

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy

College of Bio-Resources and Agriculture

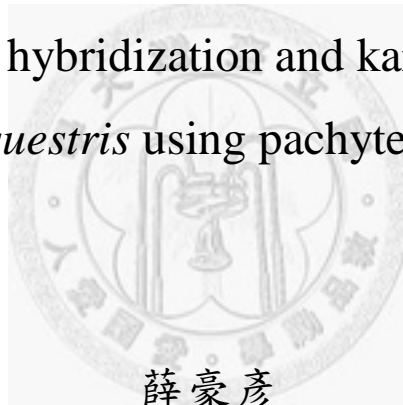
National Taiwan University

Master Thesis

蘭嶼姬蝴蝶蘭粗絲期染色體螢光原位雜交與核型分析

Fluorescence *in situ* hybridization and karyotyping analysis of

Phalaenopsis equestris using pachytene chromosomes



薛豪彥

Hao-Yen Hsueh

指導教授：常玉強 博士、張松彬 博士

Advisor: Yuh-Chyang Charng, Ph.D., Song-Bin Chang, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

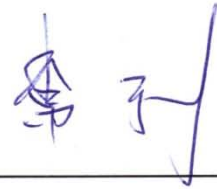
國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

蘭嶼姬蝴蝶蘭粗絲期染色體螢光原位雜交與核型分析
Fluorescence *in situ* hybridization and karyotyping analysis of
Phalaenopsis equestris using pachytene chromosomes

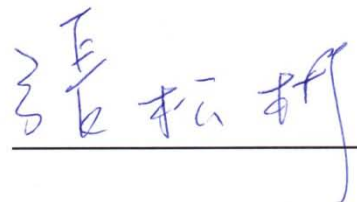
本論文係 薛豪彥 君 (R96621117) 在國立臺灣大學農藝學系完成之碩士學位論文，於民國 101 年 07 月 30 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

國立台灣大學農藝學系暨研究所
常玉強 博士(指導教授)



國立成功大學生命科學系暨研究所
張松彬 博士(指導教授)



國立成功大學蘭花中心主任
陳文輝 博士



國立成功大學生命科學系暨研究所
吳文鑾 博士



誌謝

時間飛快地流逝，那徹夜趕論文、整理數據還有口試的點滴彷彿才在昨日發生，如今我已即將要畢業了!!回想過去研究所的生活和時光，真的充滿許多酸甜苦辣。說起來我非常幸運，碩二時跟著指導教授來到成大做研究，雖然為了上課那學期每個禮拜要臺北、臺南兩邊跑，但碩士班三年中，我同時體驗了北部與南部兩種生活環境，不僅在台大有知心的麻吉和同學，在成大也有認識許多朋友和老師，不管在人際關係或學術研究上都受益良多。

很感謝張松彬老師這些年來對我生活上的關心與實驗上的細心指導，每每在我心情沮喪或實驗失敗時，都能給予我許多建議以及無限的包容，也正因為您的鼓勵和支持，我才能堅持到今天；也謝謝常玉強老師擔任我的指導老師，從碩一修習您的功能基因體學課程時，就一直非常欣賞您的教學風格，能夠成為您指導的學生我始終覺得自己很幸運並且與有榮焉；感謝陳文輝老師與吳文鑾老師於我論文上的建議和細心斧正，讓我收穫很多，發現更多自己在論文寫作與實驗上不足之處；我的論文得以順利完成，最重要的要感謝一直作我堅強後盾的家人，我的爸媽以及哥哥、姊姊對我生活上的關懷與照顧以及提供經濟來源，讓我得以無後顧之憂可以專心於研究，謝謝您們一路上的支持。很開心認識台大的同學修巧、子儀、惠心還有鍾萍，我時常想起我們一起修課、吃飯、一起談天說地分享生活點滴的回憶，還有筱薇、柏蓉和伊婷，妳們始終是我學習的對象，要特別感謝在實驗上一起共度患難的伊婷，總是在我實驗受挫或生活不如意時耐心聽我抱怨讓我有談心的對象，還有感謝成大實驗室的恆生學長於生活上的諸多幫忙，還有兩位可愛的學妹筱琦和宛萱，有妳們和我一起分享、交流實驗的點滴，常讓我茅塞頓開。還有軒妤、景安、儀慧以及凱翔和惠嵐，實驗室有妳們總是充滿歡笑，謝謝大家對我的關心。最後要感謝琬婷不離不棄的關心和照顧，有妳的鼓勵和支持，讓我在實驗上更有信心，這本論文才能順利的完成，我相信有妳的陪伴，未來的人生道路上我一定會走得更加堅定。

中文摘要

蝴蝶蘭為國內重要的花卉產業，但蝴蝶蘭生長世代較長，遺傳圖譜尚未建立，細胞遺傳研究也相當缺乏。蘭嶼姬蝴蝶蘭為台灣原生種且具代表性的蘭花，基因組較小適合作為未來蝴蝶蘭基因組定序計畫的材料。蘭嶼姬蝴蝶蘭體細胞中期染色體大小型態相似，以傳統染色法難以鑑別。本實驗分析減數分裂十九對粗絲期染色體，由於收縮程度較低，解析力提升，有助於核型的建構。分析染色體平均長度大小、染色質的分佈、中心節位置以及有無次級收縮區，可描述單一染色體的型態。根據核型分析的結果顯示，姬蝴蝶蘭粗絲期染色體平均長度為 21.95 μm ，最大與最小相差 2.35 倍。就染色體型態而論，異染色質皆集中在中心節兩側，但異染色質的大小與分佈位置在不同的染色體之間有很大的差異，有些異染色質節清晰，可辨識不同的染色體。姬蝴蝶蘭多屬於中位中節或次中位中節染色體，只有一對染色體為近端中節，該染色體的短臂末端可觀察到次級收縮區。另外與有絲分裂中期染色體相較，粗絲期染色體提高 12 倍以上的解析力，可提升染色體圖譜的應用性。進一步以螢光原位雜交技術將 5S rDNA、45S rDNA、阿拉伯芥型端粒序列與 SOC1 基因定位到染色體上，發現 5S rDNA 與 45S rDNA 分別位於第 17 對及第 13 對染色體的短臂末端，SOC1 位於第 1 對染色體的短臂上，端粒序列則分佈在每對染色體的端點。依據這些序列在染色體上的分佈位置與訊號的差異，可結合分子標誌建立起更完整的核型，辨別型態相近的染色體。

有別於蝴蝶蘭早期多以有絲分裂中期染色體為主的染色體研究，本實驗首先建立了姬蝴蝶蘭粗絲期高解析核型，可成為模式植物供其他蘭花作比較分析，以了解染色體在蝴蝶蘭屬植物演化過程中核型的演變與排列重組的可能演進。

關鍵詞：細胞遺傳、蘭嶼姬蝴蝶蘭、粗絲期染色體、核型分析、螢光原位雜交

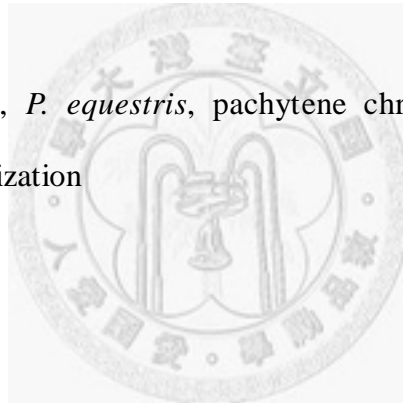
Abstract

Phalaenopsis orchid is the important floral industry in Taiwan. It however has a long period of life cycle and deficiency of genetic map as well as cytogenetic research. *P. equestris* is a native and representative orchid in Taiwan, and the kind of its relatively small genome is suitable for analysis in *Phalaenopsis* genome sequencing project in the future. The size and morphology among somatic metaphase chromosomes were close, and it is difficult to identify each with conventional staining. Nineteen pachytene chromosomes of meiotic stage were studied in this thesis showing their lower contraction and high resolution that could contribute to construct a karyotype. Single chromosome morphology can be described by analyzing average length, distribution of chromatin, centromere position and presence of secondary constriction of chromosomes. Based on the results of karyotype, the average length of each pachytene chromosome was 21.95 μm and a 2.35-fold difference between the largest and smallest ones was found. Regarding each chromosome morphology, all heterochromatin were restricted around centromere, but the amount and distribution had significant differences that could distinguish these chromosomes clearly with some heterochromatin knobs. Almost all *P. equestris* chromosomes are metacentric or submetacentric while only one chromosome which includes a secondary constriction on the end of short arm belonging to subtelocentric. In comparison with mitotic metaphase, pachytene chromosomes possessed more than 12-fold higher resolution and thus they can facilitate the construction of chromosome maps. Furthermore, 5S rDNA, 45S rDNA, *Arabidopsis*-type telomeric sequences and SOC1 gene were mapped to chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. The results showed that chromosome 17 had a 5S rDNA locus and chromosome 13 had a 45S rDNA locus

on the ends of their short arms. Furthermore, SOC1 was located on the short arm of chromosome 1, and telomeric sequences located on both ends of every chromosomes. Based on the variation in the spatial and quantitative distribution of DNA sequences, a complete karyotype could be constructed combined with molecular markers to distinguish similar chromosomes.

In this study we first developed *P. equestris* high-resolution karyotype better than previous studies which focus on mitotic metaphase chromosomes, and we hope it will become a model plant used for other orchids. In addition, in the future with the research of chromosome rearrangements of *Phalaenopsis* species, we may understand how *Phalaenopsis* chromosomes evolved.

Key words: cytogenetics, *P. equestris*, pachytene chromosomes, karyotyping, fluorescence *in situ* hybridization



目錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract.....	iv
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
一、前言.....	1
二、前人研究.....	3
(一) 蝴蝶蘭屬植物簡介與分類.....	3
(二) 姬蝴蝶蘭型態及特徵描述.....	4
(三) 蝴蝶蘭屬植物細胞遺傳之研究.....	4
(四) 螢光原位雜交技術的發展用於核型分析.....	5
(五) 利用核糖體基因與端粒序列探討核型.....	7
(六) 分子基因庫的開發應用於基因定位與核型分析.....	9
(七) 以高解析力粗絲期染色體建立核型.....	11
(八) 姬蝴蝶蘭功能性基因 SOC1 之特性及定位.....	12
三、材料與方法.....	14
(一) 材料來源.....	14
(二) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體的製備.....	14
1. 試驗材料的收集與保存.....	14
2. 花粉細胞粗絲期的鑑定.....	14
3. 以加熱板製備染色體(用於核型分析).....	15
4. 以液態氮製備染色體(用於核型分析與原位雜交反應).....	15
(三) 螢光原位雜交反應.....	16
1. 質體 DNA 抽取.....	16

2. 探針的標定.....	17
3. 探針濃度之定量.....	18
4. 螢光原位雜交.....	18
(四) 核型分析與雜交訊號影像處理.....	20
四、結果.....	21
(一) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體型態觀察.....	21
(二) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型分析.....	21
(三) 姬蝴蝶蘭螢光原位雜交與基因定位.....	24
(四) 姬蝴蝶蘭結合分子標誌高解析核型.....	25
五、討論.....	28
(一) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體的製備與型態觀察.....	28
(二) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型分析.....	28
(三) 姬蝴蝶蘭螢光原位雜交與基因定位.....	32
(四) 姬蝴蝶蘭粗絲體染色體的辨識與高解析核型.....	34
(五) 核型統計數據的細微探討.....	36
(六) 未來研究方向.....	37
六、參考文獻.....	38
七、附錄.....	61

表目錄

表 1：螢光原位雜交反應使用的探針	46
表 2：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型分析統計數據	47
表 3：姬蝴蝶蘭中期染色體長度統計分析	48
表 4：姬蝴蝶蘭相異細胞中內含 45S rDNA 訊號的染色體細部分析	49
附表 1：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體模式核型圖(第一組)原始數據分析	61
附表 2：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第二組)原始數據分析	62
附表 3：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第三組)原始數據分析	63
附表 4：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第四組)原始數據分析	64
附表 5：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第五組)原始數據分析	65
附表 6：五個供試細胞染色體編號比對的結果	66
附表 7：五個供試細胞各染色體平均長度比對的結果	67
附表 8：五個供試細胞異染色質長度比對的結果	68
附表 9：五個供試細胞真染色質長度比對的結果	69
附表 10：五個供試細胞染色體異染色質比率比對的結果	70

圖目錄

圖 1：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體型態觀察	50
圖 2：姬蝴蝶蘭粗絲期染色體模式核型圖(第一組核型).....	51
圖 3：供作核型分析之細胞染色體圖	52
圖 4：觀察姬蝴蝶蘭單離染色體末端次級收縮區	53
圖 5：觀察姬蝴蝶蘭中期染色體型態	54
圖 6：以螢光原位雜交分別將 45S rDNA 與端粒序列定位在姬蝴蝶蘭染色體.....	55
圖 7：以雙標的螢光原位雜交將兩種重複性序列定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體..	56
圖 8：以螢光原位雜交將 5S rDNA 定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體	57
圖 9：獨特性序列 SOC1 基因利用螢光原位雜交定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體 ..	58
圖 10：獨特性序列 SOC1 基因定位在姬蝴蝶蘭單離的粗絲期染色體上.....	59
圖 11：姬蝴蝶蘭核型結構模式圖	60
附圖 1：CMT 基因在染色體上的位置.....	71
附圖 2：EFS 基因在染色體上的位置	72

一、前言

蘭科植物 (Orchidaceae) 分布廣泛，除了沙漠和兩極外無所不在。台灣地處亞洲太平洋西緣，受太平洋暖流的影響終年四季如春，氣候環境非常適合蘭花的生長，原產的蘭花約有八十屬四百種，其中蝴蝶蘭具有美麗的花形與豐富的顏色特別受人喜愛 (陳，2002)。蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) 植物目前發現約有50個原生種，其中6種可能已絕種，10多種不易尋獲，而台灣為常見的20多種之中其中兩個種類：「台灣阿嬤蝴蝶蘭」(*P. aphrodite* subsp. *formosana*) 與「蘭嶼姬蝴蝶蘭」(*P. equestris* (Schauer) Rchb. f.) 之原產地 (陳，2002)。由於蘭花種原歧異度高，加上蘭科植物能夠經由人工雜交產生屬間的雜交種 (hybrid)，目前蘭花品種及市面上之蝴蝶蘭栽培種種類及數量繁多 (蔡與莊，2010)，為國內最具市場潛力的花卉產品。台灣於蝴蝶蘭的品種培育、種苗生產與商業栽培上，擁有純熟的技術與悠久的歷史經驗，加上無菌播種與組織培養在蘭花繁殖上的應用，使得台灣的蝴蝶蘭產業在國際間占有一席之地，每年有新品種育成 (林等，2008)。然而過去雖已建立許多育種雜交譜系，常發現親本遺失或不明、子代株數不足，有些品種雜交幾十個世代，染色體又有自然加倍的現象，現今有許多三倍體及四倍體的植株，加上蝴蝶蘭分子生物與基因體相關研究缺乏的情況下，至今尚無完整的遺傳圖譜，商業品種的遺傳背景相當複雜，對於未來分子育種與蝴蝶蘭品種鑑定的應用上將造成侷限 (蔡與莊，2009)。

台灣不僅在蝴蝶蘭育種與產業上有深厚的基礎，學術研究上也有獨步全球的成果，其生物科技經產學、官學與學術界共同努力下，已有許多製程與關鍵技術獲得專利 (林等，2008)。然而蝴蝶蘭植株生長緩慢，需要2至3年方能完成一個世代，對於建構遺傳圖譜尚須長時間的等待，在等待完整的遺傳圖譜建構完整前，若能從染色體圖譜著手進行分析，能迅速提供現階段分子育種與蘭花生物技術之研究和應用。未來在蝴蝶蘭基因組定序計畫中，應以基因組較小的種類為宜，因此選用染色體較小且具臺灣代表性的蘭嶼姬蝴蝶蘭 ($2n = 2x = 38$) 為材料。蘭嶼

蘭嶼姬蝴蝶蘭屬於小型的染色體，而過去的研究多以有絲分裂 (mitotic) 之中期 (metaphase) 染色體為主 (Kao *et al.*, 2001)，其收縮程度緊實、解析力低，無法鑑別單一染色體，不適合作為基因定位與核型分析 (karyotyping) 理想的材料。因此本研究中以減數分裂 (meiotic) 粗絲期 (pachytene) 染色體為對象建立高解析核型，並定位染色體專一性DNA分子標誌。若此核型系統能完整建構，可提供其他蝴蝶蘭或其他蘭科植物，甚至是同為單子葉的水稻作基因組排列 (synteny) 比較分析，並提升染色體圖譜的應用性，了解染色體在演化過程中序列重組現象。



二、前人研究

(一) 蝴蝶蘭屬植物簡介與分類

蘭花為蘭科植物的統稱，為開花植物中最大、最具多樣性的一科，約有 17,000-35,000 種 (Dressler, 1993)，除了南北兩極與沙漠外廣泛分布於世界各地，尤以亞洲和南美洲熱帶地方最多。蝴蝶蘭於蘭科植物中最具觀賞價值，且為台灣重要的出口觀賞花卉，屬名 *Phalaenopsis* 富含希臘文 *phalaina* (蛾蝶) 與 *opsis* (形象) 之含意，形容開花時花姿有如蝶蛾成群飛舞，英文稱之為 *Moth Orchid* (蛾蘭) (廖, 1990)，因花型優美、花色典雅與花期較長深受世人喜愛而有「蘭中之后」的美稱。蝴蝶蘭屬植物約有 45~63 種 (Lin *et al.*, 2005)，原產於亞洲熱帶及亞熱帶區域及太平洋島嶼，主要的分布範圍西起斯里蘭卡 (Sri Lanka)、南印度 (south India)、喜馬拉雅山麓 (Himalayas) 到亞洲東部的巴布亞新幾內亞 (Papua New Guinea)，北起中國南端 (southern China)、台灣 (Taiwan)、菲律賓 (Philippines)、馬來西亞 (Malaysia)、印尼 (Indonesia) 等居中的東南亞各國延伸到澳洲北部 (northern Australia) (Christenson, 2001., Kao *et al.*, 2007., Lin *et al.*, 2005)，台灣南部及蘭嶼可說是蝴蝶蘭天然分佈的北界。

蝴蝶蘭分類上屬於樹蘭亞科 (Epidendroideae)、萬代蘭族 (Tribe Vandae)、風蘭亞族 (subtribe Aeridinae) 之蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) 植物 (Dressler, 1993)。蝴蝶蘭分群最早由 Reichenbach (1860) 所提出，當時以唇瓣中裂片有無捲鬚的特徵將其分為兩群；Bentham (1883) 除上述特徵，再依花瓣的寬度將十五種蝴蝶蘭分成兩個節 (sections)，而 Rolfe 於 1886 年以花瓣的特徵將蝴蝶蘭歸類為四個節 (Sweet, 1980)。近代較為接受的分類系統，為 Sweet (1980) 依花瓣與萼片的特徵將四十七種蝴蝶蘭分成九個節與四個亞節 (subsections)，此系統能有效分類原生種蝴蝶蘭。後來 Christenson (2001) 再依據花粉塊數目及花型與葉片的型態擴大種類，將目前發現的六十三種蝴蝶蘭分成五個亞屬 (subgenus)

與八個節。

(二) 姬蝴蝶蘭型態及特徵描述

台灣地處北回歸線之熱帶及亞熱帶地區，氣候溼熱，雨量充足，氣溫條件適合蘭苗生產，冬季則適合花芽分化。台灣有兩種蝴蝶蘭原生種，其中「蘭嶼姬蝴蝶蘭(簡稱姬蝴蝶蘭)」最早是由 Schauer 於 1843 年所描述而稱為 *Stauroopsis equestris*；Lindley 於 1848 年稱之為 *Phalaenopsis rosea*，形容其唇瓣顏色有如粉紅色玫瑰般的豔麗；直到 1849 年 Reichenbach 正式再改命名為 *Phalaenopsis equestris* (Sweet, 1980)，其種名“equestris”源自拉丁文的“equester”，表「騎士」之意，原產於菲律賓和台灣。姬蝴蝶蘭植株大小約 15~30 公分，為多年生著生性蘭花，葉片大小及型態多變，呈現綠色至不同程度之紫紅色，無特殊斑紋。花徑約 2~3 公分，花色變化大，有白色至不同程度之粉紅色及紅色，開花期集中在春夏季。由於姬蝴蝶蘭同時具有紅花及白花種原，且梗上分枝多，每株花數達數十朵，經常被用來與其他蝴蝶蘭雜交，是迷你多花性蝴蝶蘭育種的主要親本，在蝴蝶蘭分子演化樹中，與同為 *Stauroglottis* 節的 *P. lindenii* 及 *P. celebensis* 親緣較接近 (蔡與莊，2010)。姬蝴蝶蘭在型態和花的顏色上差異很大而有 *alba*、*aurea*、*rosea*、*leucaspis* 與 *leucotante* 等不同的變種，受花青素和類胡蘿蔔素的影響而有不同顏色的唇瓣 (Tang and Chen, 2007)。

(三) 蝴蝶蘭屬植物細胞遺傳之研究

蝴蝶蘭屬植物世代較長，植株生長緩慢，材料取得不易，細胞遺傳研究相當缺乏。除了原生四倍體 *P. buyssoniana* 具有 76 條染色體 ($2n = 4x = 76$) 外，所有原生種蝴蝶蘭為具有 38 條染色體 ($2n = 38$) 之二倍體植株 (Christenson, 2001)。蝴蝶蘭屬植物雖然具有相同的染色體數目，但屬內種間之染色體大小差異很大。Shindo 和 Kamemoto (1963) 觀察八種蝴蝶蘭及一種朵麗蘭 (*Doritis*) 的核型，發現染色體大小相差約 2.8 倍，依區域性分佈及染色體大小將此九種蘭花分成兩

群：一群以 *P. amabilis* 為首六種蝴蝶蘭主要分布於菲律賓，染色體較小核型較對稱 (symmetry)；另一群包括 *P. mannii*, *P. violacea* 及 *D. pulcherrima* 則分布於菲律賓以外的地區，染色體較大核型較不對稱 (asymmetry)，顯示染色體較大的類群核型演化程度較高。Arends (1970) 進一步觀察這兩群蝴蝶蘭雜交種在第一次減數分裂 (metaphase I) 時染色體配對情形，發現蝴蝶蘭染色體群內的同源性 (homology) 較高，而群間同源性較低，提供相異類群間蝴蝶蘭序列演化的證明。隨著細胞定量分析的發展，Lin 等人 (2001) 利用細胞流測 (flow cytometry) 技術分析十八種原生種蝴蝶蘭及一種朵麗蘭基因組大小，發現 DNA 含量最小的 *P. sanderiana* (2.74 pg/2C) 與 DNA 含量最大的 *P. parishii* (16.61 pg/2C)，兩者相差 6.07 倍，其中 *P. equestris* 的 DNA 含量約為 3.37 pg/2C，於十八種蝴蝶蘭中 DNA 含量僅高於 *P. aphrodite*、*P. sanderiana* 及 *P. stuartiana*。Kao 等人 (2001) 以九種原生種蝴蝶蘭與一種朵麗蘭為材料，使用 DNA-Feulgen 染色法觀察細胞核及比較種間染色體核型之差異，發現基因組中異染色質含量與細胞核 DNA 含量 (DNA content)、總染色體體積 (total chromosome volume) 及染色體大小呈正相關，並且對照 *P. aphrodite*、*P. venosa*、*P. mannii*、*P. violacea* 及 *D. pulcherrima* 等五種蘭花核型，觀察到染色體較大之蝴蝶蘭含有較多的異染色質，反觀染色體較小的蝴蝶蘭異染色質較少，而認為異染色質的累積是造成蝴蝶蘭種間核型差異的重要因子。異染色質大多由重複性序列 (repetitive sequence) 所組成，推測蝴蝶蘭基因組的差異與重複性序列之多寡有關。為進一步探討蝴蝶蘭基因組成與親緣關係，Lin 等人 (2005) 分析七種原生種蝴蝶蘭雜交種，以基因組原位雜交 (genomic *in situ* hybridization) 技術檢視染色體上雜交訊號，發現具有較大基因組的原生種蝴蝶蘭，無論在種類與量上均含有較多的重複性序列，然而基因組較小的原生種亦含有本身獨特的序列。這些研究結果顯示異染色質與重複序列，是影響蝴蝶蘭染色體核型變異與基因組演化重要的關鍵。

(四) 螢光原位雜交技術的發展用於核型分析

原位雜交技術 (*in situ* hybridization, ISH)是結合了分子生物學 (molecular biology)、免疫細胞化學 (immunocytochemistry)及細胞遺傳學 (cytogenetics)、顯微鏡與電腦影像分析的技術 (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000)。早期原位雜交技術使用的探針為放射性標定，但放射線具危險性，且此法很難同時滿足靈敏度與解析度這兩者原位雜交成功必需的條件。由於分子生物學的快速發展，螢光原位雜交 (fluorescence *in situ* hybridization; 簡稱 FISH)為原有的放射性原位雜交基礎上發展的新技術，利用螢光標定的外源核酸片段，與細胞或染色體上待測 DNA 或 RNA 互補配對，依據染色體上雜交訊號的位點可提供探針序列的定位信息。此技術的優點在於螢光試劑安全無放射線安全之疑慮、探針穩定性高、實驗週期短且定位準確，能快速獲得結果，還可運用不同顏色螢光素標記 DNA 探針，同時觀測相異的 DNA 雜交訊號，可定位重要的基因序列 (Devi *et al.*, 2005; Trask, 1991; Volpi and Bridger, 2008)。

核型分析是對生物細胞核內所有染色體型態及特徵進行分析，為區別物種之基本遺傳學依據 (闫等, 2008)；一般可以依據染色體數目、長度、中心節 (centromere)位置或異染色質的分布，或以特定染色法如 Giemsa(G-banding)、C-banding、R-banding 或觀察端粒 (telomere)之 T-banding 等條帶技術 (banding techniques)鑑定核型 (Miller *et al.*, 2009)。例如應用 C-banding 技術觀察染色體型態及異染色質的分布，在高粱 (*Sorghum bicolor*) (Yu *et al.*, 1991)、西番蓮屬 (*Passiflora*) (Viana and Souza, 2010)等植物都有相關報導。然許多物種染色體大小型態相似，以傳統染色法無法加以鑑別；Hoshi 等人 (1998) 以 C-banding 染色觀察黃瓜 (*Cucumis sativus*) 七對染色體，其中有五對染色體呈現明顯的條帶，但無法觀察到次級收縮區 (secondary constriction)。現今 FISH 技術運用特定的重複性序列片段作為探針，廣泛運用在核型分析；單一的 DNA 序列 (single copy sequence) 片段可辨識特定染色體，而重複序列普遍存在於基因組中，其功能至今尚未完全明瞭。許多研究顯示高等植物的基因組，重複性序列佔很大之

比例，片段長度從 2 bp 到 10,000 bp 以上，拷貝數 (copy numbers) 更從幾百到數百萬次 (Kubis *et al.*, 1998)。番茄基因組中約有 30% 為重複性序列 (Peterson *et al.*, 1996)，甜菜約有 63% 的重複序列 (Flavell *et al.*, 1974)，而玉米重複性序列更高達基因組的 60 - 80% (Viotti *et al.*, 1985)。有些重複序列只在某一基因組出現或聚集在特定染色體，能作為基因組或染色體專一性分子標記 (marker)。這類專一性分子序列亦可用來辨識染色體，克服傳統染色法面臨的問題而提高核型分析的效率。

(五) 利用核醣體基因與端粒序列探討核型

植物基因組之重複 DNA 主要分成兩類；一類為縱向重複性序列 (tandemly repeated DNAs)，聚集於染色體特定區域，如衛星體 DNA (satellite DNA)、端粒序列 (telomeric sequences) 以及核醣體 DNA 基因 (ribosomal DNA genes, 簡稱為 rDNA)。另一類為散佈型重複序列 (dispersed repetitive DNA elements)，分散於整個基因組或特定染色體上，如 DNA 轉位子 (DNA transposable elements) 以及反轉位子 (retroelements) (Kubis *et al.*, 1998)。許多研究顯示高等植物中大多數重複性序列不具功能，但有些重複序列如 rDNA 基因與蛋白質合成有關，端粒序列能夠保護染色體及維持染色體結構之穩定，而基因組中某些反轉位子與物種演化、基因調節 (gene regulation) 與基因表現上扮演重要的角色 (Kubis *et al.*, 1998)。其中 rDNA 及端粒序列於探討核型上應用最多。真核生物細胞含大量的核醣體 rRNA，參與蛋白質的合成，包括 17~18S- 5.8S-25~28S rDNA (45S rDNA) 與 5S rDNA，屬於保守性序列。45S rDNA 位於染色體的核仁形成區 (nucleolar organizer regions; 簡稱 NORs)，是形成核仁之主要成分 (Sumner, 2003)，且在細胞分裂時，可觀察到次級收縮區 (secondary constriction)。Fukui 等人 (1998) 以 45S rDNA 為探針分析三種十字花科 *Brassica* 屬間不同種的植物，發現 45S rDNA 的基因座在 *B. rapa* (A genome)、*B. nigra* (B genome) 及 *B.*

oleracea (C genome)等二倍體植株染色體上的數目分別為五對、三對及兩對，顯示物種演化過程中會造成 45S rDNA 分佈上的差異。5S rDNA 在相異物種其長度有所不同，轉錄區域約為 120 bp，具高度保守性，轉錄區域為基因間間隔區 (intergenic spacer; 簡稱 IGS) 所隔開，此區段變異較大。以小麥為例，其 5S rDNA 片段有兩種大小：其中一種長度為 500 bp，包含 120 bp 的轉錄區及 380 bp 的基因間隔區；另一種長度只有 400 bp，包含轉錄區同樣為 120 bp 及 280 bp 的基因間隔區 (Mukai *et al.*, 1990); 甜菜的 5S rDNA 片段長度也具有 349 bp 與 351 bp 兩種 (Schmidt *et al.*, 1994)，顯示其單位長度的差異乃由於 IGS 所造成，研究指出 5S rDNA 與 45S rDNA 的基因座數量與分佈位置在相異物種間有極大的變化 (Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2011)。

由 FISH 為基礎發展出的多重螢光原位雜交 (Multicolor fluorescence *in situ* hybridization, 簡稱 mFISH)，能夠檢測染色體上多個基因位置。此法能同時標定兩個以上的螢光素，可一次在相同細胞內觀察數個探針訊號，擴大了 FISH 技術的運用 (Trask, 1991)。利用 mFISH 可將兩種 rDNA 序列同時定位在染色體上，能夠辨識細胞中相異染色體或比較種間核型演化上之差異。植物基因組中較小的阿拉伯芥 (*Arabidopsis*)，具有五對大小型態相似的染色體，以 FISH 方法僅將 5S rDNA 與 45S rDNA 兩種探針同時定位，即可辨識阿拉伯芥中所有染色體 (Murata *et al.*, 1997)。余等 (2012) 觀察 DAPI 染色的顯帶 (pattern) 和兩種 rDNA 雜交信號，對落花生 (*Arachis hypogaea*) 的染色體進行了準確排列和配對，建立詳細的分子細胞遺傳核型；其他農藝作物如高粱 (Bustos *et al.*, 1996; Taketa *et al.*, 1999)、玉米 (Li and Arumuganathan, 2001) 或者園藝作物如野草莓 (*Fragaria vesca*) (Rho *et al.*, 2012) 以及豬屎豆屬 (也稱野百合屬) (*Crotalaria*) (Morales *et al.*, 2012) 等綠肥作物都有相關的應用。由於此兩種 rDNA 序列保守性皆高，基因座數量及位置於不同物種間有所差異，能探討種間親緣關係。李 (2007) 分析 5S 及 45S rDNA 基因座於七種蝴蝶蘭屬植物之分佈，發現到同為

Phalaenopsis 節的 *P. sanderiana*, *P. stuartiana*, *P. schilleriana* 及 *P. philippinensis* 於中期染色體上都具有一對 45S rDNA 基因座，但其中 *P. sanderiana* 有兩對 5S rDNA 基因座，其餘三種蝴蝶蘭則均具有三對的 5S rDNA 基因座，與先前研究建立的親緣關係樹相比，將此四種蘭花歸為兩群之結果相吻合。此外 *P. equestris*, *P. celebensis* 與 *P. lindenii* 均具有一對 45S rDNA 基因座及 5S rDNA 基因座，也符合傳統分類將此三種蘭花歸類為 *Stauroglottis* 節之結果。因此利用兩種 rDNA 基因實質定位可用於探討物種演化之親緣關係。除了蝴蝶蘭屬植物外，Lan 與 Albert (2011) 也利用 rDNA 基因探討同為蘭科之仙履蘭屬 (*Paphiopedilum*) 植物中染色體之演變。由此可窺見 rDNA 於染色體鑑識及物種演化上確實提供了有利的分子證明。

被子植物的端粒序列，以單體 (monomer) 七個核苷酸 TTTAGGG 縱列重複所組成，最早是由阿拉伯芥中分離出來 (Richards and Ausubel, 1988)，許多高等植物的端粒序列均屬於阿拉伯芥型，其拷貝數在不同物種間有明顯的差異。以端粒序列為探針應用於 FISH，可觀察染色體末端有無發生斷裂，能夠量測染色體雜交訊號與端點之間的距離，為研究染色體核型與細胞遺傳圖譜上重要的分子標誌。

(六) 分子基因庫的開發應用於基因定位與核型分析

基因庫含有生物體基因之重組 DNA 隨機片段，可透過標記的探針分子進行篩選，進一步的純化與擴增後可作為遺傳研究的材料；其中細菌人工染色體 (bacterial artificial chromosome, 簡稱 BAC) 能夠建構大片段選殖基因庫，其內含 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分子或其他分子片段的 BAC 選植株可直接應用在 FISH 上，將特定基因或序列直接定位在染色體上，建立染色體實質圖譜 (physical map) 或細胞遺傳圖譜 (cytogenetic map)，是目前分子遺傳研究重要的工具。2000 年 Dong 等人利用相異 BACs 鑑別馬鈴薯十二對中期

染色體，這些 BACs 中即帶有馬鈴薯或番茄遺傳圖譜上特定的 RFLP 分子標誌。此外由於重複性序列在物種間及種內相異染色體的分佈位置有所差別，內含不同種類重複性片段的 BACs 也廣泛運用在建立核型、探討物種演化與染色體重組現象。

2010 年 Talia 等人依據染色體長度、中節位置並利用 rDNA 及一種反轉移子重複性序列在染色體上之顯帶分佈，鑑定出向日葵 (*Helianthus annuus*) 十七對染色體。目前尚無運用 BACs 建立蘭花核型的完整研究，但彭 (2007) 曾選殖朵麗蘭重複性序列 Dpr67、微衛星序列 (DpGA1、DpGA2) 以及兩種核糖體基因與端粒序列，並定位到朵麗蘭中期染色體上，依據雜交訊號的差異與序列分佈建立朵麗蘭的核型。

大量分子標誌的開發加速核型的發展，並從中得到許多遺傳與演化更精準的信息，有別於早期主要依據型態與交配的能力探討物種親緣。Zhao 等人在 2011 年觀察栽培種黃瓜 *C. sativus* 與兩種野生種黃瓜 *C. xishuangbannensis*、*C. hardwickii* 的核型，由雜交訊號發現 *C. sativus* 與 *C. xishuangbannensis* 間含有許多保守序列 (conserved sequences)，證明兩者親緣關係相接近。而利用跨物種螢光原位雜交 (cross-species FISH) 技術，能夠提供親緣相近物種間核型之應用。黃瓜與香瓜親緣關係相近，Liu 等 (2010) 利用黃瓜基因庫中已建立的分子標誌 (fosmids) 為探針進行 FISH，建立了香瓜 (*C. melo*) 十二對染色體核型。此外這些分子標誌亦能探討物種演化中染色體結構之演變。Xiong 等 (2010) 觀察大白菜 (*B. rapa*) 與甘藍 (*B. oleracea*) 及雜交後代油菜 (*B. napus*) 的核型，從這些分子訊號結果進一步觀察到雜交種油菜染色體序列重組的位置。Findley 等 (2010) 使用包含中節序列在內的十五個 BACs 建構了大豆 (*Glycine max*) 二十對染色體核型，並由雜交訊號的位置與野生種大豆 (*G. soja*) 相較，發現第十一對及十三對染色體的長臂有發生異位 (translocation) 的現象，且進一步偵測到異位的片段大小分別為 4.2 Mb 與 17.9 Mb。對照 Kao 等 (2001) 以 DNA-Feulgen 染色

研究蝴蝶蘭核型，可以發現分子標誌基因庫的建構與 FISH 等生物技術相結合，可提供更完整的核型分析圖，供後續分子生物與染色體遺傳研究。

(七) 以高解析力粗絲期染色體建立核型

早期研究核型多以初生根的根尖為材料，根尖分生組織旺盛、容易培養且不受季節因子影響，核型多以有絲分裂中期的染色體型態為主 (闫等, 2008)。中期染色體為高度凝縮，每條染色體具有可辨識的型態，染色後能觀察到著絲點及深淺不等的亮帶。然而中期染色體不足之處便在於收縮緊實的特性，染色體型態相似，兩個標記的螢光訊號須至少分隔 1 Mb 才能明確加以分辨，故中期染色體儘管能運用 FISH 確認分子標記約略的位置，解析力仍不足以建構高清晰的染色體圖譜。減數分裂粗絲期染色體收縮程度低，呈現染色質(chromatin)特殊的型態，可鑑別單一染色體及提高定位的解析力，且染色體製備過程中花粉母細胞 (pollen mother cells, 簡稱 PMCs) 之細胞壁較根尖易為酵素所破壞，加上粗絲期包含兩條配對的同源染色體 (homologous chromosomes)，與尚未配對的體細胞染色體相較，有較強的訊號，有助於提升染色體圖譜與核型分析上之應用 (Chen *et al.*, 2000)。

Singh 與 Hymowitz 曾於 1988 年時分離出雜交種大豆 (*G. max* x *G. soja*) 二十對粗絲期染色體，並分析了染色體總長度、異染色質及長臂 (long arm)、短臂 (short arm) 等數據，但當時的研究尚未使用任何分子標誌。近代運用 FISH 分析粗絲期染色體，屬禾本科 (Poaceae) 作物水稻 (*Oryza sativa*)、玉米與茄科 (Solanaceae) 作物的番茄 (*Solanum lycopersicum*)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 等研究最多。水稻是重要的糧食作物，有完整的分子遺傳圖譜，也有已建構的 BAC library (*O. sativa* ssp. *japonica* var. *Nipponbare*)，其十二對粗絲期染色體能藉由中心節序列及包含長短臂在內相異的 BACs 加以鑑別 (Cheng *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2007)；禾本科另一重要作物玉米，Chen 等 (2000) 曾以 FISH 定位中心節、rDNA、含異染色質結之 180-bp 及 TR-1 (350-bp) 等重複性序列，建立

玉米十對高解析粗絲期染色體核型。而玉米就單一染色體型態而論，則以第九對粗絲期染色體研究最多，許多分子標誌陸續被定位出來，其中即包含抗甘蔗螟蟲 (sugarcane borer) 等重要的基因。(Danilova and Birchler, 2008; Sadler *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006)。

粗絲期染色體長度的拉大提升了定位解析度，在單一條染色體上能同時觀察到多個分子標誌。馬鈴薯與番茄的第六對染色體型態相近，Iovene 等 (2008) 以 FISH 定位內含三十個馬鈴薯遺傳標誌之 BACs 於兩者第六對粗絲期染色體上，發現兩者第六對染色體有序列的共線性 (colinearity)，且發現短臂之真染色質 (euchromatin) 處有一染色體倒轉 (inversion) 的區域，與 Achenbach 等 (2010) 的實驗對照，該研究中發現馬鈴薯和番茄第五對粗絲期染色體長臂也有一處倒轉的區域。因此較以往以中期染色體為對象的遺傳研究，利用粗絲期高解析度分析，更明確提供馬鈴薯和番茄基因組中染色體重新排列組合的證據。除了重要的糧食作物外，黃瓜也有完整高解析粗絲期核型 (Koo *et al.*, 2005)，以及棉花 (Wang *et al.*, 2010) 等都有相關的粗絲期染色體研究。

姬蝴蝶蘭屬於小型染色體，染色體大小型態相似難以區別，於核型研究上較為困難，相較於中期染色體，以高解析的粗絲期染色體為對象進行分析，將可提高染色體的辨識度而予以適當的編號。過去並無蘭花粗絲期染色體核型相關方面的研究，若此核型能完整建立，將是蘭科植物中第一個建立的核型系統，可成為模式植物，提供其他蘭花作比較分析。

(八) 姬蝴蝶蘭功能性基因 *SOC1* 之特性及定位

本研究用於基因定位的 BAC，為與開花時間相關的基因 *SOC1*。開花是植物繁衍後代重要的階段，受遺傳因子所控制，在模式植物阿拉伯芥的研究中發現，開花過程受光週期、激勃素、春化作用及自發性調控等四條路徑所調控，而 SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (*SOC1*) 為這些路徑

下游的整合者 (He and Amasino, 2005)，調控蝴蝶蘭開花的時間。李 (2006) 曾選殖姬蝴蝶蘭 SOC1 基因並針對該序列作分析，在序列保守區設計簡併性引子 (degenerate primer) 擴增 SOC1 片段並選殖定序，以 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 方式獲得 SOC1 基因 cDNA 全長 (命名 PeSOC1) 為 1,227 bp，編碼區大小有 666 bp，可轉譯出 221 個氨基酸，其氨基酸序列與水稻 OsSOC1 相似度為 57%，與文心蘭相似度高達 97.8%；進一步以南方點墨法分析 PeSOC1 顯示其為單一拷貝的基因，此獨特序列適合作為本實驗染色體定位的專一性分子標誌。

本實驗以姬蝴蝶蘭減數分裂粗絲期染色體為材料，針對每一對染色體的特徵作描述並予以編碼，將兩種核醣體 rDNA、阿拉伯芥型端粒序列及 SOC1 基因定位到染色體上，建立姬蝴蝶蘭高解析力核型，以提供未來染色體圖譜或遺傳圖譜研究上有力的資源。



三、材料與方法

(一) 材料來源

本研究分析的材料為台灣原生種蝴蝶蘭之一的蘭嶼姬蝴蝶蘭 *P. equestris* ($2n = 2x = 38$)，由伍圓蘭園提供，以水苔種植於成功大學生命科學系溫室。姬蝴蝶蘭之花期為夏季，待開花後採適當大小花苞，將花苞內的花粉塊予以適當固定保存供染色體分析用。

(二) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體的製備

1. 試驗材料的收集與保存

粗絲期係位於細胞週期中減數分裂的前期 (prophase I)，染色體時期可以由尚未開花前之花苞長度作簡單的判定。姬蝴蝶蘭開花後，收集長度約 4.5-5 mm 大小之花苞，以聶子及刀片小心取出花苞內之黃色花粉塊，置於新鮮配置的 carnoy 固定液 (100% acetic acid : 95% ethanol 為 1 : 3) 保存在 -20°C 冰箱中，待隔天花粉塊顏色由黃色轉變成白色後，將樣品置換到 70% 酒精保存以提高固定的效果。為了比較粗絲期與中期染色體收縮程度的差異，除了花粉外同時也採集根尖細胞供後續的分析。待姬蝴蝶蘭新長出的幼根約 1-2 cm 左右時，以解剖刀切取末端的根尖，將根尖垂直對半後浸置於 2 mM 8-hydroxyquinolino 溶液中 4-5 小時，溫度保持在 15°C 。之後取出根尖，在室溫下以蒸餾水洗淨根尖兩次，每次時間約 5 分鐘，再將此根尖作 carnoy 固定液處理至少三小時或置於固定液中，於 -20°C 環境下保存樣品，待根尖轉為白色再置換到 70% 酒精保存。

2. 花粉細胞粗絲期的鑑定

花粉細胞鑑定的方式，係依據成大生命科學系張松彬老師實驗室所建立的鑑定方法。保存後的花粉細胞進行鑑定前，先置換到蒸餾水，隨後將花粉置於載玻片上，以刀片小心切出少許分生組織後，剩餘的花粉塊細胞暫時置回蒸餾

水。用刀片將樣品搗碎後，加一滴 1% 醋酸洋紅 (acetocarmine) 染劑，隨即覆蓋蓋玻片 (24 x 32 mm)。將玻片置於酒精燈上來回火烤 3-4 次，此步驟須注意不要讓醋酸沸騰。接著讓載玻片正面朝下置於濾紙上，以食指及中指固定，再以大拇指前端輕壓玻片將染色體壓散，於顯微鏡下觀察染色體的時期。姬蝴蝶蘭粗絲期染色體的特徵為可見一條條明顯散開的絲狀物。若確認該花粉為粗絲期，將蒸餾水中剩餘之花粉分生組織細胞繼續保存在 70% 酒精供後續染色體製備用。

3. 以加熱板製備染色體(用於核型分析)

本實驗係參考台大農藝系劉麗飛老師與張松彬老師合編之植物細胞分子顯微技術一書中所用的方法。將鑑定過的花粉塊從酒精取出時，先浸泡於蒸餾水至少 30 分鐘洗去酒精，將花粉切成數小塊以利後續的酵素反應。把樣品先放到 1x citrate buffer (4 mM citric acid, 6 mM sodium citrate, pH 4.5) 中，於室溫下靜置 5-10 分鐘，再換到配置的三合一酵素液 (1% (w/v) cellulose Onozuka RS (Yakult Honsha), 1% (w/v) pectolyase Y23, 1% (w/v) pectinase solution)，將樣品置於 37°C 烘箱中作用 30-40 分鐘。酵素作用完畢後，用滴管小心吸出樣品置換到蒸餾水，減緩酵素作用。準備乾淨的載玻片，吸取一花粉置於玻片中央，以濾紙吸去多餘水分。用酒精消毒過的別針針頭輕輕搗碎花粉後迅速加一滴 45% acetic acid，用針頭使花粉與 acetic acid 溶液均勻混合。將載玻片放在 42°C 加熱板上，靜置約 5 秒讓已混合的溶液向中央聚集。以別針在不碰觸玻片情況下，來回牽動此液體並沿著玻片周圍移動擴散，讓染色體能夠平均分散在整個玻片上。在加熱板上時間約 2 分鐘或樣本液體未完全乾掉前將載玻片從加熱板上移開，用現配的 carnoy 固定液沖洗此玻片，隨後浸泡於 95% ethanol 數秒，將載玻片置於架上風乾，再移至 37°C 烘箱中，隔天將樣品保存在 4°C 冰箱作後續核型分析用。

4. 以液態氮製備染色體(用於核型分析與原位雜交反應)

從冰箱取出花粉塊後，仍先將樣品置於蒸餾水至少 30 分鐘，再置換到三合一酵素液，於 37°C 烘箱進行酵素反應 30-40 分鐘，待作用完成將樣品小心置換到蒸餾水以洗去殘餘的酵素液。準備乾淨的載玻片，吸取一花粉塊至玻片中央，以濾紙吸去周遭多餘水分，此時加一滴 45% acetic acid 於樣品旁邊，用濾紙吸去 2/3 的 acetic acid，以別針針頭搗碎樣品後，將剩餘的 acetic acid 與樣品均勻混合，蓋上蓋玻片(18 x 18 mm)並將載玻片翻轉置於濾紙上，用鉛筆平面端以彈跳的方式輕輕敲打蓋玻片中央及周圍四個角，讓染色體更容易散開。將載玻片浸泡於液態氮中，待嘶嘶聲停止及不再冒出氣泡時將載玻片移出液態氮，迅速以刀片將蓋玻片挑開並將玻片置於 42°C 加熱板，待玻片上殘餘的液體尚未完全烘乾前，以現配的 carnoy 固定液沖洗玻片，浸泡於 95% ethanol 數秒，將載玻片置於架上風乾，晾乾後於 Nikon ECLIPSE 顯微鏡下觀察，挑選細胞多以及型態完整、無細胞質且異染色質明顯的玻片，置於 37°C 烘箱，隔天將樣品保存於 4°C 冰箱作後續原位雜交實驗用。

(三) 螢光原位雜交反應

1. 質體 DNA 的抽取

本實驗螢光原位雜交所使用的四種探針及標定方式列於(表 1)。45S rDNA 序列片段來源為小麥 (*Triticum aestivum*)，單一拷貝數長度約 9 kb，5S rDNA 序列來自玉米 (*Zea mays*)，單一拷貝數長度約 700 bp，Telomeric repeat 片段則取自阿拉伯芥。將含有質體之單一菌落置於 5 ml LB 培養液 (Luria-Bertani medium, 10 mg/ml ampicillin) 試管，於 37°C 震盪培養 16 小時。核糖體 rDNA 及 telomeric repeat plasmid 的抽取根據 EasyPure Plasmid DNA miniprep kit (Bioman, Scientific) 與 Molecular Biology Tools (BioKit) 製備。

分子標誌 SOCl 基因選自姬蝴蝶蘭 BAC library，該基因庫為成功大學生命科學系吳文鑾老師實驗室所建構，基因庫中的 BAC 選殖體可作為基因定址選

殖 (map-based cloning) 與染色體圖譜中基因定位重要的材料。將含質體的菌落置於 25 ml LB 培養液 (含 12.5 ug/ml CM, chloramphenicol macrolides), 於 37°C 生長箱震盪培養 24 小時。隔天以 13,000 rpm, 2 分鐘離心並去除上清液。加入 1 ml STE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 M NaCl) 後充分震盪讓菌塊懸浮, 於常溫下以 13,000 rpm 離心 2 分鐘去除上清液, 此步驟重複 2 次。加入 200 μ l MP I (25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM glucose) 及 2 μ l RNase (10 mg/ml) 混合後, 在冰上靜置 1 小時, 以促進 RNase 的作用。待反應完成, 加入 400 μ l 現配之 MP II (10N NaOH, 10% SDS, ddH₂O), 翻轉一次且在溶液完全透明前加入 300 μ l MP III (3M Potassium acetate (KOAC), 28.5% v/v Acetic acid, ddH₂O), 輕輕翻轉數次使白色沉澱物位於溶液上方。在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘, 取 650-700 μ l 透明的澄清液至新的微量離心管, 再加入等體積之 isopropanol, 搖晃均勻, 在 -20°C 下靜置 20 分鐘。待 DNA 沉澱, 以 13,000 rpm, 4°C 下離心 10 分鐘並去除上清液, 以 500 μ l 70% ethanol 清洗 DNA 沉澱物, 在 4°C 下以 13,000 rpm 離心 5 分鐘去除上清液, 於室溫晾乾後, 以 20 μ l 65°C 無菌水回溶並置於 4°C 保存。

2. 探針的標定

將含有 5S rDNA、45S rDNA、telomeric repeat 及 SOC1 的 plasmid DNA, 採用 nick translation 的方式, 以 biotin-16-dUTP 及 digoxigenin-11-dUTP 標定探針, 標定的方法參考 Roche (Nick Translation Mix for *in situ* probes) 的實驗步驟進行。取 1-2 μ g template DNA, 加入無菌水使體積至 16 μ l, 接著再加入 4 μ l 的 Digoxigenin-Nick translation mixture (Roche Molecular Biochemicals) 或 (Biotin-Nick translation mixture) 使總體積為 20 μ l。以 13,000 rpm 短暫離心 30 秒, 於 15°C 反應 2 小時。待作用完成後加入 1 μ l 0.5M EDTA (pH 8.0) 於 65°C 水浴槽加熱 10 分鐘以終止反應, 再加入 2 μ l 4M LiCl (1/10 倍體積) 及 50 μ l 預冷 (-20°C) absolute ethanol (2.5 倍體積) 並混合均勻, 置於 -20°C 冰箱以沉澱 DNA。隔天在 4°C 下以

13,000 rpm 離心 20 分鐘，倒掉上清液後直接晾乾或以 70% ethanol 再清洗一次，最後再以 20 μ l 預熱(65°C)之無菌水回溶，保存在-20°C 冰箱備用。

3. 探針濃度之定量

探針定量的標定方式，參考 (劉與張，2008) -植物細胞分子顯微技術中提到的方法。準備兩個乾淨的塑膠培養皿，以酒精噴洗乾淨。剪取適當大小之轉印用尼龍膜 (Hybond-N+ Membrane, Amersham Pharmacia Biotech)，置於塑膠培養皿內，以鉛筆輕輕在膜上邊緣作記。將 5 ng/ μ l 濃度之 control DNA 以無菌水稀釋使之濃度為 1000 pg/ μ l，再依序稀釋 10 倍(1 : 10、1 : 100 及 1 : 1000)，由左而右、濃度由高到低依序取 1 μ l 點漬到 membrane 上。將保存於-20°C 中之探針短暫 vortex 後離心，先取 1 μ l 加入 9 μ l 無菌水稀釋 10 倍(1:10)，再連續稀釋 10 倍 (1 : 100、1 : 1000、1 : 10000)，同樣由左而右、濃度高到低依序取 1 μ l 點漬到 membrane，所有待測的探針均依此方式做連續稀釋並點漬於膜上。將 membrane 以 120,00 uJ/cm^2 進行 crosslink (UV stratalinker 1800)。以 buffer 1 (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5)潤洗 membrane 數分鐘，再將 membrane 置換到 10 ml buffer 2 (1% Roche blocking reagent in buffer 1) 30 分鐘。接著加入 2 μ l Anti-dig AP-conjugate (或 streptavidin AP-conjugate , 150 mU/ml 稀釋 1:5000) 到 buffer 2 作用 30 分鐘。待反應完成，將 membrane 置換到 wash buffer (10 ml buffer1+0.3% Tween20)清洗兩次，每次 15 分鐘。最終進行呈色反應，將 membrane 移至 10 ml buffer 3 (100 mM Tris-HCl,100 mM NaCl,50 mm MgCl₂, pH 9.5)，再加入 100 μ l NBT/BCIP，保持在黑暗環境並小心不要移動 membrane 以確保呈色均勻，於 15 分鐘至 3 小時可見定量結果，觀察膜上圓點顏色深淺與 control DNA 作比較，檢查探針濃度及評估原位雜交反應所需加入的探針量。

4. 螢光原位雜交

原位雜交係參考 (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000)以及 (劉與張，

2008)所提到的方法。在進行雜交反應前，先將挑選過型態完整的染色體載玻片置於 37°C 烘箱至少 8 小時或於 65°C 加熱板上加熱 30 分鐘。當染色體周圍細胞質明顯時，將載玻片放入 0.01 M HCl 清洗 2 分鐘，加 100 μ l 稀釋過的 pepsine 酵素溶液 (pepsine : 0.01M HCl 為 1 : 100)於蓋玻片(24 x 40 mm)上，將載玻片正面朝下吸附蓋玻片，之後將玻片仍以正面朝下的方式倒置於染缸中，於 37°C 反應 5 - 10 分鐘。酵素作用完畢後以無菌水清洗 2 分鐘，再以 2x SSC 於振盪器中清洗 2 次，每次 5 分鐘。以 70%、90%、100% ethanol 連續脫水各 3 分鐘，靜待其自然乾燥即完成玻片之前處理。

配置 20 μ l 雜交混合液 (4 μ l 50% dextran sulphate, 10 μ l 100% formamide, 2 μ l 20 x SSC, 0.5 μ l 10% SDS, 3.5 μ l probe DNA)，於滾燙的沸水煮熱 10 分鐘，冰浴 5 - 10 分鐘。每一載玻片滴上 20 μ l 雜交混合液，蓋上蓋玻片(24 x 32 mm)，隨即放到 80°C 加熱板上靜置 2 分 30 秒，再將載玻片以正面朝下方式置於染缸，將染缸放在內含濕紙中的保溫盒(潮濕容器)內於 37°C 烘箱中進行雜合反應。

隔天將載玻片浸泡於 2x SSC，讓蓋玻片自然滑落，並於 2 x SSC 中震盪搖動 2 次，每次 5 分鐘，再將玻片放入 42°C 之 SF50 (50% formamide, 2 x SSC)溶液中浸泡 3 次，每次 5 分鐘。接著以 2 x SSC 清洗 2 次，每次 5 分鐘，再置換到 4T (4 x SSC, 0.5% Tween20)溶液清洗 5 分鐘。加入 100 μ l TNB (1% blocking reagent in 1 x TN, 10 x TN = 1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5)溶液於蓋玻片(24 x 40 mm)上，將載玻片正面朝下吸附蓋玻片，倒放置於染缸內於 37°C 潮濕容器中作用至少 30 分鐘。後續的抗體抗原反應皆以此方式吸附蓋玻片。待作用完畢浸泡 4T 溶液讓蓋玻片自然滑落，取出載玻片，滴上 100 μ l 以 TNB 稀釋之 Avidin Texas-Red (Vector Laboratories)抗體溶液 (Texas-Red : TNB 為 1 : 800)，此過程須避光處理，置於潮濕容器中 37°C 下處理 1 小時。取出載玻片，以 4T 溶液清洗 5 分鐘並讓蓋玻片自然滑落，再以 TNT (1 x TN ,0.5% Tween20)溶液清洗載玻

片 2 次，每次時間約 5 分鐘。接著再滴上 100 μ l 以 TNB 稀釋之 Biotinlyed Anti-avidine (Vector Laboratories) 抗體溶液 (Anti-avidine : TNB 為 1 : 100) 或 Sheep anti-digoxigenin-FITC (fluorescein isothiocyanate , Vector Laboratories) 抗體溶液 (anti-dig : TNB 為 1 : 200)，於 37°C 潮濕容器中處理 1 小時。取出載玻片，以 TNT 溶液清洗 3 次並讓蓋玻片自然滑落，每次 5 分鐘。滴上 100 μ l 以 TNB 稀釋之 Avidin Texas-Red 抗體溶液 (Texas-Red : TNB 為 1 : 800) 或 Anti-sheep-FITC (Vector Laboratories) 抗體溶液 (anti-sheep : TNB 為 1 : 800)，於 37°C 潮濕容器中處理 1 小時。將載玻片以 2 x SSC 清洗 2 次並讓蓋玻片滑落，每次 5 分鐘，以 70%、90%、100% ethanol 依序脫水各 5 分鐘，置於架上晾乾。乾燥後滴上 12.5 μ l DAPI 螢光染劑，蓋上 24 x 40 mm 蓋玻片，於 Nikon Ti 螢光顯微鏡下觀察實驗結果。

(四) 核型分析與雜交訊號影像處理

將製備完成的染色體玻片以 DAPI (100 μ g/ml DAPI : 抗衰退劑 Vetrashield 為 1 : 19) 螢光染劑或 PI (propidium iodide, 5 mg/ml 稀釋) 染色 (24 x 40 mm 蓋玻片覆蓋)，於 Nikon Ti ECLIPSE 螢光顯微鏡下觀察染色體分布型態，以 CCD (Cooled charged -coupled device) camera 拍照將影像輸入到電腦存檔。挑選解析度高、染色體型態完整且均勻散開的染色體圖片，以 Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) 中「straighten」功能將每一條單離的粗絲期染色體追蹤之後拉直，再利用 Adobe photoshop CS2 及 Microscope NIS-Elements Software 等影像處理軟體測量染色體長度、長短臂以及異染色質大小等數據，並推估中心節的位置及觀察染色體型態，建立初步的核型圖。另外將螢光原位雜交實驗後的染色體玻片，以 Rhodamine 或 FITC 等螢光光源激發觀察雜交訊號的位置，以 CCD camera 收集影像，利用影像處理軟體 NIS-Elements Software 整合螢光標定的結果，於相同細胞中觀察相異的螢光訊號。

四、結果

(一) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體型態觀察

本實驗分析之蘭花為台灣原生種蘭嶼姬蝴蝶蘭 ($2n = 2x = 38$)，具有 19 對染色體；收集適當長度的花苞，將花粉粒以配置的 1% Acetocarmine 染色，將染色體壓散後於光學顯微鏡下觀察花粉細胞，可發現粗絲期染色體呈現長短不等的絲狀體，均勻分散在細胞中 (圖 1A)。以酵素打破細胞壁破壞細胞的結構，將染色體壓散後以光學顯微鏡 1000X 倍率(目鏡+物鏡)觀察粗絲期染色體的型態 (圖 1B)；進一步以螢光染劑染色，其中 DAPI 是利用紫外光波長光線激發，與雙股 DNA 結合時，最大吸收波長為 358 nm，最大發射波長為 461 nm。DAPI 主要係染序列中 AT rich 之處，於螢光顯微鏡下可看到每條染色體皆有一段亮帶 (圖 1C)，為異染色質所在的區域，有些亮帶特別明顯，可見姬蝴蝶蘭異染色質中富含 AT 的序列。以影像軟體 Photoshop 處理，染色體呈現黑色與灰色相間的圖片，分別代表異染色質及真染色質的區塊 (圖 1D)，染色質處對比明顯，可觀察到粗絲期染色體明顯的異染色質區段。

(二) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型分析

禾本科模式作物水稻，由於前中期染色體較小，各型態特徵不明顯，目前國際上傾向於依粗絲期染色體的長度進行編碼，而在水稻的細胞遺傳研究中，染色體編號是依據核型分析結果中染色體長度由長到短的順序來進行(程等，1999)。姬蝴蝶蘭中期染色體型態相似，相鄰染色體之間差異不大，在沒有相關的遺傳圖譜及完整的細胞遺傳研究輔助下，欲對染色體進行編號實為困難。本實驗採用水稻編碼的方式，以粗絲期染色體核型的結果，將長度由大至小予以編號並進行後續的分析。從染色體製片中挑選一個解析度最佳、異染色質清晰且染色體均勻分散的細胞作為模式核型，以染色體長度大小予以初編號 (圖 2)，

再比對不同的細胞樣本數作統計分析，整理的核型分析結果如（表 2）所示：

1. 染色體長度與相對長度

本研究從染色體製片中共挑選 5 個較為完整的粗絲期細胞測定數據，除了模式核型的細胞外，另外供作分析的 4 個細胞詳見（圖 3），測得相異細胞中染色體總長以及相對長度（占總長度之百分率）的數值。依據資料（表 2）的結果，姬蝴蝶蘭粗絲期染色體平均總長為 417.14 μm ，就單一染色體而論，平均長度為 21.95 μm ；染色體最長約 32.07 μm ，最短約 13.65 μm ，分別占染色體總長的 7.82% 及 3.34%，兩者相差 2.35 倍。根據染色體相對長度的大小，可將染色體大致分成四組：第一組包含第 1、2、3 對屬於較長的染色體，這三對染色體占了總長的 20%；第二組為第 4~8 對染色體，相對長度加總共占 30% 左右，前 8 對染色體長度幾乎就占了總長的一半；第三組包括第 9~17 對染色體，就單一染色體而論，其相對長度都介於 4%-6% 之間，染色體相對長度的加總約占總長 40% 左右，這兩組皆屬於中等長度的染色體。最後 2 對屬於較短的染色體，其長度加總後不到總長的 10%。

2. 染色質的分佈

染色質的分佈是染色體重要的型態特徵，可作為辨識不同染色體的依據，這也是粗絲期在核型分析上優於中期染色體的主要原因之一。姬蝴蝶蘭粗絲期染色體上分佈許多染色較深的異染色質結，尤其在染色體分化良好、解析度佳的細胞中尤為明顯。在（圖 2）的模式核型圖之中，可以觀察到其中第 19 對染色體具有五個清晰且染色較深的異染色質結以及另外兩個染色較淺、相對較不明顯的異染色質結。

相異染色體間異染色質的大小有極大的差異，綜合（表 2）的數據分析，可發現第 1 對染色體有一段長度極大的異染色質區，此區域就占了該條染色體總長的 1/3，而第 4、7、8、11、15、16 對染色體也都具有較大的異染色質，長

度介於 7~9 μm ，但其中第 2、13、14 等三對染色體則僅含有極少的異染色質，平均長度不到 5 μm 。真染色質主要為基因表現的地方，姬蝴蝶蘭粗絲期染色體中真染色質與異染色質的大小，皆沒有隨染色體總長的改變而呈現相對應的增加或減少，且就單一的染色體型態而論，這兩種染色質相對大小最多相差 5.6 倍(第 2 對)，最少只有相差 1.1 倍(第 19 對)，顯示在姬蝴蝶蘭中異染色質的大小在某些染色體間有極明顯的差異，有利於染色體的辨識。

3. 中心節的位置

中心節是染色體核型上重要的特徵之一，姬蝴蝶蘭在粗絲期染色體尚未收縮很短時，中心節的位置較為清晰而易於判斷，在顯微鏡下可看到染色體的中心節是一染色較淺而兩側分布著染色較深的區域，待中心節位置確定後便可測定出各染色體長臂與短臂的臂比 (Arm ratio)。對照 (表 2) 的統計資料，臂比最大的第 13 對染色體為 4.03，最小的第 16 對染色體為 1.25，兩者相差 3.22 倍。依中心節的位置不同可將染色體分成四種型式，判定的標準係根據 Rho 等人 (2012) 所描述：臂比介於 1.00~1.67 間屬於中位中節 (metacentric) 染色體，表中心節在染色體正中央；臂比介於 1.67~3.00 間為次中位中節 (submetacentric)，中心節偏染色體中央；臂比介於 3.00~7.00 之間為近端中節 (subtelocentric)，中心節接近染色體的一端；另外臂比在 7.00 以上則是端點中節 (telocentric)，中心節在染色體端點。對照 (表 2) 的中心節統計數據，可以發現姬蝴蝶蘭的 19 對染色體中，有 8 對染色體屬於中位中節，10 對染色體為次中位中節，只有第 13 對染色體為近端中節，中心節的位置接近染色體的短臂處。臂比在某些染色體間存在很大的差異，亦可作為辨識不同染色體重要的指標。

4. 衛星染色體的觀察

有的染色體除了具有初級收縮區 (primary constriction)，即中心節所在的位置外，尚有另一段次級收縮區，此處附有一段染色體稱為衛星區 (satellite)，具

有衛星區的染色體又稱為衛星染色體 (satellite chromosome)，幾乎所有生物細胞至少有一對衛星染色體，大小不等且通常附在染色體短臂之處。從 (圖 4 A、B) 箭頭所指的地方，可以觀察到姬蝴蝶蘭單離的染色體短臂上，末端有一處染色較深，且尚未完全收縮進來的區域，此處即為次級收縮區所在。觀察該染色體的型態，發現與細胞中第 13 對染色體相當接近。因此觀察次級收縮區(衛星染色體)的有無，可作為染色體識別的重要標誌。

5. 染色體收縮程度的差異

為比較姬蝴蝶蘭中期與粗絲期染色體收縮程度的差異，同時觀察有絲分裂中期染色體的型態 (圖 5) 並測量染色體長度 (表 3)。(圖 5 A) 的中期染色體圖，經測量後得到染色體平均長度為 1.78 μm ，染色體最大與最小相差約 2 倍。而 (圖 5 B) 的染色體平均長度是 1.76 μm ，兩個樣本細胞中平均長度大小非常相近，與粗絲期染色體 (21.95 μm) 相較下，平均長度相差約 12 倍，兩者最大的染色體間相差約 13 倍。因此以粗絲期染色體建立核型，將可提高至少 12 倍以上的基因或序列定位解析力。

(三) 姬蝴蝶蘭螢光原位雜交與基因定位

1. 重複性序列的定位

核糖體 DNA 基因與端粒序列皆屬於縱向重複性序列，普遍分布在染色體上特定的位置。將 45S rDNA 以 biotin-16-dUTP 及 digoxigenin-11-dUTP 標定探針，以螢光原位雜交分別定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體上 (圖 6)，前者 (biotin) 以 Rodamin (紅色螢光) 偵測，後者 (dig) 以 FITC (綠色螢光) 偵測。依據 (圖 6) 的結果，45S rDNA 於一對中等長度的染色體末端呈現明顯的訊號，而在 (圖 4) 的單離染色體上曾觀察到次級收縮區，於 (圖 6 B、C) 該染色體末端確實也出現 45S rDNA 的訊號，顯示藉由 45S rDNA 的觀察，可判斷具有衛星體的染色體。以阿拉伯芥型的端粒重複序列 (TTTAGGG) n 為探針進行螢光原位雜交，

觀察到單離染色體的端點上有微弱的訊號 (圖 6 D)。以雙標的螢光原位雜交同時觀察這兩種序列的分佈 (圖 7)，可發現到端粒序列的訊號大多位於染色體的端點上，顯示姬蝴蝶蘭染色體的端粒是屬於阿拉伯芥型的端粒序列，而 45S rDNA 則出現在第 13 對染色體的末端。此外再將另一種核糖體基因 5S rDNA 定位在染色體上，螢光原位雜交的結果顯示，5S rDNA 於不同的細胞中皆出現在一對長度較短的染色體上，且訊號皆分佈在染色體的末端 (圖 8)，由 (圖 8 A) 內含 5S rDNA 染色體實際分析的數據指出，該染色體的平均長度將近 16 μm ，異染色質與真染色質分別約為 6.2 μm 以及 9.6 μm ，以及依據染色體型態與異染色質比率(40%)等型態與特徵皆與第 17 對染色體相似，比對 (圖 8 D) 單離染色體型態，共同之處皆在於，異染色質的分佈位置很靠近染色體的端點。

2. 內含功能性基因獨特序列的定位

以螢光原位雜交技術將開花時間相關基因 SOC1 定位在染色體，發現於一對染色體上出現明顯的訊號，該訊號的型式包含兩個明顯的點以及一個較微弱的點，觀察細胞分裂中染色間期 (interphase) 的細胞同樣也發現到一對訊號的分佈 (圖 9 A)。另外在相異細胞中也觀察到其中一對染色體有出現 SOC1 基因的訊號 (圖 9 B)，對照 李(2006) 對 SOC1 基因進行的序列分析，本實驗證實了 SOC1 在姬蝴蝶蘭中確實為單一拷貝的基因序列；另外於相異細胞單離的染色體上，同樣偵測到 SOC1 基因的訊號，而訊號的型式包含一個極為明顯的點以及兩個相對較微弱的點 (圖 10 A)，以影像軟體編輯加強染色質的對比 (圖 10 B) 並對染色體進行分析，發現該染色體長度約為 25.25 μm ，異染色質與真染色質大小分別為 8.58 μm 與 16.67 μm ，其異染色質占了染色體總長的 34%，臂比約為 1.4，SOC1 基因位於染色體短臂的真染色質上，距離短臂末端約 5.16 μm ，無論染色體型態與統計數據比對的結果發現最接近第 1 對染色體。

(四) 姬蝴蝶蘭結合分子標誌高解析核型

綜合不同細胞染色體型態的觀察、長度的測量、異染色質的大小與分佈位置、臂比的計算以及整合螢光原位雜交訊號的結果(其中 CMT 與 EFS 基因的位置係分別參考林 (2012) 以及周 (2012) 所分析的結果), 手繪出姬蝴蝶蘭核型之模式圖 (ideogram) (圖 11), 建構姬蝴蝶蘭完整的核型分析。根據這些結果, 針對每一對染色體的特徵分別描述如下:

第 1 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 平均長度為所有染色體中最大, 中央有一段極長的異染色質, 約占染色體總長的 1/3, 大多分佈在長臂上。短臂真染色質上有一個 SOC1 的基因。

第 2 對染色體: 屬於中位中節染色體, 異染色質較少, 均勻分佈在中心節的兩側, 真染色質與異染色質的相對比例為所有染色體中最大。

第 3 對染色體: 屬於中位中節染色體, 異染色質均勻分佈在中心節兩側, 短臂的長度為所有染色體中最大。

第 4 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 異染色質較多, 主要分佈在長臂。

第 5 對染色體: 屬於中位中節染色體, 異染色質均勻分佈在中心節兩側, 長短臂的比例較均勻。

第 6 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 短臂上僅含有極少量的異染色質, 長短臂相差約 2 倍, 靠近長臂的末端有一個 CMT 基因(附圖 1)。

第 7 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 中心節兩側異染色質較大。

第 8 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 有較多的異染色質均勻分佈在中心節兩側, 異染色質平均長度約 8.5 μm , 含量僅次於第 1 對染色體。

第 9 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 異染色質均勻分佈在中心節兩側, 臂比相對較大。

第 10 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 異染色質集中在短臂處, 長短臂相差約 2 倍, 靠近長臂的末端有一個 EFS 的基因(附圖 2)。

第 11 對染色體: 屬於次中位中節染色體, 有較多的異染色質, 主要分佈在長臂。

第 12 對染色體：屬於中位中節染色體，長短臂的分佈較均勻，異染色質於短臂上的分佈量略多於長臂。

第 13 對染色體：屬於近端中節染色體，具有最大的臂比，中心節靠近短臂的端點。異染色質的大小與短臂皆為所有染色體中最小。其中異染色質的分佈位置相當靠近短臂，且在短臂末端有一 45S rDNA 的基因，為染色體次級收縮區所在的地方。

第 14 對染色體：屬於次中位中節染色體，異染色質相對較少，於長臂上的分佈量略多於短臂，長短臂相差約 2.5 倍。

第 15 對染色體：屬於中位中節染色體，有較多的異染色質，主要分佈在長臂。

第 16 對染色體：屬於中位中節染色體，異染色質均勻分佈在中心節兩側，長短臂的分佈最均勻，臂比為所有染色體中最小。

第 17 對染色體：屬於次中位中節染色體，異染色質的分佈位置相當靠近短臂，長短臂的分佈比較不均勻，臂比相對較大，短臂末端有一 5S rDNA 的基因。

第 18 對染色體：屬於中位中節染色體，異染色質較多，但主要集中在長臂，短臂上僅含有極少量的異染色質。

第 19 對染色體：屬於中位中節染色體，平均長度最小。真染色質與長臂皆為所有染色體中最小，長短臂相差約 1.5 倍，真染色質與異染色質的相對比例亦為所有染色體中最小，僅相差 1.1 倍。

五、討 論

(一) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體的製備與型態觀察

蘭嶼姬蝴蝶蘭以花粉母細胞減數分裂中粗絲期染色體分析核型，在一定程度上能夠克服體細胞染色體型態過小、解析力不足的缺點，不過以粗絲期染色體進行核型分析時也存在不少的困難。由於粗絲期染色體長度過長，在製備的過程中染色體容易纏繞，相互之間產生重疊而難以分散，無法對個別染色體型態作分析；許多細胞除了相互纏繞外，還會有單一的染色體各自游離出去，常無法收集到完整的 19 對染色體，如 (圖 3 C) 與 (圖 3 D) 的細胞中各缺少一對染色體。另外也因為粗絲期染色體長度拉長的特性，染色體在製備過程中容易有斷裂的情形，這在收縮較為緊實的中期染色體上較不明顯。雖然以新鮮採集的花粉母細胞來製備可減少此情況的發生，但仍然無法完全避免，必須從製片中盡量挑選出最為完整的細胞。此外各染色體上一些重要的型態特徵如中心節的位置等，於粗絲期階段未必都能清楚加以辨識，加上細胞分裂與不斷的收縮過程中，該特徵又會發生變化，間接造成核型分析上的誤差。儘管利用粗絲期染色體分析核型有其難度，但仍有相對的優勢存在；粗絲期除了提高分析上的解析力外，還有兩個重要的優點：其一即同源染色體聯會 (synapsis) 可避免辨別同源染色體的麻煩，另一方面粗絲期染色體上分佈許多染色後深淺不同的染色質節，可作為識別特定染色體的重要標誌 (程等, 1999)。

(二) 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型分析

以禾本科模式作物水稻為例，Shastary 於 1960 年最早報導了水稻減數分裂粗絲期核型分析結果，並以長度大小編碼染色體，但當時的染色體製片技術尚未純熟，染色體不夠分散、染色質特徵不明顯，從而限制了粗絲期核型的應用。Kurata 等人於 1981 年將體細胞染色體製片中酶解火焰乾燥法引進到粗絲期的製備上，盧等 (1990) 即利用此方法，獲得了優良的粗絲期染色體製片，分析

幾種野生稻種的核型。由此可知完整與精準的核型分析，製片技術的成熟與否實乃重要的基礎。本實驗中即應用兩種不同的製備方式，期望能夠找到型態完整、分散均勻的粗絲期染色體，得到較為可靠的染色體相對長度或臂比等核型數據，並針對不同染色體的形態與特徵作詳細的描述。由於許多染色體缺乏極明顯的識別標誌，很難確保相異細胞中編號比對的結果確為同一條染色體。以下就核型分析的結果分別作探討：

1. 染色體長度與相對長度

本實驗中染色體的編碼係根據 (圖 2) 模式核型為基準，依染色體長度的大小順序予以編號，因此第 1 對與第 19 對染色體分別為長度最大與最小者，接著再從其他較為完整的細胞核型中，參考長度的大小並依據染色體異染色質的型態與分佈位置陸續和前者模式核型相互比對，完成 (表 2) 的統計分析並計算標準偏差。因此正常來說各染色體平均長度的變化，應隨著編號往後而有遞減的趨勢。然綜觀 (表 2) 的數據結果，其中第 3、7、8、12、14、16 對染色體的大小並沒有呈現規則的變化，其長度沒有相對應的遞減。探究可能的原因，係因染色體在細胞分裂過程中具有不同的收縮速率。程與頤 (1994) 在進行栽培稻 Nantehao 粗絲期核型分析時，就曾發現其中第 4、5、6 三對染色體於粗絲期的不同時期(早、中、晚期)具有不等的收縮速率，導致這三條染色體在粗絲期的不同時期，長度排列出現倒序的現象，只有在粗絲期晚期才真正表現長度往後遞減的順序。雖然染色體不同時期收縮程度的差異，未必是造成 (表 2) 數據中平均長度與相對長度不規則變化的主因，但本實驗分析的五個細胞中，確實無法詳細判定都為粗絲期中相同的時期，因此在水稻中觀察到此一現象，不排除在其他物種上發生的可能性。此外相異細胞之間單一染色體的分離與追蹤包含人為的誤差以及染色體的斷裂，都可能造成測量上的誤差，從而導致相異細胞間染色體編號的不對應，使得染色體平均長度沒有呈現規則遞減的趨勢。

2. 染色質的分佈

核型分析中待測的五個細胞，染色體長度之間如前述所提，無法完全精準的互相對應。由先前的觀察中發現姬蝴蝶蘭異染色質都分佈在中心節附近而非染色體的端點，而染色體斷裂若發生在染色體兩端真染色質上，通常較不易察覺而被忽略，因此若以染色體長度以及真染色質大小型態進行染色體的比對誤差較大，故本實驗相異細胞間染色體的辨識和比對主要係根據異染色質的型態與相對位置及大小來做判定。受到染色體製片過程的影響、染劑染色均勻與否以及影像分析中對比色的亮暗調整，事實上在同一細胞要獲得 19 對染色體染色質分佈均相當清晰的圖像是非常困難的，只有在製片技術、染色得當、染色體又收縮良好的情況下，才能真正反映不同染色體間染色質的分佈情形。以個別染色體而論，真染色質所占的比例往往多於異染色質，而真染色質往往也是姬蝴蝶蘭染色體發生斷裂機會較高的地方，故其標準偏差會略高於異染色質。然異染色質在相異的細胞間型態的分佈並非呈現一致性，主要是因為同一染色體由粗絲期中期至晚期，隨著染色體的不斷收縮，相鄰的異染色質之間，其間隙也會不斷縮小，使得相鄰的染色質有合併的趨勢；至於染色質越多，是否代表收縮程度越明顯以及相對的標準偏差就越大，從 (表 2) 的結果中並沒發現到相對的趨勢與變化。

不同的蝴蝶蘭異染色質分佈的位置有很大的差異。依據 Kao 等 (2001) 分析蝴蝶蘭的核型，觀察到 *P. aphrodite* 與 *P. equestris* 一樣，異染色質皆分佈在中心節的周圍 (pericentromeric heterochromatin)，在 *P. venosa* 中異染色質都分佈在長臂上，其中還有五對染色體全為真染色質；*P. mannii* 的異染色質大多都集中在長臂，少部分分散在短臂或中心節附近；而 *P. violacea* 與 *D. pulcherrima* 的異染色質大多分佈在長臂和短臂兩端，中心節兩側較少，且 *P. violacea* 中有三對全為真染色質。藉由異染色質的分佈位置，不僅能夠鑑別相同細胞內不同的染色體，對於識別屬間相異種類的染色體也是一項重要的指標。

3. 中心節的位置

觀察姬蝴蝶蘭粗絲期染色體的型態，其中心節在某些染色體上非常清晰，但對某些染色不均勻或收縮較短的染色體而言，中心節的位置並不容易判斷。以水稻為例子，在粗絲期中期染色體尚未收縮很短時，可觀察到相對較清晰的中心節。隨著染色體進一步收縮進入粗絲期晚期，中心節的區域將變小而難以辨認，因此在粗絲期中期染色體較長時，中心節的辨認才較為準確（程與頤，1994）。姬蝴蝶蘭核型分析的五個細胞中，部分染色體的臂比仍存在很大差異，大部分臂比的不統一常是因為相異細胞間染色體編號的不對應，以及中心節的位置判別錯誤所導致。目前姬蝴蝶蘭尚未解序中心節的序列，且中心節在相異物種間並非為保守性序列，無法以其他物種的中心節探針對姬蝴蝶蘭進行螢光原位雜交，須透過改善製片技術及取得收縮良好的細胞，才能準確辨認出中心節的位置，進而算出更精準的臂比。因此就本實驗而論，若以臂比的統計數值為基準排列染色體，所得到的核型分析較不精準。從整理的（表 2）平均數據來看，姬蝴蝶蘭除了第 13 對染色體外，幾乎全為中位中節及次中位中節染色體，顯示長短臂的分佈較為均勻，許多蝴蝶蘭屬植物包括朵麗蘭在內，其中心節主要都屬於此種類別。

4. 衛星染色體的觀察

姬蝴蝶蘭平均每一個完整的細胞中，有一條為帶有衛星體的染色體，由前述的研究結果顯示，認為是第 13 對染色體。有許多明確的報導指出，水稻的衛星染色體帶有一個小的衛星體，在體細胞分裂相中較容易辨認，在測量衛星染色體的長度時通常不包含衛星體在內，然而在粗絲期中該衛星體仍舊存在而不易辨別，在測量染色體長度時往往會將衛星體的長度也計算在內，會導致該條染色體在編碼時產生一些誤差。從（表 2）的分析結果顯示，自第 9 對染色體之後，平均長度的標準偏差普遍都不高，標準偏差數值皆低於 4，惟具有衛星體

的第 13 對染色體偏差值異常的高。本實驗的染色體編碼係以 (圖 2) 模式核型的長度大小為根據，該組細胞中染色體的衛星體較不明顯，因此所測得的長度與編碼順序應較為可靠，然而後續再行比對其他細胞，可能受到衛星體長度(或染色體斷裂)的影響，導致該條染色體的長度變動較大，這可能就是造成第 13 對染色體長度有一個高標準偏差值的主要原因。

5. 染色體收縮程度的差異

參照 (表 3) 姬蝴蝶蘭根尖中期染色體數據統計，染色體平均長度約為 1.77 μm ，雖此測量的結果只有兩個重複的樣本數，但是與 Kao 等 (2001) 觀察的結果相吻合，該研究提出姬蝴蝶蘭具有 38 條小型的染色體，且平均長度小於 2 μm ；此外最大與最小的染色體長度相差約 2 倍，也吻合 Shindo 與 Kamemoto (1963) 分析的結果，該研究中也發現姬蝴蝶蘭最大的一對染色體為最小的 2 倍。比對中期與粗絲期染色體收縮程度的差異，玉米、番茄、阿拉伯芥與水稻在粗絲期與中期染色體的平均長度上分別差了 10、15、20 與 40 倍 (de Jong *et al.*, 1999)，而姬蝴蝶蘭比較的結果，平均長度大小相差 12 倍，可提升染色體圖譜的定位解析力。

(三) 姬蝴蝶蘭螢光原位雜交與基因定位

1. 重複性序列的定位

李 (2007) 曾探討核糖體 RNA 基因在七種蝴蝶蘭屬植物中期染色體上的分佈位置，發現到有一對染色體末端出現強度相同的 45S rDNA 訊號，而 5S rDNA 則在另外兩條染色體末端發現訊號。參照 (圖 6 A) 與 (圖 7 A、B) 的結果，顯示姬蝴蝶蘭每個細胞中只有一對染色體具有 45S rDNA 的基因座，且位於染色體的末端，從染色體型態來看，應當最接近第 13 對染色體。從螢光原位雜交的結果，挑選九個內含 45S rDNA 訊號單離染色體的細胞，對該條染色體作統計分析 (表 4)，發現不論相對長度、染色質或長短臂的平均值都與第 13 或 14

對染色體最為接近，但平均臂比(3.0)與第 13 (4.03)、14 (2.50)條染色體差異均較大，極可能為中心節判斷錯誤所造成。觀察九個細胞中該染色體型態，異染色質幾乎都非常靠近短臂末端，因此仍傾向為編號第 13 對的染色體。45S rDNA 為保守序列，不過在不同物種間分佈的位置不盡相同，在姬蝴蝶蘭中出現在第 13 對染色體上，在玉米為第 6 對染色體 (Chen *et al.*, 2000)，在番茄則是位於第 2 對染色體 (Chang *et al.*, 2008)，而大豆則同樣在第 13 對染色體末端發現到次級收縮區 (Singh and Hymowitz, 1988)。45S rDNA 在染色體上的分佈位置與數量演化程度相當高，在姬蝴蝶只有一個基因座，但在蝴蝶蘭屬的 *P. amboinensis* 與 *P. venosa* 中期染色體上則分別出現七對與五對基因座 (李, 2002)。

此外由 (圖 8)的實驗結果顯示，5S rDNA 都分佈在單一條染色體的端點，與李 (2007) 年所作的結果相符合。就染色體型態與異染色質的位置而論，最接近其中第 17 對染色體，由於螢光原位雜交反應後染色體型態與解析度受到影響，導致兩種染色質的對比不甚明顯，因此在染色體編號的歸類上仍有待探討，但就染色體整體的型態與初步的數據來看顯示其為第 17 對染色體的機會仍舊相當高。

阿拉伯芥型的端粒序列 (TTTAGGG)_n 普遍存在植物染色體的端點，參照 (圖 7)螢光原位雜交的結果，姬蝴蝶蘭大多數的染色體上皆出現端粒序列的訊號，顯示螢光原位技術的過程沒有問題，但有些染色體的末端沒有發現到訊號，探究最可能的原因係染色體末段有發生斷裂的情形，觀察 (圖 7)某些染色體殘餘片段上有發現紅色的訊號，即證明確實來自某些染色體包含末端的片段。

2. 內含功能性基因獨特序列的定位

本研究所使用的功能性基因 SOC1 定位在姬蝴蝶蘭染色體上，證實其為單一拷貝的基因序列，然而 SOC1 於某些細胞染色體上的訊號型式為兩個點，有些為三個點，乃由於染色體不同的環狀結構 (loop)所致，因此訊號的型式會有多種不同的變化。實際測量 (圖 10)染色體長度為 25.25 μm，比對 (表 2)第 1 對

染色體的平均長度 (32.07 μm)，兩者顯然有些落差，但第 1 對染色體平均五個供試細胞中，長度最少者也只有 25.47 μm (附表 7)，雖然就異染色質的大小、異染色質比率、真染色質與異染色質比例等來看，與第 7 對染色體也相當類似，但觀察 (圖 10 B) 內含 SOC1 的染色體，發現短臂上具有一段相對較大的真染色質區域而明顯與第 7 對染色體有所區分，故在 SOC1 基因位置的判斷上仍為第 1 對染色體的可能性最高。

(四) 姬蝴蝶蘭粗絲體染色體的辨識與高解析核型

粗絲期染色體提高了核型分析上的解析度，整合染色體型態、核型的統計數據與螢光原位雜交的結果，能夠描述每條染色體的特性。但有些染色體彼此間型態與特徵仍相當接近，要清楚的加以鑑別還是有其困難。第 1 對染色體長度最大，中央的異染色質相當明顯，且短臂的真染色質區有一個 SOC1 基因分子標誌，於前三對染色體之間相對容易識別；第 2 與 3 對染色體長度接近，但第 3 對的異染色質較大，第 3、5 兩對染色體型態相近，但第 3 對的平均長度明顯較大，而第 4 對染色體中央同樣具有較多的異染色質，但染色體總長明顯小於第 1 對，於本實驗中暫無建構分子標誌；第 6 -10 對染色體平均長度相當接近，這五對的最大與最小平均長度僅相差 2.94 μm 。其中第 6 與第 10 對染色體的長臂真染色質上各有一個 CMT 與 EFS 的基因，可運用分子標誌鑑別之；第 9 對染色體平均長度明顯小於第 7、8 對，以異染色質分佈位置及有無 EFS 基因座可識別第 9 對與第 10 對染色體，而 7、8 兩對染色體型態、異染色質大小與中心節位置都非常相近，唯第 8 對異染色質含量略高一些，需藉由分子標誌的建立方容易加以區別。其中值得注意的是，綜觀 (表 2) 呈現的統計值，可以發現第 8 對染色體於平均長度、真染色質、長臂與臂比上皆具有極高的標準偏差，主要的原因係由於染色體編號的不對應程度最高，在不同的細胞間呈現高度的歧異性 (附表 6)。第 11、12 兩對染色體長度接近，但異染色質的分佈明顯不同，一個主要集中在長臂，另一個則分佈在短臂處較多，而第 10 對與第 12 對染色

體型態相似，異染色質多集中在短臂上，然第 10 對染色體有 EFS 基因座而第 12 對上沒有。第 13-17 對染色體平均長度也相當接近，這五對的最大與最小平均長度更僅相差 1.69 μm 。姬蝴蝶蘭大部分的染色體異染色質多分佈在中央或靠近中央，惟第 13、17 兩對染色體的異染色質分佈非常靠近短臂末端，藉由判斷異染色質分佈位置，便能夠從細胞中約略鑑別出這兩對型態特別的染色體。至於分辨第 13、17 兩對染色體，除了平均長度些微的差距外，第 13 對染色體短臂末端有一明顯的 45S rDNA 基因座，異染色質長度較小，第 17 對染色體短臂末端則有一 5S rDNA 基因座，異染色質較大。14-16 這三對染色體中，第 14 對異染色質大小明顯小於另外兩對，而臂比則是這三對中最大。而 15、16 兩對染色體除了異染色質相對位置略有差異外，不論是相對長度、染色質大小，甚至是長短臂與臂比等數據皆很相近，且 16 與 12 兩對染色體的型態與臂比也很類似，仍需要藉由分子標誌才能準確鑑別。最後再分析 18、19 兩對染色體，其中第 18 與第 6 對染色體一樣，短臂都僅含有極少的異染色質。第 19 對染色體長度最小，於細胞中相當容易辨認，異染色質比較均勻分佈在中心節兩側而能與第 17、18 兩對染色體有所區別。

一般染色體的編碼順序，係依據連鎖圖譜中的連鎖群或依染色體的長度大小予以排列。在一般連鎖分析且不涉及細胞學鑑定的遺傳研究中，較少出現染色體編號上的混亂；但若涉及到細胞遺傳研究，就有可能會因為依據染色體長度進行的染色體編號與先前已建立的連鎖群或當前國際統一的編碼不對應，造成染色體編碼上的混亂。如水稻目前的染色體編號順序與客觀的長度遞減順序尚存在著差異，尤其在第 2、3、9、10、11 與 12 對染色體更加明顯（程等，1999）。目前姬蝴蝶蘭尚未有完整的染色體編碼等相關文獻發表，蝴蝶蘭屬植物亦無遺傳圖譜，因此沒有細胞學的鑑定與連鎖群之間，染色體編號上混亂的問題產生。若姬蝴蝶蘭以細胞遺傳學為主的粗絲期核型與染色體圖譜先行建立，能以此為基礎，供後續蝴蝶蘭分子細胞與遺傳研究的持續推演，與其他蘭花作比較分析。

(五) 核型統計數據的細微探討

核型分析待測的五個細胞，第四組與第五組核型分別缺少第 13 對及第 2 對染色體 (附表 4-5)，這兩條染色體於所有測定值中皆只有四重複。綜觀染色體比對的結果，發現第 9 對染色體在五個細胞中的比對順序完全吻合，顯示該染色體在不同的細胞中歧異性最低，相對來說有較好的穩定度；另外第 10、14、19 對染色體也有 80% 的高比對率，第 8 對染色體差異性最大，而其他染色體的差異度則維持在一定的範圍內 (附表 6)。但觀察第二組核型的原始數據 (附表 2)，該組核型中長度編號暫定為第 17 的染色體在長短臂及臂比為缺值，缺值代表該條染色體末端有發生斷裂，將染色體接合後仍可測得長度與染色質大小，但中心節難以鑑別，無法準確測量長短臂，經比對後發現缺值所屬的染色體實為第 13 對染色體，因此實際上 (表 2) 中第 13 對染色體的臂比僅為三個數據的平均值。同樣觀察第五組核型原始數據 (附表 5)，該組核型編號暫定為第 18 的染色體也因染色體末端的斷裂情況，導致中心節無法明確加以判別，經比對後實為第 17 對染色體，故第 17 對染色體的臂比僅為四個數據的平均值。

異染色質的大小和型態為本實驗染色體比對與辨識上重要的關鍵，就異染色質長度來看，除了第五組核型整體的數值較高 (乃因該組的染色體平均總長度都普遍偏高) 外，各組比對後的結果顯示不同細胞間異染色質長度差異很小 (附表 8)，但異染色質比率的差異性就非常高，此乃由於真染色質有較高的誤差所造成 (附表 9-10)。

另外，參考 林(2012) 將姬蝴蝶蘭甲基化基因 (CMT) 定位到姬蝴蝶蘭粗絲體染色體上 (附圖 1)，發現內含 CMT 基因之染色體，其型態與本實驗核型圖中第六對染色體最為相似。實際測量該染色體的長度約為 26.05 μm ，與 (表 2) 第六對染色體平均長度 24.56 μm 相接近，而該染色體的異染色質與真染色質分別為 5.18 μm 及 20.8 μm ，與 (表 2) 第六對染色體兩種染色質平均大小 5.45 μm 及 19.11 μm 非常相近，另外該染色體異染色質百分比為 20%，與第六對染色體 (異

染色質平均百分比為 22%)也最為相近；再對照 周(2012) 將姬蝴蝶蘭開花時間相關基因(EFS)定位到姬蝴蝶蘭粗絲體染色體上(附圖 2)，發現內含 EFS 基因之染色體，其型態與本實驗核型圖中第十對染色體相似，該染色體的長度、異染色質大小及百分比、短臂分別為 18.82 μm 、5.18 μm 、32%及 7.8 μm ，與第十對染色體相似(表 2)，惟臂比 (1.4)與之對照誤差較大。綜合上述兩種基因定位與染色體分析的結果，可作為支持本研究核型與統計分析之準確度上，提供有力的佐證。

(六) 未來研究方向

許多重要的作物如水稻、玉米、棉花、番茄、馬鈴薯、大豆、油菜等都有完整的遺傳圖譜。運用遺傳圖譜上不同的分子標誌為探針，可相繼建立出各種的染色體核型與細胞遺傳圖譜，然現今蝴蝶蘭屬植物尚缺乏完整的遺傳圖譜。因此若姬蝴蝶蘭粗絲期核型系統能完整建立，可以依據細胞遺傳學的角度先行編碼染色體，並確認某些重要基因在染色體上的位置，其分子標誌將來或可作為染色體圖譜或蝴蝶蘭遺傳圖譜良好的參考依據。此外若台灣阿嬭蝴蝶蘭粗絲期核型系統也能完整建立，將可從姬蝴蝶蘭粗絲期核型已建立的分子標誌，或從 BAC library 篩選出其他重要的基因或序列作為探針，以螢光原位雜交分別將這些序列定位在姬蝴蝶蘭與阿嬭蝴蝶蘭粗絲期染色體上，比較這些基因或序列在兩個台灣原生種蝴蝶蘭間的分佈位置，探討這兩種親緣關係相近的蝴蝶蘭屬植物於演化過程中染色體排列重組之可能演進。

六、參考文獻

- 卢永根、万常绍、张桂权 (1990). 我国三个野生稻种粗线期核型的研究. 中国水稻科学 4:97-105.
- 闫素丽、安玉麟、孙瑞芬、李素萍 (2008). 染色体核型分析及染色体显微分离技术研究进展. 生物技术通报 4:70-77.
- 李文靜 (2002). 蝴蝶蘭屬植物核糖體 RNA 基因的選殖及實質定位. 國立台灣大學植物學研究所碩士論文.
- 李思誼 (2006). 姬蝴蝶蘭開花時間相關基因(*PeSOCl*)之選殖與特性分析. 國立成功大學生命科學研究所碩士論文.
- 李益豪 (2007). 核糖體RNA基因於七種蝴蝶蘭屬植物的分佈. 國立台灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文.
- 余朝文、张礼华、蒋向辉 (2012). 花生的荧光显带和 rDNA 荧光原位杂交核型分析. 作物学报 38(4):754-759.
- 林晋寬、侯議翔、宮良政 (2008). 台灣蝴蝶蘭產業之技術發展軌跡：專利及品種權分析. 5:1-14.
- 陳文輝 (2002). 蝴蝶蘭的品種改良. 科學發展 351:32-39.
- 程祝寬、顾铭洪 (1994). 籼、粳稻及其杂种粗线期的核型分析. Acta Genetica Sinica 21:385-392.
- 程祝寬、顏輝煌、顾铭洪 (1999). 水稻染色体的长度顺序和编号问题. Hereditas 21:46-49.
- 彭欣羚 (2007). 利用數種重複性DNA序列的分布建立朵麗蘭的核型. 國立台灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文.

廖敏卿 (1990). 蝴蝶蘭栽培. 台北. pp 1-95.

蔡奇助、莊晝婷 (2009). 遠緣雜交與分子遺傳鑑定技術在蝴蝶蘭育種之應用潛力. 農業生技產業季刊 17:37-45.

蔡奇助、莊晝婷 (2010). 搖曳生姿~蝴蝶蘭. 行政院農業委員會高雄區農業改良場. 屏東. pp 1-112.

劉麗飛、張松彬 (2008). 植物細胞分子顯微技術. 國立臺灣大學生物技術研究中心出版.

Achenbach UC, Tang X, Ballvora A, de Jong H and Gebhardt C (2010). Comparison of the chromosome maps around a resistance hot spot on chromosome 5 of potato and tomato using BAC-FISH painting. *Genome* 53:103-110.

Arends JC (1970). Cytological observations on genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 41:88-100.

Chang SB, Yang TJ, Datema E, van Vugt J, Vosman B, Kuipers A, Meznikova M, Szinay D, Lankhorst RK, Jacobsen E and de Jong H (2008). FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. *Chromosome research*:16:919-933.

Chen CC, Chen CM, Hsu FC, Wang CJ, Yang JT and Kao YY (2000). The pachytene chromosomes of maize as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 101:30-36.

Cheng Z, Buell CR, Wing RA, Gu M and Jiang J (2001). Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome Research* 11:2133-2141.

Christenson EA (2001). *Phalaenopsis: a monograph.* (Oregon: Timber Press).

Danilova TV and Birchler JA (2008). Integrated cytogenetic map of mitotic

metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. *Chromosoma* 117:345-356.

de Bustos A, Cuadrado A, Soler C and Jouve N (1996). Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*. *Chromosome Research* 4:491-499.

de Jong JH, Fransz PF, Zabel P (1999). High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends Plant Science* 4: 258–263.

Devi J, Ko JM, and Seo BB (2005). FISH and GISH: Modern cytogenetic techniques. *Indian Journal of Biotechnology* 4:307-315.

Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C and Jiang J (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics* 101:1001–1007.

Dressler RL (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. (Cambridge University Press).

Findley SD, Cannon S, Varala K, Du J, Ma J, Hudson ME, Birchler JA and Stacey G (2010). A fluorescence *in situ* hybridization system for karyotyping soybean. *Genetics* 185:727-744.

Flavell RB, Bennett MD, Smith JB and Smith DB (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics* 12: 257-268.

Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H and Yamabe M (1998). Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 96:325-330.

He Y and Amasino RM (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Science* 10:30-35.

- Heslop-Harrison JS and Schwarzacher T** (2011). Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* 66:18-33.
- Hoshi Y, Plader W and Malepszy S** (1998). New C-banding pattern for chromosome identification in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Breeding* 117: 77–82.
- Iovene M, Wielgus SM, Simon PW, Buell CR, and Jiang J** (2008). Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato. *Genetics* 180:1307-1317.
- Kao YY, Chang SB, Lin TY, Hsieh CH, Chen YH, Chen WH and Chen CC** (2001). Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Annals of Botany* 87:387-395.
- Kao YY, Lin CC, Huang CH and Li YH** (2007). The cytogenetics of *Phalaenopsis* orchids. In: Chen, W. H., and Chen, H. H. (eds) *Orchid biotechnology*. World Scientific, Singapore, pp 115-128.
- Koo DH, Choi HW, Cho J, Hur Y and Bang JW** (2005). A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. 'Winter Long') revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* 48:534-540.
- Kubis S, Schmidt T and Heslop-Harrison JS** (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany* 82:45-55.
- Lan T and Albert VA** (2011). Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *BMC Plant Biology* 11:126-141.
- Li L and Arumuganathan K** (2001). Physical mapping of sorted chromosomes 45S and 5S rDNA on maize metaphase and by FISH. *Hereditas* 134:141-145.

- Lin CC, Chen YH, Chen WH, Chen CC and Kao YY** (2005). Genome organization and relationship of *Phalaenopsis* orchids inferred genomic *in situ* hybridization. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46:339-345.
- Lin S, Lee HC, Chen WH, Chen CC, Kao YY, Fu YM, Chen YH and Lin TY** (2001). Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:195–199.
- Liu C, Liu J, Li H, Zhang Z, Han Y, Huang S and Jin W** (2010). Karyotyping in melon (*Cucumis melo* L.) by cross-species fosmid fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 129:241-249.
- Miller FP, Vandome AF and McBrewster J** (2009). Karyotype. (VDM Publishing House Limited), pp 1-140.
- Morales AG, Aguiar-Perecin MLR and Mondin M** (2012). Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:277–288.
- Mukai Y, Endo TR and Gill BS** (1990). Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *Hereditas* 81:290-29.
- Murata M, Heslop-Harrison JS and Motoyoshi F** (1997). Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *The Plant Journal* 12:31-37.
- Peterson DG, Price HJ, Johnston JS and Stack SM** (1996). DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome* 39:77-82.
- Rho IR, Hwang YJ, Lee HI, Lee CH and Lim KB** (2012). Karyotype analysis using

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) in *Fragaria*. *Scientia Horticulturae* 136: 95–100.

Richards EJ and Ausubel FM (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127-136.

Sadder MT, Ponielis N, Born U and Weber G (2000). Physical localization of single-copy sequences on pachytene chromosomes in maize (*Zea mays* L.) by chromosome *in situ* suppression hybridization. *Genome* 43:1081-1083.

Schmidt T, Schwarzacher T and Heslop-Harrison JS (1994). Physical mapping of rRNA genes by fluorescent *in situ* hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics* 88:629-636.

Schwarzacher T and Heslop-Harrison P (2000). *Practical in situ Hybridization*. (Oxford: Bios Scientific Publishers Limited), pp 1-203.

Shindo K and Kamemoto H (1963). Karyotype analysis of some species of *Phalaenopsis*. *Cytologia* 28: 390-398.

Singh RJ and Hymowitz T (1988). The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. as revealed by pachytene chromosome analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 76:705-711.

Sumner AT (2003). *Chromosomes organization and function*. (Blackwell Science Limited).

Sweet HR (1980). *The Genus Phalaenopsis*. (California: Day Printing Corp).

Taketa S, Harrison GE and Heslop-Harrison JS (1999). Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1-9.

Talia P, Greizerstein E, Quijano CD, Peluffo L, Fernandez L, Fernandez P,

- Hopp HE, Paniego N, Heinz RA and Poggio L** (2010). Cytological characterization of sunflower by *in situ* hybridization using homologous rDNA sequences and a BAC clone containing highly represented repetitive retrotransposon-like sequences. *Genome* 53:172-179.
- Tang CY and Chen WH** (2007). Breeding and development of new varieties in *Phalaenopsis*. *Orchid biotechnology*. World Scientific, Singapore, pp 1-22.
- Tang X, Bao W, Zhang W and Cheng Z** (2007). Identification of chromosomes from multiple rice genomes using a universal molecular cytogenetic marker system. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:953-960.
- Trask BJ** (1991). Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* 7:149-154.
- Viana AJC and Souza MM** (2010). Identification of the pattern of heterochromatin distribution in *Passiflora* species with C-banding. *Genetics and Molecular Research* 9:1908-1913.
- Viotti A, Privitera E, Sala E and Pogna N** (1985). Distribution and clustering of two highly repeated sequences in the A and B chromosomes of maize. *Theoretical and Applied Genetics* 70:234-239.
- Volpi EV and Bridger JM** (2008). FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *BioTechniques* 45:385-409.
- Wang CJ, Harper L and Cande WZ** (2006). High-resolution single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *The Plant Cell* 18:529-544.
- Wang K, Guo W, Yang Z, Hu Y, Zhang W, Zhou B, Stelly DM, Chen ZJ, and Zhang T** (2010). Structure and size variations between 12A and 12D homoeologous chromosomes based on high-resolution cytogenetic map in allotetraploid cotton. *Chromosoma* 119:255-266.

Xiong Z and Pires JC (2010). Karyotype and identification of all homoeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors. *Genetics* 187: 37-49.

Yu H, Liang H and Kofoed KD (1991). Analysis of C-banding chromosome patterns of sorghum. *Crop Science* 31:1524-1527.

Zhao X, Lu J, Zhang Z, Hu J, Huang S and Jin W (2011). Comparison of the distribution of the repetitive DNA sequences in three variants of *Cucumis sativus* reveals their phylogenetic relationships. *Journal of Genetics and Genomics* 38:39-45.



表 1. 螢光原位雜交反應使用的探針。

探針	來源	插入片段大小	標定抗原	標定方法	染色
1. 5S rDNA	<i>Zea mays</i>	700 bp	digoxigenin-11-dUTP	Nick translation	PI
2. 45S rDNA	<i>Triticum aestivum</i>	9.1 kb	biotin-16-dUTP digoxigenin-11-dUTP	Nick translation	DAPI
3. <i>Arabidopsis</i> -type telomeric sequences	<i>Arabidopsis thaliana</i>	402 bp	biotin-16-dUTP	Nick translation	DAPI
4. SOC1	<i>Phalaenopsis equestris</i> BAC library	105 kb (陳, unpublished)	digoxigenin-11-dUTP	Nick translation	DAPI

表 2. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型分析統計數據。

編號	細胞數 ^a	總長度(μm)	相對長度(%)	真染色質(μm)	異染色質(μm)	長臂(μm)	短臂(μm)	Arm Ratio ^b	中心節位置 ^c
1	5	32.07 ± 5.49	7.82 ± 0.42	21.38 ± 4.58	10.69 ± 0.98	21.60 ± 5.33	10.47 ± 2.80	2.21 ± 0.90	sm
2	4	29.08 ± 3.03	7.46 ± 0.34	24.69 ± 2.64	4.39 ± 0.93	18.06 ± 1.62	11.02 ± 1.79	1.66 ± 0.22	m
3	5	29.43 ± 4.22	7.20 ± 0.21	23 ± 4.47	6.44 ± 0.75	17.73 ± 1.92	11.71 ± 3.20	1.59 ± 0.40	m
4	5	28.29 ± 2.83	6.96 ± 0.44	20.38 ± 2.11	7.91 ± 1.25	18.66 ± 2.99	9.62 ± 0.79	1.96 ± 0.43	sm
5	5	26.29 ± 4.77	6.43 ± 0.59	19.96 ± 4.05	6.33 ± 1.59	15.09 ± 2.17	11.19 ± 2.92	1.39 ± 0.26	m
6	5	24.56 ± 4.25	6.00 ± 0.51	19.11 ± 3.19	5.45 ± 1.44	16.48 ± 3.89	8.08 ± 1.21	2.07 ± 0.52	sm
7	5	24.75 ± 3.64	6.07 ± 0.59	16.79 ± 3.81	7.95 ± 1.94	16.67 ± 2.25	8.07 ± 1.77	2.11 ± 0.28	sm
8	5	25.50 ± 7.73	6.19 ± 1.22	17 ± 6.07	8.5 ± 1.91	17.39 ± 6.92	8.10 ± 2.45	2.33 ± 1.11	sm
9	5	21.70 ± 2.42	5.32 ± 0.07	15.94 ± 2.33	5.76 ± 0.69	15.17 ± 1.35	6.51 ± 1.90	2.51 ± 0.84	sm
10	5	21.62 ± 2.57	5.30 ± 0.16	15.22 ± 2.24	6.4 ± 0.49	14.47 ± 1.98	7.14 ± 1.31	2.07 ± 0.41	sm
11	5	19.01 ± 2.70	4.66 ± 0.25	10.49 ± 1.69	8.52 ± 1.25	11.20 ± 1.96	7.07 ± 2.57	1.86 ± 0.65	sm
12	5	19.83 ± 2.70	4.86 ± 0.22	13.39 ± 2.33	6.44 ± 0.61	10.72 ± 1.76	8.64 ± 0.88	1.29 ± 0.15	m
13	4	17.18 ± 4.18	4.04 ± 0.60	12.88 ± 4.07	4.3 ± 0.29	14.22 ± 3.33	3.68 ± 1.50	4.03 ± 0.66	st
14	5	18.20 ± 2.84	4.46 ± 0.36	13.29 ± 1.69	4.9 ± 1.32	13.00 ± 1.94	5.20 ± 1.26	2.50 ± 0.50	sm
15	5	16.51 ± 2.14	4.04 ± 0.10	9.28 ± 1.21	7.23 ± 1.12	9.33 ± 1.07	7.19 ± 1.16	1.31 ± 0.14	m
16	5	17.17 ± 3.03	4.20 ± 0.43	9.78 ± 2.79	7.39 ± 0.41	9.50 ± 1.66	7.67 ± 1.45	1.25 ± 0.12	m
17	5	16.74 ± 2.14	4.15 ± 0.74	10.40 ± 2.50	6.34 ± 0.59	11.95 ± 1.49	4.31 ± 0.80	2.81 ± 0.32	sm
18	5	15.56 ± 3.56	3.78 ± 0.39	8.63 ± 2.34	6.93 ± 1.35	9.50 ± 2.61	6.06 ± 1.10	1.56 ± 0.28	m
19	5	13.65 ± 2.07	3.34 ± 0.28	7.24 ± 1.41	6.41 ± 0.88	8.24 ± 1.88	5.40 ± 0.27	1.52 ± 0.29	m

a. 供作分析的 5 個細胞中，其中 2 個細胞各只有 18 對染色體，分別缺少第 2 對及第 13 對，故細胞的樣本數為 4。

b. 臂比 arm ratio 數值係長臂(q)/短臂(p)所獲得。

c. 英文字縮寫: m: metacentric ; sm: submetacentric ; st: subtelocentric，係參考 Rho *et al.*, (2012) 文獻。

表 3. 姬蝴蝶蘭中期染色體長度統計分析。

染色體 編號	染色體長度 (μm)圖-5A	染色體長度 (μm)圖-5B	染色體 編號	染色體長度 (μm)圖-5A	染色體長度 (μm)圖-5B
1	2.37	2.45	20	1.71	1.69
2	2.2	2.27	21	1.71	1.67
3	2.19	2.22	22	1.68	1.67
4	2.19	2.16	23	1.68	1.67
5	2.11	2.15	24	1.68	1.64
6	2.09	2.1	25	1.66	1.64
7	2.09	1.98	26	1.65	1.59
8	2.06	1.92	27	1.65	1.59
9	2.04	1.88	28	1.57	1.58
10	2.03	1.88	29	1.56	1.57
11	1.94	1.88	30	1.55	1.57
12	1.94	1.85	31	1.51	1.56
13	1.93	1.83	32	1.51	1.53
14	1.92	1.79	33	1.51	1.51
15	1.91	1.76	34	1.48	1.51
16	1.86	1.75	35	1.47	1.46
17	1.86	1.75	36	1.41	1.44
18	1.79	1.7	37	1.22	1.43
19	1.71	1.69	38	1.19	1.4

*長度的數值係由大至小排列。(圖 5A) 38 條染色體平均長度為 $1.78 \mu\text{m}$ ，標準偏差為 0.28；(圖 5B) 38 條染色體平均長度為 $1.76 \mu\text{m}$ ，標準偏差為 0.25。

表 4. 姬蝴蝶蘭相異細胞中內含 45S rDNA 訊號的染色體細部分析。

細胞	長度	真染色質	異染色質	長臂	短臂	Arm Ratio	中心節
1	16.54	12.86	3.68	13.36	3.18	4.2	st
2	18.45	12.54	5.91	12.19	6.26	1.95	sm
3	17.61	13.29	4.32	13.79	3.82	3.61	st
4	25.64	16.5	9.14	18.58	7.06	2.63	sm
5	21.09	13.29	7.8	16.03	5.06	3.17	st
6	19.06	13.23	5.83	14.57	4.49	3.24	st
7	19.61	14.49	5.12	14.93	4.68	3.19	st
8	10.06	7.8	2.26	6.79	3.27	2.08	sm
9	17.16	13.68	3.48	12.68	4.48	2.83	sm
平均	18.36	13.08	5.28	13.66	4.7	3.0	st
標準偏差	4.1	2.3	2.17	3.21	1.29	0.71	

*表中長度、真染色質、異染色質與長短臂單位皆為 μm 。



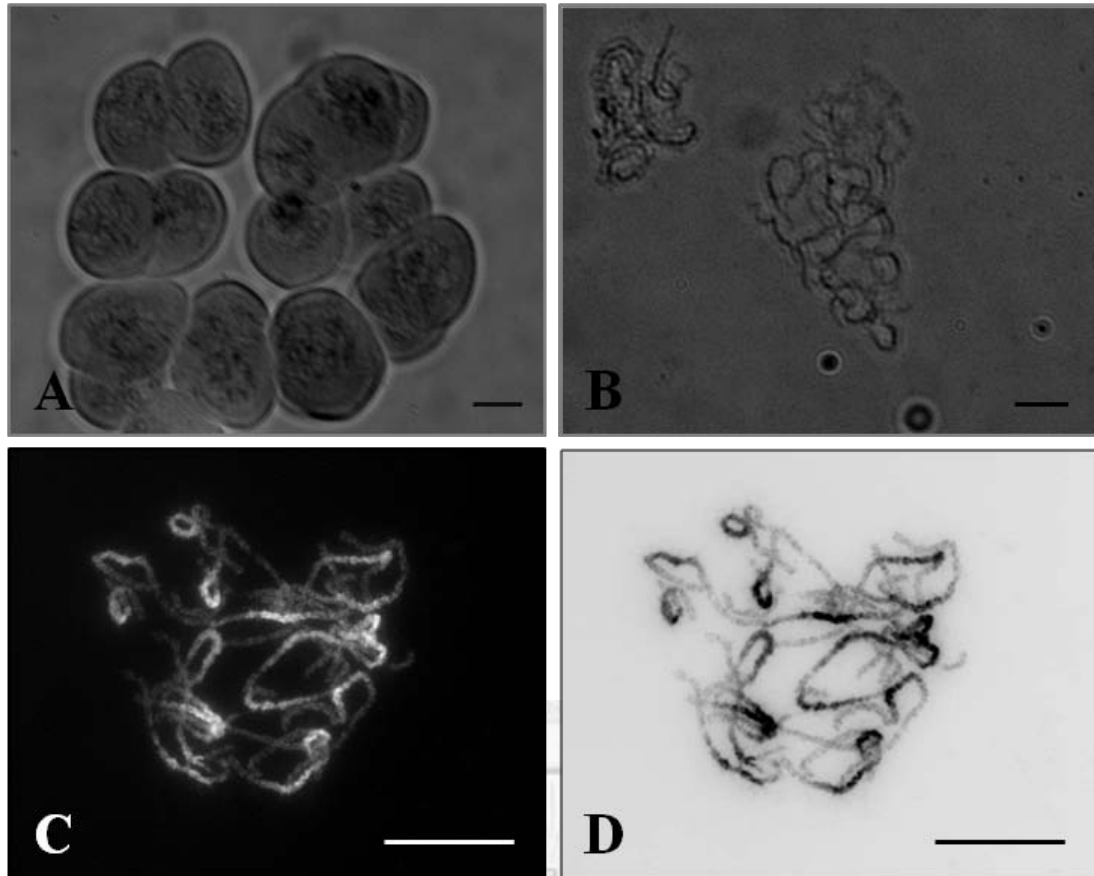


圖 1. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體型態觀察。(A) 以 1% Acetocarmine 染色觀察花粉細胞染色體型態，細胞壁尚未破壞，可觀察到較完整的細胞結構；(B) 以光學顯微鏡觀察染色體型態；(C) 將姬蝴蝶蘭粗絲期染色體以 DAPI 染色後，以螢光顯微鏡 CCD camera 拍照收集圖像；(D) 以影像軟體編輯圖檔。Scale bar = 10 μm 。

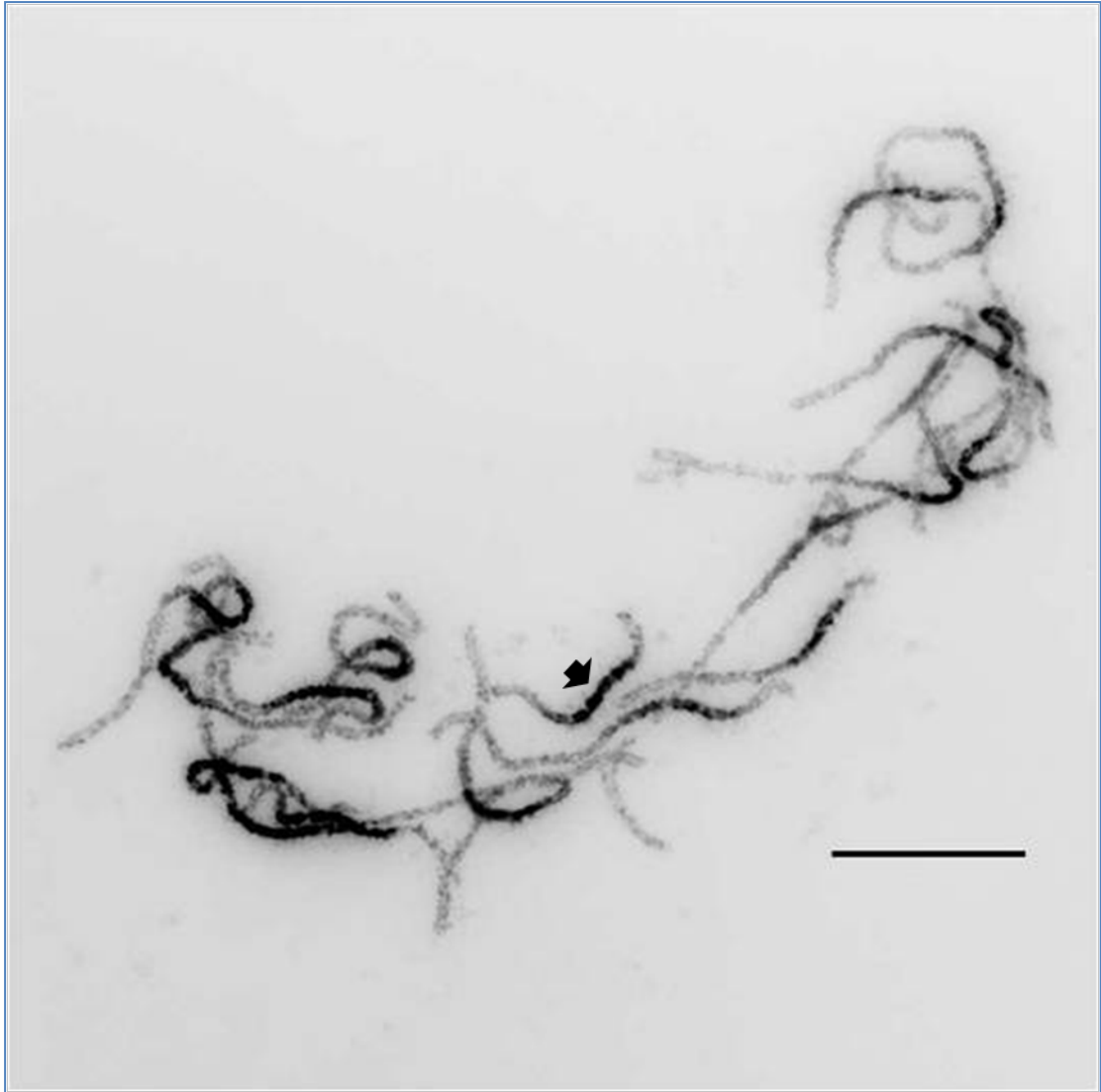


圖 2. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體模式核型圖(第一組核型)。以影像軟體處理後，呈現完整的 19 對染色體，有些染色體收縮良好且染色均勻，能夠觀察到清晰的異染色質結。染色體以 DAPI 作對比染色，箭頭所指之處為第 19 對染色體，是所有染色體中長度最小者。Scale bar = 10 μm 。

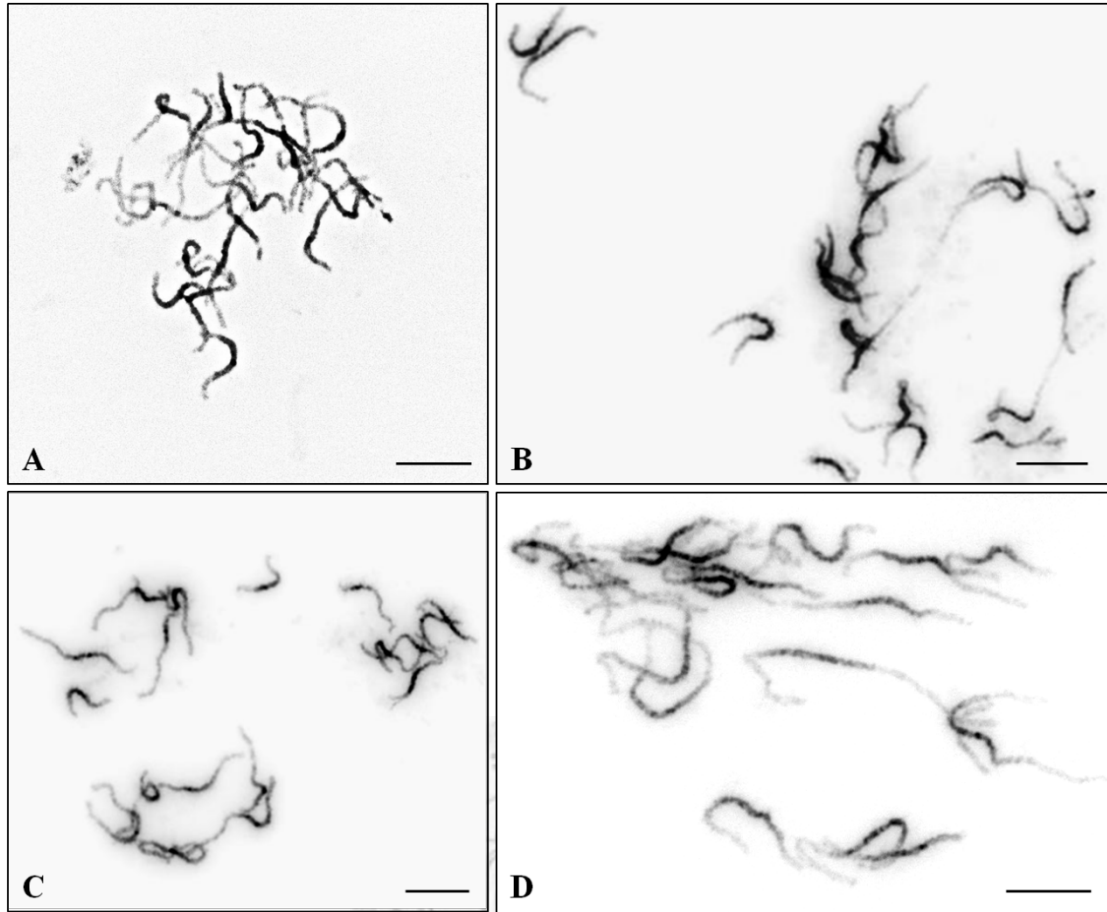


圖 3. 供作核型分析之細胞染色體圖。從製備完成的染色體玻片中挑選染色體完整，異染色質清晰且染色體分散程度較均勻的細胞，以 PI 作對比染色，於螢光顯微鏡下拍攝收集影像並進行圖檔的編輯，讓異染色質以及染色體型態更為清楚。(A) 第二組核型；(B) 第三組核型；(C) 第四組核型；(D) 第五組核型。Scale bar = 10 μm 。

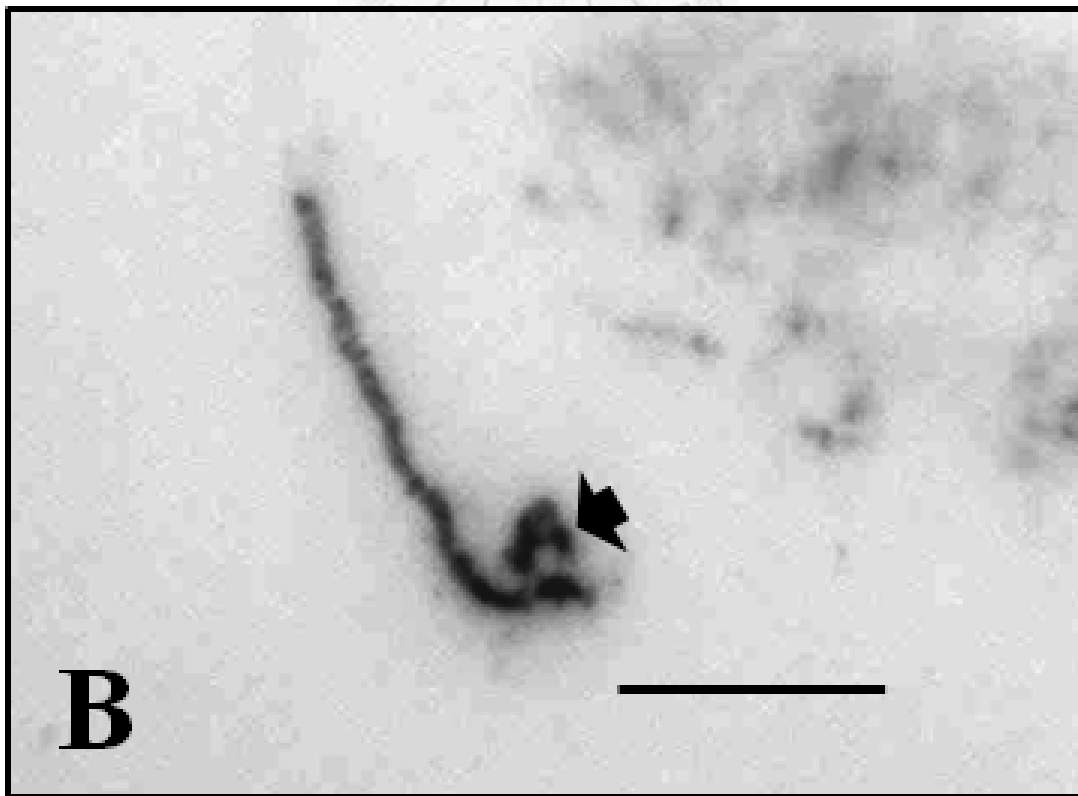
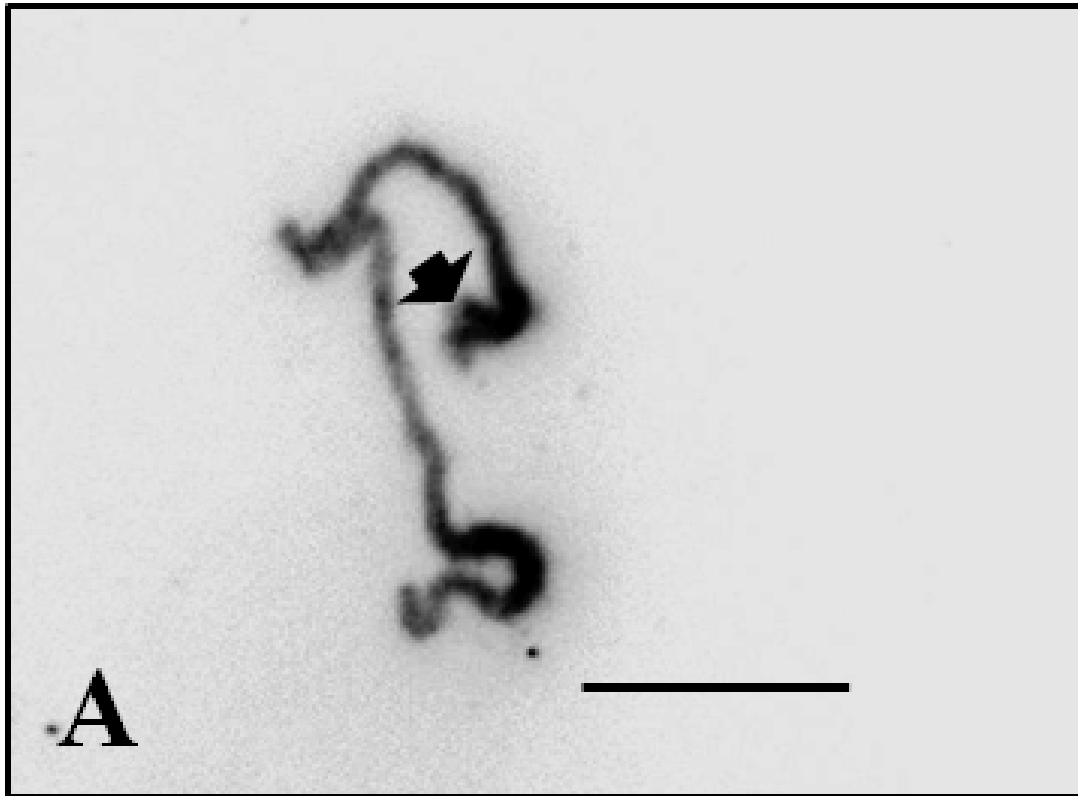


圖 4. 觀察姬蝴蝶蘭單離染色體末端次級收縮區。箭頭所指的地方有一段尚未收縮完全的染色體。染色體以 DAPI 作對比染色，Scale bar = 10 μm 。

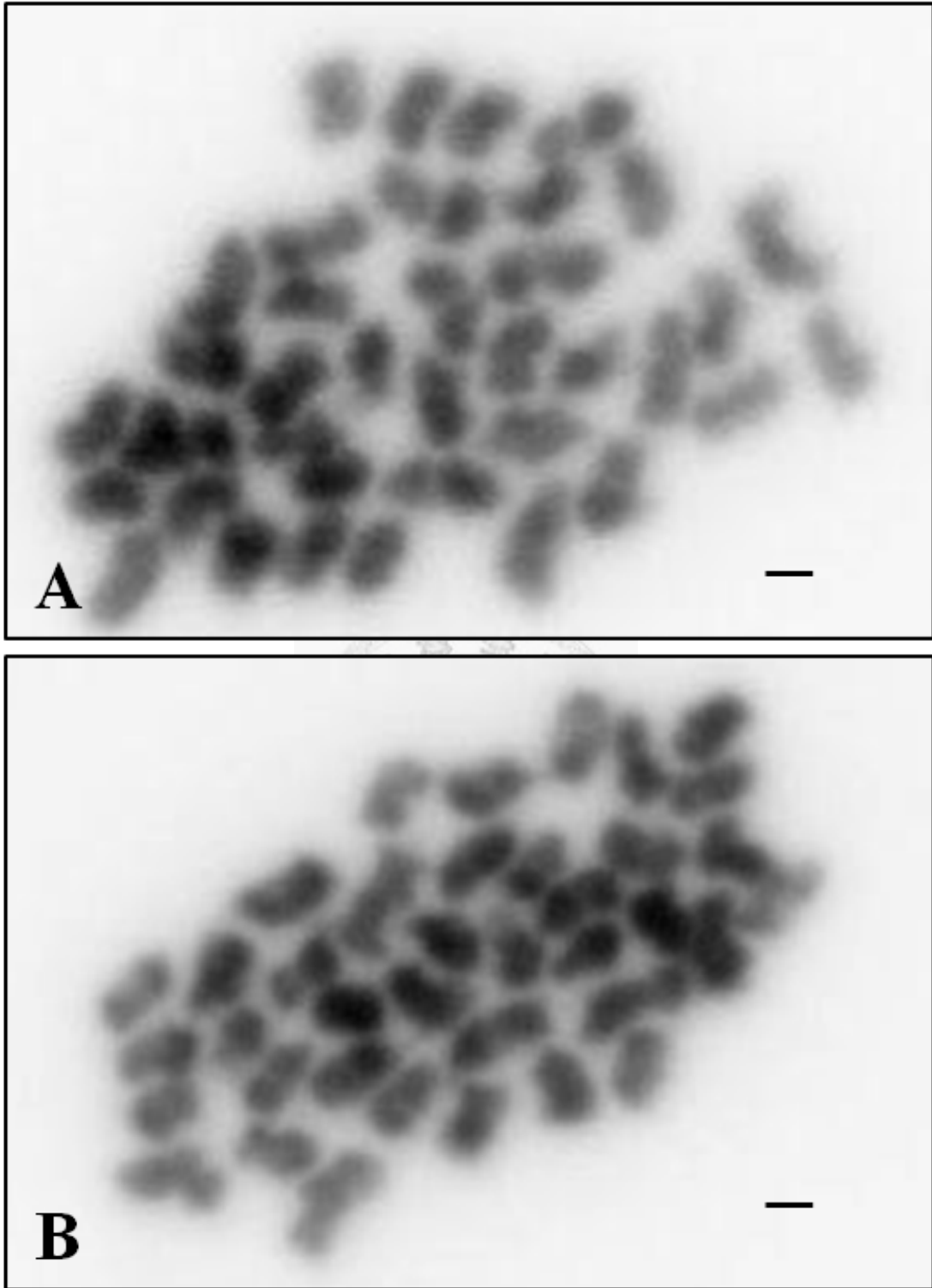


圖 5. 觀察姬蝴蝶蘭中期染色體型態。以 DAPI 作對比染色，於螢光顯微鏡下拍攝並進行影像處理。圖中可發現中期染色體大小型態相似，有些染色體染色較深。Scale bar = 1 μm 。

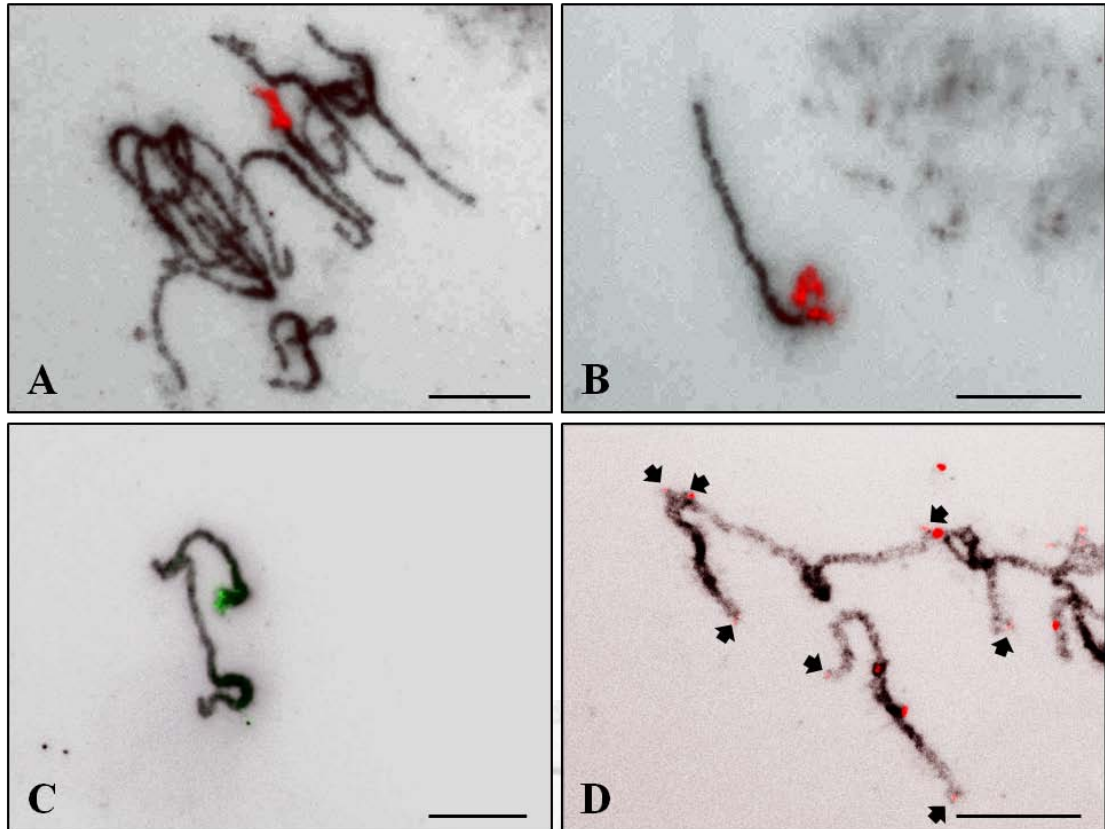


圖 6. 以螢光原位雜交分別將 45S rDNA 與端粒序列定位在姬蝴蝶蘭染色體。
 (A)、(B) 以 biotin-16-dUTP 標定 45S rDNA，再以 Rodamin 偵測，於相異細胞中染色體的末端觀察到極為明顯的紅色訊號；(C) 以 dig-11-dUTP 標定 45S rDNA，再以 FITC 偵測，染色體的末端亦觀察到綠色訊號。藉由觀察 45S rDNA 可判斷衛星體的染色體。(D) 探針為阿拉伯芥型的端粒序列(TTTAGGG)_n，以 Rodamin 紅色螢光偵測後發現單離染色體的末端皆出現微弱的訊號(箭頭處)。染色體以 DAPI 作對比染色，Scale bar = 10 μm。

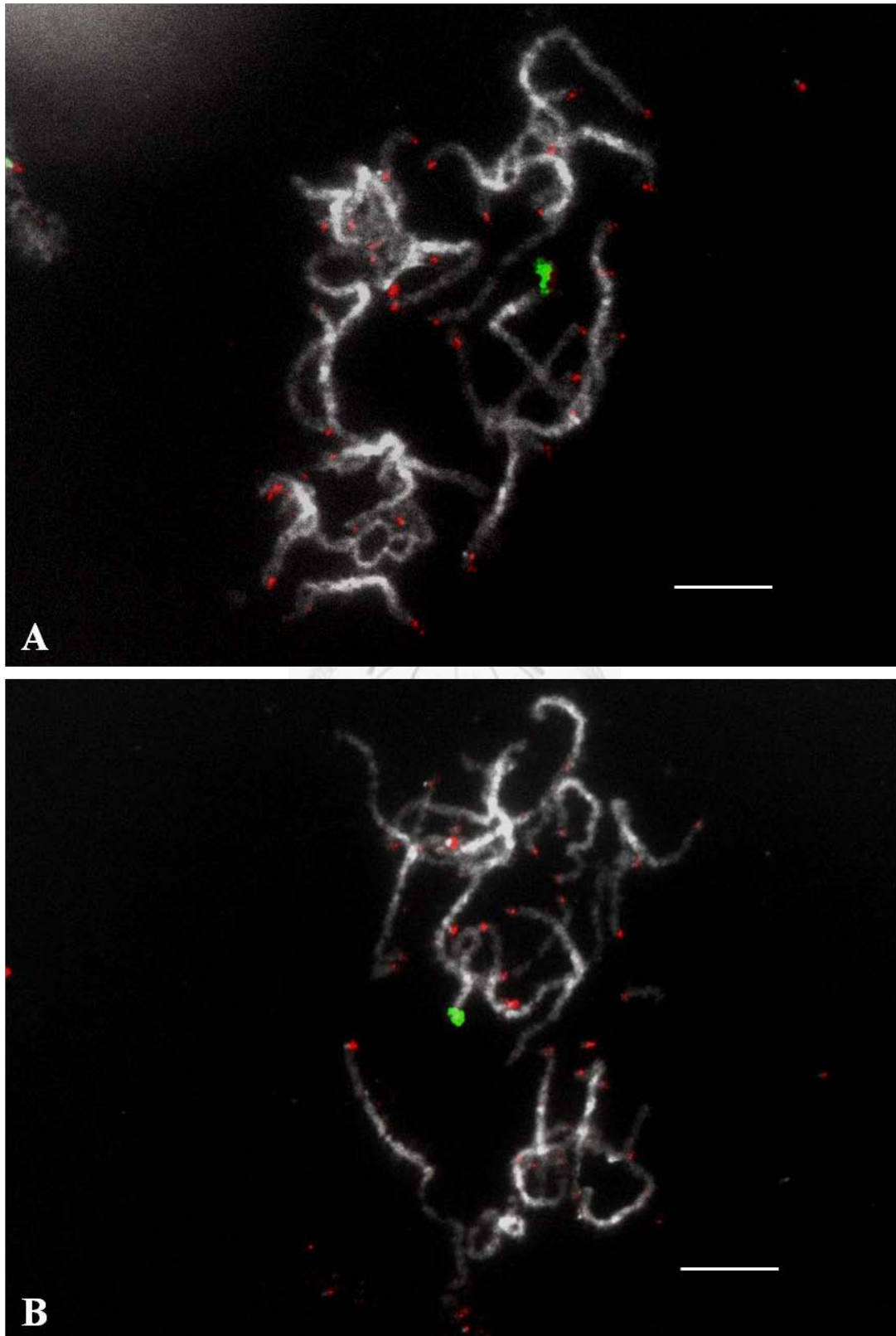


圖 7. 以雙標的螢光原位雜交將兩種重複性序列定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體。綠色訊號代表 45S rDNA，紅色訊號為(TTTAGGG)n，染色體以 DAPI 作對比染色，Scale bar = 10 μ m。

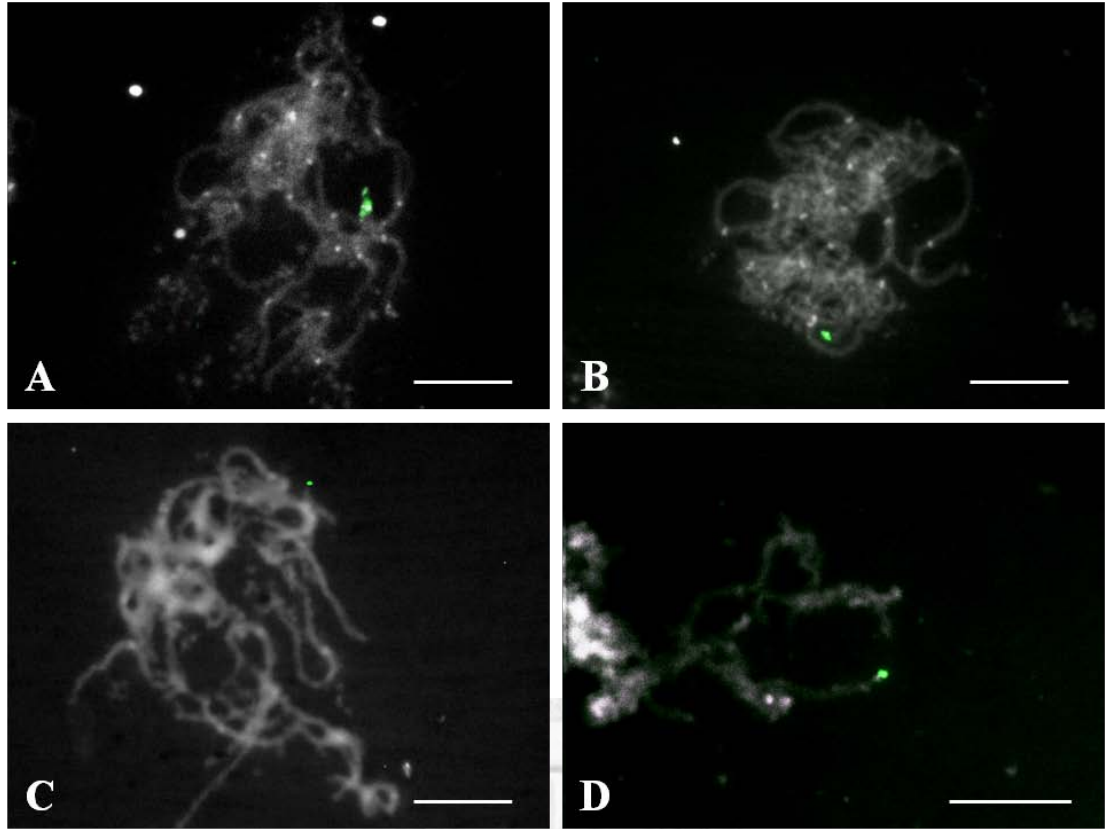


圖 8. 以螢光原位雜交將 5S rDNA 定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體。以 FITC 偵測螢光訊號，可發現到 5S rDNA 皆位於染色體的末端。染色體以 PI 作對比染色。Scale bar = 10 μm 。

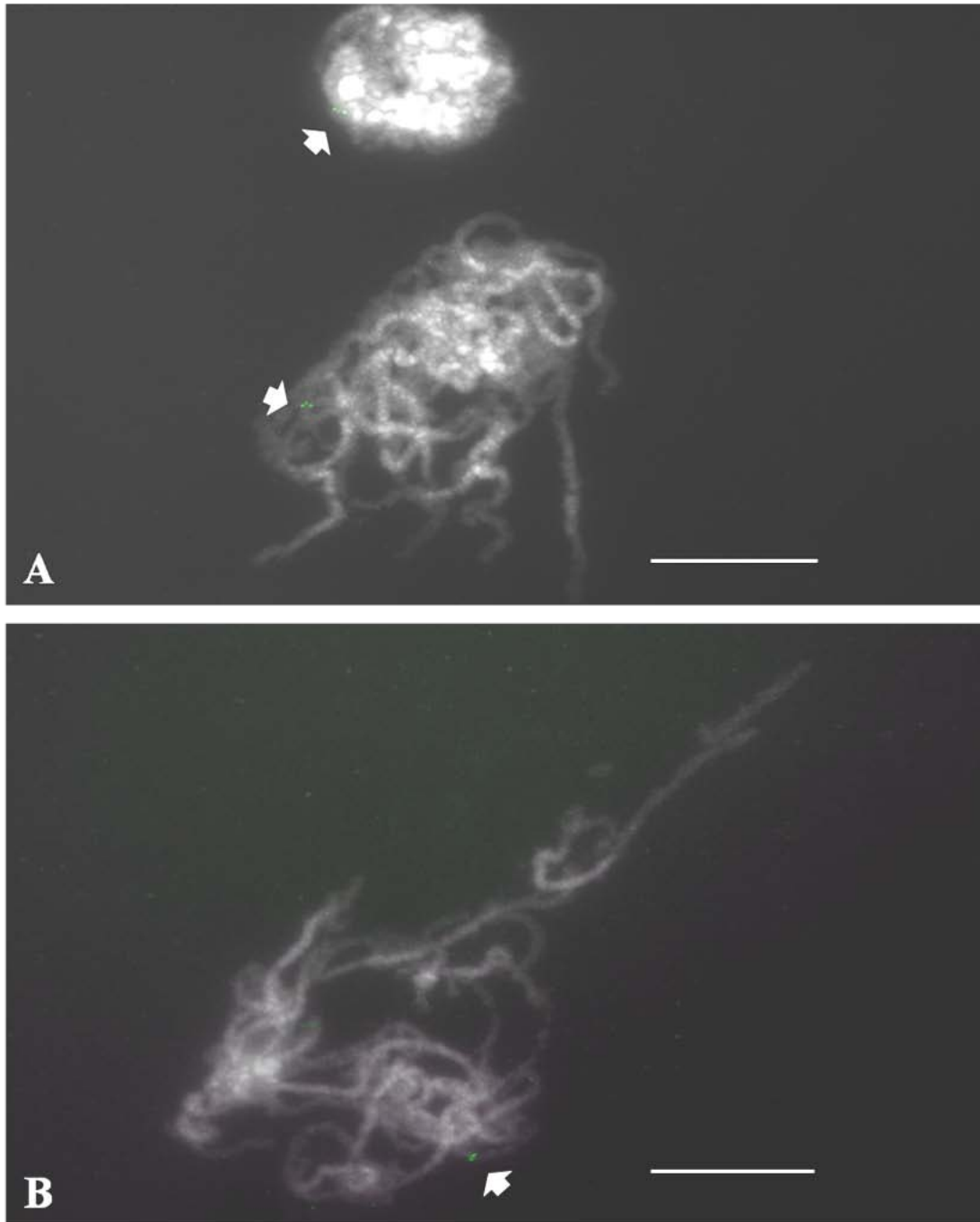


圖 9. 獨特性序列 SOC1 基因利用螢光原位雜交定位在姬蝴蝶蘭粗絲期染色體。
(A) 以 FITC 偵測螢光，於粗絲期染色體上可觀察到明顯的綠色訊號，包含兩個明顯的點以及一個較微弱的點，而圖檔上方染色間期也發現到一對明顯的訊號，包含兩個清晰的點。(B) 相異細胞中觀察 SOC1 基因訊號。染色體以 DAPI 作對比染色。Scale bar = 10 μm 。

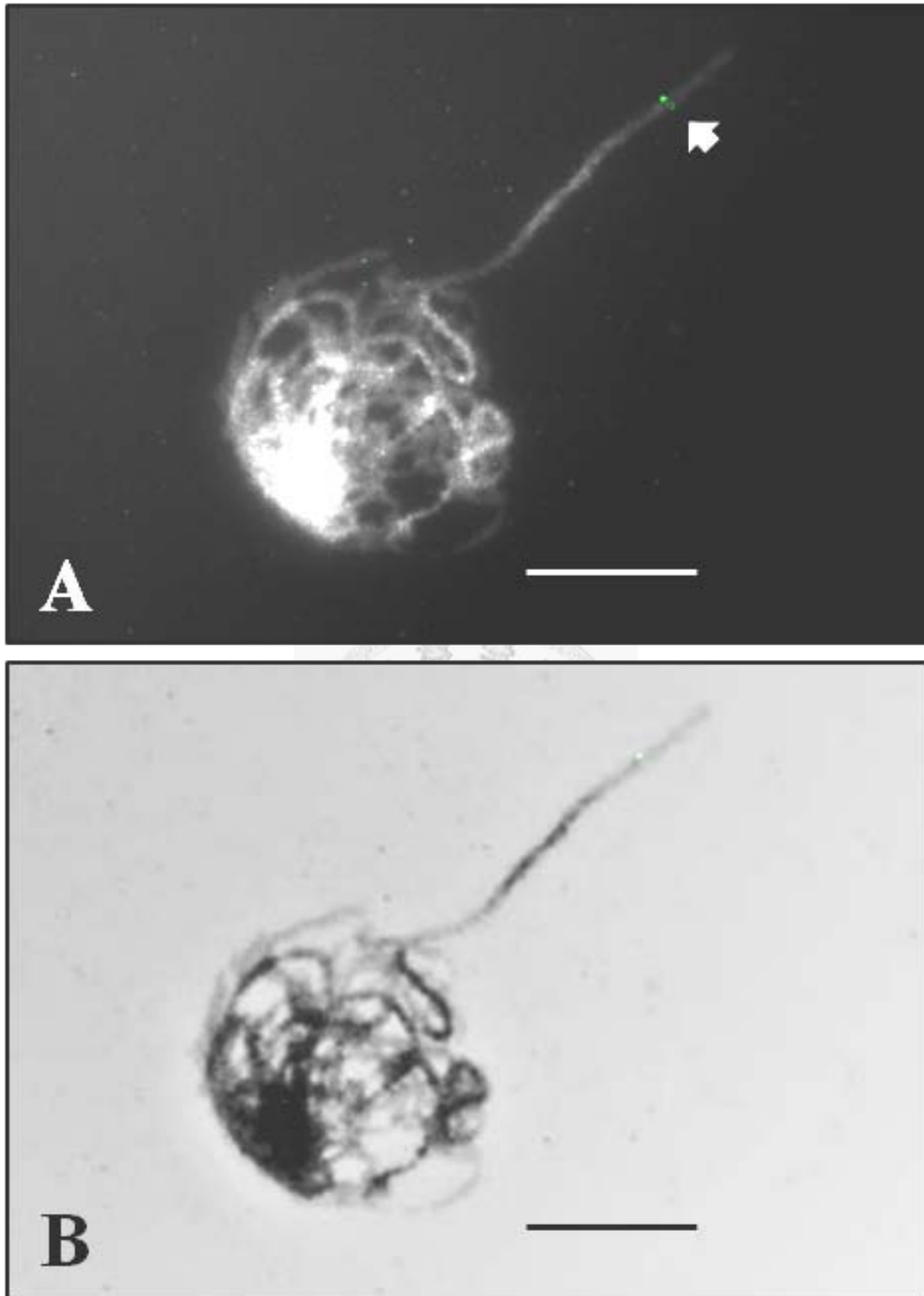


圖 10. 獨特性序列 SOC1 基因定位在姬蝴蝶蘭單離的粗絲期染色體上。(A) 單離染色體上觀察到 SOC1 的訊號，包含一個相當明顯的點以及兩個較微弱的點；(B) 以影像軟體編輯圖檔，可發現到 SOC1 基因位於染色體短臂的真染色質上。染色體以 DAPI 作對比染色。Scale bar = 10 μm 。

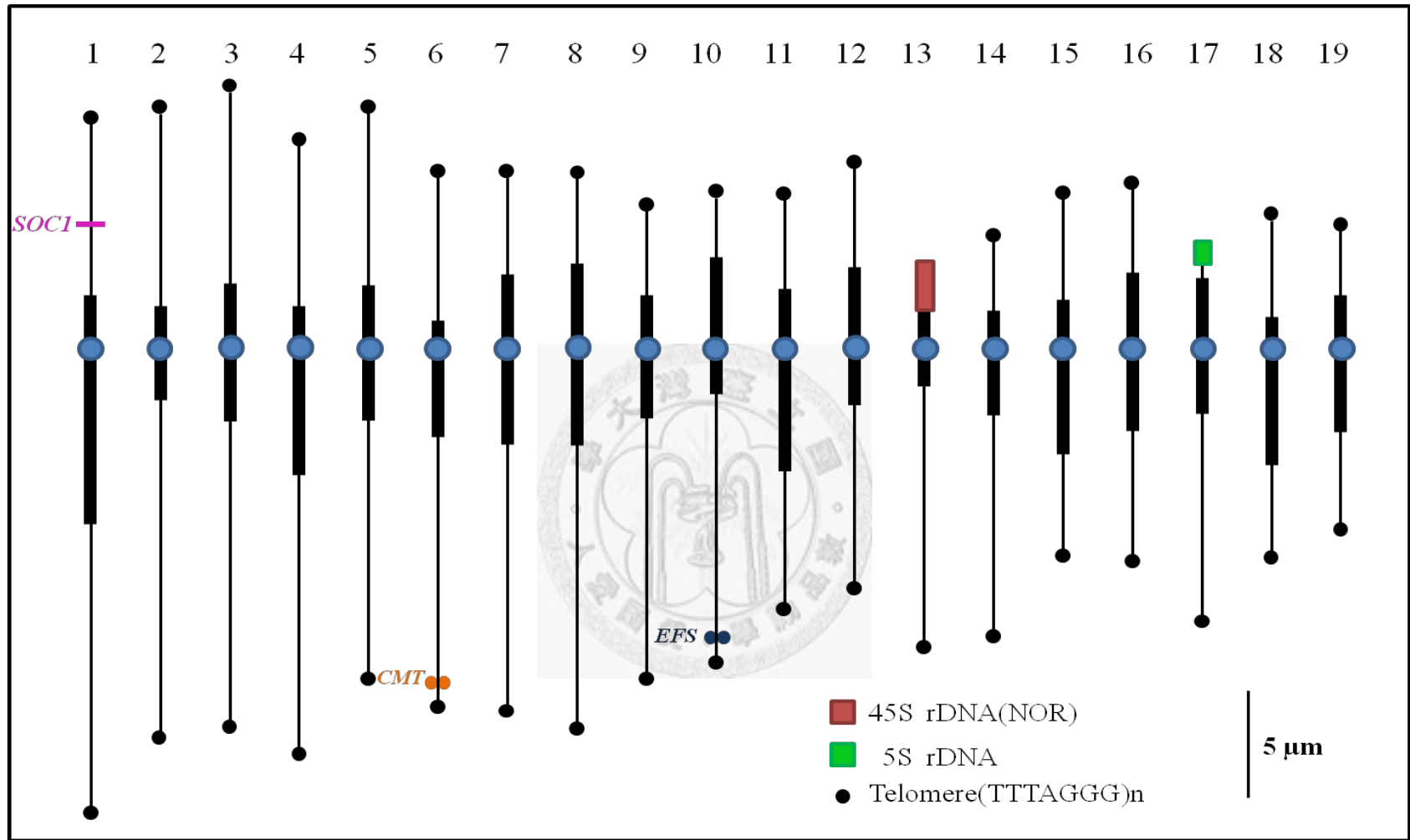


圖 11. 姬蝴蝶蘭核型結構模式圖。

*. SOC1 基因距離第一對染色體短臂末端約 5.16 μm 。

*. CMT(chromomethylase)基因位置係參考 林(2012) 論文，未發表。(CMT 基因距離第六對染色體長臂末端約 1.23 μm)。

*. EFS(Early Flowering in Short days)基因位置係參考 周(2012) 論文，未發表。(EFS 基因距離第十對染色體長臂末端約 1.13 μm)。

七、附錄

附表 1. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體模式核型圖(第一組)原始數據分析。

第 1 組	長度 (μm)	相對長 度(%)	異染色 質(μm)	真染色 質(μm)	長臂 (μm)	短臂 (μm)	Arm ratio
1	31.53	7.97	10.1	21.43	22.47	9.03	2.49
2	30.77	7.78	5.63	25.14	18.55	12.22	1.52
3	28.82	7.29	6.68	22.14	19.22	9.6	2
4	27.28	6.9	7.48	19.8	17.33	9.93	1.75
5	27.02	6.83	5.42	21.6	14.28	12.71	1.12
6	26.44	6.69	4.64	21.8	17.29	9.15	1.89
7	21.86	5.53	7.55	14.31	15.24	6.59	2.31
8	21.02	5.32	8.09	12.93	13.33	7.63	1.75
9	20.83	5.27	5.16	15.67	14.04	6.73	2.09
10	20.76	5.25	6.51	14.25	13.95	6.75	2.07
11	17.92	4.53	7.35	10.57	12.9	4.97	2.6
12	17.89	4.52	5.74	12.15	9.48	8.43	1.12
13	16.03	4.05	3.9	12.13	13.16	2.84	4.63
14	15.71	3.97	4.45	11.26	11.61	4.11	2.82
15	15.42	3.9	6.45	8.97	9.4	6.08	1.55
16	15.01	3.8	7.13	7.88	8.01	7.01	1.14
17	14.96	3.78	5.93	9.03	11.28	3.66	3.08
18	14.61	3.69	6.93	7.68	9.14	5.46	1.67
19	11.6	2.93	6	5.6	6.35	5.25	1.21

*染色體編號係根據長度大小排列。

附表 2. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第二組)原始數據分析。

第 2 組	長度 (μm)	相對長 度(%)	異染色 質(μm)	真染色 質(μm)	長臂 (μm)	短臂 (μm)	Arm ratio
1	29.86	7.65	4.58	25.28	19.57	10.29	1.9
2	29.47	7.55	10.45	19.02	20.34	9.13	2.23
3	27.08	6.94	6.74	20.34	14.9	12.18	1.22
4	25.82	6.62	7.45	18.37	16.08	9.74	1.65
5	24.12	6.18	7.93	16.19	16.55	7.57	2.19
6	23.83	6.11	4.9	18.93	14.58	9.25	1.58
7	22.37	5.73	8.16	14.21	15.34	7.03	2.18
8	21.14	5.42	4.23	16.91	12.5	8.64	1.45
9	20.89	5.35	6.84	14.05	16.54	4.35	3.8
10	20.6	5.28	6.26	14.34	14.54	6.06	2.4
11	19.63	5.03	6.03	13.6	11.28	8.35	1.35
12	18.05	4.63	5.8	12.25	12.7	5.35	2.37
13	17.31	4.44	8.06	9.25	12.22	5.09	2.4
14	16.3	4.18	3.32	12.98	11.44	4.86	2.35
15	15.73	4.03	7.38	8.35	8.67	7.06	1.23
16	15.47	3.96	7.48	7.99	8.79	6.68	1.32
17	15.02	3.85	4.5	10.52	-	-	-
18	13.8	3.54	6.87	6.93	8.16	5.64	1.45
19	13.73	3.52	6.93	6.8	8.25	5.48	1.5

*染色體編號係根據長度大小暫時予以編列。

附表 3. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第三組)原始數據分析。

第 3 組	長度 (μm)	相對長 度(%)	異染色 質(μm)	真染色 質(μm)	長臂 (μm)	短臂 (μm)	Arm ratio
1	33.6	7.99	10.8	22.8	26.12	7.48	3.49
2	31.43	7.47	7.77	23.66	20.85	10.58	1.97
3	31.08	7.39	3.77	27.31	18.36	12.72	1.44
4	29.86	7.1	5.13	24.73	18.27	11.59	1.58
5	29.4	6.99	6.06	23.34	20.38	9.02	2.26
6	24.2	5.75	5.61	18.59	15.69	8.51	1.84
7	23.58	5.61	5.26	18.32	14.99	8.59	1.75
8	23.47	5.58	7.06	16.41	16.85	6.62	2.55
9	22.63	5.38	5.51	17.12	14.54	8.09	1.8
10	21.36	5.08	7.22	14.14	12.77	8.59	1.49
11	20.83	4.95	8.26	12.57	10.52	10.31	1.02
12	19.51	4.64	5.39	14.12	12.77	6.74	1.89
13	18.76	4.46	9.22	9.54	10.39	8.37	1.24
14	16.91	4.02	7.9	9.01	9.44	7.47	1.26
15	16.47	3.92	6.84	9.63	9.63	6.84	1.41
16	15.75	3.75	6.64	9.11	10.25	5.5	1.86
17	14.33	3.41	4.29	10.04	11.55	2.78	4.15
18	13.92	3.31	7.29	6.63	10.23	3.69	2.77
19	13.43	3.19	6.31	7.12	8.37	5.06	1.65

*染色體編號係根據長度大小暫時予以編列。

附表 4. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第四組)原始數據分析。

第 4 組	長度 (μm)	相對長 度(%)	異染色 質(μm)	真染色 質(μm)	長臂 (μm)	短臂 (μm)	Arm ratio
1	25.73	7.35	6.8	18.93	16.28	9.45	1.72
2	25.47	7.27	9.8	15.67	13.12	12.35	1.06
3	25.15	7.18	7.06	18.09	16.72	8.43	1.98
4	24.6	7.02	3.58	21.02	15.77	8.83	1.79
5	22.7	6.48	7.64	15.06	12.9	9.8	1.32
6	22.41	6.4	6.55	15.86	17.9	4.51	3.97
7	22.12	6.32	6.87	15.25	15.15	6.97	2.17
8	20.25	5.78	4.9	15.35	14.22	6.03	2.36
9	18.83	5.38	5.26	13.57	14.02	4.81	2.91
10	18.38	5.25	5.71	12.67	11.52	6.86	1.68
11	18.12	5.17	6.26	11.86	13.59	4.53	3
12	17.34	4.95	7.61	9.73	11.37	5.97	1.9
13	-	-	-	-	-	-	-
14	16.89	4.82	4.48	12.41	12.9	3.99	3.23
15	16.73	4.78	6.32	10.41	8.99	7.74	1.16
16	16.41	4.69	7.61	8.8	8.77	7.64	1.15
17	14.47	4.13	5.8	8.67	8.16	6.31	1.29
18	12.44	3.55	5.26	7.18	7	5.44	1.29
19	12.15	3.47	5.23	6.92	6.47	5.68	1.14

*染色體編號係根據長度大小暫時予以編列。

附表 5. 姬蝴蝶蘭粗絲期染色體核型圖(第五組)原始數據分析。

第 5 組	長度 (μm)	相對長 度(%)	異染色 質(μm)	真染色 質(μm)	長臂 (μm)	短臂 (μm)	Arm ratio
1	40.3	8.34	12.32	27.98	25.95	14.35	1.8
2	-	-	-	-	-	-	-
3	39.14	8.1	11.69	27.45	28.66	10.48	2.73
4	36.28	7.51	6.58	29.7	19.52	16.76	1.16
5	34.31	7.1	8.43	25.88	18.71	15.6	1.2
6	31.19	6.46	10.06	21.13	22.77	8.42	2.7
7	30.76	6.37	7.87	22.89	22.68	8.08	2.81
8	27.99	5.79	11.13	16.86	17.25	10.74	1.61
9	25.3	5.24	6.03	19.27	16.71	8.59	1.95
10	24.89	5.15	6.45	18.44	15.48	9.41	1.65
11	23.73	4.91	10.35	13.38	12.77	10.96	1.17
12	23.56	4.88	6.9	16.66	13.46	10.1	1.33
13	23.36	4.84	4.52	18.84	17.95	5.41	3.32
14	22.57	4.67	6.87	15.7	16.26	6.31	2.58
15	22.48	4.65	7.87	14.61	12.29	10.19	1.21
16	21.49	4.45	9	12.49	13.46	8.03	1.68
17	20.01	4.14	8.61	11.4	11	9.01	1.22
18	18.65	3.86	6.42	12.23	-	-	-
19	17.04	3.53	7.55	9.49	11.25	5.79	1.94

*染色體編號係根據長度大小暫時予以編列。

附表 6. 五個供試細胞染色體編號比對的結果。

第一組(模式)	第二組	第三組	第四組	第五組
1	2	1	2	1
2	1	3	4	-
3	3	4	3	4
4	4	2	1	6
5	6	7	5	5
6	8	6	8	7
7	7	5	7	8
8	5	11	6	3
9	9	9	9	9
10	10	8	10	10
11	13	13	12	11
12	11	10	15	12
13	17	17	-	13
14	14	12	14	14
15	15	14	17	17
16	16	15	16	15
17	12	18	11	18
18	18	16	19	16
19	19	19	18	19

*數字代表各細胞原始的染色體編號，第一組為模式細胞，第二到第五組陸續和第一組作比對。

附表 7. 五個供試細胞各染色體平均長度比對的結果。

染色體編號	第一組	第二組	第三組	第四組	第五組
1	31.53	29.47	33.6	25.47	40.3
2	30.77	29.86	31.08	24.6	-
3	28.82	27.08	29.86	25.15	36.28
4	27.28	25.82	31.43	25.73	31.19
5	27.02	23.83	23.58	22.7	34.31
6	26.44	21.14	24.2	20.25	30.76
7	21.86	22.37	29.4	22.12	27.99
8	21.02	24.12	20.83	22.41	39.14
9	20.83	20.89	22.63	18.83	25.3
10	20.76	20.6	23.47	18.38	24.89
11	17.92	17.31	18.76	17.34	23.73
12	17.89	19.63	21.36	16.73	23.56
13	16.03	15.02	14.33	-	23.36
14	15.71	16.3	19.51	16.89	22.57
15	15.42	15.73	16.91	14.47	20.01
16	15.01	15.47	16.47	16.41	22.48
17	14.96	18.05	13.92	18.12	18.65
18	14.61	13.8	15.75	12.15	21.49
19	11.6	13.73	13.43	12.44	17.04

*表中各數值單位為 μm 。

附表 8. 五個供試細胞異染色質長度比對的結果。

染色體編號	第一組	第二組	第三組	第四組	第五組
1	10.1	10.45	10.8	9.8	12.32
2	5.63	4.58	3.77	3.58	-
3	6.68	6.74	5.13	7.06	6.58
4	7.48	7.45	7.77	6.8	10.06
5	5.42	4.9	5.26	7.64	8.43
6	4.64	4.23	5.61	4.9	7.87
7	7.55	8.16	6.06	6.87	11.13
8	8.09	7.93	8.26	6.55	11.69
9	5.16	6.84	5.51	5.26	6.03
10	6.51	6.26	7.06	5.71	6.45
11	7.35	8.06	9.22	7.61	10.35
12	5.74	6.03	7.22	6.32	6.9
13	3.9	4.5	4.29	-	4.52
14	4.45	3.32	5.39	4.48	6.87
15	6.45	7.38	7.9	5.8	8.61
16	7.13	7.48	6.84	7.61	7.87
17	5.93	5.8	7.29	6.26	6.42
18	6.93	6.87	6.64	5.23	9
19	6	6.93	6.31	5.26	7.55

*表中各數值單位為 μm 。

附表 9. 五個供試細胞真染色質長度比對的結果。

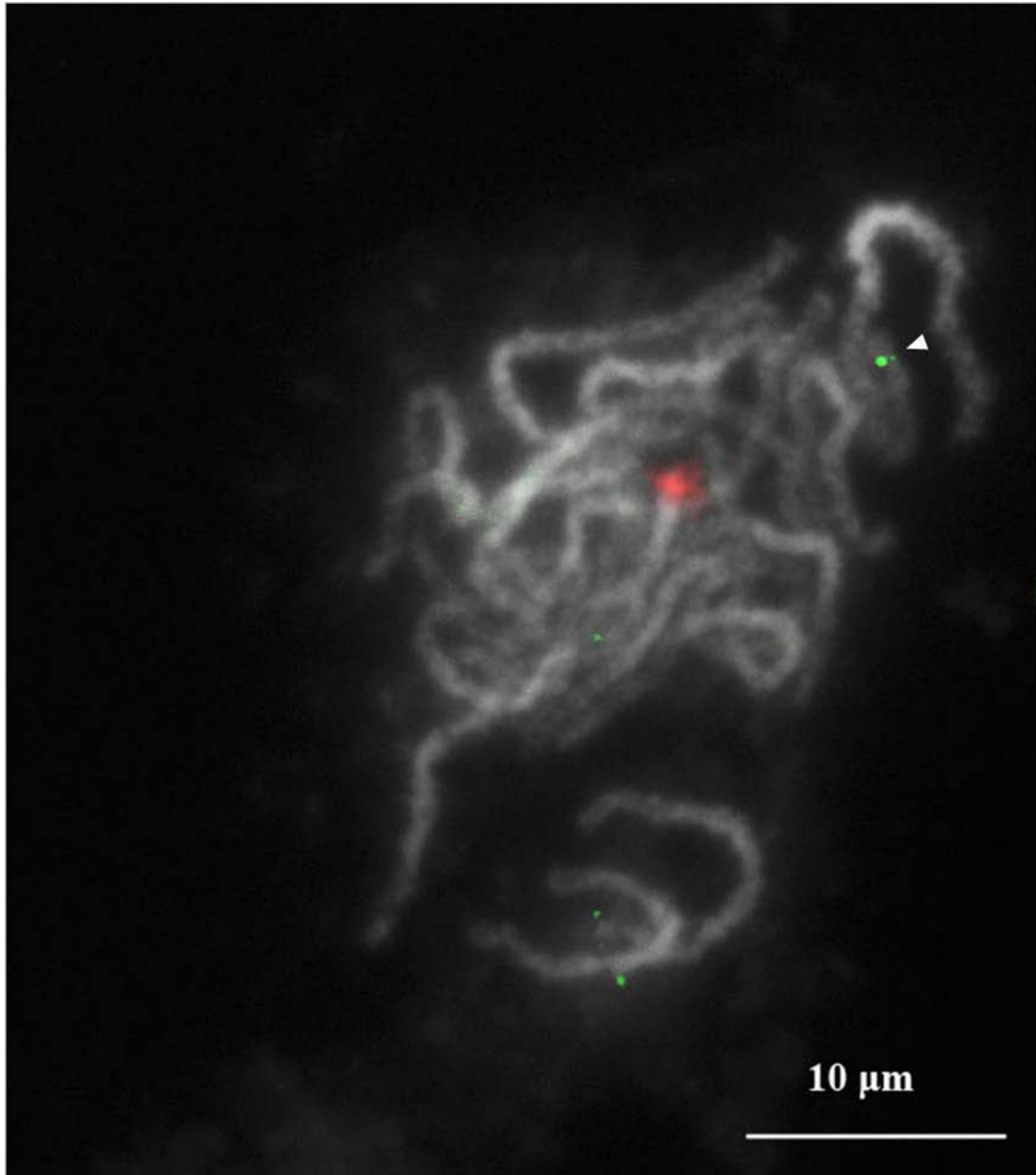
染色體編號	第一組	第二組	第三組	第四組	第五組
1	21.43	19.02	22.8	15.67	27.98
2	25.14	25.28	27.31	21.02	-
3	22.14	20.34	24.73	18.09	29.7
4	19.8	18.37	23.66	18.93	21.13
5	21.6	18.93	18.32	15.06	25.88
6	21.8	16.91	18.59	15.35	22.89
7	14.31	14.21	23.34	15.25	16.86
8	12.93	16.19	12.57	15.86	27.45
9	15.67	14.05	17.12	13.57	19.27
10	14.25	14.34	16.41	12.67	18.44
11	10.57	9.25	9.54	9.73	13.38
12	12.15	13.6	14.14	10.41	16.66
13	12.13	10.52	10.04	-	18.84
14	11.26	12.98	14.12	12.41	15.7
15	8.97	8.35	9.01	8.67	11.4
16	7.88	7.99	9.63	8.8	14.61
17	9.03	12.25	6.63	11.86	12.23
18	7.68	6.93	9.11	6.92	12.49
19	5.6	6.8	7.12	7.18	9.49

*表中各數值單位為 μm 。

附表 10. 五個供試細胞染色體異染色質比率比對的結果。

染色體編號	第一組	第二組	第三組	第四組	第五組
1	32.03	35.46	32.14	38.48	30.57
2	18.3	15.34	12.13	14.55	-
3	23.18	24.89	17.18	28.07	18.14
4	27.42	28.85	24.72	26.43	32.25
5	20.06	20.56	22.31	33.66	24.57
6	17.55	20	23.18	24.2	25.59
7	34.54	36.48	20.61	31.06	39.76
8	38.49	32.88	39.65	29.23	29.87
9	24.77	32.74	24.35	27.93	23.83
10	31.36	30.39	30.08	31.07	25.91
11	41.02	46.56	49.15	43.89	43.62
12	32.08	30.72	33.8	37.78	29.29
13	24.33	29.96	29.94	-	19.35
14	28.33	20.37	27.63	26.52	30.44
15	41.83	46.92	46.72	40.08	43.03
16	47.5	48.35	41.53	46.37	35
17	39.64	32.13	52.37	34.55	34.42
18	47.43	49.78	42.16	43.05	41.88
19	51.72	50.47	46.98	42.28	44.31

*異染色質比率指異染色質占該條染色體總長的百分比。表中各數值單位為%。



附圖 1. CMT 基因在染色體上的位置。紅色訊號代表 45S rDNA 序列，綠色訊號為 CMT 基因。係參考林(2012)所作的結果。



附圖 2. EFS 基因在染色體上的位置。紅色訊號代表阿拉伯芥型端粒序列，綠色訊號為 EFS 基因。係參考周(2012)所作的結果。