

國立臺灣大學生物資源暨農學院森林學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Forestry

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master thesis

台灣相思樹人工誘導多倍體的研究

Artificial polyploidy induction of *Acacia confusa*

潘遵宇

Tsun-Yu Pan

指導教授：王亞男 教授

Adviser: Prof. Ya-Nan Wang

中華民國100年7月

July, 2011

## 致

## 謝

這份論文是受到了許多人的幫助，才得以完成。在這兩年的研究生涯當中，特別要感謝王亞男教授在研究的方向給予了我相當大的自由，使我能夠在幾乎沒有窒礙的情況下完成研究與學業。感謝口試委員李明仁校長、簡慶德博士、林世宗教授、林敏宜助理教授對於論文寫作的建議與鼓勵。也要感謝林業試驗所的黃耀謀博士，除了教導並借用各種重要儀器之外，也對於我在研究上所碰到的問題給予了相當大的協助。當然也要感謝研究室的各位學長姐與同學，你們的支持是我能夠持續下去的最大動力。

此外，我的父親在這兩年的過程當中也給予我相當大的幫助，包括研究材料的取得以及研究方法的修改、確立，若少了父親的協助，我的研究不可能會如此順利。我的母親在論文撰寫的過程裡面也給予了相當多的建議，在此致上最深的感激。

潘遵宇

僅誌於台大森林系

2011年7月



(附件 2)

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文  
口試委員會審定書

台灣相思樹人工多倍體之研究  
Artificial polyploidy induction of *Acacia confusa*

本論文係潘遵宇君 (R98625029) 在國立臺灣大學森林學系、所  
完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 100 年 7 月 21 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：

王亞男

(簽名)

(指導教授)

李明仁

簡慶德

杜世亨

林敏宜

潘遵宇

(簽名)

系主任、所長

(是否須簽章依各院系所規定)

# 目次



圖目次.....	i
表目次.....	iii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	v
一、前言.....	1
二、前人研究.....	4
(一) 天然多倍體的特性.....	4
(二) 人工多倍體的應用.....	4
(三) 林木的人工多倍體.....	5
(四) 人工多倍體誘導法.....	5
(五) 人工多倍體的鑑定法.....	6
1. 間接鑑定.....	7
2. 直接鑑定.....	7
(六) 染色體的觀察.....	8
(七) 台灣相思樹的研究.....	9
三、台灣相思樹的性狀.....	9
四、材料與方法.....	15
(一) 材料.....	15
(二) 方法.....	15
1. 種子前處理.....	15



2.秋水仙素處理.....	15
3.多倍體鑑定.....	16
4.無菌苗培養.....	17
5.統計分析.....	18
<b>五、結果.....</b>	<b>20</b>
(一)秋水仙素對相思樹幼芽形態的影響.....	20
(二)不同濃度秋水仙素對相思樹種子發芽的影響.....	21
(三)不同濃度秋水仙素對相思樹種子多倍體化的影響.....	25
(四)人工多倍體相思樹幼苗的染色體觀察.....	28
(五) 流式細胞儀分析.....	31
1.根尖染色體.....	31
2.假葉染色體.....	34
(六)人工多倍體相思樹苗的型態鑑定.....	36
1.氣孔面積.....	36
2.單位面積氣孔數.....	37
3.生長.....	42
<b>六、討論.....</b>	<b>45</b>
(一)秋水仙素濃度和相思樹人工多倍體.....	45
(二)相思樹的人工多倍體生長.....	46
(三)相思樹的染色體觀察.....	47
(四)相思樹多倍體苗之鑑識.....	49
(五)台灣相思樹的多倍體育種.....	50
(六)台灣相思樹多倍體的生長觀察.....	51

七、結論.....	51
八、參考文獻.....	52
附錄.....	57
附錄一 改良苯酚品紅染色液配方	57
附錄二 MS MEDIUM (Murashige and Skoog MEDIUM)配方	58



# 圖 目 次



圖 1. 開花的相思樹植株	10
圖 2. 台灣相思樹幼苗的羽狀複葉	11
圖 3. 台灣相思樹的假葉	11
圖 4. 台灣相思樹的花序	12
圖 5. 台灣相思樹的莢果	13
圖 6. 台灣相思樹種子	13
圖 7. 在低海拔山丘上成片分布的台灣相思樹	14
圖 8. 一星期後的不同濃度秋水仙素處理的種子發芽情形	20
圖 9. 具有膨大根部的種子發芽兩周之情形	21
圖 10. 秋水仙素濃度與發芽率關係圖	22
圖 11. 秋水仙素濃度與種子根部膨大數與種子數比例關係圖	23
圖 12. 秋水仙素濃度與種子根部膨大數與發芽數比例關係圖	23
圖 13. 根部膨大之根尖染色體（可分辨者有 47 個）	30
圖 14. 根部未膨大之根尖染色體（可分辨者有 24 個）	31
圖 15. 多倍體初生根之流式細胞儀分析結果	32
圖 16. 二倍體初生根之流式細胞儀分析結果	33
圖 17. 多倍體假葉之流式細胞儀分析結果	35
圖 18. 二倍體假葉之流式細胞儀分析結果	36
圖 19. 根部膨大幼苗的初生葉氣孔（劍號為氣孔所在）	38
圖 20. 根部未膨大幼苗的初生葉氣孔（劍號為氣孔所在）	39
圖 21. 生長一年後的多倍體幼苗（右）與二倍體幼苗（左）之比較	42
圖 22. 多倍體幼苗假葉有明顯的扭曲現象	43
圖 23. 台灣相思樹多倍體（右）與二倍體（左）無菌苗之比較	44

圖 25. 台灣相思樹多倍體幼苗之根系

圖 26. 僅有細胞核被染色，而尚未出現染色體的細胞 (100X100)

圖 27. 早上 10 點所固定之大量出現染色體的細胞群 (100X100)

圖 28. 容易被誤認為染色體的澱粉粒等雜質 (100X100)



45

48

48

49



# 表 目 次



表 1. 完全逢機區集之變異數分析表(劉宣誠,1976)	19
表 2. 不同濃度秋水仙素在不同浸泡時間下的種子發芽數與發芽率	22
表 3. 不同濃度與時間處理的種子根部膨大數與種子數比較	24
表 4. 根部膨大的種子與發芽數之比例	24
表 5. Student t-test 分析根膨大種子與全種子百分率之差異( $t=-0.565$ )	26
表 6. Student t-test 分析根膨大種子與發芽種子百分率之差異( $t= 1.756$ )	27
表 7. 處理 12 小時,不同重複之 F-test 計算表( $LSD(0.05)=11.03$ )	28
表 8. 處理 24 小時,不同重複之 F-test 計算表( $LSD(0.05)=9.82$ )	28
表 9. 各重複氣孔平均面積一覽表( $\mu m^2$ )( $t=9.676^{***}$ )	39
表 10. 單位面積內葉背氣孔數量 (1mm X 1mm)( $t=6.254^{***}$ )	40



## 摘 要

本研究以採自林務局台南甲仙工作站之台灣相思樹 (*Acacia confuse* Merr.) 種子為材料，藉由不同濃度的秋水仙素以不同時間處理，以誘導其產生多倍體化的現象。期望可藉由本研究尋找以秋水仙素誘導多倍體發生的最佳方式，做為未來台灣相思樹育種的一個參考依據。

將浸泡於 100°C 熱水中，任其自然冷卻 24 小時的台灣相思樹種子，以重量百分率濃度 0%、0.01%、0.05%、0.1%、1%、2%、4% 之秋水仙素浸泡 12 與 24 小時，觀察其發芽率以及根部膨大的比例。其中以 1% 秋水仙素浸泡 12 至 24 小時的結果最佳。再經過染色體觀察與流式細胞儀分析之後，確定芽體具膨大現象之幼苗確實為多倍體化的幼苗。除了直接鑑定之外，觀察初生葉的葉背氣孔之後，發現多倍體幼苗葉背氣孔的平均面積較二倍體幼苗大  $64.97\mu\text{m}^2$ ，單位面積內的氣孔數也較少，二倍體在單位面積 ( $1\text{mm}^2$ ) 下的平均數量為 131 個，多倍體則僅有 53.4 個。

然而，以人工方式誘導的多倍體幼苗，由於生長點受到抑制的因素，生長速度遠較未處理的幼苗慢，常常因無法長出幼葉或是生長點受微生物感染而死亡。此外，由流式細胞儀分析假葉及根部的結果也顯示，以秋水仙素誘導種子所產生的人工多倍體，常常會有混倍體的現象，且多倍體細胞亦容易被二倍體細胞所取代，使幼苗逐漸由混倍體轉回為二倍體，可見得人工誘導多倍體具有不穩定的缺點。未來可將研究方向轉為以誘導培植體，或是將多倍體化的組織進行組織培養，來提高誘導多倍體的穩定性以及存活率。

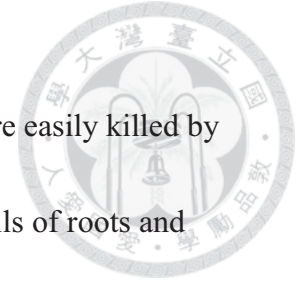
【關鍵字】台灣相思樹、誘導多倍體、秋水仙素、染色體、流式細胞儀、保衛細胞

## Abstract



The *Acacia confusa* Merr. seeds collected from Tainan Chia Shian Work Station of Forest Bureau were used for the study. Different concentrations of colchicine and different time were dealt with in the experiment. It was expected to find a best way to induce the polyploidy of *Acacia confusa*.

The seeds of *Acacia confusa* were first soaked in hot water at 100 °C. Then let them cool down for 24 hours. The seeds were put into colchicine of mass percentage by 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 1%, 2% and 4% for 12 and 24 hours. The germination rate and the ratio of the swollen roots of each treatment were recorded. The result indicated that the seeds soaked in mass percentage by 1% for 12 to 24 hour, was the best concentration to induce polyploidy of *Acacia confusa*. Polyploidy was proved by counting the chromosome numbers from the tissue of swollen roots, and analysis of the cells took from roots and phyllodes by flow cytometer. It was confirmed that the germinating seeds with swollen roots are the polyploidy of *Acacia confusa*. The stoma and guard cells of polyploids are different from diploids by size and number by unit area. The average size of stoma and guard cells from polyploids was larger than those from diploids by 64.97 $\mu\text{m}^2$ . The average number of stoma from polyploids were 131, and those from diploid were 53.4.



However, the polyploids induced by colchicine grew slowly and were easily killed by  
microbe caused by the restraint of meristem. Besides, the analysis cells of roots and  
phyllodes by flow cytometer showed that most of polyploidy seedlings were mixoploid.

It is possible that most of polyploidy cells would be replaced by diploidy cells.

Therefore, it is important to find a way to make the polyploidy more stable and improve  
survival in the future, such as tissue culture or use colchicine to treat the callus of  
culture.

**【Keyword】** *Acacia confusa*, induced polyploidd, colchicine, chromosome, flow  
cytometer, guard cell



## 一、前言

台灣相思樹(*Acacia confuse* Merr.)為含羞草科(Mimosaceae)相思樹屬(*Acacia*)之常綠中喬木，中名亦稱相思樹、相思仔、香絲樹以及假葉豆菜；英名稱 Taiwan Acacia。原產菲律賓以及台灣恆春半島、蘭嶼一帶(郭寶章，1989)。台灣相思樹是一種重要的低海拔造林樹種，由於適應力強，對風的耐受性佳，是台灣地區長期造林樹種選擇之一，全省各地均有造林。早期多用於製造家具、薪炭材、車輛用材、枕木以及造紙之用，唯因枝節多且樹幹常呈彎曲狀，因而降低其經濟價值(郭寶章，1989；劉業經等，1994)。台灣相思樹的人工林，其面積共 21200 公頃，佔林務局管轄事業區森林地的 1.46%；蓄積量為 1338000 立方公尺，為所有林型蓄積量的 0.46%(林務局，1995)。台灣相思樹雖然為台灣原生種，但是其天然分布範圍，由於長期開發使用的結果，目前已不可考，但一般相信屏東縣恆春半島港口、射麻里、牡丹鄉十八社、潮州以及台東縣南部、蘭嶼一帶之相思樹林應屬於天然生者(郭寶章，1989)。

台灣相思樹的樹皮內含多量單寧(tannin)，早期作為鞣皮劑染料、藥用、墨水原料等用途，具工業用價值，唯台灣甚少發展(郭寶章，1989)。近年來，科學家已經證明黃酮類(flavonoids)以及單寧等多酚類化合物(polyphenols)為良好的抗氧化物質，相思樹之樹皮的水溶性單寧含量約為 10%~20%，花的抽取物也具有相當程度之去除 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基之能力，因此在健康食品等利用上，具有相當程度的開發價值與潛力(張上鎮，2009)。

雖然台灣相思樹具有上述優點而廣為種植，但是現在由於政府之禁伐政策之影響，絕大多數都是作為保安林，或變成低海拔地區欠缺管理的野生雜木林，已幾乎不作為經濟生產之用，甚為可惜。若可以育種方式強化台灣相思樹的優勢，



未來可能成為台灣林業重新發展的一項重要資源。

近年來作物及造林樹種育種，大多採用速度較快、成效顯著、較具控制性、性狀移轉可不限於同種或近源的基因轉殖技術 (transgenic) (黃三光和曾經洲，2001)。雜交、多倍體化、單倍體化等成效較低，且僅限於同種或種源相近植物之傳統育種方法，已經受到挑戰。然而基因轉殖作物 (genetically modified crops, GMC) 已有不少人對其安全性產生質疑，包括吃下基因轉殖生物製成的食物是否會對人體造成傷害；或是這些 GMC 會因為意外溢出，包括其植物體、花粉、種子等部分，進而造成生態平衡、生物多樣性瓦解等危機。近年來已有不少報告對此提出質疑，例如 1998 年 Pusztai 提出老鼠食用 GMC 馬鈴薯之後體重減輕、免疫系統退化之報告，以及 2003 年由薛達元提出的 GMC 棉花已經造成所謂「超級害蟲」的報告 (賈士榮和金芄軍，2003)。雖然上述兩者均被後續的研究報告斥為無稽，卻也顯示了部分人士對 GMC 之不信任與擔憂。因此，在安全性上由於數千年之研究而受到肯定的傳統育種在今日仍有一定程度的發展潛力。

一般而言，大多數生物體內都有二組染色體，稱為二倍體 (diploid)，但少數動物及多數的植物會有僅有單組或是三組以上染色體的現象，前者稱為單倍體 (haploid)，後者則稱多倍體 (polyploid)。單倍體為雄配子或雌配子單獨發育而成的生物個體，因此只有形成體細胞的兩組染色體中的一組，沒有顯隱性基因覆蓋的問題，因此每個基因都可充分發揮作用，為研究基因性質以及純系育種的極佳工具。多倍體常見於植物界，依組成染色體來源分為兩種：增加的染色體組來自同一物種者，稱同源多倍體 (autopolyploid)；兩組染色體來自不同物種者，稱異源多倍體 (allopolyploid)。多倍體現象在被子植物界甚為常見，約有三分之一的種類有天然多倍體現象，而裸子植物則只有三種有天然同源多倍體 (王亞男和李鎮






宇，1999)。

天然多倍體的發生，常見於生育地因子經常改變或是較為惡劣的環境，如高山、乾旱地、寒原等，因多倍體較二倍體容易適應環境改變，所以在這類惡劣的生育地得以與二倍體競爭。較常自然發生多倍體的植物，一般有長壽、營養組織健壯、染色體較小的特性，因此多見於多年生草本 (Muntzing, 1936; Stebbins, 1940, 1942; 王亞男和李鎮宇，1999)。近年來由於分子生物技術的發展，對於植物天然多倍體的產生機制的研究頗多，最主要的機制就是 repeated DNA 序列的作用，這些會誘發多倍體產生的 DNA 序列在楊樹屬、棉花屬以及禾本科植物 (Burleigh *et al.*, 2009) 均有發現，而且也經由統計分析 (Burleigh *et al.*, 2009) 以及 RFLPs (Morikawa and Nishihara, 2009) 的方式證實了此種序列對於誘導植物產生天然多倍體的影響。

天然多倍體現象是植物種化的一個重要過程，現在極大部分的高等植物都是經由天然誘發多倍體所發生的結果。經研究，雙子葉植物有 43%、單子葉植物 58%、裸子植物有 47% 是經由天然發生多倍體現象後種化而成的 (Grant, 1981)。例如北美的長葉世界爺 (*Sequoia*) 屬植物，就有報告指出很可能為一種已絕滅的水杉 (*Metasequoia*) 屬的多倍體化後代 (Saylor and Simons, 1971)。

近年歐美各國對於多倍體研究的重心，多集中於分子生物層次，包括造成天然產生多倍體的基因特性、多倍體與生物演化、基因大量複製與天然多倍體發生的關聯等等。在育種方面則以中國、東南亞等開發中國家為大宗，但甚少有突破 (Burleigh *et al.*, 2009; Morikawa and Nishihara, 2009; Wood *et al.*, 2009)。



本研究的目的是，即為利用不同濃度之秋水仙素 (colchicine)，以不同時間處理未發芽之台灣相思樹種子，發現並證明產生多倍體幼苗後，再以統計分析之方式，從中尋求人工誘導台灣相思樹多倍體植株的最佳處理方式，期可作為未來台灣相思樹育種工作的參考。

## 二、前人研究

### (一) 天然多倍體的特性

被子植物的多倍體具有生長及成熟較快、體型及細胞單體巨大化、單數倍體無孕性等特點，因此在品種改良上具有相當程度的重要性，一般有增加變異、匯集優良基因、具不孕性的育種（即三倍體等單數倍體）中間媒介等應用，而裸子植物的多倍體則多半發生矮化的現象 (Kiellander, 1950; 王亞男和李鎮宇, 1999)，但是也有例外，如柳杉 (*Cryptomeria japonica* (L. f.) D. Don) 的多倍體幼苗就較二倍體粗大 (Chiba, 1951)。多倍體之形態特徵，包括器官之巨大化及扭曲現象，可作為簡單分辨二倍體及多倍體的方法。由於多倍體的巨大化特徵在幼苗期即有顯著的表現，因此在篩選疑似多倍體的材料時，是極佳的初期鑑定方式。

### (二) 人工多倍體的應用

多倍體育種已廣泛用於園藝、經濟以及糧食作物上，包括菸草、西瓜、水稻、玉米、甘蔗以及各種水果等，包括同源多倍體以及異源多倍體。由於木本植物的多倍體誘發以及培育較不容易，且花費時間甚久，因此在林業的利用極少，且絕大多數屬同源多倍體。

大部分的被子植物出現多倍體化現象之後，具有生長加速、產量提升、體型巨大化、營養或生殖器官數量增加的現象 (Osborn, *et al.*, 2003)。以直幹相思樹為





例，王學文和崔克明在 2000 年證明，二年生的四倍體直幹相思樹，其木纖維性狀與六年生的二倍體相當，顯示多倍體化對直幹相思樹這類紙漿用材而言，具有減少種植時間與成本的優點。然而也有例外，例如桑樹 (*Morus alba*) 和丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) (楊新華等，2000；艾建國和高山林，2003)。有些植物在多倍體化後則出現成熟期延後的現象，例如盾葉薯蕷 (*Dioscorea zingiberensis*) (周媛等，2005)。裸子植物多倍體化後，多半呈現矮化之性徵 (王亞男和李鎮宇，1999)。然而柳杉的多倍體則會出現與被子植物多倍體類似的巨大化現象 (Chiba, 1951)。

在一般商業上，通常會以二倍體與四倍體雜交，以產生具有多倍體優良特性，又不會產生大量後代的三倍體，因為三倍體只會開花而不會結實，可避免對環境造成不良影響。

### (三) 林木的人工多倍體

多倍體育種源於 20 世紀初期 (蔡旭，1988)，在 20 世紀的 30 年代，多倍體育種逐漸廣泛利用於農作物之品種培育，在發現秋水仙素對於誘導多倍體之效用後，利用植物鹼等物質誘導多倍體的研究日益增加 (李云等，2005)。目前在木本植物上，使用多倍體育種技術最多的樹種為楊樹屬 (*Populus spp.*)，其他有相關報告者則有樺樹 (*Betula sp.*)、赤楊 (*Alnus sp.*)、銀合歡 (*Leucaena leucocephala*)、柳杉 (*Cryptomeria japonica*) 以及直幹相思樹 (*Acacia mangium*) 等 (Chiba, 1951; 王亞男和李鎮宇，1999; 王學文和崔克明，2000)。

### (四) 人工多倍體誘導法

誘導植物產生多倍體的方法，分為物理、化學以及生物方法三大類：(李淑玲和戴豐瑞，1995)



- 1.物理法：高溫、低溫、機械處理、高壓以及離心處理等。
- 2.化學方法：植物鹼、生長素、化學藥劑等，也是最廣為利用的多倍體誘導方式。
- 3.生物法：雜交、嫁接、摘心等。

一般在實驗以及產業上常用的化學誘變劑，包括秋水仙素、八角蓮鹼 (podophyllin)、IAA、 $N_2O$ 、茶嵌戊烷 (acenaphthene)、毆拉靈 (oryzalin) (Blakeskey *et al.*, 2002; 李淑玲和戴豐瑞, 1995)，其作用機制為抑制紡錘體形成，而使細胞在分裂後染色體加倍產生多倍體，在這之中以秋水仙素處理法為最常用、最受歡迎者。常用的秋水仙素處理法包括：

浸漬法：適用於種子及生長點的處理。種子的處理法為將材料置於培養皿或濾紙，注入秋水仙素溶液但不要淹沒材料，加蓋後靜置於暗處。在發根前取出於清水中洗淨再行種植。此法也是化學方法中，最簡單也最常用的方式 (Blakeskey *et al.*, 2002)。

滴定法：用滴管將秋水仙素直接滴於幼苗頂端生長點或側芽，約 6~8 小時處理一次。

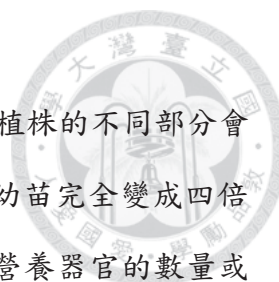
毛細管法：將生長點以脫脂棉或紗布包裹，另一端浸入秋水仙素溶液利用毛細作用逐漸將芽浸透。

塗抹法：以羊毛油處理後的秋水仙素軟膏直接塗布於生長點。此方法近似於浸泡法，但若塗布過多，即可能阻擋空氣進入而造成生長點死亡。

複合處理：同時以秋水仙素以及 x 光照射，可提高多倍體的產生率。相對的，也較容易造成植株、種子的死亡。

#### (五) 人工多倍體的鑑定法

誘導多倍體的鑑定方式，分為間接以及直接鑑定兩種，分述如下：



1.間接鑑定：由於秋水仙素所誘發的多倍體，多屬嵌合體，即同植株的不同部分會有染色體數量不同的現象，而發生形狀變異的現象，但在整株幼苗完全變成四倍體或二倍體的時候則會恢復正常。在不正常現象消失後，可由營養器官的數量或大小，包括葉片的氣孔數量、大小、芽的粗細、保衛細胞大小等方式，甚至於花的數量或大小來判斷有無形成多倍體（李淑玲和戴豐瑞，1995；Osborn, 2003）。一般而言，多倍體植株葉背氣孔數面積較大、數量較少（李涵等，2004）。除此之外，由於誘導多倍體苗的生長點常混有不同倍數染色體的細胞，因此子葉以及初生葉會因為不同倍數體之細胞生長速度不同而出現扭曲現象，也可作為分辨二倍體以及多倍體的方法（Chiba, 1951）。

2.直接鑑定又可分為顯微鏡法以及流式細胞儀法：

(1)顯微鏡法：直接取植株的細胞，觀察其染色體數量及大小，通常取根尖或地上部生長點細胞（李淑玲和戴豐瑞，1995）。或是利用流式細胞儀，直接以染色體particle 分析染色體之倍性。

(2)流式細胞儀法：流式細胞儀(flow cytometer)，是一種細胞在流體狀態下移動時，能夠觀測及記錄細胞特性的儀器。其原理為將雷射光打入一個細胞或顆粒中，藉由其被雷射光激發後產生的光學訊號，再轉換成電子訊號由電腦分析細胞或顆粒的特性。流式細胞儀是由 3cs 系統所組成，分別為（Givan, 2001; Shapiro, 1995; Darzynkiewicz *et al*, 1994; Ormerod, 2000）：

- a.流體學系統 (fluidics)：將散布於三度空間水柱中的細胞或顆粒，使其能一顆接著一顆地通過明亮的雷射光束。
- b.光學系統 (optics)：用以激發細胞或顆粒，使之產生光學訊號。
- c.電子系統 (electronics)：接收細胞或顆粒被雷射光激發後，所產生的光學訊號，並轉為電子訊號交由電腦分析。



## (六) 染色體的觀察

在整個細胞週期(cell cycle)裡,染色體僅在細胞分裂期,也就是M期(mitosis)或D期(division)時會因為DNA與蛋白質大量凝聚、濃縮而出現(Raven, etc., 1999)。由於不同生物的不同細胞,其細胞週期皆有所不同,因此在觀察植物染色體細胞時,需經過不斷的實驗與觀察,才能找到確定的分裂期。而染色體觀察,最重要的工作即固定染色體。但是在固定前須先以8-hydroxyquiniline以及Cycloheximide進行前處理,以令染色體固定(Chung *et al*, 2010)。染色體的固定多使用Carnoy's solution,常用的配方有二,Carnoy's solution I之配方為冰醋酸(acetic acid)與無水或95%乙醇(ethanol)以體積比1:3混合而成;Carnoy's solution II為將無水或95%乙醇、氯仿(choloroform)、冰醋酸以體積比6:3:1混合而成(Smith, 1947)。Carnoy's solution之各成分的作用機制如下:乙醇可迅速進入細胞,使細胞失去活性、硬化,並溶解部分脂類;而冰醋酸的作用為凝固核蛋白,以固定染色體狀態,且可使細胞膨脹並軟化;氯仿的作用為加速上述兩者滲透進入細胞內部,且可破壞粒線體與高爾基氏體,增加細胞的透明度以利於觀察。然而由於乙醇本身在此溶液中,容易發生氧化轉變成乙醛或乙酸,且可能將染色體當中的蛋白質分解以及造成DNA之變性,因此固定工作宜在低溫下進行,並於固定2-24小時之內將樣品移至乙醇當中保存(Smith, 1947; 李懋學和張贊平, 1996)。

Hoyer's solution為Baker等人於1922年所提出,用於製作玻片標本,其原始配方為50cc的二次水、阿拉伯膠30g、水合氫醛200g、甘油20cc。作用為固定樣品以及載玻片與蓋玻片、增加樣品延展性、保存樣品。Hoyer's solution在研究細胞學、昆蟲學、微生物學上,均為重要的工具。



## (七) 台灣相思樹的研究

### 1. 台灣相思樹種子的處理

由於台灣相思樹種子表皮富含油蠟質，堅韌不易吸水，故播種發芽的時間參差不齊且時間較長，因此常以以下三種方式來促進種子發芽：

(1)種子熱浸法：將種子浸於沸水中攪拌二至三分鐘，移至冷水中冷卻後，撈選出膨大之種子陰乾後下播；剩餘的未膨大之種子浸於微溫水中 24 小時，待其全部膨大後再行播種。或是直接將種子浸於沸水中靜置 24 小時即可。以此法處理的種子發芽率最高可達 94%，為效率最佳的處理法（李學勇，1974；林務局造林組，1976）。

(2)種子冷浸法：將種子浸於清潔冷水中，如在流動水中更佳，浸泡二至三日，取出下沉種子陰乾，進行播種。此法需要的時間較長，若處理時間過短，種子發芽率常未較熱浸法高（李學勇，1974；林務局，1976）。

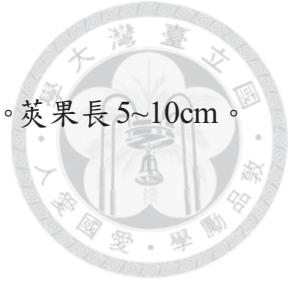
(3)濃硫酸法：將乾燥種子浸於濃硫酸（比重 1.84）處理 10-20 分鐘，倒入室溫冷水中以冷水沖洗 30 分鐘，陰乾後播種。以濃硫酸法處理效率高、速度快，唯若處理時間過長，濃硫酸常滲透過深，造成胚及子葉傷害，因而影響種子發芽率及存活率（李學勇，1974）。

本研究即採用效果及安全性相對較高之種子熱浸法，對研究材料之台灣相思樹種子進行前處理。

## 三、台灣相思樹的性狀

主要型態特徵：常綠中喬木，樹皮灰紅褐色，皮甚薄，樹幹常呈現彎曲。木材邊心材區別明顯，邊材淡黃褐色，心材褐色至暗褐色，有交錯之層次，春秋材不明顯。木材比重大，可達 0.67，耐朽性強。葉柄特化為具縱脈之假葉，假葉狹





長，略鐮狀彎曲，兩端漸尖。頭狀花序球形，徑6~8mm，花瓣金黃色。莢果長5~10cm。  
(郭寶章，1989；劉業經等，1994)

生長型態：常綠中喬木，高可達18m，直徑可達1m(圖1)。樹皮幼時光滑，老時粗糙。根系有根瘤菌共生。



圖1. 開花的台灣相思樹植株

葉的型態：羽狀複葉退化，僅在幼苗期短暫出現，其後產生之葉柄特化為鐮



刀型扁平假葉（圖 2、3），縱脈 7~9 條，互生，革質。



圖 2. 台灣相思樹幼苗的羽狀複葉



圖 3. 台灣相思樹的假葉



花的型態：頭狀花序球型，徑 6~8mm，腋生（圖 4），花萼 5 片合生為 5 裂之筒狀，花瓣 5 片，金黃色，鑷合狀排列。雄蕊多數離生，花粉於花藥中集生成花粉塊。



圖 4. 台灣相思樹的花序





果實型態：莢果長橢圓形，兩端截形（圖 5），種子 7~8，具毒性（圖 6）。



圖 5. 台灣相思樹的莢果



圖 6. 台灣相思樹種子

栽培：在造林上多為混合林，可與闊葉樹混生栽植，且因為屬於本地樹種，在抗病害、蟲害、風害等特性上極佳，加上根部有根瘤菌共生，可改良土壤肥力，因此頗受民間歡迎，為低海拔地區的主要造林樹種之一，唯目前台灣相思樹造林之種源已不可考（郭寶章，1989）。近年來則常見野生化的植株在低海拔地區大量生長（圖 7）。

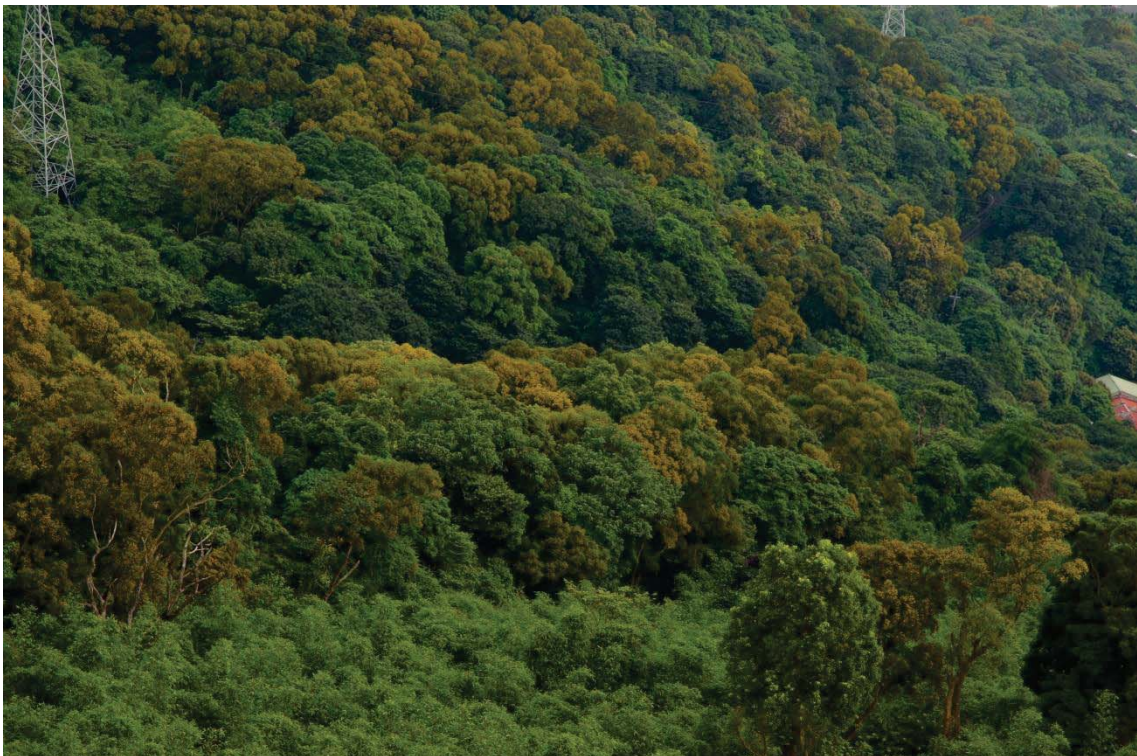


圖 7. 在低海拔山丘上成片分布的台灣相思樹

台灣相思樹的染色體數量為 26 個（Atchison, 1948），在自然狀態下幾乎不會出現多倍體現象。一般相思樹屬植物的染色體數量，絕大多數為  $2n=26$ ，只有少數種類的二倍體為  $2n=52$  甚至  $2n=102$  者（Federov, 1969）。

除了直幹相思樹（*Acacia mangium*）之外，大多數的相思樹屬植物在造林上經常出現樹幹彎曲的問題，造成木材的利用率降低，而減少其利用價值。





## 四、材料與方法

### (一) 材料

#### 1. 相思樹種子

本研究採用的種子，為林業試驗所所提供，於 1997 年 10 月採自台南甲仙工作站的造林地。將種子從果莢取出、乾燥後，以封口袋密封保存於 4°C 冰箱當中冷藏。於 2010 年 10 月至 2011 年 4 月之間分次取出，進行種子發芽。在預備實驗中，台灣相思樹種子用 100°C 之熱水浸泡至自然冷卻 24 小時，種子發芽率 80% 以上。

### (二) 方法

#### 1. 種子前處理

為避免種子外部帶菌對發芽率造成影響，試驗用的種子會先以以下步驟進行前處理：將種子以稀釋 1/100 安期-A 消毒液 (Antiseptol; 中國化學製藥公司) 浸泡並以超音波震盪 5 分鐘後，接著浸入 70% 乙醇震盪消毒 30 秒，最後以二次水清洗兩次。將經過表面消毒處理的種子，放入 100°C 的熱水中，任其自然冷卻 24 小時之後，取出瀝乾備用。

#### 2. 秋水仙素處理

將粉狀秋水仙素 (colchicine; Sigma) 以少量 95% 酒精溶解，再加入二次水調整濃度為 4%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01% 共六種濃度，以浸泡二次水者，即 0% 作為對照組。把經過前處理的相思樹種子放入不同濃度的秋水仙素溶液浸泡 12 和 24 小時。以秋水仙素處理過的種子再以二次水清洗，超音波震盪 5 分鐘，取出瀝乾，置於放有濕潤脫脂棉的培養皿，再放入溫度設定為  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  恆溫，光照強度  $28 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ，光週期 16 小時的生長箱，使其發芽。發芽時間兩星期，每處理 20 至



40 粒種子，進行八個重複，最終每處理為 160-205 粒種子。

### 3. 多倍體鑑定

本研究以種子發芽後，胚根突破種皮長至長超過 5mm 之後，作為認定種子已經發芽的條件；並以根部是否膨大至直徑 3-4mm，作為初期鑑定台灣相思樹種子有無多倍體化的方法。其次再用下列方式進行更進一步的鑑定：

#### (1) 直接鑑定

將發芽的相思樹種子在白天 10 點、11 點、12 點以及下午 3 點時，每個時段選 5-10 株幼苗，剪取 0.5-1cm 之根部放入 8-hydroxyquiniline (20ppm) 與 Cycloheximide (290ppm) 以體積比 1:1 混合之溶液中，置於 4°C 下 3-4 小時，以使染色體收縮。之後將溶液吸出，加入 Carnoy's solution，於室溫下放置 1-24 小時，以固定染色體狀態。再將 Carnoy's solution 吸出，加入 70% 乙醇，並置於 -20°C 下保存。

將上述步驟處理過的根部最前端 0.1cm 處切下置於載玻片，滴上改良苯酚品紅染色液 (Sharma, 1982) 染色八分鐘以上，再以玻棒搗至少 10 分鐘以確定樣品完全破碎，蓋上蓋玻片後選一平整桌面，置一濾紙，將玻片上下顛倒過來置於濾紙上，以左手緊緊壓住玻片，右手對玻片敲打，以壓出多餘溶劑並使樣本平整。以石蠟將蓋玻片四周封住後，置於光學顯微鏡 (OLYMPUS BX41) 當中觀察細胞並計算細胞中的染色體數量。

#### (2) 間接鑑定

待相思樹幼苗長出初生之羽狀複葉後，將小葉取下，於葉背塗上透明指甲油，以採集葉背氣孔之 peel。將取下的 peel 置於載玻片上以光學顯微鏡 (OLYMPUS BX41)，隨機選擇五個區域計算氣孔數量並測量氣孔與保衛細胞之面積。



### (3)流式細胞儀分析

以出現疑似多倍體現象之相思樹幼苗與普通二倍體之相思樹幼苗之根部，及之後兩種幼苗所生長之假葉，利用流式細胞儀分析兩種型態之台灣相思樹的染色體倍性。

#### a.根部染色體

採取台灣相思樹幼苗的根部，放入已加入 0.5mL Extraction Buffer 的培養皿中，並於冰上將根切碎，以令細胞溶入緩衝液中。切碎之樣本置於冰上備用。全部樣本切完後，過濾，將濾液收集至 tube 中，固定體積至 1.0mL，加入 RNase 並於 37°C 下放置 15 分鐘。再取 0.5mL 濾液與 10 $\mu$ L 之 51 $\times$  PI stock solution，在 4°C 絕光環境下放置至少 1 小時。

將以 PI stock solution 染色後的濾液取出，放入樣品管，上機 (BD FACScan 337452 Rev. A)，設定 SSC 電壓為 458，FL2 光波長之電壓為 448，其餘均保持預設值，此時流式細胞儀會自動計算樣本的細胞倍性並繪製出直條圖。

#### b.假葉染色體

採取台灣相思樹幼苗的假葉二至三片 (總面積大約 4cm<sup>2</sup>)，放入已加入 0.5mL Extraction Buffer 的培養皿中，並於冰上將假葉切碎，以令細胞溶入緩衝液中。切碎之樣本置於冰上備用。全部樣本切完後，過濾，將濾液收集至 tube 中，固定體積至 1.0mL，加入 RNase 並於 37°C 下放置 15 分鐘。再取 0.5mL 濾液與 10 $\mu$ L 之 51 $\times$  PI stock solution，在 4°C 絕光環境下放置至少 1 小時。

將以 PI stock solution 染色後的濾液取出，放入樣品管，上機 (BD FACScan 337452 Rev. A)，設定 FL2 光波長之電壓為 457，其餘均保持預設值，此時流式細胞儀會自動計算樣本的細胞倍性並繪製出直條圖。



#### 4.無菌苗培養

##### (1)培養基配製

本研究採用 Murashige and Skoog Medium(MS Medium)作為無菌苗培養的培養基。將配置完成之培養基，以 1N NaOH 或 HCl 將 pH 值調整為  $5.7\pm 0.01$  後，加入 0.08% 洋菜粉(American Bacteriological Agar; Pronadisa)作為支持物，以微波爐煮溶後分瓶，每瓶約 20mL 培養基。封瓶後經  $121^{\circ}\text{C}$ 、 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$  高溫高壓滅菌 20 分鐘後，取出置於常溫下至少 2 日。

##### (2)種植

將浸泡秋水仙素與未浸泡秋水仙素的台灣相思樹種子，先以二次水洗淨、瀝乾後，依序以稀釋 100 倍之安期-A 消毒液震盪 5 分鐘、70%酒精震盪 30 秒、3% 次氯酸鈉 (Sodium Hypochlorite Solution; ナカライテスク) 震盪 5 分鐘後，於無菌操作台內剝除種皮，並置於 MS 培養基中發芽。於光照強度  $28\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ，光週期 16 小時，溫度恆溫  $22^{\circ}\text{C}$  之生長環境下，培養四星期，做四重複，每處理各 20 株。

#### 5.統計分析

種子發芽後，分別統計(1)各處理之發芽種子數；(2)根部出現膨大現象之種子數；(3)不同處理的種子發芽率；(4)胚根膨大種子數與全部種子比例；(5)胚根膨大種子數與發芽種子比例；接著待子葉長出後，取葉背之 peel，隨機選擇五個區域計算(6)氣孔數量並測量(7)氣孔與保衛細胞之面積，以 SAS 軟體進行角度轉換後，套入下列公式計算不同時間處理的樣本之間有無差異。

##### (1)Student t-test

本法為比較在同樣濃度下，不同時間處理對於胚根膨大種子出現比例之影響，



以及有無出現多倍體化現象之植株的葉背棄孔數量及大小之間有無差異。本研究

所採用之公式為配對試區設計之  $t = \frac{d}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}}$ ，其中  $s_d^2 = \frac{\sum^n d_j^2 - \frac{(\sum^n d_j)^2}{n}}{n-1}$ ； $d$  為各處理之配

對差均數， $n$  為重複數。

## (2) 完全逢機區集分析

本法用以比較在同樣處理時間，不同濃度秋水仙素浸泡下，對於胚根膨大種子出現機率的影響是否有差異。公式如表 1：

表 1. 完全逢機區集之變異數分析表（劉宣誠，1976）

變異來源	自由度	平方和	均方	F 值
區集間	$r-1$	SSB	MSB	$F_b$
處理間	$k-1$	SST	MST	$F_t$
機誤	$(r-1)(k-1)$	SSE	MSE	
總計	$rk-1$	SSTot		

表內  $r$  值為各處理重複數， $k$  值為處理數， $Y_i$  為各處理總計， $Y_j$  為各重複合計， $Y$  為處理總計與重複合計之總合， $CT = \frac{Y^2}{rk}$ ；總計平方和  $SSTot = \sum^k \sum^r y^2 - CT$ ，區集平方和  $SSB = \frac{1}{k} \sum^r Y_j^2 - CT$ ，處理平方和  $SST = \frac{1}{r} \sum^k Y_i^2 - CT$ ，機誤平方和  $SSE = SSTot - SSB - SST$ 。各均方之公式如下： $MSB = \frac{SSB}{r-1}$ 、 $MST = \frac{SST}{k-1}$ 、 $MSE = \frac{SSE}{(r-1)(k-1)}$ 。求得均方後，再套入 F-test 之公式  $F = \frac{MST}{MSE}$ ，即可求得各種處理有無差異。





### (3)LSD 分析

以 F-test 確定各種處理有差異之後，再套入  $LSD = t \times \sqrt{MSE \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$ ，以求出以各種濃度秋水仙素浸泡之種子與未浸泡秋水仙素者之差異有無顯著。

## 五、結果

### (一) 秋水仙素對相思樹幼芽形態的影響

有無經秋水仙素處理之種子，發芽之後其根部長短、粗細均有相當程度的差異。圖 8 左邊為浸泡過秋水仙素的種子，種植一星期後根部長度平均為 0.5cm，直徑平均為 0.3cm；圖 8 的右邊為未浸泡於秋水仙素的種子，種植一星期後根部可長達 3cm 以上，平均直徑僅 0.1cm。浸泡過秋水仙素的種子，發芽率較低，生長也較緩慢，種植兩星期後的根部長度與僅種植一星期者比較幾乎沒有改變（圖 9）。

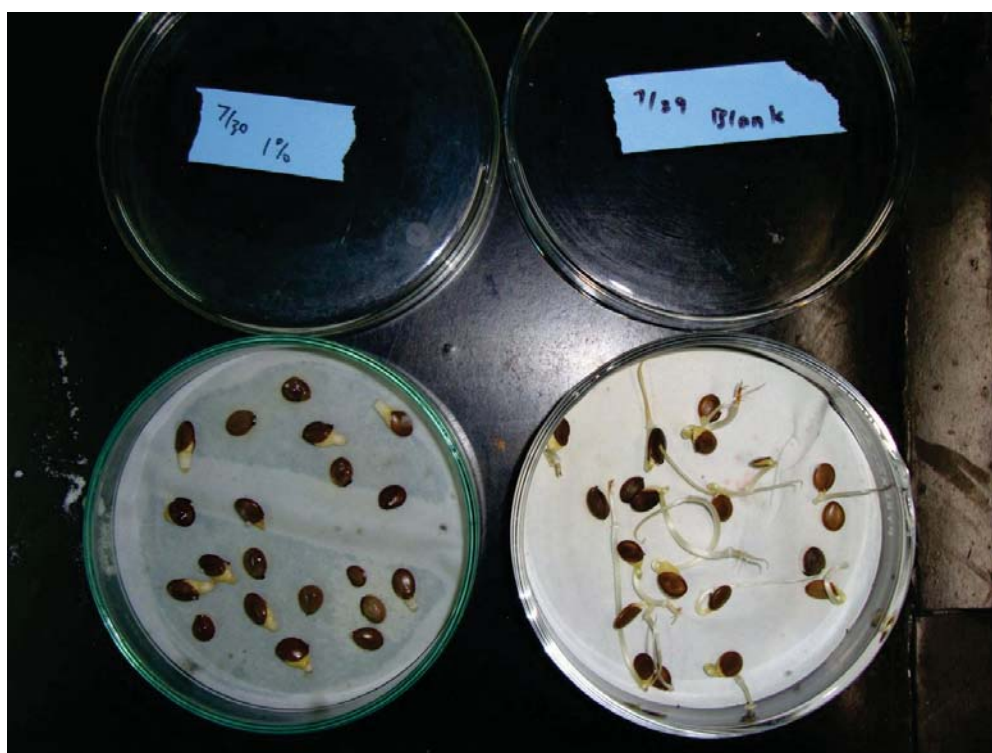


圖 8. 一星期後的不同濃度秋水仙素處理的種子發芽情形





圖 9. 具有膨大根部的種子發芽兩周之情形

## (二) 不同濃度秋水仙素對相思樹種子發芽的影響

以六種不同濃度的秋水仙素以及不以秋水仙素處理的種子，其發芽率隨著秋水仙素濃度的增加而下降（表 2），以 0%、0.01%、0.05%、0.1%、1%、2%、4% 浸泡 12 小時的台灣相思樹種子，發芽率依序為 36.59%、35.58%、31.90%、29.85%、29.70%、32.67%、16.56%；以 0%、0.01%、0.05%、0.1%、1%、2%、4% 浸泡 24 小時的台灣相思樹種子，發芽率依序為 40.31%、45.73%、35.63%、34.65%、37.62%、28.57%、24.84%，兩種時間處理的種子發芽率均隨濃度上升呈現下滑的趨勢，此外，除了 2% 之外，浸泡 12 小時的種子發芽率均較浸泡 24 小時者為低（圖 10）。



表 2. 不同濃度秋水仙素在不同浸泡時間下的種子發芽數與發芽率

濃度	發芽數		種子數		平均發芽率	
	12Hr	24Hr	12Hr	24Hr	12Hr	24Hr
0%	75	79	205	196	36.59%	40.31%
0.01%	58	75	163	164	35.58%	45.73%
0.05%	52	57	163	160	31.90%	35.63%
0.10%	60	70	201	202	29.85%	34.65%
1%	60	76	202	202	29.70%	37.62%
2%	66	58	202	203	32.67%	28.57%
4%	27	40	163	161	16.56%	24.84%

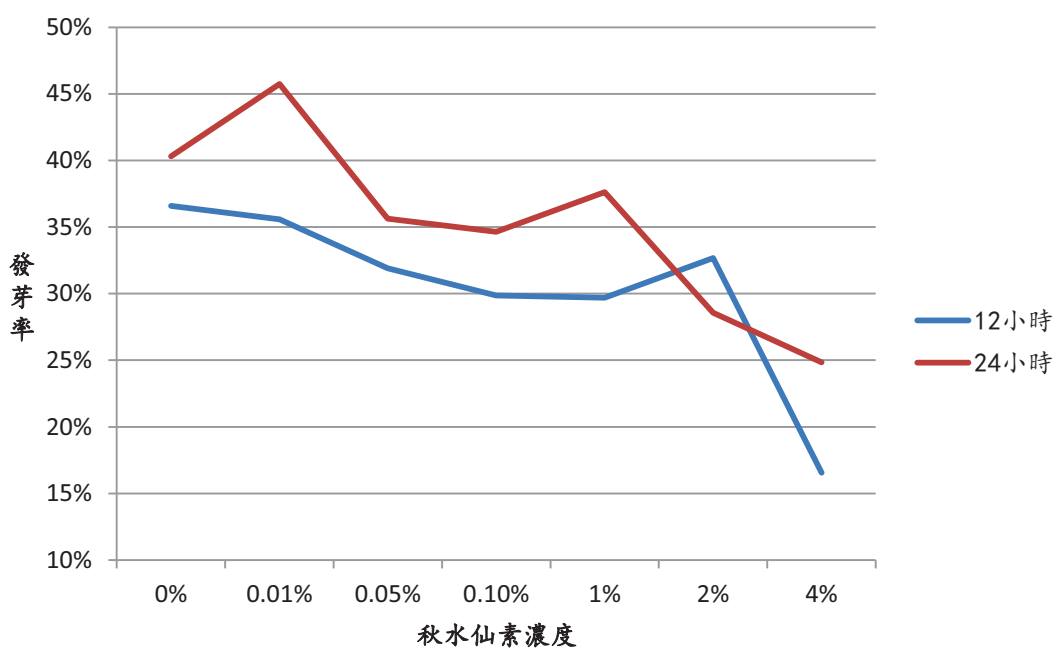


圖 10. 秋水仙素濃度與發芽率關係圖

根部的膨大比例則隨濃度與時間的增加而增加，但是濃度若過高，膨大的根



部的出現機率也稍有下降。以 0%、0.01%、0.05%、0.1%、1%、2%、4% 浸泡 12 小時的台灣相思樹種子，其具膨大根之幼苗與所有種子數量之比例為 0%、3.68%、14.72%、19.9%、22.77%、21.29%、13.5%，而具膨大根之幼苗與發芽種子數量比例為 0%、10.34%、46.15%、66.67%、76.67%、65.15%、81.48% (表 3)；以 0%、0.01%、0.05%、0.1%、1%、2%、4% 浸泡 24 小時的台灣相思樹種子，其具膨大根之幼苗與所有種子數量之比例為 0%、5.49%、17.5%、15.84%、25.74%、17.73%、16.77%，而具膨大根之幼苗與發芽種子數量比例為 0%、12%、49.12%、45.71%、68.42%、62.07%、67.50% (表 4)。比較幼苗根部膨大出現比例的趨勢，分母為全部種子數的時候，浸泡 12 小時與 24 小時者均在秋水仙素濃度為 1% 時達到高峰，接著無論提高濃度或降低濃度均使根部膨大幼苗的出現率降低 (圖 11)；而將具膨大根部的幼苗與發芽種子數量比較之後，無論浸泡時間是 12 或 24 小時，具膨大根部的幼苗在秋水仙素為 2% 時出現比例較低，但是基本上還是呈現穩定上升的趨勢 (圖 12)。



表 3. 不同濃度與時間處理的種子根部膨大數與種子數比較

濃度	膨大數		種子數		平均百分率	
	12Hr	24Hr	12Hr	24Hr	12Hr	24Hr
0%	0	0	205	196	0.00%	0.00%
0.01%	6	9	163	164	3.68%	5.49%
0.05%	24	28	163	160	14.72%	17.50%
0.10%	40	32	201	202	19.90%	15.84%
1%	46	52	202	202	22.77%	25.74%
2%	43	36	202	203	21.29%	17.73%
4%	22	27	163	161	13.50%	16.77%

表 4. 根部膨大的種子與發芽數之比例

濃度	膨大數		發芽種子數		平均百分率	
	12Hr	24Hr	12Hr	24Hr	12Hr	24Hr
0%	0	0	75	79	0.00%	0.00%
0.01%	6	9	58	75	10.34%	12.00%
0.05%	24	28	52	57	46.15%	49.12%
0.10%	40	32	60	70	66.67%	45.71%
1%	46	52	60	76	76.67%	68.42%
2%	43	36	66	58	65.15%	62.07%
4%	22	27	27	40	81.48%	67.50%

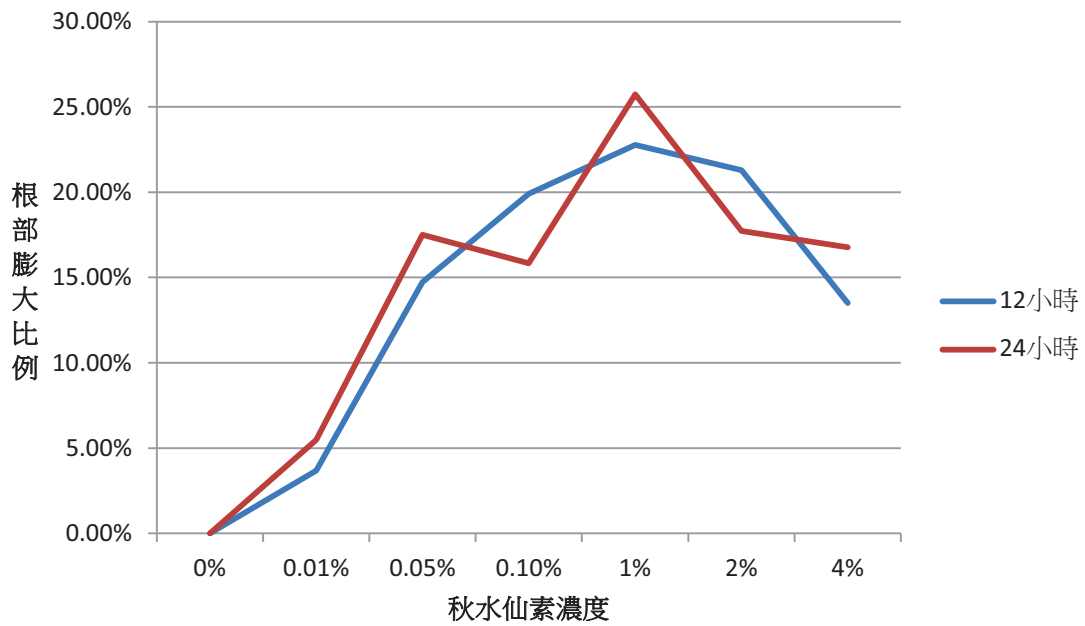


圖 11. 秋水仙素濃度與種子根部膨大數與種子數比例關係圖

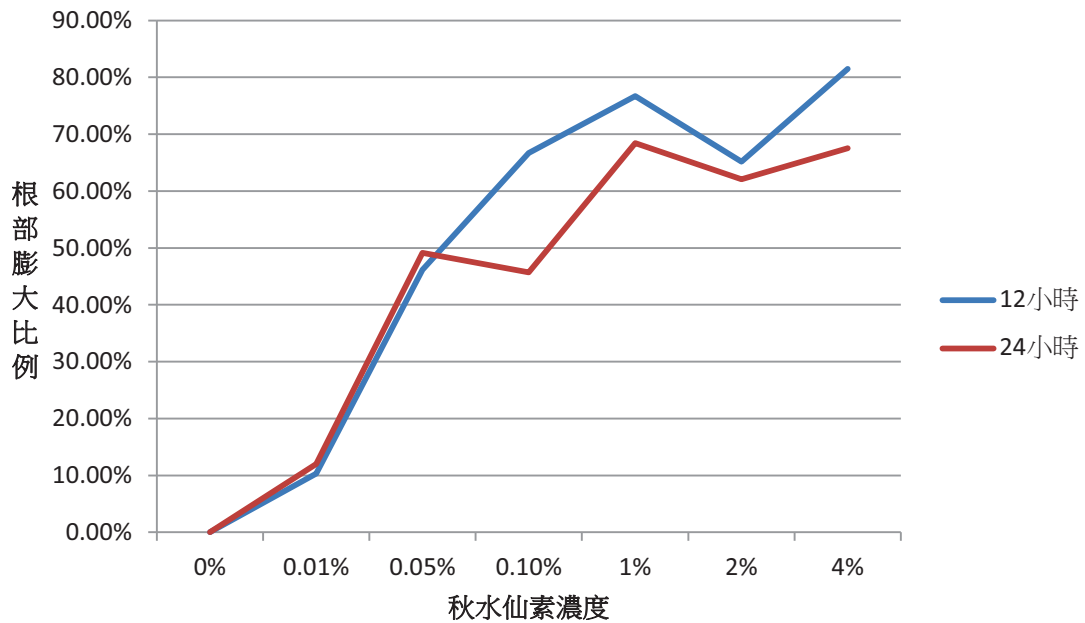


圖 12. 秋水仙素濃度與種子根部膨大數與發芽數比例關係圖

### (三) 不同濃度秋水仙素對相思樹種子多倍體化的影響

以 student t-test 分析不同時間處理的種子之後，計算出在同樣濃度的秋水仙素



處理之下，根部膨大的比例無論與全部種子或發芽種子比較，浸泡 24 小時與 12 小時對於幼苗膨大根部出現比例並無顯著差異。表 5 為根膨大種子與全部種子之比較，將數據做角度轉換後，在自由度 7 的情況下，求得 t 值為-0.565，無顯著差異；表 6 為根膨大種子與所有發芽種子之比較與角度轉換後之值，自由度為 7，求得 t 值 1.756，無顯著差異。

表 5. Student t-test 分析根膨大種子與全種子百分率之差異(t=-0.565)

濃度	24Hr	12Hr	24Hr	12Hr
	角度變化前		角度變化後	
0%	0.00%	0.00%	0	0
0.01%	3.68%	5.49%	11.0597928	13.55080794
0.05%	14.72%	17.50%	22.56098575	24.72920402
0.10%	19.90%	15.84%	26.49336942	23.45289907
1%	22.77%	25.74%	28.50133908	30.48721777
2%	21.29%	17.73%	27.47819204	24.90216863
4%	13.50%	16.77%	21.55680729	24.17418195



表 6. Student t-test 分析根膨大種子與發芽種子百分率之差異(t= 1.756)

濃度	24Hr	12Hr	24Hr	12Hr
	角度變化前		角度變化後	
0%	0.00%	0.00%	0	0
0.01%	10.34%	12.00%	18.75721866	20.26790512
0.05%	46.15%	49.12%	42.79193545	44.49578003
0.10%	66.67%	45.71%	54.73764703	42.53899375
1%	76.67%	68.42%	61.1177464	55.80849866
2%	65.15%	62.07%	53.81895054	51.98460254
4%	81.48%	67.50%	64.51032165	55.24366863

浸泡相同時間的情況下，將所有試驗品取六個重複之數值進行角度轉換，以完全逢機區集分析，處理 12 小時者，由表 7 求得 CT 為 11689.8，SST 為 3263.4，SSB 為 1159.4，SSE 為 4096.8；再從中求得 MST 為 543.9，MSB 為 231.9，MSE 為 136.6，最終求得 F 為 3.983，各種處理之間具有顯著差異。處理 24 小時者，由表 8 求得 CT 為 18595.0，SST 為 4820.2，SSB 為 436.6，SSE 為 3246.0；再從中求得 MST 為 803.4，MSB 為 87.3，MSE 為 108.2，最終求得 F 為 7.425，各種處理之間具有顯著差異。在確定有顯著差異之後再以  $LSD_{(0.5)}$  分析，浸泡 12 小時，對照組與以 0.01% 以上濃度浸泡者均具有顯著差異，以 0.01% 浸泡者則與 1% 以上濃度浸泡者具顯著差異，其餘則無顯著差異（表 7）。浸泡 24 小時，對照組與其餘所有濃度均有顯著差異，0.01% 與 1%、2%、4% 具顯著差異，其餘濃度之間則無顯著差異。（表 8）。

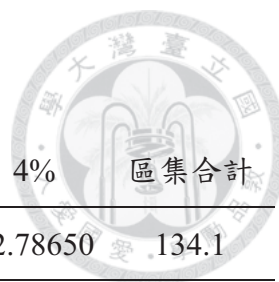


表 7. 處理 12 小時，不同重複之 F-test 計算表(LSD<sub>(0.05)</sub>=11.03)

	0%	0.01%	0.05%	0.10%	1%	2%	4%	區集合計
1	0	0	18.43495	26.56505	36.27120	30.00000	22.78650	134.1
2	0	24.80451	36.45121	0	32.83473	32.83473	19.46109	146.4
3	0	0	20.70481	52.23876	37.76125	37.76125	0	148.5
4	0	0	26.56505	0	0	0	15.00145	41.6
5	0	12.92096	22.78650	12.92096	12.92096	18.43495	23.42149	103.4
6	0	9.09743	12.92096	24.7292	31.62816	30.00000	18.43495	126.8
處理合計	0.0	46.8	137.9	116.5	151.4	149.0	99.1	700.7
處理平均	0.0 <sup>c</sup>	7.8 <sup>bc</sup>	23.0 <sup>ba</sup>	19.4 <sup>ba</sup>	25.2 <sup>a</sup>	24.8 <sup>a</sup>	16.5 <sup>a</sup>	


表 8. 處理 24 小時，不同重複之 F-test 計算表(LSD<sub>(0.05)</sub>=9.82)

	0%	0.01%	0.05%	0.10%	1%	2%	4%	區集合計
1	0.00000	12.92097	22.78650	18.43495	42.13042	0.00000	33.21092	129.5
2	0.00000	26.56506	28.11020	35.24414	35.24414	39.23153	19.46109	183.9
3	0.00000	0.00000	37.76125	30.00001	41.78470	35.24414	0.00000	144.8
4	0.00000	0.00000	39.23153	31.11253	41.14961	31.11253	21.38861	164.0
5	0.00000	11.53696	24.65372	16.42994	16.42994	20.70482	24.12046	113.9
6	0.00000	22.54481	14.05772	14.05772	35.24414	28.99728	32.83474	147.7
處理合計	0.0	73.6	166.6	145.3	212.0	155.3	131.0	883.7
處理平均	0.0 <sup>d</sup>	12.3 <sup>c</sup>	27.8 <sup>bc</sup>	24.2 <sup>abc</sup>	35.3 <sup>ab</sup>	25.9 <sup>ab</sup>	21.8 <sup>a</sup>	

(五) 人工多倍體相思樹幼苗的染色體觀察

本研究選擇下午 3 點、早上 10 點、11 點、12 點四個時段，將根段以





8-hydroxyquiniline 與 Cycloheximide 處理後，再以 Carnoy's solution 進行染色體固定。將根尖染色製成玻片標本後，發現在點固定之根尖，最容易發現細胞內有染色體，也就是表示在這段時間內有大量細胞正在細胞分裂期。而下午 3 點則很難發現處於細胞分裂期的根尖細胞。

將膨大與未膨大的根部製作為玻片標本後於顯微鏡下觀察，計算出膨大根部的細胞較未膨大者稍大，且可分辨之染色體數在 30 至 40 個以上，最多可達 52 個（圖 13）。而未膨大者可分辨者僅 10 至 20 個，最多僅 26 個（圖 14）。

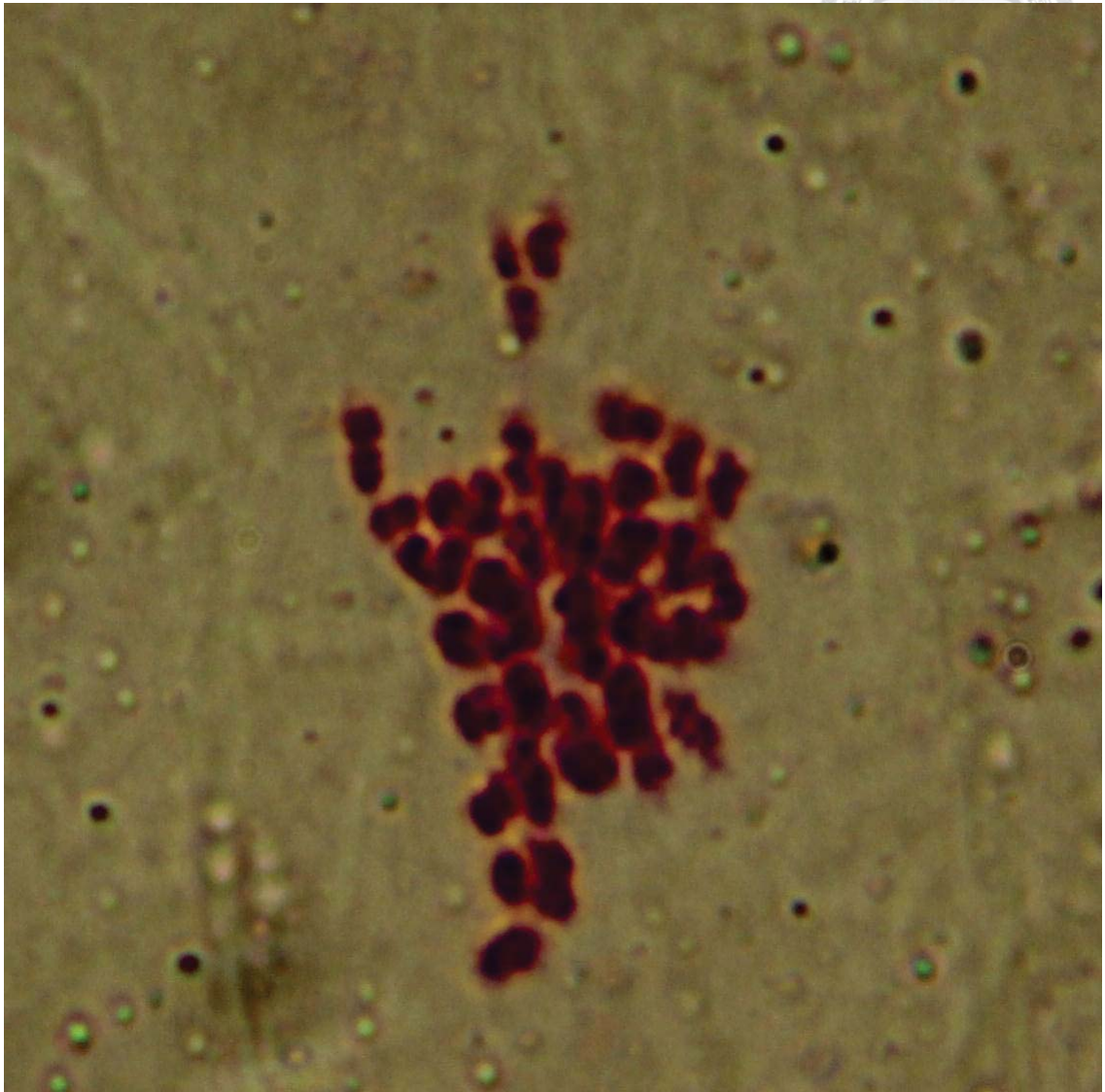


圖 13. 根部膨大之根尖染色體（可分辨者有 47 個）

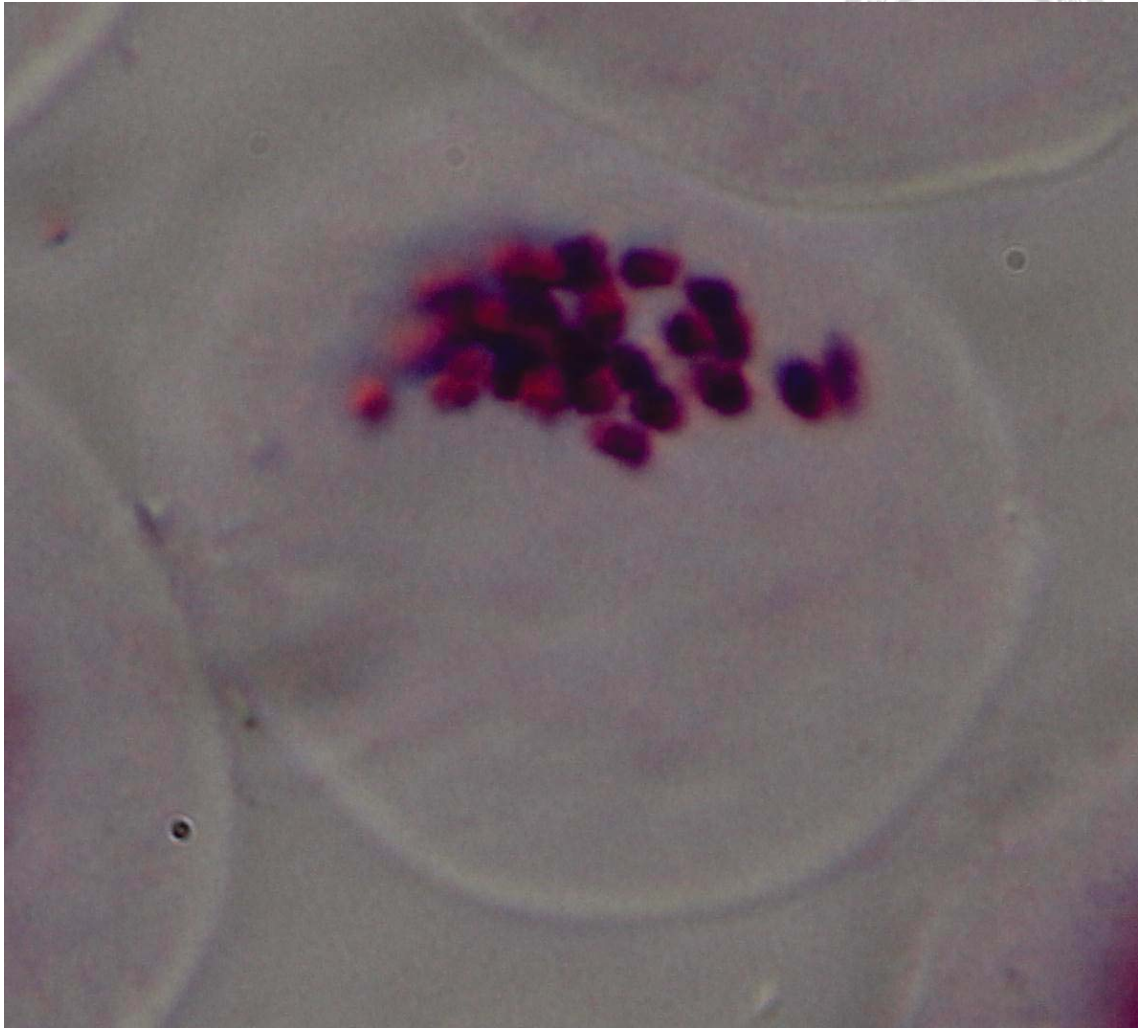


圖 14. 根部未膨大之根尖染色體（可分辨者有 24 個）

## （六） 流式細胞儀分析

### 1. 根尖染色體

以流式細胞儀分析多倍體根部所抽取的細胞後，發現在 200、400 及 800 處出現明顯峰值，且 400 處較其他兩者為高，表示多倍體之根部細胞同時具有二倍體、四倍體之性質，而 800 的峰值則代表根尖部分具有分裂中的細胞（圖 15）；而二倍體的根部，則僅在 200 及 400 處有峰值，200 處的峰值較高，表示二倍體根部同時存在普通的二倍體細胞以及分裂中的二倍體細胞（圖 16）。

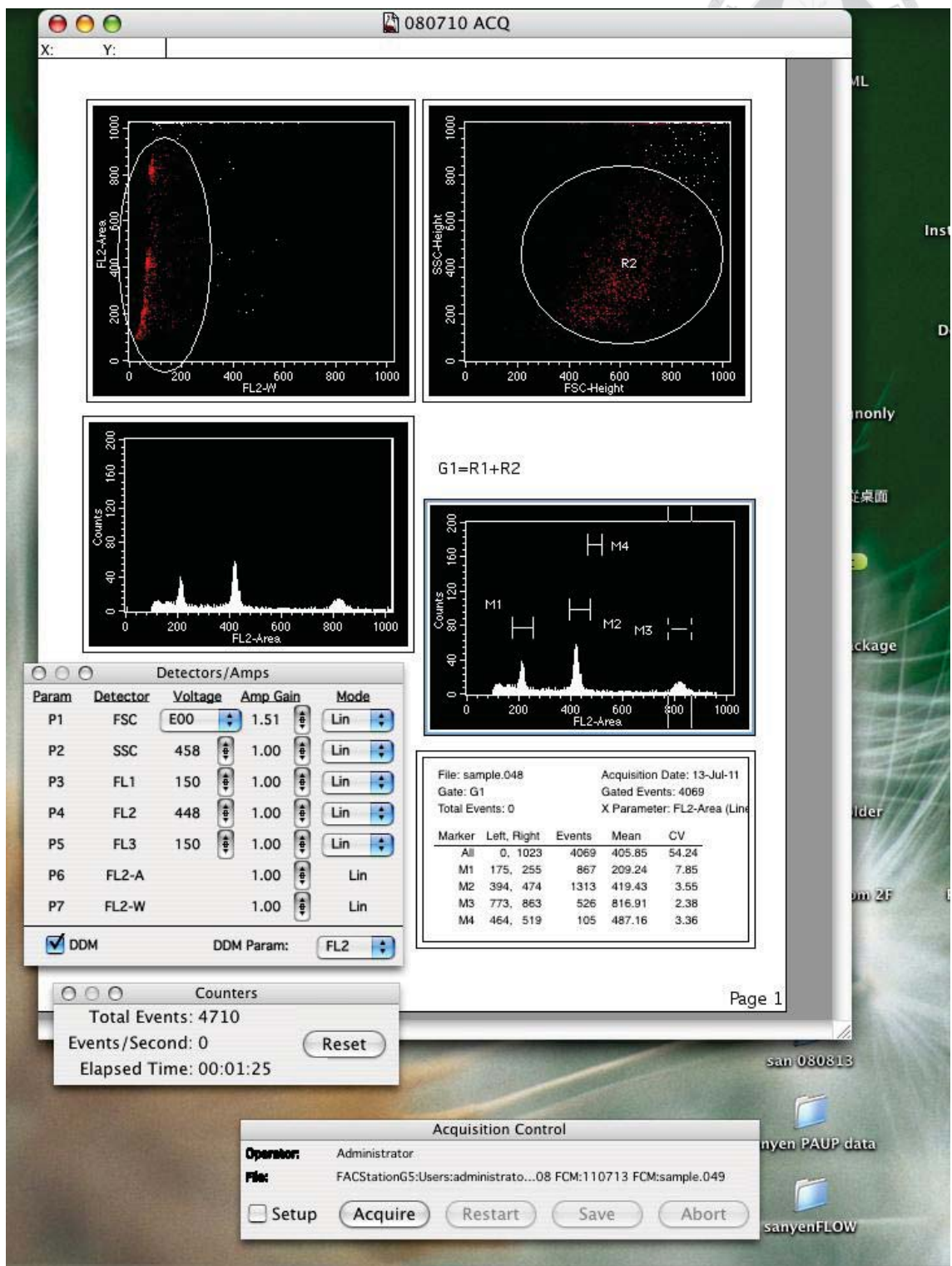


圖 15. 多倍體初生根之流式細胞儀分析結果



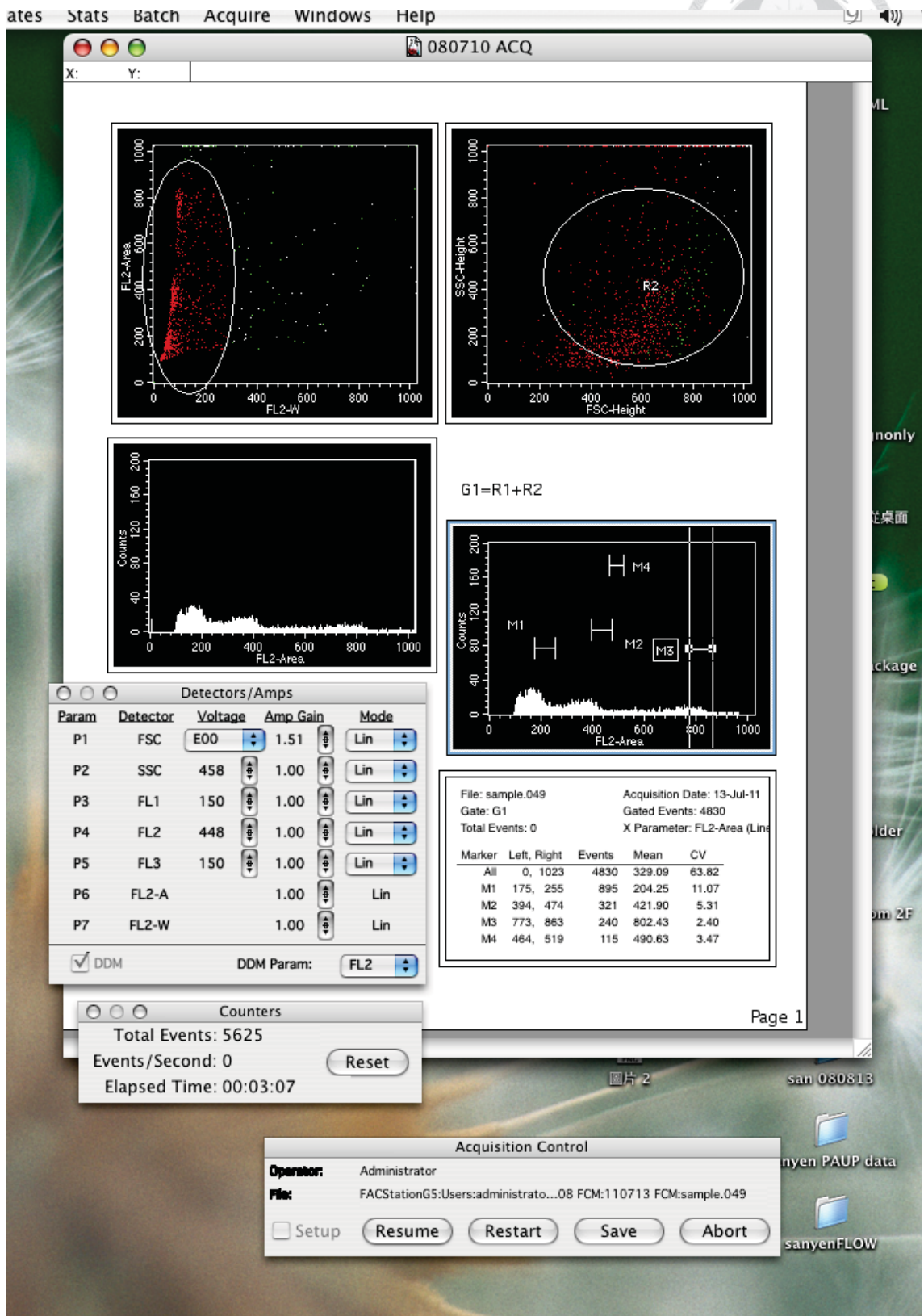


圖 16. 二倍體初生根之流式細胞儀分析結果



## 2. 假葉染色體

以流式細胞儀分析多倍體假葉所抽取的細胞後，發現在 200 及 400 處出現明顯的峰值，且 200 明顯較 400 為高，表示此假葉的細胞同時具有二倍體與四倍體之特徵，而且以二倍體佔優勢（圖 17）。而分析由二倍體假葉所抽取的細胞，則僅在 200 處出現峰值，表示二倍體之假葉僅含有二倍體之細胞（圖 18）。



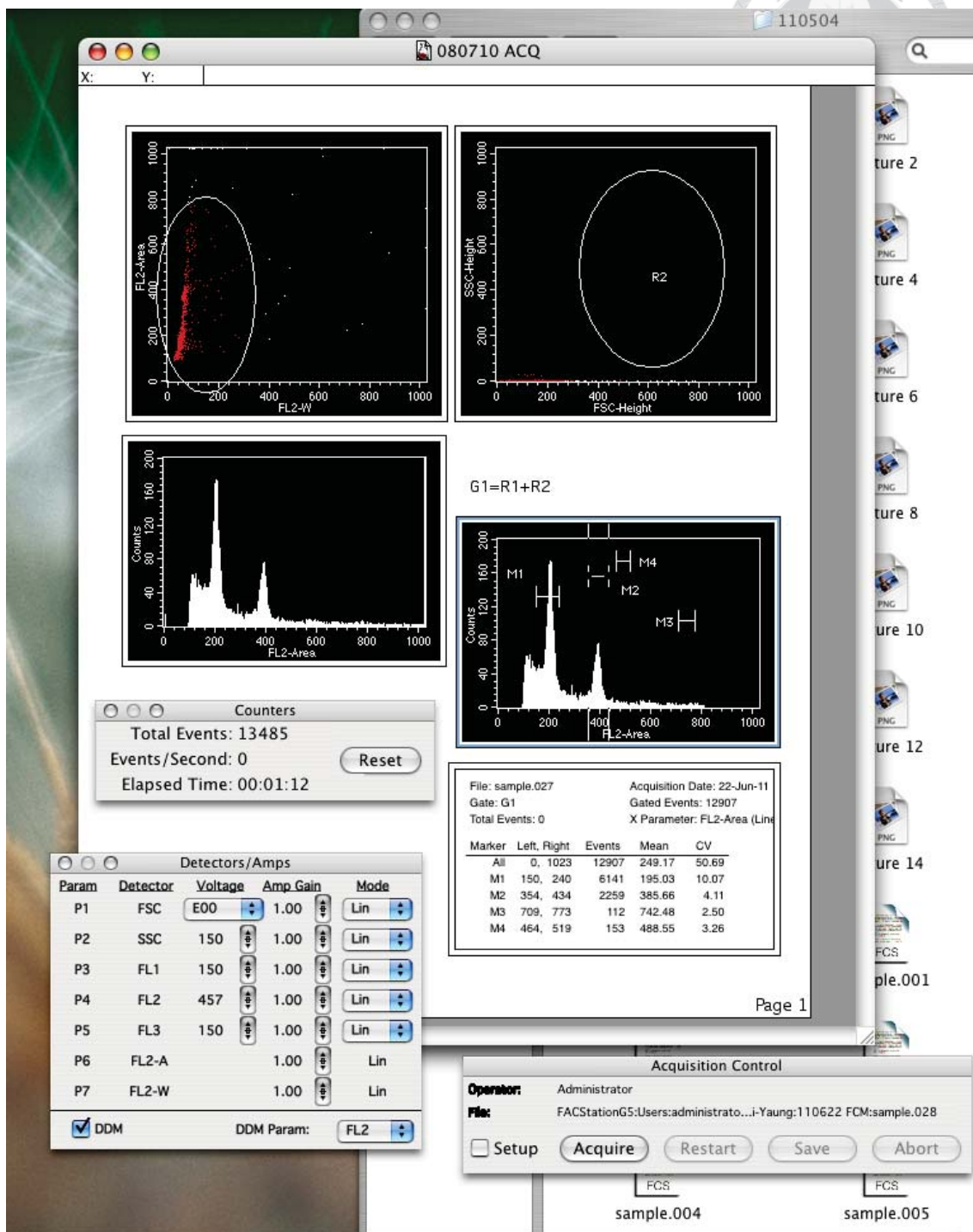


圖 17. 多倍體假葉之流式細胞儀分析結果

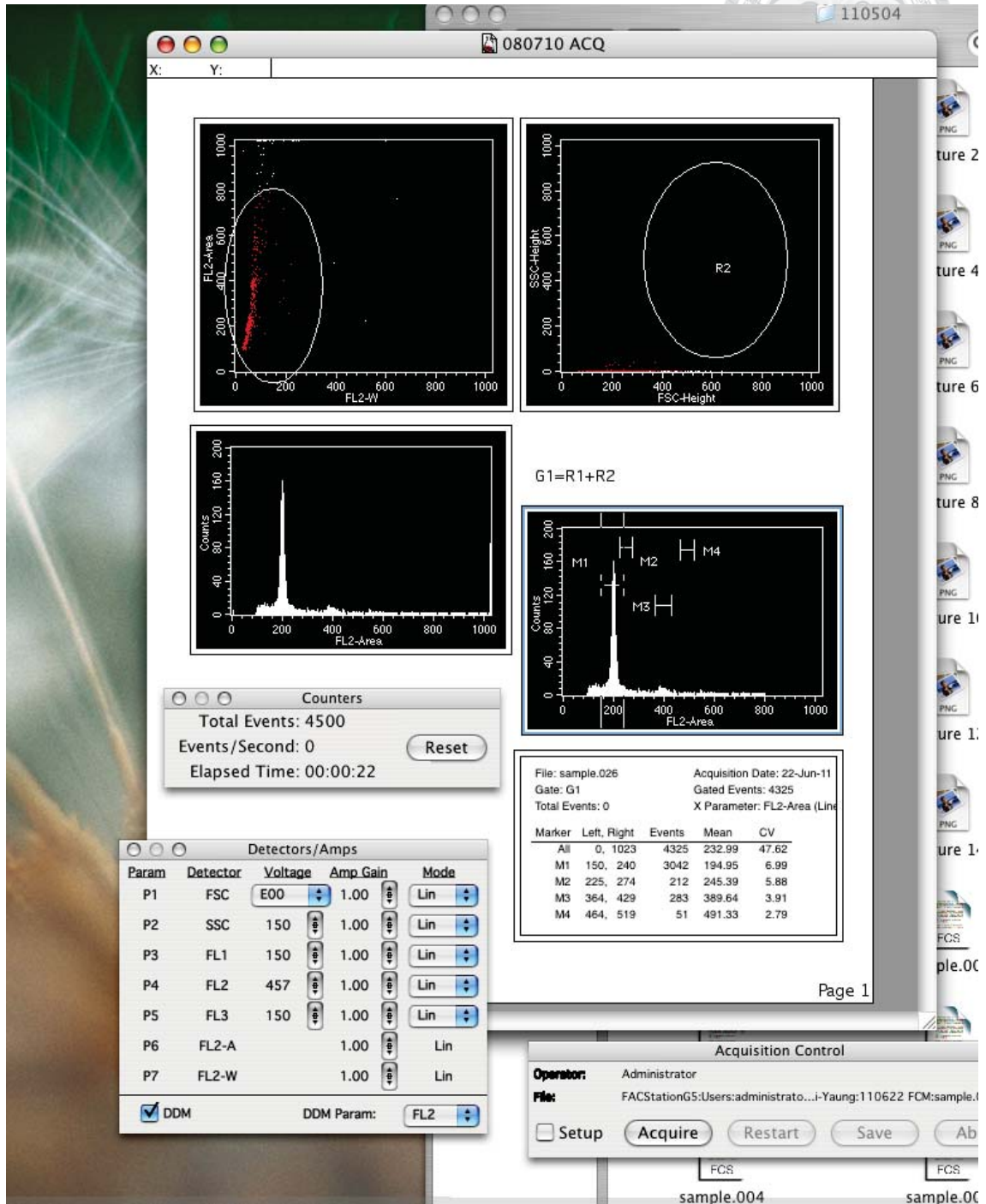
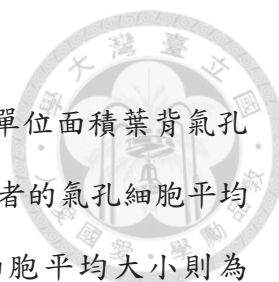


圖 18. 二倍體假葉之流式細胞儀分析結果

### (七) 人工多倍體相思樹苗的型態鑑定

#### 1. 氣孔面積



根部膨大的相思樹幼苗，即疑似多倍體幼苗，其初生葉的單位面積葉背氣孔數較正常幼苗為少，細胞尺寸亦較大（圖 19、圖 20）。根膨大者的氣孔細胞平均大小為  $222.30\mu\text{m}^2$ ，根部未膨大之正常幼苗的氣孔與保衛細胞平均大小則為  $160.32\mu\text{m}^2$ （表 9）。

將兩種幼苗的保衛細胞大小進行 Student t-test 分析，得兩種處理之保衛細胞大小的配對差平方和為 105145.49，代入  $s_d^2 = \frac{\sum^n d_j^2 - \frac{(\sum^n d_j)^2}{n}}{n-1}$  求得  $s_d^2 = 856.64$ ，再代入 t-test 公式  $t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}}$ ，求得 t 值為 9.676，自由度為 19，查表得  $t_{(0.01/2,19)} = 2.861$ ， $9.676 > 2.861$ ，

得知兩種幼苗的保衛細胞面積具有極顯著差異。

## 2. 單位面積氣孔數

根膨大者的氣孔細胞在單位面積(1mm X 1mm)下的平均數量為 53.4 個。根部未膨大幼苗的氣孔在單位面積下的平均數量為 131 個（表 10）。

其後，再將於單位面積下之氣孔數進行 Student t-test 分析，求得兩種處理之單位面積氣孔數的配對差平方和為 182268.8，代入  $s_d^2 = \frac{\sum^n d_j^2 - \frac{(\sum^n d_j)^2}{n}}{n-1}$  求得  $s_d^2 = 2925.1$ ，再代入 t-test 公式  $t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}}$ ，求得 t 值為 6.254，自由度為 19，查表得  $t_{(0.01/2,19)} = 2.861$ ，

$6.254 > 2.861$ ，得知兩種幼苗在單位面積下的氣孔數具有極顯著差異。



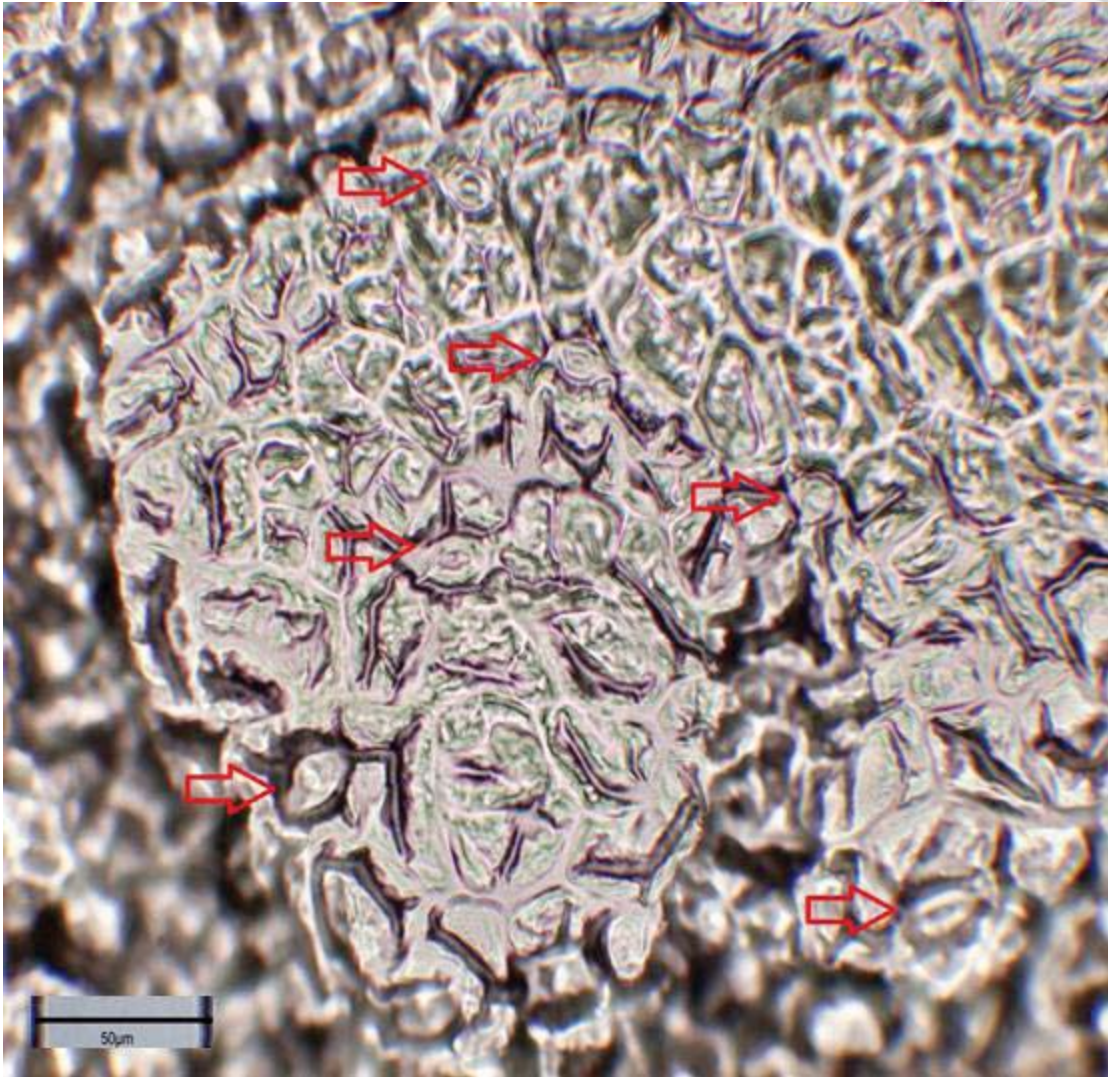


圖 19. 根部膨大幼苗的初生葉氣孔（劍號為氣孔所在）

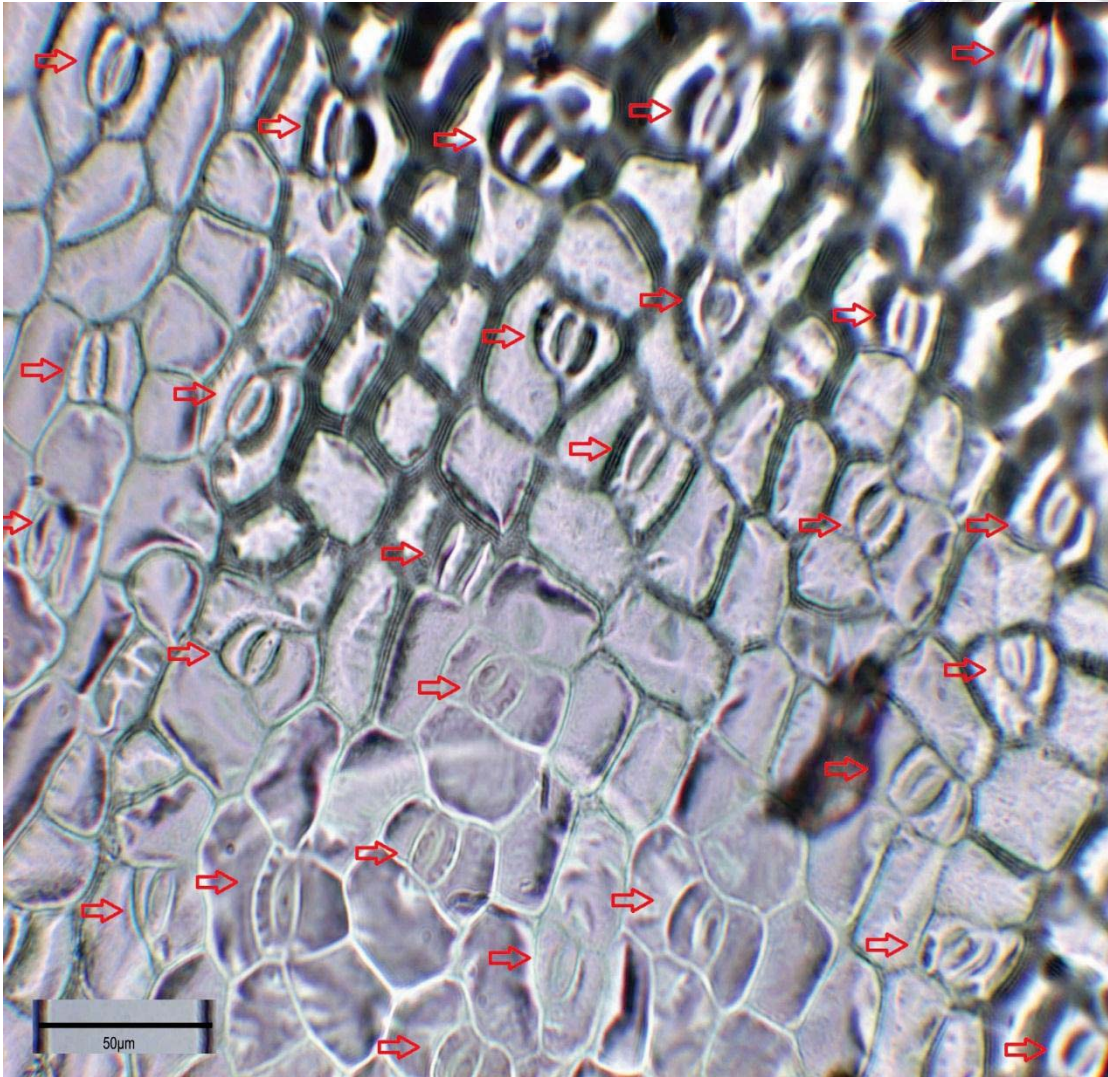


圖 20. 根部未膨大幼苗的初生葉氣孔（劍號為氣孔所在）



表 9. 各重複氣孔平均面積一覽表( $\mu\text{m}^2$ )( $t=9.676^{***}$ )

重複	二倍體	多倍體	配對差
1	165.82	184.64	18.82
2	142.98	221.48	78.50
3	148.37	204.10	55.73
4	160.27	224.87	64.60
5	166.59	206.88	40.29
6	163.36	216.54	53.18
7	161.46	222.27	60.81
8	145.40	286.72	141.32
9	145.72	206.13	60.41
10	179.69	300.92	121.23
11	107.24	154.55	47.31
12	198.43	257.93	59.50
13	155.60	198.55	42.95
14	142.16	181.53	39.37
15	224.29	314.39	90.11
16	167.17	186.53	19.36
17	150.05	229.22	79.17
18	159.94	130.07	29.87
19	140.32	257.09	116.77
20	181.53	261.67	80.14
平均	160.32	222.30	64.97





表 10. 單位面積內葉背氣孔數量 (1mm X 1mm) (t=6.254\*\*\*)

重複	二倍體	多倍體	配對差
1	191.1	67.5	123.7
2	157.4	78.7	78.7
3	281.1	56.2	224.9
4	168.6	67.5	101.2
5	281.1	67.5	213.6
6	78.7	56.2	22.5
7	123.7	56.2	67.5
8	123.7	33.7	89.9
9	112.4	67.5	45.0
10	89.9	33.7	56.2
11	78.7	67.5	11.2
12	101.2	78.7	22.5
13	78.7	56.2	22.5
14	89.9	45.0	45.0
15	78.7	22.5	56.2
16	123.7	45.0	78.7
17	134.9	22.5	112.4
18	112.4	56.2	56.2
19	112.4	56.2	56.2
20	101.2	33.7	67.5
平均	131.0	53.4	77.6



### 3. 生長

#### (1) 土壤種植

多倍體化的台灣相思樹幼苗生長速度明顯較未多倍體化的幼苗慢(圖 21)，比較同樣種植一星期者，多倍體化之幼苗根部長度平均僅 0.5cm，而二倍體幼苗的根部長度平均可達 3cm 以上；種植一年後更可發現兩者的高度具有明顯的差距，多倍體苗高僅 10cm，而二倍體則是 20cm。除了根長度與苗高之外，多倍體的子葉、假葉都有明顯的扭曲(圖 22)。此外，根部膨大的多倍體幼苗絕大多數都無法產生初生葉而提早死亡，能夠順利產生初生葉與假葉者僅 6 株，比例僅 1.64%。



圖 21. 生長一年後的多倍體幼苗(右)與二倍體幼苗(左)之比較



圖 22. 多倍體幼苗假葉有明顯的扭曲現象

## (2)無菌苗

二倍體與多倍體合計 160 株的無菌苗，總計只有二倍體 7 株以及多倍體 11 株存活，存活率甚低，二倍體存活率僅 8.75%，多倍體僅 13.75%。無菌苗與以土壤培養的幼苗相同，多倍體苗的高度明顯較二倍體苗為低，羽狀複葉的小葉與假葉面積也較小（圖 23）。最明顯的不同點在根部，二倍體苗的根系生長完整且具有大量側根，但多倍體苗的根部則極短甚至完全沒有伸長的情形（圖 24、圖 25）。





圖 23. 台灣相思樹多倍體（右）與二倍體（左）無菌苗之比較

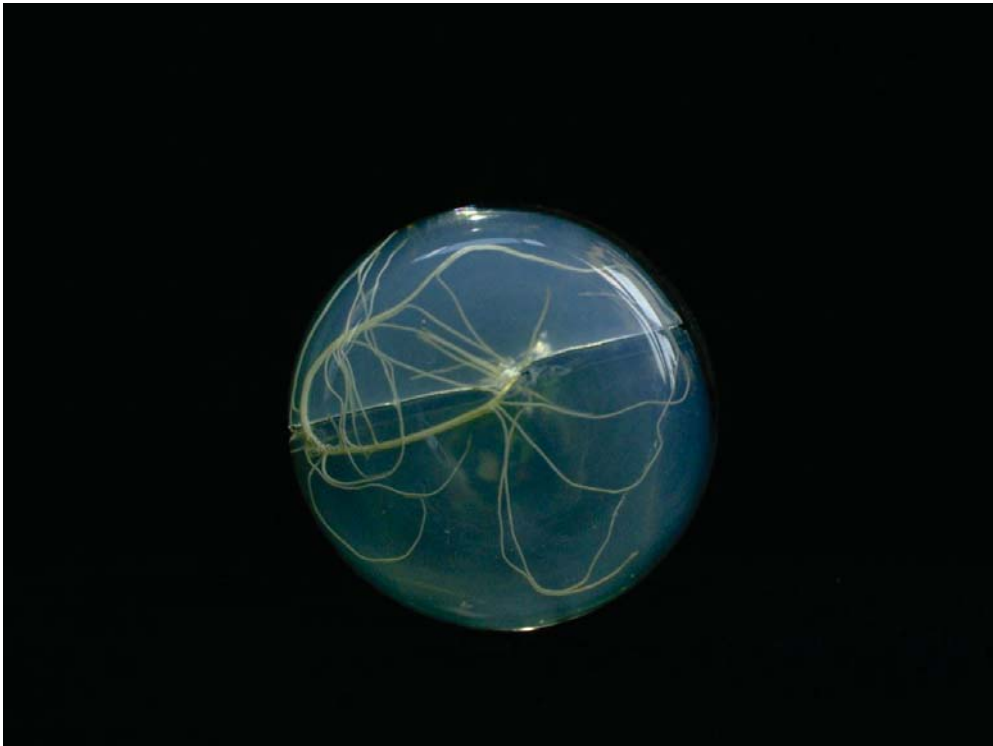


圖 24. 台灣相思樹二倍體幼苗之根系



圖 25. 台灣相思樹多倍體幼苗之根系

## 六、討論

### (一) 秋水仙素濃度和相思樹人工多倍體

Blakesley 等 (2002) 的實驗當中，僅使用 500mg/L、1000mg/L、2000mg/L、3000mg/L 的秋水仙素處理 50、75、100、150 小時，但是其多倍體發生率（與發芽的種子數量比）僅 50%-70%，且其目的僅為比較秋水仙素與毆拉靈（oryzalin）對於誘導多倍體發生的能力之差異，與本次實驗的目的不同。本研究的目的之一為尋求以秋水仙素誘導多倍體發生的最佳條件為何，因此初期便選擇以較高的重量百分率濃度 0.1%、0.5%、1%、2% 的秋水仙素浸泡處理 12、24 小時的方式，來進行多倍體誘導實驗。但是此四種濃度的發芽率與多倍體出現機率差異不大，因此加入 0.01%、0.05%、4% 三種濃度，並取消 0.5%，此時才可看出秋水仙素對種子發芽的抑制效果，以及多倍體出現機率的差異。改用上述各種濃度處理之後，出




現多倍體幼苗的機率較高，將多倍體化幼苗與全部發芽幼苗比較，最佳者可高達78.4%，且處理所需時間也較短。此外，Blakesley 等人的研究也顯示，在同樣濃度的秋水仙素處理之下，浸泡時間越長，直幹相思樹 (*Acacia mangium*) 種子產生多倍體化現象之比例越高，與本實驗的結果，即同樣濃度不同時間處理，多倍體化之比例具有顯著差異及極顯著差異相符。對於種子的存活率，Blakesley 等人並未做特別的討論，但由本研究的結果來看，秋水仙素的濃度越低，種子的存活率與發芽率也會越高。此外，可能是因為本研究當中所用的台灣相思樹種子具有過高的帶菌量，若浸泡於水或秋水仙素的時間超過48小時，則相當容易造成種子腐敗死亡。為提高種子的存活率，最好將浸泡時間限制在24小時之內。

## (二) 相思樹的人工多倍體生長

從文獻上所得的資料顯示，多倍體具有巨大化、生長迅速等特性 (王亞男和李鎮宇, 1999)，但是就實際觀察的結果，僅浸泡二次水的台灣相思樹二倍體種子大約三天至一星期就會發根，但是誘導多倍體幼苗通常需要花上大約二倍的時間，即從秋水仙素當中取出後約一至二星期，才能成功發芽。而且絕大多數的多倍體幼苗無法產生葉以及伸長的根，然而在這之中只要有幼苗產生羽狀複葉，其存活率可提升至接近百分之百，但是生長的速度也遠較二倍體植株為慢；這可能是因為染色體的倍數增加，造成與生長發育相關的基因與酶相關之生理作用發生變化，最後令幼苗的生長點受到抑制 (周媛等, 2005)，而出現生長遲滯的現象。同樣的情況也發生在其他植物的多倍體植株身上，以盾葉薯蕷 (*Dioscorea zingiberensis*) 為例，四倍體植株在外觀上與二倍體植株幾乎沒有差異，種子晚約一星期左右發芽，但是其幼苗期僅一個月，為二倍體的一半。高生長與盛花期兩者則無異，但是四倍體植株的末花期、結果期、果熟期與葉枯萎期均較二倍體植株晚兩週至一個月 (周媛等, 2005)。另外也有報導指出部分植物包括桑樹 (*Morus alba*) 和丹





參 (*Salvia miltiorrhiza*) 也有這種生長延遲的現象 (楊新華等, 2000; 艾建國和高山林, 2003)。因此推測台灣相思樹可能也屬於這類多倍體化後會導致生長延遲的植物之一, 但是木本植物的生長速度較慢, 無法以花期、果期等生理現象確定此種假說, 未來仍然需要以進行更多研究來證明。

### (三) 相思樹的染色體觀察

在採取觀察染色體所需的樣本方面, 李懋學和張贊平在 1996 年提出, 尋求樣本植物的細胞分裂高峰期, 實際上是一種沒有意義的行動。該作者認為, 植物根尖細胞的分裂並非全部都是同步進行, 在不同的個體當中又存在各式各樣的差異, 因此去尋求一個在 24 小時內固定出現的分裂高峰期在理論上或實驗上均是沒有科學證據或是受到證明的 (李懋學和張贊平, 1996)。然而實際操作的結果卻很明顯的推翻了這種說法, 以同為含羞草科的銀合歡為例, 其根尖細胞之分裂高峰期為每日的晚間 12 點 (潘富俊, 未發表)。因此本研究選擇早上 10 點、11 點、12 點以及下午 3 點進行染色體固定, 然而鏡檢時發現早上 11、12 點以及下午 3 點固定之樣本幾乎沒有染色體出現, 即此三段時間生長點幾乎不會發生分裂現象 (圖 26), 而於早上 10 點所採取之樣本則有較多的染色體 (圖 27)。顯示出植物分生組織的分裂高峰期雖然因植物而異, 但是大致上也可以找到一個共同趨勢, 以台灣相思樹而言, 早上 10 點的分裂現象顯然較本次研究所選擇的其他時間為佳, 但是真正的分裂高峰期則仍待後續研究才可確定。除此之外, 固定時的天氣也會對分生組織的活性發生影響, 一般而言, 在同樣的時間下, 晴天的活性較佳而會出現較多染色體, 陰天、雨天固定之樣本染色體則較少。

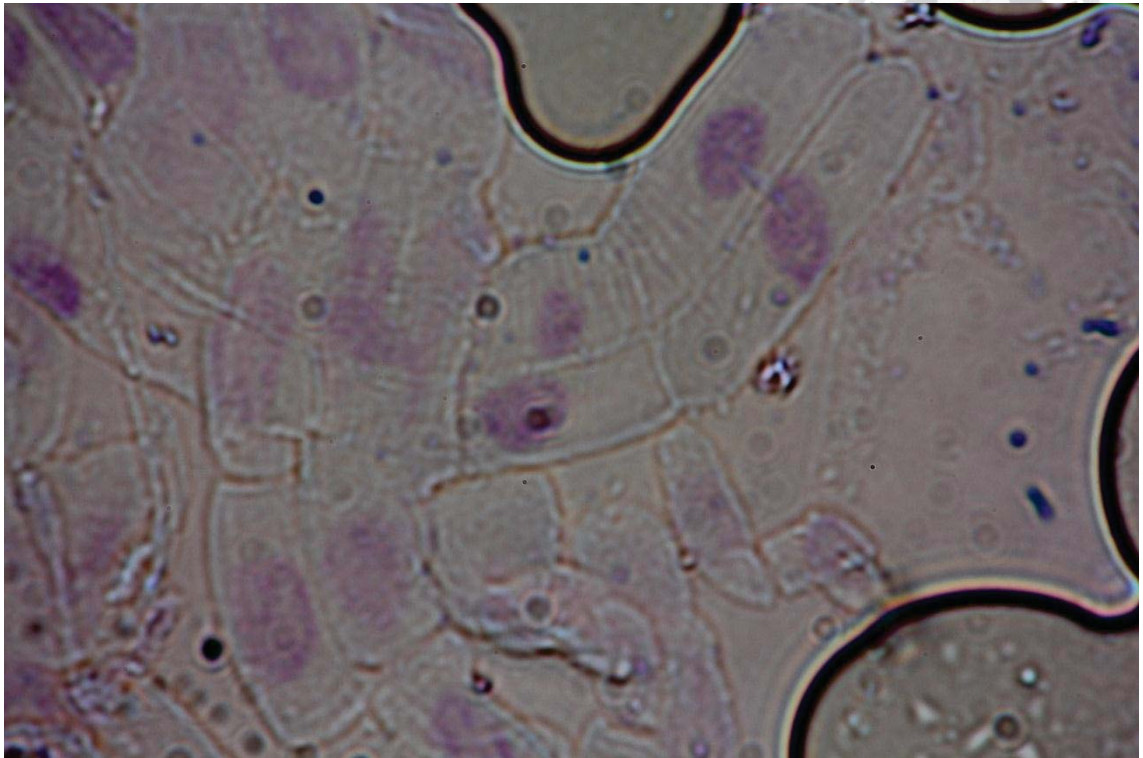


圖 26. 僅有細胞核被染色，而尚未出現染色體的細胞 (100X100)

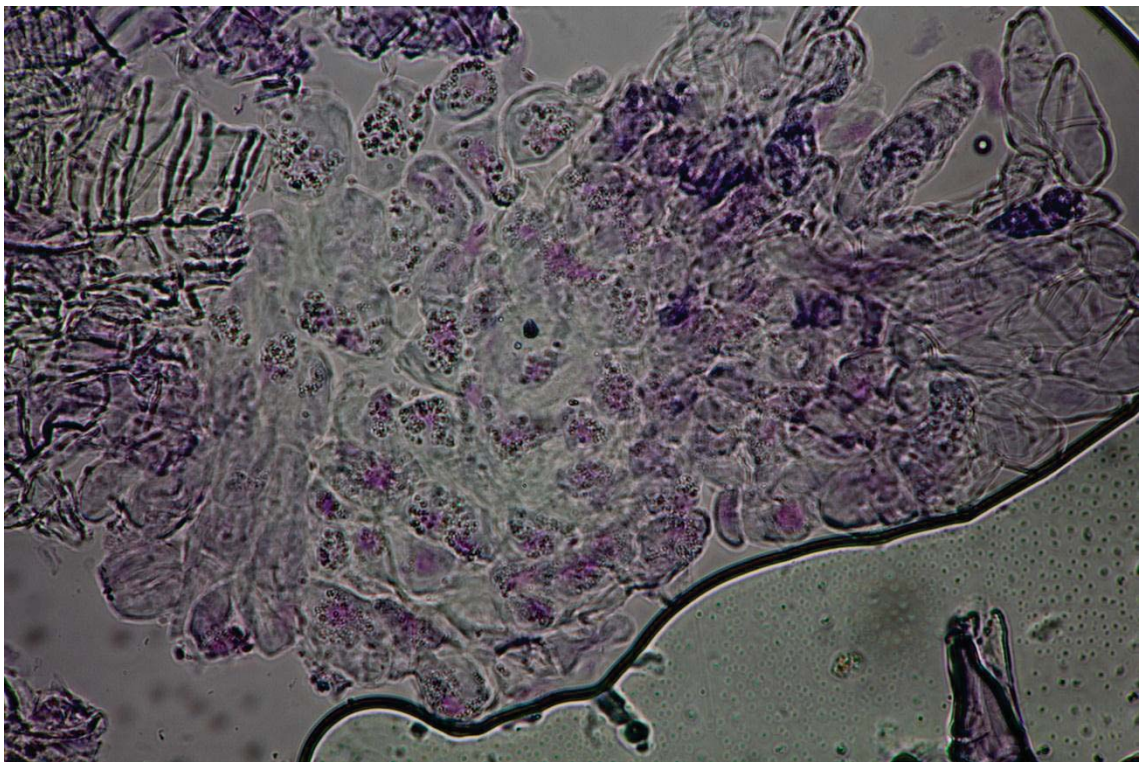


圖 27. 早上 10 點所固定之大量出現染色體的細胞群 (100X100)



除了固定時間的問題之外，在鏡檢染色體的時候，很容易將一些雜質誤認為細胞或染色體。舉例來說，同樣會被染劑染色的澱粉粒就是一種非常容易被誤認為細胞的物質（圖 28），其最大的特點就是數量非常多而且顏色比染色體與細胞核深。此外，由於染色體在固定後僅能維持大約 30min，標本之保存不易，因此多採用石蠟做半永久封片，而不用常用的 Hoyer's solution 固定，且石蠟隔絕空氣的效果比 Hoyer's solution 佳，在延長染色體標本的壽命上有較好的效果。

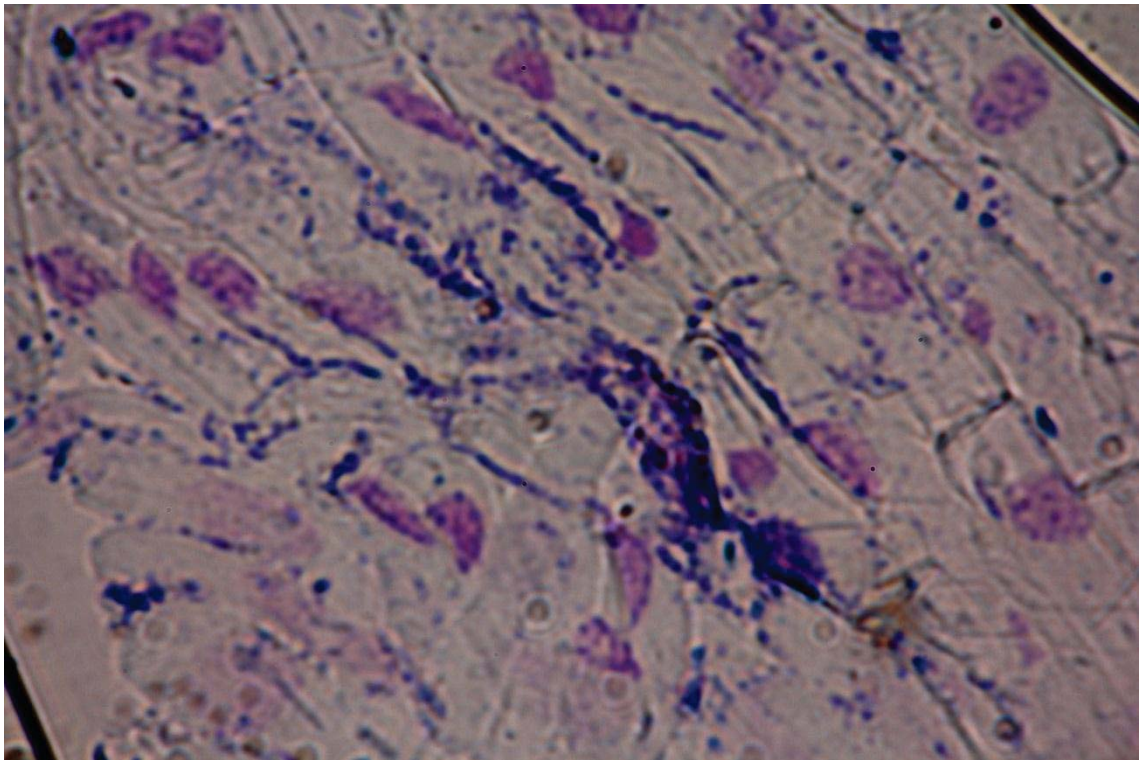


圖 28. 容易被誤認為染色體的澱粉粒等雜質（100X100）

#### （四）相思樹多倍體苗之鑑識

相思樹多倍體與二倍體幼苗的葉背氣孔數與面積，均具有顯著性差異。單位面積下的氣孔數比為 0.72:1，平均面積比則為 2.45:1，雖與 Chiba (1951) 於柳杉的四倍體與二倍體幼苗上面觀察到的氣孔數比與面積比不同，但都呈現同樣的趨勢，即多倍體之單位面積氣孔數較二倍體者少，而多倍體氣孔面積較二倍體之氣



孔大。直接觀察根尖細胞染色體，也發現根部膨大的多倍體幼苗，其染色體數較根部未膨大的二倍體幼苗多；劉禕等在 2011 年以流式細胞儀鑑定黑麥草 (*Lolium perenne*) 不同栽培種之倍性，結果顯示四倍體的峰值出現於 200 處，而二倍體則出現在 100 處。本研究分析多倍體與二倍體幼苗的假葉與胚根所得的讀數則顯示，多倍體假葉在 200 與 400 等處出現峰值，而二倍體僅在 200 處有峰值。雖然數據與文獻不同，但四倍體的峰值出現處均為二倍體出現數值的兩倍。以上結果均表示本次研究所誘導出來的幼苗確實為多倍體。

因此，藉由計算葉背氣孔數、氣孔面積、根尖細胞染色體數以及流式細胞儀分析之結果，可用來確認人工多倍體是否誘導成功，尤其在數量大或是進行組織培養時，無法以營養器官大小等明顯特徵判斷植株是否為多倍體的時候。

#### (五) 台灣相思樹的多倍體育種

在實驗過程當中，僅有少數發生多倍體化現象的台灣相思樹幼苗成功長出幼葉甚至假葉，而在這之中也僅有極少數的幼苗在幼葉、假葉出現多倍體幼苗特有的扭曲、畸形的現象，其餘的幼苗則疑似發生多倍體細胞遭到二倍體細胞「淹沒」、「取代」的情形 (匡全等, 2004)，最終無論是形態或是生長速度均近似於未處理植株。此外，由流式細胞儀分析多倍體植株假葉所得的峰值也顯示，在同一植株的假葉上，除了佔多數的二倍體與四倍體的細胞之外，也有少數六倍體與八倍體的反應，而呈現混倍體的現象。由此可見，以人工方式誘導的多倍體在生理上相當不穩定，而且染色體倍數也可能產生同樣一株幼苗的細胞同時具有二、三、四甚至更多倍數染色體的混倍體現象 (Blakesley, *et al.*, 2002; 匡全等, 2004; 周媛等, 2005)。因此為求植株染色體倍數的穩定性以及大量生產所需，未來可能需要以其他方式，例如以秋水仙素處理組織培養產生的培植體，或是利用組織培養的



方式培養產生多倍體化現象的幼苗，以提升倍數化之穩定性，並減少因為生長點抑制造成的影響，以做為未來進行台灣相思樹人工誘導多倍體方法以及提升誘導、育種以及種植效率的參考。

#### (六) 台灣相思樹多倍體的生長觀察

在實驗的過程中，所種植的幼苗曾樣本有一段時間發生水分逆境，此時發現多倍體幼苗的存活情況較同齡的二倍體幼苗佳，且較不容易產生因為缺水而出現的假葉下垂、落葉等現象，顯示多倍體在對水分逆境的耐受度上似乎比二倍體強。然而此假設未來仍然需要經由實驗的方式，例如監測水分逆境下的細胞膜油脂特性，來探討多倍體的抗逆境能力是否確實較二倍體來得好。

綜合以上，以浸泡秋水仙素處理所誘導之台灣相思樹多倍體幼苗，具有巨大化的根部，但是生長點因為生理上的不正常而遭到抑制，造成其發芽速度與生長速度均較同時種植的二倍體幼苗來得慢，存活率亦低，但是只要正常長出羽狀複葉者通常可正常成長。也有不少多倍體植株的多倍體細胞會遭到二倍體細胞取代而變回正常的二倍體幼苗。將在水中浸泡 24 小時的台灣相思樹種子以 1%秋水仙素浸泡 12 至 24 小時之後，產生多倍體的效果最好，與其他處理方式具有顯著性差異。本研究所產生的多倍體幼苗，由根尖生長點染色體數、固定面積氣孔數、氣孔面積等特性判斷，以四倍體為主。但是生長一段時間後，則有部分出現二倍體細胞將多倍體細胞「取代」之後，造成的混倍體現象。

## 七、結論

以秋水仙素所誘導之台灣相思樹多倍體，可以利用初生根部有無膨大，作為初期鑑定的方式，也可以利用直接觀察根尖等生長點染色體數量、流式細胞儀、



或是觀察葉背氣孔數量與大小等方式，進行多倍體之鑑定。多倍體化的幼苗，具有根部膨大、生長較慢、假葉扭曲、單位面積氣孔數量較少、保衛細胞大小較大等特性，因此可以將這些特徵作為判斷有無產生多倍體現象的標準。

在誘導多倍體的機率方面，無論是計算所有種子與發生多倍體現象的種子數量比或發芽種子與發生多倍體現象的種子數量比，均以體積百分率濃度 1% 的秋水仙素浸泡 12 至 24 小時的效率最佳。然而秋水仙素除了影響台灣相思樹種子的染色體倍數之外，由於其生物毒性強烈之故，也會造成種子的發芽率下降，其對種子發芽率的負面影響會隨秋水仙素濃度的提升而提升。

由於人工誘導多倍體不像天然產生的多倍體，其具有生長點受抑制、多倍體細胞會被二倍體細胞取代等特性，造成成苗率低、不穩定且生長遲緩的問題，由流式細胞儀分析生長半年的植株所採取的假葉的結果也顯示，多倍體植株大部分的細胞已經被生長速度較快的二倍體細胞所取代。未來若需要大量生產多倍體植株，可能需要以其他技術，如組織培養等方式進行輔助，或是採用其他誘導方式，如以秋水仙素誘導培植體，以求增加多倍體植株的成苗率以及存活率。

## 八、參考文獻

- 王亞男、李鎮宇（1999）突變育種。林木遺傳與育種學。國立編譯館。 pp.223-244。
- 王學文、崔克明（2000）馬占相思的樹齡與倍性對纖維性狀的影響。林業科學。 36(1):125-130。
- 艾建國、高山林（2003）丹參同源四倍體的誘導、鑑定及有效成分含量分析。藥用生物技術。 10(6):372-376。
- 匡全、梁國魯、郭啟高、李曉林（2004）秋水仙素誘導牛蒡多倍體。植物生理





- 學通訊。 40(2):157-158。
- 李云、馮大領 (2005) 木本植物多倍體育種研究進展。植物學通報。 22(3):375-382。
- 李涵、鄭思鄉、李枝林、余朝秀 (2004) 齒瓣石斛多倍體育種研究初報。園藝園林科學。 20(4):198-199
- 李淑玲、戴豐瑞 (1995) 林木良種繁育學。河南科學技術出版社。 pp.99-111。
- 李學勇 (1974) 促進相思樹種子發芽的方法。中華林學季刊。 7(1):11-23
- 李懋學、張贊平 (1996) 作物染色體及其研究技術。中國農業出版社。 pp.31-32。
- 林務局造林組 (1976) 本省主要造林樹種簡介——相思樹。台灣林業。 2(3):31-33
- 林務局 (1995) 第三次台灣森林資源及土地利用調查報告。台灣省農林廳林務局。 pp.64-92
- 周媛、胡春根、時光、姚家玲 (2005) 四倍體盾葉薯蕷生物學特性的研究。武漢植物學研究。 23(4):258-362。
- 南京林產工業學院主編 (1980) 樹木遺傳育種學。北京，科學出版社。 pp.158-172。
- 殷艾華 (2004) 豆科樹種染色體及凝集素與結瘤關係的初步研究。南京林業大學碩士論文。 pp.34-36。
- 張上鎮 (2009) 相思花茶也能抗氧化。台灣林業。 35(4):3-5。
- 黃三光、曾經洲 (2001) 基因改造作物的優勢與潛藏危機。行政院農委會農業藥物毒物試驗所技術專刊。 110:1-11
- 賈士榮、金芫軍 (2003) 國際轉基因作物的安全性爭論。農業生物技術學報。 11(1):1-5。
- 楊新華、楊今后、駱承軍 (2000) 桑樹多倍體育種的回顧與展望。浙江農業科學。 6:304-307。



- 蔡旭 (1988) 植物遺傳育種學。北京，科學出版社。 pp. 611-624。
- 鄭思鄉、吳福川、謝世清、李涵 (2005) 小花盾葉薯蕷多倍體誘導及細胞學初步研究。西南農業學報。 18(6):822-824。
- 劉禕、劉爭輝、何旭、Dragovich A. Yu、楊起簡 (2011) 利用流式細胞儀鑒定黑麥草倍性方法的研究。中國農學通報。27(9):212-215。
- 潘富俊 (未發表) 銀合歡的人工多倍體研究。
- 郭寶章 (1989) 育林學各論。國立編譯館。 pp.226-243。
- 劉宣誠 (1976) 林業試研統計。台灣省林業試驗所。 pp.181-182。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1994) 台灣樹木誌。國立中興大學。 pp.195-198。
- Atchison, E. (1948) Studies in the Leguminosae. II Cytogeography of *Acacia* (Tourn.) L. Amer. Jour. Bot. 35(10):651-656.
- Baker, E. W. and G. W. Wharton. (1922) An Introduction to Acarology. The Macmillan Company, New York.
- Blakesley, D., A. Allen, T. K. Pellny and A. V. Roberts. (2002) Natural and Induced Polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. Annals of Botany 90:391-398.
- Burleigh J.G., M.S. Bansal, A. Wehe and O. Eulenstein. (2009) Locating large-scale gene duplication events through reconciled trees: implications for identifying ancient polyploidy events in plants. Journal of Computational Biology. 16(8):1071-1083.
- Chiba, S. (1951) Triploids and Tetraploids of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) selected in the Forest Nursery. 林業試驗場研究報告 49:99-109.
- Chung, S. W., T. C. Hsu, C. I Peng. (2010) *Phacellanthus* (Orobanchaceae), a newly recorded genus in Taiwan. Botanical Studies. 51: 531-536.
- Darzynkiewicz *et al.* (1994). Flow Cytometry, 2ndEd. Academic Press.



EPA. (2006) Reregistration Eligibility Decision for Alkyl Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride (ADBAC). From [http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDS/adbac\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDS/adbac_red.pdf)

Federov, A. (ed.). (1969) Chromosome Numbers of Flowering Plants. Reprint by Otto Koeltz Science. Publishers D-624 Koenigstein. West Germany. 1974. pp.278-279

Givan, A. L. (2001). Flow Cytometry: First Principles 2ndEd. Wiley-Liss.

Grant, V. (1981) Plant Speciation Second Edition. Columbia University. pp.283-297

Kiellander, J.P. (1950) Polyploid in *Picea abies*. *Heredities*. 36:513-516.

Morikawa, T. and M. Nishihara. (2009) Genomic and polyploid evolution in genus *Avena* as revealed by RFLPs of repeated DNA sequences. *Genes Genet. Syst.* 84:199-208.

Muntzing, H.J. (1936) The evolutionary significance of autopolyploidy. *Heredities*. 21:263-378.

Ormerod, M. G. (2000). Flow Cytometry, 3rdEd. Oxford University Press.

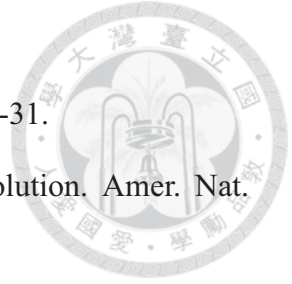
Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, H. S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R. W. Dorge, V. Colot and R. A. Martienssen. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *TRENDS in Genetics*. 19(3):141-147.

Raven, P. H., R. F. Evert, S. E. Eichhorn. (1999) *Biology of Plants* 6<sup>th</sup> ED. W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A. pp. 157-158.

Sharma, H. C. 1982. A technique for somatic counts from root tips of cereal seedlings raised by embryo culture. *Current Science* 51: 143-144.

Saylor, L. C., Simons H. A. (1970) *Cytologia*. 35:294-303.

Shapiro, H.M. (1995). *Practical Flow Cytometry*, 3rdEd. Wiley-Liss.



Smith, L. (1947) The acetocarmine smear technic. *Stain Tech.* 22:17-31.

Stebbins, G.L. (1940) The significance of polyploidy in plant evolution. *Amer. Nat.* 74:54-66.

Stebbins, G.L. (1942) Polyploid complexes in relation to ecology and the history of floras, *Amer. Nat.* 76:36-45.

Ware, G. W. (2000) *The Pesticide Book*. Thomson Publications. pp.169.

Wood, T.E., N. Takebayashi, M.S. Barker, I. Mayrose, P.B. Greenspoon, and L.H. Rieseberg. (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *PNAS.* 106(33):13875-13879.



## 附錄一

改良苯酚品紅染色液配方

A 液-- 3g 鹼性品紅 Fuchsine Basic\*1(有毒) / 100ml 70%酒精

B 液-- 取出 10ml A 液+ 90ml 5%苯酚水溶液 phenol\*2

C 液-- 取出 45ml B 液+ 6ml 冰醋酸\*3 + 6ml 37%福馬林\*4

D 液(改良苯酚品紅染色液)-- 取出 10ml C 液+ 90ml 45%冰醋酸+ 1g 山梨醇





## 附錄二

### MS MEDIUM (Murashige and Skoog MEDIUM) 配方

Macronutrients	Stock(g/L)	Stock No.	Working Solution(mg/L)	倍數
KNO <sub>3</sub>	95			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5	MS6-1	20	50
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	22			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37	MS6-2	10	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17	MS6-3	10	100
Micronutrients				
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.73			
Na <sub>2</sub> -EDTA	2.78	MS6-4	10	100
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0025			
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0025			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62			
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.23			
(MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	(1.69)	MS6-5	10	100
KI	0.083			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.86			
Organic				
Pyridoxine-HCl	0.05			
Nicotinic acid	0.05			
Thiamin HCl	0.01	MS6-6	10	100
Glycine	0.2			
My-inositol	0.1(g/L)			
Sucrose	30(g/L)			
pH	5.7			
agar	8(g/L)			
Na <sub>2</sub> EDTA: C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> * 2H <sub>2</sub> O				