchicine concentration for 3-day exposure on polyploidy induction of *A. formosanus* in vitro shoot tip and nodal explants

Colchicine (μM)	Type of explant	No. of analyzed shoots	Polyploid (%)						
			2C	4C	6C	7C	8C	9C	Chimera
0.625	tip	195	22.6	58.0	1.0	0.0	7.2	0.0	11.3
	nodal	6	66.7	16.7	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0
1.25	tip	54	13.5	68.5	0.0	0.0	20.4	0.0	3.7
	nodal	10	30.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
2.5	tip	65	35.4	29.2	1.5	1.5	15.4	1.5	15.4
	nodal	0	— ^z	—	—	—	—	—	—

^z No expansion leaf was found on shoots for analysis.

表 6. 頂芽培植體在 2.5 mM 秋水仙素處理前或處理後於含有 BA 之培養基中培養對台灣金線連誘導多倍體之影響

Table 6. Effects of BA treatment before or after 2.5 mM colchicine culturing on polyploidy induction of *A. formosanus* in vitro shoot tip explants^z

BA treatment ^z	No. of analyzed shoots	Polyploidy (%)				Chimera (%)		
		2C	4C	5C	8C	2C + 4C	4C + 8C	Other patten
Before colchicine exposure	47	27.7	34.0	0.0	31.9	4.3	2.1	0.0
After colchicine exposure	61	4.9	45.9	1.6	24.6	8.2	1.6	13.1

^z Medium containing the half MS basal salts, 2 mg/L BA, 0.5 mg/L NAA and 3% sucrose.

討 論

Chang (1999) 指出以台灣金線連培植體利用液體與固體交互培養方式可提升芽體增殖率；在台灣金線連根莖誘導多倍體的研究中亦採用此種微體增殖方式，根莖培植體於秋水仙素液體培養基中進行多倍體的誘導，再繼代於固體培養基中恢復生長，證實有良好之成效 (Hsia *et al.* 2009)。比較台灣金線連以微體繁殖之根莖或瓶苗莖節作為培植體之優缺點，顯示根莖因可處理之數量多 (由種子長出)，且具有較強之分生能力是其優點，但處理時必須配合適當的根齡，且高成活率導致後期篩選之工作量亦隨之增加 (Hsia *et al.* 2009)；對於優良品種而言，採取莖節作為培植體具有保存母株特性

之優點，尤其利用莖節中之頂芽作為多倍體誘導之材料，其誘導效率高 (最高可達 161%)，篩選效率較高是其優點。

常用之抗微管藥劑包括有：秋水仙素、二硝基苯 (dinitroaniline) 類之歐拉靈、三福林；二氯基苯甲酸類之拿草特 (pronamide) 及含磷氨基化合物 (phosphoric amide) 之甲基胺草磷 (amiprofos-methyl) (Acquah 2007)。Hansen *et al.* (1998) 利用 0–300 μM 秋水仙素、拿草特、歐拉靈、三福林及甲基胺草磷處理甜菜胚珠，發現秋水仙素具最強毒性，歐拉靈和三福林其次。在本研究中不同抗微管藥劑採用之濃度 (25、100、400 μM) 主要係參考歐拉靈和三福林，較一般秋水仙素習用濃度偏低，但因處理時間長達 2 週，各藥劑仍顯現對芽體生長抑制

之現象，以每一藥劑濃度共處理 75 個莖節芽數來看，在秋水仙素 100 μM 、400 μM 處理中，成活植株分別為 0 及 3 株；歐拉靈、三福林處理組的存活株數則在 11–47 株之間，3 種藥劑中以歐拉靈對芽體繁殖及生長的抑制作用最低，三福林其次，而以秋水仙素最強 (表 1)，與前述 Hansen *et al.* (1998) 報告之結果相類似。以抗微管藥劑對多倍體誘導的效率來看，400 μM 秋水仙素所獲得的 3 株植株皆為多倍體 (100%)；歐拉靈或三福林處理的多倍體誘導比率在 5.6–27.8% 之間。

秋水仙素是多倍體誘導最常被使用之藥劑，使用濃度的高低與處理時間的長短皆能影響植株成活率及多倍體的誘導率。Chakraborti *et al.* (1998) 以桑椹離體培養之頂芽為材料，利用 0–5 mM 秋水仙素處理 24 小時，發現 5 mM 濃度導致高死亡率。在本研究中使用 6.25 mM 秋水仙素處理 3 天，同樣發現培植體生長受抑制，芽體於繼代後皆褐化死亡 (表 2)。比較 0.625–6.25 mM 濃度，顯示其中以 2.5 mM 對多倍體誘導比率最佳 (80%)。在處理時間方面，採用 2.5 mM 濃度分別處理 3、6 及 9 天處理，雖然結果以 6 天處理之多倍體誘導比率最高 (100%)，但處理 90 個芽數僅得 2 株成活植株；處理時間增至 9 天則無成活芽體，因此推斷使用 2.5 mM 濃度最佳之處理時間應低於 3 天。同樣採用 2.5 mM 並將處理時間縮短為 1–3 天的實驗中，節芽與頂芽兩種培植體中僅頂芽培植體能繼續生長，以 2 天處理之多倍體誘導比率 100% 最高，但多倍體總株數則以 3 天處理組最高，因此推論以 2.5 mM 濃度處理，2–3 天為可接受之處理時間 (表 4)。

離體培養誘導多倍體大都採用分化能力較強的培植體，主要是希望培植體的細胞必須具有高度分裂及生長發育之特性；除此之外，亦可利用添加植物生長調節劑先活化生長靜止之體細胞，後續再以秋水仙素處理以提高多倍體

植株形成率 (Adaniya & Shoda 1998)。在本研究中首先利用瓶苗莖節作為培植體 (未區分頂芽或節芽)，觀察到培植體存在有明顯的個別差異，此差異有可能來自培植體本身生理狀態之不同，以及不同組織生長能力之不同，因此進一步將莖節培植體區分為頂芽及其下一節段之節芽，比較其差異性。試驗結果顯示不同培植體對於成活率影響顯著 ($p < 0.01$)，其中頂芽較節芽對秋水仙素濃度的耐受性較高 (表 4)，多倍體誘導倍率亦較高 (表 5)，尤其頂芽若以 0.625 mM 低濃度秋水仙素處理，可以保持高成活率並具有增殖能力，雖然其多倍體誘導比率 66.2% 低於 1.25 mM 組之 88.9% (表 5)，但因成活之總株數較多 (195 株)，其中 129 株皆為多倍體，誘導效率達 161.3% (129 株/80 個芽)；而提高濃度之 1.25 mM 組僅獲得 48 株多倍體，佔處理芽數之 60% (48 株/80 個芽)，顯示培植體、秋水仙素濃度及處理時間適當之配合，可提高多倍體誘導之效率。

嵌合體或多種倍體數同時存在於不同之細胞或發育時期在植物並不鮮見 (Lee *et al.* 2004)，在多倍體誘導過程中，由於細胞分裂的不同步，因此有嵌合體的產生。本研究中培植體於含有 BA 之增殖培養基中培養的時間，分別在秋水仙素處理之前或之後，兩種培養方式的培植體在含有 BA 的增殖培養基中皆共培養 4 天，結果顯示兩種程序在多倍體的誘導率上雖然差異不大 (65.9% vs. 72.1%)，但培植體於秋水仙素處理後若繼續培養於增殖培養基中，嵌合體出現比例為 23.0%，較先以增殖培養基預培養再施以秋水仙素組之嵌合體比例 6.4% 明顯偏高 (表 6)。推論培植體先於增殖培養基中培養，有利於將不同生理狀態之細胞經由細胞分裂素 BA 的作用同質化；又或者培植體在秋水仙素處理後繼續培養於增殖培養基中培養，由於 BA 對細胞分裂促進的持續作用，因而導致嵌合體比例的增高，值得進一步研究。

綜合本研究之結果歸納如下，抗微管藥劑的種類及其濃度對金線連多倍體誘導效果各有不同，歐拉靈與三福林於較低濃度即可達到多倍體誘導之效果，且芽體有較高之成活率，但多倍體誘導比率與秋水仙素相較則偏低；使用秋水仙素需避免長時間處理（超過 3 天）對培植體所導致之毒害作用；選擇具有高生長分化力之培植體配合低濃度秋水仙素處理，雖然多倍體產生比率較高濃度秋水仙處理為低，但因芽體生長受到抑制較小，成活之植株數較多，在獲得多倍體總株數方面反而有利。建議採用頂芽為培植體並適當降低秋水仙素使用濃度 (0.625–1.25 mM)，可提高芽體成活率及增殖率，可獲得較多的多倍體植株。此外，在秋水仙素處理前培植體先以增殖培養基培養，並避免培植體於秋水仙素處理後持續培養於增殖培養基中，可減少嵌合體的出現。

誌 謝

本研究經費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)

- Acquah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Pub. USA. 569 pp.
- Adaniya, S. and M. Shoda. 1998. Variation in pollen fertility and germinability in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 67: 872–874.
- Adaniya, S. and M. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Sci. Hort. 88: 277–287.
- 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)
- Gao, S. L., D. N. Zhu, Z. H. Cai, and D. R. Xu. 1997. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47:73–77.
- Hansen, A. L., A. Gertz1, M. Joersbo, and S. B. Andersen. 1998. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. Euphytica 101:231–237.
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309. (in Chinese with English abstract)
- 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)
- Kermani, M. J., V. Sarasau, A. V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth, and V. K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. Theor. Appl. Genet. 107:1195–1200.
- Lee, H. C., D. W. Chiou, W. H. Chen, A. H. Markhart, Y. H. Chen, and T. Y. Lin. 2004. Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. Plant Sci. 166:659–667.
- Murashiige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. 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.
- Shiau, Y. H., C. C. Chen, C. Y. Lu, and H. S. Tsay. 1995. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata I. Studies in the improvement of seed germination. J. Agric. Res. China 44:279–286.

In Vitro Induction of Polyploidy from Nodal Explants of *Anoectochilus formosanus*¹

Chi-Ni Hsia^{2,4}, Jian-Tan Huang³, Uei-Chern Chen², Chin-Yi Tsao²,
Shu-Hui Liang², and Hsin-Sheng Tsay⁴

Abstract

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2010. *In Vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 59:165–176.

Anoectochilus formosanus is an important ethnic as well as a medicinal herb in Taiwan. Investigations of antimicrotubule chemicals, colchicine concentration, colchicine exposure time and colchicine combination with BA treatment on polyploidy induction using *in vitro* *A. formosanus* nodal explants were conducted in this study. Ploidy levels of shoots regenerated from antimicrotubule chemical treatments were analyzed using flow cytometry. Nodal segments were exposed to different concentration (25–400 μ M) of colchicine, oryzalin and trifluralin in a liquid culture for two weeks, and the highest polyploidy rate was found at 400 μ M colchicine with minimum survival. In order to find the optimum concentration for polyploidy induction, nodal explants were exposed to colchicine concentration range from 0.625 to 6.25 mM for three days. Polyploids were able to induce from all tested concentrations except of 6.25 mM which had severe toxicity on explants and the highest induction rate of 80% was found at 2.5 mM colchicine. Nodal explants were further exposed to 2.5 mM colchicine for 3–9 days, and minimum survival rates (< 30%) were found on prolonging exposure time longer than 3 days. Nodal explants were further defined into shoot tip and nodal segment as explants culturing at 2.5 mM colchicine for 1 to 3 days. No polyploidy was found from nodal segment regardless exposure times however a polyploidy induction rate up to 100% was obtained using shoot tip as explants for 2-day exposure. Extending colchicine concentration from 0.625 to 6.25 mM for 3-day exposure using both nodal segment and shoot tip as explants was conducted subsequently. Although the highest polyploidy induction rate 88.9% was found at 1.25 mM colchicine, the highest numbers of polyploids were obtained at lower concentration of 0.625 mM from shoot tip explants. BA treatment applied before or after colchicine exposure was compared using shoot tip explants. A chimera rate 23% observed from explants continuously exposed to BA-containing medium after the colchicine treatment, in contrast only

-
1. Contribution No. 2411 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: September 23, 2010.
 2. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Project Assistant, Biotechnology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Graduate student, Department of Agronomy, Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Professor, Department of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.

6.4% chimera observed in explants which were exposed to BA-containing medium only before the colchicine treatment. The present study demonstrates that polyploidy can be induced from *in vitro* grown nodal segments successfully with different antimicrotubule chemicals. An efficient polyploidy induction method has been established culturing shoot tip in a liquid medium containing 0.625 concentrations of colchicine for 3-day exposure with polyploidy induction rate up to 161% (129 polyploids/80 shoot tip explant) in this study.

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

