

猩猩草多倍體化與自交子代倍數性分析

廖晨皓¹⁾ 潘怡君²⁾ 溫佩容³⁾ 陳彥銘⁴⁾

關鍵字：猩猩草、無融合生殖、多倍體化、花粉稔性

摘要：本試驗以猩猩草 (*Euphorbia cyathophora*) 種子為材料，進行不同濃度秋水仙素浸漬誘導多倍體，並調查誘變植株之花粉發芽率及其自交子代之倍數性。經流式細胞儀檢測相對 DNA 含量之結果。猩猩草種子以 0.25 g·L⁻¹ 浸泡 24 小時處理，獲得一株四倍體 (Cy-M1; 4.18)，倍體數誘變率為 8.4%；1 g·L⁻¹ 浸泡 72 小時處理獲得一株四倍體 (Cy-M2; 3.74) 及一株混倍體 (Cy-M3; 2/3.92)，倍體數誘變率為 18.2%，且形態與原株具明顯差異。調查誘變株之葉長及葉寬與原株無差異，葉緣較圓整無缺刻，大戟花序直徑較原株減少。誘變株之花粉活力皆較原株 (2.1%) 提升，且花粉粒直徑皆增加。Cy-M1 花粉活力最高 (16.3%)，及最大花粉粒直徑 (49.3 μm)。

前 言

猩猩草 (*Euphorbia cyathophora*) 與聖誕紅 (*E. pulcherrima*) 同屬於地錦亞屬 (subgen. *Chamaesyce*; Taylor *et al.*, 2011)。為一年生或多年生草本植物，株高 0.5-1 公尺，環境適應力極強，能周年開花。葉互生，為卵橢圓形或提琴形。大戟花序為淡黃綠色，無花被，其苞葉著生於頂端花序旁，較正常葉片小且基部呈橘紅色 (應紹舜, 1991)。

陸 (2015) 利用聖誕紅與猩猩草進行種間雜交，在其正交 (聖誕紅作為母本) 結果中，聖誕紅之結種數 (成熟種子) 為 0，可能與猩猩花粉稔性 (1.8-2.2%) 極低相關，在其反交 (猩猩草作為母本) 結果中，調查子代之植物性狀，並透過流式細胞儀分析，再與母本及其自交子代相互比較，發現數據幾乎完全相同。因此，陸 (2015) 藉由螢光顯微鏡觀察猩猩草

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授。

3) 國立中興大學園藝學系研究助理。

4) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

自交授粉後其體內花粉管萌發情形，發現授粉後猩猩草之花粉粒會沾黏在柱頭上，無法伸入花柱中與胚珠結合，但胚珠卻能自行發育並可獲得成熟種子，據此判斷猩猩草可能以無融合生殖進行繁衍。本試驗以秋水仙素處理猩猩草，並觀察四倍體猩猩草之花粉稔性是否提升，及分析探討其子代倍數性與無融合生殖現象之關聯。

材料與方法

一、植物材料

試驗所使用之猩猩草 (*E. cyathophora*) 為自行播種繁殖，使用 200 格穴盤播種。使用商用泥炭苔混和介質 BVB 7H (7H PO441389, Bas van Buuren B.V., Coldenhovelaan 10, The Netherlands) 作為栽培介質。栽培至成熟期前，每周施用 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Jack's 水溶性肥料 20-20-20 (Scotts- Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, USA) 3 次，栽培至成熟期時，適時補充 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Jack's 水溶性肥料 10-30-20 (Scotts- Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, USA)，以促進生殖生長。並定期進行病蟲害防治。

二、秋水仙素誘變

於塑膠培養皿 ($90 \times 15 \text{ mm}$ Petri dishes, Alpha plus, Taiwan) 添加不同濃度 (0.1 、 0.25 、 0.5 、 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 秋水仙素溶液，每個培養皿加入 10 ml，再將猩猩草 (*E. cyathophora*) 種子置於其中浸泡，每處理 30 粒種子，進行三重複，對照組則添加 10 ml 去離子水。分別浸泡 24 hr、48 hr、72 hr 後，以去離子水洗去種子外皮之殘餘秋水仙素。洗淨後，在 200 格穴盤中播種，播種 2 周後，調查猩猩草之萌芽率及存活率 (存活植株數/總萌芽數)，播種 3 周後，將存活之苗株定植在 2 吋黑軟盆中。定植 1 周後，利用流式細胞儀檢測存活植株之相對 DNA 含量，之後持續栽培至成熟期，進行植物外表型態之營養及生殖性狀調查。於開花後，將其放置於人工搭設之授粉網室 (網目為 1.0 mm) 內行自交授粉，並採收誘變單株之自交種子，播種後進行其子代倍數性分析與計算子代倍數性分離之比例。

三、秋水仙素誘變株與自交子代之相對 DNA 含量測定

將猩猩草誘變植株及其自交子代進行相對 DNA 含量檢測。試驗步驟為，採取幼嫩葉片 0.25 cm^2 ，放置在培養皿上，加入 $400 \mu\text{l}$ nuclei extraction buffer (CyStain ultraviolet Precise P Nuclei Extraction Buffer; Sysmex Partec, Gorlitz, Germany) 溶液，接著利用刮鬍刀片將葉片剝碎與試劑均勻混合。之後再加入 $1600 \mu\text{l}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining buffer (Cystain ultraviolet Precise P Staining Buffer; Sysmex Partec, Gorlitz, Germany)，與先前含有葉片殘體之溶液混和，以震盪器均質後，靜置一分鐘，再透過 $30 \mu\text{m}$ 網目之過濾器，篩除多餘雜質及植物殘體，最終獲得含有待測植株染色體之純淨分析樣品液。接著使用流式細胞儀 (CyFlow® Ploidy Analyzer, Ploidy Analyzer, Sysmex Partec, Gorlitz, Germany) 進行樣品相對 DNA 含量分析 (Pickens *et al.*, 2006)。

四、秋水仙素誘變株植物性狀調查

同時將誘變處理獲得之猩猩草誘變株與對照組，於自然環境下種植至長出花絲時且苞葉之橘色斑塊完全著色時進行大戟花序型態調查。分別量測各單株及對照組之大戟花序直徑(第一級大戟花序之苞葉長度)、葉片葉身比及花粉粒直徑，並拍照記錄。

五、秋水仙素誘變株花粉活力檢測

參考陸(2015)方法檢測猩猩草秋水仙素之花粉活力。挑選大戟花序總苞能正常發育花藥及釋出花粉之猩猩草及其誘變植株進行調查。於天氣晴朗時，收取當日開裂花藥之新鮮花粉，花粉活力測定培養基以 Brewbaker 和 Kwack (1963) 之配方為基本配方，培養基每公升含有 0.3 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g H_3BO_3 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 0.1 g KNO_3 ，額外添加 15% 之蔗糖，調整為猩猩草花粉萌發的最適糖度，並將培養基 pH 值調整至 6.0。將當日收取之新鮮花粉，均勻撒在含有培養基之雙凹槽載玻片進行花粉培養。將載玻片放置於黑暗環境之加濕保鮮盒中，再放入 25°C (猩猩草花粉萌發最適溫度) 之恆溫箱 (RI80, Firstek Scientific, Taiwan) 進行培養。培養 10 小時後，於光學顯微鏡 (ZEISS HBO 50/AC, Zeiss Axiolab, Germany) 下進行觀察，花粉管伸長度超過花粉直徑兩倍，即視為發芽，可計算花粉發芽率並進行拍照記錄。試驗每處理調查 200 粒花粉，進行 3 重複。

六、四倍體猩猩草自交試驗

自西元 2017 年 3 月至西元 2018 年 6 月於人工搭設之授粉網室 (網目為 1.0 mm) 進行四倍體猩猩草 (Cy-M1) 自交授粉。試驗結果為 4 周後開始採收種子至 6 月，並記錄收穫種子數，以 200 格穴盤添加泥炭苔混和介質 BVB 7H (7H PO441389, Bas van Buuren B.V., Coldenhovelaan 10, The Netherlands) 進行播種後，計算種子發芽率，待長出第一對本葉後，以流式細胞儀測定相對 DNA 含量，調查二倍體及四倍體子代數量。

七、統計分析

試驗採用完全逢機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，調查數據使用 CoStat 6.4 版套裝軟體 (CoHort software, U.S.A.) 中之 ANOVA (Analysis of variance) 進行變方分析，以最小顯著性差異測驗比較 (least significant difference test, LSD)，分析各處理間是否有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。

結 果

依據試驗數據顯示，以浸泡猩猩草種子之處理，僅有在 0.25 g·L⁻¹ 及 1 g·L⁻¹ 秋水仙素溶液分別浸泡 24 小時和 72 小時之處理下，成功獲得多倍體誘變株，0.25 g·L⁻¹ 秋水仙素浸泡下，有 40.0% 種子能萌芽，且具 100% 存活率，透過流式細胞儀檢驗，具 8.4% 倍體數誘變率，並產生四倍體 (Cy-M1) 植株，其形態差異明顯，而 1 g·L⁻¹ 秋水仙素浸泡下，其有 50.0% 種子能萌芽，且具 73.4% 存活率，經由流式細胞儀分析，具 18.2% 倍體數誘變率，獲得四倍體 (Cy-M2) 及混倍體 (Cy-M3) 植株，形態較原株也是差異明顯 (圖 1、圖 2)。其他處理下之種子發芽後，再藉由流式細胞儀檢驗，證實其倍體數皆與原株無異 (表 1)。

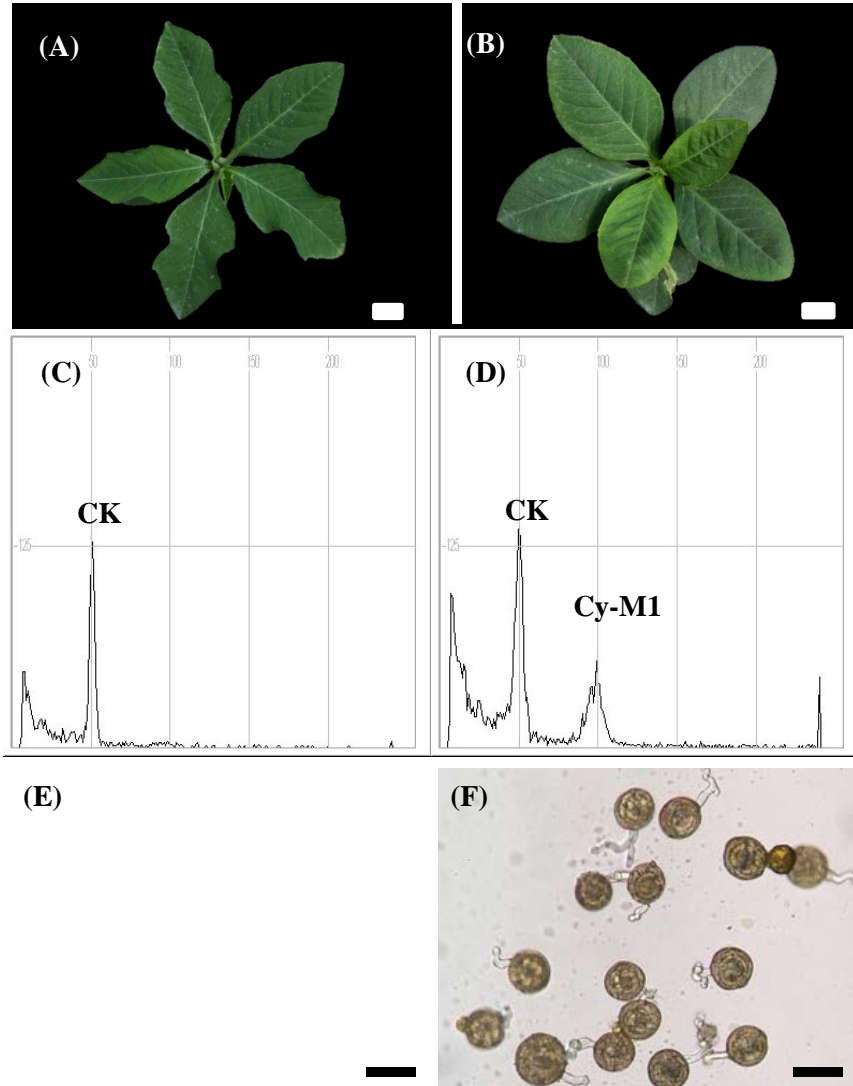


圖 1. 猩猩草 (*E. cyathophora*) 秋水仙素誘變株之相對 DNA 含量檢測和花粉觀察。(A) 二倍體猩猩草植株。(B) 猩猩草誘變株 Cy-M1。(C)-(D) 經流式細胞儀檢測誘變與對照組之相對 DNA 含量。Gain: 340, Speed: 0.4。(E) 二倍體猩猩草花粉。(F) 猩猩草誘變株 Cy-M1 花粉。(E) 二倍體猩猩草花粉。(F) 猩猩草誘變株 Cy-M1 花粉。(A) & (B) Bar = 1 cm。(E) & (F) Bar = 30 μ m。

Fig. 1. Relative DNA content of the colchicine mutants obtained from poinsettia *E. cyathophora* and comparison of pollen. (A) Diploid *E. cyathophora*. (B) *E. cyathophora*. mutant Cy-M1. (C)-(D) Relative DNA content between mutants and control plant by flow cytometry. (E) The pollen of diploid *E. cyathophora*. (F) The pollen of *E. cyathophora*. mutant Cy-M1. (A) & (B) Bar = 1 cm. (E) & (F) Bar = 30 μ m.

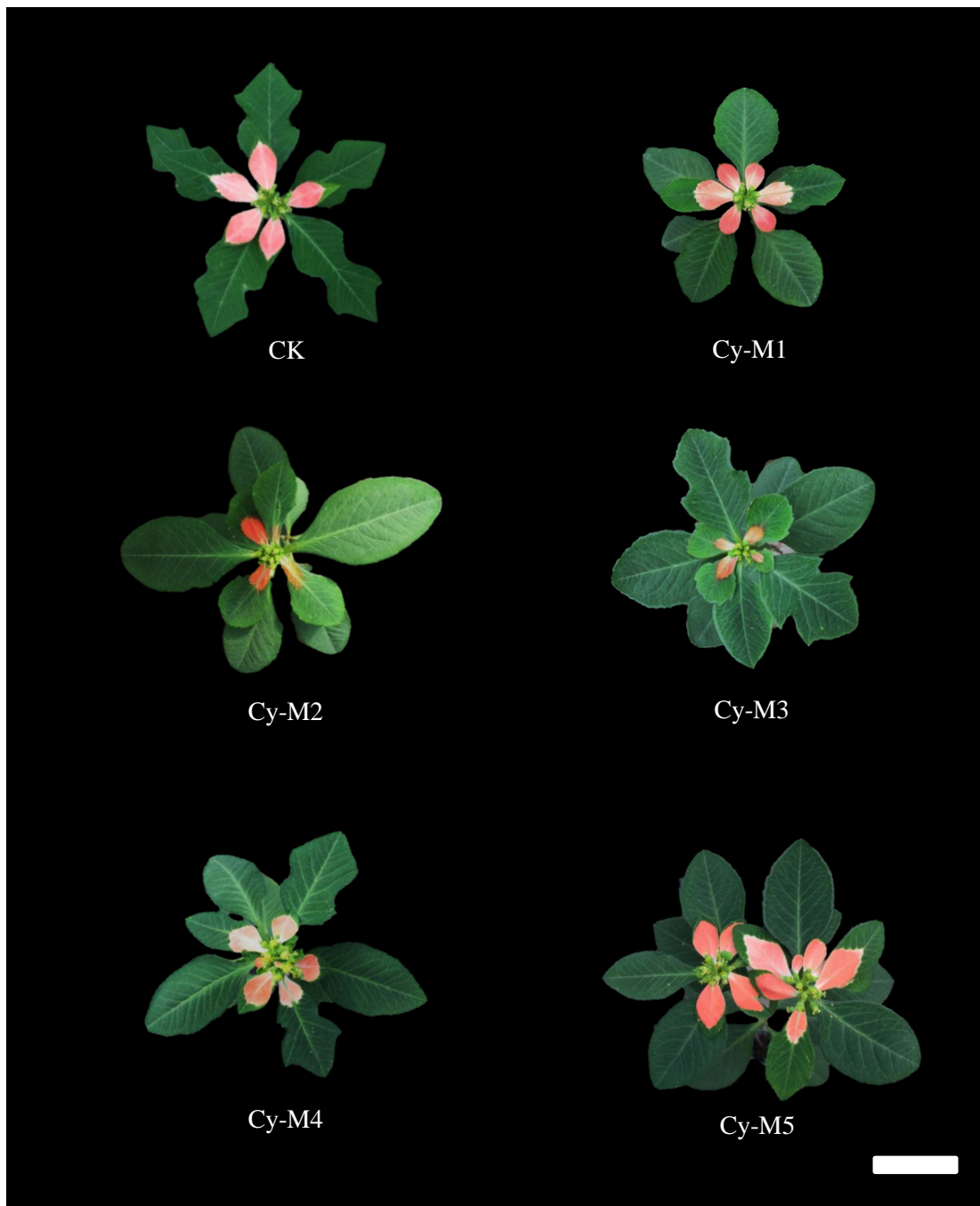


圖 2. 猩猩草 (*E. cyathophora*) 及其秋水仙素誘變株之花序。Bar = 5 cm。

Fig. 2. The inflorescence of *E. cyathophora* and its mutants obtained from colchicine induction.
Bar = 5 cm.

表 1. 不同濃度秋水仙素與浸漬時間對猩猩草 (*E. cyathophora*)種子誘變之影響。

Table 1. Effect of different colchicine concentrations and incubation time on the germination of *E. cyathophora*.

濃度 Conc. (g·L ⁻¹)	時間 Times (hr)	萌芽率 Seed germination ratio (%)	存活率 Survival ratio (%)	倍體數誘變率 ^y Ploid mutant ratio (%)	型態變異率 Mutation ratio (%)
0	24	100.0 (28/30)	100.0 (28/28) ^z	0 (0/28)	0 (0/28)
0.1	24	56.7 (17/30)	82.4 (14/17)	0 (0/14)	0 (0/14)
0.1	48	21.7 (13/30)	92.3 (12/13)	0 (0/12)	0 (0/12)
0.1	72	73.3 (22/30)	86.4 (19/22)	0 (0/19)	0 (0/19)
0.25	24	21.7 (13/30)	100.0 (13/13)	0 (0/13)	0 (0/13)
0.25	48	40.0 (12/30)	100.0 (12/12)	8.4 (1/12) ^y	8.4 (1/12) ^y
0.25	72	76.7 (23/30)	86.9 (20/23)	0 (0/20)	0 (0/20)
0.5	24	53.3 (16/30)	100.0 (16/16)	0 (0/16)	0 (0/16)
0.5	48	50.0 (15/30)	93.4 (14/15)	0 (0/14)	0 (0/14)
0.5	72	63.3 (19/30)	84.2 (16/19)	0 (0/16)	0 (0/16)
1	24	36.7 (11/30)	100.0 (11/11)	0 (0/11)	0 (0/11)
1	48	26.7 (08/30)	87.5 (07/08)	0 (0/07)	0 (0/07)
1	72	50.0 (15/30)	73.4 (11/15)	18.2 (2/11)	18.2 (2/11)

^z: 存活植株數/總萌芽數，於種植後 2 周調查存活率。

^y: 相對 DNA 含量與對照組具有明顯差異之誘變株數量。

^z: NO. of survival plant / NO. of total seed germination, investigated after 2 weeks.

^y: NO. of mutants with obvious difference of DNA content contrast with control.

觀察秋水仙素溶液浸泡處理獲得之猩猩草誘變株，比較其營養性狀與原株之差異。根據性狀調查數據，誘變單株之葉片長寬並無較原株更加增加，但葉身比例都比原株更減少，為短橢圓型態葉片，葉緣型態也由戟型邊緣，變成無缺刻的圓整葉緣(表 2、圖 1)。而生殖性狀與原株之比較，誘變單株之大戟花序直徑較原株並無增加。但四倍體(Cy-M1、Cy-M2)及混倍體(Cy-M3)誘變植株之大戟花序與原株相比各具不同之差異(表 2)。且與猩猩草原株之苞葉對比之下，各個誘變單株苞葉之橘色斑塊顏色皆較深且濃，橘色斑塊也較原株更加持久且不易退色(圖 2)。

於顯微鏡下觀察猩猩草原株與其誘變單株之花粉管萌發情形，各個誘變單株之花粉活力與原株相比皆有提升的現象，花粉粒直徑也因倍體數增加而增大，且能觀察到大小孢子的存在(圖 1F)，在誘變單株中，Cy-M 單株(四倍體)的花粉活力(16.3%)為最高，花粉粒直徑(49.3 μm)也是最大的。

猩猩草四倍體誘變株經自交授粉後，獲得子代之倍數性調查結果中，羊毛脂膏處理獲得之四倍體誘變株子代有 108 株二倍體、24 株四倍體，四倍體子代佔 22.2%；而種子浸漬處理獲得之四倍體誘變株子代有 78 株二倍體、18 株四倍體，四倍體子代佔 23.1%。

討 論

本試驗以 0.1、0.25、0.5 和 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素浸漬猩猩草種子，搭配浸泡時間為 24、48 和 72 小時，處理結果中，僅有在 0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液分別浸泡 24 小時和 72 小時之處理下，能獲得多倍體誘變株(表 1)。文獻顯示以 0.05、0.1% 秋水仙素搭配 24 和 48 小時處理甜葉菊(*Stevia rebaudiana*)之種子，結果以 0.1% 秋水仙素浸漬 24 小時，有 80.0% 的存活率，獲得 10% 的混倍體和 20.0% 的四倍體(Zhang *et al.*, 2018)。以 0.05、0.1 和 1.0% 秋水仙素搭配 24、48 和 96 小時處理可樂豆樹(*Colophospermum mopane*)之種子，結果以 0.1% 和 1.0% 秋水仙素分別浸漬 96 小時浸漬 24 小時後，皆為 5% 的存活率和 100% 的四倍體誘變率(Rubuluza *et al.*, 2007)。上述文獻之數據結果，若符合處理濃度達到半數致死量(median lethal dose)，其多倍體化之誘導效率較佳。將秋水仙素濃度增加及處理時間增長時，雖會使培植體存活率大幅下降，但多倍體化誘變效率會提升。本試驗中四個處理濃度之萌芽率及存活率皆相差不大，且多數處理未達半致死量，推測秋水仙素溶液之濃度可再提高，應能使誘變效率提升。

本試驗以秋水仙素浸泡種子成功獲得四倍體植株其葉片較圓整無缺刻，苞葉顏色較原株加深，且較不易退色(表 2、圖 1&2)，可提升其觀賞價值。Mears (1980)證實多倍體植物在遺傳上與外觀形態與二倍體植物的差異，如器官較大、光合作用效率增加，且少數多倍體植物因染色體加倍，可因此提高抵抗逆境、病蟲害等相關基因之表現量，而具有較佳之耐逆境能力(Osborn *et al.*, 2003；Yang *et al.*, 2013；Butt *et al.*, 2014)。誘變處理

表 2. 猩猩草 (*E. cyathophora*) 經不同濃度秋水仙素浸種獲得之誘變植株型態調查^z。Table 2. The morphological characteristics between *E. cyathophora* and its mutants obtained from colchicine treatment^z.

誘變 單株 Mutants	處理 Agent (g·L ⁻¹ /hr)	葉長 Length (cm)	葉寬 Width (cm)	葉長寬比 Length/Width ratio	單一大戟花序直徑 Cyathium diameter (cm)	花粉粒直徑 Pollen diameter (μ m)	花粉活力 ^y Pollen germination (%)	相對 DNA 含量 Relative DNA content (units)
CK	-	7.9 a	3.6 a	2.2 a	14.8 a	26.3 b	2.1 d	2
Cy-M1	0.25/48	7.8 a	3.8 a	2.1 a	12.3 b	49.3 a	16.3 a	4.18
Cy-M2	1/72	7.5 a	3.8 a	2.0 ab	10.4 d	48.7 a	7.3 c	3.74
Cy-M3	1/72	7.7 a	3.6 a	2.1 a	11.3 c	25.2, 48.6 a	9.0 b	2, 3.92

^z : 數據以最小顯著性差異測驗做顯著差異比較, $p \leq 0.05$ 具有顯著差異。

^y : 將花粉培養在含 15% 蔗糖之 BK 培養基中, 25°C 黑暗環境下培養 10 小時。

^z : Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

^y : The pollen cultured on BK medium containing 15% sucrose and 25°C in 10 hours dark condition.

表 3. 猩猩草四倍體誘變株 (*E. cyathophora*) 自交後代之倍數性調查。Table 3. The ploidy of self-cross hybrids from tetraploid mutants in *E. cyathophora*.

自交 ^z Selfing	播種數 No. of sowing seeds	發芽數 No. of seed germination	發芽率 Germination Rate (%)	種子之倍數性 Ploidy of seeds		四倍體 種子比率 Tetraploid seed ratio(%)
				二倍體 Diploid	四倍體 Tetraploid	
羊毛脂膏 Colchicine(S)	150	136	90.6	108	24	22.2
種子浸漬 Colchicine(L)	150	96	64.0	78	18	23.1

^z：自交系種子來自經秋水仙素羊毛脂膏處理或種子浸泡秋水仙素獲得之猩猩草四倍體誘變株。

^z：The seeds of self-cross hybrids from tetraploid mutants in *E. cyathophora* obtained from colchicine treatment.

結果中獲得非整倍體 (aneuploid) (Cy-M4) 及混倍體植株 (Cy-M3) (表 2)，文獻已指出導致植物形成非整倍體可能之原因，如同源染色體配對異常、複製後無法正常分離，或是在細胞分裂過中增加或喪失染色體，由於秋水仙素之作用是抑制微小管合成，進而干擾紡錘體運作，使染色體複製後不能分離 (Ranney, 2006)。而混倍體的產生，可能是因浸泡秋水仙素溶液的高度，無法使種子均勻吸收，只有部分組織被誘導成多倍體，形成嵌合體 (chimera) 或是混倍體，同時具有二倍體及四倍體的細胞。可樂豆樹 (*Colophospermum mopane*) 及甜葉菊 (*Stevia rebaudiana*) 之種子進行秋水仙素浸漬後，除成功誘導出四倍體也產生混倍體植株 (Rubuluza *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018)。使用秋水仙素誘導植株多倍體化，時常容易獲得混倍體，是由於秋水仙鹼僅作用於分裂中的細胞，而種子內不是每個細胞都被多倍體化時，就會產生混倍體或鑲嵌體 (Chen *et al.*, 2006)。

經由顯微鏡觀察猩猩草及誘變株之花粉管伸長，調查數據顯示誘變株之花粉活力皆較原株提升，花粉粒直徑也隨著倍體數提升而增加，且能觀察到大小孢子 (圖 1F)。猩猩草誘變單株 Cy-M1、Cy-M2、Cy-M3 之花粉活力 (16.3、7.3、9.0%) 皆超越其原株 (2.1%)。這與其他作物有相似之處，研究指出，利用 oryzalin 將玫瑰誘導多倍體後，其四倍體誘變株花粉活力較二倍體原株有所提升 (Kermani *et al.*, 2003)。使用薑的二倍體觀賞品種或金光菊種間雜交不稔性後代誘變成多倍體植株後，其多倍體植株的花粉活力也較其原株有提升之現象 (Adaniya and Shirai, 2001; Oates *et al.*, 2012)。多倍體植物產生之未

減數花粉，較 1n 花粉細胞內有花粉管萌發所需物質多，因此花粉活力較佳 (Kumar *et al.*, 2014)。

試驗以秋水仙素溶液浸泡二倍體猩猩草種子，及使用固態羊毛酯膏 (含秋水仙素) 塗抹二倍體猩猩草之側芽，成功誘導產生四倍體猩猩草後，使其自交授粉並收集種子，於播種後，進行其子代之倍數性分析，經檢測結果顯示子代中有 80% 依然為二倍體，僅產生 20% 四倍體子代，且無獲得三倍體子代 (表 3)。四倍體猩猩草的自交子代中多數仍為二倍體，據此推測猩猩草具有無融合生殖的繁衍能力。但這與常見於蒲公英族群中的無融合生殖現象有所不同，文獻指出關西蒲公英 (*Taraxacum japonicum*) 之野外族群進行有性繁殖的繁衍過程，以二倍體植株為主。而少數比例自然產生的四倍體植株會與這些二倍體植株進行雜交，創造出三倍體植株，後續這些三倍體子代將無融合生殖進行繁衍。不過近年來發現，這些三倍體族群也具雜交能力，經過觀察它們的花粉粒，證實具有 1n 雄配子和 2n 雄配子，可與二倍體族群進行雜交，產生基因重組過的三倍體與四倍體子代 (Mártonfióvá, 2015)。一般行無融合生殖之植物，在自然環境中二倍體植株因減數分裂異常，產生 2n 配子再雜交後所產生之四倍體族群，通常會具有無融合生殖能力，能在野外環境中迅速增加族群數目 (Brukhin, 2017)。Krahulec 等人 (2011) 長時間調查與分析野外的柳菊屬 (*Pilosella*) 族群內的倍數性變化，從研究結果顯示，其族群內的倍數性變化具有循環規律，為二倍體-四倍體-二倍體的循環繁殖機制。此循環機制能使四倍體族群與有性繁殖的二倍體族群做基因交流，以維護族群間的基因歧異度。循環的開始是由於二倍體族群減數分裂異常，產生 2n 配子，彼此雜交後產生新的四倍體族群，在四倍體族群中會有少數植株具備有性生殖能力，其子代裡會有單倍體 (haploid)，其實就是二倍體植株，這些二倍體子代再與其他二倍體族群互相雜交，最終完成基因交換，達成野外的循環繁殖。此現象與本試驗猩猩草的自交子代倍數性分析結果十分相似，猩猩草四倍體植株能產生二倍體及四倍體後代，推測猩猩草可能也具有二倍體及四倍體族群循環繁殖機制。此結果將利於後續深入探究猩猩草無融合生殖機制，及評估未來育種利用之可能。

參考文獻

- 陸雅芬。2015。聖誕紅之多倍體化與種間雜交。國立中興大學園藝系研究所碩士論文。pp. 29-30。
- 應紹舜。1991。台灣高等植物彩色圖誌(第四卷)。淑馨出版部。台北。650pp。
- Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Scientia Hort.* 88: 277-287.
- Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50: 859-865.
- Brukhin, V. 2017. Molecular and genetic regulation of apomixis. *Russ. J. Genet.* 53: 943-964.

- Butt, S. J., A. Sarwar, N. A. Abbasi, and S. K. Chaudhari. 2014. Performance of *in vitro* Rosa mutant lines developed by the application of gamma irradiation and colchicine. *Int. J. Biosci.* 5: 256-264.
- Chen, L. P., Y. J. Wang, and M. Zhao. 2006. *In vitro* induction and characterization of tetraploid *Lychnis senno* Siebold et Zucc. *HortScience* 41: 759-761.
- Kermani, M. J., V. Sarasan, A. V. Roberts, A. Yokoya, J. Wentworth, and V. K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effects on plant morphology and pollen viability. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1195-1200.
- Kumar, P., P. K. Rana, Humshikha, V. J. Singhal, and R. C. Gupta. 2014. Cytogeography and phenomenon of cytomixis in *Silene vulgaris* from cold regions of Northwest Himalayas (India). *Pl Syst Evol* 300: 831-842
- Mártonfiová, L. 2015. Hybridization in natural mixed populations of sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum* sect. *Taraxacum*): Why are the diploid sexuals not forced out? *Folia Geobot.* 50: 339-348.
- Mears, J. A. 1980. Chemistry of polyploids: a summary with comments on *Parthenium* (Asteraceae-Ambrosiinae). In: Lewis W. H. (ed) *Polyploidy: biological relevance*, vol 13. Plenum Press. New York. pp. 77-102.
- Oates, K. M., T. G. Ranney, and D. H. Touchell. 2012. Influence of induced polyploidy on fertility and morphology of *Rudbeckia* species and hybrids. *Hort. Sci.* 47: 1217-1221.
- Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, and H. S. Lee. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genetics* 19: 141-147.
- Pickens, K. A., Z. M. Cheng, and S. A. Kania. 2006. Effect of colchicine and oryzalin on callus and adventitious shoot formation of *Euphorbia pulcherrima* 'Winter Rose'. *Hort. Sci.* 41: 1651-1655.
- Ranney, T. G. 2006. Polyploidy: from evolution to new plant development. *Proc. Int. Plant Propagator soc.* 56: 137-142.
- Rubuluza, T., R. V. Nikolova, M. T. Smit, and K. Hannweg. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. *S. Afr. J. Bot.* 73: 259-261.
- Taylor, J. M., R. G. Lopez, C. J. Currey, and J. Janick. 2011. The poinsettia: history and transformation. *Chronica Hort.* 51: 23-28.
- Yang, N., Y. Sun, Y. Wang, C. Long, Y. Li, and Y. Li. 2013. Proteomic analysis of the low mutation rate of diploid male gametes induced by colchicine in *Ginkgo biloba* L. *PLoS One* 8: 1-8.
- Zhang, H., S. An, J. Hu, Z. Lin, X. Liu, H. Bao, and R. Chen. 2018. Induction, identification and characterization of polyploidy in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Biotechnol. J.* 35: 81-86.

Euphorbia Cyathophora Polyploidization and Analysis of Self-Pollinated Progenies Ploidy

Chen-Hao Liao¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Pei-Jung Wen³⁾ Yen-Ming Chen⁴⁾

Key words: *Euphorbia cyathophora*, Apomixis, Polyploidization, Pollen fertility

Summary

In this study, seeds of *Euphorbia cyathophora* were imbibed in different colchicine concentrations to induce polyploidy, detected ploidy and the pollen germination (%) of mutant plants and their self-pollinated progenies. The mutants were detected by flow cytometry. Seeds of *E. cyathophora* were imbibed in 0.25 g·L⁻¹ for 24 hours obtained one tetraploid (Cy-M1, 4.18) and had 8.4% ploid mutant ratio; In 1 g·L⁻¹ imbibed treatment for 72 hours obtained one tetraploid (Cy-M2, 3.74) and one mixploid (Cy-M3, 2/3.92) and the ploid mutant ratio was 18.2%. Morphology of mutants was significantly different from the original plant. The leaf length and leaf width of mutants were no difference with the original plant and leaf margins were round. The cyathium diameter of mutants all reduced. The pollen germination of the mutants was higher than original plant (2.1%), and the diameter of the pollen grains increased. The highest pollen germination (16.3%), and the largest pollen grain diameter (49.3 μm) found in Cy-M1.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Research Assistant, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

4) Assistant professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.