

扇形文心蘭品系及品種染色體數分析

莊子平¹⁾ 鄭雅銘²⁾ 陳昌岑³⁾ 張正⁴⁾

關鍵字: 扇形文心蘭、染色體、核型、螢光原位雜合

摘要: 扇形文心蘭 (*Erycina pusilla*) 之染色體數為 $2n=12$ 。近年來則確認了自然界中有不同染色體數 ($2n=10$) 的扇型文心蘭族群存在，並建立了兩族群的核型圖譜。本研究室歷年來發展出了許多扇型文心蘭品系，希望藉由根尖染色體觀察、核型組成測量及螢光原位雜合技術鑑定扇形文心蘭各品系的核型特性。試驗樣本中涵蓋了自交選拔品系及品種、化學誘變選拔品系。研究結果顯示多數自交選拔品系之染色體數為 $2n=11$ ，也有染色體數為 $2n=20$ 、 21 、 22 、 24 的品系，各品系的核型組成也不盡相同。而在自交選拔品系 EP05 上之原位雜合結果則顯示核型中遺失了一條具 5S rDNA 之染色體。這些結果顯示試驗材料可能因本身核型歷經複雜的重排事件，使得後續配對時再度發生染色體重排之機率提高。另一方面，長期的瓶內培養環境也可能對植株的減數或有絲分裂產生影響，而使得遺傳穩定性發生改變。

前 言

扇形文心蘭 (*Erycina pusilla* (L.) Williams *et al.*) 具有幼年期短、週年開花，以及瓶內開花之特性 (Livinston, 1962; Sheehan and Sheehan, 1989; Chiu *et al.*, 2011)，為近年備受矚目的原種蘭花。在過去關於扇形文心蘭染色體數的報導共有 $2n=10$ 、 12 兩種不同細胞型 (Dodson, 1957a; 1957b; Felix and Guerra, 1999; 2000)，相關研究透過以 45S 及 5S rDNA 進行螢光原位雜合，建立了扇形文心蘭之核型圖譜，並發現在演化過程中，核型歷經了複雜

-
- 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教授。
 - 3) 行政院農業委員會農業試驗所技術服務組研究員。
 - 4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者

的染色體重排 (Yeh *et al.*, 2015; 2017a; 2017b)。這些細胞遺傳資訊的建立，有助於後續研究者在進行育種或試驗時參考。因此本試驗藉由觀察各品系及品種之染色體數，作為鑑定遺傳特性的基礎資訊，並探討造成染色體數或核型變異的潛在原因。

材料與方法

一、試驗材料

試驗品系包含 (1)自交選拔品系及品種，共有品系代號 EP01~EP07 及品種'興大黃金'；(2)化學誘變品系，共有品系代號 EP11、12 (表 1)。所有自交選拔品系及品種'興大黃金'均為民國 96 年時自清華蘭園所購入的實生瓶苗 (已鑑定染色體數為 $2n=12$)，自交後所衍生的子代；扇形文心蘭化學誘變品系則為以興大黃金為試驗材料，利用秋水仙素誘變所選拔出之品系 (林，2013)；所有品系中除 EP11 外，均為於長期瓶內培養過程中分芽增殖之植株。

品系 EP11 以 PLB 營養系增殖系統提供，PLB 以 MS (Murashige and Skoog, 1962) 基礎培養基[大量及微量鹽類為半量，其中 NH_4NO_3 及 KNO_3 為 1/8 量， $\text{NaFe}\cdot\text{EDTA}$ 、 FeSO_4 、vitamin、glycine 為全量、170 mg/L NaH_2PO_4 (Hayashi Pure Chemical Ind., Co., Ltd., Japan)、20 g/L 蔗糖 (Taiwan Sugar Corporation, Taiwan)、150 ml/L 椰子水 (ZICO, Los Angeles, USA)、100 mg/L myo-inositol (Sigma-Aldrich Co., USA)、1g/L 活性碳、1g/L peptone (Uni-Onward Co., Taiwan)、8 g/L agar (Trade Mark, Taiwan)，以 0.1 N HCl 或 NaOH 調整 pH 值至 5.2]進行培養，培養環境為溫度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、光週期 12/12 小時、光度 $5.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每三個月繼代一次。同時自母瓶中挑選具 3~5 片小葉且具根之苗株，繼代至子瓶中。

所有試驗品系植株均培養於 MS 基礎培養基[大量及微量鹽類為半量；其中 $\text{NaFe}\cdot\text{EDTA}$ 、 FeSO_4 、vitamin、glycine 為全量、170 mg/L NaH_2PO_4 、20 g/L 蔗糖、150 ml/L 椰子水、100 mg/L myo-inositol、1g/L 活性碳、1g/L peptone、8 g/L agar，以 0.1 N HCl 或 NaOH 調整 pH 值至 5.2]，培養環境為溫度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、光週期 12/12 小時、光度 $56\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每 3 個月繼代一次。

二、扇形文心蘭品系及品種之染色體數鑑定及核型測量

(一)根尖染色體觀察

根尖處理及染色體觀察方法參照馮 (2014)中玉米根尖有絲分裂中期染色體鑑定之試驗方法。首先於操作台中以解剖刀切取植株剛萌發之根尖 (約 5 mm 為佳)，將根尖放入離心管中，依序加入 1 ml 去離子水、2.5 μl BrNa、3.5 μl DMSO，於常溫避光環境下靜置 5 小時。接著移除管內液體，加入固定液 (Farmer's solution, 95% 酒精/冰醋酸= 3/1，須即時配置使用)，置於 4°C 冰箱中避光處理至少 8 小時。

表 1. 扇形文心蘭各品系及品種之染色體數。

Table 1. Chromosome number of *Erycina pusilla* lines and cultivar.

Experiment material type	Line code/cultivar name	Chromosome number ^z
Self-crossing selected lines	EP01	11
	EP02	11
	EP03	11
	EP04	11
	EP05	11
	EP06	24/11
	EP07	22
Self-crossing selected cultivar	<i>Erycina pusilla</i> 'Hsinda Golden'	22/11
Chemical mutation selected lines	EP11	20
	EP12	21

^z The chromosome number of diploid (2n).

將管內固定液移除，加入 1 N HCl (液面高過處理樣本即可) 靜置 10 分鐘，移除 HCl 後再加入一次 1 N HCl，並置於 60°C 乾浴鍋 10 分鐘。將離心管移出乾浴鍋，並移除 HCl，再於管中加入二次水 (液面高過處理樣本即可) 清洗根尖兩次，接著加入 50 µl Feulgen，置於常溫避光環境下 1 小時。移除 Feulgen 後加入 50 µl 1% pectinase，置於常溫避光環境下 1 小時，最後移除 pectinase，加入去離子水 (液面高過處理樣本即可) 並置於 4 °C 冰箱中保存。觀察時以鑷子夾取處理好之根尖，置於載玻片中央，並切去其餘未呈粉紫色部分，滴上醋酸洋紅約 17.5 µl 並將其搗碎，蓋上蓋玻片，以酒精燈進行間歇性火烤 (每次約 1~2 秒，重複約 30~40 次)，再以濾紙包裹玻片後，用力按壓蓋玻片將多餘醋酸洋紅排出。根尖玻片以顯微鏡 (Olympus, BX50, Japan) 進行觀察及染色體計數，並拍照記錄 (Olympus, DP72, Japan)。

(二) 核型組成測量

取自交選拔品系 EP01-EP03、品種'興大黃金'、化學誘變品系 EP11-EP12 至少五個可

清晰辨認染色體型態及數量之細胞，以 Image J software (LOCI, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) 量測各染色體之染色體長、長短臂長，並依照獲得數據換算染色體臂長比(長臂測量值/短臂測量值)，依據染色體外觀、染色體長度及臂長比進行染色體配對。並依照臂長比對染色體之型態進行分類：

臂長比 1.0-1.7 為中位中節染色體 (metacentric chromosome, M)；1.7-3.0 為次中位中節染色體 (submetacentric chromosome, Sm)；3.0-7.0 為近末端中節染色體 (acrocentric chromosome, t)；7.0-∞ 為末端中節染色體 telocentric chromosome, T)，再以核型公式 ($nM+nSm+nt+nT$, n = chromosome number of the type) 進行表示。

三、螢光原位雜合分析

本試驗之螢光原位雜合技術中探針製備、根尖染色體製備，及雜合方法均參照馮 (2014) 中試驗方法。

(一) 45S 及 5S rDNA 序列之質體構築及質體純化抽取

45S rDNA 序列 (來自小麥 *Triticum aestivum*) 構築於質體 pTA71(9-kb)；5S rDNA 序列則來自玉米 *Zea mays*，並構築於質體中 (約 2.5-kb)。含有質體之轉型大腸桿菌菌株均由國立成功大學生命科學系張松彬 副教授之研究室慷慨提供。接著參照質體純化套件 (Plasmid Miniprep Purification Kit, GeneMark) 之操作步驟進行抽取。首先將事先培養好含有上述質體之大腸桿菌液倒入離心管中，以離心機 (機型) 進行離心 (12,000 rpm, 1 min)。倒出上清液，加入 200 μ l Solution I 並震盪均勻，再加入 200 μ l Solution II，輕晃離心管 3~5 下，加入 200 μ l Solution III 並輕晃 3~5 下後進行離心 (12,000 rpm, 5 min)。吸取管中上清液，滴入組合好的 Spin column 及下部收集管中並離心 (12,000 rpm, 1 min)，接著倒去收集管中的下清液，加入 700 μ l Wash Solution 後離心 (12,000 rpm, 1 min)，再加入一次 700 μ l Wash Solution 後離心 (12,000 rpm, 10 min)。丟棄下部之收集管，並將上部的 Spin column 放至新離心管上，加入 40 μ l Elution solution (60 °C)，待 2 分鐘反應後離心 (12,000 rpm, 1 min)，最後去除上部 Spin column，存放於 -20 °C 下。

(二) 探針製備

取一已滅菌之離心管，於離心管中依序加入 1.8 μ l 去離子水、1 μ l NT buffer (DNA polymerase I buffer : DNase I buffer = 1:1)、0.8 μ l 0.5 mM dUTP、0.2 μ l 1M DIG/Biotin-dUTP、5 μ l Plasmid DNA、0.2 μ l DNA Polymerase I (10 u/ μ l, NEB)、1 μ l 1/800X DNase I (2 u/ μ l, NEB)，最後總體積為 10 μ l，於 15 °C 乾浴鍋中待作用 20 分鐘，過後將離心管置於冰上，取 1 μ l 進行電泳分析，若顯現之條帶過大，則再加入 1 μ l 1/800X DNase I，重複以上步驟至條帶集中在約 1000 bp 處，即可加入 1 μ l 3M NaOAc 及 200 μ l 99.8% EtOH，於 -20 °C 下進行沉澱一天。接著進行低溫離心 (12,000 rpm, 10 min, 4 °C)，而後倒去 EtOH，再加入 200 μ l 99.8% EtOH，進行低溫離心 (12,000 rpm, 5 min, 4 °C)，然後倒去 EtOH，倒扣離心管待

乾直至管內呈完全透明，最後加入 10 μ l FISH buffer 中，輕拍離心三次後即保存於-20 $^{\circ}$ C 下，待後續試驗步驟使用。

(三) 根尖固定及染色體製備

切取染色體數為 $2n = 11$ 之自交選拔品系 (本試驗選取品系 EP05) 之剛萌發根尖，並參照前述根尖染色體觀察試驗中根尖固定之方法備妥材料。接著切下根尖前端白色部分，放入內含 30 μ l Enzyme buffer 的離心管中，待其作用 10 分鐘。接著移除 Enzyme buffer 並離心乾淨，加入 15 μ l CP solution (2% cellulase, 1% pectinase)，置於 37 $^{\circ}$ C 乾浴鍋中 4 小時。過後移除 CP solution，並加入 30 μ l 45% acetic acid，待其作用 10 分鐘，期間配製固定液(ethanol : acetic acid = 1:1)。接著移除 acetic acid，再加入 300 μ l 現配固定液，並利用吸量管將軟化之根尖與固定液均勻混合為細胞液。吸取 20 μ l 細胞液，滴於乾淨載玻片中央，再於相同位置滴上 15 μ l 的固定液，並以刻刀於載玻片背面刻劃出細胞液擴散邊界，待玻片靜置風乾後，以相位差顯微鏡檢查玻片上是否有合適可觀察染色體的細胞，並標記細胞群位置，接著將玻片放入乾燥箱中乾燥過夜，最後將玻片存放於防潮箱中，待後續試驗步驟使用。

(四) 探針雜合雜合訊號觀察

首先須進行脫水處理。將玻片依序進行以下步驟: 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0) 中 5 分鐘、4% formaldehyde 10 分鐘、2X SSC 中 5 分鐘、2X SSC 中 5 分鐘、70% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘。接著待玻片瀝乾後，才可進行變性(denature)處理，依序進行以下步驟：70% formamide (72 $^{\circ}$ C，2.5 分鐘)、70% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘、95% EtOH 5 分鐘，接著待玻片瀝乾後進行探針雜合。吸取 20 μ l 已備妥的 probe mixture [每玻片需先前置備好的 probe 1 (DIG) 及 probe 2 (Biotin) 各 2 μ l，FISH buffer 將體積補到 21 μ l，於 85 $^{\circ}$ C 下作用 10 分鐘，置於冰上 5 分鐘以上]，分散滴於載玻片上，並蓋上蓋玻片，以 rubber cement 封好邊緣，將玻片放入保濕盒中，並將其置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中 24 小時進行雜合反應。雜合過後，滑除蓋玻片，並快速放入 wash buffer (20% formamide) 中 10 分鐘，接著依序進行 3 次 2X SSC 5 分鐘、4XT (4X SSC, 0.1% Tween 20) 5 分鐘的處理(以上處理均須於 37 $^{\circ}$ C，搖晃 80 下/分鐘之水浴鍋中進行)。接著於避光環境下於玻片上滴入備好之 50 μ l antibody mixture (0.25 μ l anti-dig-FITC 1/200X, 0.25 μ l avidin-rhodamine 1/200X, 50 μ l 4XT)，蓋上塑膠片後，放入保濕盒中並置於 37 $^{\circ}$ C 生長箱中 1 小時反應。滑除塑膠片後，經 3 次 4XT 5 分鐘(須於 37 $^{\circ}$ C，搖晃 80 下/分鐘之水浴鍋中進行)，晾乾玻片後加上 25 μ l DAPI (50 ng/ml)，蓋上蓋玻片後以指甲油進行封片，待乾後即可以螢光顯微鏡(Olympus, BX51, Japan)觀察或是存放於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，並須在 7 天內鏡檢及拍照記錄 (Olympus, DP72, Japan)。

結 果

一、扇形文心蘭各品系染色體數

本次試驗除 EP02 及 EP03 品系葉片上具斑紋外，其餘品系在植株性狀上並未有差異。品系 EP04-EP06 則未能觀察其花朵性狀，其餘品系之花朵性狀可參照圖 1。

在自交選拔品系中，EP01-EP05 之染色體數均為 $2n=11$ (圖 2A-E)，與目前學術界所認定的 $2n=12$ 有所差異。EP06 則為正常染色體數之四倍體，染色體數為 $2n=24$ ，但也有觀察到少數為 $2n=12$ 的細胞(圖 2F·G);EP07 為異常染色體數的四倍體，染色體數為 $2n=22$ (圖 2H)。而在扇形文心蘭品種興大黃金上，則同時觀察到 $2n=11$ 及 $2n=22$ 的細胞，且有同一根尖中均觀察到相同染色體數，或是同一根尖同時具有不同染色體數細胞的情形存在(圖 2I·J)。在興大黃金的秋水仙素誘變選拔品系 EP11 中，則觀察到 $2n=20$ 的染色體數(圖 2K); 另一誘變選拔品系 EP12 之染色體數則為 $2n=21$ (圖 2L)。本次試驗所觀察到之各品系染色體數詳見表 1。

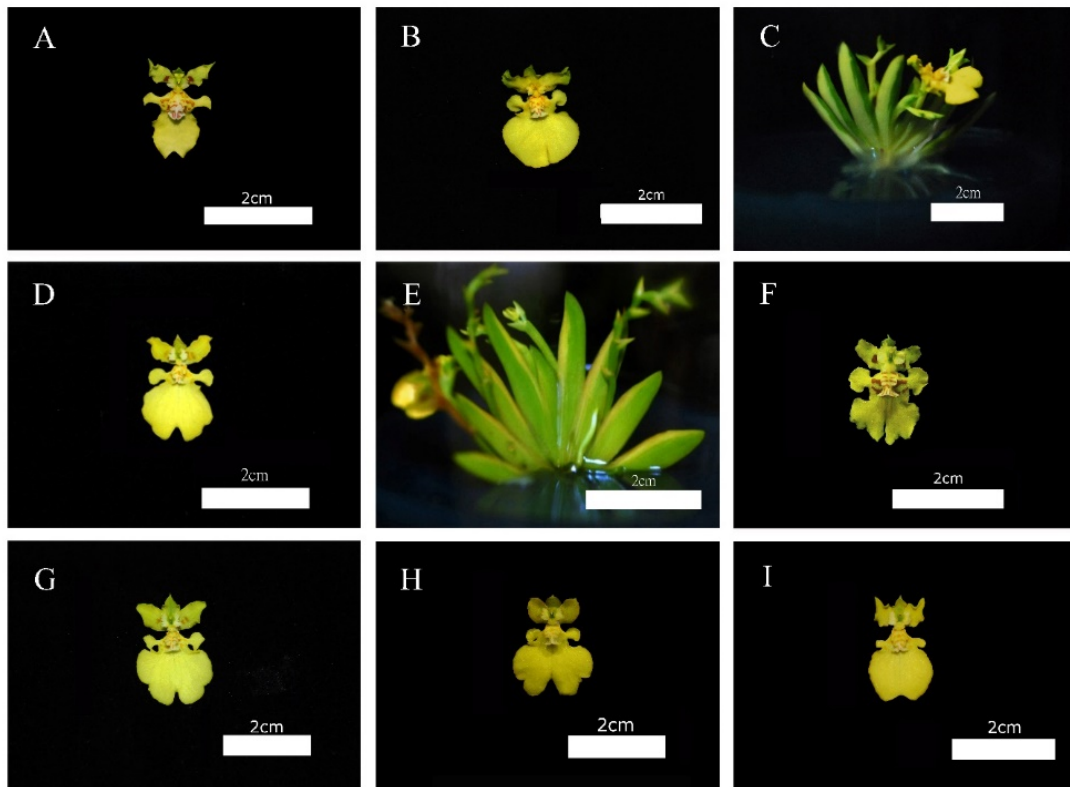


圖 1. 扇形文心蘭品系之花朵與植株性狀。

Fig. 1. Flower and plant character of *Erycina pusilla* lines.

(A) EP01; (B), (C) EP02; (D), (E) EP03; (F) EP07; (G) 'Hsinda Golden'; (H) EP11; (I) EP12.

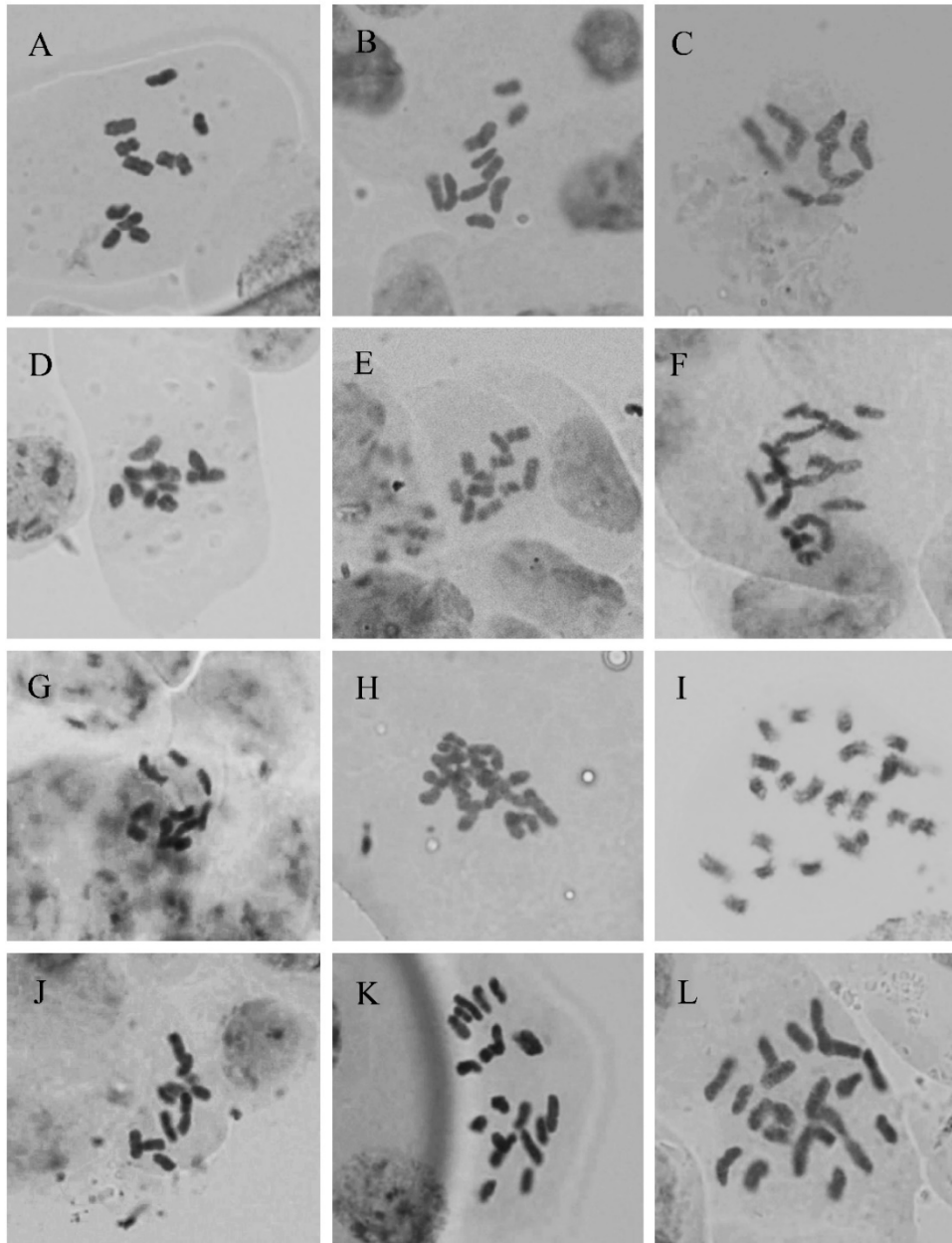


圖 2. 扇形文心蘭品系之染色體觀察。

Fig. 2. The chromosome observation of *Erycina pusilla* lines and cultivar.

(A) EP01, $2n=11$; (B) EP02, $2n=11$; (C) EP03, $2n=11$; (D) EP04, $2n=11$; (E) EP05, $2n=11$;
(F) EP06, $2n=24$; (G) EP06, $2n=12$; (H) EP07, $2n=22$; (I) 'Hsingda Golden', $2n=22$; (J)
'Hsingda Golden', $2n=11$; (K) EP11, $2n=20$; (L) EP12, $2n=21$.

二、扇形文心蘭各類型品系之核型組成

自交選拔品系 EP01 之核型中包含 7 條中位中節染色體及 4 條次中位中節染色體；自交選拔品系 EP02 及 EP03 之核型則為 11 條中位中節染色體；品種興大黃金之 $2n=22$ 細胞之核型中包含 14 條中位中節染色體及 8 條次中位中節染色體， $2n=11$ 細胞之核型中則包含 7 條中位中節染色體、2 條次中位中節染色體以及 2 條近末端中節染色體；化學誘變品系 EP11 之核型中包含 18 條中位中節染色體及 2 條次中位中節染色體，EP12 之核型則包含 15 條中位中節染色體及 6 條次中位中節染色體（表 2）。

三、5S 及 45S rDNA 序列定位結果

圖 3 為扇形文心蘭自交品系 EP05 之雜合定位結果，該品系染色體上 5S rDNA 位點僅有一個，位於染色體近末端（圖 3A）；此品系染色體上 45S rDNA 位點則有二個，同樣位於染色體之末端（圖 3B）。而在圖 3 (C) 中也顯示 5S 及 45S rDNA 並未有位在同一處或同一染色體上的現象。

表 2. 扇形文心蘭品系及品種之染色體數及核型特性。

Table 2. The chromosome number and karyotype character of *Erycina pusilla* lines and cultivar.

Investigation item	Line code/cultivar name					
	Self-crossing selected lines			Self-crossing selected cultivar	Chemical mutation selected lines ^x	
	EP01	EP02	EP03	<i>Erycina pusilla</i> 'Hsinda Golden'	EP11	EP12
Chromosome number ^z	11	11	11	22/11	20	21
Karyotype constitution ^y	7M+4Sm	11M	11M	14M+8Sm/7M+2Sm+2t	18M+2Sm	15M+6Sm

^z The chromosome number of diploid (2n).

^y Letter 'M' indicates chromosome with arm ratio 1.0-1.7 ; 'Sm' indicates chromosome with arm ratio 1.8-3.0 ; 't' indicates chromosome with arm ratio 3.1-7.0 ; 'T' indicates chromosome with arm ratio 7.1-∞.

^x Colchicine-induced mutation of *Erycina pusilla* 'Hsinda Golden'.

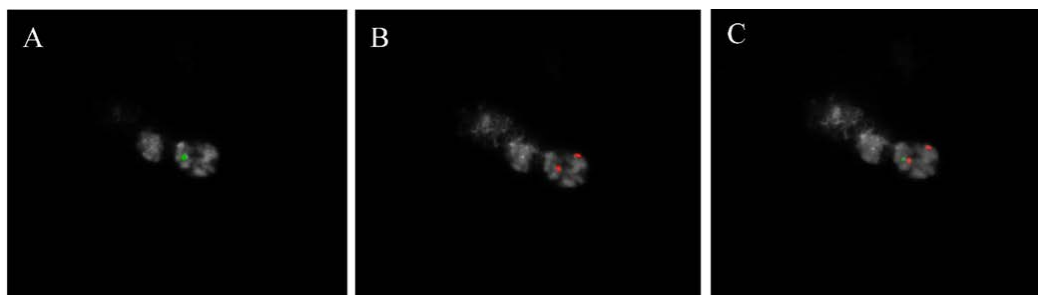


圖 3. 扇形文心蘭品系 EP05 之 5S 及 45S rDNA 之有絲分裂中期染色體定位結果。

Fig. 3. The 5S and 45S rDNA loci on mitotic metaphase chromosome of the *Erycina pusilla* line code EP05.

(A) 5S rDNA (green); (B) 45S rDNA (red); (C) Merged image of 5S and 45S rDNA loci.

討 論

一、扇形文心蘭染色體數之變異原因探討

自交選拔品系 EP01-07 中，所觀察到的染色體數多為 $2n=11$ ，與學界認知的染色體數 $2n=12$ 有所不同。同時也觀察到在各類型品系及品種之核型組成也不盡相同。在 Yeh 等人 (2015; 2017b) 的報導中，確定了 $2n=10$ 細胞型 (cytotype) 存在。兩細胞型在外觀上並沒有差異，兩者互交後可以獲得染色體數 $2n=11$ 的子代。然而本次所觀察到具有 $2n=11$ 染色體數的品系均為親本自交所獲得，且親本之染色體數已確認為 $2n=12$ ，因此其染色體數變異原因並非來自不同細胞型間的雜交。此外 Yeh 等人 (2017b) 也指出扇形文心蘭之染色體間的重排事件繁多，這可能影響到自身的遺傳穩定性。而本次試驗中在 EP01-EP05 上所觀察到的染色體數變異為 $2n=11$ 的結果，也可能是透過染色體重排的機制演變而來。這些染色體重排事件可能發生於有性生殖中減數配子產生及營養繁殖之細胞分裂的過程。

減數配子生成時，同源染色體間會發生聯會及同源重組，此一機制可能使染色體之長度及組成等特性發生改變。後續配對時除依靠外觀及大小進行配對外，也可能依照同源染色體片段來進行配對，因此如同源片段重組至其他染色體上，可能造成三條染色體配對的情形，造成不對等減數分裂，導致具有非常態性單套染色體數的配子產生，該配子再與正常的單套配子結合後，便可能產生染色體數異常的子代 (Schubert and Rieger, 1985; Schubert and Lysak, 2011)。另一方面瓶內培養的環境、培養基成分，以及培養對培植體細胞分裂週期所造成的影響等因素均可能誘發培植體產生變異，其中也包括了染色體數的改變 (Bairu *et al.*, 2011)。Devi 等人 (2015) 以印度豬籠草 (*Nepenthes khasiana*) 進行莖節瓶內

扦插對遺傳穩定性(genetic fidelity)的影響的研究中，也發現經過多次的培養再生後，培植體中含有的變異染色體數的細胞顯著增加。Sacristan (1971)也在還陽參屬 (*Crepis capillaris*) 經癒傷組織 (callus)所增殖出來的後代中發現相同情況，比對變異細胞與正常細胞的染色體核型後也顯示確實有染色體重排的情形發生。這些變異可能是因分裂過程中，紡錘體受到干擾進而造成著絲時的錯誤，抑或是染色體的斷裂等情形造成。其中染色體斷裂的位點通常會位於染色體較晚開始複製的區塊，如異染色質豐富處、中節處 (Sacristan, 1971; Devi *et al.*, 2015)。本次試驗中，在扇形文心蘭各品系中除了觀察到染色體數的變異外，也發現各品系的核型組成也有所差異，可能也可作為發生染色體重排的一個佐證。

二、5S 及 45S rDNA 定位結果比對

根據本次原位雜合結果，可確認品系 EP05 核型中共具 1 個 5S rDNA 及 2 個 45S rDNA 位點，比對 Yeh 等人 (2017b)所建構的兩細胞型核型圖譜後，可發現品系 EP05 之核型與 $2n=12$ 之細胞型較為接近，主要差異點就在於 5S rDNA 位點為一個而非一對，因此可推斷品系 EP05 染色體數之變異是因帶有一 5S rDNA 的染色體遺失。其原因可能牽涉前述所提到的染色體重排，扇形文心蘭核型中的染色體在大小上並未相差甚大，如在繁殖及培養的過程中發生重排，而後又在減數分裂時發生配對上的錯誤，極有可能造成染色體數變異 (Schubert and Rieger, 1985; Schubert and Lysak, 2011)。除了染色體之間結構的交換外，減數分裂或有絲分裂過程中如紡錘體或著絲時的失誤也可能參與其中 (Bairu *et al.*, 2011)。然而目前仍需後續試驗確定其他品系的染色體數變異是否也來自染色體的遺失。

三、扇形文心蘭倍體數變異原因之探討

品系中染色體數異常的狀況，除了染色體數減少外，在品系 EP07、興大黃金中則觀察到異常染色體數的四倍體 ($2n=22$)的情形，以下針對可能造成多倍體化之因素進行探討。在有性生殖上，未減數配子 (unreduced gamete)的產生可能驅使物種的多倍體化。以 *Phalaenopsis* Taipei Gold 為例，其親本為 *Phal. Glady's Read* (4X)及 *Phal. venosa* (2X)。在兄弟株中，*Phal. Taipei Gold 'STM'* (3X)與 *Phal. Taipei Gold 'Gold Star'* (4X)分別為不同倍體數，可推測在親本雜交所用的減數配子中有未減數配子的存在 (Lee *et al.*, 2020)。Chung 等人(2013)也在 *Lilium auratum* × *L. henryi* Hybrid 所產生的減數配子中發現其中具一定比率的未減數配子。而在阿拉伯芥上則發現某些基因 (ex: *cycal*;2/*tam*、*osd1*、*Atps1*、*tes/stud*)的突變株會使減數分裂產生未減數配子的頻率提升，且各個基因突變後，均影響減數分裂過程中的不同時期 (Brownfield and Köhler, 2011)。而在營養繁殖方面，內生多倍體化之特性可能為影響多倍體化之主要因子之一。內生多倍體化的程度在植體上之分布可能隨著植物種類、組織部位及環境因子而不同 (Barow, 2006)，本次試驗於 EP06 及興大黃金上所觀察到品系內包含不同染色體數細胞的現象可能也與此有關。相關研究以白蝴蝶蘭 (*Phal. aphrodite* subsp. *formosana*)作為試驗樣本，發現其內生多倍體化分布具有發育階段及組織

的特異性，並利用此一特性，配合截切原球體誘導 PLB 生成之處理，順利誘導出多倍體化的植株 (Chen *et al.*, 2009; 2011)。一些蝴蝶蘭商業品種在經過了大量的無性繁殖後，出現了許多花朵或植株性狀變異的單株，進一步分析這些單株，與正常植株比對後，發現確實在異常單株之變異組織中有較為顯著的內生多倍體化情形 (Lee *et al.*, 2016; 2017)。以上研究結果顯示，在大量微體繁殖技術的應用下，是有一定的機率使培植體之倍體數抑或是內生多倍體化情形發生改變的，進而影響到後續植株的性狀表現。

參 考 文 獻

- 林依潔。2013。扇形文心蘭誘變育種。國立中興大學園藝學系碩士論文。76pp。
- 馮滢茹。2014。玉米變異 B 染色體的特性分析。國立中興大學農藝學系碩士論文。67pp。
- Bairu, M. W., A. O. Aremu, and J. Van Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63(2): 147-173.
- Barow, M. 2006. Endopolyploidy in seed plants. *Bioessays* 28(3): 271-281.
- Brownfield, L. and C. Köhler. 2011. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *J. Exp. Bot.* 62(5): 1659-1668.
- 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 Tissue Organ Cult.* 98(2): 229-238.
- 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(1): 31-38.
- Chiu, Y. T., C. S. Lin, and C. Chang. 2011. *In vitro* fruiting and seed production in *Erycina pusilla* (L.) NH Williams and MW Chase. *Propag. Ornament. Plants* 11: 131-136.
- 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(7): 693.
- Devi, S. P., S. Kumaria, S. R. Rao, and P. Tandon, 2015. Genetic fidelity assessment in micropropagated plants using cytogenetical analysis and heterochromatin distribution: a case study with *Nepenthes khasiana* Hook f. *Protoplasma* 252(5): 1305-1312.
- Dodson, C. 1957a. Chromosome number in *Oncidium* and allied genera. *Am. Orchid Soc. Bull.* 26:323-330.
- Dodson, C. 1957b. *Oncidium pusillum* and its allies I. *Am. Orchid Soc. Bull.* 26:170-172.
- Felix, L. P. and M. Guerra. 1999. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson and Dressier: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. *Caryologia* 52: 165-168.

- Felix, L. P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genet. Mol. Biol.* 23: 957-978.
- Lee, H. J., Y. E. Kim, Y. J. Yoon, C. S. Jeong, M. L. Lian, K. Y. Paek, and S. Y. Park. 2016. Highly endoreduplicated floral organs of somaclonal variants in clonally propagated *Phalaenopsis* 'Spring Dancer'. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 126: 67-77.
- Lee, H. J., Y. J. Yoon, K. Y. Paek, and S. Y. Park. 2017. Endoreduplication and gene expression in somaclonal variants of clonally propagated *Phalaenopsis* 'Wedding Promenade'. *Hortic Environ Biotechnol.* 58(1): 85-92.
- Lee, Y. I., Y. F. Tseng, Y. C. Lee, and M. C. Chung. 2020. Chromosome constitution and nuclear DNA content of *Phalaenopsis* hybrids. *Sci. Hortic.* 262: 109089.
- Livingston, R. B. 1962. *Oncidium pusillum* blooming in flask. *Am. Orchid Soc. Bull.* 31: 1007.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497.
- Sacristan, M. D. 1971. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Chromosoma* 33(3): 273-283.
- Schubert, I. and R. Rieger. 1985. A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. *Theor. Appl. Genet.* 70(2): 213-221.
- Schubert, I. and M. A. Lysak. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends Genet.* 27(6): 207-216.
- Sheehan, T. and M. Sheehan. 1989. Orchid genera illustrated 127-*Psychmorchis*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 58: 24-25.
- 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.
- Yeh, H. Y., C. S. Lin, and S. B. Chang. 2015. Cytogenetic and cytometric analyses in artificial intercytotypic hybrids of the emergent orchid model species *Erycina pusilla*. *Euphytica* 206(2): 533-539.
- Yeh, H. Y., C. S. Lin, and S. B. Chang. 2017a. Chromosome Number Variation in the Emergent Orchid Model Species *Erycina pusilla*. In: *Orchid biotechnology III*. W.H. Chen and H.H. Chen (eds.). World Scientific Publishing Co Pte Ltd. pp. 51-60.
- Yeh, H. Y., C. S. Lin, H. de Jong, and S. B. Chang. 2017b. Two reported cytotypes of the emergent orchid model species *Erycina pusilla* are two different species. *Euphytica* 213(10): 233.

The Chromosome Number Analysis of *Erycina pusilla* Lines and Cultivar

Tzu-Ping Chuang¹⁾ Ya-Ming Cheng²⁾ Chang-Tsern Chen³⁾ Chen Chang⁴⁾

Key words : *Erycina pusilla*, chromosome, karyotype, fluorescent *in situ* hybridization

Summary

The chromosome number of *Erycina pusilla* is $2n = 12$. Studies have confirmed that other cytotypes ($2n = 10$) exist in nature, and the karyotype pattern of two cytotypes had been set up. Our laboratory have many *Erycina pusilla* lines. By using root tip staining technique and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), the karyotype traits of these lines can be identify. The experimental lines include self-crossing selection lines, cultivar, and chemical mutation selection lines. The results show that chromosome number of most self-crossing selection lines are not $2n = 12$, but rather $2n = 11$. For other lines, it is $2n = 20, 21, 22, 24$, and karyotype constitutions between lines are varied. The FISH result in self-crossing selection line EP05 indicates that one chromosome with 5S rDNA is lost. These results indicates that itself complicated chromosome rearrangement in karyotype may enhance probability of chromosome pairing error. In addition, long-time *in vitro* culture may influence meiosis and mitosis and result in genetic change.

-
- 1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University.
 - 3) Research Fellow, Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute.
 - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

