

利用多倍體化及雜交親本篩選改進藍紫色蝴蝶蘭育種研究

曹進義¹ 陳威臣¹ 吳容儀² 吳姿穎³ 夏奇鈺^{4,*}

摘要

曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鈺。2020。利用多倍體化及雜交親本篩選改進藍紫色蝴蝶蘭育種研究。台灣農業研究 69(2):154–168。

本研究分析蝴蝶蘭花瓣組織之酸鹼值 (pH)，並據此篩選作為藍紫色蝴蝶蘭育種之雜交親本。此外，並以秋水仙素誘導藍紫色蝴蝶蘭種原之多倍體化，擴大藍紫色蝴蝶蘭種原在育種上之應用。以 0.1 mM 秋水仙素浸漬處理藍紫色蝴蝶蘭原生種 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*、*Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 及藍紫色蝴蝶蘭栽培種 *Phalaenopsis Siam Treasure* 無菌播種發芽後約 6 wk 齡原球體 (protocorm) 8 d，進行多倍體誘導。結果顯示，3 種材料之原球體存活率在 59.2–85.0% 之間，4 倍體誘導率為 27.3–32.9%。比較秋水仙素誘導所得之 4 倍體與 2 倍體植株的園藝性狀，顯示 4 倍體植株之花朵質地較硬實，且 *P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 之 4 倍體花朵具較大花徑，4 倍體 *P. Siam Treasure* 的花徑雖未明顯增大，但其花梗較粗短與 2 倍體有明顯差異。4 倍體之雜交親和性，則需進一步測試。花瓣 pH 檢測結果顯示，藍紫色蝴蝶蘭花瓣組織之平均 pH 值在 5.22–5.42 之間，明顯較其他色系為高。篩選花瓣組織 pH 值 (5.33–5.38) 偏高之品種作為雜交親本與藍紫色蝴蝶蘭進行雜交，後裔中表現藍紫色花之比率約為 0.2–62.0%，較逢機選擇之親本明顯有較高之藍紫色表現比例，具有應用於藍紫色蝴蝶蘭育種改進之潛力。

關鍵詞：藍紫色蝴蝶蘭、矢車菊素、秋水仙素、倍體數、流式細胞儀。

前言

蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 因外型優美、花色變化豐富及觀賞期長等優點，深受國內消費者的喜愛，在國際花卉市場亦極具競爭力，是台灣重要外銷花卉之一。台灣為蝴蝶蘭原生種分布的最北界限，亦為重要蝴蝶蘭種原台灣阿嬾 (*Phalaenopsis aphrodite*) 與姬蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris*) 之原生地 (Christenson 2001)。台灣蝴蝶蘭在種原與產業方面具有優勢，多年來藉由雜交育種與組織培養技術，已培育出各種色系的蝴蝶蘭品種，然而在某些特定色系新品種的育成上仍難以突破。其中，以藍紫色系蝴蝶蘭的育成尤其困難，係蝴蝶蘭

育種者與產業都亟欲開發與突破之目標 (Tsao 2013)。為滿足消費者之需求，市面上遂出現藉由人工染色方式生產之藍紫色蝴蝶蘭商品 (Wang 2015)。除此之外，Mii (2014) 利用基因轉殖方式將鴨跖草 (*Commelina communis*) 花朵之藍色基因導入蝴蝶蘭，成功使蝴蝶蘭花朵表現出藍色花色，但至今尚未見到基改蝴蝶蘭的上市。藍紫色蝴蝶蘭目前仍缺乏具有良好園藝性狀 (如無法調控花期、花徑小與花型不佳、花梗直立與過長、花朵壽命短等)，並具可涼溫調控花期特性之優良商業品種，同時亦缺乏後裔可表現藍紫色之種原作為親本來進行育種改進，短時間內仍難育成園藝性狀達到當前商業生產要求之品種。惟因藍紫色蝴蝶蘭的

投稿日期：2019 年 8 月 8 日；接受日期：2020 年 1 月 30 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所花卉研究中心助理研究員。台灣 雲林縣。

³ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

稀有性，育種者遂採用各種方法，如利用藍色大花萬代蘭 (*Vanda John De Biase*)、立梗藍色狐狸尾蘭 (*Rhynchostylis coelestis* fma. *coerulea*) 及蝴蝶蘭進行屬間雜交來獲得藍紫色花之後裔 (Wu *et al.* 2016)。然這些異屬雜交之後裔，因生長習性幼年期較長及園藝性狀等因素考量，亦無法符合商業生產的要求。

在蝴蝶蘭花色中，所謂的藍紫色是指包括藍、紫、靛 (indigo)、紫中帶藍、藍中帶紫及紫藍色 (violet-blue) 等色系之描述 (Tsao 2013; Liang 2017)。在蝴蝶蘭原生種中，如 *Phalaenopsis bellina*、*Phalaenopsis corningiana*、*Phalaenopsis equestris*、*Phalaenopsis javanica*、*Phalaenopsis lowii*、*Phalaenopsis lueddemanniana*、*Phalaenopsis modesta*、*Phalaenopsis pulcherrima*、*Phalaenopsis tetraspis*、*Phalaenopsis violacea*、*Phalaenopsis willsonii* 皆已發現具有藍紫色之突變種，這些突變種通常是由正常的粉紅色及紅色突變為藍紫色。此外，觀察上述原生種在台灣環境條件的開花習性，除 *P. lueddemanniana*、*P. tetraspis*、*Phalaenopsis speciosa* 可於冷涼之冬季抽梗之外，其他原生種皆為夏、秋高溫季節抽梗開花之類型，亦即上述這些原生種大都未具備涼溫催梗之商業生產特性。又觀察目前藍紫色蝴蝶蘭品種 (系) 之雜交譜系，以 *P. pulcherrima* 作為親本者占有極高的比例，這些雜交種的園藝性狀大都有花徑小與花形不佳、花梗直立與過長、單花壽命短、邊開邊凋謝、花朵褪色及葉片肥厚革質等缺點，因此市場接受度低。

根據研究顯示，藍紫色花朵之花色表現主要是受到花色素結構、液胞酸鹼值及金屬離子等因子影響 (Wu 2000; Honda & Saito 2002; Liang 2017)。Griesbach (2005) 指出藍紫色蝴蝶蘭的花色表現是由調控液胞酸鹼值之基因突變所造成，花瓣細胞之酸鹼值由正常顯性紅色之 pH 5.0 突變成為隱性藍紫色之 pH 5.8。Liang (2017) 的研究則推測，諸多因子如液胞中的酸化不足、鋁離子含量較高、鈣離子及鐵離子及這些金屬離子與花青素的莫耳數比等因素，皆可能是造成紫藍花色蝴蝶蘭的原因，與其他花卉之藍色花色單純由於藍色基因 (fla-

vonoid 3', 5'-hydroxylase; F3', 5'H) 生合成之飛燕草素 (delphinidin) 的累積所致有所不同。因此，以傳統育種方式將藍紫色原生種與其他色系的商業品種蝴蝶蘭雜交，後裔大都表現出紫紅花色，難以見到藍紫花的出現。顯示與藍紫色蝴蝶蘭雜交之其他色系蝴蝶蘭，必須具備某些特質，方能在與藍紫色蝴蝶蘭雜交後讓其後裔花朵呈現藍紫色，也是本文研究想要探討之課題。

本研究首先分析藍紫色蝴蝶蘭之色素為何種成分，並探討以蝴蝶蘭花瓣組織之酸鹼值篩選親本之可行性。此外，另利用秋水仙素誘導藍紫色蝴蝶蘭種原多倍體化，藉此擴大藍紫色蝴蝶蘭種原之可利用性與改善其雜交親和性。期望藉由上述方法，能提高藍紫色種原之利用性，以及雜交後裔藍紫色花表現比率，同時改善藍紫色花系蝴蝶蘭園藝與開花特性之目的。

材料與方法

藍紫色花朵色素萃取與分析

分別選取花色淺藍紫色花與深藍紫色花之蝴蝶蘭原生種 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' 及 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo' (圖 1) 完全展開 3 d 之整朵花，進行冷凍乾燥後置入研鉢，並添加液態氮研磨成粉末狀。取 0.02 g 粉末加入含有 1% 鹽酸的甲醇進行花青素萃取，萃取至上清液無顏色為止，將萃取液以真空濃縮機 (Thermo SPD111V, Waltham, MA, USA) 濃縮定量至 1 mL。取 0.5 mL 萃取液加入 0.25 mL 2.4 N 鹽酸均勻混合，在 100°C 下進行酸化 40 min。酸化後濃縮至 0.5 mL，並以 0.45 μ M 過濾膜過濾，以濾液進行高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析花青素之種類及含量。HPLC (Waters 2695, Waters 2996, Milford, MA, USA) 分析條件移動相為水：醋酸：甲醇 = 69：10：21，流速 1 mL min⁻¹，分析管柱為 octadecylsilica (ODS) column (Inertsil ODS-3 column, 4.6 mm × 250.0 mm, 5 μ m; precolumn: Inertsil ODS-3 column, 4.6 mm × 33.0 mm, 5 μ m, GL Sciences, Tokyo, Japan)。

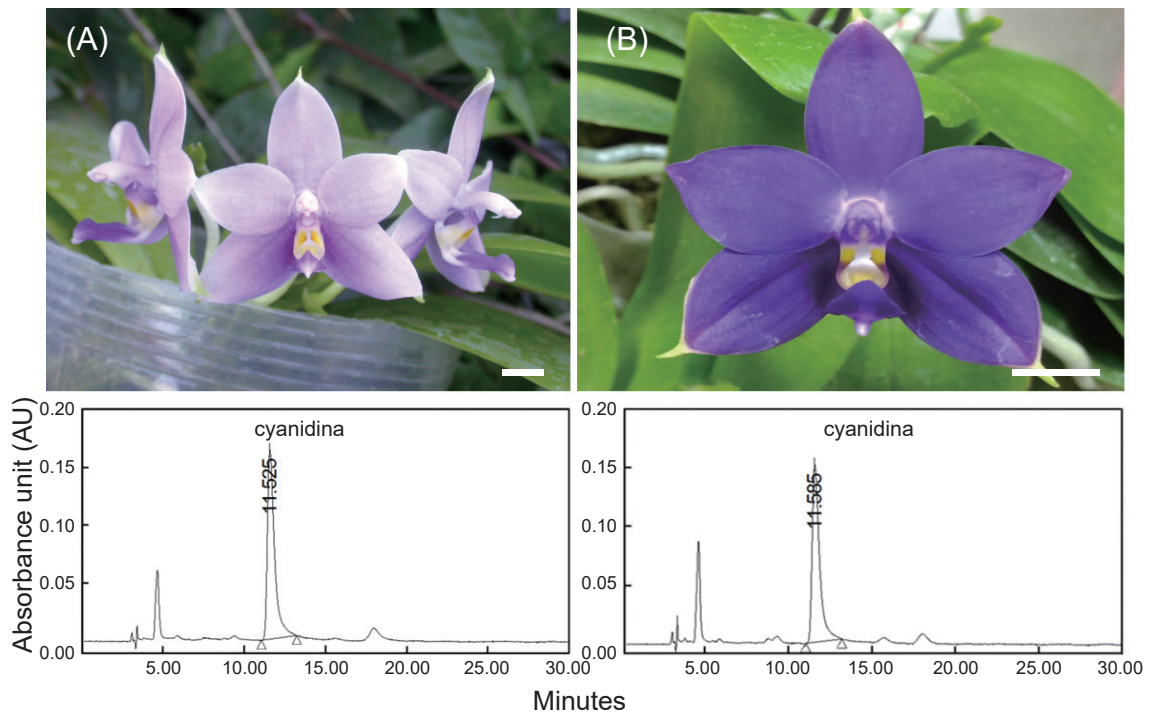


圖 1. 以高效液層分析儀 (HPLC) 分析淺藍紫色與深藍紫色蝴蝶蘭原生種 (A) *Phalaenopsis violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' 及 (B) *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo' 之藍紫色成分。

Fig. 1. Anthocyanin composition of light and dark blue-purple flowers analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), (A) *P. violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' and (B) *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo'. Bars = 1 cm.

以矢車菊素 (cyanidin) 與飛燕草素 (delphinidin) (Extrasynthese, Genay Cedex, France) 之標準品製作檢量線。

無菌播種

取 3 種藍紫色蝴蝶蘭，分別為 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *Phalaenopsis* Siam Treasure 自花授粉 (約 120–180 d) 之果莢進行無菌播種，播種育苗方法參照 Tsao *et al.* (2018)。將種子均勻接種在固體培養基上並置於培養室培養，培養室培養環境為溫度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照強度為 $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 及 14 h 光週期。固體培養基以花寶 1 號 (HY-PONeX No. 1. N : P : K = 7 : 6 : 19) 為基本鹽類，添加 1 g L^{-1} Peptone、1% 蔗糖、 2 g L^{-1} 活性碳、 25 g L^{-1} 香蕉、 50 g L^{-1} 馬鈴薯以及 8 g L^{-1} Bacto Agar (Difco, Detroit, MI, USA)。固體培養容器為直徑 90 mm、高度 15 mm 的

培養皿，每皿置 25 mL 培養基。

秋水仙素誘導多倍體化

以 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *P. Siam Treasure* 無菌播種 6 wk 後，大小約 1.5 mm 之原球體 (protocorm) 為培植體。經刻傷處理後 (以解剖刀切割原球體邊緣一刀)，置入含有 0.1 mM 秋水仙素之培養液中浸漬處理 8 d。原球體在處理期間於避光環境下，以 50 rpm 轉速進行震盪培養 (Griesbach 1981)；浸漬處理後之原球體以無菌水清洗 3 次，將原球體接種於不含秋水仙素之無菌播種培養基中。其中，培養 *P. equestris* 原球體之培養基未添加活性碳，其餘培養基及處理方法皆參照 Tsao *et al.* (2018)。每一種與栽培種接種 3 皿，每皿接種 30 個原球體，並於接種 4 wk 後調查存活率。

染色體倍體數之流式細胞儀分析

參考 Hsia *et al.* (2010) 的分析方法，切取培植體長出大小約 0.3–0.5 cm² 幼嫩葉片，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Münster, Germany)，以刀片將葉片組織切碎後過濾，再於濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B。靜置染色 3 min 後，以流式細胞儀 (Partec PA, Münster, Germany) 檢測，每種藍紫色蝴蝶蘭每皿逢機檢測 30 個樣品 (含原球體分裂增生之培植體樣品)。每個培植體樣品同一位葉取樣檢測 2 次確認倍體數，檢測之細胞數為 5,000 個。

根尖染色體染色分析

於中午 11:30–12:30 期間，切取經流式細胞儀檢測為 2 倍體 (對照組) 與多倍體之藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. bellina* fma. *coerulea* 瓶苗之根尖，進行染色體分析。根尖染色體分析方法參照 Tsao *et al.* (2018) 進行。取幼嫩根尖浸於 0.002 M 8-HQ (8-hydroxyquinoline) 於黑暗環境下處理 3–4 h，以無菌水清洗 3 次，之後以 Farmar's solution (95% alcohol : acetic acid = 3 : 1) (新鮮配製) 固定液浸泡 24–48 h，接著用無菌水清洗，之後置入 70% 酒精並放置於 4°C 冰箱中保存備用。觀察時先以無菌水將樣品清洗數次後，置於酵素溶液中 (6% pectinase 及 6% cellulose 溶於 75 mM KCl, pH 4)，於 37°C 下作用 1 h 後，取出以無菌水清洗數次。然後夾取適量經酵素軟化後的根尖置於載玻片上，加入 lacto-propionic-orcein 染劑，輕壓使染色體均勻分布後，夾出不要的組織碎片，蓋上蓋玻片染色數分鐘後，於酒精燈上迅速過火使細胞膨大，以手掌壓片後，於光學顯微鏡下觀察並照相記錄。

花朵及植株性狀調查

將 2 倍體與秋水仙素誘導所得之 4 倍體瓶苗出瓶，栽培於行政院農業委員會農業試驗所生技組配備有水牆風扇之溫室，約 15 mo 後，取同季節 (夏季) 第一次開花之 2 倍體與 4 倍體植株各 5 株，進行花朵及植株性狀調查。

花瓣組織 pH 檢測

收集各種大小花徑及顏色之花，如藍紫、白、粉紅、深紅、黃綠、黑花 (harlequin)、綠花紅斑等花色，共 118 個蝴蝶蘭品種 (系)，並依其花瓣質地分為蠟質與非蠟質。花瓣組織 pH 檢測參考 Griesbach (2005) 方法並稍作修正。每個蝴蝶蘭品種 (系) 皆以取自 3 個不同著花位置完全展開第一天之花朵為材料，以刀片或鑷子撕或刮取花瓣之上表皮。使用 S40 SevenMulti™ pH 表面酸鹼度檢測儀 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) 搭配 In-Lab Surface pH 複合液體補充型電極 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)，以電極直接測定花瓣上表皮組織之酸鹼值，並以相同方法檢測雜交後代花瓣上表皮酸鹼值。

利用花瓣 pH 值篩選之他色蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交

依據花瓣組織 pH 檢測之結果，選出呈現 pH 值較高 (pH 5.33–5.38) 之白色或其他花色蝴蝶蘭品種 (系)，並評估其遺傳背景與雜交譜系。據此，篩選出雜交親本，並與藍紫色蝴蝶蘭進行互交，調查雜交後裔花朵之藍紫色表現情形。

統計分析

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗資料先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理間差異顯著，再進行最小顯著差異性測驗 (least significant difference; LSD) 比較各處理平均值間的差異性。其中，培植體存活率與多倍體率之數據先經 \sin^{-1} 角度轉換後，再進行統計分析。各項分析工作利用 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 統計分析套裝軟體進行。

結果

藍紫色蝴蝶蘭花朵之色素成分分析

以淺藍紫色與深藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' 及 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo' 完全展開 3 d 之花朵萃取其花色素，並與矢車菊素與飛

燕草素之標準品進行比對。HPLC 分析結果顯示，上述兩原種藍紫色花之主要色素成分為矢車菊素 (圖 1)，並未檢出由藍色基因 (flavonoid 3', 5'-hydroxylase; F3', 5'H) 所生合成之飛燕草素。

以秋水仙素進行藍紫色蝴蝶蘭多倍體化誘導及倍數性分析

三種藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea*、*P. Siam Treasure* 之原球體以秋水仙素進行多倍體誘導，結果顯示以 *P. Siam Treasure* 之原球體存活率較低，為 59.2%；

P. bellina fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 之存活率較高，分別為 73.3 和 85.0% (表 1、圖 2)。在多倍體誘導率方面，依據流式細胞儀檢測結果，顯示 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *P. Siam Treasure* 之 4 倍體誘導率，分別為 27.3、31.3 及 32.9% (表 1、圖 3)。將 *P. bellina* fma. *coerulea* 流式細胞儀檢測為 4 倍體之苗株，進行根尖染色體分析，結果證實確為 4 倍體 (圖 4)，兩種檢測方法之結果相符合 (*P. equestris* fma. *coerulea* 與 *P. Siam Treasure* 未進行根尖染色體染色分

表 1. 秋水仙素 0.1 mM 處理藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*、*Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 及 *Phalaenopsis Siam Treasure* 之原球體 8 d 對多倍體誘導之影響。

Table 1. Effects of 0.1 mM colchicine for 8 d exposure on polyploidy induction using protocorms of *P. bellina* fma. *coerulea*, *P. equestris* fma. *coerulea* and *P. Siam Treasure*^z.

Species or variety	Survival rate (%) ^y	Ploidy (%) ^x	
		2x	4x
<i>P. bellina</i> fma. <i>coerulea</i>	73.3 ± 6.9 ab ^w	72.7 ± 5.3 a	27.3 ± 5.1 a
<i>P. equestris</i> fma. <i>coerulea</i>	85.0 ± 2.9 a	68.7 ± 7.6 a	31.3 ± 6.5 a
<i>P. Siam Treasure</i>	59.2 ± 6.8 c	67.1 ± 10.4 a	32.9 ± 9.1 a

^z Colchicine treatment and medium were same as Tsao *et al.* (2018). *P. equestris* fma. *coerulea* was cultured on the same medium but without charcoal. Each species and variety had 3 replications and each replication contained 30 protocorm explants.

^y Percentage of survival rate = (no. of green and protocorms/30) × 100%.

^x Percentage of ploidy = (no. of ploidy explants/30 samples were detected) × 100%.

^w Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

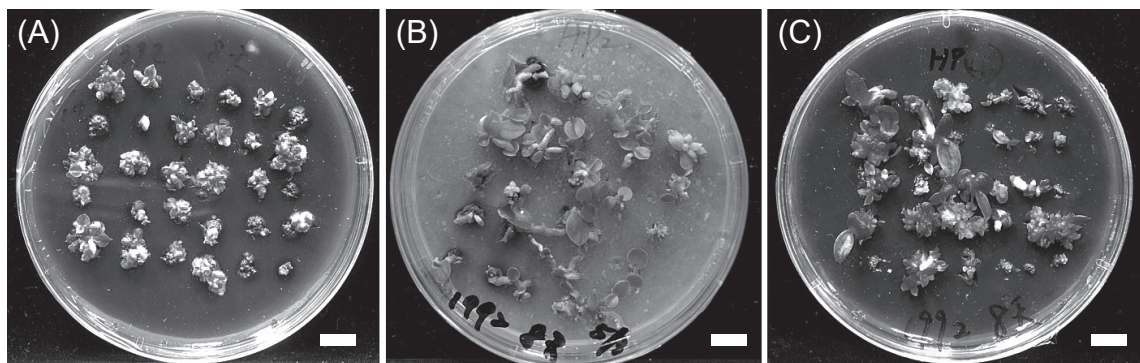


圖 2. 以 0.1 mM 秋水仙素處理藍紫色蝴蝶蘭 (A) *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*；(B) *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea*；及 (C) *Phalaenopsis Siam Treasure* 原球體 8 d 並經 8 wk 培養後之生長情形。培養基配方參照 Tsao *et al.* (2018)，其中 *P. equestris* fma. *coerulea* 接種之培養基不含活性碳。

Fig. 2. Growth of protocorms of (A) *P. bellina* fma. *coerulea*; (B) *P. equestris* fma. *coerulea*; and (C) *P. Siam Treasure* after exposure with 0.1 mM colchicine for 8 d in a liquid medium followed by 8 wk culture. Culture medium was the same as Tsao *et al.* (2018), but *P. equestris* fma. *coerulea* was cultured in the same medium without charcoal. Bars = 1 cm.

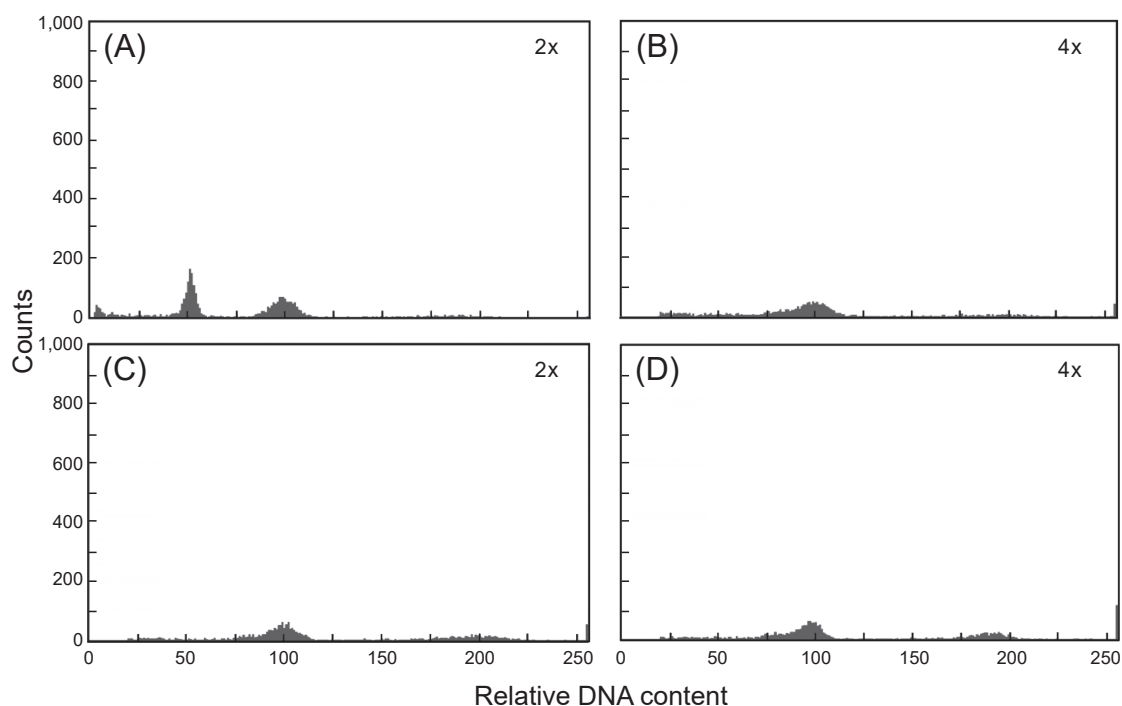


圖 3. 利用流式細胞儀分析藍紫色蝴蝶蘭 (A) *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea* 2x ; (B) *P. bellina* fma. *coerulea* 4x ; (C) *Phalaenopsis* Siam Treasure 4x ; 及 (D) *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 4x 之圖譜。

Fig. 3. Flow cytometric histograms of various ploidies of (A) *P. bellina* fma. *coerulea* 2x; (B) *P. bellina* fma. *coerulea* 4x; (C) *P. Siam Treasure* 4x; and (D) *P. equestris* fma. *coerulea* 4x plantlets.

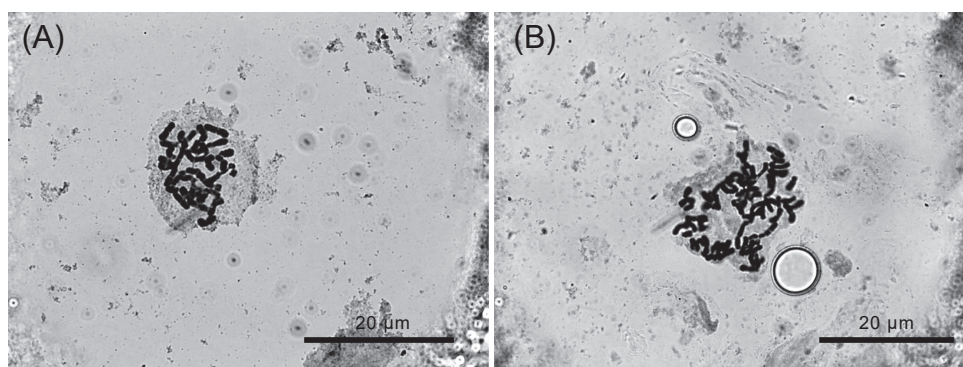


圖 4. 藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea* 之 2 倍體與 4 倍體之瓶苗根尖染色體染色分析，(A) $2n = 2x = 38$ 及 (B) $2n = 4x = 76$ 。

Fig. 4. Squash staining of chromosome using in vitro root tips of *P. bellina* fma. *coerulea*, (A) $2n = 2x = 38$ and (B) $2n = 4x = 76$.

析)。比較 4 倍體植株與對照組 (2 倍體) 植株之花朵及園藝性狀，4 倍體花朵質地較堅挺硬實。其中，*P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. eque-*

tris fma. *coerulea* 具有較大的花徑，另 4 倍體之 *P. bellina* fma. *coerulea* 葉片、小花柄、唇瓣中央裂片、蕊柱較寬，小花柄、蕊柱較長；

4 倍體之 *P. equestris* fma. *coerulea* 唇瓣中央裂片、蕊柱較寬且唇瓣中央裂片較長；而 4 倍體之 *P. Siam Treasure* 花徑雖未明顯增大，但其花梗較短且直徑較粗、葉片短，植株型態與 2 倍體植株間呈現明顯差異 (表 2、圖 5)。

不同花色蝴蝶蘭花瓣組織之酸鹼值檢測

取各種大小花徑及不同顏色 (如藍紫、白、粉紅、深紅、黃綠、黑花、綠花紅斑等) 花色總共 118 個蝴蝶蘭品種 (系)，檢測其花瓣上表皮組織之 pH 值。結果顯示，非蠟質類之藍紫色花瓣平均 pH 值為 5.22–5.27，最高可測得 pH 5.48，雖與白、深紅花瓣間之 pH 無顯著差異，但其平均仍較其他顏色花之 pH 值為高。在蠟質性花瓣類之 pH 值檢測，以藍紫色 pH 值最高，平均為 5.42，最高可測得 pH 5.54。深紅、黃綠、綠花紅斑等花色之平均 pH 值亦較高，在 5.33–5.38 之間，最高可測得 pH 5.52，顯著高於白、粉紅及黑花之 4.96–5.22 (表 3)。

以花朵 pH 值較高之他色蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交

依據花瓣組織 pH 檢測結果，挑選呈白色及其他花色花朵 pH 值較高之蝴蝶蘭品種，再根據其遺傳背景與譜系加以評估後，從中挑選出適當之親本與藍紫色蝴蝶蘭互為父母本，共進行 63 個雜交組合。其中，編號 CYT115、CYT142、CYT155 及 CYT191 之 4 個雜交組合成功獲得後代。觀察 4 個組合雜交後裔之花色表現，除了 CYT155 之雜交後裔花色皆為紅色之外，其餘 3 組合 CYT115、CYT142 及 CYT191 之雜交後裔花朵皆有藍紫色表現，其表現比率 (藍紫色花株數/後裔總株數) 分別為 0.2、61.7 及 9.8% (表 4)。其中，CYT115 之藍紫色表現在蕊柱基部周圍，花徑約 8.5 cm，可涼溫催梗；CYT142 選拔出具有圓整花型與花序排列佳之藍紫色優良單株，花徑約 4.5 cm，花期在秋季；CYT191 選拔出有雙梗特性，古銅色花瓣以及藍紫色唇瓣，並具有濃郁香氣之優良單株，花徑約 5 cm，花期在夏季 (圖 6)。

表 2. 2 倍體藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*、*Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 及 *Phalaenopsis Siam Treasure* 與其誘導所得之 4 倍體植株之園藝性狀比較。

Table 2. Comparison of horticultural traits between diploid and tetraploid plants of *P. bellina* fma. *coerulea*, *P. equestris* fma. *coerulea* and *P. Siam Treasure*^z.

Ploidy of species	Stalk length (cm)	Stalk diameter (mm)	Flower diameter (cm)	Column length (cm)	Column width (mm)	Pedicle length (cm)	Pedicle width (mm)	Apical lobe length (cm)	Apical lobe width (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)
<i>P. bellina</i> fma. <i>coerulea</i>											
2x	4.9 b ^y	3.7 a	3.9 b	1.1 b	4.1 b	3.3 b	2.5 b	1.3 a	8.0 b	9.0 a	5.1 b
4x	4.3 a	4.8 a	4.8 a	1.3 a	4.6 a	4.0 a	3.4 a	1.5 a	9.8 a	8.8 a	6.3 a
<i>P. equestris</i> fma. <i>coerulea</i>											
2x	16.0 a	2.0 a	2.0 b	0.8 a	1.9 a	2.3 a	1.4 a	0.9 b	7.0 b	10.5 a	4.1 a
4x	19.4 a	2.7 a	2.5 a	0.8 a	1.9 a	2.7 a	1.8 a	1.1 a	7.3 a	10.7 a	4.4 a
<i>P. Siam Treasure</i>											
2x	33.7 a	2.5 b	3.9 a	- ^x	-	-	-	-	-	12.2 a	4.0 a
4x	19.6 b	3.2 a	3.9 a	-	-	-	-	-	-	8.6 b	3.6 a

^z Diploid (2x) and tetraploid (4x) plants were cultivated on pad in a fan green house for 60 wk, and 5 plants from each which blooming at the first time in the same season were used for horticultural traits investigation. Stalk length did not include inflorescence length, stalk diameter was measured in the second section of stalk, and leaf length and width of the largest leaf were measured. Each horticultural traits investigation had 3 replications with 5 plants per replication.

^y Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

^x No measurement on pedicel length, pedicel width, apical lobe length, apical lobe width, column length and column width of *P. Siam Treasure*.

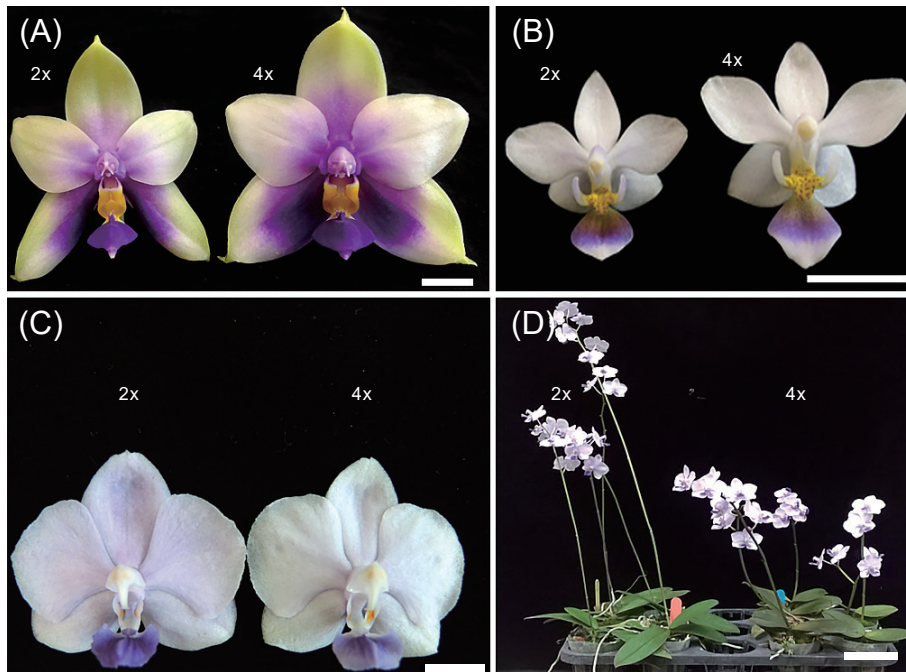


圖 5. 藍紫色蝴蝶蘭 (A) *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*; (B) *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea*; (C) *Phalaenopsis* Siam Treasure 之 2 倍體與 4 倍體花朵; 及 (D) *P. Siam Treasure* 植株形態比較。

Fig. 5. Diploid and tetraploid flowers of (A) *P. bellina* fma. *coerulea*; (B) *P. equestris* fma. *coerulea*; (C) *P. Siam Treasure*; and (D) *P. Siam Treasure* plants. (A–C), bars = 1 cm. (D), bar = 8 cm.

表 3. 不同花色與花瓣質地蝴蝶蘭之花瓣上表皮組織 pH 值。

Table 3. pH value of upper epidermis tissue of petal from various color and petal texture of *Phalaenopsis* varieties^z.

Color	Average value of pH	
	Waxy	Non-waxy
Blue-purple	5.42 ± 0.11 a ^y	5.22 ± 0.13 ab
Light blue-purple	5.41 ± 0.13 ab	5.27 ± 0.21 a
Yellow green	5.38 ± 0.14 ab	5.01 ± 0.15 c
Dark red	5.33 ± 0.08 abc	5.12 ± 0.09 abc
Green with red spot	5.33 ± 0.04 abc	- ^x
Pink	5.22 ± 0.06 bc	5.07 ± 0.07 bc
White	5.18 ± 0.18 c	5.13 ± 0.16 abc
Harlequin	4.96 ± 0.16 d	-

^z A total of 118 samples of *Phalaenopsis* varieties were detected. Samples were fully opening flower in first day taken from 3 different positions in the same stalk as samples to detect. Each detection had 3 replications.

^y Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

^x No samples were detected.

討論

根據 Katsumoto *et al.* (2007) 研究顯示，花青素之藍紫色除了由藍色基因 (F3', 5'H) 調

控所生成之飛燕草素之外，花色呈現之影響因子尚有花色素結構 (Honda & Saito 2002; Shiono *et al.* 2005; Saito *et al.* 2011; Saito *et al.* 2012)、液胞酸鹼值 (Reuveni *et al.* 2001;

表 4. 選拔之他色蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交其後裔藍紫色花表現比率。

Table 4. Percentage of blue-purple descendants from four hybridizations by crossing blue-purple varieties with selection of other colors of *Phalaenopsis* varieties as parents^z.

Hybridization code	No. of seedlings	No. of seedlings with blue-purple flower	% of blue-purple seedling
CYT115	1,105	2	0.2
CYT155	95	0	0.0
CYT142	243	150	61.7
CYT191	51	5	9.8

^z *Phalaenopsis* varieties were selected as parents based on its pH value of upper epidermis tissue from petal (5.33–5.38) to cross blue-purple *Phalaenopsis* varieties. Four success hybridizations were obtained from all 63 crossings.

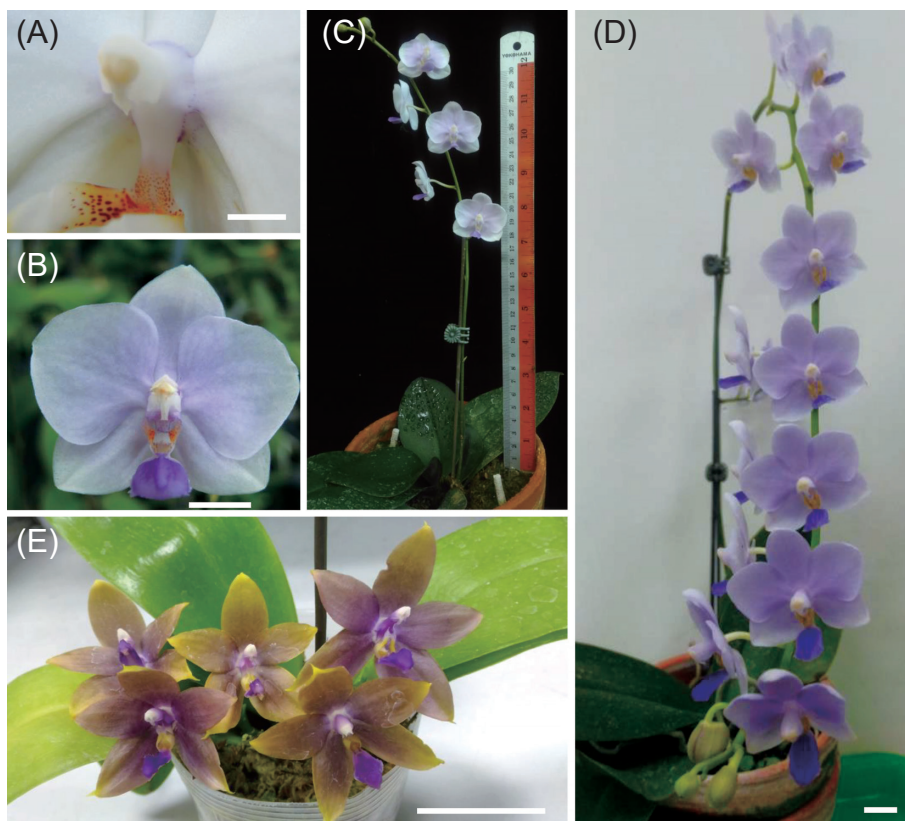


圖 6. 依據花瓣 pH 值篩選之親本與藍紫色蝴蝶蘭雜交其後裔之藍紫色花表現。(A) CYT115 選拔單株，花徑約 8.5 cm，於蕊柱基部表現藍紫色；(B–D) CYT142 選拔之不同單株，具有花形圓整與花序排列優良園藝性狀；(E) CYT191 選拔單株，具雙梗特性及濃郁香氣，花瓣古銅色並具藍紫色唇瓣之優良單株，花徑約 5 cm。

Fig. 6. Descendants of three hybridizations which use varieties of higher pH values of petal as parents to cross blue-purple varieties. (A) Seedling of CYT115 cross, flower diameter is about 8.5 cm with blue-purple color on the base of column, bar = 5 mm; (B–D) Seedlings of CYT142 cross, which with round flower and flowers arranged orderly in the inflorescence, bars = 1 cm; (E) Seedling of CYT191 cross, which with strong fragrance and double stalks. Flowers with unique copper color in the petals and blue-purple color in the lip, flower diameter is about 5 cm, bar = 4 cm.

Honda & Saito 2002; Yoshida *et al.* 2003; Griesbach 2005)、金屬離子 (Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+}) (Takeda 2006; Yoshida *et al.* 2006; Schreiber *et al.* 2010; Oyama *et al.* 2015; Liang 2017) 及金屬離子，與共色物如黃酮醇 (flavonols) 與黃酮 (flavones) 的共色作用，形成堆積的複合物 (Wu 2000; Shiono *et al.* 2005; Shoji *et al.* 2007) 等。蝴蝶蘭之藍色基因已被選殖出來，卻是來自紅色之蝴蝶蘭雜交品種 ('Super Firebird')，顯示蝴蝶蘭藍紫色表現是受到其他因子所影響，且將此蝴蝶蘭之藍色基因轉殖到矮牽牛以及百合，並未能表現出藍色之花色 (Qi *et al.* 2013)。本研究以 HPLC 分析淺藍紫色與深藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' 與 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo' (圖 1)，而 Liang (2017) 以 HPLC 分別分析紫色及紫羅蘭-藍花色之蝴蝶蘭，結果皆為以矢車菊素為基底的花青素，並未檢測出由藍色基因調控生合成之飛燕草素。根據主要色素之生合成路徑顯示，矢車菊素為經由紅色素之生合成路徑所形成 (Katsumoto *et al.* 2007)，證實蝴蝶蘭之藍紫色花色表現因受到其他因子影響而呈現出藍紫色，並非由藍色基因調控合成飛燕草素而來。

考察目前藍紫色蝴蝶蘭種原大多為 2 倍體之原生種或是一代雜交種，其花朵有壽命短、花朵質地薄、花形差、花徑小、花梗太長、軟等不良園藝性狀。考量目前蝴蝶蘭商業品種大多為 4 倍體，二者在雜交上可能會面臨親和性的問題，即使有後代產生也可能為 3 倍體，不利後續育種工作之進行 (Chen *et al.* 2009)。蝴蝶蘭可利用秋水仙素化學藥劑 (Griesbach 1981, 1985; Azmi *et al.* 2016) 或物理切割原球體 (Chen *et al.* 2009) 等方式進行多倍體化誘導，產生之 4 倍體具有改善雜交不親和性、增大花徑、改善花朵質地與花形等優點 (Griesbach 1981, 1985)，但多倍體化研究鮮少針對藍紫色之蝴蝶蘭。藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 及栽培種 *P. Siam Treasure* 之原球體培植體，其多倍體誘導之存活率與花朵園藝性

狀表現出差異性。在存活率方面，*P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 較接近 (73.3–85.0%)，而 *P. Siam Treasure* 則偏低 (59.2%)。顯示不同材料間秋水仙素處理的耐受性並不相同，且原種之存活率較栽培種為高 (表 1、圖 2)。

根據研究顯示，秋水仙素濃度與處理天數，是影響培植體存活率與多倍體誘導效率的重要因子 (Hsia *et al.* 2009, 2010; Azmi *et al.* 2016)，以 *P. Siam Treasure* 來說，需進一步調整秋水仙素處理之條件。而在多倍體誘導率方面，根據流式細胞儀檢測結果，三種材料的差異不顯著，誘導率在 27.3–32.9% 之間，且所誘導之多倍體皆為 4 倍體，並無其他倍數體產生 (圖 3)。更進一步取 4 倍體 *P. bellina* fma. *coerulea* 瓶苗之根尖進行染色體分析 (圖 4)，同樣證實其染色體數目為 4 倍體，與流式細胞儀檢測之結果相符。Tsao *et al.* (2018) 以 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 進行多倍體誘導，亦顯示流式細胞儀檢測倍體數之結果與根尖染色體分析一致，但流式細胞儀更簡單快速，有助育種大量篩選工作之進行。

根據前人研究顯示，4 倍體蝴蝶蘭之花徑較 2 倍體為大，且可改善蝴蝶蘭花朵之花形與花瓣質地 (Griesbach 1981, 1985; Chen *et al.* 2009)，但本試驗調查參試之 3 種藍紫色蝴蝶蘭 (兩原種與一栽培種) 4 倍體花朵性狀之表現，發現並非三種材料之 4 倍體皆表現出較大花徑之特性。其中，2 原種 *P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 之 4 倍體有較大花徑，顯示出物種間的表現存有差異性。此外，個別 4 倍體植株亦存有差異性，因此建議應建立足夠數量之多倍體族群，較有利於選拔優良 4 倍體單株。3 種材料之 4 倍體花瓣質地皆較 2 倍體硬實，此點與前述學者研究之結果相符。在花器組織上，*P. bellina* fma. *coerulea* 4 倍體之唇瓣中央裂片、蕊柱、小花柄以及 *P. equestris* fma. *coerulea* 之唇瓣中央裂片皆較其 2 倍體較長或寬；在葉片外型上，*P. bellina* fma. *coerulea* 4 倍體葉片較 2 倍體為寬。此外，*P. Siam Treasure* 4 倍體之花梗較粗短，葉片

較短 (表 2、圖 5)，改善了 2 倍體花梗細長、軟及葉片長等缺點。根據石斛蘭 (*Dendrobium*) 的研究顯示，4 倍體植株之花朵壽命可較 2 倍體長 (de Medeiros Vichiato *et al.* 2014)，但亦有指出 4 倍體與 2 倍體花朵壽命相同者 (de Faria *et al.* 2009)。而觀察本研究誘導 3 種藍紫色蝴蝶蘭少數已開花之 4 倍體，花朵壽命則發現同時存在與 2 倍體花朵壽命長、相同以及較短之情形 (資料未顯示)。前人研究指出，多倍體化可改善雜交不親和性 (Griesbach 1985; Adaniya & Shirai 2001)，但本研究自藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 以及 *P. Siam Treasure* 所誘導之 4 倍體，目前尚未能成功獲得自交或雜交果莢及後裔。因此，此一論點需再進行更多之雜交測試以確認 4 倍體之雜交親和性。

依據英國皇家園藝學會 (The Royal Horticultural Society; RHS) 蝴蝶蘭品種登錄資料顯示，早在西元 1963 年即有藍紫色蝴蝶蘭品種 *Phalaenopsis* Kenneth Schubert 之育種紀錄，是以 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 與 *P. violacea* fma. *coerulea* 二者雜交而來，距今已超過 55 年的時間中，卻鮮有符合商業生產要求亦即具備可涼溫催梗特性之藍紫色蝴蝶蘭新品種的出現。顯示育成具備商品化特性之藍紫色蝴蝶蘭，仍有極大的挑戰性與困難度。歸納傳統藍紫色蝴蝶蘭育種所遭遇到的瓶頸，主要可歸納出藍紫色蝴蝶蘭種原的限制、種間與屬間雜交親和性不佳及後裔難以呈現藍紫色等因素 (Tsao 2013)。觀察藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. bellina*、*P. corningiana*、*P. equestris*、*P. javanica*、*P. lowii*、*P. lueddemanniana*、*P. modesta*、*P. pulcherrima*、*P. speciosa*、*P. tetraspis*、*P. violacea*、*P. willsonii* 及其雜交後裔，共同之特性為園藝性狀不佳，且除了 *P. lueddemanniana*、*P. speciosa* 及 *P. tetraspis* 之外，其他原生種之花期皆在為夏季或近秋季，並不具備涼溫催梗之特性。要改善此缺點，必須與商業化的蝴蝶蘭品種進行雜交育種，同時改良其園藝性狀與開花習性。然而，除了藍紫色蝴蝶蘭種原開花性狀限制之外，觀察其他育種者以及作者自身實際進行藍紫色蝴蝶蘭與商

業品種蝴蝶蘭雜交育種之結果發現，這些雜交後裔花色多為紅色。因此，如何使雜交後裔花朵表現出藍紫色，推測商業品種蝴蝶蘭親本之選擇為主要影響因素。

Griesbach (2005) 檢測由紅色蝴蝶蘭原生種 *P. pulcherrima* 而來之藍紫色突變種花瓣組織之 pH 值，結果顯示藍紫色花之 pH 值 (5.8) 較紅色花之 pH 值 (5.0) 為高。藉由二者雜交後裔再行互交或回交，可使花瓣 pH 值較高之後裔族群比例提高，進而提升其藍紫色花後裔之比例，並認為是調控液胞 pH 值之 *ph* 基因突變，使得由原本正常表現顯性之紅色 (pH 值較低) 突變為隱性之藍紫色 (pH 值較高)，且推論此為影響蝴蝶蘭藍紫色表現之主要因子之一。Liang (2017) 分析紫藍與紫色蝴蝶蘭花瓣之酸鹼值，結果顯示紫藍色花瓣具有較高的酸鹼值 (pH 5.33–5.54)，紫色蝴蝶蘭花瓣之酸鹼值較低 (pH 4.77–5.04)。除此之外，該研究亦量測紫藍色與紫色蝴蝶蘭花瓣中五種金屬離子 (鋁、鎂、鈣、鐵、鋅) 的濃度及上述金屬離子與花青素的莫耳數比，結果顯示紫藍色花瓣中的鋁、鈣及鐵離子含量與花青素含量的莫耳數比分別為紫色蝴蝶蘭的 3.6、2.5 及 3 倍，但鎂及鋅離子含量與花青素的莫耳數比則無明顯差異。據此，認為液胞之酸鹼值偏高及含有較高的鋁、鈣及鐵離子與花青素的莫耳數比，可能是蝴蝶蘭表現出紫藍色花的主因，而非僅依飛燕草素累積所致。本研究中檢測各種大小花徑以及蠟質與非蠟質花瓣質地之藍紫、白、粉紅、深紅、黃綠、黑花、綠花紅斑等花色共 118 個蝴蝶蘭品種 (系) 花瓣上表皮組織之 pH 值，結果顯示大部分非蠟質類之非藍紫色蝴蝶蘭花瓣呈較酸性，實際測得之 pH 值為 4.86–5.29 左右，因少數樣品檢測出之 pH 值偏高而造成藍紫色花與白、深紅色蝴蝶蘭花瓣間之平均 pH 值無顯著差異。但相較之下，藍紫色蝴蝶蘭花瓣仍較其他色花瓣之 pH 值為高，平均在 5.22–5.27 之間 (表 3)，最高可測得 pH 5.48。此結果與 Griesbach (2005) 及 Liang (2017) 之研究結果相似。同樣的，蠟質花瓣類之非藍紫色蝴蝶蘭亦有相同情形，花瓣 pH 值較高的樣品包括深紅、黃綠、綠花紅斑等花

色，平均 pH 值在 5.33–5.38 之間，樣品最高可測得 pH 5.52，與藍紫色無顯著差異。而白、粉紅及黑花平均 pH 值則偏在 4.96–5.22 之間，與藍紫色之平均 pH 5.42 具顯著差異 (表 3)。由於大部分育種者與蝴蝶蘭業者皆選擇性狀優良之其他顏色商業品種蝴蝶蘭作為親本與藍紫色蝴蝶蘭雜交，但其後裔花色表現幾乎皆為紅色，並未能育成具有藍紫花色表現之蝴蝶蘭品種 (系)。由於目前尚未見利用花瓣 pH 值較高之其他顏色蝴蝶蘭作為親本選擇標準實際應用於藍紫色蝴蝶蘭之雜交育種，本研究將花瓣 pH 值較高 (5.22 以上) 之其他顏色蠟質與非蠟質蝴蝶蘭選出作為親本與藍紫色蝴蝶蘭雜交，並觀察其雜交後裔之花色表現。結果顯示，共進行 63 個雜交組合中僅 CYT115、CYT142、CYT155 及 CYT191 4 個雜交組合可成功獲得後裔並栽培至開花，各組合實生後裔數量在 51–1,105 株之間。除了 CYT155 雜交組合後裔之花色皆為紅色之外，CYT115、CYT142 及 CYT191 雜交組合後裔皆有藍紫色表現，其比率為 0.2–61.7% (表 4、圖 6)。顯示出以花瓣 pH 值篩選親本，有助於後裔藍紫色花之表現。大多數藍紫色蝴蝶蘭親本皆在夏季抽梗開花，但上述 3 個雜交組合中在 CYT115 選到優良單株具備有涼溫催梗之特性，顯示出大部分藍紫色蝴蝶蘭之第一代雜交種仍難以導入可涼溫催梗之特性。雖然如此，與原始藍紫色蝴蝶蘭親本之開花期仍有差異，例如 CYT142 之抽梗時間為秋季而非原種之夏季。

Griesbach (2005) 指出利用回交可提高藍紫色與紅色蝴蝶蘭原生種 *P. pulcherrima* 雜交後裔 *ph* 隱性基因表現的比例與強度，使花瓣組織 pH 較高，進而使雜交後裔藍紫色花表現比例提高。觀察目前其他育種者及本文第一作者利用遺傳背景較簡單之原生種或珍奇類蝴蝶蘭品種 (系) 與藍紫色蝴蝶蘭進行雜交育種，第一代後裔之花色大多為紅色，其花瓣組織 pH 經檢測有提高之情形 (如表 3 蠟質類深紅色花瓣樣品所示)。pH 平均為 5.33，最高可測得 pH 5.41。再以此為育種材料與藍紫色蝴蝶蘭親本進行回交，確實可使後裔之藍紫色花表現提高。然而，本研究更進一步利用遺傳背

景較複雜之大輪 (約 12 cm) 及中輪花徑 (約 8 cm) 商業品種蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交與回交育種至第二代，目前雜交後裔中尚未見藍紫色花之表現，但卻有花徑變小，花期亦重回到夏季，及園藝性狀變差之現象。因此，推論以一般 2 倍體的藍紫色蝴蝶蘭親本欲利用回交育種的方式，使雜交後裔表現藍紫色花僅適合遺傳背景較為簡單之原生種或品種 (系)，對於遺傳背景較複雜之多倍體商業蝴蝶蘭品種並不適用。

目前所誘導之 4 倍體藍紫色蝴蝶蘭 *P. belina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *P. Siam Treasure* 雖然尚未能獲得自交或雜交果莢及後裔，但已建立可應用之 4 倍體藍紫色蝴蝶蘭種原，應可擴大藍紫色蝴蝶蘭育種親本的利用性。本研究已檢測相當數量蝴蝶蘭品種之花瓣表皮組織 pH 值，並據此篩選出花瓣 pH 值較高之品種 (系) 與藍紫色蝴蝶蘭雜交，證實其雜交後裔可成功表現藍紫花色，並已成功獲得特殊花色、香氣、良好花序排列以及花形圓整等優良性狀單株，此一親本篩選模式應可作為今後藍紫色蝴蝶蘭育種改進之參考。

誌謝

本研究承農業試驗所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助論文審閱與校正、台南區農業改良場徐淑菁前助理研究員、張滄榮前助理研究員協助指導根尖染色體染色分析技術，以及李芸媽前計畫助理協助執行染色體分析工作、古坑花卉研究中心楊彩綺小姐協助蝴蝶蘭苗株栽培管理，特此致謝。

引用文獻

- Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci. Hort.* 88:277–287. doi:10.1016/S0304-4238(00)00212-0
- Azmi, T. K. K., D. Sukma, S. A. Aziz, and M. Syukur. 2016. Polyploidy induction of moth orchid [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume] by colchicine treatment on pollinated flowers. *J. Agric. Sci.* 11:62–73. doi:10.4038/jas.v11i2.8118

- Chen, W. H., C. Y. Tang, and Y. L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 98:229–238. doi:10.1007/s11240-009-9557-3
- Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis: A Monograph*. Timber Press. Portland, OR. 330 pp.
- de Faria, R. T., L. S. A. Takahashi, and A. B. Lone. 2009. UEL 6: Nova cultivar de *Dendrobium*. *Hortic. Bras.* 27:114–115. doi:10.1590/S0102-05362009000100023
- de Medeiros Vichiato, M. R., M. Vichiato, M. Pasqual, F. A. Rodrigues, and D. M. de Castro. 2014. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 14:154–159. doi:10.1590/1984-70332014v14n3a23
- Griesbach, R. J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1:103–107. doi:10.1007/BF02318909
- Griesbach, R. J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. *J. Hered.* 76:74–75.
- Griesbach, R. J. 2005. A scientific approach to breeding blue orchids: Exploring new frontiers in search of elusive flower colors. *Orchids* 74:376–379.
- Honda, T. and N. Saito. 2002. Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigments. *Heterocycles* 56:633–692. doi:10.3987/REV-01-SR(K)2
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:302–309. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2009.05804.06
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2010. *In vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. *J. Taiwan Agric. Res.* 59:165–176. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2010.05903.03
- Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T. A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G. Q. Tao, N. S. Nehra, C. Y. Lu, B. K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J. G. Mason, and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol.* 48:1589–1600. doi:10.1093/pcp/pcm131
- Liang, C. Y. 2017. Assessment of violet-blue color formation in *Phalaenopsis* orchids. Master Thesis, Department of Life Sciences, National Cheng Kung University. Tainan, Taiwan. 57 pp. (in English with Chinese abstract)
- Mii, M. 2014. Genetic transformation of orchids and production of transgenic blue *Phalaenopsis*. p.73–92. *in: Taiwan International Orchids Symposium*. March 8, 2014. Tainan, Taiwan. Taiwan Orchid Growers Assoc. Pub., Tainan. (in Chinese with English abstract)
- Oyama, K., T. Yamada, D. Ito, T. Kondo, and K. Yoshida. 2015. Metal complex pigment involved in the blue sepal color development of hydrangea. *J. Agric. Food Chem.* 63:7630–7635. doi:10.1021/acs.jafc.5b02368
- Qi, Y., Q. Lou, Y. Quan, Y. Liu, and Y. Wang. 2013. Flower-specific expression of the *Phalaenopsis* flavonoid 3',5'-hydroxylase modifies flower color pigmentation in *Petunia* and *Lilium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 115:263–273. doi:10.1007/s11240-013-0359-2
- Reuveni, M., D. Evenor, B. Artzi, A. v. i. Perl, and Y. Erner. 2001. Decrease in vacuolar pH during petunia flower opening is reflected in the activity of tonoplast H⁺-ATPase. *J. Plant Physiol.* 158:991–998. doi:10.1078/0176-1617-00302
- Saito, N., F. Tatsuzawa, K. Toki, K. Shinoda, A. Shigihara, and T. Honda. 2011. The blue anthocyanin pigments from the blue flowers of *Heliophila coronopifolia* L. (Brassicaceae). *Phytochemistry* 72:2219–2229. doi:10.1016/j.phytochem.2011.07.020
- Saito, N., M. Nakamura, K. Shinoda, N. Murata, T. Kanazawa, K. Kato, K. Toki, H. Kasai, T. Honda, and F. Tatsuzawa. 2012. Covalent anthocyanin-flavonol complexes from the violet-blue flowers of *Allium* 'Blue Perfume'. *Phytochemistry* 80:99–108. doi:10.1016/j.phytochem.2012.04.011
- Schreiber, H. D., A. M. Swink, and T. D. Godsey. 2010. The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. *J. Inorg. Biochem.* 104:732–739. doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.03.006
- Shiono, M., N. Matsugaki, and K. Takeda. 2005. Phytochemistry: Structure of the blue cornflower pigment. *Nature* 436:791. doi:10.1038/436791a
- Shoji, K., N. Miki, N. Nakajima, K. Momono, C. Kato, and K. Yoshida. 2007. Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions. *Plant Cell Physiol.* 48:243–251. doi:10.1093/pcp/pcl060
- Takeda, K. 2006. Blue metal complex pigments involved in blue flower color. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 82:142–154. doi:10.2183/pjab.82.142
- Tsao, C. Y. 2013. Blue flower breeding of *Phalaenopsis*. p.78–85. *in: Proceeding of Symposium on Orchid*

- Breeding in Taiwan. October 23, 2013. Taichung, Taiwan. Taiwan Orchid Breeders Soc. Pub., Chang-hua, Taiwan. (in Chinese)
- Tsao, C. Y., U. C. Chen, R. Y. Wu, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2018. Effects of colchicine treatments on polyploidy induction using protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*. J. Taiwan Agric. Res. 67:247–257. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201809_67(3).0002
- Wang, Y. T. 2015. Orchid production and market in the United States. p.17–20. in: Bloom: Taiwan Orchid Talks. (Lee, N., G. Sung, E. Chou, C. C. Tu, L. Huang, C. Tu, H. Huang, T. Liao, and J. Haskell, eds.) Taiwan Orchid Growers Assoc. Pub. Tainan, Taiwan. 68 pp.
- Wu, R. Y., C. Y. Tsao, K. C. Chuang, T. F. Hsieh, C. C. Tsai, Y. C. Yeh, Y. Yang, W. C. Hu, P. H. Sung, and Y. H. Lai. 2016. Breeding on new *Phalaenopsis* varieties by intergenus hybridization. p.41–56. in: Proceedings of the Symposium on Strategies of *Phalaenopsis* Breeding and Variety Management. (Wu, R. Y., K. C. Chuang, and T. F. Hsieh, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 195. Yulin, Taiwan. 99 pp. (in Chinese)
- Wu, Y. J. 2000. Molecular cloning and expression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase in seed coats of soybean (*Glycine max*). Master Thesis, Department of Agricultural Biotechnology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 98 pp. (in Chinese with English abstract)
- Yoshida, K., Y. Toyama-Kato, K. Kameda, and T. Kondo. 2003. Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. Plant Cell Physiol. 44: 262–268. doi:10.1093/pcp/pcg033
- Yoshida, K., S. Kitahara, D. Ito, and T. Kondo. 2006. Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. Phytochemistry 67:992–998. doi:10.1016/j.phytochem.2006.03.013

Polyploidization and Selection of Parents for Improving Breeding of Blue-Purple *Phalaenopsis*

Chin-Yi Tsao¹, Uei-Chern Chen¹, Rung-Yi Wu², Tzu-Ying Wu³, and Chi-Ni Hsia^{4,*}

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, R. Y. Wu, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2020. Polyploidization and selection of parents for improving breeding of blue-purple *Phalaenopsis*. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(2):154–168.

Polyploidy induction and selection of parents by pH of flower petal were used as strategies for improving breeding of blue-purple *Phalaenopsis* in this study. Using 6-wk-old protocorms of *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*, *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* and *Phalaenopsis* Siam Treasure as explants exposed in 0.1 mM colchicine for 8 d to induce polyploidy. Ploidy levels of seedlings derived from colchicine treatments were analyzed by flow cytometry and root tip staining. Results showed that survival rate among two species and one variety were 59.2–85.0%, and their tetraploid induction rates were 27.3–32.9%. Comparison of horticultural traits of diploid and tetraploid plants showed that all tetraploids had firmer petal texture than that of diploids. It was also found that tetraploids of *P. bellina* fma. *coerulea* and *P. equestris* fma. *coerulea* had larger flower diameter than that of their diploids. Although tetraploid plants of *P. Siam Treasure* had similar flower diameter with diploid, tetraploid plants had thicker and shorter stalk than their diploids. The hybridization compatibility of tetraploid plants would need more crossings for investigation for further information. It showed that average pH values of blue-purple petal *Phalaenopsis* were more alkaline (pH about 5.22–5.42) than that of other colors flower. Selection of other colors from *Phalaenopsis* varieties with higher values of petal pH (pH about 5.33–5.38) as parents to cross blue-purple *Phalaenopsis* varieties were conducted in this study. Results showed that a significant higher percentage of 0.2–62.0% blue-purple progeny was found than that of using random parents without pH selection on parents. This pH-based parental selection would improve breeding for blue-purple *Phalaenopsis* varieties.

Key words: Blue-purple *Phalaenopsis*, Cyanidin, Colchicine, Polyploidy, Flow cytometry.

Received: August 8, 2019; Accepted: January 30, 2020.

* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

³ Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.