

扇形文心蘭誘變育種

林 依 潔¹⁾ 鄭 雅 銘²⁾ 張 正³⁾

關鍵字：扇形文心蘭、秋水仙鹼、多倍體、流式細胞儀、非整倍體

摘要：扇形文心蘭在植物分類上隸屬於文心蘭亞族，具有短幼年期，可在試管內開花的特性，合適進行組織培養誘變育種。將扇形文心蘭類原球培養於添加 0.5% 與 1% 秋水仙鹼培養基中 4 天，多倍體株誘導率最高。扇形文心蘭多倍體成熟植株的植株厚度、最大葉片厚度和最大根直徑皆較二倍體植株厚，並可使用做為早期篩選標的性狀。多倍體植株染色體觀察，結果顯示同時有整倍體株、非整倍體株及嵌合體株，多倍體株間染色體數有差異，同一個根尖樣品的染色體數也不同。多倍體株花色呈深黃色，花型呈現差異，花萼及側花瓣較為圓寬，柱頭與花粉粒皆增大。從誘變株中挑選出具觀賞或研究價值單株可供日後使用。

前 言

扇形文心蘭為文心蘭亞族 (Oncidiinae) 原生種蘭花，是文心蘭近緣屬物種，株高 4-8 公分，無假球莖，為單軸的短縮莖，開花習性屬續花形，花色為黃色 (Baker and Baker, 2006)。扇形文心蘭學名經多次分類訂正及更名，已從文心蘭屬移出，學名為 *Erycina pusilla* (L.) Williams et al. (Williams *et al.*, 2001)。扇形文心蘭具有幼年期短，於蘭科植物中有最少的染色體數 $2n = 12$ (Félix and Guerra, 2000) 和基因組小 $1c = 1.5$ pg (Chase *et al.*, 2005) 等特性。

扇形文心蘭花色以黃色為主，若要做為一個商品則需增加其多樣性。而扇形文心蘭和其他文心蘭屬雜交具有雜交障礙，扇形文心蘭與文心蘭亞族間各成員授粉親合性差異極大，其中與屬間雜交種的親合性最低、與劍葉文心蘭的各品種親合性較高 (劉等, 2011)。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學農藝學系副教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

故本研究希望藉由誘變育種提高觀賞價值，並將其所誘導的多倍體株做為育種親本與異屬文心蘭進行雜交育種。

在植物進化史上，多倍體化為演化動力之一，可增大花朵及果實、延長開花期、克服雜交障礙、恢復稔性 (Dunn and Lindstrom, 2007)、增加對病蟲害及環境逆境的抗性等 (Comai, 2005)、提高花粉活力 (Kermani *et al*, 2003)。Griesbach (1981) 提及白花蝴蝶蘭於多倍體化後，確實在其花朵大小及形狀上產生改變。

在多倍體育種中，已知有許多會影響有絲分裂的化學藥劑，如秋水仙鹼、氮磺靈、nitrous oxide (N₂O) 等，而秋水仙鹼是最常用且使用最久的誘變劑，故本試驗藉由秋水仙鹼來誘導多倍體植株。

材料與方法

一、秋水仙鹼化學誘變

1. 植物材料

以扇形文心蘭營養系 psyp-h1 之類原球體增殖系統為植物材料，類原球體繼代到類原球體增殖培養基中，待有小苗形成時，則將小苗繼代到成苗培養基。

2. 培養基組成及製備

類原球體增殖培養基：1/2 MS 無機鹽類 (Murashige and Skoog, 1962; NH₄NO₃ 為 206.25 ppm、KNO₃ 為 237.5 ppm, FeSO₄ · 7H₂O、Na₂-EDTA 及維生素為全量)、100 mg L⁻¹ 肌醇 (Sigma)、170 mg L⁻¹ NaH₂PO₄、6 g L⁻¹ Potato powder (Technology LaboratoriesTM)、1 g L⁻¹ 蛋白脲 (Sigma)、150 ml L⁻¹ 椰子水、20 g L⁻¹ Sucrose、1 g L⁻¹ Activated charcoal、8 g L⁻¹ Agar，滅菌前 pH 值調整為 5.2。

小苗定植成苗培養基：1/2 MS 無機鹽類 (Murashige and Skoog, 1962; FeSO₄ · 7H₂O、Na₂-EDTA 及維生素為全量)、100 mg L⁻¹ 肌醇 (Sigma)、170 mg L⁻¹ NaH₂PO₄、1 g L⁻¹ 蛋白脲 (Sigma)、150 ml L⁻¹ 椰子水、20 g L⁻¹ Sucrose、1 g L⁻¹ Activated charcoal、8 g L⁻¹ Agar，pH 值於滅菌前調整為 5.2。培養基以 121°C、1.2 kg cm⁻² 經高溫高壓滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

3. 培養容器與培養環境

類原球體培養於 9 公分無菌塑膠培養皿 (αplus, 臺灣)，再以石蠟膜 (parafilm) 封口。小苗培養於容積 617 ml 之蘭花瓶中，每瓶添加 100 ml 培養基。培養於溫度 25 ± 2°C，光週期 12 小時之環境，不論是對照組或處理組的類原球體均培養於散射光線床架，光強度為 5.6 μmol m⁻² s⁻¹；待類原球體形成為小苗後，則培養於光強度為 56 μmol m⁻² s⁻¹ 之床架。

4. 秋水仙鹼固體培養試驗

將扇形文心蘭類原球體置於含有 0、0.5% 及 1% 秋水仙鹼之類原球體固體培養基，處理 1、2 及 4 天，處理完後再繼代到未添加誘變劑的類原球體固體培養皿中繼續培養。每

培養皿接種 5 團類原球體 (每團約 20 個類原球體)，每處理共 3 重複，於處理完後 2 週計算類原球體褐化率。

二、早期篩選

經 1% 秋水仙鹼處理 4 天後的再生植株，於培養 4 個月後進行早期篩選，分出大、中、小級(高薄、中高中厚、矮厚)後再培養 1 個月，之後每級各隨機挑選 3 棵植株藉由流式細胞儀測定基因組大小，確定早期篩選出的小級植株為多倍體。

檢測基因組大小時，取扇形文心蘭及標準品水稻各 0.5 g 葉片，放入培養皿中，並加入 200 μ l CyStain Extraction buffer 後，以刀片切碎葉片，再加入 1 ml 的 PI 螢光染劑 (CyStain PI Absolut P, 05-5022，包含 125 ml Extraction buffer，500 ml Staining buffer，2 \times 1.5 ml propidium iodide solution，1 \times 5 mg RNase A)，混合後經 30 μ m 孔徑之尼龍濾網過濾至 1.5 ml 分析管中，避光置於冰上。試管內包含待測樣品及標準品水稻，以流式細胞儀 (Elite ESP, Beckman and Coulter Inc., Hong Kong) 分析基因組大小。

基因組大小計算：檢測樣品 (X Mean) / 標準品 (X Mean) \times 標準品基因組含量 / 倍數體 = 單套樣品之基因組含量 (pg)。標準樣品之基因組含量為水稻 2C = 1 pg。

三、多倍體株檢定

1. 染色體觀察

於早上 9-11 點間取扇形文心蘭二倍體和多倍體新生根尖約 0.5 mm 長，於 25 $^{\circ}$ C、黑暗下以預處理液 BrNa (0.2% bromonaphathelene，0.25% DMSO 及 99.55% 無菌水) 進行預處理 4-5 小時，之後於 4 $^{\circ}$ C 下以新鮮配置之固定液 (乙醇：醋酸 = 3：1) 固定隔夜。移除固定液，以 1 N HCl 浸泡根尖 10 分鐘，再置於 60 $^{\circ}$ C 乾浴鍋中 10 分鐘，移除 1N HCl，以 RO 水(逆滲透水) 清洗兩次，移除 RO 水。每管分注 50 μ l Feülgen，使根尖浸泡於 Feülgen 中 1 小時 (室溫下避光)。之後移除 Feülgen，以 1% pectinase 浸泡 1 小時 (室溫下避光)。根尖經醋酸洋紅染色並搗碎，進行壓片於顯微鏡 (Olympus BX50) 下觀察。

2. 性狀檢定

隨機取株齡 9 個月以上的對照組及多倍體株各 30 株進行性狀調查，項目包括株高、株幅、最大葉長、植株厚度、最大根直徑等。取 10 朵對照組之花朵及 2 朵多倍體花朵調查花朵性狀，包括花朵長、寬，側花瓣長、寬，上花萼長、寬及蕊柱寬度等性狀。

3. 統計分析

試驗設計採用完全隨機區集設計，數據經由 SAS 軟體 (SAS Institute, Cary NC., USA) 的 ANOVA (Analysis of Variance) 進行統計分析，每處理間的平均值在 5% 的顯著性水平下，利用 Fisher's LSD 多重範圍進行比較。

結 果

一、秋水仙鹼化學誘變

扇形文心蘭類原球體經不同秋水仙鹼濃度處理不同天數的試驗結果顯示，隨著秋水仙鹼濃度從 0.5% 提高到 1% 及處理時間從 1 天延長到 4 天，褐化率也隨之提高，以 0.5% 秋水仙鹼處理 4 天及 1% 秋水仙鹼處理 2 天和 4 天的褐化率較高，而擬多倍體誘導率也隨著處理時間及濃度的提高而增加，以 0.5% 秋水仙鹼和 1% 秋水仙鹼處理 4 天，分別有最高的擬多倍體誘導率 46.8% 和 46% (表 1)。

二、早期篩選多倍體株

扇形文心蘭之類原球體經 1% 秋水仙鹼處理 4 天後，於培養 4 個月後分成大、中、小三級，再培養 1 個月，調查株高、株幅等植株性狀後，每級隨機挑選 3 株進行基因組大小測定。從性狀調查結果歸納出，第三級-小 (矮厚) 的植株有株高最矮、植株厚度最厚、最大葉片厚度最厚及最大的根直徑等外表性狀特性 (表 2)。進行基因組大小檢測時，水稻的

表 1. 扇形文心蘭類原球體經秋水仙鹼固體培養之褐化率及擬多倍體株誘導率

Table 1. Browning rate and suspected polyploidy of colchicine treatments of *Erycina pusilla*

Conc. (%)	Duration (days)	Browning rate (%)	Suspected polyploidy (%)
0	1	4.8c ^z	0d ^z
0	2	5.2c	0d
0	4	1.3c	0d
0.5	1	1.3c	15.8cd
0.5	2	15.7b	31.0abc
0.5	4	29.1a	46.8a
1.0	1	8.1bc	18.2bc
1.0	2	29.1a	33.1ab
1.0	4	38.7a	46a
Conc.		*** ^y	***
Duration		***	**
Conc.* Duration		***	Ns

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

^yNs, **, *** mean nonsignificant or significant difference at $p > 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively.

數據在所有的圖中皆為 R11，而待檢測樣品則是第一根峰 (R12) 之 Mean 值，再帶入公式計算。扇形文心蘭二倍體基因組為 2.855 pg/2c (圖 1a); B-2 的基因組為 2.944 pg/2c (圖 1b)，推測為二倍體；M-3 基因組為 6.15 pg (圖 1c)，為二倍體基因組的 2.2 倍，倍體數略大於四倍體，推測為非整倍體；S-2 基因組為 11.17 pg (圖 1d)，為二倍體基因組的 3.9 倍，推測為八倍體。檢測結果發現大級樣品中，3 株中有一株為四倍體，多倍體率為 33.3%；而中級樣品中，有四倍體及非整倍體的現象，多倍體率為 100%；小級樣品倍體數皆為四倍體以上，多倍體率為 100% (表 2)。

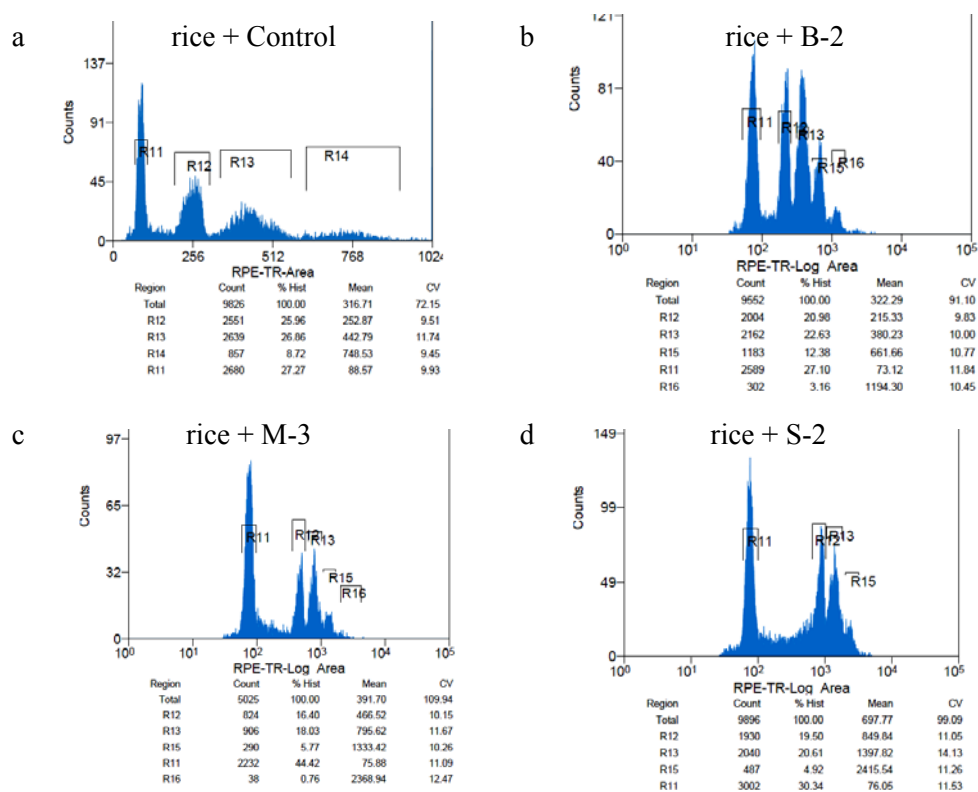


圖 1. 扇形文心蘭以流式細胞儀進行基因組大小的測定。

水稻標準品 R11，(a) rice + Control (二倍體)，(b) rice + B-2 (大級)，(c) rice + M-3 (中級)，(d) rice + S-2 (小級)。

Fig. 1. Measuring the genome size by flow cytometry. Rice is the standar (R11), (a) rice+ Control, (b) rice+B-2(the 'Big' grade), (c) rice+M-3(the 'Medium' grade), (d) rice+S-2(the 'Small' grade).

表 2. 扇形文心蘭類原球體經 1% 秋水仙鹼處理 4 天後分級植株之性狀及多倍體率

Table 2. The characters of plant and polyploid rate after graded of 1% colchicine treatments for 4 days on PLBs of *Erycina pusilla*

Grade ^y	Plant height ^z (mm)	Plant width (mm)	Plant thickness (mm)	Maximum thickness of blade (mm)	Maximum width of blade (mm)	Maximum diameter of root (mm)	Polyploidy (%) ^x
Control	31.23 ± 1.89 a	24.68 ± 2.22 a	1.77 ± 0.14 b	1.10 ± 0.08 b	5.74 ± 0.24 a	0.98 ± 0.06 b	0
Big	26.28 ± 1.96 b	21.49 ± 2.15 ab	1.6 ± 0.11 b	0.84 ± 0.03 c	5.06 ± 0.26 ab	0.98 ± 0.05 b	33.3
Medium	18.77 ± 0.94 c	16.32 ± 1.49 bc	1.00 ± 0.07 c	0.74 ± 0.06 c	3.50 ± 0.27 c	0.78 ± 0.03 c	100
Small	14.12 ± 1.15 d	13.57 ± 1.80 c	2.30 ± 0.16 a	1.69 ± 0.10 a	4.45 ± 0.54 bc	1.17 ± 0.06 a	100

Plant are graded as 'Big', 'Medium', and 'Small' followed by early screening after treatment of 1% colchicine for 4 days.

^zIn the column with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by LSD test. Each data was meaned ± S.E. of 9 replicates.

^y 5 plants were investigated per grade.

^x 3 plants were used for measuring the genome size by flow cytometry. One sample of each grade was used to run the flow analysis.

三、多倍體株性狀調查

二倍體和多倍體扇形文心蘭的成熟株進行性狀比較，在株高、株幅上二倍體較多倍體植株高、寬，在根數、葉數和花梗數上也較多倍體植株多，多倍體在植株厚度、最大葉片厚度和最大根直徑明顯地較二倍體植株厚（表 3），這和在早期篩選歸納出的小級（矮厚）植株之株高最矮、有最厚之植株厚度和最大葉片厚度及最大根直徑的結果相符。

多倍體株之花朵，花色呈現深黃色，花萼及側花瓣變成較為圓寬（圖 2-a），且多倍體花朵和二倍體相比柱頭增大。比較二倍體和多倍體株的花朵性狀（表 3），多倍體株蕊柱寬度為 4.8 mm，二倍體株為 3.7 mm；多倍體株上花萼長、寬為 5.5、4.0 mm，二倍體為 5.7、3.7 mm；多倍體側花瓣長、寬為 6.6、4.9 mm，二倍體株為 7.6、4.0 mm。從上花萼及側花瓣長、寬的數據顯示，多倍體株上花萼及側花瓣的長、寬比例較二倍體圓寬；而多倍體花朵長、寬為 19.7 mm、15.5 mm，二倍體的花長、寬為 22.3 mm、16.1 mm，顯示多倍體株的花朵並沒有比二倍體株大。

調查二倍體花粉粒的長、寬為 14.78、14.10 μm ，多倍體株為 23.96、21.85 μm ，兩者間具有顯著差異。將二倍體和多倍體各取株齡約 10 個月的植株四株進行葉綠素測定，檢測結果為單位面積的葉綠 a、葉綠素 b 及葉綠素 a + b 含量，多倍體株都顯著高於二倍體株，多倍體株葉綠素 a、葉綠素 b 及葉綠素 a + b 含量分別為 32.59、16.56、49.10 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ，二倍體株為 14.72、7.75、22.44 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ 。

除了觀察到多倍體株外，也觀察到一些變異株，從中挑出扇形文心蘭三唇瓣株（圖 2-b、c）、扇形文心蘭棒狀葉株（圖 2-d）等。可見秋水仙鹼除了造成染色體數變異外，也會有誘變植株造成基因突變的效果，進而造成植株性狀改變。

經染色體觀察，對照於非誘變株染色體數 ($2n = 2x = 12$)，誘變多倍體植株染色體數具有高度歧異，具有整倍體的 $2n = 24$ 、 $2n = 36$ 、 $2n = 48$ ，及非整倍性的染色體數（圖 3，表 4）。

觀察 10 株多倍體誘變株染色體數，結果顯示（表 4），同一誘變株的根尖細胞卻有不同的染色體數，顯示出有鑲嵌現象，每個根尖樣品彼此間所含的染色體數也不相同。以第一個樣品為例，株齡是 7 個月，此樣品觀察到的細胞數為 7 個，其中有 2 個細胞的染色體數為 44 條，有 1 個細胞觀察到 48 條的染色體，為整倍體的扇形文心蘭 ($2n = 8x = 48$)，有 1 個細胞內有 46 條染色體，依序表示之。而第二個樣品，株齡同樣是 7 個月，但此樣品內含的染色體數與第一個樣品不同，各有 2 個細胞觀察到 41 條和 39 條染色體，也觀察到 1 個含有整倍體 48 條染色體的細胞，都各觀察到 1 個細胞內各包含 47、43、40、38 或 32 條染色體。而第一和第二個樣品又是經相同秋水仙鹼處理組合，且於同一天進行觀察（數據未顯示），可知雖然同一批培植體經過同樣的處理程序，染色體也會有不一樣變化。

表 3. 扇形文心蘭二倍體和多倍體成熟植株進行植株及花朵性狀比較

Table 3. Comparison of the plant and flower characters between mature plants of diploidy and polyploidy

Ploidy ^z	Height of plant ^y (mm)	Thickness Of plant (mm)	Maximum diameter of root (mm)	No. of roots	No. of stalks	Width of column (mm)	Length of upper sepal (mm)	Width of		Length of		Width of	
								upper sepal	sepal(mm)	lateral	petal(mm)	lateral	petal(mm)
Diploid	39.00 a	2.27 b	0.96 b	10.53 a	1.27 a	3.7 ± 0.3 ^y	5.7 ± 0.3 ^y	3.7 ± 0.3 ^y	7.6 ± 0.3 ^y	4.0 ± 0.3 ^y			
Polyploid	24.07 b	3.75 a	1.35 a	6.87 b	0.10 b	4.8 ± 0.3 ^x	5.5 ± 0.8 ^x	4.0 ± 1.7 ^x	6.6 ± 0.4 ^x	4.9 ± 0.3 ^x			

^z 30 plants were measured per ploidy. In the column with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by LSD test.

^yThe averages were from measuring 10 flowers of diploidy. Data was meaned ± S.E. of 10 replicates.

^xThe averages were from measuring 2 flowers of polyploidy. Data was meaned ± S.E. of 2 replicates.

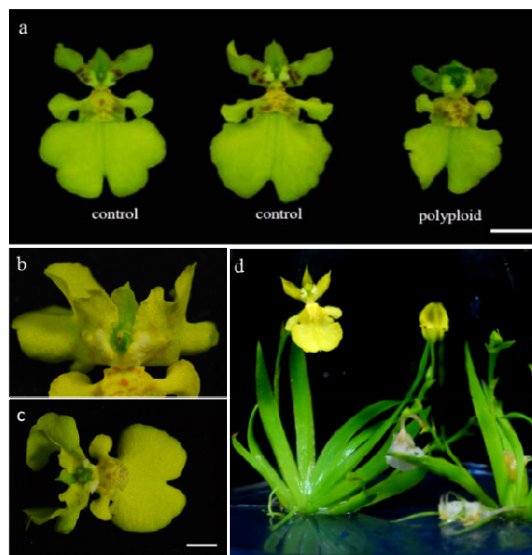


圖 2. 扇形文心蘭經秋水仙鹼處理後之花朵 (a) 扇形文心蘭多倍體和二倍體之花朵比較，(b、c) 三唇瓣株，(d) 扇形文心蘭棒狀葉株。

Fig. 2. Flowers of treatments of colchicine of *Erycina pusilla*. (a) Flowers of diploidy (control) and polyploidy, (b) flowers of *Erycina pusilla* mutant (c) plant type of cylindrical leaves of *Erycina pusilla*. Bar = 0.5 cm.

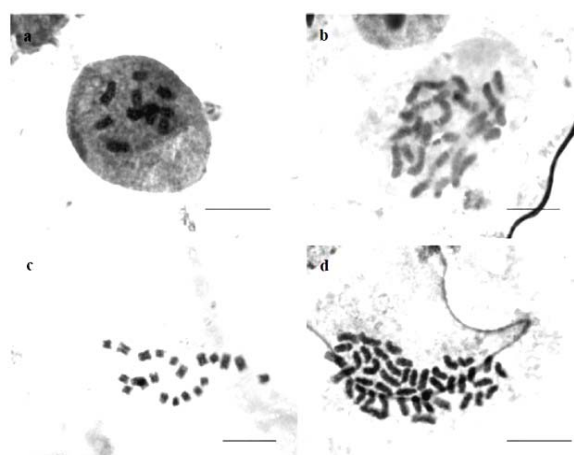


圖 3. 扇形文心蘭染色體觀察。

(a) 扇形文心蘭二倍體 $2n = 2x = 12$ ，(b) 四倍體 $2n = 4x = 24$ ，(c, d) 非整倍體的扇形文心蘭，(c) $2n = 21$ 和(d) $2n = 43$ 。(Bar = 10 μm .)

Fig. 3. Chromosome observation of *Erycina pusilla*. (a) Diploidy of *Erycina pusilla*, $2n = 2x = 12$, (b) tetraploidy, $2n = 4x = 24$, (c, d) aneuploidy, (c) $2n = 21$, and (d) $2n = 43$. Bar = 10 μm .

表4. 扇形文心蘭多倍體株染色體觀察

Table4. Chromosome observation of polyploidy in *Erycina pusilla*

Number	Plant age (month)	Cell numbers observed	Chromosome numbers (number of cells)
1	7	7	44 (2), 48 ^a (1), 46 (1), 42 (1), 39 (1), 25 (1)
2	7	10	41 (2), 39 (2), 48 ^a (1), 47 (1), 43 (1), 40 (1), 38 (1), 32 (1)
3	9	5	43 (3), 22 (2)
4	9	10	37 (6), 44 (1), 41 (1), 31 (1), 28 (1)
5	9	12	41 (4), 36 ^a (2), 46 (2), 33 (2), 48 (1), 30 (1)
6	9	14	47 (4), 29 (2), 27 (2), 36 ^a (1), 49 (1), 43 (1), 31 (1), 28 (1), 21 (1)
7	10	7	28 (5), 29 (1), 22 (1)
8	10	6	36 ^a (3), 45 (1), 41 (1), 39 (1)
9	10	9	22 (3), 24 ^a (2), 32 (1), 28 (1), 27 (1), 23 (1)
10	10	10	43 (2), 40 (2), 38 (2), 36 ^a (1), 58 (1), 42 (1), 41 (1)

^aEuploidy, 2n = 24, 36 or 48.

討 論

扇形文心蘭的類原球體經化學誘變後，隨著處理時間增加，會再從四倍體誘變成八倍體，Griesbach (1981) 提到蝴蝶蘭類原球體經秋水仙鹼振盪培養後，約有 46% 類原球體可產生四倍體株，2% 能產生八倍體，顯示蘭科植物的類原球體是可用來做為誘導多倍體的材料。蘭科植物雖有內生多倍性的特性，但蘭花內多倍化的作用及其意義則是鮮為人知。Chen *et al.* (2011) 指出台灣白花蝴蝶蘭以流式細胞儀檢測其內生多倍性，結果在不同部位和不同成熟度的細胞都有差異，就連蘭根也有內生多倍性的現象，而栽培環境的不同也會造成內生多倍性峰間 DNA 含量的改變。蘭花之內生多倍性特性是否也會與化學誘變有所交感，進而使二倍體蘭花在經化學誘變後出現八倍體，是值得探討的。

流式細胞儀分析確實具有快速、方便、檢測時間短等優點 (邱等, 2010)，此試驗中，經由化學誘變處理過後的誘變株，充滿許多不確定性，例如：非整倍性、倍體數變小，以測定基因組大小的方式，既能得知樣品的基因組的大小，也能就植株的外表型和基因組大小進行後續的推估。

植物經化學誘變處理後，可能會有染色體斷裂或是染色體複製後於分裂時出現異常，例如非整倍體和嵌合體等情形產生，Luckett (1989) 提到棉花經秋水仙鹼誘導後，產生不育、生長異常、染色體損失或重排和基因突變等副作用。在本試驗中也確實在染色體觀察時發現有非整倍體和嵌合體的現象。

非整倍體在許多植物中也曾被觀察到 (Bianco *et al.*, 1991)，或是不同倍體進行雜交時，子代易有非整倍體產生 (Chable *et al.*, 2009; Makarevitch and Harris, 2010)。所以，經由化學誘變後所得之扇形文心蘭非整倍體株，在花型與株型等型態上與正常二倍體植株相比，可能會出現差異，至於在基因表達的量與質上是否有改變，還需進一步研究才能得知。

目前蘭科作物已進行多倍體化的有蕙蘭 (尹等, 2010)、蝴蝶蘭 (Griesbach, 1981; Chen *et al.*, 2011)、文心蘭 (崔等, 2010) 等，而尹等 (2010) 進行蕙蘭雜交種 (雜交蘭'韓國桃花' × 九華) 四倍體誘導，指出由於雜交蘭從組培苗到開花需要 2-3 年，而染色體加倍後，生長緩慢，通常需更多時間來達到開花。本試驗從扇形文心蘭類原球體經化學誘變誘導出多倍體株並開花，最快只需 11 個月，此結果在蘭科植物中實屬難得，也證明扇形文心蘭的生長周期短，對於研究來說是很好的蘭科模式植物。

誌 謝

本試驗承蒙中央研究院植物暨微生物研究所助理黃素馨小姐在流式細胞儀檢測的協助及植微所科學儀器中心提供流式細胞儀核心設施的技術支持，並感謝園藝學系林慧玲老師在葉綠素測定的協助，特致謝意。

參考文獻

- 尹翠翠、張燕、張景華、陳瑤瑤、王廣東。2010。秋水仙素誘導雜交蘭四倍體及倍性鑑定。核農學報 24 (3): 518-521。
- 邱輝龍、陳榮芳、許圳塗、張滄萊。2010。台灣芭蕉倍數性的研究。台灣農業研究 59 (2): 78-85。
- 崔廣榮、張子學、張從宇、胡能兵、隋益虎、李傑勤。2010。文心蘭多倍體誘導及其鑑定。草葉學報 19 (1): 184-190。
- 劉冠廷、邱翊恬、張正。2011。扇形文心蘭與文心蘭亞族成員之屬間雜交。植物種苗 13 (1): 31-39。
- Baker, M. L. and C. O. Baker. 2006. Orchid species culture *Oncidium Odontoglossum* alliance. p. 992, Timber Press, Oregon.
- Bianco, P., S. D'Emérico, P. Medagli, and L. Ruggiero. 1991. Polyploidy and aneuploidy in *Ophrys*, *Orchis*, and *Anacamptis* (Orchidaceae). Plant Syst. Evol. 178: 235-245.
- Chable, V., A. Rival, T. Beule', J. Jahier, F. Eber, V. Cadot, F. Boulineau, A. Salmon, H. Bellis, and M. J. Manzanares-Dauleux. 2009. "Aberrant" plants in cauliflower: 2. Aneuploidy and global DNA methylation. Euphytica 170: 275-287.
- Chase, M. W., L. Hanson, V. A. Albert, W. M. Whitten, and N. H. Williams. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). Ann. Bot. 95: 191-199.
- 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 Sci. 181: 31-38.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. Nat. Rev. Genet. 6 (11): 836-846.
- Dunn, B. L. and J. T. Lindstrom. 2007. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. HortScience 42 (6): 1326-1328.
- Félix, L. P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid* orchids. Genet. Mol. Biol. 23 (4): 957-978.
- Griesbach, R. J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1: 103-107.
- Kermani, M. J., V. Sarasan, 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.
- Luckett, D. J. 1989. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. Euphytica 42 (1-2): 177-182.

- Makarevitch, I. and C. Harris. 2010. Aneuploidy causes tissue-specific qualitative changes in global gene expression patterns in maize. *Plant Physiol.* 152: 927-938.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Williams, N. H., M. W. Chase, T. Fulcher, and W. M. Whitten. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 113-139.

Mutation Breeding of *Erycina pusilla* (L.) Williams et al.

Yi-Chieh Lin¹⁾ Ya-Ming Cheng²⁾ Chen Chang³⁾

Key words: *Erycina pusilla*, polyploidy, colchicine, flow cytometry, aneuploidy

Summary

The plant classification of *Erycina pusilla* was belonging to Oncidiinae, had a short juvenility and *in vitro* flowering characteristics, suitable for mutation breeding by tissue culture. By 4 days treatments of 0.5% or 1% colchicine on PLBs (protocorm like bodies) of *Erycina pusilla*, had the highest rate of suspected polyploidy. The plant thickness, maximum blade thickness and maximum root diameter of the mature polyploids were higher than diploids, and could be used as the subject of early screening traits. Chromosome examination of polyploid plants showed that euploidy, aneuploidy and chimerias. Polyploid chromosome numbers differed between plants, and chromosome number of root tip of the same sample were also different. In addition, polyploid flowers had saturate yellow in color, more round and width in sepals and lateral petals, and increased in length and width of stigma and pollen size. Mutants with ornamental or research value could be selected for future use.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University.

3) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.