

# 黃根節蘭授粉後 DNA 微注射處理對 莢果發育之影響

李淑真、廖芳心、鄭隨和

## 摘 要

本試驗目的在釐定黃根節蘭 (*Calanthe sieboldii* Decne. ex Reg.) DNA 微注射處理轉移外來基因的最適時間，並調查授粉後天數 DNA 微注射處理外來基因對莢果發育之影響。螢光顯微鏡觀察黃根節蘭授粉後花粉管生長及受精情形，不同時間結果顯示，授粉後 48 小時花粉塊已萌芽，授粉後 60 天完成受精。於授粉後不同時間進行 DNA 微注射處理外來基因，結果以授粉後 55 天所得之莢果結實率達 100% 為最高，於授粉後 60 天所得之莢果鮮重為 2.60 g 最重。

關鍵詞：黃根節蘭、授粉、花粉管發芽、DNA 微注射。

## 前 言

黃根節蘭 (*Calanthe sieboldii* Decne. ex Reg.)，別名川上氏根節蘭，是中型地生蘭。分佈於台灣北部海拔 700-1200 m 之山區，如拉拉山、插天山、李棟山及南庄。花黃色至金黃，有檸檬香味，是根節蘭屬中花朵最大，最具觀賞價值者。花期為 2-3 月 (林, 1988; 周, 1986; 葉, 1990)，正值農曆過年前後，花開時葉幼嫩未完全張開且包於花軸基部，植株外形相當優美，適合開發為盆植或花壇群植。但其花朵壽命短，花期約 1-2 週，為提高商品價值，應育成花期長之品種。

高等植物花朵的老化與乙烯有密切關係，ACC 合成酶已知是乙烯生成的重要調控酵素，抑制 ACC 合成酶即可抑制乙烯的合成，以達到延遲老化的效果。John 等人 (1995) 轉移 ACC 合成酶反義基因到番茄，成功的抑制番茄葉片的老化。Ayub 等人 (1996) 用農桿菌轉移 ACC 合成酶反義基因到甜瓜，轉殖株葉片的創傷乙烯生成量減少，果實乙烯的生成量不到對照組的 1%。以花粉管法成功的轉移外來基因，且能表現出該外來植物之優良特性，已有許多先例，而不同作物最適宜接受外來基因的時間均不同；如水稻以外穎剛開時 1-2 小時最適宜 (Luo and Wu 1989)、棉花以授粉後 1 日之棉鈴最適宜 (Zhou et al., 1983)、茄子以授粉後 24 小時最適宜 (許等, 1991)、甘藍亦以授粉後 24 小時最適宜 (廖和黃, 1996)、蝴蝶蘭則以 30 天左右注射外來基因轉殖效率最佳 (謝和黃, 1995) 等；上述最適宜接受外來基因的時間均為完成受精的時間，胚胎發育早期，外來 DNA 的導入最適合。惟有關利用花粉管通道以 DNA 微注射法轉移外來基因至黃根節蘭方面之研究，尚付闕如。本試驗擬先行探討黃根節蘭授粉後花粉管發芽與受精的行為及授粉後使用 DNA 微注射對莢果發育的影響，以釐定最適注射外來基因時間，供為應用 DNA 微注射處理輔助黃根節蘭育種之參考。

## 材料與方法

### 一、植物材料

供試植物為蒐集自台灣北部山區的原生黃根節蘭，具有三個以上的假球莖開花株，種植於桃園區農業改良場新屋本場。

### 二、花粉管發芽、生長與受精之觀察

花粉管觀察方法係參照 Kho 和 Bear (1968) 及 Alexander (1987) 之方法。黃根節蘭異株異花人工授粉，授粉後 2、4、16、24、48 小時、20、23、30、31、35、45、50、55 及 60 天等，取子房（含蕊柱）固定於 FAA 固定液（formalin：glacial acetic acid：50% ethanol = 1：1：18）中，至少 24 小時。固定之材料以水清洗後，取全花或子房部位置入 3 N NaOH 內，放置於 60℃ 恆溫箱內軟化 1 小時。將軟化之材料以水清洗後，加入溶於 0.1 N  $K_3PO_4$  之 0.1% aniline blue 溶液中，染色一天以上。將染色之材料置於載玻片上，滴加甘油，蓋上蓋玻片壓平，以螢光顯微鏡觀察並照相紀錄。

### 三、質體 DNA 材料

欲轉移的 ACC 合成酶反義基因構築於 pAACS B-9 質體 DNA 內，以 CaMV 35S 啟動子所引導的蝴蝶蘭 ACC 合成酶反義基因（cDNA），接上 NOS 終結子，另具有由 CaMV 35S 之啟動子所引導之 GUS 報導基因，基因之後接上 NOS 的終結子，以及由 NOS 之啟動子所引導之 NPT II 篩選基因，此質體 DNA 由台灣大學園藝系黃鵬林教授提供，做為 DNA 微注射轉移外來基因的材料。

### 四、質體 DNA 之抽取

質體 DNA 之抽取係遵照廖和黃等人(1995)之方法。DNA 濃度的定量，係使用光電比色計（Hitachi U-2000）波長 260 nm 之吸光度測定。

### 五、DNA 微注射處理轉移外來基因

黃根節蘭開花當日異花人工授粉，於授粉後 31、40、55 及 60 天，以 Hamilton 26 G 之針頭自胎座注入 5  $\mu$ l pAACS B-9 質體 DNA（圖 1），濃度為 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l，每處理微注射 5 個莢果。處理後植株依照慣常管理。於授粉後 110 天調查莢果大小及結實率。



圖 1. 黃根節蘭以花粉管通道微注射 pAACSB-9 質體 DNA。

Fig.1. Microinjection of pAACSB-9 plasmid DNA by pollen tube pathway in *Calanthe sieboldii* Decne. ex Reg.

## 結果與討論

### 一、黃根節蘭授粉後花粉管發芽、生長及受精之觀察

黃根節蘭花朵經授粉後於 1-2 天內便會萎凋，之後子房開始膨大生長。螢光顯微鏡下觀察結果顯示於授粉後 2、4、16、24 小時均未見花粉塊發芽，但於授粉後 48 小時，可見少數花粉塊正萌芽，但多數花粉塊已發芽長出花粉管（圖 2A, B）；授粉後 20 天花粉管明顯伸長（圖 2C），花粉管延伸至子房腔的 1/2；授粉後 23 及 31 天花粉管在子房腔繼續向前延伸；授粉後 31 天，花粉管伸長至子房腔的 2/3；授粉後 35 及 45 天花粉管仍在子房腔繼續向前延伸；授粉後 50 天花粉管已伸長至子房腔的底端；授粉後 55 天花粉管雖已伸長至子房腔的底端，但未見受精；於授粉後 60 天才見到受精，表示此時有胚珠已完成受精（圖 2D）。綜合上述，觀察黃根節蘭授粉後花粉塊發芽，花粉管生長及伸長的時間如表 1，顯示授粉後時間與花粉管的生長過程。

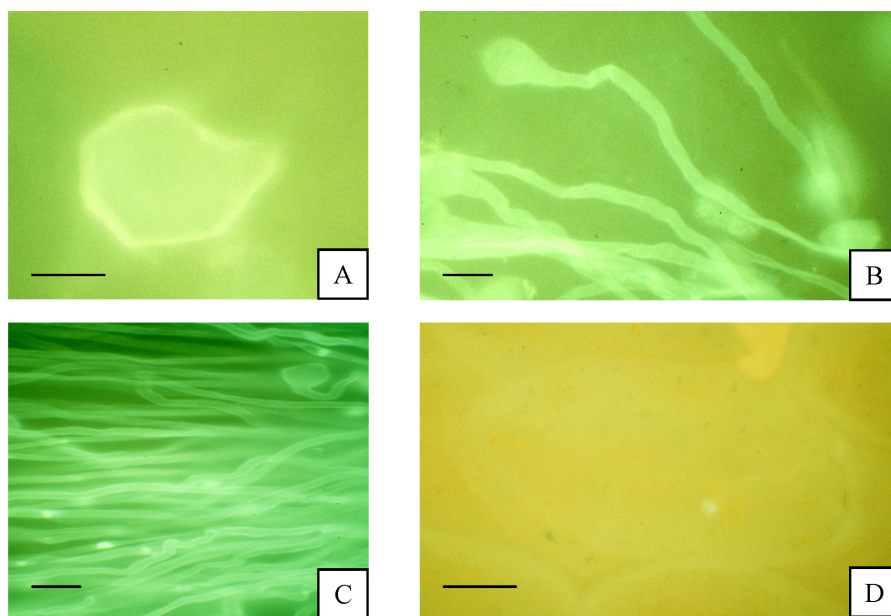


圖 2. 黃根節蘭花粉管發芽(A)、生長(B)、伸長(C)與受精(D)觀察。(A) (B) 為授粉後 48 小時花粉管發芽與生長；(C)為授粉後 20 天花粉管伸長；(D)為授粉後 60 天完成受精。

Fig.2. Observation of pollen tube germination (A), growth (B), elongation (C) and fertilization (D) of *Calanthe sieboldii*. Decne. ex Reg. (A) (B) Pollen tube germination and growth at 48 hours after pollination. (C) Pollen tube elongation at 20 days after pollination. (D) Fertilized at 60 days after pollination. Bar=50 $\mu$ m (A, D), Bar=100 $\mu$ m (B, C)。

蘭科植物子房的發育必須經由授粉來誘發，花粉塊的 Auxin 刺激促使子房內的胚囊發育(Arditti and Knauft, 1969)，因此於授粉後到完成受精須一段時間，其長短因物種不同而異，短的如赤箭蘭 (*Gastrodia elata* Blume.) 3-4 天即可(Arditti,1966)，拖鞋蘭 (*Paphiopedilum* spp.) 則需 26-33 天

(Carlson,1940)，蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 則需 63-70 天(涂和李,1987, 謝和黃,1995)，長的如素心蘭 (*Cymbidium ensifolium* (L.) Sw. var. *rubrigemmum* (Hayata) Liu & Su) 須 120-150 天(蕭,1978)。根節蘭屬則依不同種類其授粉至受精天數不同，如 *C. discolor* Lindl. 需 38-40 天、*C. furcata* Batem. ex Lindl. 需 43-45 天，而 *C. amamiana* Fuk.、闊葉根節蘭(*C. aristulifera* Reichb. F.)及黃根節蘭(*C. sieboldii* Decne. ex Reg.)需 48-50 天(Nagashima,1982; 1983; 1984; 1985)。本試驗觀察的結果於授粉後 60 天完成受精，與 Nagashima 的結果略晚 10 天，可能是因氣候條件不同所導致，是否高溫會延遲或抑制花粉管的發芽與生長，應再進一步探討。

表 1. 黃根節蘭不同授粉後時間之花粉管生長。

Table 1. Pollen tube growth at different duration after pollination in *Calanthe sieboldii* Decne. ex Reg.

授粉後時間 Duration after pollination	柱頭 stigma	子房前端 upper part of ovary	子房中段 mid part of ovary	子房末端 lower part of ovary
2hrs	—	—	—	—
4hrs	—	—	—	—
16hrs	—	—	—	—
24hrs	—	—	—	—
48hrs	+	—	—	—
20days	+	+	+	—
23days	+	+	+	—
30days	+	+	+	—
31days	+	+	+	—
35days	+	+	+	—
40days	+	+	+	—
45days	+	+	+	—
50days	+	+	+	+
55days	+	+	+	+
60days	+	+	+	+

—：未觀察到花粉管。—：no pollen tube occurred.

+：已觀察到花粉管。+：pollen tube occurred.

## 二、黃根節蘭 DNA 微注射處理對莢果發育之影響：

黃根節蘭開花當日異花人工授粉，授粉後 1 天蕊柱閉合，之後花朵萎凋，子房迅速膨大。於授粉後不同時間 DNA 微注射處理莢果，其結莢率、莢果大小及鮮重如表 2 及表 3 所示，於授粉後 31 天實施 DNA 微注射處理，其結莢率、莢果大小及鮮重均顯著較 40、55 及 60 天者低且瘦小。因此黃根節蘭於授粉後 31 天注射會影響莢果發育，明顯降低莢果結莢率且導致莢果較瘦小，鮮重較輕。是故 DNA 微注射處理轉移外來基因於莢果發育早期處理，會影響莢果生育，其原因可能是注射造成傷害或外來基因進入造成稔性降低(Matzke et al., 1994)。

蝴蝶蘭進行花粉管通道以 DNA 微注射法處理轉移外來基因，授粉後不同天數進行注射處理，經注射處理的莢果與正常授粉所得的莢果外表無明顯差異，但注射處理的莢果種子數較正常者少，而於莢果生育後期再進行注射者，較無影響(謝與黃，1995)。甘藍花粉管通道以 DNA 微注射法處理轉移外來基因，於授粉同時處理者，由於柱頭組織尚嫩，注射易引起傷害，因而影響種子數，授粉後 12 及 24 小時則柱頭組織硬化，操作較容易，傷害較小，不影響種子數 (廖和黃，1996)。是故花粉管通道以 DNA 微注射法處理轉移外來基因早期處理通常會導致結莢率降低，種子數減少。

表 2. 不同授粉後時間以花粉管通道微注射 DNA 對黃根節蘭結莢率之效應

Table 2. Effect of different DNA microinjection time after pollination on the percentage of capsule set of *Calanthe sieboldii* Decne. ex Reg. via pollen tube pathway.

處理時間 Microinjection time	處理莢果數 No. of capsules treated	採收莢果數 No. of capsules harvested	結莢率 Percentage of capsule set
	no.	no.	%
授粉後 31 天 31 days after pollination	5	3	60
授粉後 40 天 40 days after pollination	5	4	80
授粉後 55 天 55 days after pollination	5	5	100
授粉後 60 天 60 days after pollination	5	4	80

表 3. 授粉後不同天數以花粉管通道微注射 DNA 對黃根節蘭莢果大小及鮮重之影響

Table 3. Average size and fresh weight of capsules at different DNA microinjection time after pollination in *Calanthe sieboldii* Decne ex Reg. via pollen tube pathway.

處理時間 Microinjection time	莢果大小 size of capsule		鮮重 Fresh weight
	長 Length	寬 Width	
	----- cm -----		g/capsule
授粉後 31 天 31 days after pollination	7.146	2.944	1.70
授粉後 40 天 40 days after pollination	8.042	3.428	2.47
授粉後 55 天 55 days after pollination	6.916	3.374	2.07
授粉後 60 天 60 days after pollination	7.821	3.592	2.60



### 三、黃根節蘭 DNA 微注射處理位置及最適時間探討：

黃根節蘭之雌雄蕊合生為蕊柱，於授粉後蕊柱柱頭會閉合，為避免再與其他花粉接觸，DNA 微注射處理直接由胎座注入。花粉管通道以 DNA 微注射法處理轉移外來基因，注射 DNA 的部位有多種選擇，水稻(Luo and Wu, 1989)與裸麥(de la pena, et al. 1987)於注射前將花柱切除，以縮短外來基因進入胚囊的距離；茄子是將已授粉的柱頭截除 2/3，以針頭順著柱頭插入子房 2/3 處再慢慢抽出一段，注入外來基因(許等, 1991)；甘藍因花柱短，直接由柱頭注射(廖和黃, 1996)；棉花則以針頭注入胎座中軸，再抽出 0.2 cm 後注入外來基因(黃等, 1982)。因此不同作物最適的注射處理方法及位置不同，選擇應用花粉管通道 DNA 微注射法處理轉移外來基因時，應先了解作物的花器構造，再決定適合的注射處理方法及位置。

本試驗黃根節蘭於授粉後 31 天，花粉管伸長至子房腔的 2/3；授粉後 50 天花粉管已伸長至子房腔的底端，但未見受精，於授粉後 60 天完成受精；而於授粉後 31 天轉殖莢果結實率為 60%，授粉後 55 天轉殖莢果結實率達 100%，為最高，授粉後 60 天轉殖莢果結實率降為 80%；因此建議黃根節蘭 DNA 微注射處理最適時間為 55-60 天。以花粉管通道 DNA 微注射法處理轉移外來基因應選擇受精過程或胚胎發育早期，細胞分裂最旺盛的時期，此時期受體的合子或卵子及胚胎初期細胞都不具細胞壁，外來基因較易進入且完成轉移(廖和黃, 1996)。而蘭科植物通常須經授粉的刺激，促使大孢子發育形成胚囊與胚珠。以蝴蝶蘭為例，授粉後 30 天大孢子母細胞發育已形成，50 天大孢子母細胞開始進行減數分裂，60 天胚囊形成，70 天發生受精，100 天則胚大致形成，以花粉管通道 DNA 微注射法處理轉移外來基因則於授粉後 30 天最適宜(謝和黃, 1995)。因此蘭科植物不同物種的授粉及受精時間亦不同，不同物種的蘭花選擇應用花粉管通道 DNA 微注射法處理轉移外來基因時，應先瞭解該種蘭花的授粉及受精行為，再決定 DNA 微注射法處理的最適時間。

## 誌謝

本文為 92-農科-桃-4.1.1-Y1 計畫報告，鄒稚涵小姐的協助田間工作，謹此致謝。

## 參考文獻

- 林讚標。1988。台灣蘭科植物(2)。南天書局。台北。p68-100。
- 周光宇、翁堅、龔蓁蓁、曾以申、楊晚霞、沈慰芳、王自芬、陶全洲、黃駿麒、錢思穎、劉桂玲、應苗成、薛達元、洪愛華、徐英俊。1988。授粉後外源 DNA 導入植物的技術。中國農業科學 21：1-6。
- 周鎮。1986。台灣蘭圖鑑—地生蘭篇。周鎮出版。台中。p107-141。
- 涂美智、李晔。1987。蝴蝶蘭授粉適期與莢果成熟度對種子發芽之影響。中國園藝 33：190-200。
- 許勇、周長久、王福鈞、李丙東。1991。外源 DNA 注射茄子子房後代性狀的變異。園藝學報 18:49-54。
- 黃駿麒、錢思穎、劉桂玲、翁堅、曾以申、周光宇。1982。外源海島棉 DNA 誘導中棉性狀的變異。江蘇農業科學 11：18-20。

- 廖芳心、黃鵬林。1996。應用花粉管法轉移甘藍基因注射處理時間之探討。中國園藝 42(3)：289-301。
- 葉淑如。1990。黃根節蘭、繡邊根節蘭及白鶴蘭植株之生長習性與種子發芽生理。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。233pp。
- 謝永祥、黃鵬林。1995。應用花粉管法於蝴蝶蘭基因轉殖之研究。中國園藝 41(4)：309-324。
- 蕭楊區。1978。觀音素心蘭子房發育與種子形成之研究。國立台灣大學植物系研究所碩士論文。p38。
- 閻新莆、劉文軒、胡學義。1991。外源 DNA 處理小麥種苗和穎花其誘變的研究初報。河南農業大學學報 25: 359-364。
- Alexander, M. P. 1987. A method for staining pollen tube in pistil. *Stain Technol.* 62:107-111.
- Arditti, J. and R. L. Knauff. 1969. The effect of auxin, actinomycin D, ethionine, and puromycin on post-pollination behavior of *Cymbidium*(Orchidaceae)flower. *Amer. J. Bot.* 56:620-628.
- Ayub, R., M. Guis, M. B. Amor, L. Gillot, J. P. Roustan, A. Latche, M. Bouzayen, and J. C. Pech. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biol.* 14:862-866.
- Carlson, M. C. 1940. Formation of the seed of *Cypripedium parviflorum*. *Bot. Gaz.* 102:295-301.
- De la Pena, A., H. Iorz, and J. Schell. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* 325:274-276.
- Huang P., Y. Do, and F. Jheng. 2004. Research and development on the establishment of transformation systems for *Phalaenopsis* orchids. Proceedings of 8th Asia Pacific Orchid Conference. Taiwan Orchid Growers Association. Tainan, Taiwan. p416-426.
- Kho, Y. O., and J. Bear. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17:289-302.
- John, I., R. Drakod, A. Farrell, W. Cooper, P. Horton, and D. Grierson. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant J.* 7:483-490.
- Luo, Z., and R. Wu. 1989. A simple method of the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7:69-77.
- Matzke, M. A., E. A. Moscone, Y. D. Park, I. Papp, H. Oberkofler, F. Neuhuber, and A. J. M. Matzke. 1994. Inheritance and expression of a transgene in an aneuploid tobacco line. *Mol. Gen. Genet.* 245:471-485.
- Nagashima, T. 1982. Studies on the seed germination and embryogenesis in the *Bletilla striata* Rohb. f. and *Calanthe discolor* Lindl. *Engei Gakkai Zasshi.* 51 (1): 82-93.
- Nagashima, T. 1983. Seed germination and embryogenesis in the *Calanthe furcata* Bateman, *Calanthe cardioglossa* Schltr. and *Phaius minor* Blume. *Engei Gakkai Zasshi.* 52 (1): 65-77.
- Nagashima, T. 1984. On the seed germination and embryogenesis in the *Calanthe aristulifera* Rchb. f., *Calanthe izu-insularis* Ohwi et. Satomi and *Calanthe amamiana* Fukuyama. *Engei Gakkai Zasshi.* 53 (2):176-186.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Zhou, G., J. Weng, Y. Zeng, J. Huang, S. Qian, and G. Liu. 1983. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods Enzymol.* 101: 433-442.

## **Capsule Development as Influenced by DNA Microinjection after Pollination in *Calanthe sieboldii* Decne. Ex Reg.**

Shu-Jen Lee, Fang-Shin Liao and Shui-Ho Cheng

### **Abstract**

This study is to investigate the optimum time for DNA microinjection via pollen tube pathway and effect of DNA microinjection on the capsule development at different duration after pollination in *C. sieboldii* Decne. The pollen was found germinated at 48 hours and fertilized at 60 days after pollination. The percentage in capsule set was 100% in the treatment of DNA microinjection at 55 days after pollination, but the highest fresh weight which was 2.6g per capsule was shown in the treatment microinjected at 60 days after pollination. These results indicated that the optimum time for DNA microinjection via pollen tube pathway was at 55 days after pollination.

Key words: *Calanthe sieboldii* Decne., pollination, DNA microinjection, pollen tube pathway.