

秋水仙素處理對藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* *fma. coerulea* 原球體多倍體誘導之影響

曹進義¹ 陳威臣¹ 吳容儀² 吳姿穎³ 夏奇鈺^{4*}

摘要

曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鈺。2018。秋水仙素處理藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima fma. coerulea* 原球體對多倍體誘導之影響。台灣農業研究 67(3):247–257。

本研究以藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima fma. coerulea* 無菌播種發芽後約 6 wk 齡之原球體 (protocorm) 作為培植體，探討秋水仙素 (colchicine) 濃度及處理時間對多倍體誘導之影響，並以流式細胞儀與根尖染色檢測苗株之多倍性。結果顯示，在存活率方面，原球體在不同濃度與天數的秋水仙素處理下，以處理 1 d 存活率最高，達 85.5–93.3%，隨著秋水仙素處理天數的增加，存活率有降低的趨勢，且二因子間具有顯著交感效應。在多倍體的誘導方面，原球體以 0.1 mM 秋水仙素浸漬處理 1 d 即可誘導出多倍體，隨著處理天數的增加，多倍體的誘導率亦隨之提高，處理 8 d 之多倍體誘導率可達 43.9%，此誘導率與 2.5 mM 秋水仙素處理原球體 8 d 多倍體誘導率 46.0% 相較並無顯著差異，但前者可獲得生長良好且數量較多的多倍體植株。比較 2 倍體與秋水仙素誘導所得之 4 倍體植株的園藝性狀，結果顯示 4 倍體植株具有較大的花徑、果莢、梗徑與子房徑，且葉片較寬短、花梗長度較短以及花朵質地較厚實堅挺等特性。有關 4 倍體之雜交親和性尚需進一步測試。

關鍵詞：蝴蝶蘭、原球體、秋水仙素、倍體數、流式細胞儀。

前言

蝴蝶蘭為國際花卉市場上最受歡迎的蘭花之一 (Wang 2004)，台灣在蝴蝶蘭種原上具有優勢，多年來藉由雜交育種與組織培養繁殖技術培育出各種色系的蝴蝶蘭品種，但仍有難以突破的瓶頸，譬如缺乏新穎的特定花色，藍紫色系之蝴蝶蘭即為其一 (Tsao 2013)。藍紫色花為開花植物中的夢幻顏色，亦為育種者亟欲育成之目標 (Griesbach 2005)，考察目前商業生產的蝴蝶蘭品種中，鮮少有藍紫色蝴蝶蘭品種同時具備有商業生產模式所需的特性。Arends (1970) 在原生種蝴蝶蘭染色體型態的分析研究指出，

Phalaenopsis bellina、*Phalaenopsis violacea* 及 *Phalaenopsis pulcherrima* 等原種具有大型染色體，*Phalaenopsis equestris* 則為小型染色體，且在分類上 *P. bellina*、*P. violacea* 屬於 *Polychilos* 亞屬，*P. pulcherrima* 與 *P. equestris* 屬於 *Phalaenopsis* 亞屬但不同節 (Christenson 2001)。上述種原皆具有藍紫色之變種植株，但此類藍紫色蝴蝶蘭的種間或亞屬間雜交難度較一般蝴蝶蘭雜交育種為高，雜交不親和性的現象亦相當普遍。由於現有藍紫色蝴蝶蘭的親本大多是原種或是原種第一代雜交種，且皆為 2 倍體植株，具花徑較小、花朵質地較薄、整體花形較差且花朵壽命較短等缺點；反觀目前商業生產之蝴蝶

投稿日期：2017 年 8 月 15 日；接受日期：2017 年 12 月 17 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所花卉研究中心助理研究員。台灣 雲林縣。

³ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

蝶蘭品種大多為 4 倍體，二者之間雜交可能面臨雜交親和性低的問題，即使育有雜交代後也可能多為 3 倍體，難以更進一步之利用 (Chen *et al.* 2009)。

根據 Griesbach (1985) 的研究顯示，以秋水仙素 (colchicine) 誘導 2 倍體的原生種蝴蝶蘭，或雜交種所獲得的 4 倍體蝴蝶蘭來進行雜交代育種，可改善雜交不親和性與園藝性狀等問題。多倍體主要是指相對正常染色體 ($2n = 2x$) 數目倍加之植株，多倍體具有的特徵為增大的植物的器官 (Osborn *et al.* 2003)；花徑增大及改善花朵質地與花型 (Griesbach 1981)；葉數與根數減少，根較粗短，生長較為緩慢 (Azmi *et al.* 2016) 以及可克服雜交不親和性 (Griesbach 1985; Adaniya & Shirai 2001) 等特性。由於自然界自發性的染色體倍加頻率非常低且難以被發現，因此藉由人為的方式進行多倍體化誘導，獲得多倍體的育種材料有其必要性 (Griesbach 1981)。秋水仙素為染色體倍加常用的藥劑 (Hsia *et al.* 2010)，在蝴蝶蘭與其他蘭科植物的多倍體誘導上已有許多成功之案例 (Griesbach 1981, 1985; Hsia *et al.* 2009, 2010; Azmi *et al.* 2016)。本研究以藍紫色蝴蝶蘭原生種 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 之原球體為材料，探討秋水仙素濃度與處理天數對於多倍體化誘導之影響，預期可誘導出多倍體植株作為育種親本，藉此擴大種原的利用性，並加速雜交代後代成為商業品種，解決目前藍紫色蝴蝶蘭雜交代育種所面臨之困境。

材料與方法

無菌播種

藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 自花授粉 120 d 後之果莢，以 75% 酒精表面擦拭消毒，再以 0.6% (v/v) NaOCl (Clorox Bleach, Oakland, CA, USA) 添加 1–2 滴 Tween 20 搖動消毒 20 min (含超音波震盪 1 min)，然後於無菌操作台內以無菌水清洗 3 次後切開果莢，將種子均勻接種在固體培養基上並置於培養室培養。培養室培養環境為溫度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照強度為 $38 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 及 14 h 光週期。固體培養基以花寶 1 號 (HYPONeX No. 1. N : P : K = 7 : 6 : 19) 為基本鹽類，添加 2 g L^{-1} 花寶 1 號、

1 g L^{-1} Peptone、1% 蔗糖、 2 g L^{-1} 活性碳、 25 g L^{-1} 香蕉、 50 g L^{-1} 馬鈴薯及 8 g L^{-1} Bacto Agar (Difco, Sparks, MD, USA)。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。秋水仙素浸漬處理之液體培養基，同樣以花寶 1 號為基本鹽類，並添加 1 g L^{-1} Peptone、1% 蔗糖，培養容器為 125 mL 三角玻璃瓶，每玻璃瓶置 20 mL 培養液，pH 皆調整至 5.6，再以 121°C 滅菌 20 min。

秋水仙素處理試驗

秋水仙素母液以 $0.22 \mu\text{m}$ 微過濾膜過濾至已滅菌之血清瓶容器，並以鋁箔紙包覆避光，放置 4°C 冰箱冷藏備用。以播種後 6 wk、大小約 1.5 mm 之原球體 (protocorm) 為培植體，原球體直接接種至固體培養基作為對照組。處理組之原球體經刻傷處理 (以解剖刀切割原球體邊緣一刀) 後，分別置入添加 0.1、0.5 及 2.5 mM 秋水仙素之培養液中，處理時間分別為 1、2、4 及 8 d。原球體在處理期間於避光環境下以 50 rpm 轉速進行震盪培養 (Griesbach 1981)；浸漬處理後之原球體以無菌水清洗 3 次，並接種於不含秋水仙素之前述花寶 1 號固體培養基中。每個處理 3 重覆，每重覆接種 50 個原球體，並於接種後 4 wk 調查存活率。

染色體之倍體數分析

參考 Hsia *et al.* (2010) 的分析方法，切取培植體長出大小約 $0.3\text{--}0.5 \text{ cm}^2$ 幼嫩葉片，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Münster, Germany)，以刀片將葉片組織切碎後過濾，再於濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B，靜置染色 3 min 後以流式細胞儀 (Partec, Münster, Germany) 檢測，每個處理逢機檢測 33 個培植體樣品，檢測時以高雄大學所提供經檢測分析為 2 倍體之原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis aphrodite* 瓶苗為對照材料。每個培植體取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞數為 5,000 個。

根尖染色體染色分析

於中午 11:30–12:30 間，切取經流式細胞儀檢測為 2 倍體 (對照組) 與多倍體之藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 瓶苗

植株之根尖做為染色體分析材料。參考 Kuo *et al.* (2005) 所建立之蝴蝶蘭根尖染色技術並稍作修正，取幼嫩根尖浸於 2 mM 8-HQ (8-hydroxy-quinoline) 於黑暗環境下處理 3–4 h，以無菌水清洗 3 次，之後以 Farmar's solution (95% alcohol : acetic acid = 3 : 1) (新鮮配製) 固定液浸泡 24–48 h，接著用無菌水清洗，之後置入 70% 酒精並放置於 4°C 冰箱中保存備用。觀察時先以無菌水將樣品清洗數次後，置於酵素溶液中 (6% pectinase 及 6% cellulose 溶於 75 mM KCl, pH 4)，於 37°C 下作用 1 h 後，取出以無菌水清洗數次。然後夾取適量經酵素軟化後的根尖置於載玻片上，加入 lacto-propionic-orcein 染劑，輕壓使染色體均勻分布後，夾出不要的組織碎片，蓋上蓋玻片染色數分鐘後，於酒精燈上迅速過火使細胞膨大，以手掌壓片後，於光學顯微鏡下觀察並照相記錄。

園藝性狀調查

將 2 倍體與秋水仙素誘導所得之多倍體苗株出瓶栽培於農業試驗所生技組配備有水牆風扇之溫室約 60 wk 後，取同時間第一次開花之 2 倍體與 4 倍體植株各 7 株，進行花朵橫徑、梗長 (不含花序長)、梗徑 (第 3 節位)、最大葉長、葉寬、子房長 (含子房柄)、子房寬 (最寬)、授粉後 12 wk 之果莢長、果莢寬等園藝性狀調查。

統計分析

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，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，培植體存活率與多倍體率資料，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

秋水仙素濃度配合浸漬時間處理影響原球體存活率

將藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma.

coerulea 之原球體作為培植體，以 3 種不同秋水仙素濃度 (0.1、0.5 及 2.5 mM) 與 4 種浸漬處理時間 (1、2、4、8 d) 進行多倍體誘導之結果顯示，原球體在不同濃度與天數的秋水仙素處理下，以處理 1 d 原球體有最高的存活率，達 85.5–93.3%。隨秋水仙素處理天數的增加，培植體存活率呈現下降的趨勢，且處理濃度與天數二因子間呈現顯著之交互效應，顯示秋水仙素濃度與處理時間的長短的交互作用會影響原球體的存活率 (表 1)。

以流式細胞儀及根尖染色之苗株倍體數分析

在多倍體誘導效果方面，以 0.1 mM 秋水仙素處理 1 d 即可誘導出多倍體 (4 倍體)，但其多倍體誘導率僅為 1%。隨著秋水仙素處理濃度與天數的增加，多倍體的比率亦隨之提升，其中以 0.1、0.5 及 2.5 mM 處理 8 d 有較高的多倍體 (3x、4x、6x、8x) 誘導率，為 39–46%。在不同倍體的誘導率方面，以 4 倍體所占比率最高，為 33–40%。在秋水仙素濃度與處理天數二個因子中，以濃度為主要影響因子，呈現顯著 (6x 及 8x) 與極顯著差異 (4x) (表 1)。觀察亦發現，以 0.1 mM 秋水仙素處理 8 d 後，原球體後續之生長與分化受到抑制，隨著處理濃度與天數的增加 (0.5 mM 及 2.5 mM 秋水仙素處理 8 d)，原球體生長與分化受抑制的情形更為明顯，且植株分化與生長更加緩慢 (圖 1)。根據流式細胞儀檢測各種倍體數苗株之圖譜 (圖 2) 與根尖染色體分析的結果 (圖 3)，顯示以流式細胞儀分析檢測苗株之葉片及切取根尖，進行染色體分析兩者所得的結果是相符合的。

園藝性狀調查

由於誘導所得之 3 倍體、6 倍體與 8 倍體植株較少，僅為 2% 左右，加上瓶內培養及取樣過程與栽培期間皆有部分材料死亡，得以正常生長並開花結莢之多倍體目前僅有 4 倍體植株。觀察並比較 4 倍體藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 植株與對照組 (2 倍體) 植株之園藝性狀，顯示前者具有較大的花徑與果莢、梗徑與子房徑較粗，以及葉片寬短、花梗長度較短以及花朵質地厚實堅挺等特性，外觀

表 1. 秋水仙素濃度與天數處理對藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體與誘導多倍體之影響。

Table 1. Effects of colchicine concentration and exposure duration on polyploidy induction of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* protocorm explants^z.

Colchicine (mM)	Exposure duration (d)	Survival rate (%) ^y	Ploidy (%) ^x				
			2x	3x	4x	6x	8x
Control (0)	0	93.2 ± 5.0 a ^w	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
0.1	1	85.5 ± 0.8 abc	99.0 ± 1.0 a	0.0 ± 0.0 a	1.0 ± 1.0 e	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	2	71.1 ± 2.2 cd	98.0 ± 1.9 a	0.0 ± 0.0 a	2.0 ± 2.0 e	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	4	78.7 ± 2.8 bcd	89.0 ± 2.1 ab	1.0 ± 1.0 a	10.0 ± 2.7 de	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	8	69.6 ± 7.0 d	56.1 ± 5.3 de	0.0 ± 0.0 a	40.0 ± 4.0 a	0.0 ± 0.0 b	3.9 ± 2.0 a
0.5	1	93.3 ± 5.1 a	91.1 ± 6.1 ab	0.0 ± 0.0 a	8.9 ± 6.1 de	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	2	76.6 ± 5.7 bcd	88.2 ± 7.8 abc	0.0 ± 0.0 a	8.9 ± 6.1 de	0.0 ± 0.0 b	2.9 ± 1.7 ab
	4	74.4 ± 5.8 cd	73.0 ± 8.1 cd	0.0 ± 0.0 a	26.0 ± 7.0 bc	0.0 ± 0.0 b	1.0 ± 1.0 ab
	8	70.0 ± 5.0 d	61.0 ± 10.5 de	2.0 ± 2.0 a	33.0 ± 5.9 ab	2.0 ± 2.0 a	2.0 ± 2.0 ab
2.5	1	89.3 ± 3.8 a	96.0 ± 3.9 ab	2.0 ± 2.0 a	2.0 ± 2.0 e	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	2	67.7 ± 4.8 d	91.0 ± 1.7 ab	1.0 ± 1.0 a	8.0 ± 1.0 de	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	4	70.1 ± 9.1 d	82.0 ± 1.9 bc	0.0 ± 0.0 a	18.0 ± 1.9 cd	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	8	72.5 ± 0.5 cd	54.0 ± 3.3 e	0.0 ± 0.0 a	40.0 ± 3.4 a	2.0 ± 1.0 a	4.0 ± 1.0 a
Concentration		NS ^v	**	NS	**	*	*
Days		*	*	NS	NS	NS	NS
Concentration × Days		*	NS	NS	NS	NS	NS

^z Explants were cultured on HYPONeX No. 1. (N : P : K = 7 : 6 : 19) medium which contains 2 g L⁻¹ HYPONeX No. 1, 1 g L⁻¹ Peptone, 1% sucrose, 2 g L⁻¹ charcoal, 25 g L⁻¹ banana, 50 g L⁻¹ potato, and 8 g L⁻¹ bacto agar after exposure with various colchicine concentrations for various days in a liquid medium. Liquid medium is the same as the HYPONeX No. 1. medium which contains 2 g L⁻¹ HYPONeX No. 1, 1 g L⁻¹ Peptone, and 1% sucrose. Each treatment had 3 replications with 50 protocorm explants per replication.

^y Percentage of survival rate = (no. of green and protocorms/50) × 100%.

^x Percentage of ploidy = (no. of ploidy explants/33 survival explants) × 100%.

^w Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

^v NS, *, **: Non-significant, significant at 0.05, and 0.01 levels, respectively.

大小與 2 倍體植株間呈現顯著差異 (表 2、圖 4)。不同倍數體植株生長速率與對照組相較之下生長較為緩慢，於原球體生長與分化階段即可觀察出對其生長有影響，尤以高濃度 (0.5 mM 及 2.5 mM) 與多天數 (8 d) 處理最為明顯。相對的，亦影響後續植株之生長速度，生長最為緩慢，而 6 倍體與 8 倍體培植體不易分化長成正常植株，出瓶種植後容易死亡。

討論

由於現行藍紫色蝴蝶蘭育種所使用之親本大多為種原歧異度大之 2 倍體原生種 (Arends 1970; Christenson 2001)，或是親本為園藝性狀不佳之種間雜交種，期待與目前大白花商業品

種 (大多為 4 倍體) 進行雜交，此種雜交可能面臨雜交親和性低的問題，即使幸運獲得雜交後代，也可能多為 3 倍體，難以有更進一步之雜交應用 (Chen *et al.* 2009)。在我們實際進行超過 200 個以上雜交組合之育種過程中，亦觀察到藍紫色蝴蝶蘭與商業品種之雜交後代，如欲以父母本或以其他藍紫色蝴蝶蘭種原進行回交或雜交時，往往無法成功獲得果莢，因此難有更進一步之育種應用。據此，本研究欲藉由 2 倍體之藍紫色蝴蝶蘭育種材料的多倍體化，作為克服雜交不親和性以及改善花徑、花形、花朵質地與花序等園藝性狀 (Griesbach 1981, 1985; Adaniya & Shirai 2001) 的手段。

蝴蝶蘭的多倍體化於自然界中發生的機率低，必須藉由人工誘導的方式提高多倍體之育成

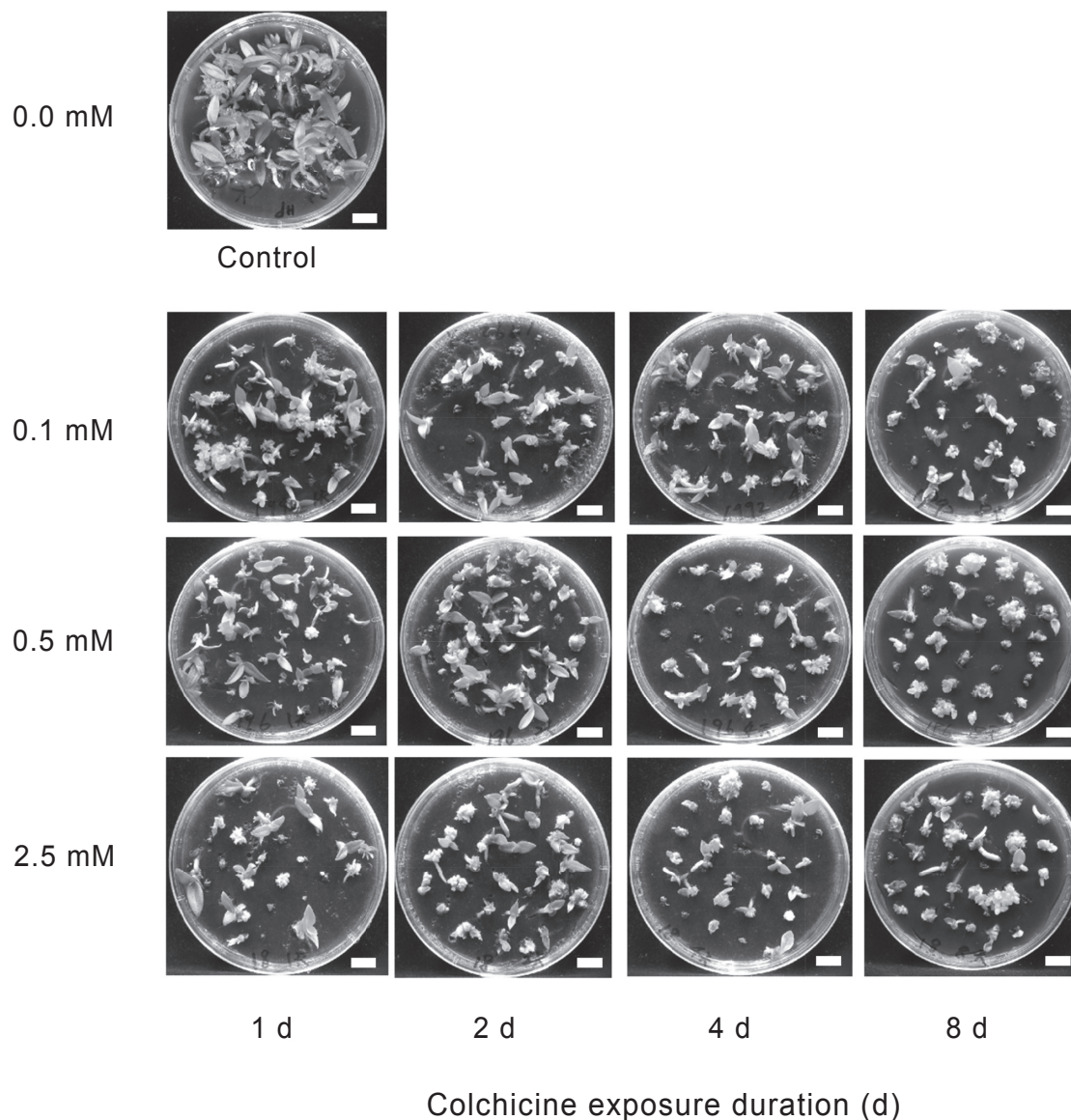


圖1. 以0.1、0.5、2.5 mM秋水仙素處理藍紫色原生種蝴蝶蘭*Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體1、2、4、8 d後經8 wk培養後之生長情形。花寶1號(HYPONeX No. 1, N:P:K = 7:6:19)培養基組成為2 g L⁻¹花寶1號、1 g L⁻¹ Peptone、1%蔗糖、2 g L⁻¹ 活性碳、25 g L⁻¹ 香蕉、50 g L⁻¹ 馬鈴薯以及8 g L⁻¹ bacto agar。對照組(control)為未經秋水仙素處理之原球體直接接種於花寶1號培養基。

Fig. 1. Growth of protocorm explants of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* for 8 wk culturing on HYPONeX No. 1. (N : P : K = 7 : 6 : 19) medium contains 2 g L⁻¹ HYPONeX No. 1, 1 g L⁻¹ Peptone, 1% sucrose, 2 g L⁻¹ charcoal, 25 g L⁻¹ banana, 50 g L⁻¹ potato, and 8 g L⁻¹ bacto agar after exposing with 0.1, 0.5, 2.5 mM colchicine for 1, 2, 4, 8 d in a liquid medium. Control is protocorm explants culturing on the same HYPONeX No. 1 solid medium directly without colchicine exposure treatment. Bar = 1 cm.

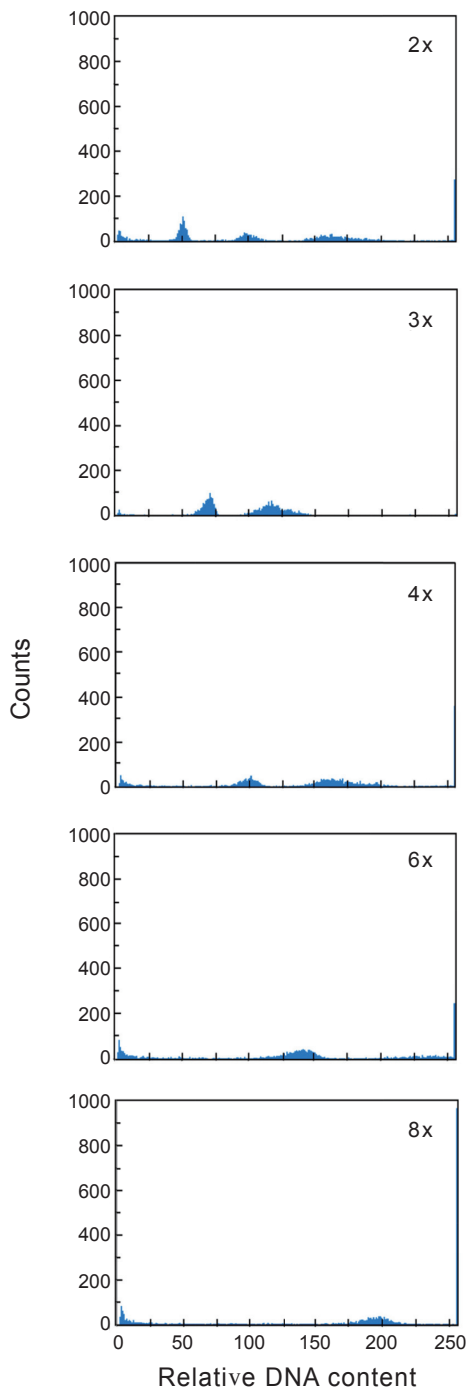


圖 2. 利用流式細胞儀分析藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*, 2x、3x、4x、6x 和 8x 倍數體之圖譜。

Fig. 2. Flow of cytometric histograms of 2x, 3x, 4x, 6x, and 8x types of ploidy of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* plantlets.

率 (Griesbach 1981)。因此，培植體的選擇與培養條件的配合，對於以人為的方式進行多倍體誘導的效果相當重要 (Chakraborti *et al.* 1998)。Azmi *et al.* (2016) 以秋水仙素處理授粉後 3 d 蝴蝶蘭花朵之柱頭與子房，果莢成熟後經無菌播種，4 倍體植株的誘導率可達 100%。以離體方式誘導多倍體時，可採用分化能力較強的培植體如根莖 (rhizome)、原球體等，希望藉由培植體細胞高度分裂及生長發育之特性，提高秋水仙素施用之效果。由於蝴蝶蘭原球體具有前述之特性，是多倍體誘導最佳之材料 (Griesbach 1981; Hsia *et al.* 2010)，因此本試驗亦以藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體為多倍體誘導材料。除本身所具有高度生長分化的能力外，在可取得培植體數量上亦具有優勢，且有良好之多倍體誘導效果。

根據本研究與其他學者的研究結果皆顯示，秋水仙素濃度的高低、處理時間的長短以及培植體的特性，皆會影響培植體存活與多倍體誘導效果。Griesbach (1981) 以 50 mg L^{-1} (約 0.13 mM) 秋水仙素處理蝴蝶蘭原球體 10 d，其多倍體誘導率為 48% (4 倍體 46%、8 倍體 2%)，以 4 倍體為主要多倍體，其他倍體數僅占極低的比率，與本研究結果相似。Azmi *et al.* (2016) 分別以秋水仙素 50 mg L^{-1} (約 0.13 mM) (3–5 d) 與 500 mg L^{-1} (約 1.3 mM) (5 d) 處理原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis amabilis* 授粉後 3 d 花朵之柱頭與子房，4 倍體植株誘導率分別為 60% 與 100%，若以高濃度 $1,000\text{--}2,000 \text{ mg L}^{-1}$ (約 $2.6\text{--}5.2 \text{ mM}$) 處理則子房容易黃化，可獲得果莢數少。Hsia *et al.* (2009) 利用液態培養的方式，以 2.5 mM 秋水仙素處理 10 wk 齡的台灣金線連根莖 24 h，多倍體的誘導率可達 54.6%，且培植體存活率高；以低濃度 0.625 mM 秋水仙素固體培養處理台灣金線連根莖 2 wk，雖然多倍體誘導率最佳 (44.8%)，但因處理時間過長，導致培植體存活率偏低 (20.4%)，且在含有 2.5 mM 秋水仙素之液體培養處理時間延長至 48 h 後，多倍體的比例不再隨之增加，但成活率有下降趨勢，與本研究結果相似。此外，Hsia *et al.* (2010) 於液態培養基中添加 1.25 mM 秋水仙素處理台灣金線連頂芽培植體 3 d，其多倍體誘導率可高達 88.9%，以 2.5 mM 秋水仙素處理台灣金線連莖

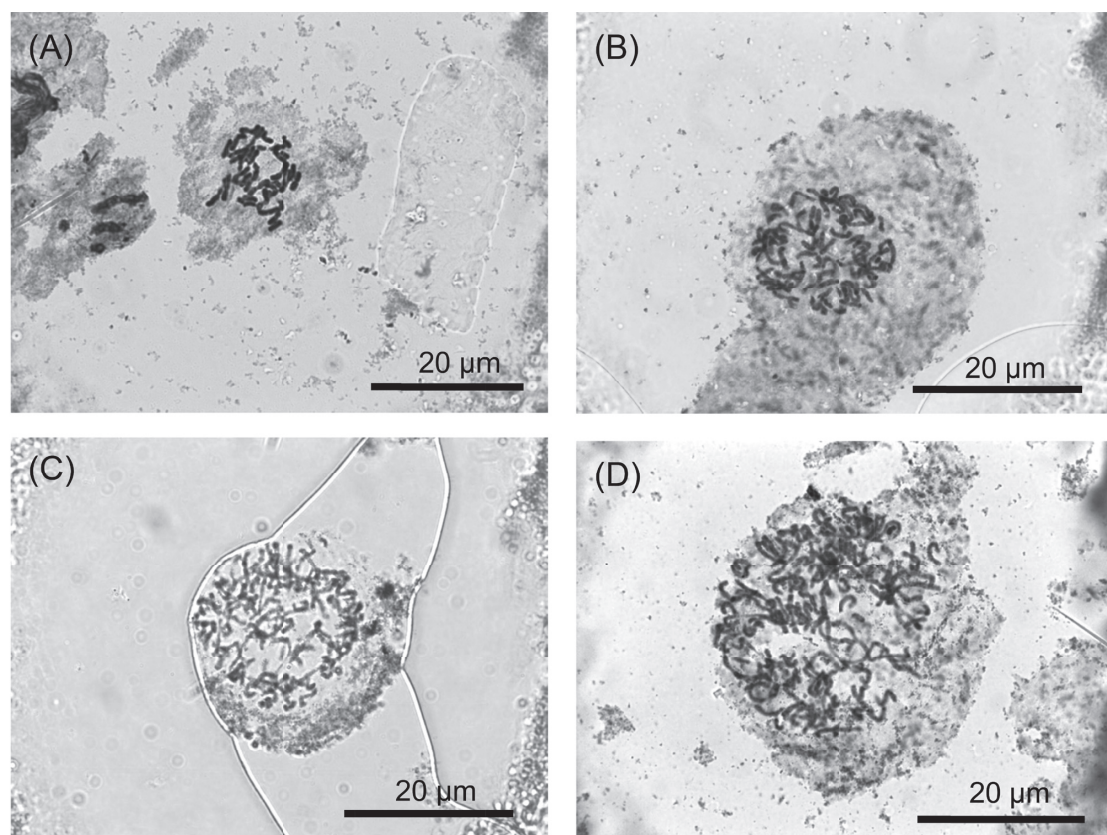


圖 3. 藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 各種倍體數之瓶內苗株其根尖染色體染色分析 (A) $2n = 2x = 38$ 、(B) $2n = 4x = 76$ 、(C) $2n = 6x = 114$ 和 (D) $2n = 8x = 152$ 。

Fig. 3. Squash staining in root tip chromosomes of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* with chromosome number of (A) $2n = 2x = 38$, (B) $2n = 4x = 76$, (C) $2n = 6x = 114$, and (D) $2n = 8x = 152$.

表 2. 比較 2 倍體藍紫色原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 與誘導所得之 4 倍體植株之園藝性狀。

Table 2. Comparison on horticultural traits between diploid and tetraploid plants of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*^z.

Ploidy	Flower diameter (cm)	Stalk length (cm)	Stalk diameter (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Ovary length (cm)	Ovary width (mm)	Capsule length (cm)	Capsule width (cm)
Diploid	2.4 ± 0.0 b ^y	46.5 ± 2.6 a	2.6 ± 0.0 b	14.7 ± 0.7 a	2.3 ± 0.1 b	1.8 ± 0.2 b	1.6 ± 0.0 b	2.4 ± 0.1 b	0.7 ± 0.0 b
Tetraploid	3.0 ± 0.0 a	38.4 ± 2.1 b	3.1 ± 0.1 a	12.2 ± 0.8 b	3.5 ± 0.1 a	2.0 ± 0.1 a	2.0 ± 0.0 a	3.2 ± 0.1 a	0.9 ± 0.0 a

^z Diploid and tetraploid plants were cultivated in a pad and fan green house for 60 wk, and 7 of diploid and tetraploid plants which flowering at the same time were used for horticultural traits investigation. Stalk length did not include inflorescence length, stalk diameter was measured in the third section of stalk, leaf length and width were measured in the largest leaf, and seed capsule length and width (not include gynophore) were measured 12 wk after pollination.

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

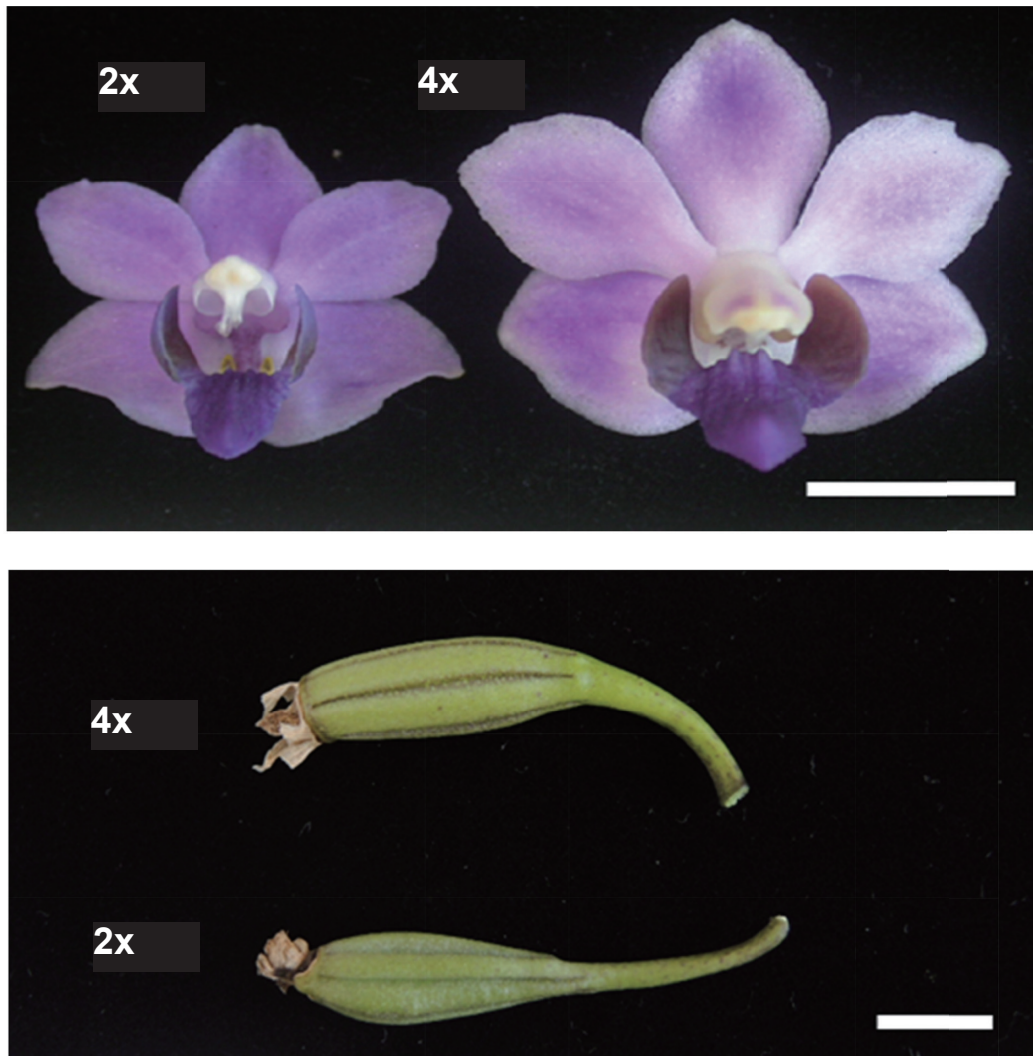


圖 4. 藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea* 2 倍體與 4 倍體植株之花朵與果莢之形態。

Fig. 4. Flower and capsule traits of diploid and tetraploid plants of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*. Bar = 1 cm.

節培植體 6 d，其多倍體誘導率雖可達 100%，但僅得 2 株成活植株，而以 6.25 mM 秋水仙素處理，芽體繼代後皆褐化死亡。Blasco *et al.* (2015) 分別以 0.01–0.05% 秋水仙素處理枇杷瓶苗莖頂 1–3 d，多倍體誘導效果最佳，可獲得最多 43 株多倍體苗株，其次為以 0.1% 秋水仙素處理整株小苗 15–60 min，可獲得 16 株多倍體，而以 0.1–0.5% 秋水仙素處理未發芽之枇杷種子 1–2 d 效果最差，僅得 8 株多倍體。

本研究以藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcher-*

rima fma. *coerulea* 之原球體為材料，以秋水仙素 (0.1、0.5、2.5 mM) 處理 1 d 有最高的存活率 (85.5–93.3%)，隨著秋水仙素處理濃度與天數的增加，存活率略降至 69.6–72.5%，但可誘導出多倍體 (3x、4x、6x、8x) 的比率提升，可達 46%。觀察秋水仙素處理原球體後續之生長與分化情形，發現以 0.1 mM 秋水仙素處理 8 d 原球體之生長與分化受抑制，隨著處理濃度的增加 (0.5 mM 及 2.5 mM 秋水仙素處理 8 d)，原球體生長與分化受抑制之情形更為明顯，植株生長

緩慢，且存活率有下降的趨勢，顯示出培植體、秋水仙素濃度及處理時間必須適當配合方能提高多倍體之誘導效率。

除了以秋水仙素、歐拉靈 (oryzalin)、三福林 (trifluralin) 等抗微管藥劑可誘導多倍體外 (Hsia *et al.* 2010; Talebi *et al.* 2017)，亦可以物理方式促進多倍體的誘導，Chen *et al.* (2009) 利用原生種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* 原球體中所發現之內生性染色體多倍化現象，以物理切割原球體的方式，將 3–5 mm 大小的原球體均等份水平切割為片狀培植體，於固體培養基中誘導長出具有多倍化的擬原球體，此法可避免藥劑處理對培植體生長產生抑制之現象。

本研究除了以流式細胞儀進行染色體之倍體數分析之外，亦利用根尖染色進行染色體分析，除了 3 倍體植株因瓶苗汙染與苗株死亡而無法進行染色體分析外，其餘之多倍體數植株皆可觀察到染色體。然而 6 倍體與 8 倍體植株的染色體收縮程度不夠，不易觀察到清楚的染色體影像，因此染色體之計數難以進行。推測可能因多倍體材料體型較大，根尖也較粗，造成分析過程中組織難以分散，細胞聚集堆疊的結果造成染色體較不易被分散，造成樣品不易觀察。可藉由藥劑濃度、前處理時間及加長根尖在鹽酸溶液中的軟化時間，或提高鹽酸濃度的調整，加以改進 (Kuo *et al.* 2005)。流式細胞儀與根尖染色體分析方法相較，前者是較為簡易快速之多倍體鑑別方法，尤其在樣品數眾多時，流式細胞儀的使用可節省許多的人力、時間，並提高鑑別之正確度。

本研究針對已開花之 4 倍體植株與對照組 (2 倍體) 植株之園藝性狀進行比較，結果顯示 4 倍體植株具有較大的花徑、果莢、梗徑與子房徑、葉片寬短、花梗較短及花朵質地厚實堅挺等特性，與 Osborn *et al.* (2003)、Griesbach (1981, 1985)、Chen *et al.* (2009) 等研究結果所顯示出之多倍體化可以增大植物器官、改善花徑、花形、花朵質地與花序長度等園藝性狀的結果相似。至於多倍體是否可克服雜交不親和性方面，未來將更進一步以雜交方式進行測試。

綜合本研究之結果顯示，雖然以 2.5 mM 秋

水仙素處理原球體 8 d 可獲得較高的 4 倍體誘導率 (40%)，但原球體生長與分化受抑制之情形明顯，植株生長緩慢；但以 0.1 mM 秋水仙素處理 8 d 之 4 倍體誘導率亦可達 40% 左右，雖然多倍體誘導率與存活率於二處理間皆無顯著差異。惟後者原球體生長與分化受抑制之情形，較 2.5 mM 秋水仙素處理 8 d 者輕微，且原球體生長較正常與快速。因此，建議以 0.1 mM 秋水仙素處理藍紫色原生種蝴蝶蘭 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 原球體 8 d，作為多倍體誘導處理組合，對於培植體的存活率與生長之影響較小，並可得到數量較多與品質較佳的多倍體植株。

誌謝

本研究承國立高雄大學生命科學系鄧澄欣前博士後研究員、陳文輝博士指導流式細胞儀分析技術與蝴蝶蘭對照材料提供，本所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助論文審閱與校正，台南區農業改良場徐淑菁前助理研究員、張滄榮前助理研究員協助指導根尖染色體染色分析技術，以及李芸嫣前計畫助理協助執行染色體分析工作，特此致謝。

引用文獻

- Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci. Hortic.* 88:277–287.
- Arends, J. C. 1970. Cytological observations on genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 41:88–100.
- Azmi, T. K. K., D. Sukma, S. A. Aziz, and M. Syukur. 2016. Polyploidy induction of moth orchid [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume] by colchicine treatment on pollinated flowers. *J. Agric. Sci.* 11:62–130.
- Blasco, M., M. L. Badenes, and M. M. Naval. 2015. Polyploid induction via colchicine treatment in loquat. *Acta Hort.* 1092:43–47.
- Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. N. Roy, and S. M. H. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep.* 17:799–803.
- 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 Tiss. Org. 98:229–238.
- Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*: A Monograph. Timber Press. Portland, OR. 330 pp.
- Griesbach, R. J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell Tiss. Org. 1:103–107.
- Griesbach, R. J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. J. Hered. 76:74–75.
- Griesbach, R. J. 2005. A scientific approach to breeding blue orchids: Exploring new frontiers in search of elusive flower colors. Orchids 74:376–379.
- 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. (in Chinese with English 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. (in Chinese with English abstract)
- Kuo, H. L., C. I. Ke, Y. S. Chen, S. W. Chin, and F. C. Chen. 2005. Study on root tip squash and staining techniques of *Phalaenopsis* orchids. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 51:339–346. (in Chinese with English abstract)
- Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, H. S. 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.
- Tsao, C. Y. 2013. Blue flower breeding of *Phalaenopsis*. p.78–85. in: Proceeding of Symposium on Orchid Breeding in Taiwan. October 23, 2013. Taichung, Taiwan. Taiwan Orchid Breeders Soc. Pub., Changhua, Taiwan. (in Chinese)
- Talebi, S. F., M. J. Saharkhiz, M. J. Kermani, Y. Sharafi, and F. R. Fard. 2017. Effect of different antimetabolic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). Caryologia 70:184–193.
- Wang, Y. T. 2004. Flourishing market for potted orchid. Flower Tech. 7:2–5.

Effects of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction Using Protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*

Chin-Yi Tsao¹, Uei-Chern Chen¹, Rung-Yi Wu², Tzu-Ying Wu³, and Chi-Ni Hsia^{4,*}

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, R. Y. Wu, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2018. Effects of colchicine treatments on polyploidy induction using protocorm of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*. J. Taiwan Agric. Res. 67(3):247–257.

Effects of colchicine concentration and exposure time on polyploidy induction, using 6-wk-old protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*, were conducted in this study. Ploidy levels of seedlings derived from colchicine treatments were analyzed by flow cytometry and chromosome counting of root tips. Results showed that the highest survival rates of 85.5–93.3% were found on protocorms exposed with various concentrations of colchicine for 1 d. It was found that survival rate decreased along with colchicine exposure time. In addition, both factors of colchicine concentration and exposure time had significant interaction on survival rate of protocorms. Both 0.1 mM colchicine for 1 d and 2.5 mM colchicine for 8 d had the highest polyploidy induction rates of 43.9% and 46.0%, respectively. However, a better growth of protocorms as well as plantlet development was observed from the former treatment. Comparison on horticultural traits of diploid and tetraploid plants showed that tetraploid with larger flowers and seed capsules, thicker diameter of stalk and ovary, shorter length of leaf and stalk, and thicker texture of petal were observed. Although tetraploid plants show better horticultural traits than that of diploid plants, their hybridization affinity needs more cross investigations for further information.

Key words: *Phalaenopsis*, Protocorm, Colchicine, Polyploidy, Flow cytometry.

Received: August 15, 2017; Accepted: December 17, 2017.

* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin, Taiwan, ROC.

³ Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.