

## 九重葛之組織培養化學誘變

范芳綺<sup>1)</sup> 朱建鏞<sup>2)</sup>

關鍵字：九重葛、秋水仙素、稻米素、疊氮化鈉

**摘要：**本試驗以無菌培養的九重葛'Pink Pixie'與'Pink Pixie Variegata'作為材料。取 4 mm 長之無菌枝梢，培養於含各種誘變劑之培養基。培植體的致死率及腋芽萌芽率隨著誘變劑處理時間及濃度增加而降低。當以 oryzalin 處理 0.1%-0.3%時，未獲得任何的變異株；'Pink Pixie Variegata'以 0.1% Colchicine 溶液處理 1 天的培植體獲得 1 株嵌合變異株'Pink Pixie Variegata M<sub>1</sub>'。經再繼代培養分離出穩定的變異株'Pink Pixie Variegata M<sub>2</sub>'。另外'Pink Pixie'經 0.25 mM 疊氮化鈉溶液處理 1 天後也獲得 2 株花形態的變異株。

### 前 言

九重葛(*Bougainvillea* spp.)為雙子葉植物(Dicotyledonae)紫茉莉科(Nyctaginaceae)之多年生蔓性木本花卉。自原產南美引種到世界各地栽培後，在大部分氣候溫暖的地區，包括印度、台灣、越南、馬來西亞、澳大利亞、地中海地區、加勒比海地區、墨西哥、南非和美國的亞利桑那州、加利福尼亞州、佛羅里達州、夏威夷與德克薩斯州南部，九重葛皆為重要的經濟觀賞花卉(Srivastava *et al.*, 2009; Liu and Chang, 2011)。九重葛在台灣的栽培約始於 1872 年，由馬偕博士(Dr. George Leslie Mackay)從英國引進。西元 1901 年日本人田代安定再次由日本引入，西元 1992~1993 年間，薛聰賢先生又由東南亞各國引進 40 餘品種，現已成為廣泛應用於景觀的觀賞花木之一(郭，2000)。

誘變育種可使用於改善於一個性狀，如花色、花型、花序、葉片特性(類型或大小)和生長特性(緊湊或分枝性)，和生理特性(包括光週期、提早開花、維持花的品質、對於生物和非生物的逆境耐受性)，又花卉作物大多以無性繁殖方法生產種苗，因此利用誘變育種，在花卉作物的可行性很高(黃，1998; Shibata, 2008)。現有的九重葛品種多為二倍體(2N=

---

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教授，通訊作者。

34) 且具不稔性，在傳統的雜交育種受限制。另外現有的許多九重葛品種，是經由自然芽變或人工誘變而獲得。本試驗擬以'Pink Pixie'與'Pink Pixie Variegata'為材料，利用組織培養配合誘變劑進行誘變育種方法之研究，期能育出不同性狀的新品種。

## 材料與方法

### 一、誘變材料

取九重葛'Pink Pixie'與'Pink Pixie Variegata'之頂梢，經 1% NaOCl 滅菌和無菌水沖洗後，培養在含 MS(Murashige and Skoog, 1962)培養基與 0.5 mg/l 6-benzylamino purine(BA, Sigma Chemical, U.S.A)(涂, 2010)以培養量化，供作誘變材料。

### 二、試驗方法

#### (一)、培養基配製和培養環境

以全量 MS(Murashige and Skoog, 1962)商業配方(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)，另再添加 2 mg/l (BA)、30 g/l 蔗糖(台糖細粒特砂)、8 g/l 的洋菜(Difco Bacto agar)。將洋菜加入培養基前，先以 1N 之 NaOH 或 HCl 調整 pH 值至  $5.7\pm 0.1$ 。將培養基加熱融解後，利用自動分注器進行培養基分裝。每支試管(15cm $\times$ 2.5cm)裝填 10 ml 培養基。每瓶 GA-7 容器(Magenta Corporation, Chicago, U.S.A.)裝填 40 ml 之培養基。封蓋後的培養基置於殺菌釜中，以 121 $^{\circ}$ C (1.1kg/cm $^2$ )滅菌 15 分鐘後，取出置於 60 $^{\circ}$ C 恆溫箱備用。Colchicine、Oryzalin 或 NaN $_3$  依試驗濃度經無菌過濾膜(Millipore, 0.22 $\mu$ M)過濾滅菌後，分別注入至備用之培養基。經搖動混合均勻後靜置凝固備用。培養室溫度為 25 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C。以冷白螢光燈(FL 40D/38)提供光合作用光子流密度(Photosynthetic Photon Flux Density, PPF)為 35 $\pm$ 5 $\mu$ mol $\cdot$ m $^{-2}$ s $^{-1}$ 之光照。除暗培養外，所有培養之光週期明期為 16 小時。

#### (二)、誘變方法

##### (1) Colchicine 誘變

自器內繁殖植株，取約 4 mm 長之莖段，將葉片去除後扦插於含有 BA 0.5 mg/l，以及分別含 Colchicine 0、0.1 或 0.4% 的固態培養基中，經 1、3、5、7、9 天培養後，移出培植體經無菌水沖洗 3 次，再扦插於含有 BA 2 mg/l 而不含秋水仙素的固態培養基繼續培養，一個月後調查其腋芽萌芽與癒傷組織形成。每處理 4 個培植體為一重複，每處理 3 重複。

##### (2) Oryzalin 誘變

自器內繁殖植株，取約 4 mm 長之莖段，將葉片去除後扦插於含有 BA 2 mg/l 及 Oryzalin 0、0.1、0.2、0.3% 等濃度的固態培養基，進行 6、12、24、48 小時的黑暗培養，處理後將培植體經無菌水沖洗 3 次，再扦插於含有 BA 2 mg/l 而不含 Oryzalin 的固態培養基繼續培養，於黑暗下培養 7 日後移至光照下培養，於一個月後調查其側芽形成、褐化率與白化

率。每處理 12 個培植體為一重複，每處理 3 重複。

### (3) $\text{NaN}_3$ 誘變

先將 0.65g  $\text{NaN}_3$  溶於 pH=3 磷酸緩衝液(79.4 ml 0.1 M-citric acid + 20.55 ml 0.2 M- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )配製成 0.1M 磷酸緩衝液。另再配製含有 BA 2 mg/l 之 MS 固體培養基。於瓶內已繁殖之植株，取約 4 mm 長之莖段，將葉片去除後扦插於含有疊氮化鈉 0、0.25、0.5 或 0.75mM 的固態培養基中，於黑暗培養 1 或 2 天後，移出培植體經無菌水沖洗 3 次，再扦插於含有 BA 2 mg/l 而不含  $\text{NaN}_3$  的固態培養基繼續培養，於一個月後調查其植株形態與存活率。每處理 16 個培植體為一重複，共 3 重複。

### (三)、'Pink Pixie Variegate'變異分離

'Pink Pixie Variegate'以 0.1%的 Colchicine 處理 1 天之培植體，獲得 1 株葉色嵌合變異株'Pink Pixie Variegate M<sub>1</sub>'，經組織培養成功分離為一單獨個體'Pink Pixie Variegate M<sub>2</sub>'(圖 3 及圖 4)。以莖段為培植體以不定芽增殖的方式，培養於 BA 2 mg/l 之全量 MS 固體培養基進行增殖量化。待瓶內再生株長度 $\geq$ 3 cm 時將之移出，基部沾 IBA 2000 mg/kg 粉劑，扦插於含泥炭土(Hochmoortorf für jeden Garten zersetzt H2-H5, karl wolpe, Garmen)和 2 號珍珠石(好成特選珍珠岩 2-3mm, Hopes Int'l Floriculture & Horticulture Co.)以體積比 2:1 混合而成的穴盤中，置於噴霧扦插床，待發根存活後，定植於 2 吋黑色塑膠軟盆中，再移植至 3 吋塑膠盆(盆徑 7.5 cm)，置於中興大學園藝試驗場防雨棚下的高床上，按一般栽培管理。

### (四)、統計分析

試驗設計採用完全隨機設計(completely randomized design, CRD)，每一容器視為 1 重複，每處理皆進行 3 重複，試驗數據利用 CoStat 6.1 軟體(CoHort software, Minneapolis, USA)以 LSD 比較 5% 差異顯著性。

## 結 果

### (1) Colchicine 誘變

將'Pink Pixie'和'Pink Pixie Variegate'莖段處理 0.1 或 0.4%的 Colchicine，經 1、3、5、7 或 9 天培養，1 個月後調查其腋芽萌芽與癒傷組織形成。在'Pink Pixie'以 0.1 及 0.4%的 Colchicine 處理不同天數後，結果顯示存活率皆較對照組低。經 0.1% Colchicine 處理 9 天芽體形成率降至 50%，以較少天數處理的培植體，芽體形成率都在 66.7%以上。處理 0.4% Colchicine 時，1 天及 3 天的芽體形成率分別為 66.7%及 58.3%，隨著天數的延長，芽體形成率也隨之下降，顯示 Colchicine 處理會對培植體造成傷害，在 7 天時有最低的芽體形成率為 8.3%，隨著 Colchicine 處理濃度與時間的增加，癒傷組織形成率也會隨著遞增(表 1)。「Pink Pixie Variegate」隨著處理時間延長，芽體形成率明顯下降，經 0.1% Colchicine 處理 7 及 9 天存活率分別為 8.3%及 16.6%。當處理 0.4% Colchicine 7 天及 9 天時，癒傷

組織形成率為 100%及 91.7%(表 1)。「Pink Pixie Variegate」以 0.1%處理 1 天時獲得 1 株葉色嵌合變異株「Pink Pixie Variegate M<sub>1</sub>」，經組織培養成功分離為一單獨個體「Pink Pixie Variegate M<sub>2</sub>」(圖 1)，其葉色表現為，主要顏色 RHS 143C 在葉身而次要顏色 RHS 137A 在葉緣，與「Pink Pixie Variegate」的主要顏色 RHS 137B 在葉身，次要顏色 RHS 150D 在葉緣，有明顯之不同(圖 2)。其他成活的 45 株，葉片與原株相同但尚未開花。

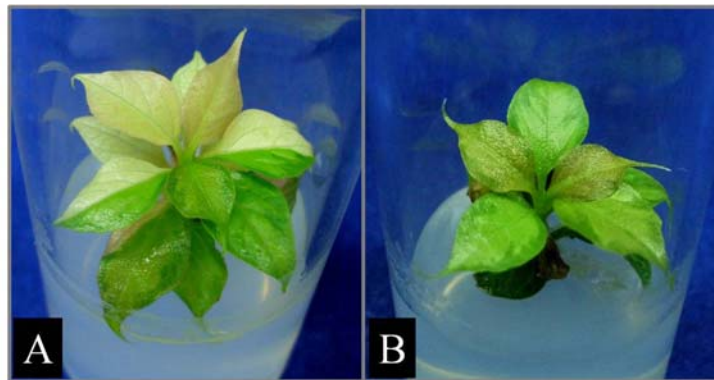


圖 1. 'Pink Pixie Variegate'處理 Colchicine 後出現的變異株 M<sub>1</sub> (A)以及經數次繼代分離之變異株 M<sub>2</sub> (B)。

Fig. 1. The M<sub>1</sub> mutant (A) of 'Pink Pixie Variegate' after Colchicine treatment and separated mutant M<sub>2</sub> (B) after several subcultures.



圖 2. 'Pink Pixie Variegate'原株(A)及經 Colchicine 處理所得誘變株(B)之形態差異。

Fig. 2. Morphological difference between B. 'Pink Pixie Variegate' (A) and its mutant, (B) obtained from treating Colchicine.

## (2) Oryzalin 誘變

將'Pink Pixie'和'Pink Pixie Variegate'莖段處理 0.1、0.2 或 0.3% 的 Oryzalin，經 6、12、24 或 48 小時培養，於 1 個月後調查其褐化、白化苗與新梢生長。隨 Oryzalin 處理濃度及處理時間的增加，死亡率有明顯上升的趨勢。'Pink Pixie'在 0.1% 處理 6、12 或 24 小時其側芽形成率與對照組相似，但至 48 小時則降至 22.7%；0.2% 處理 6、12 或 48 小時其側芽形成率都在 32.6 % 以上，唯 24 小時為 11.1%；以 0.3% 處理 6 或 12 小時其側芽形成率分別為 19.4% 與 13.1%，培植體在 24 或 48 小時則無任何側芽形成，後者死亡率高達 100% (表 2)。'Pink Pixie Variegate'在 0.1% 處理 12 或 24 小時其側芽形成率與對照組相似，都在 91.7% 以上，48 小時則降至 41.7%；0.2% 處理 24 或 48 小時有最低的側芽形成率，分別為 5.6% 與 2.8%；0.3% 處理 6 小時有最高的新梢形成率 25%，48 小時死亡率高達 100% (表 2)。誘變株共 36 株，但皆未發現異形株。

## (3) $\text{NaN}_3$ 誘變

培植體經  $\text{NaN}_3$  處理後，培植體隨處理時間增長及濃度增加急遽死亡，又所有誘變材料在 1 mM 與 2 mM 處理後，皆全部死亡(數據未顯示)。'Pink Pixie'經  $\text{NaN}_3$  處理 1 天，濃度為 0.5 mM 時全數死亡，濃度為 0.25 mM 有較高之存活率 41.7%；當處理 2 天時，不論濃度培植體皆全數死亡(3)。'Pink Pixie Variegate'經  $\text{NaN}_3$  處理 1 天，濃度為 0.75 mM 時全數死亡，濃度為 0.25 或 0.5 mM，存活率分別為 16.7% 與 18.8%；當處理 2 天時，濃度為 0.25 mM 有最低存活率 4.2% (表 3)。'Pink Pixie'莖段經 0.25 mM  $\text{NaN}_3$  處理後，已獲得 2 株異形株，其中 1 株苞葉主色仍為原來的粉紅色，但葉端呈黃綠色，兩色界限不明顯，另外 1 株苞葉和花瓣變狹長，但顏色有明顯差異(圖 3)。



圖 3. 'Pink Pixie'原株(A)，經疊氮化鈉處理所得誘變株：(B)苞片顏色變異，(C)苞片形狀變異。

Fig 3. Morphological difference between 'Pink Pixie' (A) and its mutants : (B) bract off-color mutant, (C) bract off-shape mutant by  $\text{NaN}_3$ .

表 1. Colchicine 處理對 'Pink Pixie' 與 'Pink Pixie Variegate' 芽體生長之影響

Table 1. Effects of colchicines treatment on shoot growth of 'Pink Pixie' and 'Pink Pixie Variegate'.

Colchicine (%)	Duration (days)	'Pink Pixie'			'Pink Pixie Variegate'		
		Shoot growth (%)	Cullas growth (%)	Shoot growth (%)	Cullas growth (%)	Shoot growth (%)	Cullas growth (%)
0.0	0	100.0 a <sup>z</sup>	0.0 e	91.7 a	0.0 e	91.7 a	8.3 d
0.1	1	83.3 ab	16.7 de	91.7 a	16.7 de	91.7 a	8.3 d
0.1	3	75.0 abc	25.0 cde	58.3 b	25.0 cde	58.3 b	41.7 cd
0.1	5	66.7 bc	33.3 cde	75.0 ab	33.3 cde	75.0 ab	25.0 cd
0.1	7	75.0 abc	25.0 cde	8.3 c	25.0 cde	8.3 c	91.7 a
0.1	9	50.0 cd	50.0 bc	16.6 c	50.0 bc	16.6 c	83.3 ab
0.4	1	66.7 bc	33.3 cde	58.3 b	33.3 cde	58.3 b	41.7 cd
0.4	3	58.3 bc	41.7 cd	16.7 c	41.7 cd	16.7 c	50.0 bc
0.4	5	25.0 de	75.0 ab	16.7 c	75.0 ab	16.7 c	50.0 bc
0.4	7	8.3 e	91.7 a	0.0 c	91.7 a	0.0 c	100.0 a
0.4	9	16.7 e	83.3 a	8.3 c	83.3 a	8.3 c	91.7 a

<sup>z</sup> Means followed by the same letter within columns are not significantly different by least significant difference (LSD) test at 5 % level.

表 2. Oryzalin 處理對 'Pink Pixie' 與 'Pink Pixie Variegate' 芽體生長之影響  
 Table 2. Effects of oryzalin treatment on shoot growth of 'Pink Pixie' and 'Pink Pixie Variegate'.

Oryzalin (%)	Duration (HR.)	'Pink Pixie'			'Pink Pixie Variegate'		
		New shoots (%)	Brown shoots (%)	Albino shoots (%)	New shoots (%)	Brown shoots (%)	Albino shoots (%)
0.0	0	97.2 a <sup>z</sup>	2.8 d	0.0 c	100.0 a <sup>z</sup>	0.0 g	0.0 c
0.1	6	91.7 a	8.3 cd	0.0 c	-	-	-
0.2	6	32.6 bc	60.4 b	6.9 c	25.0 cd	66.7 abc	8.3 c
0.3	6	19.4 cd	69.4 ab	11.1 c	25.0 cd	75.0 ab	0.0 c
0.1	12	97.2 a	2.8 d	0.0 c	94.4 a	5.6 fg	0.0 c
0.2	12	48.0 b	32.3 c	19.7 c	52.33 b	34.5 def	13.1 c
0.3	12	13.1 de	32.1 c	54.8 b	4.4 e	39.3 cde	56.3 b
0.1	24	94.4 a	2.8 d	2.8 c	91.7 a	8.3 efg	0.0 c
0.2	24	11.1 de	88.9 a	0.0 c	5.6 e	94.4 a	0.0 c
0.3	24	0.0 e	5.6 d	94.4 a	6.3 de	29.1 defg	64.6 b
0.1	48	22.7 cd	63.4 ab	13.9 c	41.7 bc	58.3 bcd	0.0 c
0.2	48	36.1 bc	63.89 ab	0.0 c	2.8 e	97.2 a	0.0 c
0.3	48	0.0 e	0.0 d	100.0 a	0.0 e	0.0 g	100.0 a

<sup>z</sup> Means followed by the same letter within columns are not significantly different by least significant difference (LSD) test at 5 % level.

表 3. 疊氮化鈉處理對 'Pink Pixie' 與 'Pink Pixie Variegate' 芽體培養之影響

Table 3. Effects of  $\text{NaN}_3$  on shoot growth in vitro cultured of 'Pink Pixie' and 'Pink Pixie Variegate'.

NaN <sub>3</sub> (mM)	Duration(days)	Survival (%)	
		'Pink Pixie'	'Pink Pixie Variegate'
0	1	100.0 a <sup>z</sup>	97.9 a
0.25	1	41.7 b	16.7 b
0.5	1	0.0 c	18.8 b
0.75	1	0.0 c	0.0 c
0	2	100.0 a	100.0 a
0.25	2	0.0 b	4.2 c
0.5	2	0.0 b	0.0 c
0.75	2	0.0 b	0.0 c

<sup>z</sup> Means followed by the same letter within columns are not significantly different by least significant difference (LSD) test at 5 % level.



## 討 論

Colchicine 與 Oryzalin 為一有絲分裂抑制劑(Anti-mitotic agents)，在植物細胞的有絲分裂過程中，抑制與微管蛋白二聚體(tubulin dimer)結合，讓染色體無法順利向兩極遷移(Dhoogh *et al.* 2009)。已知 Colchicine 與動物細胞的微管具高親和性(Morejohn *et al.*, 1984)，而 Oryzalin 則是與植物特定的微管蛋白結合，因此使用濃度低(Bajer and Molebajer, 1986; Hugdahl and Morejohn, 1993; Morejohn *et al.*, 1987)。

雖然在芒草(Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003)，棗(Gu *et al.*, 2005)，福祿考(Zhang *et al.*, 2008)，懸鈴木(Liu *et al.*, 2007)，水仙百合(Lu and Bridgen, 1997)，芋頭(Tambong *et al.*, 1998)和海芋(Cohen and Yao, 1996)顯示 Colchicine 可有效地誘導多倍體植物，但 Colchicine 對聖誕玫瑰(Dhooghe *et al.*, 2009)是無效的，在本試驗利用莖段，以 0.1 或 0.4% Colchicine 溶液處理 1、3、5、7 與 9 天，以及 0.1、0.2 或 0.3% Oryzalin 溶液處理 6、12、24 與 48 小時，進行‘Pink Pixie’和‘Pink Pixie Variegate’之多倍體誘變，也未獲得任何的多倍體變異的植株。由於有絲分裂抑制劑會干擾植物的生理，導致細胞分裂速度減慢，使得存活率較低(Swanson, 1957)。在本試驗也可看到進行試驗後存活率有降低的現象(表 1、表 2)。經過誘變處理後培植體的存活率，通常與誘變劑劑量及處理時間呈負相關(Fu *et al.*, 1995)，本試驗結果與此相符。Yan(2001)將火鶴的莖頂浸泡在 0.05% 的 Colchicine 處理後，發現會抑制植株的生長且新生的器官有畸形的現象發生，在本試驗不論處理 Colchicine 或 Oryzalin，隨著濃度的增加，新生的葉片有高比例的畸形發生，推測應為有絲分裂抑制劑所造成，又葉片畸形為一短暫現象，隨著培養時間的延長，植株又回復至正常葉片狀態，此現象與 Yan(2001)相同。本試驗未能成功誘導多倍體的原因可能為，培植體的使用不適宜所造成，因為莖段屬已發育完全，但有絲分裂抑制劑對植物的刺激作用，只發生在細胞分裂時期，而對那些處於靜止狀態的細胞不發生效用，因此處理的植物組織必須是細胞分裂最活躍、最旺盛的部位，通常處理的植株部位是萌動的或剛發芽的種子、正在膨大的芽、幼苗、嫩枝生長點及花序的花蕾等(Dhooghe *et al.*, 2011)。除此之外要提高誘導的效率，也必須考慮有絲分裂抑制劑種類的使用、施用方法及施用時機(Kermani *et al.*, 2003)。

在許多的園藝作物皆可看到嵌合體現象，如 *Yucca elephantipes* 的斑葉變異 (Pierik and Steegmans, 1983)和菊花(Earle and Langhans, 1974; Bush, *et al.* 1976)、香石竹(Hackett and Anderson, 1967)的花色變異。這些嵌合體大部分都起源於頂端分生組織(apical meristem)層是自發突變，如細胞層的葉綠素突變所形成的斑葉也屬嵌合體變異，此現象是由於突變細胞出現於一個細胞層所造成，而斑葉嵌合體取決於葉片所在的黃-白色組織(Marcotrigiano, 1997)。本試驗以 0.1% 處理 1 天時獲得 1 株葉色嵌合變異株‘Pink Pixie Variegate M<sub>1</sub>’ (圖 1)與上述的黃-白色組織相似。

目前很多的觀賞植物皆有嵌合體存在，嵌合體在植物花瓣和葉片的形狀、大小和顏色

上有很大的變化，對植物育種具有價值。若優良變異僅在花瓣等處出現，以扦插方法要將變異自嵌合體分離出來，並保存下去比較困難，因此組織培養具有其重要性與特殊優點。Canli 和 Skirvin(2008)利用具有有刺-無刺的玫瑰嵌合體，於器內分離純化出一個穩定遺傳的無刺玫瑰，本試驗也以組織培養自'Pink Pixie Variegata M<sub>1</sub>'成功分離出一新斑葉類型的'Pink Pixie Variegata M<sub>2</sub>'(圖 1)。Norris *et al.*.(1983)利用非洲堇斑葉嵌合體，以葉片進行不定芽的再生誘導，所有的再生植株均與其親本有相同的嵌合類型，本實驗也有相同的結果，取自'Pink Pixie Variegata M<sub>2</sub>'的莖段再生培養也與親本有相同的斑葉類型。在誘變育種過程，一旦選獲優良變異，即可利用營養繁殖法固定為新品種，不必考慮其基因型是否已經固定，特別是利用組織培養法將嵌合體分離，而可以長期保存與繁殖，隨著嵌合體研究工作的不斷深入，人們越來越認識到嵌合體在植物育種上廣闊的應用前景(Burge *et al.*, 2002)。

### 參考文獻

- 涂旭帆。2010。環境因素對九重葛結實之影響。國立中興大學園藝研究所碩士論文 72 pp。
- 郭能禎。2000。植物生長調節劑、枝條成熟度及修剪方式對九重葛生長及開花之影響。國立台灣大學園藝研究所碩士論文 135 pp。
- Bajer A. S., and J. Molebajer. 1986. Drugs with colchicine-like effects that specifically disassemble plant but not animal microtubules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 466:767-784.
- bamboo) through nodal bud culture. *J. Hort. Sci.* 70: 469-475.
- Burge, G. K., E. R. Morgan, and J. F. Seelye. 2002. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: past and future. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70:13-21.
- Bush, S. R., E. D. Earle, and R. W. Langhans. 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer. J. Bot.* 63: 729-737.
- Canli, F. A., and R. M. Skirvin. 2008. In Vitro separation of a rose chimera. *Plant cell Tiss. Org. Cult.* 95(3):353-361.
- Cohen, D., and J. L. Yao. 1996. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. *Plant Cell Tiss. Org.* 47:43-49.
- Dhooghe, E., W. Grunewald, L. Leus, and M.C. Van Labeke. 2009. In vitro polyploidisation of *Helleborus* species. *Euphytica.* 165:89-95.
- Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tiss. Org.* 104: 359-373.
- Earle, E. D. and R. W. Langhans. 1974. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. I. Multiple

- plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99:128-132.
- Fu, R., R. L. Anderson, and Z. R. Liu. 1995. Studies on induced mutation of fruit trees in vitro. *Acta Hort.* 403:111-116.
- Gu, X.F., A. F. Yang, H. Meng, and J.R. Zhang. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep.* 24:671-676.
- Hackett, W. P., and J. M. Anderson. 1967. Aseptic multiplication and maintenance of differentiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 90: 365-369.
- Hugdahl, J. D., and L. C. Morejohn. 1993. Rapid and reversible high affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 102:725-740.
- Kermani, M. J., V. Sarasan, A. V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth, and V. K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theor. Appl. Genet.* 107:1195-1200.
- Liu, F. Y., and Y. S. Chang. 2011. Effects of shoot bending on ACC content, ethylene production, growth and flowering of bougainvillea. *Plant Growth Regul.* 63: 37-44.
- Liu, G., Z. Li, and M. Bao. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica.* 157:145-154.
- Lu, C., and M. P. Bridgen. 1997. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*. *Euphytica.* 94:75-81.
- Marcotrigiano, M. 1997. Chimeras and variegation: patterns of deceit. *HortScience.* 32:773-784.
- Morejohn, L. C., T. E. Bureau, L. P. Tocchi, and D. E. Fosket. 1984. Tubulins from different higher-plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1440-1444.
- Morejohn, L. C., T. E. Bureau, J. Molebajer, A. S. Bajer, and D. E. Fosket. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta.* 172:252-264.
- Murashige, T., and F. Shoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.
- Norris, R. E., R. H. Smith, and K.C. Vaughn. 1983. Plant chimeras used to establish de novo origin of shoots. *Science.* 220:75-76.
- Petersen, K. K., P. Hagberg, and K. Kristiansen. 2002. In vitro chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. *Plant Breed.* 121:445-450.
- Petersen, K. K., P. Hagberg, and K. Kristiansen. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell Tiss. Org.*

73:137-146.

- Pierik, R. L. M., and H. H. M. Steegmans. 1983. Vegetative propagation of a chimerical *Yucca elephantipes* Regel in vitro. *Sci. Hort.* 21: 267-272.
- Srivastava, R., S. Shukla, A. Soni, and A. Kumar. 2009. RAPD-based genetic relationships in different *Bougainvillea* cultivars. *Crop. Breed. App. Biotech.* 9:154-163.
- Swanson, C. P. 1957. *Cytology and cytogenetics*. Prentice Hall, New Jersey.
- Tambong, J. T., V. T. Sapra, and S. Garton. 1998. In vitro induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. *Euphytica.* 104:191-197.
- Yan, G. 2001. Chromosome doubling of wax flower plantlets regenerated in vitro. In *The Proceeding Biology of Wax flower*. pp. 11-20.
- Zhang, Z., H. Dai, M. Xiao, and X. Liu. 2008. In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica.* 159:59-65.

## The Mutation of *Bougainvillea in vitro* by Mutagens

Fang-Chi Fan <sup>1)</sup> Chien-Young Chu <sup>2)</sup>

Key Word: *Bougainvillea*, Colchicine, Oryzalin, Sodium azide

### Summary

In vitro shoots of *Bougainvillea* 'Pink Pixie' and 'Pink Pixie Variegata' were used as explant. Shoots of 4 mm in length were cultured various medium containing different mutagens. Treat with higher concentration and longer exposure time of mutagens, the survival and lateral shoot sprouting were decreased. When treatment with oryzalin in concentrations varying from 0.1%-0.3%, did not get any mutants. 'Pink Pixie Variegata' treated with Colchicine of 0.1% for 1 day, proliferated a chimeric mutant 'Pink Pixie Variegata M<sub>1</sub>'. The mutant 'Pink Pixie Variegata M<sub>2</sub>' were separated after several subcultures. In addition, 'Pink Pixie' treated with NaN<sub>3</sub> of 0.25 mM for 1 day, obtained two flower types mutants.

---

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

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

