

香石竹倍數性與植物特徵及細胞膜熱穩定之相關性

陳政宏¹⁾ 陳彥銘²⁾

關鍵字：香石竹、流式細胞儀、倍數性、保衛細胞、花粉、細胞膜熱穩定性

摘要：本研究利用流式細胞儀評估不同香石竹品種之倍數性，建立香石竹倍數性與植物器官之關連性，以進行早期簡易選拔，並檢測不同品種之電解質滲漏率以計算相對傷害值 (relative injury, RI)，探討倍數性與細胞膜熱穩定性。流式細胞儀試驗材料共評估 23 個市場流通品種，結果指出二倍體有 14 品種、三倍體有 2 品種、四倍體有 5 品種，並具非整倍體 2 品種，其中二倍體、三倍體、四倍體其葉片保衛細胞長度與倍數性呈現正相關性，寬度無關係性。多數香石竹品種皆具大/小花粉，二倍體品種大小花粉長寬直徑為 51.05-60.67/40.28-52.99 μm 、四倍體為 65.14-69.62/42.10-60.54 μm 、非整倍體為 54.26/45.11 μm ，而三倍體未具花粉。細胞膜熱穩定性結果顯示不同倍數性香石竹品種於 55°C 下葉片之 RI 值無顯著差異，相對傷害曲線中點溫度為 50.3-51.4°C，熱致死溫度介於 50.4-51.9°C。

前 言

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 屬於石竹科 (Caryophyllaceae) 石竹屬 (*Dianthus*) 之花卉作物，其在溫帶地區可週年栽培，哥倫比亞、肯亞、中國及歐洲之高冷地為主要產區 (Nimura *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2017)，而香石竹在台灣之主要產區為彰化縣，宜蘭縣、南投縣和嘉義市等地區亦有栽培(魏，2005)。根據我國農業統計資料顯示，民國 89 年產值高達 3 億新台幣，但近 20 年生產面積和產量急劇下滑，至 107 年產值不到 1 億新台幣 (行政院農業委員會，2020)。探究其原因，香石竹栽培種多由溫帶國家引進，不能完全適應本土氣候，因此於台灣進行香石竹耐熱育種將對其產業復興有所助益。

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，通訊作者。

然而進行雜交育種，已知雜交獲種率與育種材料倍數性有其關聯性，根據胚乳平衡數 (Endosperm Balance Number, EBN) 之假說，種間雜交母本和父本於胚乳中之配子貢獻需為 2:1，因此雜交成功與否取決於親本之倍體數，故於早期選拔及釐清親本倍數性極為重要 (Johnston and Hanneman, 1980)。植物倍數性檢測可透過根尖染色體計數方式進行，但相較費時，因此近年多藉由流式細胞儀快速測定細胞核內 DNA 含量，可有效率評估植物倍數性，而此儀器已於石竹屬物種 (Balao *et al.*, 2009; Yagi *et al.*, 2009) 及其他物種廣泛應用於分析倍數性 (Aragane *et al.*, 2014; Ishizaka *et al.*, 2009)。

此外為瞭解植物對高溫逆境之耐受性，現已知可透過植物組織經高溫處理，造成細胞膜之通透性增加引起電解質滲漏，藉以計算高溫對其相對傷害植 (relative injury, RI)，釐清細胞膜熱穩定性 (cell membrane thermostability, CMT)，作為區別耐高溫之逆境指標，目前已應用於如菊花和石竹等花卉作物之耐熱篩選 (曾, 1990; 黃, 2017; Yeh and Lin, 2003)，然而迄今尚未有香石竹文獻探討其耐熱性與膜滲透之關連性。此外倍數性亦影響植物耐侯性，如四倍體聖誕紅與二倍體相比有較佳的 SPAD 值和細胞膜穩定性 (廖, 2019)，現今僅八木等 (2007) 探討不同香石竹栽培種的倍數性和氣孔大小之間探討，未比較不同倍數性及之逆境耐受性進行比較及描述。

因此，本篇研究調查不同香石竹栽培種的倍數性、植株性狀、氣孔和花粉大小，以及細胞膜熱穩定性，期能了解各因素之相關性以提供香石竹耐熱育種之篩選指標。

材料與方法

一、植株材料

本試驗材料使用香石竹 12 種單朵大花型 (Standard type) 品種，9 種多花型 (Spray type) 品種，以及 Selecta one 公司的 2 種 Dianthini carnation。植株於西元 2017 年 12 月進行採穗繁殖，待插穗發根後定植。保衛細胞大小於西元 2018 年 3 月取第一片完全展開葉測量，而在 5-7 月期間花朵開放時調查花粉大小。

二、流式細胞儀估算倍數性

本試驗以香石竹 'Festival'、'Butterfly' 和蘭嶼秋海棠 (*Begonia fenicis*) 作為對照之標準品，藉以估算不同香石竹栽培種之相對 DNA 含量。取試驗材料未展開之新鮮葉片約 0.25 cm²，置於含有 400 µl Solution A 溶液 (Nuclei Extraction Buffer, Partec GmbH, Münster, Germany) 之玻璃培養皿中，以刀片將葉片剁碎後加入 1600 µl Solution B 溶液 (Staining Buffer, Partec GmbH, Münster, Germany)，再以網目 30 µm 之尼龍網過濾葉片及雜質，獲得澄清樣品後靜置一分鐘，以流式細胞儀 (CyFlow[®] Cube 6, Ploidy Analyzer, Partec GmbH, Münster, Germany) 進行測定。

三、根尖染色體觀察

修改李 (2019)之方法，取香石竹'Festival'之新鮮根尖 0.3 cm，加入 1 ml DI water、2.5 μ l BrNa 和 3.5 μ l DMSO 進行預措處理，於常溫避光環境下靜置五小時，移除預措液後加入 800 μ l 固定液 (酒精：冰醋酸 = 3:1)，之後置於 4°C 避光環境下 24 小時，取出固定液後進行軟化處理，以 500 μ l 1N HCl 浸泡 10 分鐘，移除 HCl 後再加入 500 μ l 1N HCl 於 60°C 水浴槽中處理 10 分鐘，去除 HCl 後以 DI water 清洗根尖兩次，然後加入 50 μ l feulgen 在 4°C 避光環境下放置 1 小時後移除 feulgen，再加入 100 μ l 1% pectinase 於常溫避光環境下靜置 1 至數小時，爾後取二至三個根尖以醋酸洋紅染色，將根尖搗碎並壓製成染色體玻片，於光學顯微鏡下計算染色體數目，以及拍照記錄。

四、保衛細胞和花粉測量

(一)保衛細胞觀察

試驗材料取用參試栽培種第一片完全展開之葉片中段進行保衛細胞觀察，以解剖刀將葉片下表皮取下置於載玻片上，滴上去離子水再蓋上蓋玻片，隨即於光學顯微鏡 (Axioskop2, CARL ZEISS, Germany)下觀察，並以攝影機 (ProgRes® CF scan, Jenoptik, Germany)和相機軟體 ProgRes® CapturePro 2.8 (Jenoptik, Germany)測量氣孔長寬及拍照。

(二)花粉觀察

取當日開裂之新鮮花粉，均勻撒於含有花粉培養基之雙凹載玻片上。隨即於光學顯微鏡 (Axioskop2, CARL ZEISS, Germany)下觀察，並以攝影機 (ProgRes® CF scan, Jenoptik, Germany)和相機軟體 ProgRes® CapturePro 2.8 (Jenoptik, Germany)測量花粉大小及拍照。花粉培養基以 Brewbaker 和 Kwack (1963)之配方作為基底，其中每公升含有 0.3 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g H_3BO_3 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 0.1 g KNO_3 ，另外添加 15% 蔗糖，並調整 pH 值至 6.0。

五、細胞膜熱穩定性

植株於定植兩個月後放入人工氣候生長箱 (恆溫 20°C 光週期 8 小時)中兩星期，爾後進行細胞膜熱穩定性之評估，檢測方法參考黃 (2017)之方法。取第 3 至第 5 對之葉片，以去離子水清洗數次，再以直徑 2 mm 之鑽孔器取下葉片，放入含 20 ml 去離子水之試管中，每支試管有 15 片。將試管放入水浴槽處理 25 (對照組)、30、35、40、45、50、55、60、65、70°C 30 分鐘，每支試管為一重複，每處理三重複。待試管冷卻後以電導度計測定破壞前之 EC 值，之後將試管以高溫高壓 (121°C、1.2 $\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$)處理 20 分鐘破壞細胞膜，冷卻後再以電導度計測定破壞後之 EC 值，此後計算熱相對傷害值 (relative injury, RI)，計算方式參照 Martineau 等 (1979)之公式： $\text{RI}(\%) = \{1 - [1 - (T_I/T_F)] / [1 - (C_I/C_F)]\} \times 100$ 。T 和 C 分別為處理組和對照組 (水浴 25°C)，I 和 F 則表示破壞前及破壞後之 EC 值。最後以 Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)繪製相對熱傷害值反應曲線。

六、統計分析

試驗採完全逢機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，試驗數據以軟體 CoStat 6.1 (CoHort software, Minneapolis, USA)以最小顯著差異測驗法 (Fisher's least significant

difference test), 比較 5% 差異性顯著。

結 果

一、相對 DNA 含量估算和根尖染色體觀察

本試驗利用流式細胞儀檢測和計算香石竹相對 DNA 含量, 十二個單朵大花(Standard type)品種相對 DNA 含量可分成三區間, 分別為 2.02-2.08、2.99-3.01 和 3.98-4.08 units, 推測二倍體有 5 品種、三倍體具 2 品種, 及 5 品種為四倍體; 九個多花型 (Spray type) 品種, 經流式細胞儀測定後皆為二倍體, 相對 DNA 含量為 1.96-2.01 units (表 1)。以蘭嶼秋海棠作為標準品, 進一步確認香石竹 'Optimistic'、'Kleos' 和 'Bizet', 皆為不同倍數體 (圖 1J-L)。此外, 檢測出非整倍體之品種 'Barbados' 和 'Butterfly' (Dianthini carnation), 其相對 DNA 含量分別為 4.34 和 4.46 units (表 1)。香石竹 'Festival' 因其相對 DNA 含量最小, 進行香石竹 'Festival' 根尖染色體計數, 染色體數量為 30, 確認為二倍體品種 (圖 2)。

二、植物器官評估: 花朵、保衛細胞和花粉大小

單朵大花品種, 花朵大小並未隨著倍數體增加 (圖 1A-C)。不同倍數性香石竹葉片保衛細胞長寬分別為 35.89-43.50/28.84-33.83 μm (二倍體)、38.47-47.60/32.23-38.27 μm (三倍體)、及 46.86-56.69/34.00-42.58 μm (四倍體), 二倍體和三倍體保衛細胞大小相似 (圖 1D&E), 四倍體較大 (圖 1F)。所有香石竹栽培種花粉皆具大/小花粉, 二倍體花粉為 51.05-53.37/43.20-45.80 μm 、四倍體為 65.14-69.62/42.10-60.54 μm , 而三倍體未產生花粉 (圖 1H); 多花型品種, 保衛細胞長/寬為 37.81-43.26/26.72-34.50 μm , 大/小花粉為 51.16-60.67/40.28-52.99 μm (表 1); 非整倍體品種 'Barbados' 和 'Butterfly', 保衛細胞長/寬分別為 49.50/30.66 μm 和 44.34/30.77 μm 。'Barbados' 未產生花粉, 'Butterfly' 之大/小花粉為 54.26/45.11 μm (表 1)。

三、水浴溫度對不同倍數性香石竹栽培種 RI 值之影響

將三個不同倍數性栽培種之葉片以 25-70°C 之水浴溫度處理 30 分鐘後, 檢測電解質滲漏率計算相對傷害值 (Relative Injury, RI), 結果顯示三個香石竹品種之葉片相對傷害值隨著水浴溫度增加呈 S 曲線變化 (圖 3)。「Optimistic」、「Kleos」和 'Bizet' 55°C 下葉片之 RI 值分別為 72.9、73.8 和 74.9%; 相對傷害曲線中點溫度分別為 50.3、50.3 和 51.4°C; 熱致死溫度分別為 50.4、50.5 和 51.9°C (表 2)。

表 1. 不同香石竹栽培種其倍數性與葉片保衛細胞和花粉大小之相關性^z。Table 1. The correlation between polyploidy level and blade's guard cells and pollen size in carnation cultivars^z.

類型/栽培種 Type/Cultivars	相對 DNA 含量 Relative DNA content (units)	推定倍數 Estimation of ploidy levels	保衛細胞長 Length of guard cells (μm)	保衛細胞寬 Width of guard cells (μm)	大花粉 Size of large pollens (μm)	小花粉 Size of small pollens (μm)
Standard type						
Optimistic	2.02	2x	39.19 jk	33.63 de	52.21 fg	43.44 g
Lajoy	2.03	2x	35.89 m	28.84 k	53.37 ef	45.80 ef
日本王冠	2.04	2x	41.55 i	31.81 gh	-	-
Relax	2.06	2x	36.35 m	29.69 jk	51.05 g	43.20 g
Ajax	2.08	2x	43.50 gh	33.83 de	-	-
Tingva	2.99	3x	47.60 f	38.27 c	-	-
Kleos	3.01	3x	38.47 kl	32.23 fg	-	-
Unknown Peach I	3.98	4x	56.69 a	37.60 c	65.14 b	54.40 b
Yellow Viana	4.01	4x	54.88 b	42.58 a	-	-
Eloah	4.03	4x	51.06 d	37.66 c	-	-
Bizet	4.03	4x	52.77 c	41.59 b	69.62 a	60.54 a
Black Heart	4.08	4x	46.86 f	34.00 d	-	42.10 h
Spray type						
Tia Maria	1.96	2x	41.31 i	33.66 de	-	-
Scaplet Aneen	1.97	2x	43.09 h	32.48 fg	60.67 c	52.99 c
Natila	2.00	2x	38.14 l	26.72 l	-	-
Tarantella	2.00	2x	39.88 j	32.58 fg	-	43.33 g
Festival	2.00	2x	43.26 h	32.99 ef	51.16 g	45.89 ef
Unknown Red I	2.01	2x	37.81 l	29.64 jk	-	46.22 e
Celine	2.01	2x	37.88 l	31.07 hi	58.00 d	48.93 d
Unknown Orange I	2.01	2x	38.38 kl	34.50 d	53.21 ef	43.10 g
Unknown White Purple I	2.01	2x	41.86 i	30.43 ij	53.61 ef	40.28 i
Dianthini carnation						
Barbados	4.34	4.3x	49.50 e	30.66 i	-	-
Butterfly	4.46	4.5x	44.34 g	30.77 i	54.26 e	45.11 f

^z：同行英文字母相同者表示經 Fisher's 最小顯著差異性測驗在 5% 水準之差異不顯著。

^z：Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference test.

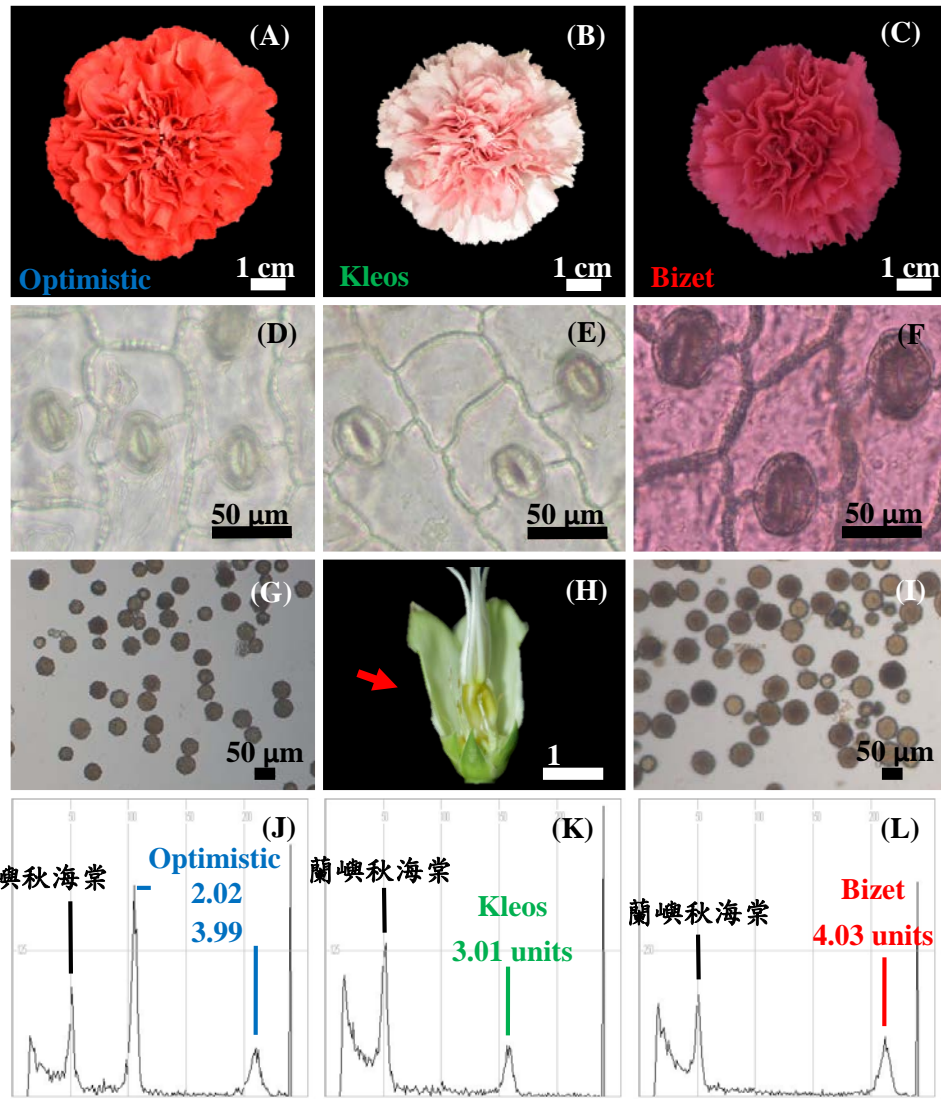


圖 1. 不同倍數性香石竹栽培種之花朵、保衛細胞、花粉及流式細胞儀分析。(A) 二倍體栽培種'Optimistic'。(B) 三倍體栽培種'Kleos'。(C) 四倍體栽培種'Bizet'。(D)-(F) 保衛細胞。(G)、(I) 花粉。(H) 'Kleos'皺縮花藥。(J)-(L) 流式細胞儀分析，標準品：蘭嶼秋海棠，Gain：514，Speed：0.4。

Fig. 1. Flower characteristic, guard cells, pollen grain and flow cytometric analysis of different ploidy level carnation cultivars. (A) Flower of diploid cultivar 'Optimistic'. (B) Flower of triploid cultivar 'Kleos'. (C) Flower of tetraploid cultivar 'Bizet'. (D)-(F) Guard cells. (G) and (I) Pollens. (H) Depauperate anther of triploid cultivar 'Kleos'. (J)-(L) Relative DNA content estimated by flow cytometric analysis. Standard: *Begonia fenicis*. Gain: 514. Speed: 0.4.

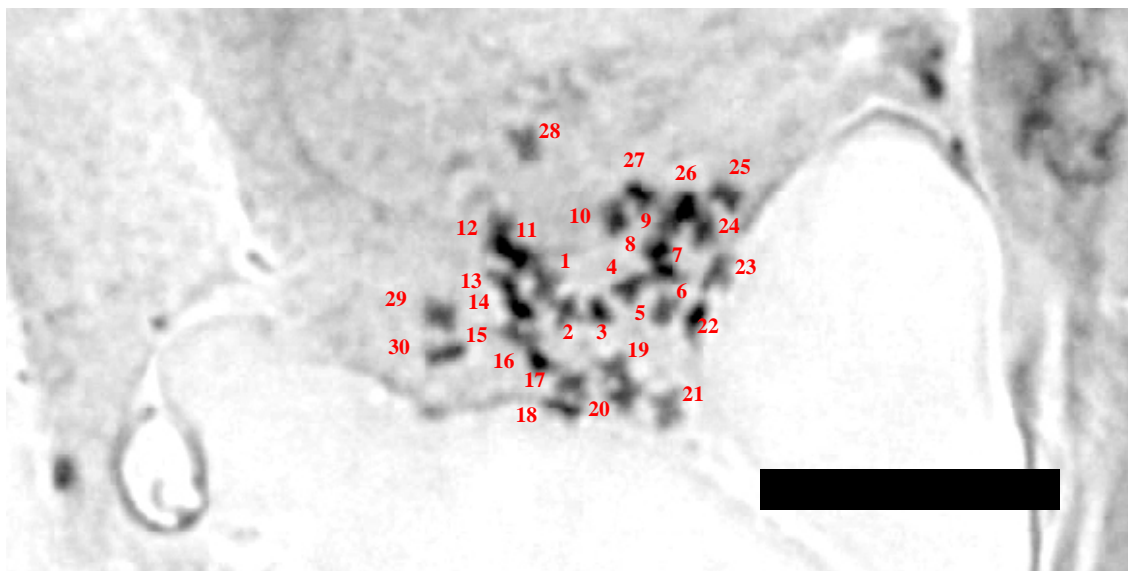


圖 2. 香石竹'Festival'-之根尖染色體圖。2n=2x=30。Bar = 1 mm。

Fig. 2. The chromosome numbers of *D. caryophyllus* 'Festival'. 2n=2x=30. Bar = 1 mm.

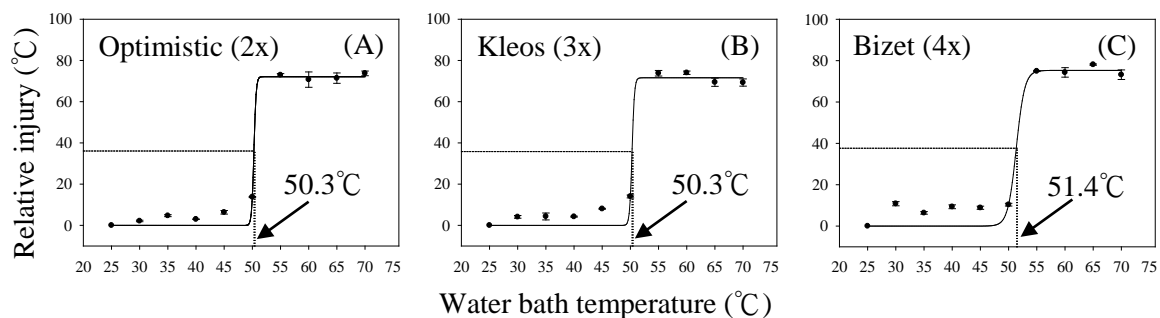


圖 3. 水浴溫度對不同倍數性香石竹栽培種相對熱傷害值之影響。(A) 二倍體栽培種'Optimistic'。(B) 三倍體栽培種'Kleos'。(C) 四倍體栽培種'Bizet'。誤差線代表平均值的標準誤，如果小於標記，則看不見。虛線指出 S 曲線中點溫度之葉片相對傷害值。

Fig. 3. Effect of water bath temperature on relative injury of leaves in different ploidy level carnation cultivars. (A) Diploid cultivar 'Optimistic'. (B) Triploid cultivar 'Kleos'. (C) Tetraploid cultivar 'Bizet'. Error bars represent standard error of the mean and are not visible if smaller than the symbol. Dash line indicated leaf RI at midpoint temperature of the sigmoid curves.

表 2. 不同倍數體香石竹葉片之相對傷害值、S 曲線中點溫度及熱致死溫度。

Table 2. Relative injury (RI) values at 55°C water bath, midpoint temperature (Tmid) of the sigmoid curves, and lethal temperature in different ploidy levels carnation cultivars.

栽培種 Cultivars	相對傷害值 ^z RI(%) at 55°C ^z	相對傷害曲線中點溫度 Tmid (°C)	熱致死溫度 Lethal temperature (°C)
Optimistic (2x)	72.9 a ^y	50.3	50.4
Kleos (3x)	73.8 a	50.3	50.5
Bizet (4x)	74.9 a	51.4	51.9

^z: $RI (%) = \{1 - [1 - (T_i/T_F)] / [1 - (C_i/C_F)]\} \times 100$ 。

^y: 同行英文字母相同者表示經 Fisher's 最小顯著差異性測驗在 5% 水準之差異不顯著。

^z: $RI (%) = \{1 - [1 - (T_i/T_F)] / [1 - (C_i/C_F)]\} \times 100$.

^y: Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference test.

討 論

本試驗將近年市場上流通之 23 個香石竹品種以流式細胞儀檢測相對 DNA 含量，推測有 14 個為二倍體 (1.96-2.08 units)、2 個為三倍體 (2.99 和 3.01 units)、5 個為四倍體 (3.98-4.08 units) 和 2 個為非整倍體 (4.34 和 4.46 units) (表 1)，這結果與八木等 (2007) 研究結果雷同，該試驗結果指出多數香石竹品種為二倍體佔 97.7% (297/304)，少數為多倍體，三倍體約 0.1% (3/304)，四倍體約為 1.3% (4/304)。由於多倍體香石竹通常具晚花的特性，此特性不符合商業生產的期待，因此多倍體香石竹可能於選拔過程中遭淘汰 (Onozaki, 2018)。此外本研究亦發現非整倍體品種 ('Barbados' 和 'Butterfly') (表 1)，此結果與八木等 (2007) 不同，該篇文獻以流式細胞儀檢測 307 個香石竹栽培種並未發現非整倍體，推測其可能原因，由於香石竹雜交背景複雜 (Onozaki, 2018)，近年來為改善香石竹之缺點，已有香石竹與石竹屬物種種間雜交之研究 (小野崎等, 2002; 小野崎等, 2011; 小野崎等, 2013; Nimura *et al.*, 2003; Nimura *et al.*, 2006; Nimura *et al.*, 2008)，又石竹屬物種相對 DNA 含量範圍廣泛 (牛尾等, 2002)，故推測本試驗中非整倍體品種 'Barbados' 和 'Butterfly' 可能為香石竹種間雜交所獲得。

本試驗結果亦發現僅單朵大花之品種可區分成不同倍數體，且二倍體品種保衛細胞長度介於 35.89-43.50 μm，三倍體品種保衛細胞長為 38.47 和 47.60 μm，四倍體品種範圍為 46.89-56.69 μm，保衛細胞寬度並未看出明顯趨勢 (表 1)。八木等 (2007) 調查不同倍數體香石竹氣孔長度的結果顯示，三倍體和四倍體氣孔長度相似且大於二倍體，建議可依氣孔長度初步區分二倍體和多倍體，但本試驗中三倍體品種 'Kleos' 保衛細胞長度與二倍體品種

相近，因此利用保衛細胞長度判斷現今流通之香石竹品種倍數性仍需保守評估。因此本試驗輔再透過建立花粉大小資訊，得知單朵大花二倍體品種大/小花粉直徑分別為 51.05-53.37/43.20-45.80 μm ，四倍體為 65.14-69.62/42.10-60.54 μm ，具明顯差異 (表 1)。然而八木等(2007)並未調查香石竹倍數性和花粉之相關性，先前已發現二倍體雜交石竹(*D. caryophyllus* L. \times *D. japonicus* Thunb.)之花粉大小較其四倍體秋水仙素誘變株小 (Nimura *et al.*, 2006)，又植物三倍體植株通常不具稔性 (Sattler, 2016)，故本研究建議可用花粉大小及型態初步判別香石竹品種之倍數性。此外本試驗供試 23 個品種中，有 14 品種可產生花粉其中有 11 品種出現大小花粉，推測大花粉為未減數配子 (表 1)。已知未減數配子對於物種演化 (Mason and Pires, 2015)及育種 (Younis *et al.*, 2014)扮演重要角色，玫瑰花(El Mokadem *et al.*, 2002)、百合 (Chung *et al.*, 2013)、秋海棠 (Dewitte *et al.*, 2009)和香石竹 (Zhou *et al.*, 2015)已證實具有大小孢子現象。通常未減數分裂配子產生與逆境相關，如玫瑰花發現處理 30°C 以上高溫，會提升未減數配子發生的比率 (Pécricx *et al.*, 2011)。因此推測本試驗大部分有產花粉之香石竹品種具有未減數配子的原因可能為 5-7 月高溫環境導致 (Zhou *et al.*, 2015)。然而本試驗中，'Unknown Red 1'並未發現大花粉，先前的研究亦發現香石竹並非所有栽培種均會產生未減數配子，且未減數配子形成比率與每個品種間有所不同，推測品種間是否形成未減數配子與遺傳差異相關 (Zhou *et al.*, 2015)。

將三個不同倍數性品種處理不同水浴溫度檢測電解質滲漏率計算 RI 值，其中 55°C 下葉片之 RI 值沒有顯著差異 (表 2)，顯示這三種香石竹不同倍數性品種其耐熱性可能相似。與其他石竹屬物種比較，黃 (2017)指出石竹屬物種 55°C 水浴處理，葉片 RI 值為 11.7-73.5%，相對傷害曲線中點溫度為 51.7-55.6°C，熱致死溫度為 52.2-56.1°C，其參試物種中於馬祖採集的長萼瞿麥 (*D. superbus* L. var. *longicalycinus*)有最佳的細胞膜熱穩定性 (黃, 2017)。而本試驗三個不同倍數性香石竹品種 55°C 下葉片之 RI 值較高為 72.9-74.9%，相對傷害曲線中點溫度較低為 50.3-51.4°C，熱致死溫度較低為 50.4-51.9°C (表 2)，結果顯示不同倍數性香石竹品種高溫水浴處理仍與其他石竹屬物種類表現不同，但與實際高溫耐熱性仍須後續研究比較證實。

總結，試驗結果指出現今流通之香石竹品種倍數性與保衛細胞及花粉大小呈正相關趨勢，三倍體品種不具花粉，未來可透過測量保衛細胞和花粉大小進行初步篩選，並透過流式細胞儀再次確認，此研究方法建立可有效節約流式細胞儀高額檢測藥材耗品使用，並為香石竹倍數性評估及育種工作提供基礎資訊建立。此外本篇文獻提供不同倍數性香石竹細胞膜熱穩定性之結果，未來本篇研究結果將可結合高溫環境逆境，比較對其香石竹生長量之影響及表現，以建立其相關性。

參考文獻

- 八木雅史、藤田祐一、吉村正久。2007。フローサイトメトリーによるカーネーション栽培品種の倍数性の網羅的推定。花き研究所研究報告 7: 9-16。
- 小野崎隆、池田広、山口隆、姫野正己、天野正之、柴田道夫。2002。萎凋細菌病抵抗性中間母本'カーネーション農1号'の育成とその特性。園芸学研究 1: 13-16。
- 小野崎隆、八木雅史、藤田祐一、棚瀬幸司。2011。花持ち性の優れるカーネーションとカワラナデシコとの種間雑種および戻し交雑系統の特性。園芸学研究 10: 161-172。
- 小野崎隆、八木雅史、棚瀬幸司。2013。カーネーション、カワラナデシコ種間雑種および戻し交雑系統における開花の早晚性と日長反応性ならびに早生性の遺伝性。園芸学研究 12: 351-359。
- 牛尾亜由子、小野崎隆、柴田道夫。2002。フローサイトメーターによる *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性測定。花き研究所研究報告 2: 21-26。
- 行政院農業委員會。2020。農產品生產量值統計。農業統計資料查詢。
<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>。
- 李誠紘。2019。玉米雄配子發育時期之 B 染色體相關 cDNA-AFLP 標誌篩選與分析及玉米變異 B 染色體-Btd 之分析。國立中興大學農藝學系碩士學位論文。126pp。
- 曾夢蛟。1990。溫度逆境生理在園藝育種上之應用。園藝作物育種講習會專刊。臺灣省農業試驗所。pp. 69-79。
- 黃智暉。2017。花壇用種間雜交石竹之選育。國立台灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系碩士論文。114pp。
- 廖晨皓。2019。不同倍数性聖誕紅之生理性狀評估及育成。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。116pp。
- 魏芳明。2005。香石竹。台灣農家要覽-農作篇 (二) (增修訂三版)。行政院農業委員會。pp. 691-694。
- Aragane, M., D. Watanabe, J. Nakajima, M. Yoshida, M. Yoshizawa, T. Abe, R. Nishiyama, J. Suzuki, T. Moriyasu, D. Nakae, H. Sudo, H. Sato, A. Hishida, N. Kawahara, S. Makabe, I. Nakamura, and M. Mii. 2014. Rapid identification of a narcotic plant *Papaver bracteatum* using flow cytometry. *J. Nat. Med.* 68: 677-685.
- Balao, F., R. Casimiro-Soriguer, M. Talavera, J. Herrera, and S. Talavera. 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. *Ann. Bot.* 104: 965-973.
- 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.
- Chung, M. Y., J. D. Chung, M. Ramanna, J. M. Van Tuyl, and K. B. Lim. 2013. Production of

- polyploids and unreduced gametes in *Lilium auratum* × *L. henryi* hybrid. *Int. J. Biol. Sci.* 9: 693-701.
- Dewitte, A., T. Eeckhaut, J. Van Huylenbroeck, and E. Van Bockstaele. 2009. Meiotic aberrations during 2n pollen formation in *Begonia*. *Heredity*. 104: 215-223.
- El Mokadem, H., L. Crespel, J. Meynet, and S. Gudin. 2002. The occurrence of 2n-pollen and the origin of sexual polyploids in dihaploid roses (*Rosa hybrida* L.). *Euphytica*. 125: 169-177.
- Ishizaka, H., T. Oku, K. Mishiba, M. Mii. 2009. Identification of ploidy level of *Cyclamen rohlfsianum* plants through flow cytometric and cytological analysis of *C. rohlfsianum*, *C. purpurascens* and their hybrid. *Cytologia*. 74: 457-465.
- Johnston, S. A. and R. E. Hanneman. 1980. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am. Potato J.* 57: 7-14.
- Martineau, J. R., J. E. Specht, J. H. Williams, and C. Y. Sullivan. 1979. Temperature tolerance in soybeans I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.* 19: 75-78.
- Mason, A. S. and J. C. Pires. 2015. Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends Genet.* 31: 5-10.
- 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, H. Horaguchi, M. Mii, K. Sakai, and T. Katoh. 2006. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicas* Thunb. *Breed. Sci.* 56: 303-310.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii, and K. Ohishi. 2008. Cross-compatibility and the polyploidy of progenies in reciprocal backcrosses between diploid carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and its amphidiploid with *Dianthus japonicus* Thunb. *Sci Hortic.* 115: 183-189.
- Onozaki, T. 2018. *Dianthus*. In: *Ornamental Crops*, Johan Van Huylenbroeck (eds.), Springer. pp. 349-381.
- Pécricx, Y., G. Rallo, H. Folzer, M. Cigna, S. Gudin, and M. Le Bris. 2011. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *J. Exp. Bot.* 62: 3587-3597.
- Sattler, M. C., C. R. Carvalho, and W. R. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 243: 281-296.
- Yagi, M., T. Kimura, T. Yamamoto, and T. Onozaki. 2009. Estimation of ploidy levels and breeding backgrounds in pot carnation cultivars using flow cytometry and SSR markers. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 78: 335-343.

- Yeh, D. M. and H. F. Lin. 2003. Thermostability of cell membranes as a measure of heat tolerance and relationship to flowering delay in chrysanthemum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 656-660.
- Younis, A., Y. J. Hwang, and K. B. Lim. 2014. Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. *Plant Cell Rep.* 33: 215-223.
- Zhou, X. H., X. J. Mo, M. Gui, X. W. Wu, Y. L. Jiang, L. L. Ma, Z. M. Shi, Y. Luo, and W. R. Tang. 2015. Cytological, molecular mechanisms and temperature stress regulating production of diploid male gametes in *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Physiol. Biochem.* 97: 255-263.
- Zhou, X., Y. Su, X. Yang, Y. Zhang, S. Li, M. Gui, and J. Wang. 2017. The biological characters and polyploidy of progenies in hybridization in 4x-2x crosses in *Dianthus caryophyllus*. *Euphytica.* 213: 118.

The Correlation between Polyploidy Level and Plant Characteristics and Cell Membrane Thermostability in Carnation

Zheng-Hong Chen¹⁾ Yen-Ming Chen²⁾

Key words: Carnation, Flow cytometry, Ploidy level, Guard cell, Pollen, Cell membrane thermostability

Summary

In present study, the ploidy levels of various carnation cultivars were analyzed by flow cytometry to establish the correlation between ploidy levels and plant characteristics for early selection. In addition, the cultivars were investigated the electrolyte leakage and calculated relative injury (RI) to evaluated the relationship between polyploidy level and cell membrane thermostability. The results indicated 14 cultivars were diploid, 2 cultivars were triploid, 5 cultivars were tetraploid, and 2 cultivars were aneuploidy among 23 commercial cultivars by flow cytometry. The length of guard cells of diploid, triploid, and tetraploid exhibited a positive correlation with the ploidy levels, but the width were no relationship. Most carnation cultivars had large/small pollen grains. Pollen size (large/small) of diploids, tetraploids, and aneuploidys were 51.05-60.67/40.28-52.99 μm , 65.14-69.62/42.10-60.54 μm , and 54.26/45.11 μm , and triploid cultivars without pollen. The cell membrane thermostability indicated that relative injury (RI) values of different ploidy cultivars at 55°C were no significant difference, midpoint temperature (T_{mid}) of the sigmoid curves were 50.3-51.4°C, and lethal temperature were 50.4-51.9°C.

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

2) Assistant professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.

