

## 雜種石竹'巴陵紫雲'之多倍體化

陳 柏 吟<sup>1)</sup> 潘 怡 君<sup>2)</sup> 陳 彥 銘<sup>3)</sup>

關鍵字：石竹屬、種間雜交、多倍體化、稔性

**摘要：**本試驗以雜種石竹'巴陵紫雲' (*Dianthus japonicus* 'Red Plum' × *D. palinensis*) 為材料，進行瓶外多倍體化與誘變植株之倍數性檢測，並調查誘變植株之花粉發芽率。'巴陵紫雲'以秋水仙素及羊毛脂膏為基質處理腋芽後，以 10 g Kg<sup>-1</sup> 處理一次具有最高芽體存活率 (50%)；然而以棉花作為秋水仙素之沾附基質，以 2 g L<sup>-1</sup> 處理一天具有最高芽體存活率 (40.0%)。經流式細胞儀檢測其倍體數，共可獲得 54 株多倍體誘變株。調查誘變株 (二倍體、四倍體及混倍體) 之性狀，其株高、節間長減少，株型變得緊密，花瓣長度增加，混倍體誘變株 P-M4 花藥能正常釋放花粉，具有 8.53% 花粉發芽率。

### 前 言

石竹屬植物為重要花卉。台灣供做切花用途以香石竹為最多 (1562.3 千把)，其次為日本石竹 (深山櫻) (217.6 千把)、美國石竹 (83.6 千把) 及其他雜種石竹 (農產品批發市場交易行情站, 2017)。香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 為石竹科 (Caryophyllaceae) 石竹屬 (*Dianthus*) 物種。主要分佈在北半球的溫帶和暖溫帶，少數在非洲、大洋洲和南美洲，地中海地區為分佈中心，全世界共計約有 80 餘屬 2000 多種 (Bittrich, 1993)。

現今全球石竹產業呈現萎縮狀態，其主要歸因於瓶插壽命無顯著成長。此外，瓶插壽命亦是切花商業上最重要的特性，決定其品質和滿足消費者喜好。因此，利用具有優良切花壽命之石竹品種作為育種親本，以遺傳育種之策略可以預期突破石竹屬切花瓶插壽命不良之窘境。

褚 (2012) 以 *D. japonicus* 'Red Plum' 與 *D. palinensis* 進行種間雜交，獲得具有長瓶插壽

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
  - 2) 國立中興大學園藝學系助理教授。
  - 3) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

命之種間雜交後代'巴陵紫雲'，然而該優良切花壽命之種間雜交石竹並無稔性，導致育種進程受阻，本試驗藉由瓶外秋水仙素誘變，期望獲得恢復稔性之植株，以作為後續雜交親本。

## 材料與方法

### 一、植物材料

試驗所使用材料為褚 (2012)以 *Dianthus japonicus* 'Red Plum' × *D. palinensis* 之種間雜交後代'巴陵紫雲'，將植株種植於台中市霧峰區-國立中興大學園藝試驗場防雨棚之床架上。採取植物之 2-3 節的頂梢進行扦插繁殖，扦插時亦於基部沾取含 1 g kg<sup>-1</sup> IBA (Indole-3-butyric acid, Sigma Chemical, Mo., U.S.A)滑石粉後，扦插於商用泥炭苔混和介質 BVB 7H (7H PO441389, Bas van Buuren B.V., Coldenhovelaan 10, The Netherlands)的 200 格穴盤中，後置於噴霧插床上，待約 3 週後插穗發根並移出噴霧環境、種植在 2 吋塑膠盆中，介質與扦插時相同。栽培時期每週施用 1 g L<sup>-1</sup> 之 Jack's 水溶性肥料 20-20-20 (Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, USA)3 次，並適時補充 0.2 g L<sup>-1</sup> EDTA 鐵肥 (Dissolvine® E-Fe-13 Chelated Iron Powder 13%, AkzoNobel, The Netherlands)、0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> (Bittersalz, K+S KALI GmbH 34111 Kassel, Germany)，並定期病蟲害防治。

### 二、多倍體誘變

秋水仙素誘變處理方法修改自 Nimura 等人 (2006a)。石竹商業品種'巴陵紫雲'經扦插後移植至 2 吋黑軟盆，栽培 4 週後於試驗前 1 天將頂芽摘除。使用秋水仙素 (Sigma, U.S.A.) 與含有秋水仙素之羊毛脂膏，以評估不同處理方式對誘變效率之影響。秋水仙素之處理於各腋芽上放置棉花球 (直徑 5 mm)，分別處理 0.5、1、2、5、10、15、20 g L<sup>-1</sup> 之不同濃度秋水仙素溶液，處理時機為當日於棉花球上添加 1 ml 之秋水仙素溶液，處理次數為 1 天 2 次或連續 2 天共四次。另一處理為使用含有秋水仙素之羊毛脂膏，其濃度與液體相同。每處理各濃度處理使用 10 株，總處理腋芽數共計 30 個。誘變處理 8 週後調查芽體之存活率，及利用流式細胞儀進行存活芽體之相對 DNA 含量的檢測，並將存活之芽體進行扦插繁殖及栽培。待誘變植株存活後，接著栽培至開花以進行後續植物外表型態調查。

### 三、秋水仙素誘變植株性狀調查與花粉活力檢測

於開花期調查秋水仙素誘變植株株高、節間長、葉長、葉寬、葉長寬比、葉厚、花徑、花瓣長、花瓣寬、花粉發芽率。參考彭 (2007)方法檢測試驗材料之花粉活力。花粉活力測定培養基以 Brewbaker 和 Kwack (1963)為基本配方，培養基每公升含有 0.3 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O、0.1 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.2 g MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 及 0.1 g KNO<sub>3</sub>，另外添加 15% 的蔗糖，並將培養基之 pH 值調整至 6.0。於天氣晴朗時採取當日花藥開放之新鮮花粉，花粉培養於雙凹槽載玻片之液體培養基中，並在底部鋪有加濕紙巾的保鮮盒中以防止培養基之水分散失，培

養放置於溫度設定為 25°C、黑暗環境之恆溫箱 (RI80, Firstek Scientific, Taiwan)。經 2 小時培養後利用光學顯微鏡 (ZEISS HBO 50/AC, Zeiss Axiolab, Germany) 以進行觀察，當花粉管生長的長度超過花粉之直徑兩倍時即視為發芽，並進行花粉發芽率的計算與拍照記錄。試驗之每處理調查 200 粒花粉，每處理 3 重複。

#### 四、秋水仙素誘變植株倍數性調查

相對 DNA 含量檢測方法以原株為標準品，秋水仙素誘變植株與原株同時進行相對 DNA 含量測定，參考 Nimura 等人 (2006a) 方法，取約為 0.25 cm<sup>2</sup> 之葉片，將 0.4 ml nuclei extraction buffer (CyStain ultraviolet Precise P Nuclei Extraction Buffer; Sysmex Partec, Gortitz, Germany) 溶液加入樣品中，使用刀片將樣品均勻剁碎。接著再加入 1.6 ml 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining buffer (Cystain ultraviolet Precise P Staining Buffer; Sysmex Partec, Gortitz, Germany)，與含有葉片殘體之溶液混合均勻，等待一分鐘後，以網目約為 30 μm 之尼龍網 (CellTrics® filter; Sysmex Partec, Gortitz, Germany) 過濾雜質與植物殘體，最終獲得植物染色體純淨之分析樣品液。並使用流式細胞儀 (CyFlow® Ploidy Analyzer, Ploidy Analyzer, Sysmex Partec, Gortitz, Germany) 進行樣品相對 DNA 含量測定。

#### 五、統計分析

試驗採完全隨機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，調查數據藉由 CoStat 6.1 版套裝軟體 (CoHort software, U.S.A.) 中之 ANOVA (Analysis of variance) 進行變方分析，利用 Duncan's LSD 進行各處理之顯著差異 5% 比較。

## 結 果

### 一、秋水仙素不同處理方式及濃度對'巴陵紫雲'誘變效率之影響

種間雜交種'巴陵紫雲'於誘變處理後進行存活率及倍體數誘變率之調查。經秋水仙素以羊毛脂膏為基質處理之結果顯示，在 10 g Kg<sup>-1</sup> 處理一次具有最高的芽體存活率為 50%；其次以 0.5 g Kg<sup>-1</sup> 秋水仙素處理一次芽體的存活率為 48.4%。經流式細胞儀檢測存活芽體之倍體數誘變率，以 10 g Kg<sup>-1</sup> 處理二次及 15 g Kg<sup>-1</sup> 處理二次時具有最佳之倍體數誘變率 19.4%，分別各獲得 6 株的混倍體誘變株 (表 1)。

以棉花作為秋水仙素之沾附基質，在處理一次 2 g L<sup>-1</sup> 的濃度下具有最高芽體存活率 40.0%；此外隨著處理濃度增加存活率有下降的趨勢，當處理濃度為 5 g L<sup>-1</sup> 和 10 g L<sup>-1</sup> 時其芽體存活率分別降至 12.1%、3.0%。相似的結果於處理兩次亦可發現此趨勢，在處理兩次 5 g L<sup>-1</sup> 的濃度下芽體存活率為 9.4%，隨秋水仙素濃度增加為 10 g L<sup>-1</sup>、15 g L<sup>-1</sup> 及 20 g L<sup>-1</sup>，其芽體存活率分別為 3.10%、0% 及 0%。經流式細胞儀使用 0.5 g L<sup>-1</sup> 一天的處理可獲得 1 株混倍體植株，倍體數誘變率為 3.30%；使用 0.5 g L<sup>-1</sup> 二天可獲得 2 株四倍體植株，倍體數誘變率為 6.70%；使用 1 g L<sup>-1</sup> 一天可獲得 1 株混倍體植株，倍體數誘變率為 3.30%；使

用 2 g L<sup>-1</sup> 一天可獲得 6 株四倍體及 4 株混倍體植株，倍體數誘變率為 33.30%、使用 5 g L<sup>-1</sup> 一天可獲得 1 株四倍體植株，倍體數誘變率為 3.03%、使用 5 g L<sup>-1</sup> 二天可獲得 2 株混倍體植株，倍體數誘變率為 6.25%、使用 10 g L<sup>-1</sup> 二天可獲得 1 株混倍體植株，倍體數誘變率為 3.10%、使用 15 g L<sup>-1</sup> 一天可獲得 2 株混倍體植株，倍體數誘變率為 6.30%。根據以上結果，最易獲得四倍體的誘變濃度為秋水仙素濃度 0.5-5 g L<sup>-1</sup> 之處理 (表 2)。

表 1. 不同秋水仙素羊毛脂濃度對石竹雜交種'巴陵紫雲'誘變效率之影響。

Table 1. Effect of different colchicine concentrations on the mutation induction in *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud'.

| 濃度<br>Conc.<br>(g Kg <sup>-1</sup> ) | 次數<br>Times<br>(No.) | 芽體存活率 <sup>y</sup><br>Survival rate<br>(%) | DNA C-values (Min-Max) |                   |                  | 倍體數誘變率 <sup>z</sup><br>Ploid mutant<br>rate<br>(%) |
|--------------------------------------|----------------------|--|------------------------|-------------------|------------------|--|
|                                      |                      |  | 二倍體<br>Diploid         | 四倍體<br>Tetraploid | 混倍體<br>Mixoploid |  |
| 0.5                                  | 1                    | 48.4 (15/31)                               | 14                     |                   | 1                | 3.20 (1/31)  |
|                                      | 2 <sup>z</sup>       | 29.0 ( 9/31)                               | 9                      |                   |                  | 0.00 (0/31)  |
| 1                                    | 1                    | 35.5 (11/31)                               | 11                     |                   |                  | 0.00 (0/31)  |
|                                      | 2                    | 19.4 ( 6/31)                               | 6                      |                   |                  | 0.00 (0/31)  |
| 2                                    | 1                    | 20.0 ( 6/30)                               | 6                      |                   |                  | 0.00 (0/30)  |
|                                      | 2                    | 34.4 (11/32)                               | 11                     |                   |                  | 0.00 (0/32)  |
| 5                                    | 1                    | 43.3 (13/30)                               | 12                     | 1                 |                  | 3.30 (1/30)  |
|                                      | 2                    | 47.0 (15/32)                               | 10                     |                   | 5                | 15.60 (5/32)                                       |
| 10                                   | 1                    | 50.0 (15/30)                               | 10                     |                   | 5                | 16.70 (5/30)                                       |
|                                      | 2                    | 41.9 (13/31)                               | 7                      |                   | 6                | 19.40 (6/31)                                       |
| 15                                   | 1                    | 46.7 (14/30)                               | 10                     |                   | 4                | 13.30 (4/30)                                       |
|                                      | 2                    | 41.9 (13/31)                               | 7                      |                   | 6                | 19.40 (6/31)                                       |
| 20                                   | 1                    | 30.0 ( 9/30)                               | 6                      |                   | 3                | 10.00 (3/30)                                       |
|                                      | 2                    | 29.0 ( 9/31)                               | 6                      |                   | 3                | 9.70 (3/31)  |

<sup>z</sup>: 羊毛脂二次處理：誘變劑處理一次後，相隔 7 日後再處理相同濃度之羊毛脂。

<sup>y</sup>: 存活腋芽數/處理腋芽數，於誘變處理後 8 週調查存活率。

<sup>x</sup>: 相對 DNA 含量與對照組具明顯差異之誘變株數量。

<sup>z</sup>: Once treated lanolin, after 7 days treated the same concentration.

<sup>y</sup>: NO. of survival axillary bud / NO. of totally treatments, investigated after 8 weeks.

<sup>x</sup>: NO. of mutants with obvious difference of DNA content contrast with control.

## 二、秋水仙誘變植株之性狀調查

調查經秋水仙素處理所獲得之'巴陵紫雲'誘變株與原株之比較 (圖 1)。透過流式細胞儀檢測, PM2 為倍數體加倍變異之誘變株, 相對 DNA 含量為 3.91 (圖 3c); 另外部分變異株出現非整倍體之變異, 其相對 DNA 含量分別為 PM-1 (3.73/7.31) (圖 3b)、PM-3 (4.07/8.02) (圖 3d)、PM-5 (2/3.9) (圖 3f)。其中, 所調查之五株誘變株獲得方式與濃度分別為 PM-1 (秋水仙素、兩次 0.5 g L<sup>-1</sup>)、PM-2 (秋水仙素、一次 2 g L<sup>-1</sup>)、PM-3 (秋水仙素、一次 2 g L<sup>-1</sup>)、PM-4 (秋水仙素羊毛脂膏、二次 1 g Kg<sup>-1</sup>)、PM-5 (秋水仙素羊毛脂膏、二次 20 g Kg<sup>-1</sup>) (表 3)。

表 2. 不同秋水仙素濃度對石竹雜交種'巴陵紫雲'誘變效率之影響。

Table 2. Effect of different agents and colchicine concentrations on the mutation induction in *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud'.

| 濃度<br>Conc.<br>(g L <sup>-1</sup> ) | 次數<br>Times<br>(No.) | 芽體存活率 <sup>z</sup><br>Survival rate<br>(%) | DNA C-values (Min-Max) |                   |                  | 倍體數誘變率 <sup>y</sup><br>Ploid mutant rate<br>(%) |
|-------------------------------------|----------------------|--|------------------------|-------------------|------------------|---|
|                                     |                      |  | 二倍體<br>Diploid         | 四倍體<br>Tetraploid | 混倍體<br>Mixoploid |   |
| 0.5                                 | 1                    | 6.7 ( 2/30)                                | 1                      |                   | 1                | 3.30 ( 1/30)                                    |
|                                     | 2                    | 30.0 ( 9/30)                               | 7                      | 2                 |                  | 6.70 ( 2/30)                                    |
| 1                                   | 1                    | 3.3 ( 1/30)                                |                        |                   | 1                | 3.30 ( 1/30)                                    |
|                                     | 2                    | 0.0 ( 0/30)                                |                        |                   |                  | 0.00 ( 0/30)                                    |
| 2                                   | 1                    | 40.0 (12/30)                               | 2                      | 6                 | 4                | 33.30 (10/30)                                   |
|                                     | 2                    | 0.0 ( 0/30)                                |                        |                   |                  | 0.00 ( 0/30)                                    |
| 5                                   | 1                    | 12.1 ( 4/33)                               | 3                      | 1                 |                  | 3.03 ( 1/33)                                    |
|                                     | 2                    | 9.4 ( 3/32)                                | 1                      |                   | 2                | 6.25 ( 2/32)                                    |
| 10                                  | 1                    | 3.0 ( 1/33)                                | 1                      |                   |                  | 0.00 ( 0/33)                                    |
|                                     | 2                    | 3.1 ( 1/32)                                |                        |                   | 1                | 3.10 ( 1/32)                                    |
| 15                                  | 1                    | 6.3 ( 2/32)                                |                        |                   | 2                | 6.30 ( 2/32)                                    |
|                                     | 2                    | 0.0 ( 0/34)                                |                        |                   |                  | 0.00 ( 0/34)                                    |
| 20                                  | 1                    | 0.0 ( 0/32)                                |                        |                   |                  | 0.00 ( 0/32)                                    |
|                                     | 2                    | 0.0 ( 0/33)                                |                        |                   |                  | 0.00 ( 0/33)                                    |

<sup>z</sup>: 存活腋芽數/處理腋芽數, 於誘變處理後 8 週調查存活率。

<sup>y</sup>: 相對 DNA 含量與對照組具明顯差異之誘變株數量。

<sup>z</sup>: NO. of survival axillary bud / NO. of totally treatments, investigated after 8 weeks.

<sup>y</sup>: NO. of mutants with obvious difference of DNA content contrast with control.

所獲得之誘變株營養性狀其株高、節間長皆減少，因此，株型變得緊密（圖 1a），P-M1 葉長寬比下降，其餘 P-M2、P-M3、P-M4、P-M5 皆為上升，葉片的厚度介於 0.96-0.73 mm 均較原株 0.71 mm 厚。誘變株與原株生殖性狀之差異，以花徑 P-M1、P-M2、P-M3、P-M5 分別為 33.70 mm、32.87 mm、31.58 mm、30.65 mm 均有較原株 28.51 mm 有顯著的增加（圖 1b）。觀察'巴陵紫雲'與其誘變株之花器構造（圖 2a），'巴陵紫雲'雖有形成雄蕊之構造，但其花藥無法釋放花粉或是僅少量釋放花粉，將花粉進行花粉發芽之試驗仍無法順利萌發生長（圖 2b），經過秋水仙素處理之混倍體誘變株 P-M1 花藥能正常釋放花粉，花粉經花粉發芽之試驗可順利萌發伸長（圖 2c），調查後具有 8.53% 花粉發芽率，此外，其具有大、小孢子，花粉直徑大小為 193.3/398.0  $\mu\text{m}$ 。其他誘變株雖外觀與原株有些微差異，但其花藥皆無法正常釋放花粉。

表 3. 石竹種間雜交種'巴陵紫雲'(Palin Purple Cloud) 經秋水仙素處理獲得之誘變植株型態調查<sup>z</sup>。  
 Table 3. The morphological differences between *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud' and its mutants obtained from colchicine treatment<sup>z</sup>.

| 誘變<br>單株<br>Mutants | 處理 <sup>y</sup><br>Agent | 株高<br>Plant height<br>(cm) | 節間長<br>Internode<br>length<br>(mm) | 葉長<br>Leaf<br>length<br>(mm) | 葉寬<br>Leaf<br>width<br>(mm) | 葉長<br>寬比<br>length/<br>width ratio | 葉厚<br>Leaf<br>thickness<br>(mm) | 花徑<br>Floret<br>diameter<br>(mm) | 花瓣長<br>Floret<br>length<br>(mm) | 花瓣寬<br>Floret<br>width<br>(mm) | 相對 DNA<br>含量(units)<br>Relative DNA<br>content |
|---------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|
| CK                  | -                        | 34.67 a                    | 38.75 a                            | 93.67 c                      | 15.48 a                     | 6.08 d                             | 0.71 c                          | 28.51 d                          | 33.96 d                         | 11.15 bc                       | 2.0  |
| P-M1                | L-1-2                    | 28.50 b                    | 20.91 e                            | 114.60 ab                    | 16.35 a                     | 7.01 ab                            | 0.73 c                          | 27.96 d                          | 37.01 c                         | 10.68 c                        | 2.0  |
| P-M2                | C-2-1                    | 19.77 d                    | 14.90 f                            | 96.35 c                      | 15.48 a                     | 6.22 cd                            | 0.89 ab                         | 32.87 ab                         | 38.26 bc                        | 11.45 abc                      | 3.91   |
| P-M3                | L-20-2                   | 29.37 b                    | 29.46 c                            | 108.21 b                     | 16.47 a                     | 6.57 bc                            | 0.82 bc                         | 30.65 c                          | 37.47 bc                        | 11.35 abc                      | 2.0/3.9  |
| P-M4                | C-0.5-2                  | 29.47 b                    | 33.39 b                            | 58.93 d                      | 12.62 b                     | 4.69 e                             | 0.87 ab                         | 33.70 a                          | 40.87 a                         | 12.10 ab                       | 3.73/7.31                                      |
| P-M5                | C-2-1                    | 24.20 c                    | 26.16 d                            | 116.55 a                     | 16.37 a                     | 7.12 a                             | 0.96 a                          | 31.58 bc                         | 39.24 ab                        | 12.45 a                        | 4.07/8.02                                      |

z : 數據以新青氏多變域顯著性比較顯著差異比較,  $p \leq 0.05$  具有顯著差異。

y : 處理: (L: 羊毛脂、C: 棉花)-濃度-次數

z : Means separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .

y : Agent: (L: lanolin、C: cotton) -concentration- No.

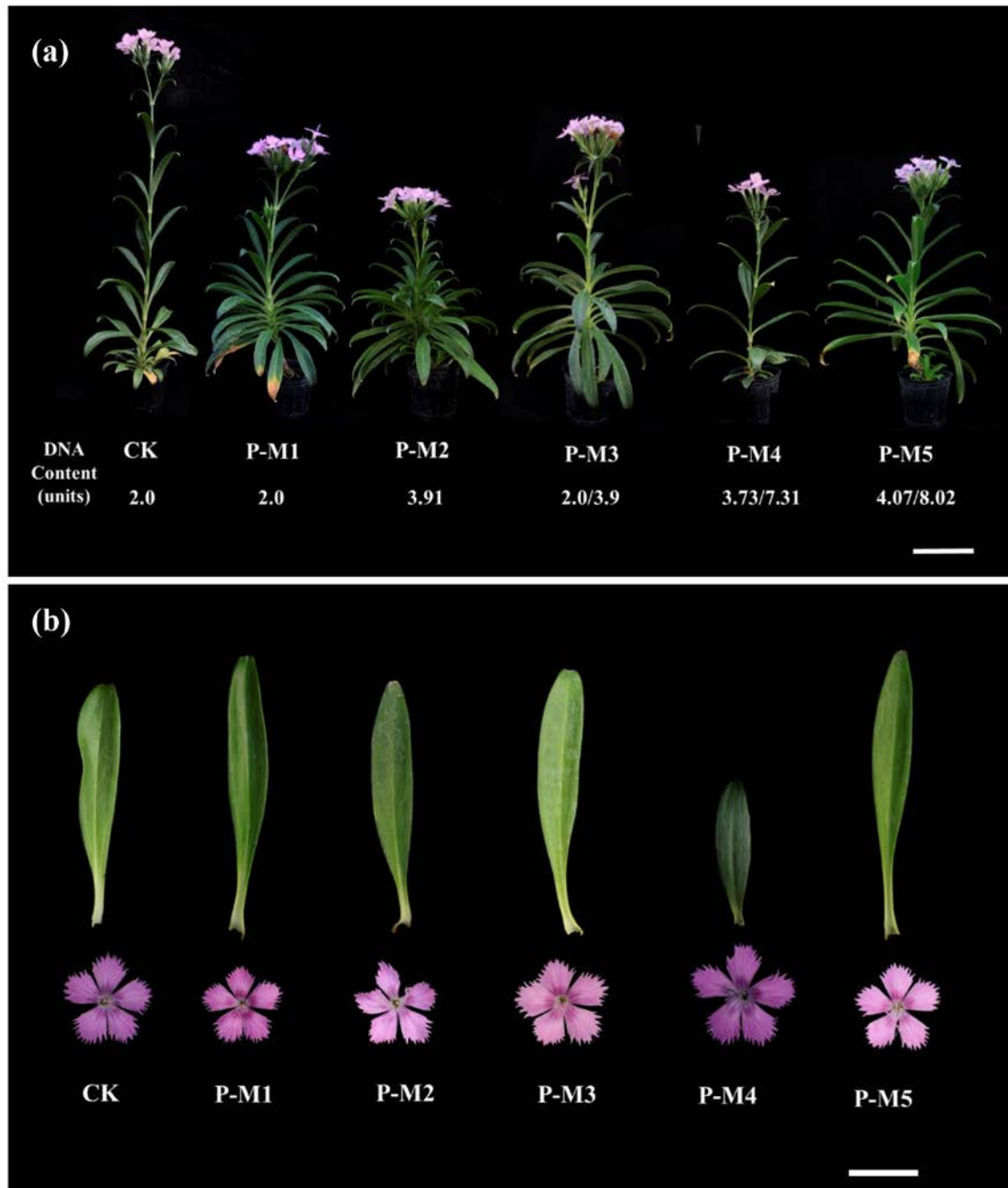


圖 1. '巴陵紫雲'與其秋水仙素誘變株性狀之比較。

(a) 植株型態 Bar = 8 cm、(b) 葉片與單花 Bar = 2 cm。

Fig. 1. The *Dianthus hybrida* 'Palin Purple Cloud' and its mutants obtained from chochicine induction. (a) Plant morphology. Bar = 8 cm (b) leaf and flowers. Bar = 2 cm。



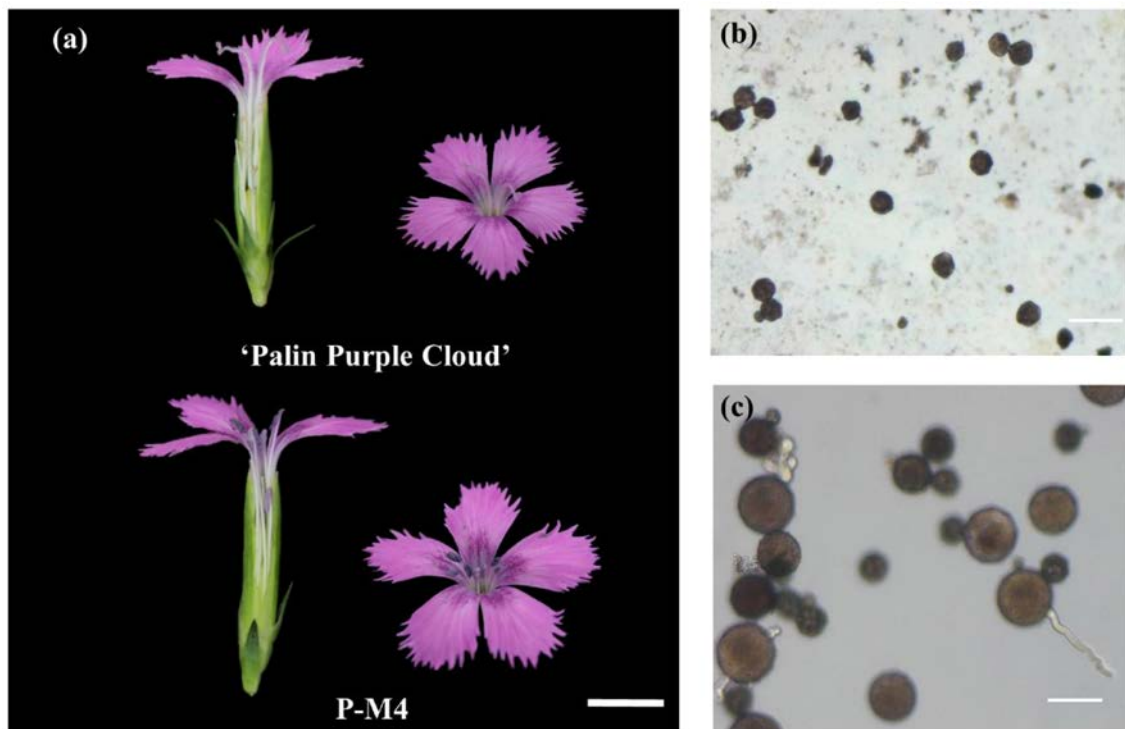


圖 2. '巴陵紫雲'與其誘變株 P-M4，其誘變株花器型態與花粉外觀。

(a)'巴陵紫雲'異常雄蕊型態及'巴陵紫雲'誘變 P-M4 花藥開裂及花粉釋出之情況。(b)'巴陵紫雲'花粉不具發芽能力。(c)'巴陵紫雲'誘變株 P-M4 花粉管順利萌發。Bar=(a)1cm；(b&c)400  $\mu\text{m}$ 。

Fig. 2. The inflorescence and pollen character on *Dianthus hybrida* 'Palin Purple Cloud', and its individual mutants.

(a)Abnormal stamens of *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud' and anther dehisced *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud' mutant P-M4. (b)Non pollen germination of *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud'. (c)Pollen tube elongation of *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud' mutant P-M4. Bar = (a)1cm ; (b, c)400  $\mu\text{m}$ 。

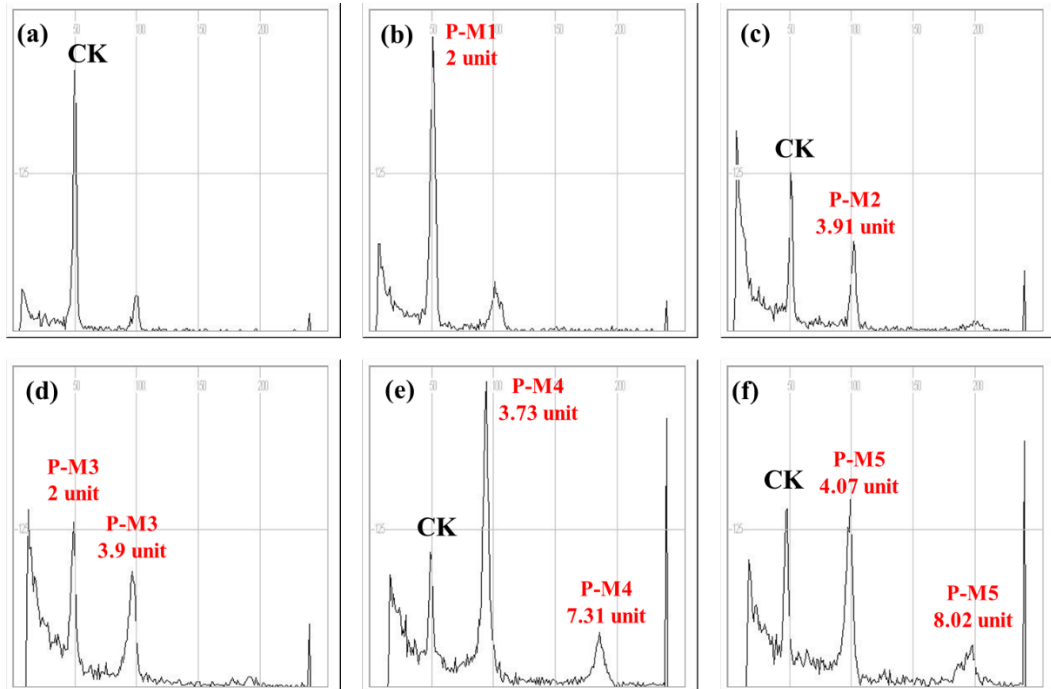


圖 3. '巴陵紫雲'與其誘變株經流式細胞儀檢測之相對 DNA 含量。

(a) '巴陵紫雲'原株。(b-f)經流式細胞儀檢測誘變株與對照株之相對 DNA 含量。

Fig. 3. Relative DNA content of the colchicine mutants obtained from *D. hybrida* 'Palin Purple Cloud'. (a)*D. hybrida* 'Palin Purple Cloud'. (b-f) Relative DNA content between mutants.

## 討 論

### 一、秋水仙素濃度及方法

本研究以秋水仙素溶液處理 1 天為最適當日數，以濃度  $2\text{g L}^{-1}$  具有較佳的倍體數誘變率，其誘變率為 33.30%。然而以秋水仙素羊毛脂處理 2 次為適當方法，以濃度 10、15  $\text{g Kg}^{-1}$  具有較佳的倍體數誘變率，其誘變率皆為 19.40%，根據實驗以秋水仙素液體處理在較低的濃度即能有最佳的誘變效果。香石竹與日本石竹之種間雜交後代皆不稔 (Nimura et al., 2003)，Nimura 等人 (2006a) 以瓶外的方式直接將秋水仙素液體點滴一次於莖頂之生長點，使用  $2\text{g L}^{-1}$  具有較佳的倍體數誘變率；以瓶內誘變的方式處理秋水仙素  $0.5\text{g L}^{-1}$  為最佳濃度，可成功誘導出具稔性的雙二倍體 (amphidiploids) 種間雜交誘變株。Nimura 等人 (2006a) 亦指出香石竹以瓶內進行誘變處理，以秋水仙素  $0.5\text{g L}^{-1}$  及 amiprophos methyl  $10\text{g L}^{-1}$  處理為最佳的濃度，可成功誘導出多倍體。本試驗利用瓶外環境進行秋水仙素誘變多倍體，和前人的研究結果相似，可以證實秋水仙素的誘變處理方法 (瓶內或瓶外) 與劑量之濃度、誘變存活率、多倍體誘變效率皆具有相關性。

## 二、秋水仙素誘變劑對恢復稔性之效果

本研究所使用之'巴陵紫雲'為石竹屬雜交種 (*D. japonicus* 'Red Plum' × *D. palinensis*)，其花器異常，花藥無法正常開裂或花藥可正常發育，但花粉經檢測卻不具花粉活力，故無法作為育種材料，推測可能與其獲得自種間雜交相關，褚 (2012)亦指出由巴陵石竹與日本石竹種間雜交之子代，部分子代之花粉有敗育之情況。因種間雜交後代常由於染色體減數分裂異常而影響小孢子的形成進而影響稔性 (Van Tuyl and Lim, 2002)。花粉母細胞於減數分裂中期 I 時，染色體配對時出現障礙，缺乏同源染色體或配對染色體間大小的差異，因而造成花粉稔性低落 (Prosevičius and Strikulyte, 2004)。此外造成花器異常現象及花粉不稔之原因可能與外在環境及遺傳基因組有關聯 (Zhou *et al.*, 2012; Oates *et al.*, 2012)。花粉敗育不具稔性現象亦於石竹屬種間雜交發現此現象，如伊勢石竹與日本石竹種間雜交子代 (Nimura, 2006b)。馬祖原生種長萼瞿麥與中國石竹'Super Parfait Strawberry'之種間雜交其子代花粉也具有高度的敗育率 (黃, 2017)。此現象亦發生於其他植物之種間雜交子代，如鼠尾草屬之種間雜交子代花藥內之花藥量除了較親本少，花粉大小、形狀不一，且發芽力較親本低 (徐, 2015)。

人工誘導多倍體是現代品種改良的重要方法之一，由於遠緣雜交使兩個物種的基因體結合，人工加倍後即可形成異源多倍體 (雙二倍體) (梁, 2003)。不僅有助於克服雜種的不稔性，而且可創造出新的種質資源。本研究利用石竹商業種間雜交種'巴陵紫雲' (*D. japonicus* 'Red Plum' × *D. palinensis*)，經秋水仙素僅獲得 1 株花器恢復正常植株。'巴陵紫雲'原本花藥無法正常開裂釋出花粉之情況得到改善，其誘變株之花藥可正常釋出花粉，經花粉活力檢測後，其花粉活力為 8.53% (表 3)。Nimura 等人 (2006a)利用秋水仙素進行生長點點滴處理香石竹與日本石竹種間雜交種，獲得多倍體植株並成功恢復其稔性，因而得以進行後續育種計畫。此外，經由誘變處理能獲得恢復稔性的結果，Kermani 等人 (2003)使用 Oryzalin 誘導玫瑰，能使部分無花粉活力之品種恢復稔性，部分品種經誘導獲得之四倍體或六倍體植株，其花粉皆較原來二倍體或三倍體植株有較高之活力。美女櫻經秋水仙素處理獲得多倍體之植株，除花粉粒直徑增加外，少數花粉粒亦具活性 (González *et al.*, 2015)。天竺葵 (*Pelargonium* × *hortorum*)與 *P. quinquelobatum* 之種間雜交後代無稔性，藉由秋水仙素誘變使染色體加倍，成功獲得具稔性之四倍體植株 (Hondo *et al.*, 2015)。陸 (2015)利用秋水仙素進行聖誕紅種間雜交種之誘變，成功獲得恢復稔性植株及解決雜交障礙等。

## 三、秋水仙素誘變劑對植物外表型改變

本試驗之'巴陵紫雲'經秋水仙素處理後所獲得之多倍體植株，與未經處理之對照組相比下其株高與節間長皆有顯著差異，株型變為較緊湊的植株型態，葉長、葉寬、葉厚、花徑、花瓣長與寬皆有變長與變大的現象等特性。Chen (2007)表示多倍體植株所帶之基因組與原株相同，僅於數量上之改變，因此染色體數目的增加，將導致數量性狀之重複表達而造成變異。通過增加一個現存物種的染色體數目，可以產生同源多倍體。由於染色體加

倍後的劑量效應，可獲得植物某些器官巨大型的直接效果（梁，2003）。多倍體化現象的結果造成植株性狀產生改變已被證實於其他的作物上，如紫薇多倍體化致使花瓣變大、葉片變得寬圓及花序直徑增加（Ye *et al.*, 2010）、美女櫻之多倍體誘變株的葉形和花瓣變寬厚、花瓣色澤加深（Lucía *et al.*, 2015）、剪秋羅多倍體亦可造成株型的緊密、莖部加粗、深綠色的葉片（Nakano *et al.*, 2012）、麒麟花葉片增厚、葉色變深（陳，2012），以及提升抗蟲（Butt *et al.*, 2014）、環境耐受性的能力（Yang *et al.*, 2013）、提高耐候性（Van Laere *et al.*, 2011）等。

香石竹已被證實染色體多倍體化會導致株形矮小、葉片寬、花徑變大（Mo *et al.*, 2006；Qu *et al.*, 2004）、花朵顏色加深（Yamaguchi, 1989）。Nimura 等人（2006a）以香石竹與日本石竹之種間雜交種進行多倍體的誘導，所獲得之四倍體及混倍體其花徑、花瓣數量、葉長、葉寬及花粉直徑均較二倍體大。

## 參 考 文 獻

- 徐駿逸。2015。鼠尾草屬植物之花器生物學、生殖系統與種間雜交。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。176pp。
- 梁紅。2003。植物遺傳與育種。九州圖書文物有限公司。台北。445pp。
- 陳俊源。2012。麒麟花種間雜交及多倍體誘導。國立中興大學園藝學系碩士論文。67pp。
- 陸雅芬。2015。聖誕紅之多倍體化與種間雜交。國立中興大學園藝學系碩士論文。95pp。
- 彭寶儀。2007。台灣原生石竹之開花習性及其種間雜交。國立中興大學園藝學系碩士論文。64pp。
- 黃智暉。2017。花壇用種間雜交石竹之選育。國立臺灣大學園藝學系碩士論文。114pp。
- 褚哲維。2012。台灣原生石竹新品種之開發。國立中興大學園藝學系碩士論文。67pp。
- Bittrich, V. 1993. Caryophyllaceae. In: K. Kubitzki., J. G. Rohwer. and V. Bittrich (eds.). The families and genera of vascular plants. Flowering plants·dicotyledons, vol. 2. Springer, Germany. pp. 206-236.
- Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50: 859-865.
- Butt, S. J., A. Sarwar, N. A. Abbasi, and S. K. Chaudhari. 2014. Performance of *in vitro* *Rosa* mutant lines developed by the application of gamma irradiation and colchicine. *Int. J. Biosci.* 5: 256-264.
- Chen, Z. J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 377-406.
- González Roca, L., J. Iannicelli, A. Coviella, V. Bugallo, P. Bologna, S. Pitta Álvarez, and A. Escandón. 2015. A protocol for the *in vitro* propagation and polyploidization of an interspecific hybrid of *Glandularia* (*G. peruviana* × *G. scrobiculata*). *Sci. Hort.* 184: 46-54.

- Hondo, K., P. Sukhumpinij, and F. Kakihara. 2015. Flower color and pigments in yellow-flowered hybrid progeny raised from the interspecific cross *Pelargonium quinquelobatum* × white-flowered geraniums. *Sci. Hort.* 195: 145-153.
- 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.
- Mo, X., M. Gui, S. Qu, L. Xiong, and M. Yang. 2005. Polyploid breeding studying of standard carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Chin. Agric. Sci. Bul.* 21: 262-264.
- Nakano, M., H. Tasaki, T. Nonaka, D. S. Han, and T. Godo. 2012. Chromosome doubling of japanese native *Lychnis* spp by *in vitro* oryzalin treatment. *Bul. Facul. Agr. Niigata Univ.* 64: 101-105.
- Nimura, M., J. Kato, H. Horaguchi, M. Mii, K. Sakai, and T. Katoh. 2006a. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Breeding Sci.* 56: 303-310.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii, and K. Morioka. 2003. Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1164-1170.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii, and T. Katoh. 2006b. Amphidiploids produced by natural chromosome-doubling in inter-specific hybrids between *Dianthus* × *isensis* Hirahata et Kitam. and *D. japonicus* Thunb. *J. Hort. Sci. Bio.* 81: 72-77.
- Oates, K. M., T. G. Ranney, and D. H. Touchell. 2012. Influence of induced polyploidy on fertility and morphology of *Rudbeckia* species and hybrids. *HortScience* 47: 1217-1221.
- Prosevičius, J. and L. Strikulyte. 2004. Interspecific hybridization and embryo rescue in breeding of lilies. *Acta Univ. Latv. Biol.* 676: 213-217.
- Qu, S., L. Xiong, X. Mo, J. Wang, H. Zhang, and Y. Su. 2004. Polyploidy induction of *Dianthus caryophyllus* and variation of the polyploids. *J. Southwest Agr. Univ. (Nat Sci.)* 26: 609-612.
- Van Laere, K., S. C. França, H. Vansteenkiste, J. Van Huylenbroeck, K. Steppe, and M. C. Van Labeke. 2011. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta Physiologiae Plant.* 33: 1149-1156.
- Van Tuyl, J. M., K. B. Lim, and M. S. Ramanna. 2002. Interspecific hybridization and introgression. In: Vainstein, A. (Eds.), *Breeding for ornamental: classical and molecular approaches*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 47-83.
- Woltering, E. J. and W. G. Van Doorn. 1988. Role of ethylene in senescence of petals-morphological and taxonomical relationships. *J. Expt. Bot.* 39: 1605-1616.
- Yamaguchi, M. 1989. Basic studies on the flower color breeding of carnations (*Dianthus*

- caryophyllus* L.). Bul. Fac. Hort. Minamikyushu Univ. 19: 1-78.
- Yang, N., Y. Sun, Y. Wang, C. Long, Y. Li, and Y. Li. 2013. Proteomic analysis of the low mutation rate of diploid male gametes induced by colchicine in *Ginkgo biloba* L. PLoS ONE 8: 1-8.
- Ye, Y. M., J. Tong, X. P. Shi, W. Yuan, and G. R. Li. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Sci. Hort. 124: 95-101.
- Zhou, H., Q. Liu, J. Li, D. Jiang, L. Zhou, P. Wu, S. Lu, F. Li, L. Zhu, Z. Liu, L. Chen, Y.G. Liu, and C. Zhuang. 2012. Photoperiod- and thermo-sensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA. Cell Res. 22: 649-660.

## The Polyploidization of *Dianthus hybrida* 'Palin Purple Cloud'

Bo-Yin Chen <sup>1)</sup> I-Chun Pan <sup>2)</sup> Yen-Ming Chen <sup>3)</sup>

Key words: *Dianthus*, Interspecific hybridization, Polyploidy induction, Fertility

### Summary

In this research, the *Dianthus hybrida* 'Palin Purple Cloud' of the interspecific hybrids (*Dianthus japonicus* 'Red Plum' × *D. palinensis*) were processed on the axillary buds with colchicine *in vivo*. We investigated the ploidy and pollen viability of polyploidy mutants were obtained from 'Palin Purple Cloud'. After the treatment of different concentrations of colchicine in 'Palin Purple Cloud', each with lanolin or with cotton, colchicine treatment with lanolin of 10 g Kg<sup>-1</sup> for one time led to the highest rate (50.0%) of survival. However, colchicine treatment with cotton of 2 g L<sup>-1</sup> for one time led to the highest rate (40.0%) of survival. Among 54 mutants were identified by flow cytometry. These mutants (diploid, tetraploid and polyploid) of characteristics were investigated, which the height and internode were decreased, the plant type became compact, and the length of petal were increased. The mutant P-M4 of mixoploid, which anther dehiscence, and the pollen germination rate was 8.53%.

---

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

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

