

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系



博士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

重瓣日日春之花芽形態、花形遺傳及育種

Floral Morphology, Inheritance, and Breeding of

Double-flowered *Catharanthus roseus*

陳錦木

Chin-Mu Chen

指導教授：葉德銘 教授

Advisor: Prof. Der-Ming Yeh

中華民國 102 年 7 月

July, 2013



誌謝 (Acknowledgement)



本文之完成首先感謝恩師 葉德銘老師，在研究上多年來細心的指導，並在我研究遭遇瓶頸幾乎想放棄時鼓勵我重新開始，讓我能在修業的最後期限前完成論文畢業，尤其在本論文撰寫期間，又蒙老師的包容與敦促，夜以繼日地批閱初稿，逐字斧正，始臻完成，感激之情無以表達。感謝楊雯如、沈榮壽老師擔任學生的論文輔導委員，提供論文試驗上寶貴的建議讓研究能順利進行，及給予學生鼓勵，使學生有信心寫出這本論文。感謝李咩老師及陳福旗老師在論文初稿上悉心斧正，使論文更臻完善，陳香君老師在植物形態發育角度審視研究的協助，特置卷首，以表由衷謝意。

本論文能夠完成還要感激子耀及進學在試驗及報告撰寫上協助與幫忙，提供巨大的支援與知識激勵，小范協助論文校正，奕璇協助花朵解剖操作拍照，使我可以有效率地進行試驗。由於我出現在花卉館的時間不多，也謝謝韶妤及昱均在相關事務聯繫上的協助，皆令我衷心感激。

回想 9 年前幸蒙桃園農改場長官推薦回校在職進修，讓我有機會完成博士學位的夢想，在論文付梓後期望能利用在校所學服務社會及貢獻國家。博士班進修過程中讓我感到遺憾的是我的前學業輔導委員嘉義大學沈再木老師積勞成疾離開我們，老師是我花卉學的啟蒙，感謝他帶領我進入花卉的世界，體驗花卉園藝的美，我希望把我的論文獻給他藉以表達對老師的感謝。

最後感謝親愛的媽媽及吾妻麗英，包容我不常回家，給予我最大的自由空間，讓我能專注於課業研究中，妻女的體諒是我最大的支柱。僅將這本論文獻給我親愛的家人、同學、朋友及師長因為有你們的存在，讓我的生命更具意義。

陳錦木 謹誌於
園藝暨景觀學系 花卉館

August 14, 2013

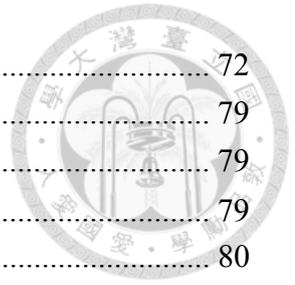


目錄



目錄.....	i
表目錄.....	iii
圖目錄.....	iv
中文摘要.....	vi
Abstract.....	viii
第一章 前言.....	1
第二章 前人研究.....	5
一、日日春的命名及流通.....	5
二、外觀形態.....	6
三、重瓣花的分類.....	8
四、重瓣花遺傳模式.....	11
五、影響重瓣花的外在環境因素.....	14
六、日日春品種演進.....	15
七、日日春育種目標.....	16
八、環境條件對日日春生育及開花之影響.....	17
九、日日春花粉活力及授粉模式.....	18
第三章 重瓣日日春之花芽形態發育.....	21
摘要.....	21
Abstract.....	22
前言(Introduction).....	22
材料與方法(Materials and Methods).....	24
結果(Results).....	27
討論(Discussion).....	28
第四章 溫度對重瓣日日春生育、細胞膜熱穩定性及花粉發芽之影響.....	45
摘要.....	45
Abstract.....	45
前言(Introduction).....	46
材料與方法(Materials and Methods).....	47
結果(Results).....	49
討論(Discussion).....	50
第五章 日日春重瓣性狀之遺傳及倍體分析.....	67
摘要.....	67
Abstract.....	67
前言(Introduction).....	68
材料與方法(Materials and Methods).....	69
結果(Results).....	71

討論(Discussion).....	72
第六章 重瓣日日春品種之選育.....	79
摘要.....	79
Abstract.....	79
前言(Introduction).....	80
材料與方法(Materials and Methods).....	81
結果(Results).....	82
討論(Discussion).....	83
第七章 綜合討論與結論.....	101
參考文獻(References).....	105



表目錄



表 序	頁 碼
表 3.1. 重瓣日日春 TYV1 與單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’之葉片表面、葉色及花型比較.....	36
表 3.2. 重瓣日日春 TYV1 與單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’形態之差異.....	36
表 4.1. 栽培溫度處理對重瓣日日春 TYV1 及其親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花下節數、到開花天數、花徑及分枝數之影響.....	54
表 5.1. 日日春重瓣變異株 TYV1 與‘Little Pinkie’自交、正反雜交及回交後裔花形分離比.....	74
表 5.2. 日日春重瓣變異株 TYV1 與‘Titan Burgundy’自交、正反雜交及回交後裔花形分離比.....	75
表 6.1. 日日春 TYV1 (♀) × TYV3 (♂) 之 F ₁ 自交，產生 91 株重瓣花經篩選之 28 棵優良單株之株高、側枝數、到花日數、花徑、花色、發根日數及扦插存活率.....	86
表 6.2. 日日春 TYV1 (♀) × TYV3 (♂) F ₂ 28 株重瓣花植株初選 16 棵優良單株扦插繁殖後進行之株高、葉長、側枝數、花徑、側枝花朵數及品質指數第一次品系園藝性狀比較.....	87
表 6.3. 日日春 TYV1 (♀) × TYV3 (♂) F ₂ 16 個優良品系經第一次品系比較後選出 8 個優良品系進行之株高、葉長、側枝數、花徑、側枝花朵數及品質指數第二次品系園藝性狀比較.....	88
表 6.4. 日日春 TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F ₁ 自交，產生 66 株重瓣花 F ₂ 植株初選 26 棵優良單株之株高、側枝數、到花日數、花徑、花色、發根日數及扦插存活率.....	89
表 6.5. 日日春 TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F ₂ 66 株重瓣花植株初選 18 棵優良單株扦插繁殖後進行第一次品系園藝性狀比較.....	90
表 6.6. 日日春 TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F ₂ 18 個優良品系經第一次品系比較後選出 10 個優良品系進行第二次品系園藝性狀比較.....	91
表 6.7. 日日春‘桃園 1 號-玫瑰女孩’植物品種特性表及照片.....	92
表 6.8. 日日春‘桃園 2 號-桃花女’植物品種特性表及照片.....	93
表 6.9. 日日春‘桃園 3 號-紅蝴蝶’植物品種特性表及照片.....	94
表 6.10. 日日春‘桃園 4 號-夏雪’植物品種特性表及照片.....	95
表 6.11. 日日春‘桃園 5 號-紅娘’植物品種特性表及照片.....	96

圖目錄



圖 序	頁 碼
圖 3.1. 重瓣日日春 TYV1 (A)及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’ (B)花朵不同發育階段之外觀形態.....	32-33
圖 3.2. 重瓣日日春 TYV1 變異花朵外觀(A)及花朵縱切(B)	34
圖 3.3. 重瓣日日春 TYV1 (A)與其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’ (B)之花冠筒上部結構.....	35
圖 3.4. 重瓣日日春 TYV1 (A 和 C)與其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’ (B 和 D)之花冠筒下部結構.....	37
圖 3.5. 重瓣日日春 TYV1 花芽發育初期變化之解剖觀察.....	38
圖 3.6. 重瓣日日春 TYV1 花芽發育初期變化之切片觀察.....	39
圖 3.7. 單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花芽發育初期變化之解剖觀察.....	40
圖 3.8. 單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花芽發育初期變化之切片觀察.....	41
圖 3.9. 重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’栽培於 30/25°C 之年輕實生苗葉片外觀.....	42
圖 3.10. 重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’葉柄形態.....	43
圖 4.1. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’株高之影響.....	55
圖 4.2. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’植株外觀之影響.....	56
圖 4.3. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花芽發育階段之影響.....	57
圖 4.4. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’自花苞可見(1.0-1.9 mm)至開花所需天數之影響.....	58
圖 4.5. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花朵壽命之影響.....	59
圖 4.6. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花朵外觀之影響.....	60
圖 4.7. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’葉片外觀之影響.....	61
圖 4.8. 水浴溫度對栽培於不同溫度重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’葉片相對傷害值之影響.....	62
圖 4.9. 培養溫度對栽培於日夜溫 30/25°C 之重瓣日日春 TYV1 及其親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花粉發芽率之影響.....	63
圖 4.10. 栽培於日夜溫 30/25°C 之重瓣日日春 TYV1 花粉培養於不同溫度之萌發情形.....	64

圖 4.11.	栽培於日夜溫 30/25°C 之單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花粉培養於不同溫度之萌發情形.....	65
圖 5.1.	雞血紅蛋白、日日春 TYV1、‘Pacifica Polka Dot’及‘Little Pinkie’ DNA 含量分析測定圖譜.....	76
圖 5.2.	日日春 TYV1、‘Pacifica Polka Dot’及‘Little Pinkie’ DNA 含量定量分析測定圖譜.....	77
圖 5.3	日日春雜交授粉流程.....	78
圖 6.1.	以重瓣日日春 TYV1 為種子親與單瓣日日春 TYV3 雜交後取 15 株 F ₁ 自交產生 F ₂ 世代經一次初次選拔、第一次品系選拔後之第二次品系選拔情形...	97
圖 6.2.	以重瓣日日春 TYV1 為種子親與單瓣日日春 TYV4 雜交後取 15 株 F ₁ 自交產生 F ₂ 世代經一次初次選拔、第一次品系選拔後之第二次品系選拔情形...	98
圖 6.3.	日日春植株外觀品質分級依據.....	99

中文摘要

日日春 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] 喜高溫強光，花期長，是近年來全球發展快速的花卉，新品種持續育成推出。本研究比較重瓣變異日日春 TYV1 品系及其單瓣親本 'Pacifica Polka Dot' 不同生長期的花苞，進行解剖及埋蠟切片觀察，以瞭解新增生內花瓣的起源與形態特徵。並將其栽培於不同溫度下，探討溫度對生育、開花、細胞膜熱穩定性和花粉發芽之影響。TYV1 品系雌雄蕊仍具有功能，與其他單瓣品系進行正反交、自交及回交，瞭解日日春重瓣花型的遺傳模式。最後，利用上述所得形態及遺傳資訊，建立重瓣日日春新品種之選育流程。

日日春 TYV1 外花瓣 5 片輪生成高腳碟狀 (salverform)，新增生內花瓣 5 片輪生成漏斗形 (funnel-shaped)，內花瓣起源於花冠筒頂端與花瓣連接處。將 TYV1 及 'Pacifica Polka Dot' 栽培於日夜溫 30/25 °C 下，可觀察到 TYV1 及 'Pacifica Polka Dot' 花開 1-2 天時柱頭上部和花藥下端重疊距離分別為 0.56 ± 0.01 及 0.82 ± 0.02 mm。TYV1 子房內胚珠數明顯較 'Pacifica Polka Dot' 少。依花蕾長度將發育分為 12 個階段，取其中前 6 個階段進行解剖及切片觀察，其中第 1 階段 (0.5-0.9 mm) 時，可觀察到 5 枚細長萼片包圍 5 枚離生花瓣，其內又有 5 個雄蕊，而正中心皮尚未完全分化。第 2 階段 (1.0-1.9 mm) 時，5 枚花瓣已相互接觸並將雄蕊及心皮包裹在其中，解剖後顯示 TYV1 花冠筒與花瓣交界處已可觀察到內輪花瓣原體，而 'Pacifica Polka Dot' 則無此構造。第 3 階段 (2.0-2.9 mm) 外觀上萼片與外花瓣約等長，內花瓣明顯伸長且邊緣可見絨毛，切片顯示內外花瓣共用一層細胞。自第 5 階段 (4.0-4.9 mm) 開始花冠筒開始快速伸長，至第 10 階段 (21.0-25.9 mm) 才減緩。第 11 階段時花瓣開始展開，第 12 階段時花瓣完全平展。TYV1 自交實生苗 6 對葉片時期，其葉片表面皺褶，而 'Pacifica Polka Dot' 則平滑。TYV1 和 'Pacifica Polka Dot' 之葉柄長度分別為 1.3 及 0.4 cm。

將日日春 TYV1 及 'Pacifica Polka Dot' 栽培於日夜溫 20/15、25/20 及 30/25 °C 下，並調查生育開花表現及細胞膜熱穩定性。結果顯示 20/15 °C 不利 TYV1 及

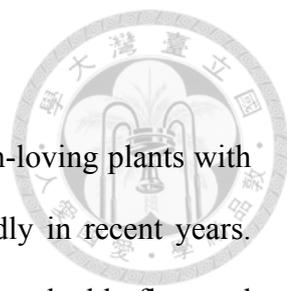


‘Pacifica Polka Dot’生育，株高矮、花徑小、分枝數少、到花日數長，花下節位數少。以 25/20°C 為日日春 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’之生育適溫。日日春 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’葉片相對傷害值與水浴溫度呈 S 形曲線關係，以‘Pacifica Polka Dot’較 TYV1 有較明顯熱馴化反應，但以 TYV1 較耐熱。取栽培於 30/25°C 之花粉培養於含 20%蔗糖之 B&K 培養基並置於 10-45°C 環境，結果顯示 TYV1 花粉發芽適溫 25-30°C 及‘Pacifica Polka Dot’花粉發芽適溫為 20-40°C，TYV1 發芽適溫範圍較‘Pacifica Polka Dot’窄。

以營養繁殖之 TYV1、‘Little Pinkie’及‘Titan Burgundy’為材料，進行自交、重瓣與單瓣品系雜交(F₁)、F₁ 自交(F₂)及 F₁ 與種子親回交(BCF₁)等組合。結果顯示 TYV1 自交後代皆為重瓣型，而‘Little Pinkie’及‘Titan Burgundy’自交後代全為單瓣型。四組 F₁ 後代全為單瓣型，四個 F₁ 組合中有三組之 F₂ 後代單瓣及重瓣型植株數符合 3:1 ($\chi^2 = 0.78-1.53, P = 0.22-0.37$)，二組 BCF₁ 後代單瓣及重瓣植株數符合 1:1 ($\chi^2 = 0.25-0.69, P = 0.41-0.62$)，顯示日日春之重瓣花性狀由一對隱性對偶基因控制，同質或異質顯性時表現單瓣花。重瓣日日春 TYV1 及單瓣‘Pacifica Polka Dot’之 DNA 長度與二倍體的‘Little Pinkie’無顯著差異，三者分別約有 1468.0、1508.1 及 1457.2 百萬鹼基對。

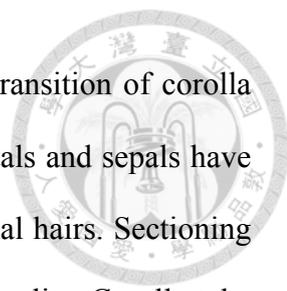
以 TYV1 為種子親與單瓣品系 TYV3 及 TYV4 為花粉親經雜交授粉，得單瓣 F₁ 後裔，選其中 15 株花徑大、生長強勢單株自交得 F₂ 單重瓣分離世代族群，再經初選及兩次品系比較試驗，選出性狀優良的五個重瓣日日春品系，分別命名為‘桃園 1 號-玫瑰女孩’、‘桃園 2 號-桃花女’、‘桃園 3 號-紅蝴蝶’、‘桃園 4 號-夏雪’及‘桃園 5 號-紅娘’。重瓣日日春新品種側枝數及花朵數多、株高矮，適合盆花栽培，花形均具兩輪 10 片花瓣，花瓣排列緊密呈漏斗狀，平均花徑 3.3 ± 0.3 cm。本研究所育出之重瓣日日春品種通過中華民國農業委員會植物品種審議委員會審查通過，為目前全世界首度有品種保護的重瓣日日春，權力期間至民國 119 年。

Abstract



Periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] is a heat and sun-loving plants with prolonged flowering duration. Cultivars have been developed rapidly in recent years. This study aimed to compare flower bud development of TYV1, a double-flowered periwinkle mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’ by dissection and wax sectioning to determine the origin of doubled petals. Plants of TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ were also grown under different temperatures to establish cultural, cell membrane thermostability, and pollen germination information. With functioning pistils and stamens, TYV1 was cross-pollinated with single-flowered cultivars to create reciprocal F₁ hybrid, F₂, and back-crossed F₁ generation to determine the inheritance of double-floweredness in periwinkle. Moreover, based on morphological and genetical information, the procedure of breeding and selection for double-flowered periwinkle was established.

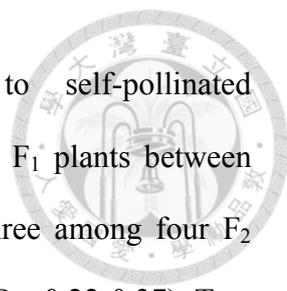
TYV1 has five salverform outer corolla lobes and five funnel-shaped inner corolla lobes. Sectioning results showed inner corolla lobes of TYV1 originated from adaxial meristem originally formed into orifice in ‘Pacifica Polka Dot’. Plants of TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ were grown at day/night temperature of 30/25°C, flower buds at different developmental stages were taken for anatomical observations. The overlap between the top end of the pistil and bottom ends of anthers in TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ flowers at 1-2 d after anthesis was 0.56±0.01 and 0.82±0.02 mm, respectively. TYV1 had fewer ovules per ovary than ‘Pacifica Polka Dot’. Based on flower bud longitudinal length, 12 stages were proposed for flower bud development of periwinkle and the first six stages were taken for further observations. At stage 1 (0.5-0.9 mm long), undifferentiated carpel was surrounded by five stamens, then five polypetals, and five thin sepals outermost. At stage 2 (1.0-1.9 mm long), polypetals had fused into sympetal and stamens and pistil were enclosed within. Dissecting stage 2



flowers showed that TYV1 had initiated inner corolla lobe at the transition of corolla tube and lobe, but not for ‘Pacifica Polka Dot’. At stage 3 when petals and sepals have same lengths, inner corolla lobes started to elongate and had marginal hairs. Sectioning results showed both outer and inner corolla lobes had the same originality. Corolla tube rapidly elongated from stage 5 (4.0-4.9 mm long) until stage 10 (21.0-25.9 mm long). Flower anthesis at stage 11 and corolla lobe fully expanded at stage 12. Young seedlings from self-pollinated TYV1 had crinkled leaf before the sixth pair of leaves emerged, as compare with smooth leaf surface in ‘Pacifica Polka Dot’. Petiole length of TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ was 1.3 and 0.4 cm, respectively.

Plants of TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ were grown at day/night temperatures of 20/15, 25/20, and 30/25°C, for the evaluation of the responses of growth, flowering, and cell membrane thermostability. Results showed that plants at 20/15°C had poor growth, both TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ exhibited reduced plant height, flower diameter, and branching, and more days to flowering, but fewer node number below the flower. Optimum temperature for growth and flowering of TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ was 25/20°C. The relationship between the RI value, as measured with water bath temperature from 25 to 75°C for 30 min, occurring in leaf tissue discs and the water bath temperature was sigmoidal in both TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’. ‘Pacifica Polka Dot’ showed more heat acclimatization response than TYV1, but TYV1 could tolerate higher temperatures than ‘Pacifica Polka Dot’. Pollen from plants grown at 30/25°C was tested for incubation temperatures of 10-45°C, and results showed that the optimum pollen germination temperature was 25-30°C for TYV1 and 20-40°C for ‘Pacifica Polka Dot’.

Vegetative propagated double-flowered TYV1, single-flowered ‘Little Pinkie’, and ‘Titan Burgundy’ were used for self-pollination, cross between single- flowered and double-flowered lines (F_1), F_2 , and back-crossed F_1 of seed parents. Self-pollinated



TYV1 produced all double-flowered progeny compared to self-pollinated single-flowered lines which produced all single-flowered progeny. F₁ plants between TYV1 and ‘Little Pinkie’ or ‘Titan Burgundy’ were all single. Three among four F₂ population segregated into 3 single : 1 double ratio ($\chi^2 = 0.78-1.53$, $P = 0.22-0.37$). Two BCF₁ population segregated into 1 single : 1 double ratio ($\chi^2 = 0.25-0.69$, $P = 0.41-0.62$). Results indicated a double-flowered form was controlled by a recessive allele. A single dominant gene expressed in the homozygous or heterozygous state resulted in the single-flowered phenotype. DNA length of double-flowered TYV1 and single-flowered ‘Titan Burgundy’ did not differ with diploid ‘Little Pinkie’, and estimated to have 1468.0, 1508.1, and 1457.2 Mbp, respectively.

Double-flowered TYV1 was used as female parent and crossed with single-flowered TYV3 and TYV4. Fifteen single-flowered F₁ seedlings were selected based on bigger flower diameter and vigorous growth habit. Five double-flowered lines with desirable traits were selected after the first selection and two line comparison tests, and were named as ‘Taoyuan No.1 Rose Girl’, ‘Taoyuan No.2-Peach Lady’, ‘Taoyuan No.3-Red Butterfly’, ‘Taoyuan No.4-Summer Snow’, and ‘Taoyuan No.5-Red Lady’. The new double-flowered cultivars were suitable for potted flower production characterized with more branching, flower number per plant, and shorter plant height. All the selected cultivars had two whirls of compacted petals in funnel-shaped, and had flower diameter of 3.3 ± 0.3 cm. The selected new double-flowered cultivars had been certified of plant breeders’ right (PBR) by Council of Agriculture, Taiwan, and were the world’s first PBR protected double-flowered periwinkle cultivars.

第一章 前言

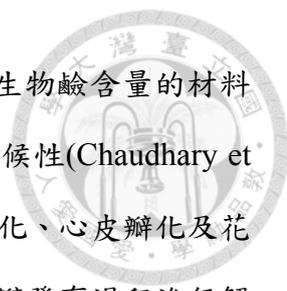
Chapter 1. Introduction



日日春[*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]為夾竹桃科(Apocynaceae)多年生草本植物，原生於非洲馬達加斯加，具鮮艷花朵及持續開花特性，為重要的觀賞花卉(Armitage, 2001；Ball, 1998；Hogan, 2003；National Garden Bureau Inc, 2002；van Bergen and Snoeijer, 1996)。全株含多種植物鹼亦為重要的藥用植物(Zhou et al., 2009)。由於全球暖化及熱帶地區國家的經濟快速發展，耐高溫強光的花卉種類及品種需求量持續增加，因此近年來眾多花卉種苗公司積極投入熱帶花卉及耐熱品種選育工作(鶴島，2005)。日日春喜溫暖強光，並具耐旱、抗污染、栽培容易及移植適應性佳等特性，已成為美國重要的花壇及盆花作物(Howe and Waters, 1994；USDA, 2010)。陳等人(2011)調查指出日日春為臺灣夏季最重要的草花，年產量達230萬盆，在春夏秋三季開花良好，市場需求量持續增加。

日日春品種記錄始於日本 Sakata 種子公司 1925 年目錄中的四個品種(鶴島，2005)，而現今流通的商業品種多係由康乃狄克大學的 Parker 自 1978 年起利用 *C. roseus* L.、*C. longifolius* L.及 *C. trichophyllus* Bak.進行種間雜交(Parker, 1980)，選育多分枝、大花、花瓣重疊及矮生等性狀之品種，適合花壇及庭園種植(Curry, 2012)。原生種日日春植物皆為高腳碟狀的五瓣花(van Bergen and Snoeijer, 1996)，缺乏花型變化，市面上亦不見重瓣日日春品種(National Garden Bureau Inc., 2002)。至 2008 年，Sakata 種子公司在國內通訊販賣目錄中展示花瓣基部增生 5 片細長花瓣的‘夏の思い出-夏の夢’，為首次販售的重瓣品種日日春，但其花瓣分離且花色單一，枝條上花朵數少，枝條過長呈下垂狀，性狀不符盆花栽培所需，品質有待改進。本研究蒐集到單瓣‘Pacifica Polka Dot’之重瓣突變株 TYV1，相較於‘夏の思い出-夏の夢’，TYV1 花瓣排列緊密、內圈增生花瓣寬大，突變株可提供重瓣日日春形態與育種之研究。

由於日日春生物鹼衍生藥物價值高(Huxtable, 1992)，常利用 ethylmethane



sulfonate 藥劑誘變及秋水仙素處理，使染色體倍增以篩選具高生物鹼含量的材料 (Zhou et al., 2009)。日日春誘變可使花徑及花朵數增加並提高耐候性(Chaudhary et al., 2011)，但尚未有重瓣性狀。重瓣起源有染色體倍增、雄蕊瓣化、心皮瓣化及花瓣數增加等(Reynolds and Tampion, 1983)。前人曾對日日春於花瓣發育過程進行解剖研究，但僅限於單瓣品種(Boke, 1948)，目前並不清楚重瓣日日春增生的花瓣起源，本研究擬藉解剖切片觀察重瓣日日春花器之形成、起源及形態。

一般日日春品種於高溫環境下生長開花良好，但植物品種間常具有不同的溫度生長反應(Wang et al., 2008)，重瓣之 TYV1 對溫度之反應是否與其單瓣親本 ‘Pacifica Polka Dot’ 相同目前並不清楚。細胞膜熱穩定性可做為植物耐熱之指標，利用高溫逆境會造成蛋白質變性且傷害細胞膜結構，進而測量細胞電解質滲漏情形以判定品種間耐熱性之差異(Anderson and Padhye, 2004)。另外，植物配子體世代(花粉)生育適溫多和孢子體世代(成株)相似(Weinbaum et al., 1984)，因此可利用花粉離體培養檢測花粉活力及發芽適溫，以評估品種間對溫度之生長反應。

日日春 TYV1 生長速度慢、苗期植株較矮及葉片皺縮等外觀性狀，與 Dnyansagar 和 Sudhakaran (1970) 所描述四倍體日日春類似。流式細胞儀是一種可快速檢測植物大量細胞倍體數且可分析不同組織和細胞的方式(Leus et al., 2009)，且不需經由根尖取樣或植物馴化，可省時且省空間的早期檢測。由於 DNA 含量與倍體數直接相關，流式細胞儀之原理為利用 DNA 含量不同及其出現高峰不同，藉以推斷倍體數。目前並不清楚重瓣日日春是否與染色體倍增有關，故擬利用流式細胞儀以分析重瓣日日春之染色體倍數變化。

日日春部分變異性狀如多花、自花授粉及花瓣皺褶等，在經過遺傳分析後發現是由一或多對隱性基因所控制(Chaudhary et al., 2011)。隱性基因所控制的性狀在自然界中易受顯性基因覆蓋，故不易維持易被淘汰(Reynolds and Tampion, 1983)。瞭解日日春重瓣花之性狀遺傳方式，才能決定適當之育種方式，因此有必要於育種前先瞭解其遺傳模式。

日日春一直少有重瓣花，TYV1 特殊的花形經評估後確認具商品價值，因此本

論文以 TYV1 為種子親，與其他單瓣但具優良目標性狀之品種進行雜交育種，期望能育成具市場潛力之重瓣花型日日春新品種，並建立一套重瓣日日春育種模式，以加速日日春花形多樣化的發展。





第二章 前人研究

Chapter 2. Literature Review



一、日日春的命名及流通

日日春又稱長春花，為夾竹桃科(Apocynaceae)多年生草本植物。1658 年法國人 Etienne de Flacourt 記錄馬達加斯加的原生植物時提及日日春，描述它的花形如肥皂草(*Saponaria officinalis* L.)及茉莉花[*Jasminum sambac* (L.) Aiton.]，花色紫紅或白，在當地為治療心臟不適的藥用植物。殖民者隨後將日日春引進歐洲栽培於加熱的溫室中，漸漸成為大眾熟知來自熱帶地區的外來種植物(Curry, 2012)。在 1759 年分類學家 Linnaeus 以花朵外觀像 *Vinca* 為由，將日日春命名為 *Vinca rosea*。1838 年英國植物分類學家 George Don 將日日春和 *Vinca* 分開新成立長春花屬 (*Catharanthus*)，命名為 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] (van Bergen and Snoeijer, 1996)。長春花屬中有 8 個種，其中 *C. coriaceus* Markgr.、*C. lanceus* Bojer ex A. DC.、*C. longifolius* Pichon、*C. ovalis* Markgr.、*C. scitulus* Pichon、*C. trichophyllus* Bak.與 *C. roseus* (L.) G. Don 7 種原生於馬達加斯加，*C. pusillus* (Murray) G. Don 在印度及斯里蘭卡被發現。van Bergen 和 Snoeijer (1996)指出日日春在早期文獻的記載中出現一些混淆的學名，如 *Vinca rosea* L.、*Pervinca rosea* L.、*Vinca speciosa* 及 *Lochnera rosea* L.及 *Ammocallis rosea* 等，目前因資訊的普及，已少有誤用的情況。但現今的花卉商業目錄中日日春仍多以 *Vinca* 稱之，這易和 *Vinca minor* L.及 *Vinca major* L. 兩種植物混淆，會使用 *Vinca* 這一屬名，歸因於日日春早期長期使用 *Vinca rosea* 的學名所造成，現今還習慣以舊屬名稱之(Curry, 2012；van Bergen and Snoeijer, 1996)。

由於日日春具有強健的風土適應性，露天栽培常受曲管式(siphoning type)口器之蝶蛾類昆蟲授粉產生種子，種子散落後又可自行發芽生長，使日日春常成為溫暖地區的外來馴化植物(Levy, 1981)。早期人為的流通亦造成日日春普及於廣大的熱帶及亞熱帶地區，如 18 世紀中葉英國倫敦 Chelsea 藥用植物園 Philip Miller 館



長在他的任期內，就積極和歐洲各植物園及英國殖民地進行植物種子種原交流，其中日日春即為交流的物種之一(Curry, 2012)。另外，同時期日日春的葉片被當時航海的船員認為具有興奮劑效果，而被帶上船咀嚼食用，因此也隨著當時航海的盛行，將日日春傳布到全世界各地適合生長的地方(van Bergen and Snoeijer, 1996)。日日春傳入日本的時間為 1881 年(鶴島，2005)，而何時引進台灣栽培已不可考，由於風土適應性良好目前已普遍栽培於台灣各地。日日春主要育種公司如美國的 Goldsmith、PanAmerican 及 Bodger，日本為 Sakata、Miyoshi 及 Murakami 所育出的園藝品種日日春則多透過種子販售到世界各地栽培，並已成為全球性的重要花壇及盆花植物(Ball, 1998；Curry, 2012；van Bergen and Snoeijer, 1996)。

除觀賞外日日春也是重要的藥用植物，植株全株中含有超過 130 種以上的生物鹼(terpenoid indole alkaloids)，其中又以 Vinblastine 及 Vincristine 最常為研究，並已廣泛製成用來治療哺乳類動物腫瘤的藥物(Kulkarni et al., 2001；Zhou et al., 2009)，在 1985 年交易金額就達 1 億美元(Huxtable, 1992)。

二、外觀形態

日日春營養生長期短，實生苗約 6 對葉時進入生殖生長階段，莖頂形態通常為營養生長芽伴隨花芽(Pietsch, et al., 1995)。常見的紫紅色單瓣之日日春株高約 30-100 cm，直立性，幼嫩的枝條及葉片折斷後會流出白色乳汁。頂芽成複莖生長型態，莖葉有異味，成熟莖淡灰色，幼莖圓柱狀、綠或紅褐色，植株無毛。葉柄長 3-11 mm，綠或酒紅色，光滑偶爾有毛。托葉 2-4 片呈窄翼型、光滑狀偶爾有毛。對生呈長橢圓形或窄卵形，紙質或稍革質，深綠色，主脈白綠色，長 25-84 mm，寬 8-40 mm，葉先端尖形、圓形或微凹，有缺形短突起，葉全緣或微波狀，邊緣偶爾有毛，葉表面具蠟質角質層。植株頂端的葉片角質層較下位葉厚(Balamurugan et al., 2011)。果實綠或灰綠，蒴果長 22-47 mm，直徑 2-3 mm 光滑或有毛。種子黑色長 2-3 mm、寬 1.1-1.5 mm，胚長 1.5-2.5 mm，寬 0.5-1.2 mm (van Bergen and Snoeijer, 1996)。

日日春細長的蓇葖果(follicle)成熟時會單邊裂開，種子散落傳播的距離不遠，因此野外自然生長的日日春常成群密生，早期的文獻中指出螞蟻可以幫忙傳播種子(van Steenils, 1934)。種子具嫌光性，覆蓋可提高發芽率，發芽適溫在 24-27°C，約 4-6 天後發芽(呂，2010)。

生殖生長階段，花芽分化形成於對生葉片一邊的葉腋內，有成對花朵，2 個花苞發育速度不一(Boke, 1947)營養狀況良好時兩個花苞都可發育至開花，有時僅一個花苞可發育至開花，當低溫光線不足下甚至兩個花苞都無法順利發育(van Bergen and Snoeijer, 1996)。花梗長 1-2 mm，偶爾有毛綠色，花萼 5 片披針形綠色，起源於花原體之邊緣第二層及第三層細胞平周分裂(periclinal)，長度約 3-6 mm、寬度約 1-2 mm。花萼外邊光滑或有毛。花朵高腳碟狀，花瓣顏色紫紅、粉紅或白等，花朵中間的花心稱為眼圈(eye)，花瓣 5 片平展，花瓣為寬倒卵形，頂端有 1-1.5 mm 長的突出尖端部位。花瓣長約 15-26 mm，寬約 5-20 mm，邊緣完整或左邊有纖毛，花瓣左旋包覆表面光滑或有纖毛。花冠筒(corolla tube)細長圓柱形，由兩部分不同起源構成:上半部是由花瓣基部邊緣融合而成，下半部是由花瓣和花藥共同原基進行 intercalary(二次)或區域性(zonal)生長而形成，是花冠構造中最晚分化的部分。上端和花瓣連接處形成緊縮小孔(orifice)，直徑約 0.8-1 mm，紅色眼圈品種花冠筒和花瓣連接處顏色紫紅不明顯、白眼圈連接處為黃色明顯，連接處與花瓣間光滑或有長約 0.5-1 mm 的細絨毛(pubescence)。花冠筒上端膨大的喉部(throat)長約 5.5-9 mm，花冠筒 22-35 mm 長，花冠筒基部約 1.3 至 2 mm 寬，中間約 0.7-1.5 mm 寬。喉部 2-3 mm 寬。雄蕊較花瓣的形成遲，雄蕊及心皮是經由種皮第二層細胞平周分裂而形成，雄蕊具花藥 5 個，位於花冠筒的喉部下方，長度約 0.8-0.9 mm，花藥長圓狀披針形長約 3.0 mm，寬 0.4-0.7 mm。花絲短彎曲，花粉長圓球形，具 3 孔溝，直徑為 76.4 μm 。花冠筒喉部中間位置花絲著生處有一圓形凸起。雌蕊由 2 個離生心皮構成單雌蕊，長度 18-27 mm。子房上位，窄卵形長 1.5-3 mm，寬 0.4-0.8 mm 光滑或有毛，邊緣胎座，胚珠沿腹縫線縱向排列，胚珠多數，花柱連合，生長後期頂部合成花柱及柱頭(Boke, 1948)。花柱長 15-23 mm，柱頭圓柱狀長 1.2-1.7 mm、

直徑 0.5-0.8 mm，基部有包膜長 0.4-0.7 mm，圓柱形柱頭上有棉毛狀的柱頭頂；花托上有 2 舌狀腺體(nectar)和子房互生，腺體長約 2.6 mm (Boke, 1949；van Bergen and Snoeijer, 1996)。

從看見花苞到開花的發育過程約需兩周時間，花苞初期花萼明顯長於花冠，而後花冠筒伸長，花萼長度僅為花冠筒的 1/7，花落時由花冠筒基部脫落，花萼與子房宿存，花萼包覆幼果，果實成熟後花萼與果柄與腺體一起脫落(Boke, 1947)。Dnyansager 和 Sudhakaran (1970)利用秋水仙素誘導出 4 倍體的日日春，外觀上較 2 倍體植株矮、側枝數多、葉片短寬、花徑大、花冠筒粗、子房中胚珠數少、莢果短、種子大，且單位面積氣孔數少、氣孔保衛細胞大，果莢中未發育的種子數多、植物體中有較高的植物鹼含量、較慢的生長速率、較大的花粉粒及高比例的花粉不稔性等。一般 2 倍體日日春染色體數 $2n=16$ ，染色體組長度為 1500 Mbp (Levêque et al., 1996)。Xing 等人(2011)檢測經秋水仙素(colchicine)處理後之日日春小苗，觀察到 4 倍體的植株除染色體加倍外還有較大的氣孔、更多分枝及葉片數，並且也促使植物鹼含量明顯增加。1980 年後利用流式細胞儀分析染色體倍性的技術大量地使用於動植物細胞染色體組的研究上，快速檢測細胞染色體大小及倍性狀況對植物多倍體育種有很大的助益(Ochatt, 2008)。

三、重瓣花的分類

重瓣花是指花的花瓣數比基本數多之花朵，通常重瓣花具有花色較深、美觀、花朵壽命長及香氣較濃等優點(Reynolds and Tampion, 1983)，重瓣性狀常是觀賞花卉育種目標之一。目前多數的花卉作物植物都有重瓣品種，但重瓣花起源方式多樣及複雜，使得觀賞植物重瓣花研究資料少。植物重瓣品種多數由突變產生並透過人為篩選而育成，在野外自然重瓣突變植物因生殖能力低落常自然淘汰(Wang et al., 2011)。

Reynolds 和 Tampion (1983)依重瓣花的花瓣著生形態分成 5 種，分述如下：

(一) 離瓣花(polypetalous)植物的重瓣花：分為 4 類，這種形式的重瓣花雌雄蕊、



萼片等花器官通常都能正常能結實，但也有部分受到影響。

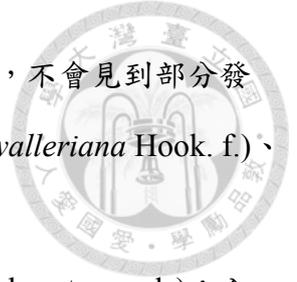
1. 缺刻、重疊和分裂(fluting, overlapping and dissection)：原花瓣數沒有增加但花瓣表現出缺刻、重疊或分裂於花瓣上，使花朵呈現立體化如同重瓣花形態，如仙客來(*Cyclamen periscum* Mill.)及虞美人(*Papaver rhoeas* L.)等。
2. 花瓣數增加(extra petals)：額外增加花瓣數，使花瓣數比原花瓣數多的重瓣花，此種性狀容易受環境及營養影響，但在人為選拔下經過若干代後可使花瓣數目逐漸增加而形成較為穩定的重瓣花，如油菜(*Brassica napus* L.)及美國石竹(*Dianthus barbatus* L.)等。
3. 花瓣輪數增加(extra whorl)：增加額外輪數，使花瓣數呈倍數增加如西洋耬斗菜(*Aquilegia vulgaris* L.)、鐵線蓮(*Clematis* spp.)、飛燕草(*Delphinium grandiflorum* L.)及小蒼蘭(*Freesia hybrid* L.)等。
4. 新增分生組織(secondary centres)：花苞發育階段因刺激造成新增分生組織所形成的重瓣形態，如康乃馨(*Dianthus caryophyllus* L.)等。

(二) 合瓣花(Sympetalous)植物上的重瓣花：分為 2 類。

1. 缺刻、重疊和分裂(fluting, overlapping and dissection)：於原花瓣上表現出缺刻、重疊或分裂，使花朵立體化而呈現如同重瓣花外表之類形，如矮牽牛(*Petunia*)、杜鵑花(*Rhododendron*)及日日春‘Angel Tutu’ (Kitajima, 2007)等。
2. 花瓣輪數增加(extra whorl)：增加額外輪數，使花瓣數呈倍數增加如套筒式(hose in hose)的杜鵑花、大岩桐(*Sinningia speciosa* Baill.)及曼陀羅(*Datura stramonium* L.)等。

(三) 雌雄蕊瓣化：分為 4 類。

1. 雄蕊部分瓣化(petaloid of part stamens)：為部分雄蕊花瓣化，增生花瓣上殘存之部分花藥可產生花粉，但多數為雄不稔，如水仙花(*Narcissus* spp.)、玫瑰花(*Rosa* L.)、山茶花(*Camellia japonica* L.)、蔓長春(*Vinca minor* L.)、杜鵑花、球根海棠(*Begonia tuberhybrida* Voss)、四季秋海棠(*Begonia semperflorens-cultorum* Hort.)及梅花(*Prunus mume* Siebold and Zucc.)等。



2. 雄蕊完全瓣化(petaloid of complete stamens)：全部雄蕊花瓣化，不會見到部分發育不全的花藥，為完全雄不稔，如重瓣非洲鳳仙花(*Impatiens walleriana* Hook. f.)、球根海棠、四季秋海棠、玫瑰花及山茶花等。
3. 雄蕊完全瓣化及部分心皮瓣化(petaloid of complete stamens and part carpels)：全部雄蕊花瓣化，最內層增生花瓣連結部分心皮，子房中胚珠功能有時受影響，在杜鵑花、玫瑰花及山茶花部分品種上可見。
4. 雄蕊及心皮完全瓣化(petaloid of complete stamens and carpels)：雌雄蕊完全瓣化，無法行有性生殖及做為雜交親本，如重瓣荊豆(*Ulex europaeus* L.)及毛茛(*Ranunculus aconitifolius* L.)等。

雌雄蕊瓣化的植物生殖能力低落，在野外容易被淘汰，但有一已知重瓣蔓長春(*Vinca minor flore pleno*)其增加的花瓣是部分或完全由雄蕊瓣化而來，開花性較單瓣植株差，但卻能在野外存活 160 年以上。主因為蔓長春具有極強的無性繁殖能力，各枝條的節位在接觸泥土後易發根長芽成新植株，具有自行無性繁殖產生種苗能力(Wang et al., 2011)。從形態方面觀察雌雄蕊瓣化過程中，通常雄蕊先於雌蕊發生瓣化，有些僅瓣化到雄蕊，雌蕊仍具受精能力形成種子。花菸草(*Nicotiana alata* Link & Otto)雌雄蕊瓣化表現出從外向內的增生花瓣，花瓣也由外向內逐漸變小，直到出現花瓣和雌雄蕊的過渡形態，有些還有花絲或花藥的痕跡，或者僅花絲變成花瓣狀(Zainol and Stimart, 2001)。重瓣秋海棠在花季末期常受環境及營養的影響讓瓣化雄蕊回復成具花粉的雄蕊可利用於雜交育種上，這現象在玫瑰花及山茶花上也可見到(趙和劉，2009)。

(四) 菊科植物的重瓣花(pseudo-doubles)

由頭狀花序形成的重瓣花，如翠菊[*Callistephus chinensis* (L.) Nees]、菊花(*Dendranthema × grandifolium* Kitam.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、大理花(*Dahlia pinnata* Cav.)、百日草(*Zinnia elegans* Jacq.)及非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook. f.)等重瓣品種。當花序中舌狀花數多時稱為重瓣，反之當最外圍的舌狀花瓣輪數少，花朵中心筒狀小花多時稱為單瓣花，另外菊科植物花朵內圍的筒狀花



瓣呈直立狀態時，頭狀花序外觀呈球形或座氈形，都歸類為菊科植物的重瓣花(Reynolds and Tampion, 1983)。

(五) 花朵異常化的重瓣花(floral abnormalities)

泛指其他增加類似花瓣的重瓣花，常見為苞片瓣化，如重瓣聖誕紅(*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch)、九重葛(*Bougainvillea spectabilis* Willd.)、杜鵑花及麒麟花(*Euphorbia milii* Des Moul.)等。另外進行花芽分化及發育過程中，頂端分生組織受到環境或營養的阻礙，重新分化或發育產生花中有花的情況，在重瓣蓮花(*Nelumbo nucifera* L.)及菊花上有部分品種屬於此種形態的重瓣花(姜等人，2009)。

另外金盞花(*Calendula officinalis* L.)有增生形及花序形重瓣花，杜鵑花有花萼瓣化、重複起源及雄蕊瓣化形等重瓣花，菊花有花序重瓣及花朵異常化的重瓣花，可見同種植物中重瓣花形成方式有異且複雜，而將重瓣起源做系統性分類將有助於進一步的研究及供重瓣育種的參考(趙和劉，2009)。

四、重瓣花遺傳模式

(一) 等位基因控制(allelic mode)

1. 隱性(recessiveness)

由一對同質的隱性等位基因控制之重瓣性狀，等位基因在異質或同質顯性基因控制時表現為單瓣花。紫羅蘭(*Matthiola incana* L.)異質的單瓣植株經自交其後代單重瓣的比例 1:1，由於有控制雌雄蕊瓣化的顯性基因與一花粉的致死基因連鎖，此自交時帶顯性重瓣基因之花粉致死，所有花粉均為隱性。其自交後代產生隱性同質後代(重瓣花)比異質後代(單瓣花)為 1:1 (Saunders, 1917)。Zainol 和 Stimart (2001)用一個重瓣花菸草(*Nicotiana glauca* Link & Otto)的突變株自交，後代全部為重瓣花。重瓣花菸草與基因型同質的單瓣花品種行正反雜交的 F_1 代全為單瓣花， F_1 自交後的 F_2 代出現了單瓣:重瓣=3:1 分離比， F_1 與重瓣花親本回交產生單:重瓣=1:1 的分離比例， F_1 與單瓣花親本回交全部為單瓣花，顯示重瓣花菸草的重瓣性是由 1



對隱性基因控制。重瓣花菸草自交後代的重瓣化的程度不一樣，顯示某些次要基因對重瓣化的表達有一定修飾作用。Hitier (1950)指出重瓣菸草品種 *N. tabacum* ‘Corolle Double X’ 的重瓣性是受一對隱性基因決定；但另一重瓣菸草品種 ‘Xanthi N C’ 卻受顯性基因控制，顯示品種間的重瓣性也可能由不同的等位基因所決定。重瓣花是隱性性狀的花卉，包括秋海棠、福祿考(*Phlox drummondii* Hook.)、非洲鳳仙及蔓長春等(Sink, 1973；Wang et al., 2012)。由隱性基因控制的性狀，在自然界中表現弱勢易被淘汰，故野生植物重瓣花較稀少。

2. 顯性(dominance)

重瓣性為顯性指重瓣花性狀由顯性基因控制，同質和異質的顯性基因狀態均表現為重瓣花，同質隱性基因控制時表現型為單瓣花。Kloos (2004)以非洲菊重瓣品系和野生型的單瓣品系雜交，結果 F_1 後代全部為重瓣花形，另外在正反雜交及回交的組合中結果亦相同，證明重瓣花的遺傳由顯性控制(Natarella and Sink, 1971)。重瓣花由顯性控制的花卉作物有菊花、天竺葵(*Pelargonium ×hortorum* L.H. Bailey)、翠菊及馬齒牡丹(*Portulaca grandiflora* Hook.)等(Almouslem and Tilney-Basset, 1989；Sink, 1973)。

3. 不完全顯性(incomplete dominance)

Saunders (1917)指出康乃馨的重瓣花遺傳由顯性單一等位基因(D)控制。後來 Scovel 等人 (1998)以單瓣、半重瓣及重瓣花的康乃馨進行正反雜交及回交，發現重瓣康乃馨是顯性控制，當等位基因同質(DD)時表現重瓣花，但異質(Dd)時為半重瓣，同質隱性時為(dd)為單瓣花。當一對呈顯隱性關係的等位基因，於基因異質結合時，兩者相互作用而出現了介於兩者之間的中間性狀，即異質結合(Dd)的外表形較同質結合(DD)似中間形狀時，稱為不完全顯性(incomplete dominance)又叫半顯性。另外 Scovel 等人(2000)指出康乃馨的常綠基因(Evergreen gene, e)，當植株為含有純質結合的(EE)基因型突變體，植株僅產生穗狀的苞片，不產生花朵，異質結合時花朵發育正常但花瓣數減少，作者認為此基因和康乃馨重瓣花基因(D)連鎖，並控制苞片形成、花朵分生組織的分化及花瓣數。



(二) 數量遺傳(quantitative inheritance)

Lammerts (1945)指出觀賞用桃[*Prunus persica* (L.) Batsch]品種的單瓣($D1$)對重瓣($d1$)為完全顯性，基因型為($D1D1$)時花瓣的數量僅有 5 瓣的單瓣，重瓣基因型為($d1d1$)時花瓣數表現從 6 到 10 片。重瓣桃花中有兩個累加效應的基因($dm1$)及($dm2$)，在‘Early Double Pink’基因型為($d1d1, dm1dm1$)者花瓣數為 10 至 16 片，另外在‘Early Double Red’及‘Peppermint Stick’中具有另一個累加效應基因($dm2$)，基因型為($d1d1, dm1dm1, dm2dm2$)時重瓣花的花瓣數增加到 15 至 24 片。天竺葵重瓣花遺傳由顯性基因(D)所控制，基因型為(dd)表現為單瓣花(花瓣 5、花萼 5)，(Dd)時為半重瓣形；重瓣天竺葵中有($M1/m1$)、($M2/m2$)及($M3/m3$)等 3 個修飾基因；當有(D)基因存在時，同質的隱性修飾基因($m1m1$)、($m2m2$)可以增 10 個花被片，同質結合隱性修飾基因($m3m3$)可以增加 20 個花被片，當修飾基因為($M1m1$)、($M2m2$)及($M3m3$)異質結合時就無增加花瓣數的作用。由此推測單瓣天竺葵品種的基因型為($dd, M1M1, M2M2, M3M3$)，半重瓣天竺葵品種基因型為($Dd, M1m1, M2M2, M3M3$)。這顯示主基因和修飾基因的共同作用控制植物花瓣的數量，即重瓣性主要由一對等位基因控制顯隱性，其他修飾基因影響重瓣花的花瓣數量(Almousslem and Tilney-Bassett, 1989)。

自然界很多植物的重瓣性表現為多基因控制的數量性狀，如 Serrato (1991)對萬壽菊(*Tagetes erecta* L.)進行瓣性研究指出重瓣花的後代中單瓣、半重瓣和重瓣均有分佈，單瓣花的後代為單瓣或半重瓣應該是多基因控制的數量性狀。Heursel 和 Garrestsen (1989)以杜鵑花雄蕊瓣化的重瓣品種進行雜交，後代呈現各種程度的瓣化，因此推測雄蕊瓣化的重瓣杜鵑遺傳也是由多基因控制。多基因控制的數量性狀，通過多代雜交選育，後代往往可能出現超過親代花瓣數量的品種。由於這種類型的重瓣花由多基因控制，故基因與環境交感效應對重瓣花花瓣數量的影響很大。

(三) 倍數性遺傳(polyploidy inheritance)



李等人(1983)根據核型分析野生菊花常為二倍體及四倍體，而栽培品種多為六倍體以上及其它非整倍體，且野生種多呈舌狀花單輪之單瓣花，栽培種多為多輪之重瓣花，推論菊花的花型和染色體倍性有關。Gaint 等人(2011)指出以秋水仙素所誘導的4倍體非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus 'Sciella')可增加花瓣數，提高外觀品質。Abo El-Nil 和 Hildebrandt (1973)指出4倍體重瓣天竺葵花粉進行離體培養，2倍體植株花朵會變成單瓣花。顯示染色體倍性的改變會影響有些植物的花瓣數量。

(四) 母系遺傳(maternal inheritance)

Rousi (1968)以重瓣及單瓣花型耬斗菜(*Aquilegia vulgaris* L.)設計了正反雜交及回交的試驗，顯示以重瓣品種為母本，單瓣或重瓣品種為父本，後代均只能產生重瓣花後代，若以單瓣為母本，重瓣為父本，後代僅產生單瓣花；顯示耬斗菜的瓣性受母系細胞質基因之影響。

五、影響重瓣花的外在環境因素

(一) 葉片

Tooke 和 Battey (2000)指出鳳仙花在花發育過程中，當摘除葉片至僅留1片時，花瓣的數量增加，形成重瓣花，作者認為當葉起源信號(Leaf derived signal)，受到限制後，葉來源信號的延遲及荷爾蒙、營養、環境等因素也能導致花瓣數量增加，但它們是如何調控相關基因導致花器官發育還有待進一步研究。

(二) 荷爾蒙

Raman 和 Greyson (1978)研究指出重瓣黑種草(*Nigella damascene* L.)的花苞於組織培養中需要一定量的 Kinetin 和 GA_3 才能完整分化成為重瓣花。Reynolds 和 Tampion (1983)以耬斗菜為材料，噴施 Kinetin ($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)及 GA_3 ($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)可增加花瓣數，從 16.04 片到 23.33 片及 30.83 片。Weijer (1959)以一個後代會產生 33%

的單瓣株的鳳仙花，處理 GA₃ 後變成 100% 重瓣，他認為在隱性基因所控制的重瓣花中，GA₃ 扮演一個重要角色。Garrod 和 Harris (1974) 以 IAA 和 GA₃ 處理高溫環境下生長的康乃馨 'White Sim'，會使花瓣數明顯增多。



(三) 溫度

在夏季高溫下玫瑰花葉片乾重明顯降低，葉片中累積的光合產物大量消耗在呼吸作用，造成重瓣玫瑰花花瓣數減少 (Blom, 1980)。在花發育期間給予短時間的低溫處理，使紫羅蘭花的中心長出花瓣和花萼，形成花中花形態的重瓣花 (Reynolds and Tampion, 1983)。這些結果表示花器官的發育對外界溫度敏感，重瓣花的花瓣數會受到溫度所影響。

六、日日春品種演進

日本 Sakata 種子公司於 1925 年的目錄上展示四個日日春品種，分別為花色紫紅的 'Rosa'，白花紅心的 'Alba Okulata'，花色純白的 'Alba Pura' 和花色混合的 Mix (鶴島, 2005)。1931 年美國 Ball 種子公司推出兩個商業品種，而這兩個品種外形及花色和 1658 年 Etienne de Flacourt 所描述的外觀類似，1932 年時增加一個淡粉紅色品種，1934 再推出一個純白的品種 (Curry, 2012)。早期日日春品種花色僅有紫紅及白兩種，花心眼圈顏色同樣僅有紫紅和白兩種，品種間花色的變化少且花瓣分離；另外還有分枝性差及種子發芽率低等缺點 (鶴島, 2005)。1970 年代品種目錄上增加了一些新品種，包括 'Dwarf'、'Snowflakes'、'Little Pinkie'、'Polka Dot' 等。1976 年美國康乃狄克大學的 Parker 進行了種間雜交育種計畫，育出的新品種具花色多樣、分枝性增加、株形矮化及花瓣重疊等優良性狀，使日日春觀賞品質明顯提升 (Curry, 2012; National Garden Bureau Inc., 2002)。1980 年 PanAmerican 種子公司推出的品種 (Pacifica Series) 強調早花、生長整齊及適合庭園及花壇的栽培。1988 年推出的 (Cooler Series) 如 'Grape Cooler' 及 'Peppermint Cooler' 強調新花色及種子高發芽率。1990 年 Park 種子公司目錄上提供超過 20 多個品種供生產者選擇；1991



年 Parker 的新品種‘Pretty in White’和‘Parasol’獲得全美選拔的頒獎(All-America Selection)；同年 Parker 另外推出新的(Tropicana Series)品種具有全新花色(National Garden Bureau Inc., 2002)。Goldsmith 種子公司 2007 年推出(Cora Series)，其品種植株生長勢強且花徑大，是目前臺灣栽培量第一的品種(呂，2010)。

目前流通品種中，Pacifica Series 具有最多的 18 種花色變化(鶴島，2005)。日日春銷售上分為系列品種及單一品種兩種模式，系列品種有外觀及開花期一致的特性有利於生產者管理栽培安排。另外繁殖方式仍以種子播種為主，但以插穗無性繁殖的品種近年來有增加的趨勢。在植株形態上懸垂性品種適合吊盆栽培，近年來極受都市中的消費者喜愛，另有 Mediterranean Series 及 Cora Cascade Series，統計到 2013 年已有超過 100 個以上的商業品種流通栽培。

七、日日春育種目標

栽培於花壇中的日日春常在雨後高濕及排水不良狀況下發生嚴重病害，需要靠持續的化學藥劑來防治真菌性病原菌(陳和姜，1996)。歐和吳(1998)指出臺灣在春夏秋三季，約三至十月間，從病株分離之真菌以炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、疫病菌(*Phytophthora parasitica*)與立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)為主，其中又以疫病菌對日日春的危害最為嚴重，除造成幼苗腐敗倒伏外，於成株上亦可造成根腐、莖腐、萎凋等病徵，往往導致植株死亡，因此選育出耐濕抗病之品種是日日春育種中最重要的目標。

現今流通的品種在花徑、花瓣重疊性及分枝數等其他性狀上表現良好(National Garden Bureau Inc., 2002；Vitti and Parker, 1985)，但花朵數稍嫌不足，使得日日春用於花壇栽培時常有綠葉比花朵多之視覺感受，Chaudhary 等人(2011)於誘變中找到一棵花序生長改變成總狀花序的突變株，開花時多數花同時開放於葉面上，明顯提高了觀賞性。另外在花色上，近年來出現了藍紫色及鮮紅色品種非常受市場歡迎(Kulkarni, 1999)，由於日日春遺傳資源上缺乏鮮黃色的基因，因此從無黃花品種出現，這也有待育種的突破(National Garden Bureau Inc., 2002)。



花形上近年來日日春除傳統高腳碟狀花形，在日本市場出現一些新的花形品種，如迷你花型的‘小精靈’系列，花瓣細長的‘牛奶王冠’系列和花瓣邊緣缺刻捲縮、花形立體的‘Angel Tutu’。日日春眾多品種中，僅 2008 年於 Sakata 種子公司發行的國內通訊販賣目錄中展示一花瓣基部增生 5 片細長花瓣的重瓣品種，名稱為‘夏の思い出-夏の夢’，此為首見多花瓣的日日春品種，但其花瓣分離且花色單一，枝條上花朵數少，枝條過長呈下垂狀，性狀不符盆花栽培所需，品質有待改進。一般重瓣花形需有緊密排列的花瓣，足夠的花瓣數及寬大的花瓣才能讓花形立體化，另外需有適當比例的植株和葉片大小及枝條硬度支撐花朵等條件，才是一個優良的重瓣品種(Reynolds and Tampion, 1983)。

八、環境條件對日日春生育及開花之影響

日日春性喜高溫強光，Pietsch 等人(1995)以‘Grape Cooler’為試驗材料，結果顯示在 25°C，植株生長至 9 對葉後從營養生長轉變為生殖生長。當溫度從 18°C 增高到 35°C，開花天數減少 30 天，且對生葉展開速率(Leaf-pair unfolding rate)呈線性增加。25°C 下植株有最大花朵直徑為 4.3 cm，當提高溫度到 30-35°C，可提高生長速率及提早開花，但花徑稍微降低。高溫 35°C 的處理和其他溫度處理品質上相似，適合夏季及熱帶地區栽培。

植物之細胞電解質滲漏率隨水浴溫度上升或水浴時間增加常呈 S 曲線變化，利用電解質滲漏率 S 曲線，可計算出相對傷害值 50%時對應之溫度(Temp₅₀)，即熱致死溫度(heat killing temperature)，可做為鑑別物種或品種間耐熱性之指標(Chen et al., 1982)。將日日春與香豌豆(*Lathyrus odoratus* L.)葉片置於不同溫度水浴 15 分鐘，以進行細胞膜熱穩定性測試，其中於 50°C 以上日日春葉片之電解質滲漏率才明顯上升，但香豌豆則於 47 至 48°C 即上升，顯示耐熱的日日春細胞膜穩定性高於香豌豆(Anderson and Padhye, 2004)。

在低溫 15°C 處理下‘Grape Cooler’在 60 天的試驗期均無法開花，經迴歸分析後作者推測 17.5°C 是最低的開花溫度，以葉片生長速率做迴歸分析可計算出生長基

本溫度(base temperature)約為 10°C(Pietsch et al., 1995)。在溫帶地區，若溫度低至 12 至 15°C 就需要進行避寒措施，如溫度更低於 5 至 8°C 時日日春就會立即寒害(van Bergen and Snoeijer, 1996)。

日日春喜全日照，在遮陰 50%、不遮陰及人工補光處理下，遮陰 50%處理之葉片展開速率及到開花天數都明顯延長，推測因光合產物的累積降低，故營養生長慢，開花因此延遲(Pietsch et al., 1995)。Heinze (1976)亦指出當遮光 85%時花芽無法形成，遮光 45%時開花較未遮光延遲 11 天。

日日春週年持續開花常被視為日中性植物(Boker, 1947)。Howe 和 Waters (1994)將 19 個日日春品種種植於夏秋兩季，結果種植於秋季者比夏季者早開 6 至 7 天，Heinze (1976)指出在相同溫度下，‘Little Pinkie’及‘Little Bright Eye’以 8 小時光週處理較 16 小時處理者提早 5 天開花，推測日日春為相對性的短日植物(quantitative short day plants)。

九、日日春花粉活力及授粉模式

植物生命週期分為孢子體世代(sporophytic generation)及配子體世代(gametophytic generation)，傳統育種針對孢子體世代表現進行篩選，但孢子體植株大且生育期長，需投入較多資金及時間，又須培育龐大族群供性狀選拔(Hormanza and Herrero, 1996)。某些基因在孢子體及配子體世代具有重疊性表現(Mascarenhas, 1990)，花粉與後續孢子體的表現呈正相關，對溫度、鹽分、病害、重金屬及殺草劑等抗耐性狀之反應相似，因此花粉篩選逐漸被人重視(Hormanza and Herrero, 1992)。通常最適合花粉萌發的溫度範圍會與開花的適溫相似(Weinbaum et al., 1984)，當花粉在適溫下培養時，花粉內酵素活性提高，故有最佳的花粉發芽率與花粉管生長速率；過低之培養溫度則會降低花粉及花粉管細胞膜之完整性，影響花粉萌發與花粉管之生長(Weinbaum et al., 1984)；過高之溫度亦使花粉管產生扭曲、分叉與脹裂現象(Loupassaki et al., 1997)。此外，同一物種之不同品種間的花粉對溫度反應也有差異，此現象可能與其原生地之氣候環境有關(Stern, 1998)。植物不

同品種間常有不同耐熱反應，育種前測定親本之細胞膜熱穩定性以瞭解育種材料的膜相對傷害值(relative injury, RI)，並進行花粉體外發芽最適溫度之測試均可作為耐熱育種的指標(Kakani et al., 2002)。

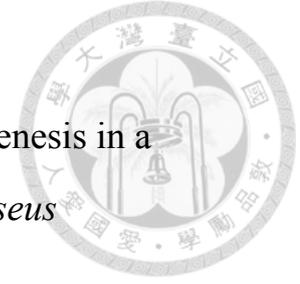
呂等人(2011)指出日日春花藥在開花前1天開裂，離體花粉在室溫中壽命約6-7天。花粉只要在一般含糖培養基中就具萌發的能力最適蔗糖濃度為20%，在不含糖的培養基中花粉管完全無法伸出，最適的發芽溫度約25°C，而25-35°C下都具有高發芽率。早期的觀察指出日日春為自花花粉可親和性的植物(Knuth, 1909)；Sreevalli 等人(2000)指出日日春的花藥和柱頭藏於細長的花冠筒中受到嚴密保護及阻隔，且花冠筒和花瓣連接處之開口直徑僅約1 mm，此封閉式的結構可以讓花粉不致受雨水淋洗及昆蟲吞食，似自花授粉植物。解剖觀察到日日春花冠筒基部子房邊有2個蜜腺，可分泌蜜汁吸引曲管式(siphoning type)口器的蝶蛾類昆蟲伸入吸食，協助日日春授粉，因此實為常異交植物(Miyajima, 2004)。

Miyajima (2004)利用日日春‘Parasol’及‘Peppermint’進行人工授粉，顯示兩品種開花第一天的授粉著果率達86.6%及100%均為最佳。在網室中無昆蟲協助下兩個品種自花授粉(intraflower self-pollination)之著果率分別為29.6%與37.8%。但Kulkarni 等人(2001)亦觀察到有三個品系在防蟲溫室下，仍然會產生果莢及種子，並以這三個品系雜交研究，以分析不需蟲媒的自花授粉性狀遺傳機制，指出此性狀為隱性基因所控制。而Kulkarni 等人進一步(2005 b)指出日日春自花授粉原因為雌蕊長度變化及柱頭與花藥重疊，提出三種不需蟲媒而可以自主授粉的狀況，第一種是柱頭增長，第二種是子房的增長，二者均會促使柱頭周邊與花藥接觸而自動授粉，第三種是花柱的增長，只要當中一種狀況發生就會自主授粉。而需蟲媒協助授粉的品系，在沒有蟲媒的情況下，柱頭則是在花藥的下方直到花朵凋謝。



第三章 重瓣日日春之花芽形態發育

Chapter 3. Anatomical Analysis of Floral Morphogenesis in a Double-flowered Mutant of *Catharanthus roseus*



附加關鍵字：突變、表皮分生組織、花藥、埋蠟切片

Additional index words: mutant, adaxial meristem, anther, paraffin section

摘要

本研究觀察單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’及其突變之重瓣日日春 TYV1 不同生長期的花苞。依據其縱徑大小與外觀形態，將花苞分為 12 期，取前 6 期進行解剖與埋蠟切片觀察記錄，調查花苞各部位分化發育情形。TYV1 外花瓣 5 片輪生成高腳碟狀(salverform)，新增生內花瓣 5 片輪生成漏斗形(funnel-shaped)，內花瓣起源於花冠筒(corolla tube)頂端與花瓣連接處。雌雄蕊位於花冠筒上部膨大的喉部(throat)，柱頭於花藥下方，開放 1 到 2 天的 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’花朵柱頭上部和花藥的下端重疊距離為 0.56 ± 0.01 及 0.82 ± 0.02 mm。埋蠟切片(paraffin section)觀察花蕾第 1 階段花萼已清楚可見，花瓣、花藥隆起，心皮部位顏色較深尚未分化；第 2 階段花苞外觀可見細長花萼，花瓣與花冠筒連接處向內面內花瓣增生隆起；第 3 階段外觀萼片與外花瓣約等長，內花瓣明顯伸長生長且邊緣可見絨毛，切片中可看出內外花瓣明顯共用一層細胞。雌蕊為兩枚心皮組成，合生雌蕊(syncarpous pistil)，花柱與柱頭於第 2 階段時癒合生長。花藥中花粉數量少，子房長度短，胚珠數比‘Pacifica Polka Dot’少。年輕實生苗葉片表面皺褶，進入生殖生長階段後葉片皺褶逐漸消失；TYV1 葉柄長度達 1.3 cm，而‘Pacifica Polka Dot’僅 0.4 cm。

Abstract

This study compared floral morphogenesis of double-flowered *Catharanthus roseus* TYV1 and its single-flowered parent ‘Pacifica Polka Dot’. Twelve flower developmental stages were defined based on flower bud size and the flower buds of the first six stages were taken for dissection and paraffin sectioning. TYV1 had an outer salverform whorl of petals and an additional inner funnel-shaped whorl of petals originating from the apex of the corolla. Anthers and stigma located within the throat of corolla tube. The stigma of this mutant was set below the anthers. The overlap between the top end of the pistil and bottom ends of anthers in TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’ flowers at 1-2 d after anthesis was 0.56 ± 0.01 and 0.82 ± 0.02 mm, respectively. Paraffin sectioning results showed that flower buds at stage 1 had initiated sepals, petals, and androecia, but pistil was not yet well differentiated and no inner petals were observed. Flower buds at stage 2 had visible sepals and expanded adaxial meristem at apex of corolla tube. Sepals and outer petals were the same length for flower buds at stage 3 when inner petals had started to elongate and marginal pubescent was visible. Sectioning results indicated that inner and outer petals had the same petal originality. Syncarpous pistil by fusion of two carpels formed at stage 2. TYV1 had fewer pollen, shorter ovary, and fewer ovules than ‘Pacifica Polka Dot’. Young vegetative seedlings had crinkled leaf surface in TYV1, as compared with smooth leaf surface in ‘Pacifica Polka Dot’. Petiole length of TYV1 was 1.3 cm but only 0.4 cm for ‘Pacifica Polka Dot’.

前言 (Introduction)

雖然早年學者曾對日日春進行花芽分生組織、花被、雄蕊、雌蕊等花器進行切片，探討其分化發育過程之變化，但僅限於單瓣品種(Boke, 1947, 1948, 1949)，



至今尚未有報告研究重瓣日日春內花瓣之起源。單瓣日日春之花冠由五枚花瓣原基經序列分化、發育及癒合(fusion)而來(Boke, 1948)。五枚花瓣原基同時起源，剛起源時之外觀形態與萼片相似，排列在萼片內側並與萼片交錯。花瓣原基起源後繼續向先端生長並向基部銳折覆蓋，當長度達 200 μm 時會停止縱向生長(apical growth)，而面向花原基外側之表層細胞會逐漸液胞化。另一方面，從花瓣原基起源後持續有邊緣生長(marginal growth)，花瓣邊緣有一層細胞維持分化活性，也因此日日春花瓣排列會逐漸變成螺旋狀(convolute)。雖然在 Boke (1947) 的文獻中針對幼花苞切片觀察顯示花瓣和花藥共用同一個環狀原基，但其長度僅 15 μm 。日日春的花冠筒應分為上下兩部分，花藥著生處以下稱為下花冠筒，當花朵成熟時長度約 20 mm，花藥著生處以上、未達花瓣部分則稱為上花冠筒，於花朵成熟時長度約 4 mm。上花冠筒是由五枚花瓣基部合生而成，花瓣剛起源時彼此分離，但隨著花瓣邊緣生長可觀察到花瓣逐漸倚靠。花瓣互相倚靠後到癒合之間的過程不易觀察，但可看到花瓣癒合處的組織較薄。此外，花瓣癒合後可以觀察到上花冠筒上端接近花瓣基部處有表皮分生組織(adaxial meristem)增厚的情形。雖未觀察到花瓣(corolla lobe)和即將花瓣癒合(petal fusion)前的邊緣細胞(marginal cell)有垂周分裂的情形，但根據最後無法確實分別各花瓣原有組織，但觀察成熟之花苞仍然有少量的垂周分裂進行，因此構成合瓣花。下花冠筒是由花瓣和花藥共同原基進行中間生長(intercalary) 或區域性生長(zonal)快速形成，是花冠構造中最晚分化的部分。下花冠筒會不斷向上伸長直到開花，此一快速伸長的發育現象是日日春花器發生晚期的特徵。下花冠筒組織向基部逐漸成熟，隨著花朵逐漸趨近開花階段，具分生組織活性的區域只限於花冠筒基部(Boke, 1948)。

相較於日日春，同為夾竹桃科的蔓長春花有一在野外已存在達百年之久的重瓣變異系(flore plena)，由於蔓長春花的匍匐莖節位處極易長出不定根，自行營養繁殖，故即使此重瓣變異系常有花藥或心皮瓣化等失去生殖能力之情形，也不影響其在野外生存(Wang et al., 2011)。其他植物如矮牽牛及花菸草，常是因雄蕊瓣化而形成重瓣花(Sink, 1973; Zainol and Stimart, 2001)。目前並不清楚重瓣日日春

重瓣花瓣起源是否與雄蕊或雌蕊瓣化有關，仍待進一步研究。

日日春自花花粉和柱頭具有親合性可授粉結實，但在封閉的環境中自花授粉並不常發生(呂等, 2011)，此因日日春可供花粉發芽的位置在柱頭的側面，而花藥多位於柱頭上端，當花藥開裂後花粉則僅停留於柱頭上部空間，不易落至柱頭側邊所造成(Miyajima, 2004; Sreevalli, 2000)。日日春多由曲管式(siphoning type)口器昆蟲協助授粉，這類昆蟲為吸取花冠筒底部蜜腺分泌物，細長的口器從花朵中心之小孔(orifice)伸入將自花或異花之花粉往下帶進柱頭側邊造成授粉，而此種授粉模式造成商業種子生產成本提高(Miyajima, 2004)。重瓣化常改變花朵構造，重瓣所產生的花瓣使傳粉昆蟲不再能夠幫助達到傳粉目的，因而改變環境生態，重瓣日日春重瓣花瓣之構造與其在戶外是否能與曲管式口器互動可能有關。

重瓣的花卉植物通常具有較高的欣賞價值及較久的觀賞壽命，在花形改良上重瓣花型常是重要的育種目標(Anderson, 2006)，由於重瓣花的種類多樣，遺傳方式複雜，在重瓣化過程中又常造成不孕無法產生花粉沒有種子，因此研究資料少(Reynolds and Tampion, 1983)。本研究未來為利用 TYV1 做為雜交親本進行重瓣日日春育種，因此亟需進行相關的解剖觀察，以建立重瓣花瓣的起源位置與發生時間之基本資料，以供後續育種研究之參考。

材料與方法(Materials and Methods)

TYV1(為桃園區農業改良場於桃園縣新屋鄉所收集之重瓣日日春變異品系之代號)及其變異親本‘Pacifica Polka Dot’，於 2009 年 3 月 30 日播種於長×寬×高為 60×30×4.3 cm 之 200 格穴盤，穴格體積 16.2 cm³，播種介質使用(BVB No.7A, De Lier, Holland)。當苗高 1.5 cm、具 2 對葉時，移植至容積為 250 mL、直徑 9.0 cm 塑膠盆種植，每盆 1 株。栽培介質為泥炭苔(Fafard No.1; Conrad Fafard, Agawarm, MA)及珍珠石(南海珍珠石 3 號，南海蛭石工業股份有限公司，臺北，臺灣)體積比 3：1。定植後放置於桃園農改場花卉溫室中，每盆施用 2 g 好康多 1

號(Hi-Control No.1) 14N-5.3P-11.3K (旭化成株式會社, 日本)。並每週一次 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 20N-8.6P-16.6K 可溶性速效完全肥料 Peters 20-20-20 (The Scotts Co., Marysville, Ohio, USA)。澆水頻率視介質乾燥程度以人工方式給水, 每盆每次澆水量約 80 mL; 定期實施病蟲害防治, 用藥參考植物保護手冊。

果莢長度、種子大小及發芽率調查, 於 2009 年 5 月至 10 月間於進行。自交後果莢約 30 天黃熟, 果莢採收時以游標尺測量長度, 每一果莢為一重複調查 20 個果莢。果莢陰乾種子脫離, 量測種子縱徑, 每一顆種子為一重複, 每品種調查 20 顆。發芽率測試以直徑 15 cm 塑膠盆播種, 每盆 50 顆種子, 介質使用泥炭苔 (BVB No.7A, De Lier, Holland), 每品種播 3 盆, 每盆為一重複。調查期間溫室內平均溫度為 30°C , 每日最大光強度約 $400\text{-}500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

後又於 2013 年 2 月 1 日播種, 於 2013 年 3 月 5 日移植, 定植後放置於 $30/25^{\circ}\text{C}$ 之人工氣候室中, 栽培管理方式如上述。葉片皺縮觀察於整個栽培期中進行, 並以數位相機拍照比對; 葉柄長度、花徑及子房胚珠數調查於 2013 年 6 月進行, 參試品種種植於人工氣候室 $30/25^{\circ}\text{C}$ 之環境, 葉柄長度以游標尺量測, 選開花後植株頂梢下第 3 至 5 片成熟葉之葉柄, 每片葉為 1 重複, 量測 10 片, 花徑調查每朵花為 1 重複, 每品種調查 10 朵, 子房胚珠數每品種調查 4 個子房, 於解剖顯微鏡(Model SMZ-U, Nikon Co., Tokyo, Japan)下進行調查。

花器解剖觀察係將 1-6 生育階段之花苞以解剖刀進行縱切, 以解剖顯微鏡 (Model SMZ-U, Nikon Co., Tokyo, Japan) 觀察並用數位照相機 (Optronics MicroFire True Color Firewire Digital CCD Camera, Meyer Instrument Inc., Houston, TX, USA) 拍照觀察內輪增生花瓣之位置。以圖像分析軟體測量柱頭頂部和花藥下端重疊距離 (Picture Frame 2.3, Optronics, CA, USA)。

為觀察 TYV1 新增生的內花瓣分化之階段及形成之位置將 1-6 生育階段之花苞進行埋蠟切片, 處理方法參考蔡(1992)之步驟, 之花蕾樣品浸入 FAA 固定液 (50% 乙醇: 冰醋酸: 福馬林體積比 90:5:5) 之固定瓶中, 並抽氣至隔夜使花蕾樣本下沉。固定後去除固定液, 將樣品以 20%、35%、55%、75% (v/v 100% 酒

精)及100%第三級丁醇(tertiary-butyl alcohol, TBA)序列脫水,各濃度浸漬3小時,再更換100% TBA 脫水二次各12小時。脫水後樣品連同固定瓶及100% TBA 置入65°C烘箱中,瓶口放入濾紙槽,每2-3小時於槽內添加溶點56-57°C之石蠟顆粒(TissuePrep®, FisherScientific Co., USA),添蠟2-3次使樣品逐漸滲蠟,再以液態純蠟快速置換瓶內1/3之混TBA蠟液,6小時後再以液態純蠟置換2/3混TBA之蠟液,並將瓶口打開使TBA揮發,六小時後再倒出瓶內所有混合有TBA之蠟液,並倒入純蠟液,隔夜重複一次。取出滲蠟之樣品包埋製成石蠟塊,修整後以手動切片機(Model MIC 505, Euromex Microscopen, Arnhem, Holland)切成厚度10-12 μm之切片蠟帶,取清潔的載玻片塗佈以微量1甘油:1蛋白(體積比)之黏著劑後,置於40°C加熱板上並滴加3%福馬林,將切片蠟帶漂浮於載玻片之福馬林上,使其展著。黏著乾燥後於抽風櫃中進行脫蠟與染色,將附著蠟帶之載玻片浸於二甲苯(Xylene)中20分鐘以脫蠟,再以1二甲苯:1酒精(體積比)之溶液及100%、95%、80%、70%和50% (v/v dH₂O)乙醇序列復水,各濃度浸3分鐘,於1% Safranin O (以50%乙醇配製)染色隔夜,再以70%、80%及90% (v/v dH₂O)乙醇序列脫水後,於Fast green (以95%乙醇配製)染色10秒,再以95%及兩次100%酒精脫水;置換於1二甲苯:1酒精(體積比)之溶液3分鐘,再以純二甲苯浸泡10分鐘,取出後於抽風櫃中風乾。之後以光學顯微鏡(Nikon E600, Nikon Co, Tokyo, Japan)觀察,並以顯微鏡數位相機進行拍照。

統計分析

試驗皆採完全逢機試驗設計(Completely Randomized Design, CRD)。試驗結果以CoStat 6.4 (CoHort Software, USA)統計軟體進行 *t*-test 或最小顯著差異(Least significant difference, LSD)分析比較處理間差異,顯著水準為 $P < 0.05$ 。

結果(Results)

將重瓣日日春TYV1及單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’栽培於人工氣候室30/25°C之環境中，開花後取12發育階段花苞及花朵進行形態觀察，stage 1-6 (圖 3.1)解剖及埋蠟切片觀察。TYV1花朵最外圍是五片花萼，細長平滑呈綠色；內側為細長管狀的花冠筒平均長度為 20.2 ± 1.2 mm，上端為膨大喉部長度為 6.1 ± 0.3 mm，內含5個花藥和1柱頭，柱頭位於花藥下方，花藥以短花絲著生於花冠筒喉部內壁，外觀上有明顯的突起點(圖 3.1)。花冠筒喉部上端及下端均有纖毛(hair)，但TYV1的纖毛顯著較‘Pacifica Polka Dot’少(圖 3.3)。TYV1花開放1至2天後，估算柱頭上方和花藥下方的重疊距離為 0.56 ± 0.01 mm，而‘Pacifica Polka Dot’則為 0.82 ± 0.02 mm (圖 3.3)。內花瓣起源於花冠筒頂端與花瓣連接處，花朵中心形成一個直徑約1 mm的圓形孔(orifice)，小孔邊緣有細絨毛(pubescence) (圖 3.2)，TYV1之重瓣花屬於合瓣花花瓣輪數增加之類型。

外觀上TYV1花瓣2輪10片，外花瓣輪生成高腳碟狀(salverform)，新增生內花瓣輪生成漏斗形(funnel-shaped) (圖 3.2)，幼年期葉片表面皺褶，‘Pacifica Polka Dot’無此性狀，葉色顏色綠色而‘Pacifica Polka Dot’較深為濃綠色(表 3.1)。子房胚珠數15.0顆，比‘Pacifica Polka Dot’的26.8顆少；果莢長度TYV1為1.5 cm，‘Pacifica Polka Dot’長度較長為2.8 cm；種子長度為TYV1為1.4 mm，‘Pacifica Polka Dot’為1.3mm，種子發芽率TYV1為53.1%，‘Pacifica Polka Dot’為76.5%，葉柄長度TYV1為1.3 cm，‘Pacifica Polka Dot’為0.4cm，平均花徑TYV1為2.3 cm，而‘Pacifica Polka Dot’為4.1 cm (表 3.2)。重瓣日日春TYV1之子房長度小於‘Pacifica Polka Dot’(圖 3.4)。

花苞前6階段埋蠟切片觀察，結果顯示TYV1品系花苞第1階段，各部位已開始發育，依序由外向內為花萼、花瓣、花藥及尚未分化的心皮，未見內層增生花瓣(圖 3.5A)；第2階段花苞外觀實際長度約2 mm 肉眼可見細長花萼，花瓣與花冠筒連接處向內面細胞增生隆起(圖 3.5B)；第3階段實際長度約3 mm，萼

片與外花瓣約與等長，內花瓣明顯伸長生長且邊緣可見毛絨(圖 3.5C)。切片中可看出內外花瓣明顯共用一層細胞；第 6 階段花冠筒下部開始快速進行中間生長。‘Pacifica Polka Dot’切片觀察在第 1 階段已開始各花器官分化(圖 3.7A)，相較之下，TYV1 分化發育速度明顯較慢。切片顯示柱頭頂面平滑而側面具毛絨狀突起(圖 3.7E)，此部位為柱頭上花粉發芽之位置，日日春雌蕊為合生雌蕊(syncarpus pistil)，由兩個心皮、花柱與柱頭，合生在一起，切片中 2 花柱合生(圖 3.6B)；子房位於花冠筒下方的花托基座，為子房上位花，兩個蜜腺組織(nectary)位於子房邊(圖 3.4A、B)。

外觀上重瓣日日春 TYV1 實生小苗在生殖生長前葉片皺縮明顯(圖 3.9)，進入生殖生長開花後葉片皺縮情況漸漸回復正常。另外葉片上的葉柄長度為 1.4 ± 0.3 cm 比對照品種‘Pacifica Polka Dot’的 0.4 ± 0.2 cm 長，外觀上葉柄中段有一類似托葉突起痕跡而‘Pacifica Polka Dot’無此性狀(圖 3.10)。

討論(Discussion)

本研究以日日春TYV1不同發育時期之花苞為材料分為12階段(圖 3.1)，取 1-6 階段進行埋蠟切片觀察花苞發育過程。第 1 階段實際長度約 0.5 mm，肉眼不易觀察，解剖後可看到最外層細長的花萼明顯發育快速，內層的花瓣原基、花藥及心皮剛隆起(圖 3.5A)，切片顯示花瓣原基、花藥及心皮細胞濃密排列，而萼片細胞已分化完成(圖 3.5B)。第 2 階段內層增生花瓣起源於花瓣基部和花冠筒連接處，切片可看到內花瓣隆起(圖 3.6B)，花瓣基部初期分離後漸漸癒合成花冠筒上部(圖 3.5B)。這和Boke (1947)以單瓣日日春花芽分化的初期切片形態觀察相同，癒合的過程不易觀察，但可看到花瓣癒合處的組織較薄，因此花朵屬於合生花。

在第 3 階段埋蠟切片圖可看出內花瓣持續隆起，並與外花瓣明顯連結共用一層細胞(圖 3.6B)，這層細胞表層花青素聚集是外層花瓣的向上面，內層花瓣的向外面或向下面，使得外觀上內外層花瓣位置及顏色相反。Boke (1948)從花苞切片

指出花瓣和花冠筒連接處此位置細胞具有近軸面的表皮分生組織(adaxial meristem)，在TYV1的切片觀察中發現此為內花瓣分化處。開花植物器官分化發育過程一般為向頂順序(acropetal)，亦即依花萼、花瓣、雄蕊、隨後雌蕊的順序，逐漸從位於外側的器官順次向內側器官分化發育(Bold et al., 1987)。由切片觀察日日春重瓣品種花器官的發育順序相同，內花瓣原基分化後伴隨外花瓣持續發育。

日日春成熟萼片及花冠筒內外多為絨毛(trichome)所覆蓋，但花瓣則僅於尖端及邊緣可見(Boke, 1948)。呂等人(2011)經由解剖觀察單瓣品種日日春花冠筒中具有許多纖毛(hair)構造，在花藥的上方纖毛幾乎佈滿開口。Miyajima (2004)指出此纖毛構造可以防止外來的灰塵、花粉、雨水及細小異物進入，且可分為上下兩部分，上半部阻擋外來物，而下半部的纖毛可防止花粉掉落花冠筒中。TYV1在花冠筒上端的喉部(throat)，內邊的纖毛排列稀疏，不像‘Pacifica Polka Dot’數量多排列整齊(圖 3.3)，為何TYV1纖毛稀少原因並不清楚，仍待進一步研究探討。

在外觀形態上TYV1花苞在第10階段時(圖 3.1)，花冠筒上端花瓣部位較對照品種‘Pacifica Polka Dot’短和寬，主要由多一層花瓣所造成。重瓣花所造成花苞直徑較單瓣品種大，重瓣花菸草及重瓣蔓長春的花苞切片調查上均有此現象(Zainol et al., 1998; Wang et al., 2011)。重瓣日日春並不像雄蕊完全瓣化的重瓣毛茛(Galimba et al., 2012)，缺乏具功能的雄蕊，無法做為雜交的花粉親。從解剖中觀察到TYV1雌雄蕊器官依然存在，但子房長度明顯比對照‘Pacifica Polka Dot’短，胚珠數少(圖 3.4; 表 3.1)，花藥中花粉數量亦少，這和Kulkarni和Baskaran (2008)日日春變異株遺傳研究中指出有一花粉數量少的突變株，不利於花粉收集，且花粉活力弱，雜交後果莢的種子數量少之特徵相同。

日日春柱頭可讓花粉發芽的位置為柱頭的側邊，子房旁有兩個蜜腺體(nectary)會吸引曲管式(siphoning type)口器之昆蟲，為吸食蜜汁將花粉推往側邊協助授粉，因此日日春為常異交植物(Miyajima, 2004)。部分品種在無昆蟲協助下，

會有自花授粉之情形產生，主因為雌雄蕊之間重疊距離大，花粉直接散落於柱頭側邊(Kulkarni and Baskaran, 2013；Miyajima, 2004；Sreevalli, 2000)。TYV1開花後1-2天的調查顯示雌雄蕊重疊距 0.56 ± 0.01 mm，這樣的距離無法讓TYV1進行自花授粉，另外內層花瓣阻隔花冠筒頂端小孔亦讓授粉昆蟲無法進行授粉(圖 3.3)，這為TYV1無法自然產生種子之原因。

TYV1在葉片外觀上葉柄長度 1.4 ± 0.3 cm比對照品種‘Pacifica Polka Dot’ 0.4 ± 0.2 cm長，葉柄中段處有類似托葉的痕跡，在痕跡之上應為原來之葉柄，下段應由枝條上表皮維管素與莖分離形成(圖 3.10)。Gupta 等人(2007)指出日日春長葉柄性狀的突變株*gsr8*，有葉色較淡、葉片波浪狀及果莢長度短的外觀，性狀遺傳上為隱性。TYV1和*gsr8*的外觀性狀多處相似，僅在花型及葉形上不同，這顯示日日春的突變性狀在不同植株上會重複出現。

TYV1幼年期葉片皺縮之特性，緊密和重瓣花連鎖，是苗期早期篩選重瓣株的良好指標(圖 3.9)，Saunders (1917)在紫羅蘭重瓣花遺傳中亦指出有明顯的葉色和重瓣基因連鎖可做為篩選指標提高重瓣苗的整齊度，顯示重瓣的突變也常伴隨同一染色體其他部位突變。TYV1皺縮葉片之原因推測可能幼小植株體中養分累積不足使葉片上層的柵狀細胞(palisade cells)排列不整齊所導致，而當進入生殖生長後葉片面積增加到一定量的光合產物後使葉片漸漸回復正常狀態。苗期葉片皺縮外觀像菌質體(phytoplasma)感染生長異常之症狀(Su et al., 2011)，由於苗期皺縮捲曲的葉片像似罹病植株，使得生產業者及育種家在栽培過程中在未開花前先將其淘汰這也可部分說明為何市面上一直沒有重瓣日日春品種出現的原因之一。





圖 3.1. 重瓣日日春TYV1 (A)及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’ (B)花朵不同發育階段之外觀形態

- 第1期：縱徑0.5-0.9 mm左右，莖頂膨大肉眼不易觀察。
- 第2期：縱徑約1.0-1.9 mm，看到細長花萼內側莖頂微微膨大。
- 第3期：縱徑約2.0-2.9 mm，花萼明顯，花瓣開始形成。
- 第4期：縱徑約3.0-3.9 mm，花瓣綠色明顯約凸出花萼1 mm。
- 第5期：縱徑約4.0-5.9 mm，花瓣生長快速伸長。
- 第6期：縱徑約6.0-8.9 mm，喉部和花瓣完成。
- 第7期：縱徑約9.0-12.9 mm，花瓣綠色喉部下端花冠筒開始伸長。
- 第8期：縱徑約13.0-16.9 mm，花瓣漸轉成淡綠色，喉部下端花冠筒開始伸長快。
- 第9期：縱徑約17.0-20.9 mm，喉部下端花冠筒持續伸長。
- 第10期：縱徑約21.0-25.9 mm，花瓣轉淡綠色，已有膨脹現象。花冠筒伸長結束。
- 第11期：縱徑約26.0-30.0 mm，花瓣轉為白色，微開。
- 第12期：縱徑約26.0-30.0 mm，花瓣開放。

Fig. 3.1. Flower appearance of TYV1 (A), a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* and its single-flowered parent ‘Pacifica Polka Dot’ (B) at different developmental stages.

- Stage 1: \approx 0.5-0.9 mm long, shoot apex expanded but not easily visible.
- Stage 2: 1.0-1.9 mm long, thin sepal and expanded floral apex visible.
- Stage 3: 2.0-2.9 mm long, sepal visible and early petal formation.
- Stage 4: 3.0-3.9 mm long, green petals visible and tips are 1 mm above sepal.
- Stage 5: 4.0-5.9 mm long, petals grow apically and rapidly.
- Stage 6: 6.0-8.9 mm long, throat and petals completely formed.
- Stage 7: 9.0-12.9 mm long, start of lower corolla elongation, petal remains green.
- Stage 8: 13.0-16.9 mm long, corolla continue to elongate, petal turns light green.
- Stage 9: 17.0-20.9 mm long, corolla continue to elongate.
- Stage 10: 21.0-25.9 mm long, corolla lobes turn even more light green and expand like a balloon. Corolla tube elongate slowly.
- Stage 11: 26.0-30.0 mm, corolla lobes turn white, anthesis.
- Stage 12: 26.0-30.0 mm, corolla lobes fully expanded.



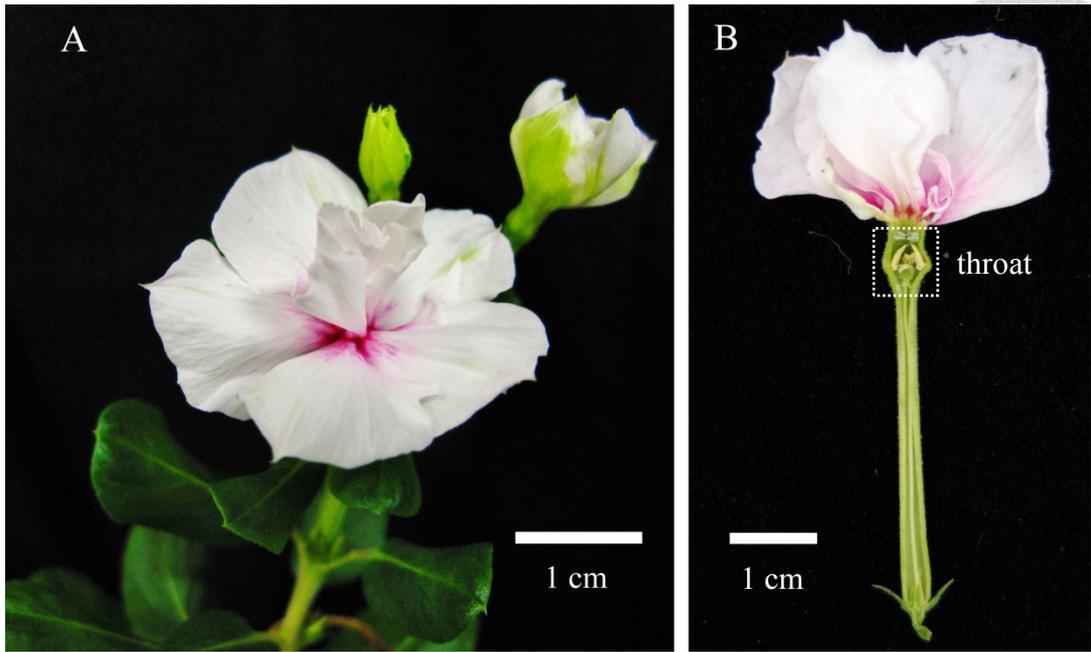


圖 3.2. 重瓣日日春 TYV1 變異株花朵外觀(A)及花朵縱切(B)。

Fig. 3.2. Flower appearance (A) and longitudinal section of a flower (B) of TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus*.

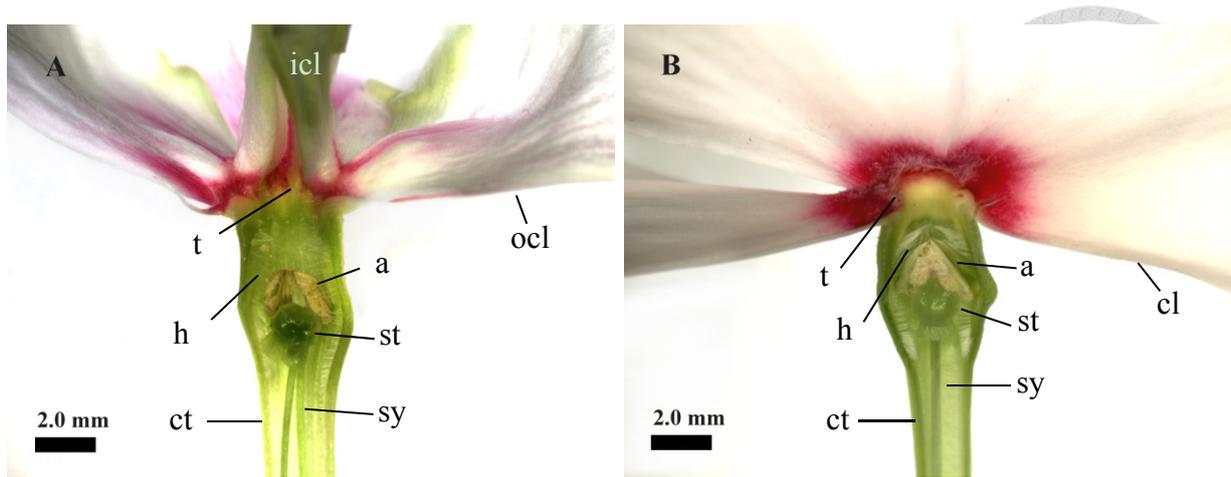


圖 3.3. 重瓣日日春 TYV1 (A)與其來源親本單瓣‘Pacifica Polka Dot’ (B)之花冠筒上部結構

Fig. 3.3. Structure of the apex of a corolla tube of TYV1 (A), a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* and its single-flowered parent ‘Pacifica Polka Dot’ (B). Bar = 2 mm. a, anther; cl, corolla lobe; ct, corolla tube; h, hair; icl, inner corolla lobe; ocl, outer corolla lobe; t, trichome ; st, stigma; sy, style.



表 3.1. 重瓣日日春 TYV1 與單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’之葉片表面、葉色及花型比較

Table 3.1. Leaf surface, leaf color, and flower type in *Catharanthus roseus* TYV1, a double-flowered mutant and single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’.

Plant material	Leaf surface	Leaf color	Flower type
TYV1	Crinkled	Green	Double
Pacifica Polka Dot	Smooth	Dark green	Single

表 3.2. 重瓣日日春 TYV1 與單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’形態之差異

Table 3.2. Morphological difference between *Catharanthus roseus* TYV1, a double-flowered mutant and single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’.

Plant material	Petiole length (cm)	Flower diameter (cm)	Ovule no.	Follicle length (cm)	Seed length (mm)	Seed germination (%)
TYV1	1.3	2.3	15.0	1.5	1.4	53.1
Pacifica Polka Dot	0.4	4.1	26.8	2.8	1.3	76.5
<i>t</i> -test	***	***	***	***	NS	***

NS,*** Nonsignificant or significant at $P < 0.001$ level.

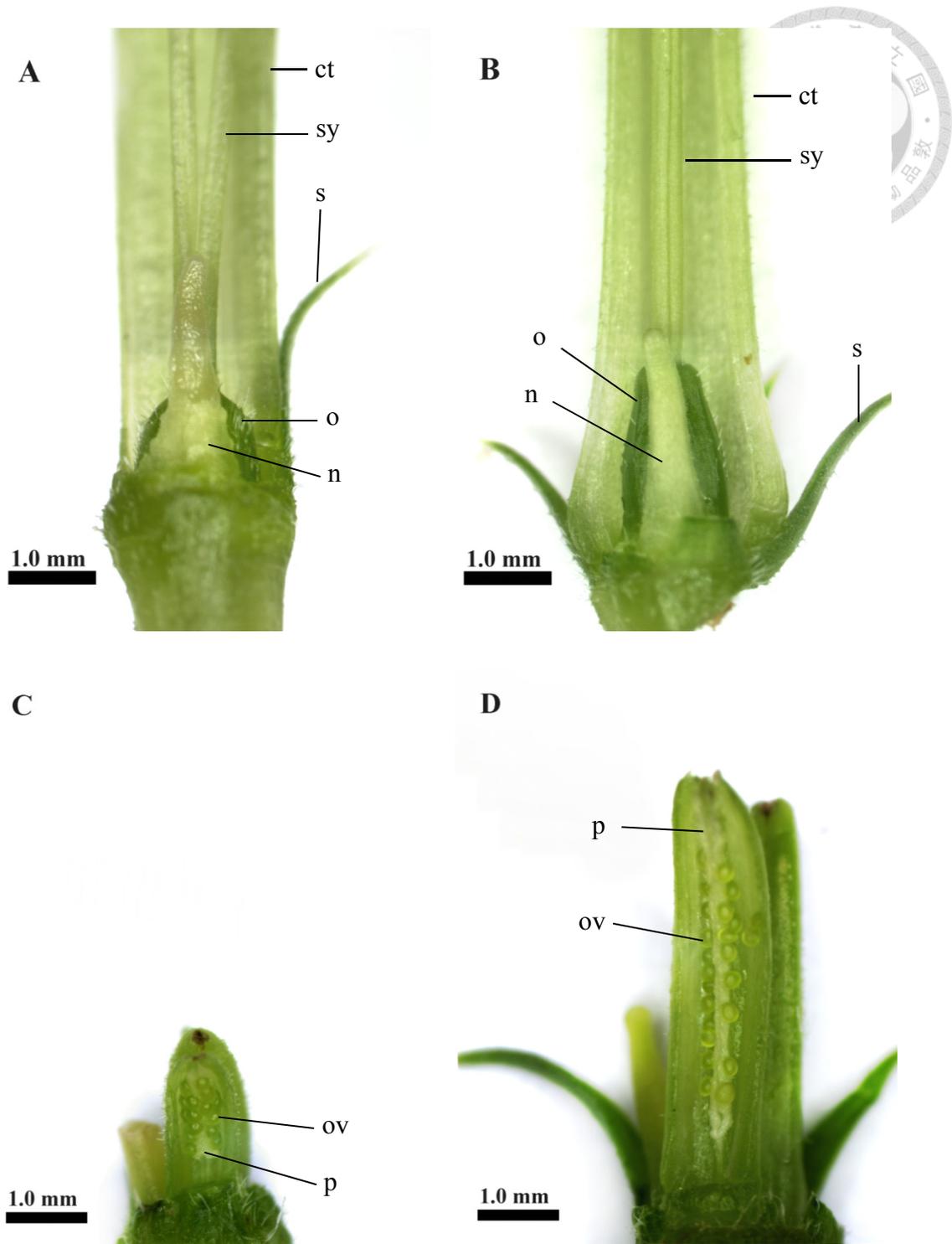


圖 3.4. 重瓣日日春 TYV1 (A 和 C)與其來源親本單瓣‘Pacifica Polka Dot’ (B 和 D)之花冠筒下部結構

Fig. 3.4. Appearance (A and B) and inside (C and D) of a ovary of TYV1 (A and C), a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* and its single-flowered parent ‘Pacifica Polka Dot’ (B and D). Bar = 1 mm. ct, corolla tube; n, nectary; o, ovary; ov, ovule; p, placenta; s, sepal; sy, style.

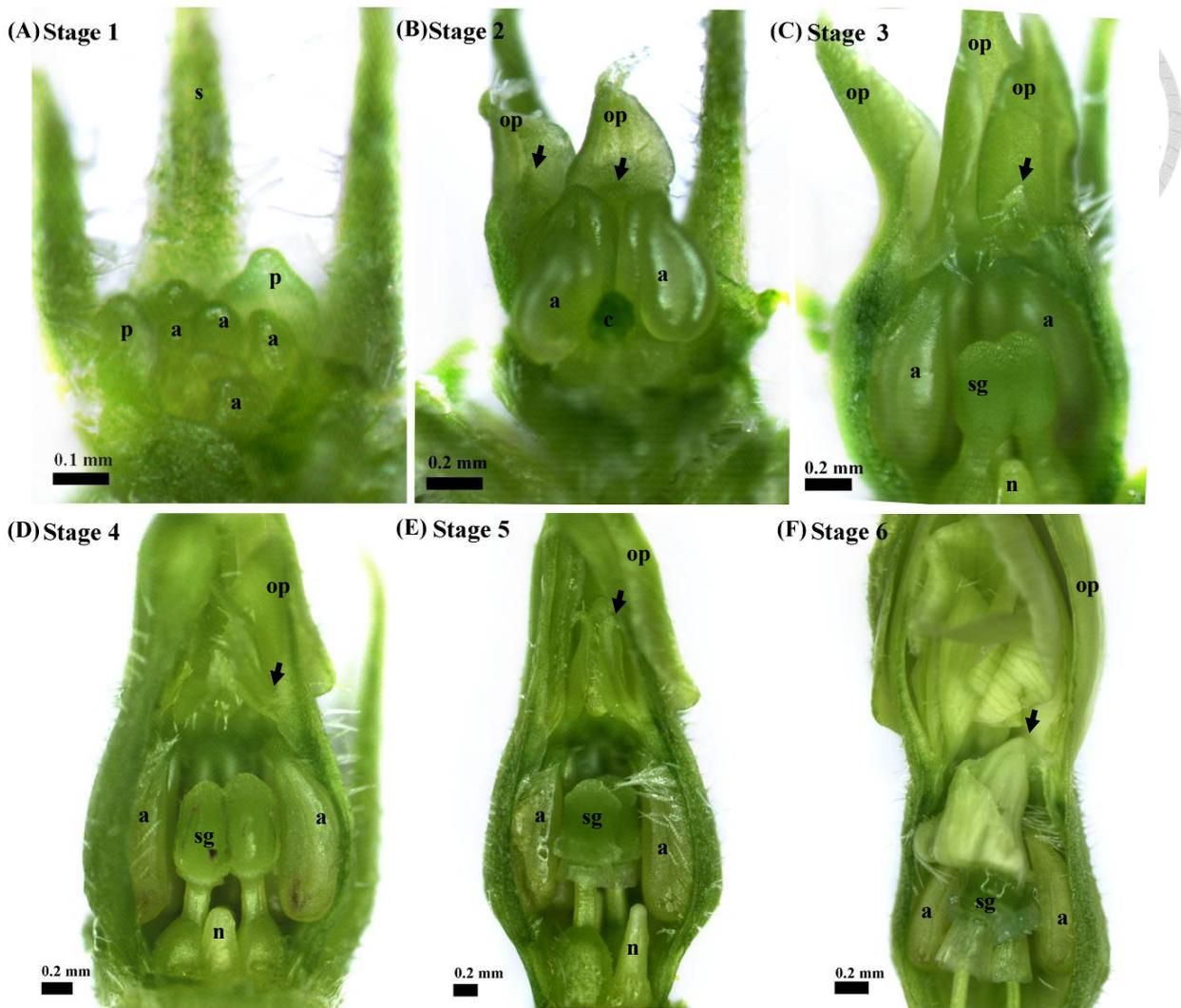


圖 3.5. 重瓣日日春 TYV1 花芽發育初期變化之解剖觀察

Fig. 3.5. Anatomical observation of TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* by dissection. a, anther; c, carpel; n, nectary; op, outer petal; p, petal; s, sepal; sg, stigma. Arrow indicates inner petal.

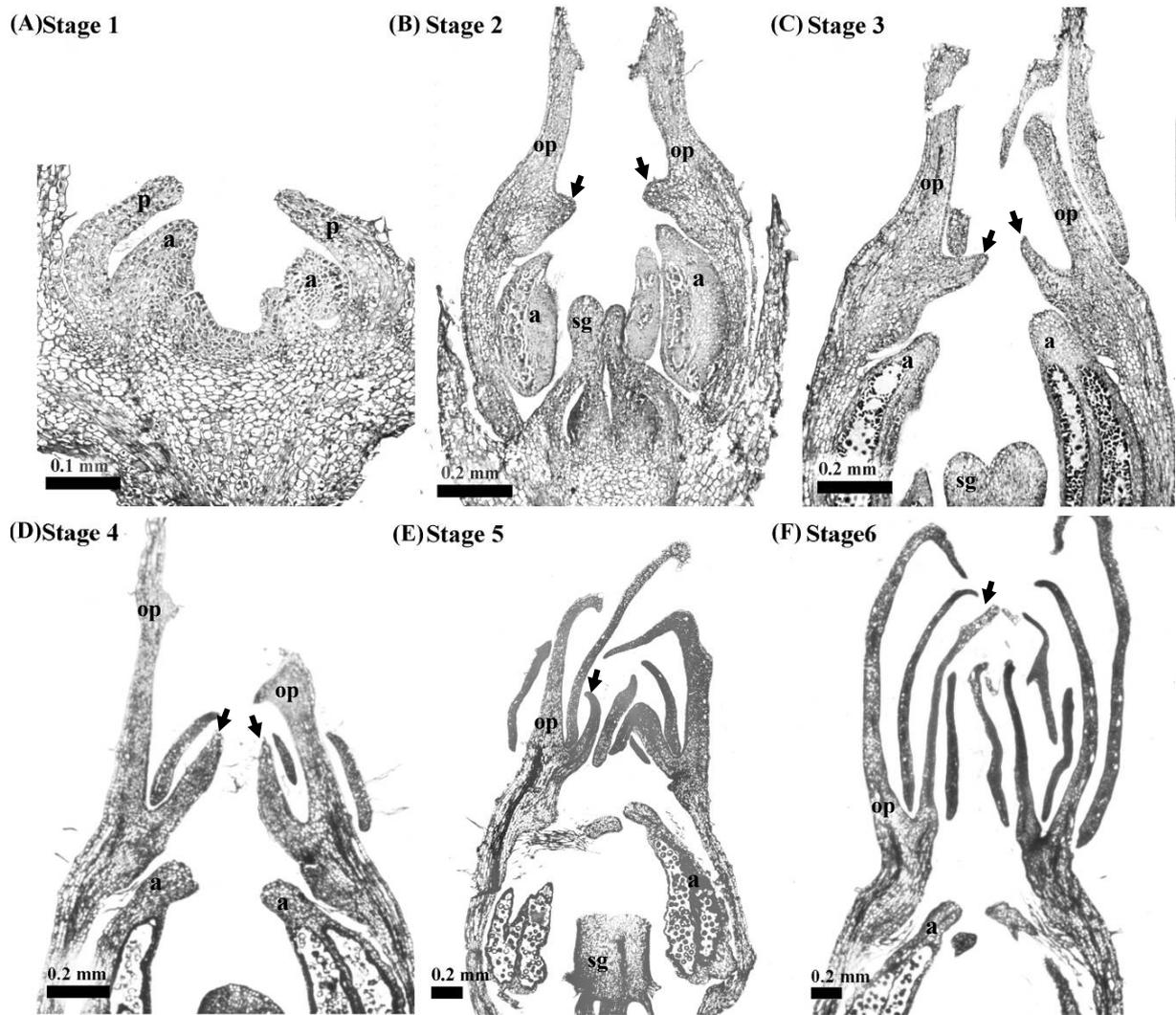


圖 3.6. 重瓣日日春 TYV1 花芽發育初期變化之切片觀察

Fig. 3.6. Anatomical observation of TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* by wax sectioning. a, anther; op, outer petal; p, petal; sg, stigma. Arrow indicates inner petal.

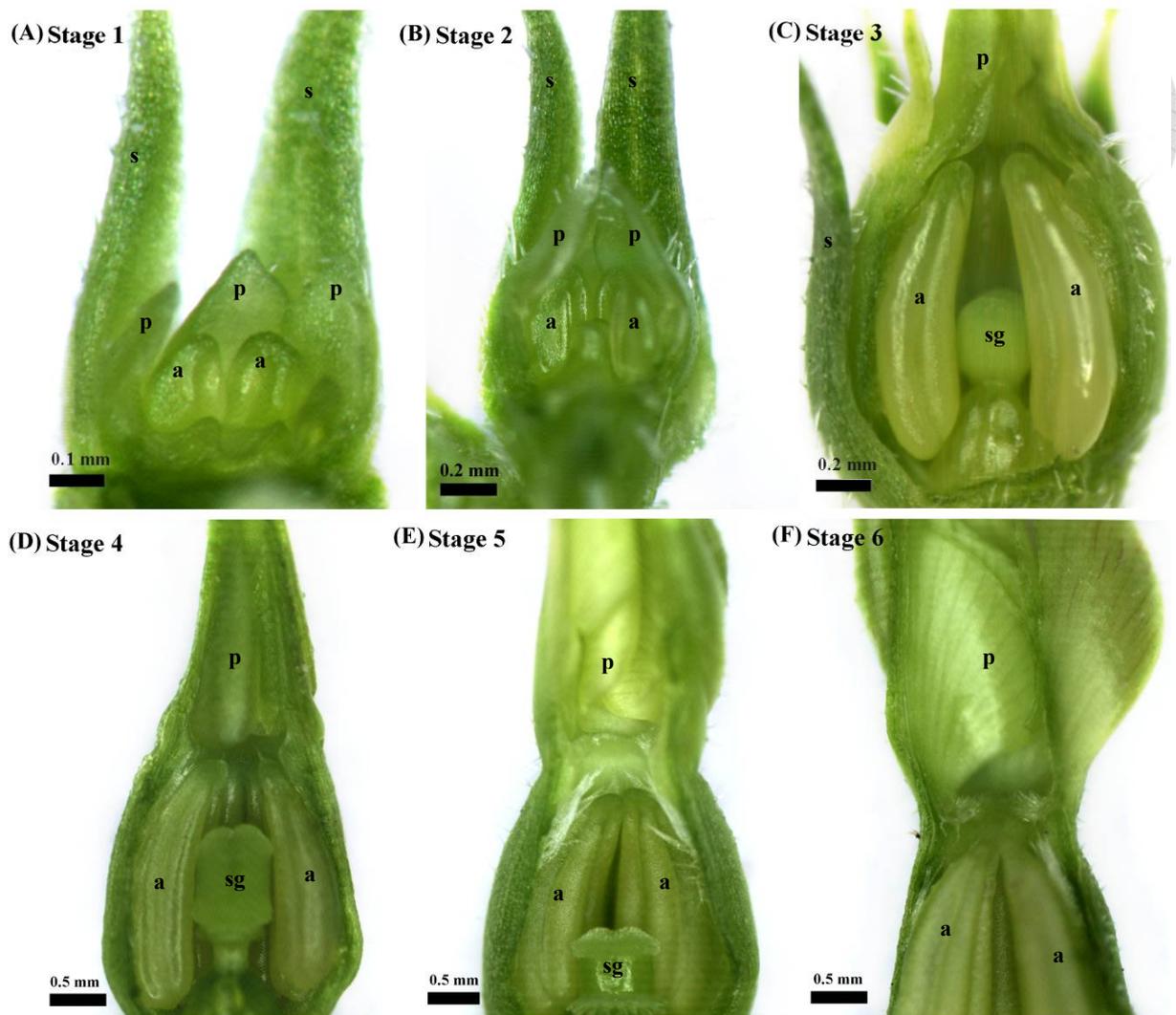


圖 3.7. 單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花芽發育初期變化之解剖觀察

Fig. 3.7. Anatomical observation of single-flowered *Catharanthus roseus* ‘Pacifica Polka Dot’ by dissection. a, anther; p, petal; s, sepal; sg, stigma.

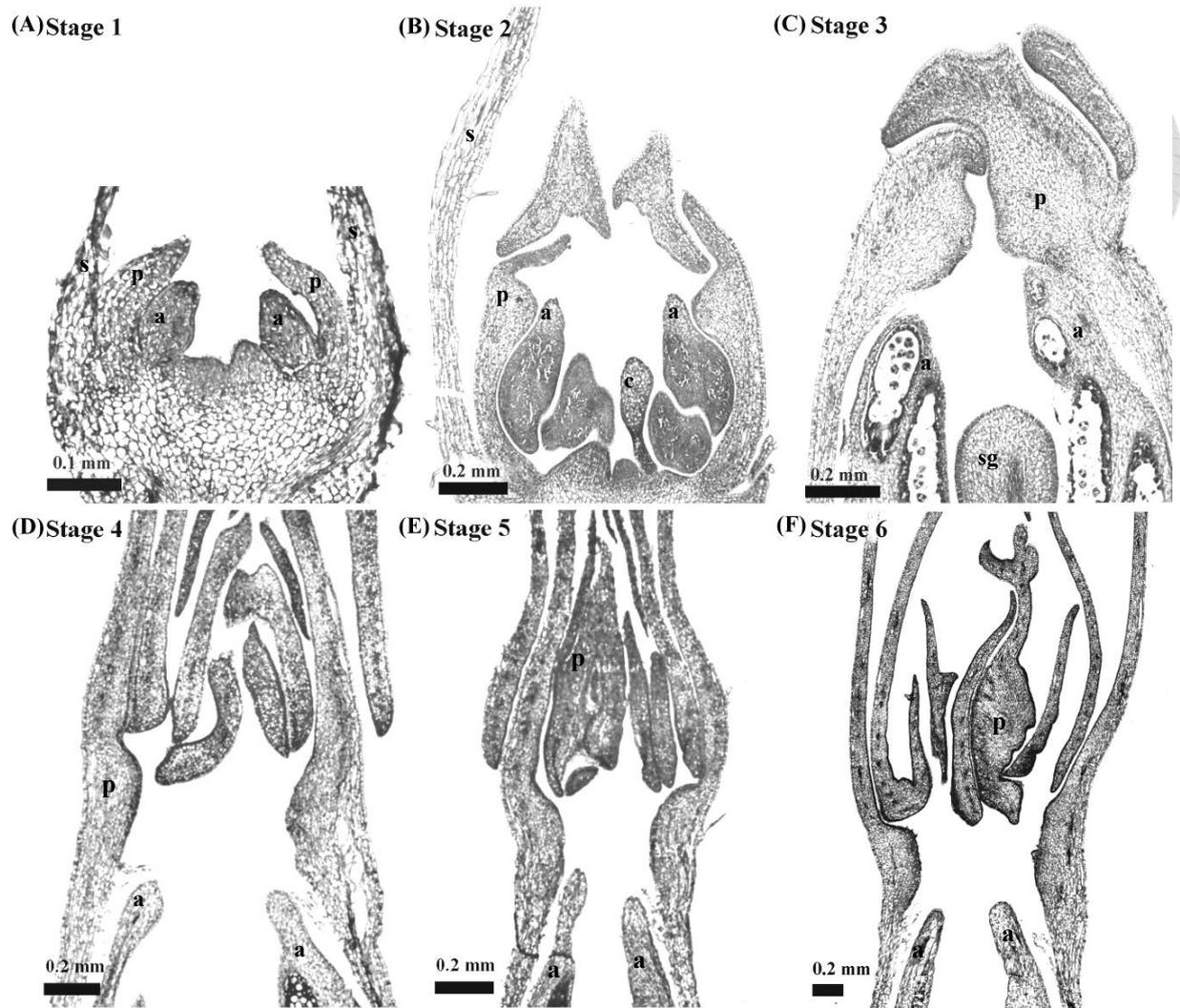


圖 3.8. 單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花芽發育初期變化之切片觀察

Fig. 3.8. Anatomical observation of single-flowered *Catharanthus roseus* ‘Pacifica Polka Dot’ by wax sectioning. a, anther; c, carpel; p, petal; s, sepal; sg, stigma.

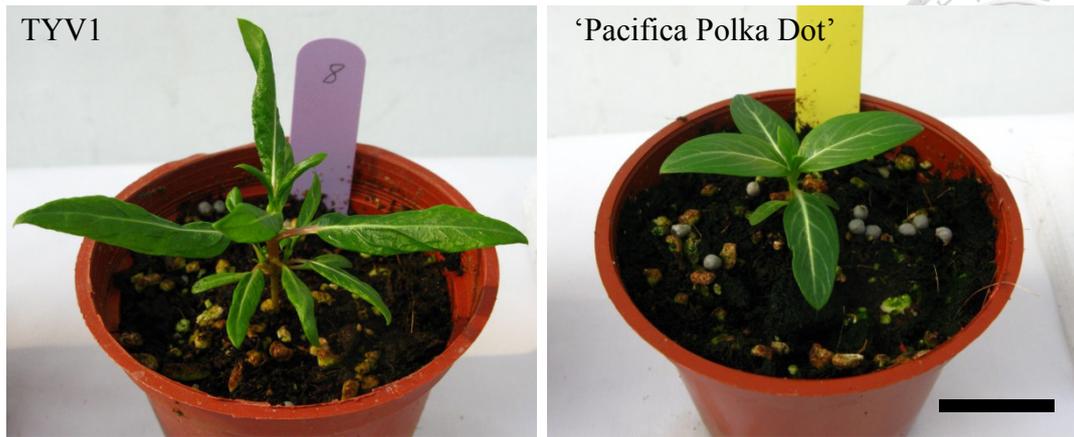
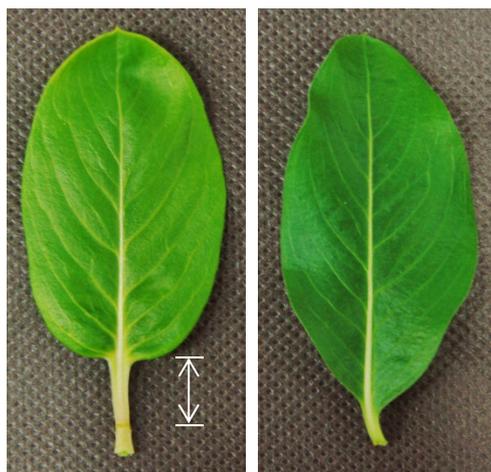


圖 3.9. 重瓣日日春 TYV1 及其來源親本‘Pacifica Polka Dot’栽培於 30/25 °C 之年輕實生苗葉片外觀

Fig. 3.9. Leaves appearance of young seedlings of TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its single-flowered parent ‘Pacifica Polka Dot’ grown at 30/25 °C. Bar = 2.5 cm. Note that TYV1 showed crinkled leaf, as compared to smooth leaf of ‘Pacifica Polka Dot’.

TYV1



'Pacifica Polka Dot'



圖 3.10. 重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春 'Pacifica Polka Dot' 葉柄形態
Fig. 3.10. Petiole morphology of TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* and its single-flowered parent 'Pacifica Polka Dot'. Bar = 1 cm. Double-head arrow indicates petiole.



第四章 溫度對重瓣日日春生育、細胞膜熱穩定性及花粉發芽之影響

Chapter 4. Effects of Temperature on Growth, Flowering, Cell Membrane Thermostability, and Pollen Germination in a Double-flowered *Catharanthus roseus* Mutant TYV1

附加關鍵字：葉片皺縮、花朵發育、熱馴化、配子體世代、孢子體世代

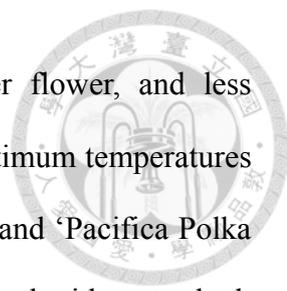
Additional index words: crinkled leaf, flower development, heat acclimatization, gametophyte, sporophyte,

摘要

本研究探討溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本‘Pacifica Polka Dot’生長發育、開花、細胞膜熱穩定性及花粉發芽之影響。結果顯示涼溫 20/15°C 不利日日春 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’生長發育，二者皆有株高較矮、到花日數較長、花徑較小、分枝數較少之情形。日日春 TYV1 之生育適溫為以 25/20°C，而‘Pacifica Polka Dot’則以 25/20-30/25°C 為較適。日日春 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’葉片相對傷害值與水浴溫度呈 S 型曲線關係。且皆 S 曲線隨栽培溫度提高而右移，並以‘Pacifica Polka Dot’之熱馴化反應較 TYV1 略為明顯。取栽培於 30/25°C 之花粉培養於含 20 蔗糖之 B&K 培養基，花粉發芽適溫範圍 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’分別為 25-30°C 與 20-40°C。

Abstract

This study aimed to investigate the effects of temperature on growth, flowering, cell membrane thermostability, and pollen germination in double-flowered TYV1 and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’ vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Results showed that plants grown of day/night temperature of 20/15°C had poor growth and flowering both TYV1 and ‘Pacifica Polka Dot’. Both TYV1 and ‘Pacifica Polka



Dot' had shorter plant height, longer days to flowering, smaller flower, and less branching, but fewer node number below the flower at 20/15°C. Optimum temperatures for growth and flowering were 25/20 and 25/20-30/25°C for TYV1 and 'Pacifica Polka Dot', respectively. The relationship between the RI value, as measured with water bath temperature from 25 to 75°C for 30 min, occurring in leaf tissue discs and the water bath temperature was sigmoidal in both TYV1 and 'Pacifica Polka Dot'. Both cultivars showed heat acclimatization response, but 'Pacifica Polka Dot' had more response than TYV1. Pollen from 30/25°C were incubated with B&K medium containing 20% sucrose, and results showed that optimum temperature for pollen germination was 25-30°C and 20-40°C for TYV1 and 'Pacifica Polka Dot', respectively.

前言(Introduction)

全球暖化的現代，耐熱作物的改良及育種越來越重要(Anderson, 2006；Hall, 1992)。日日春為重要的熱帶花卉，在溫暖、強光環境下具有周年持續開花的特性，經評估是亟具發展潛力的花卉作物(Quinn, 1996；van Bergen and Snoeijs, 1996)，各花卉育種公司近年來持續推出新品種供應市場所需(Ball, 1998；Curry, 2012)。

Pietsch 等人(1995)指出日日春'Grape Cooler'在 25°C 下需生長至 9 對葉才從營養生長轉變為生殖生長。此外，當溫度從 18 增高到 35°C，日日春'Grape Cooler'開花天數減少 30 天，且葉片展開速率與溫度呈線性正相關(Pietsch et al., 1995)。以栽培於 25°C 之日日春'Grape Cooler'植株有最大花朵直徑，當提高溫度到 30-35°C，花徑稍微縮小。Pietsch 等人(1995)並指出日日春相較於聖誕紅、菊花及百合等花卉，是少數能在高溫(30-35°C)下生育、開花良好的花卉，適合夏季及熱帶地區栽培。日日春較不適合栽培於溫帶地區；當溫度低於 5-8°C 時會發生寒害(Snoeijs, 1996)。

日日春品種間對溫度的反應有差異，例如針對冷涼環境所選育的 Cooler 品系就強調涼溫下開花品質良好(鶴島，2005)，但目前並沒有日日春耐熱或耐低溫生理



之研究報導。利用測量植物組織經過溫度處理後之細胞電解質滲漏率，可做為鑑別物種或品種間耐熱性之指標(Chen et al., 1982)。例如，七個常春藤(*Hedera helix* L.) 品种植株栽培在 35/30°C 下，葉片相對傷害值低之品種其地上部生長量較不受高溫影響(Yeh and Hsu, 2004)。此外，可藉由預馴化提升植物在高溫下細胞膜穩定度而有較未馴化者佳之生育表現(Chen et al., 1982)，如菊花‘神馬’先經 48°C 馴化 8 小時後再給予 50°C 處理葉片電解質滲漏率較未馴化者低，顯示高溫馴化有助於維持菊花‘神馬’細胞膜穩定性(李等人，2008)。

重瓣日日春 TYV1 品系由‘Pacifica Polka Dot’變異而來，並不清楚其生長發育、耐熱程度及花粉發芽之溫度反應是否和親本相同。因此，本試驗以重瓣日日春 TYV1 及其親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’為材料，探討環境溫度對其生長及開花之影響，並調查葉片細胞膜熱穩定性及花粉培養溫度對花粉發芽之影響，以做為重瓣日日春栽培及雜交育種之參考。

材料與方法(Materials and Methods)

植物材料

取 2009 年重瓣日日春 TYV1 之自交種子，與單瓣日日春純系品種‘Pacifica Polka Dot’種子購自美國 PanAmerican 公司。播種育苗、肥培、病蟲害及澆水管理方式如第三章所述。

試驗一、溫度對日日春生育、花苞發育及葉片細胞膜熱穩定性之影響

於 2013 年 3 月 5 日當參試植株見第 2 對葉，寬度約 3 cm 時定植，先置於日夜溫 30/25°C 之人工氣候室中 10 天，植株見第 3 對葉，寬度約 5 cm 再於 2013 年 3 月 14 日分別移至 20/15、25/20 及 30/25°C 中。每週進行株高調查，花徑及花下節位數於開花後量測，分枝數(長 5 cm 以上枝條數)處理後 45 天調查，記錄溫度處理後到開花所需日數。

參試植株開花後挑選並標定約為 Stage 2~3 之幼花苞進行生育階段連續調查，每朵花視為一重複，每溫度每品種共調查四朵花，為四重複。記錄自 Stage 2~3 至花朵開放(Stage 12)所需天數及單朵花壽命(花朵開放至花瓣萎縮或脫落之花謝時間)之天數。

溫度處理 56 天(2013 年 5 月 9 日)時取各溫度處理下之葉片進行細胞膜熱穩定性分析。取剛完全展開成熟葉(由上往下數為第 3~4 對葉)經去離子水洗淨，以直徑 6 mm 打洞機避開主脈取葉圓片，將同一溫度同一品種之葉圓片混合盛裝於有離子水之培養皿中。取 5 個葉圓片裝於含 1 mL 去離子水之試管中，每管視為一重複，每處理三重複。將試管置於試管架，以恆溫之流水水浴槽溫度處理 30 分鐘，水浴溫度分別為 35、40、45、50、55、60、65 及 75°C，並以 25°C 水浴溫度為對照組，水浴後每試管各添加 15 mL 去離子水。將試管靜置於 15°C 冷藏庫 12 小時以上，以電導度計(Model SC-170, Suntex Instruments Co., Taiwan)測定水浴處理後之電導度(electronic conductivity, EC)值為 T_i 。再將試管置於高溫高壓殺菌釜(121°C、1.2 kg·cm²) 15 分鐘，完全破壞葉圓片，並於室溫靜置冷卻後測定完全破壞葉圓片之 EC 值為 T_f ，其中 25°C 水浴者之完全破壞前後 EC 值分別為 C_i 及 C_f 。以下列公式計算相對熱傷害值(relative injury, RI)，以繪圖軟體製作溫度與相對熱傷害值之迴歸圖(Yeh and Lin, 2003)。

$$RI (\%) = \{1 - [1 - (T_i/T_f)] / [1 - (C_i/C_f)]\} \times 100\%$$

(Yeh and Lin, 2003)

試驗二、培養溫度對日日春花粉發芽之影響

參試植物 TYV1 及 'Pacifica Polka Dot' 栽培於 30/25°C 之環境，試驗以 B&K 培養基(Brewbaker and Kwack, 1963)進行花粉培養，包含 300 mg·L⁻¹ 硼酸(H₃BO₃)、200 mg·L⁻¹ 硫酸鎂(MgSO₄)、300 mg·L⁻¹ 硝酸鈣[Ca(NO₃)₂]及 100 mg·L⁻¹ 硝酸鉀(KNO₃)，蔗糖濃度為 20%，以上皆採用試藥級藥品，以去離子水為溶劑。於添加蔗糖前以



pH meter (Jenco Model 6171, Jenco Instruments Inc., Calif., U.S.A.)及 0.01 N 之氫氧化鈉(NaOH)或鹽酸(HCl)將培養基 pH 值校正為 5.6 至 5.8。每微量離心管注入 1 mL 備用，以鑷子刮取花藥中花粉，再撒落於微量離心管液體培養基中，每試管視為一重複，每重複刮取 1-2 朵花之花粉。培養溫度包括 10、15、20、25、30、35、40 及 45°C，以生長箱或烘箱控制環境溫度。培養 2 小時後觀察花粉發芽情形，並計算發芽率。以解剖顯微鏡(Model SMZ-U, Nikon Co., Tokyo, Japan)觀察，當花粉管長度超過花粉直徑時即視為發芽，每處理 3 重複，每重複計算 50 粒花粉，並以顯微鏡數位相機(MicroFire, Optronics, Calif., USA)拍照記錄。

統計分析

試驗皆採完全隨機試驗設計(Completely Randomized Design, CRD)。試驗結果以 CoStat 6.4 (CoHort Software, USA)統計軟體進行 *t*-test 或最小顯著差異(Least significant difference, LSD)分析比較處理間差異。以繪圖軟體 SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., USA)繪圖。

結果(Results)

於日夜溫 30/25、25/20 及 20/15°C 栽培重瓣日日春 TYV1 品系及其親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’。結果顯示參試品系及品種之株高皆隨時間而增加，並以栽培於日夜溫 20/15°C 者較低，而 TYV1 株高於 25/20 及 30/25°C 間無顯著差異(圖 4.1)，‘Pacifica Polka Dot’則以栽培於 30/25°C 者最高(圖 4.1、4.2)。花下葉片數皆隨溫度降低而減少，而 TYV1 在各溫度下之花下節位數皆較‘Pacifica Polka Dot’為多(表 4.1)。日日春‘Pacifica Polka Dot’到開花日數隨溫度降低而增加，而 TYV1 則以栽培於 25/20°C 者最早開花，其次為 30/25°C 者，以栽培於 20/15°C 者最晚開花(表 4.1；圖 4.3)。日日春 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’皆於 20/15°C 下有較長花朵壽命，為 11.4-12.9 天，兩者無顯著差異，而在 25/20 及 30/25°C 下皆較短，但在 30/25°C



時則以 TYV1 花朵壽命顯著較‘Pacifica Polka Dot’長(圖 4.5)。TYV1 花徑以 20/15℃處理者最小，而 25/20 及 30/25℃處理之花徑則無顯著差異(圖 4.5)；‘Pacifica Polka Dot’花徑則以栽培於 25/20℃者較 30/25 及 20/15℃者大(表 1；圖 5)；不論何種溫度，皆以花瓣較為平展之‘Pacifica Polka Dot’花徑大於 TYV1 (表 4.1)。分枝數上參試品系及品種均無顯著差異，並皆以 20/15℃者最少(表 4.1)。栽培於 20/15℃時可觀察到參試品系及品種之葉柄近軸面皆有花青素著色(圖 4.6)。

於 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’在 30/25、25/20 及 20/15℃栽培 56 天後，取剛完全展開葉片給予 25-70℃水浴溫度處理 30 分鐘，量測電解質滲漏，計算葉片相對傷害(RI)值及 RI 曲線之中點溫度。結果顯示參試品系及品種之葉片 RI 值隨水浴溫度上升而增加，葉片 RI 值與其水浴溫度呈 S 曲線關係(圖 4.7)。且隨栽培溫度增加，RI 曲線向右移動，曲線中點溫度也隨之提高，但以‘Pacifica Polka Dot’之右移情形較 TYV1 略為明顯。顯示以‘Pacifica Polka Dot’之熱馴化反應略為明顯。重瓣日日春 TYV1 於 20/15、25/20 及 30/25℃處理的葉片 RI 曲線中點溫度分別為 55.7、56.1 及 56.4℃，而‘Pacifica Polka Dot’則略低分別為 52.7、53.2 及 54.5℃(圖 4.8)。

取重瓣日日春 TYV1 及其親本‘Pacifica Polka Dot’之花粉，以含 20%蔗糖之 B&K 液體培養基於 10-45℃進行培養。結果顯示 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’花粉在 10℃處理中已可發芽分別為 12.4%及 36.9%，TYV1 當溫度在 25 及 30℃處理中花粉發芽率分別達 92.4%及 90.2%，明顯高於其他溫度之處理。‘Pacifica Polka Dot’在 20-40℃範圍中發芽率均高達 83.0%以上顯著高於其他溫度，兩參試品系及品種之花粉發芽適溫範圍以‘Pacifica Polka Dot’為 20-40℃較 TYV1 之 25-30℃廣(圖 4.9)。

討論(Discussion)

日日春原生於熱帶地區喜歡高溫強光環境，近年來園藝化新品種持續推出，已成為高溫夏季中重要的草花(林，2002)。重瓣 TYV1 到開花日數以 25/20℃處理

最快為 36.5 天，而‘Pacifica Polka Dot’最快開花之溫度為 30/25°C 僅 29.8 天(表 4.1)。30/25°C 處理之溫度下 TYV1 開花日數為 43.0 天比‘Pacifica Polka Dot’慢 13.2 天明顯延遲。低溫 20/15°C 處理兩品種明顯開花延遲，TYV1 延遲 10.5 天而‘Pacifica Polka Dot’延遲 23.3 天，顯示 TYV1 較‘Pacifica Polka Dot’不受涼溫 20/15°C 影響。商業品種講求生產效率，生長快速能夠降低管理成本及提早出貨使場地使用率增加，因此早生品種於市場上受生產者歡迎，TYV1 在 30/25 及 20/15°C 開花延遲問題有待後續育種時改進。

重瓣日日春 TYV1 花下節位數，25/20°C 處理為 6.5 節，單瓣‘Pacifica Polka Dot’僅為 5.2 節(表 4.1)，這和 Pietsch 等人(1995)指出‘Grape Cooler’在 25°C 環境中本葉發育 8 至 9 對時開始開花顯示品種間有所差異。日日春花苞形成後會促進基部節位的側芽生長，因此早開花的品種側芽萌發較早、分枝數多，分枝數多會有較大的展幅及較多的開花位置。另外溫度亦影響分枝數的生長，參試兩品種在 20/15°C 植株生長緩慢及低矮，長度達 5 公分的枝條數明顯較少，這對品質明顯有不利的影响(圖 4.2；表 4.1)。

在花徑上，Pietsch 等人(1995)指出日日春‘Grape Cooler’在 25°C 有最大的花徑，溫度提高到 35°C 花徑會輕微降低但並不影響外觀品質。試驗中‘Pacifica Polka Dot’及 TYV1 花徑對溫度的反應與前人研究相同，TYV1 在 30/25°C 處理中花徑大小和 25/20°C 並無顯著差異(表 4.1)，顯示 TYV1 花徑表現較不受高溫所影響，這有利於在高溫夏季中生產重瓣日日春。在 20/15°C 溫度處理 TYV1 花徑僅 1.4 cm，與最大花徑相差達 1.5 cm，且變形成漏斗形，瓣端細尖形突起品值低落。‘Pacifica Polka Dot’花徑在 20/15°C 較不受溫度變化所影響(圖 4.6)。TYV1 花苞發育最適合之溫度為 25/20°C(圖 4.3)，從花苞可見(第 2 階段)到開花(第 12 階段)所需天數為 16.6 天(圖 4.4)。在花朵壽命上，25/20°C 兩品種分別為 11.4 及 12.9 天，比 25/20 及 30/25°C 長，而 TYV1 在 25/20 及 30/25°C 處理中分別為 7.4 及 7.7 天沒有顯著差異；25/20 及 30/25°C 溫度中 TYV1 及‘Pacifica Polka Dot’比較，TYV1 均有較長

的花朵壽命。推測是由於 TYV1 不易結種子而有較多的養分可供花朵生長造成，這和 Stead 和 Moore (1979)指出毛地黃(*Digitalis purpurea* L.)未授粉結子的植株花朵壽命比授粉植株長，主要由於養分的分配所造成相同。

TYV1 於 20/15°C 處理下葉片皺縮至開花後仍持續，而 30/25 及 25/20°C 均於開花後漸漸退去，皺縮葉外觀像染病之植株，外觀不正常無商業價值(圖 4.7)，在扦插繁殖的過程中取葉片平緩的頂梢為材料，在扦插後期插穗上的葉片容易回復成皺縮狀，因此推測此種現象為植株缺乏養分所造成。試驗中 20/15°C 處理影響 TYV1 葉片累積養分，造成皺縮葉無法回復平緩狀，至於詳細原因為何仍有待進一步研究確認。

中點溫度為 RI 值最高與最低之中點所對應溫度(Arora et al., 1992)，中點溫度與 Howarth 等人(1997)指出之熱致死溫度(Lethal temperature, LT₅₀)類似。重瓣日日春 TYV1 於 30/25、25/20 及 20/15°C 處理的葉片熱相對傷害曲線之中點溫度分別為 56.4、56.1 及 55.7°C(圖 4.8)，而‘Pacifica Polka Dot’熱相對傷害曲線之中點溫度分別為 54.5、53.2 及 52.7°C(圖 4.8)，兩品種當栽培溫度提高中點溫度隨著提高，熱傷害曲線向右移動，顯示提高生長環境溫度對兩個參試品種均具有熱馴化的效果。比較 30/25°C 相同溫度處理中 TYV1 和‘Pacifica Polka Dot’的中點溫度分別為 56.4 及 54.5°C，顯示 TYV1 可能比‘Pacifica Polka Dot’耐熱。

許多前人研究指出，溫度對花粉體外發芽溫度，與植株孢子體世代對溫度之反應相似，因此花粉溫度篩選可應用於許多作物之育種研究，扁桃與桃的花粉分別於 16 及 23°C，花粉發芽率最高，可能因扁桃可於晚冬開花結果，其花粉於低溫發芽率高於桃(Weinbaum et al., 1984)。花粉發芽試驗中‘Pacifica Polka Dot’與 TYV1 發芽適溫範圍有明顯差異(圖 4.9)，‘Pacifica Polka Dot’適溫從 20-40°C 而 TYV1 僅為 25-30°C，這與溫度試驗結果‘Pacifica Polka Dot’栽培於日夜溫 30/25、25/20 及 20/15°C 均有良好品質相符，而 TYV1 僅栽培在 30/25、25/20°C 表現較佳，當溫度降至 20/15°C 時花徑及外觀品質明顯表現差，這也與花粉發芽試驗結果相符(表 4.1；

圖 4.2、4.6)，此結果與前人所指孢子體世代與配子體世代對環境之反應相似相符 (Weinbaum et al., 1984)。本研究結果亦顯示 TYV1 生育適溫較‘Pacifica Polka Dot’窄，亟需進行改良以適應更廣泛多變的氣候條件。



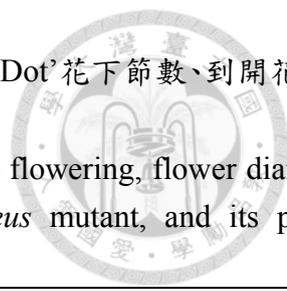


表 4.1. 栽培溫度處理對重瓣日日春 TYV1 及其親本單瓣‘Pacifica Polka Dot’花下節數、到開花天數、花徑及分枝數之影響

Table 4.1. Effects of temperature on node number below the flower, days to flowering, flower diameter, and branch number of TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’ (PPD).

Day/night temp (°C)	Node number below the flower		Days to flowering		Flower diameter (cm)		Branch number	
	TYV1	PPD	TYV1	PPD	TYV1	PPD	TYV1	PPD
	30/25	8.7 aA ^z	5.4 aB	43.0 bA	29.8 cB	2.8 aB	4.4 bA	8.0 aA
25/20	6.5 bA	5.2 abB	36.5 cA	36.2 bA	2.9 aB	4.6 aA	9.0 aA	7.9 aA
20/15	6.5 bA	5.0 bB	57.0 aA	53.1 aB	1.4 bB	4.2 bA	3.5 bA	4.6 bA
Significance								
Cultivar (T)	***		***		***		NS	
Temp (C)	***		***		***		***	
C×T	***		***		***		NS	

^zMeans followed by different lowercase and uppercase letters are significant different at $P < 0.05$ level by LSD between temperature treatments and cultivars, respectively.

NS, *** Nonsignificant or significant at $P < 0.001$, respectively.

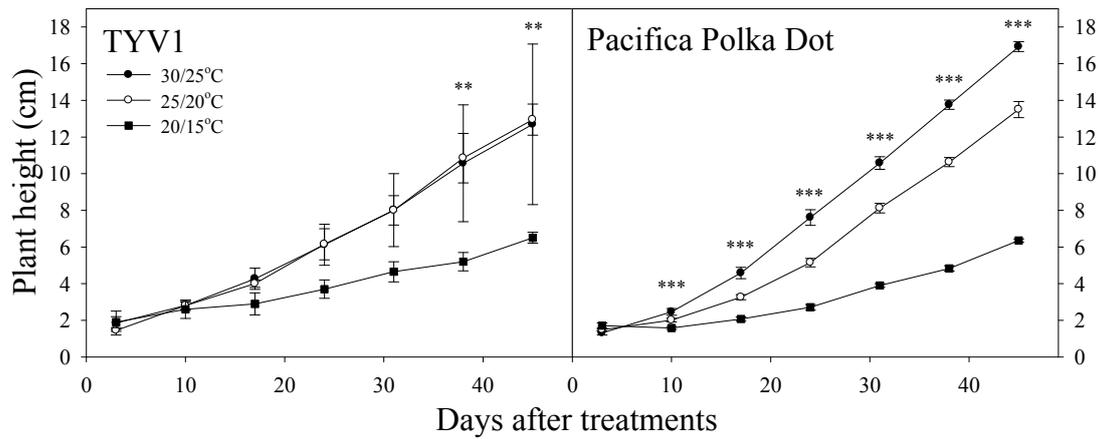


圖 4.1. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’株高之影響

Fig. 4.1. Effect of temperature on plant height in TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Mean separation within cultivars and each sampling time by LSD test. Bars indicate standard error of the mean.

** , *** Significant at $P < 0.01$ or 0.001 , respectively.

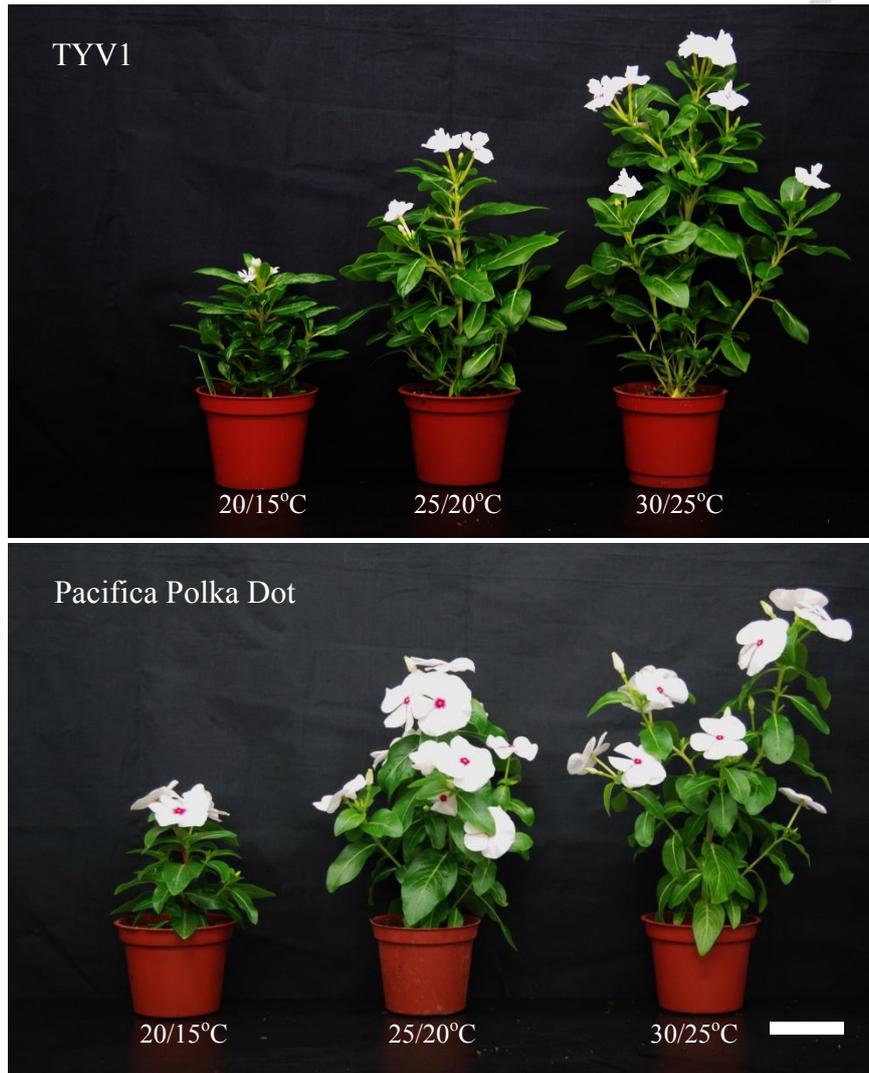


圖 4.2. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’植株外觀之影響。

Fig. 4.2. Effect of temperature on plant appearance of TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Bar = 5 cm.

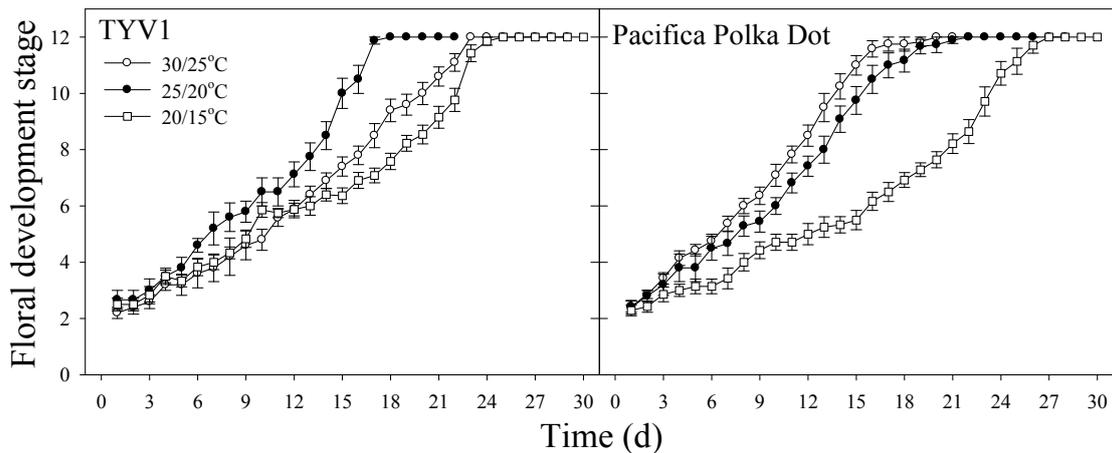


圖 4.3. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花芽發育階段之影響

Fig. 4.3. Effect of temperature on flower developmental stage in TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Bars indicate standard error of the mean (n=5).

Stage 2: 1.0-1.9 mm long, thin sepal and expanded floral apex visible.

Stage 3: 2.0-2.9 mm long, sepal visible and early petal formation.

Stage 4: 3.0-3.9 mm long, green petals visible and tips are 1 mm above sepal.

Stage 5: 4.0-5.9 mm long, petals grow apically and rapidly.

Stage 6: 6.0-8.9 mm long, throat and petals completely formed.

Stage 7: 9.0-12.9 mm long, start of lower corolla elongation, petal remains green.

Stage 8: 13.0-16.9 mm long, corolla continue to elongate, petal turns light green.

Stage 9: 17.0-20.9 mm long, corolla continue to elongate.

Stage 10: 21.0-25.9 mm long, corolla lobes turn even more light green and expand like a balloon. Corolla tube elongate slowly.

Stage 11: 26.0-30.0 mm, corolla lobes turn white, anthesis.

Stage 12: 26.0-30.0 mm, corolla lobes fully expanded.

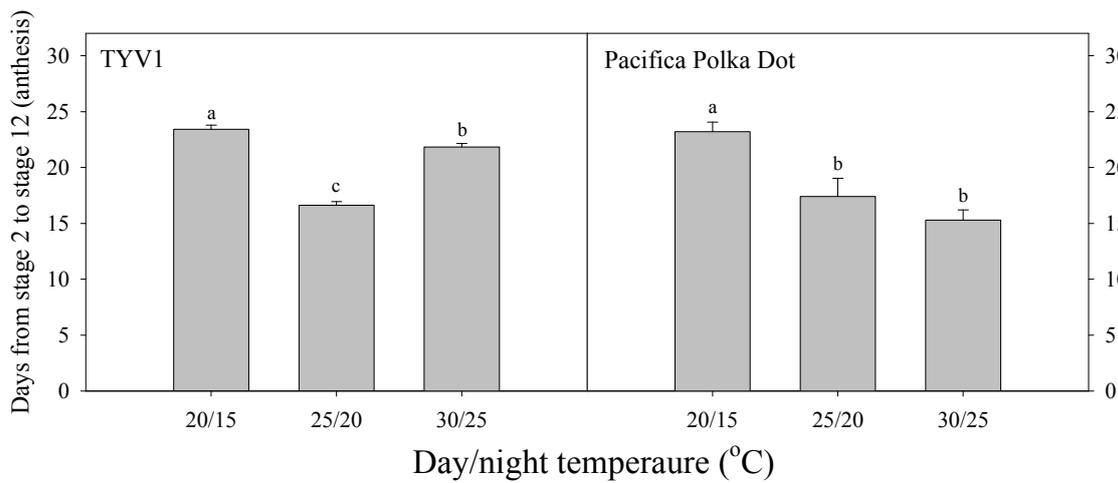


圖 4.4. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’自花苞可見(1.0-1.9 mm)至開花所需天數之影響

Fig. 4.4. Effect of temperature on days required from visible flower bud to anthesis in TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus*, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Mean separation within temperature treatments by LSD at $P < 0.05$. Bars indicate standard error of the mean (n=5).

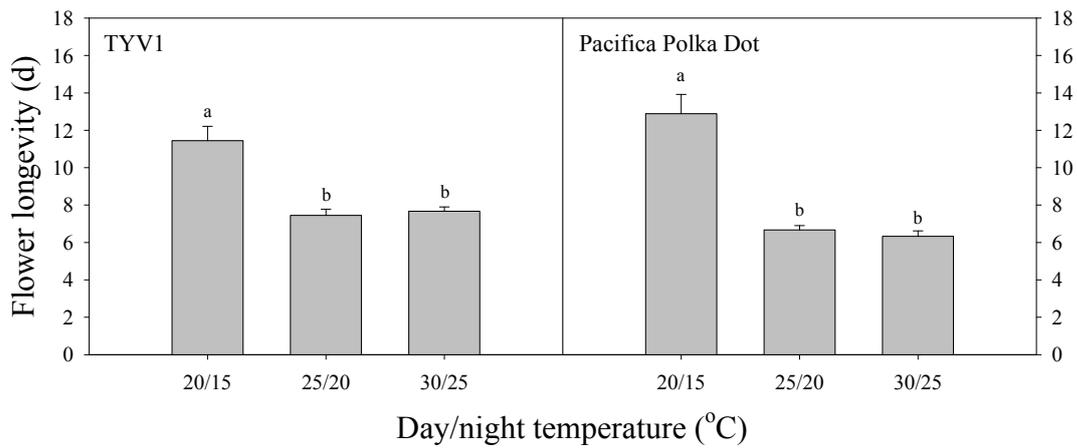


圖 4.5. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’ 花朵壽命之影響

Fig. 4.5. Effect of temperature on flower longevity of TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Mean separation within temperature treatments by LSD test. Bars indicate standard error of the mean (n=8).

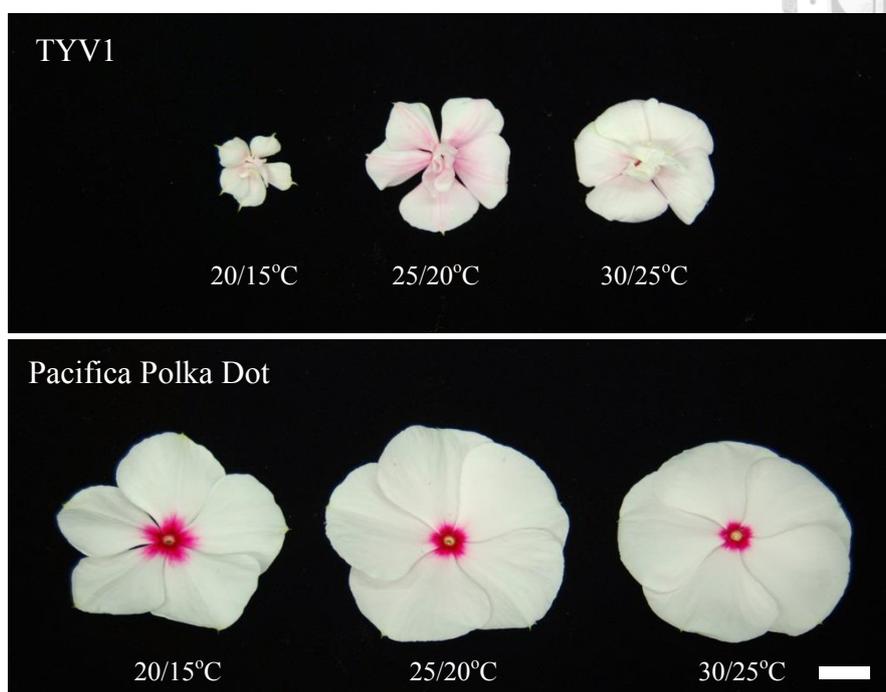


圖 4.6. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’花朵外觀之影響。

Fig. 4.6. Effect of temperature on flower appearance of TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Bar = 1 cm.

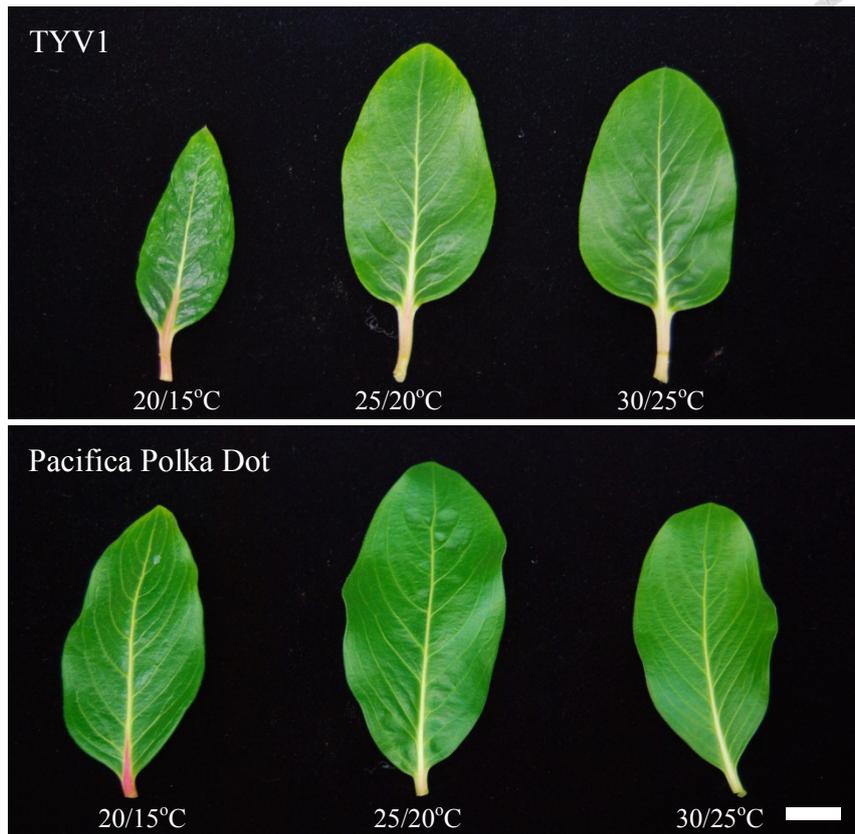


圖 4.7. 栽培溫度對重瓣日日春 TYV1 及其親本單瓣日日春‘Pacifica Polka Dot’葉片外觀之影響。

Fig. 4.7. Effect of temperature on leaf appearance of TYV1, a double-flowered *Catharanthus roseus* mutant, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’. Bar = 1 cm.

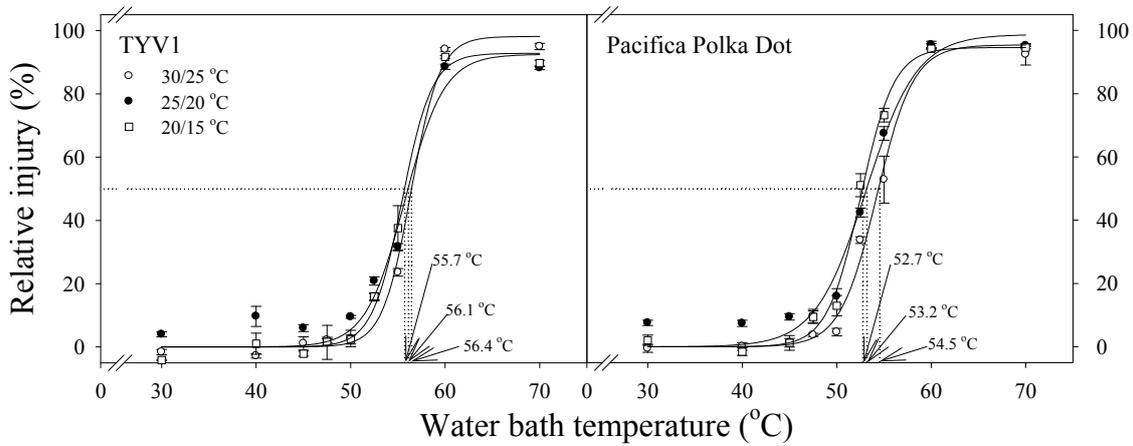
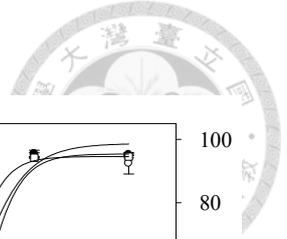


圖 4.8. 水浴溫度對栽培於不同溫度重瓣日日春 TYV1 及其來源親本單瓣日日春 ‘Pacifica Polka Dot’ 葉片相對傷害值之影響

Fig. 4.8. Effect of water bath temperature on relative injury (RI) of leaves in TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus*, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’ grown at different temperatures for 56 days. Dash lines indicate 50% RI temperature of the sigmoid curves. Bars indicate standard error of the mean (n=3).

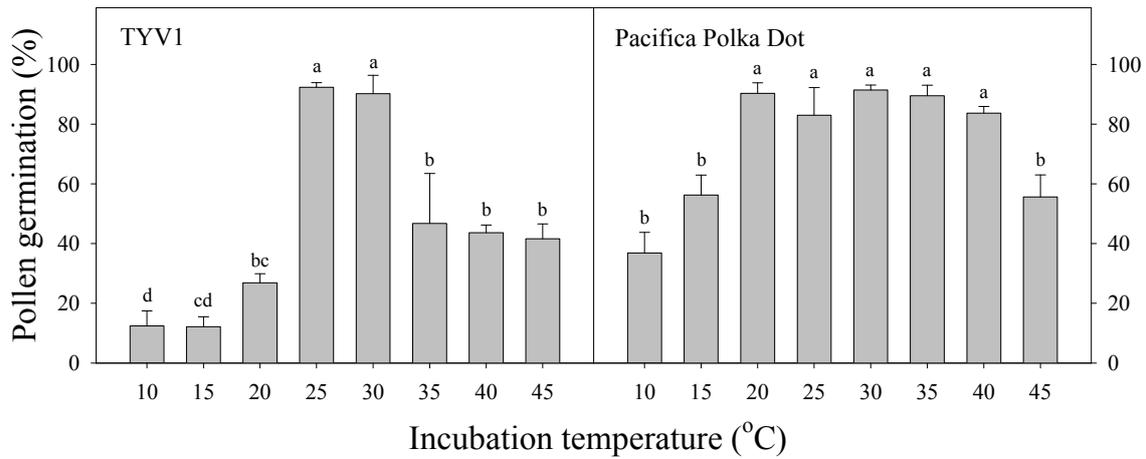
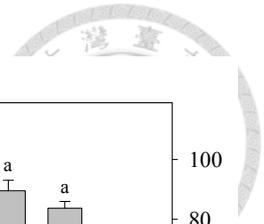


圖 4.9. 培養溫度對栽培於日夜溫 30/25 °C 之重瓣日日春 TYV1 及其親本單瓣 ‘Pacifica Polka Dot’ 花粉發芽率之影響

Fig. 4.9. Effect of incubation temperature on pollen germination of TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus*, and its parent, single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’ grown at 30/25 °C.

Mean separation within temperature treatments by LSD at $P < 0.05$. Bars indicate standard error of the mean (n=3).

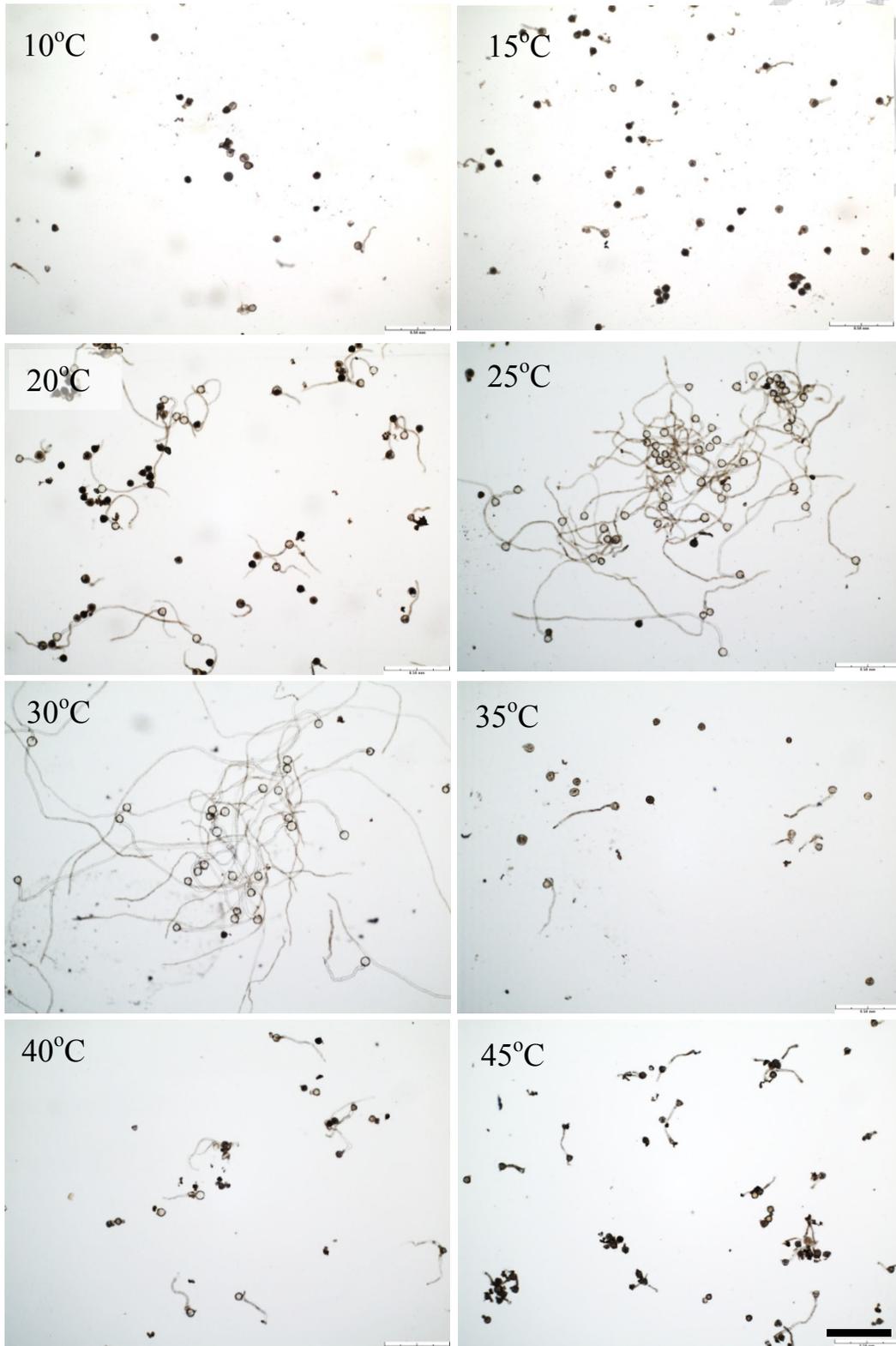


圖 4.10. 栽培於日夜溫 30/25 °C 之重瓣日日春 TYV1 花粉培養於不同溫度之萌發情形

Fig. 4.10. Effect of temperature on pollen germination in TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* grown at 30/25°C. Bar = 0.5 mm.

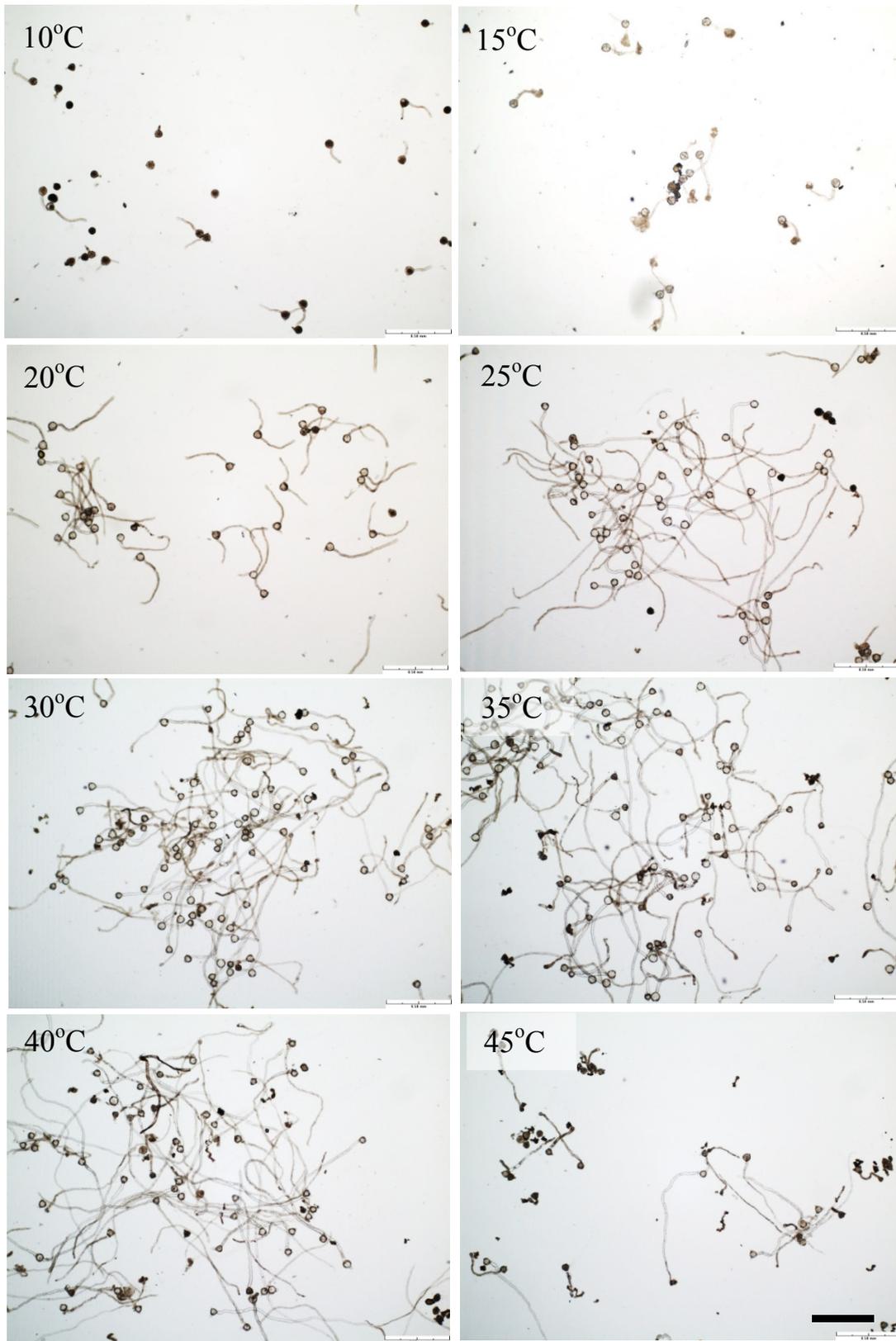


圖 4.11. 栽培於日夜溫 30/25 °C 之單瓣日日春 'Pacifica Polka Dot' 花粉培養於不同溫度之萌發情形

Fig. 4.11. Effect of temperature on pollen germination in 'Pacifica Polka Dot', a single-flowered of *Catharanthus roseus* grown at 30/25°C. Bar = 0.5 mm.



第五章 日日春重瓣性狀之遺傳及倍體分析

Chapter 5. Inheritance and Ploidy Analysis of Double Floweredness in *Catharanthus roseus*



附加關鍵字：花壇植物、流式細胞儀、DNA 含量、植物育種、隱性

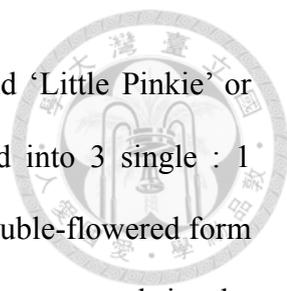
Additional index words: bedding plant, flow cytometry, DNA content, plant breeding,
recessive

摘要

本研究探討日日春 TYV1 重瓣花型之遺傳及其染色體分析，重瓣日日春 TYV1 具有雌雄蕊器官，可供為雜交的種子親及花粉親，其與單瓣‘Little Pinkie’及‘Titan Burgundy’利用自交、互交及回交雜交。TYV1 的自交後裔全為重瓣型，而單瓣‘Little Pinkie’及‘Titan Burgundy’自交後代則皆為單瓣型。TYV1 和‘Little Pinkie’及‘Titan Burgundy’之 F₁ 雜交後代全為單瓣型，3 個 F₁ 雜交組合之 F₂ 自交後代單瓣及重瓣型植株數符合 3：1 之分離率 ($\chi^2 = 0.78-1.53, P = 0.22-0.37$)，F₁ 後代回交重瓣親本產生之後代，其單瓣及重瓣植株數符合 1：1 之分離率 ($\chi^2 = 0.25-0.69, P = 0.41-0.62$)，顯示日日春之重瓣花性狀由一對隱性對偶基因控制，同質或異質顯性時表現單瓣花。進一步分析重瓣日日春 TYV1 及單瓣‘Pacifica Polka Dot’與‘Little Pinkie’葉片之染色體數，結果顯示重瓣日日春 TYV1 及單瓣‘Pacifica Polka Dot’均為二倍體。

Abstract

The study aimed to investigate the inheritance of double-flowered phenotype in periwinkle. TYV1 could be used as either male or female parent in crossing. Self-pollinated TYV1 produced all double-flowered progeny compared to self-pollinated single-flowered cultivars ‘Little Pinkie’ and ‘Titan Burgundy’ which



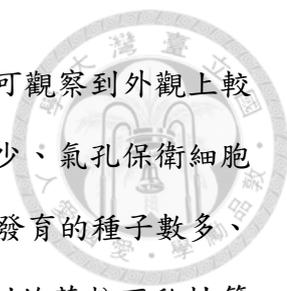
produced all single-flowered progeny. F₁ plants between TYV1 and ‘Little Pinkie’ or ‘Titan Burgundy’ were all single. Three F₂ populations segregated into 3 single : 1 double ratio. Backcrossing F₁ to seed parents also indicated that a double-flowered form was controlled by a recessive allele. A single dominant gene expressed in the homozygous or heterozygous state resulted in the single-flowered phenotype. Flow cytometry indicated that double-flowered TYV1 and single-flowered ‘Pacifica Polka Dot’ and ‘Little Pinkie’ were all diploid.

前言(Introduction)

日日春為夾竹桃科植物，原生於馬達加斯加島，除園藝栽培應用外，亦是知名的藥用植物，可萃取多種植物鹼供治療心血管疾病或哺乳類動物的癌症(Zhou et al., 2009)。在很多熱帶及亞熱帶地區日日春已從栽培中脫逃成為當地馴化的植物(Levy, 1981)，由於具耐熱、乾旱及耐汙染之特性因此在美國日日春已成為夏日重要的花壇或庭園植物(Howe and Waters, 1994；USDA, 2010)。在臺灣地區由於氣候適宜及品種多樣，近年來除花壇栽培外，盆花及吊籃栽培量越來越多，據統計年產量共達 230 萬盆，為台灣夏季重要之花壇或庭園植物(陳等，2011)。

一般重瓣花增加的花瓣常起源於雄蕊瓣化，而使授粉功能減弱或完全喪失(Comba et al., 1999)。例如同為夾竹桃科的蔓長春有一個已知存在於野外達百年之久的重瓣突變型，其增加的花瓣是部分或完全由雄蕊瓣化而來(Wang et al., 2011)，雄蕊瓣化後常使遺傳研究不易進行。花朵的重瓣化常常是由單一基因座所控制，如花菸草是由隱性基因控制(Zainol and Stimart, 2001)；而矮牽牛由顯性基因所控制(Sink, 1973)，本章利用重瓣日日春 TYV1 未失去雌雄蕊之特性，進行日日春重瓣性狀遺傳研究。

商業單瓣花之日日春染色體數為 $2n=16$ ，染色體長度為 1500 Mbp (Leveque et al., 1996)。Gantait 等人(2011)指出以秋水仙素誘導非洲菊形成四倍體可增加花瓣數，



提高外觀品質。然而日日春四倍體化則未見花瓣數的增多，但可觀察到外觀上較二倍體植株矮、側枝數多、葉片短、葉寬大、單位面積氣孔數少、氣孔保衛細胞大、花徑大、花冠筒粗、子房中胚珠數少、果莢短、種子大、未發育的種子數多、較高的植物鹼含量、較慢的生長速率、較大的花粉粒及高比例的花粉不稔性等 (Dnyansager and Sudhakaran, 1970; Xing et al., 2011)。重瓣日日春 TYV1 植株矮、側枝數多、子房中胚珠數少、果莢短、未發育的種子數多及較慢的生長速率與前人研究之多倍體外觀相似，仍需進一步檢測染色體組大小及倍性分析，供新品種雜交選育之參考。

材料與方法(Materials and Methods)

日日春‘Titan Burgundy’及‘Little Pinkie’(種子購買於台和園藝公司，臺北，臺灣)，兩品種先播種育苗栽培成採穗母本，再與 TYV1 同時取長度 2-3 cm 之頂稍扦插繁殖育成種苗。除雄及授粉參考 Miyajima (2004)的方式進行，種子親除雄於花蕾未展開前 2 天進行，除雄後之花朵待雌蕊分泌出柱頭液時，以直徑 0.37 mm、長度約 8 cm 碳纖維釣魚線為授粉工具，伸入花朵開放之花粉親的花冠筒中沾出花粉，再伸入已除雄的種子親花中進行授粉，授粉時間為 0800-1000 HR。授粉地點於桃園區農業改良場花卉溫室中，溫室環境約遮光 30%，光強度為 $200-460 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，自然日長 12 至 14.5 h，平均溫度為 $25.7 \pm 6.5^{\circ}\text{C}$ 。

雜交組合包括 TYV1、‘Titan Burgundy’及‘Little Pinkie’自交、單瓣及重瓣品系互交等四個組合，四個雜交組合之 F_1 後裔各選生長勢強且表現較為類似的 15 株單株於開花後進行自交，得 F_2 後裔。四個雜交組合之 F_1 後裔再各取 15 株為花粉親回交(back cross, BC)其種子親，得 BCF_1 後裔。每個雜交組合以一朵花為一重複，至少 30 重複。

授粉成功 30 天後果莢外觀開始轉黃，趁尚未開裂前人工採收，置於盤中陰乾，約兩天果莢會從腹縫線裂開。去除雜物後之種子置於夾鏈袋中儲放於 6°C 冰箱。



種子播種於長×寬×高為 60×30×4.3 cm，每格體積 16.2 cm³ 之 200 格穴盤，播種介質為 (BVB No.7A, De Lier, Holland)。育苗環境條件光強度約 50-100 μmol·m⁻²·s⁻¹，溫度 20-30°C。播種約 30 天後苗高約 1.5 cm，具 2 對本葉時，移植至盆徑 10.5 cm、容積 400 mL 黑色軟質塑膠盆，每盆 1 株。栽培介質為泥炭苔 (Fafard No.1, Conrad Fafard, Agawarm, MA)：3 號真珠石 (南海蛭石股份有限公司，臺北，臺灣)=3：1 (v/v)。成活後每盆施用 3 g 緩效性肥料好康多 1 號 70 天型 (Hi-Control No.1) 14N-5.3P-11.3K (旭化成株式會社，日本)。試驗期間每週施一次含 200 mg·L⁻¹ N 之 20N-8.6P-16.6K 可溶性速效完全肥料 Peters 20-20-20 (The Scotts Co., Marysville, Ohio, USA)。視介質乾燥程度調整澆水頻率及給水量，定期實施病蟲害防治。當植株開花時調查各授粉組合重瓣及單瓣株數，並以卡方分析進行合適性評估。

以流式細胞儀分析 TYV1、‘Pacifica Polka Dot’及‘Little Pinkie’之染色體量，修改 Galbraith 等人(1983)之方法，取頂芽往下第三對已發育成熟之葉片，避開葉脈剪下 1 cm² 大小之葉片組織，加入 1.5 mL Galbraith buffer (45 mM MgCl₂·6H₂O, 30 mM sodium citrate, 20 mM 3-^LN-morpholino propanesulfonate, 1% Triton-X 100, pH=7.0, 使用前添加 0.5% 2-mercephnol)，以刮鬚刀片快速將葉片組織剁碎，使細胞核懸浮於 Galbraith buffer 中。細胞核懸浮液，經 30 μm 孔徑之尼龍網過濾後加入 75 μL propidium iodide (1000 ppm)，置於碎冰黑暗處理待進行分析。細胞懸浮液樣品以 Epics Elite ESP 流式細胞儀 (Beckman Coulter Electronics, Hialeah, Florida) 測定。樣品上機後收集 562.5-587.5 nm 之螢光。每樣品讀取 10000 個細胞核，讀取結果以 Summit V5.3 軟體編輯分析 (中研院植微所流式細胞儀分析分選)。DNA 含量計算以雞紅血球細胞核 (chicken erythrocyte nuclei, CEN, 2.5 pg/2C) 為已知標準液細胞核 DNA 含量，日日春測試品均為未知核基因組大小 = (植物細胞核尖峰之平均 / 標準液細胞核尖峰之平均) × 標準液細胞核之核 DNA 含量值。



結果(Results)

本試驗中將重瓣日日春 TYV1 品系與單瓣品種‘Little Pinkie’及‘Titan Burgundy’進行自交、互交及回交以探討日日春重瓣花型之遺傳，結果顯示重瓣品系 TYV1 自交所產生的後代全部為重瓣，單瓣花品種‘Little Pinkie’自交後代全部為單瓣的後代，TYV1 × ‘Little Pinkie’的組合中所有 F₁ 為單瓣花，F₁ 再自交的 F₂ 後裔中得到符合單重瓣植株數分離率為比例 3:1 之結果($\chi^2 = 0.78, P = 0.37$)。而 F₁ 後裔回交 TYV1 則得到單重瓣比例為 1:1 之分離比($\chi^2 = 0.25, P = 0.62$)。在‘Little Pinkie’×TYV1 的雜交組合中全部的 F₁ 後裔為單瓣花，F₂ 世代符合 3:1 的分離比($\chi^2 = 1.53, P = 0.22$)，以‘Little Pinkie’×TYV1 之 F₁ 回交‘Little Pinkie’獲得全部為單瓣的後裔(表 5.1)。

自交單瓣的‘Titan Burgundy’產生的後代全部是單瓣花(表 5.2)，雜交組合 TYV1 × ‘Titan Burgundy’得到的 F₁ 後裔也全是單瓣，此組合 F₁ 自交得 F₂ 後代並不符合單重瓣植株數分離率為比例 3:1 之期望值，但以 F₁ 回交 TYV1 得到單重瓣後裔植株數分離比為 1:1($\chi^2 = 0.69, P = 0.41$)，在‘Titan Burgundy’×TYV1 的雜交組合中得到 F₁ 的後代全為單瓣後裔，而此組合 F₁ 自交得 F₂ 世代在單重瓣後裔的比例符合分離率 3:1 之期望值($\chi^2 = 0.84, P = 0.36$)。以 F₁ 回交‘Titan Burgundy’則得到全部為單瓣的後裔(表 5.2)。

流式細胞儀分析 TYV1 染色體組重量為 1.501 pg，‘Pacifica Polka Dot’為 1.542 pg，‘Little Pinkie’為 1.490 pg(圖 5.1)。換算成染色體組長度分別為 1468.0、1508.1 及 1457.2 Mbp(圖 5.2)，Leveque (1996)分析指出二倍體日日春染色體組長度約為 1500 Mbp，因此推測參試的三個品系/種均為二倍體。

日日春雜交授粉的方法參考 Miyajima (2004)的方式進行，除雄於花朵開放前 1-2 天進行，通常於傍晚時進行較佳，剪除位置為從喉部中間花絲著生位置，再去殘留花藥，日日春花朵出現柱頭高於花藥的機率約 10%-20%，此種花苞除雄會連同柱頭剪除無法應用於雜交工作，立刻摘除。試驗溫室密閉，蝶蛾類昆蟲不易進入，因此並未進行套袋。日日春授粉工具為直徑 0.37 mm 碳纖維釣魚線，長度

約 8 cm 左右。花粉以釣魚線黏取後，再塗抹上已除雄之柱頭，因柱頭容易受釣魚線壓損，授粉動作宜輕，釣魚線應沿花冠筒邊緣上下移動較佳。(圖 5.3)。



討論(Discussion)

日日春花型性狀相當穩定，原生長春花屬植物均為單瓣高腳碟狀花(van Bergen and Snoeijer, 1996)，重瓣品種極為稀少。特殊的重瓣 TYV1，其花瓣排列緊密，內圈增生花瓣寬，極具美觀性且雌雄蕊正常具有繁殖能力可產生雜交後代，本研究利用其未失去雌雄蕊之功能，進行日日春重瓣性狀遺傳研究。

重瓣花起源方式多樣，遺傳模式複雜，不同物種或不同品種之間可能不一致(Reynolds and Tampion, 1983)。重瓣日日春 TYV1 由花冠筒頂端與花瓣連結處增生一輪新花瓣，新花瓣並非雄蕊瓣化產生，同科植物重瓣蔓長春則是由雄蕊瓣化形成重瓣花(Wang et al., 2011)。Boke (1948)解剖單瓣日日春花冠筒後觀察，指出在花冠筒和花瓣(lobe)連結處有一近軸向的分生組織(adaxial meristem)，TYV1 的增生花瓣起源於這層分生組織。一般情況下，重瓣程度越高，其結實能力越差，為了使後代具有較高重瓣性，往往以重瓣程度高具雌蕊可育的植株作為母本，以半重瓣性的雄蕊可育的植株作為父本，以進行雜交育種(Reynolds and Tampion, 1983)。

觀賞植物之重瓣花性遺傳複雜，有單獨一對顯隱性等位基因控制或由多數基因座所控制的數量遺傳，另外還受修飾基因及環境之間相互作用的影響(Reynolds and Tampion, 1983)。試驗結果顯示日日春 TYV1 重瓣花的表現是由一對偶的隱性基因所控制，而顯性對偶基因在同質或異質時花朵為單瓣 (表 5.1、5.2)。由隱性基因控制花朵的重單瓣花型相似的例子有花菸草(Zainol and Stimart, 2001)和罌粟花(Dhawan et al., 2007)。

唯一不符合雜交後代分離率的組合是 TYV1 × ‘Titan Burgundy’ F1 後裔再自交之 F2 後裔的單重瓣比例(表 5.2)，原因並不清楚。Zainol 和 Stimart (2001)在花菸草重瓣花型的遺傳研究，亦出現雜交後代分離率不符合期望值，Zainol 和 Stimart 認為並不是環境差異造成，因為所有雜交組合均在同一環境的溫室中進行，可能為取樣



誤差(sampling errors)或因後代族群數太小(30 株)所造成。第四章結果指出環境溫度會影響重瓣日日春之生育表現，而本試驗與 Zainol 和 Stimart (2001)同樣都將植株栽培於溫室中，且環境溫度偏暖，故可推測並非環境造成後代數量不符合預期比例。此外，本試驗此組合後代總數為 165 株，較 Zainol 和 Stimart (2001)之 30 株為多。推測不符合之原因為重瓣花植株幼苗生長勢較弱，成活率較低所造成。

所有的重瓣花後代小苗都有皺縮的葉片，重瓣與皺縮葉兩性狀密切的連結，商業栽培日日春的生產者或是育種者可能會將葉片異常的小苗在未開花前篩除，這可能為重瓣花型的日日春品種少於市場上出現的原因之一。

生物都具有特定的染色體數，植物經長久的栽培與選拔後，有時會自然形成多倍體，多倍體植物常具有植株較粗大、強健、花朵加大、花瓣較厚、花色較濃、抗逆境性強及重瓣化等優良特性，但也有可能造成生長緩慢及開花期延後等缺點(郭，2012；Xing, 2011)。Leveque (1996)指出二倍體日日春染色體長度約為 1500 百萬鹼基對，而 TYV1 經流式細胞儀分析染色體量換算染色體長度約為 1468.0 百萬鹼基對(圖 5.1、5.2)，顯示 TYV1 為二倍體植物。本研究藉由流式細胞儀分析單瓣商業品種及重瓣變異株之染色體，驗證重瓣變異株 TYV1 非多倍體植株，因此未來可應用秋水仙素處理以獲得多倍體植株，將有利於重瓣日日春多樣化之新品種育成。

表 5.1. 日日春重瓣變異株 TYV1 與‘Little Pinkie’自交、正反雜交及回交後裔花形分離比

Table 5.1. Segregation for flower form in progeny of self-pollinated and crossed TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* and a single-flowered wild type ‘Little Pinkie’.

Parents/Generation	Test ratio	Flower form ^z			
	- : +	-	+	χ^2	P
		<i>Parents self-pollinated</i>			
TYV1	0 : 1	0	61	All double	
Little Pinkie	1 : 0	362	0	All single	
		<i>F₁, F₂, and Backcross</i>			
TYV1 × Little Pinkie					
F ₁	1 : 0	141	0	All single	
F ₂	3 : 1	147	42	0.78	0.37
F ₁ × TYV1	1 : 1	101	94	0.25	0.62
Little Pinkie × TYV1					
F ₁	1 : 0	189	0	All single	
F ₂	3 : 1	126	33	1.53	0.22
F ₁ × Little Pinkie	1 : 0	203	0	All single	

^zSingle (-) or double (+) flower form.

表 5.2. 日日春重瓣變異株 TYV1 與‘Titan Burgundy’自交、正反雜交及回交後裔花
形分離比

Table 5.2. Segregation for flower form in progeny of self-pollinated and crossed TYV1, a double-flowered mutant of *Catharanthus roseus* and a single-flowered wild type ‘Titan Burgundy’.

Parents/Generation	Test ratio	Flower form ^z			
	- : +	-	+	χ^2	P
		<i>Parents self-pollinated</i>			
TYV1	0 : 1	0	61	All double	
Titan Burgundy	1 : 0	182	0	All single	
		<i>F₁, F₂, and Backcross</i>			
TYV1 × Titan Burgundy					
F ₁	1 : 0	118	0	All single	
F ₂	3 : 1	138	27	6.56	0.01
F ₁ × TYV1	1 : 1	63	54	0.69	0.41
Titan Burgundy × TYV1					
F ₁	1 : 0	189	0	All single	
F ₂	3 : 1	112	31	0.84	0.36
F ₁ × Titan Burgundy	1 : 0	162	0	All single	

^zSingle (-) or double (+) flower form.

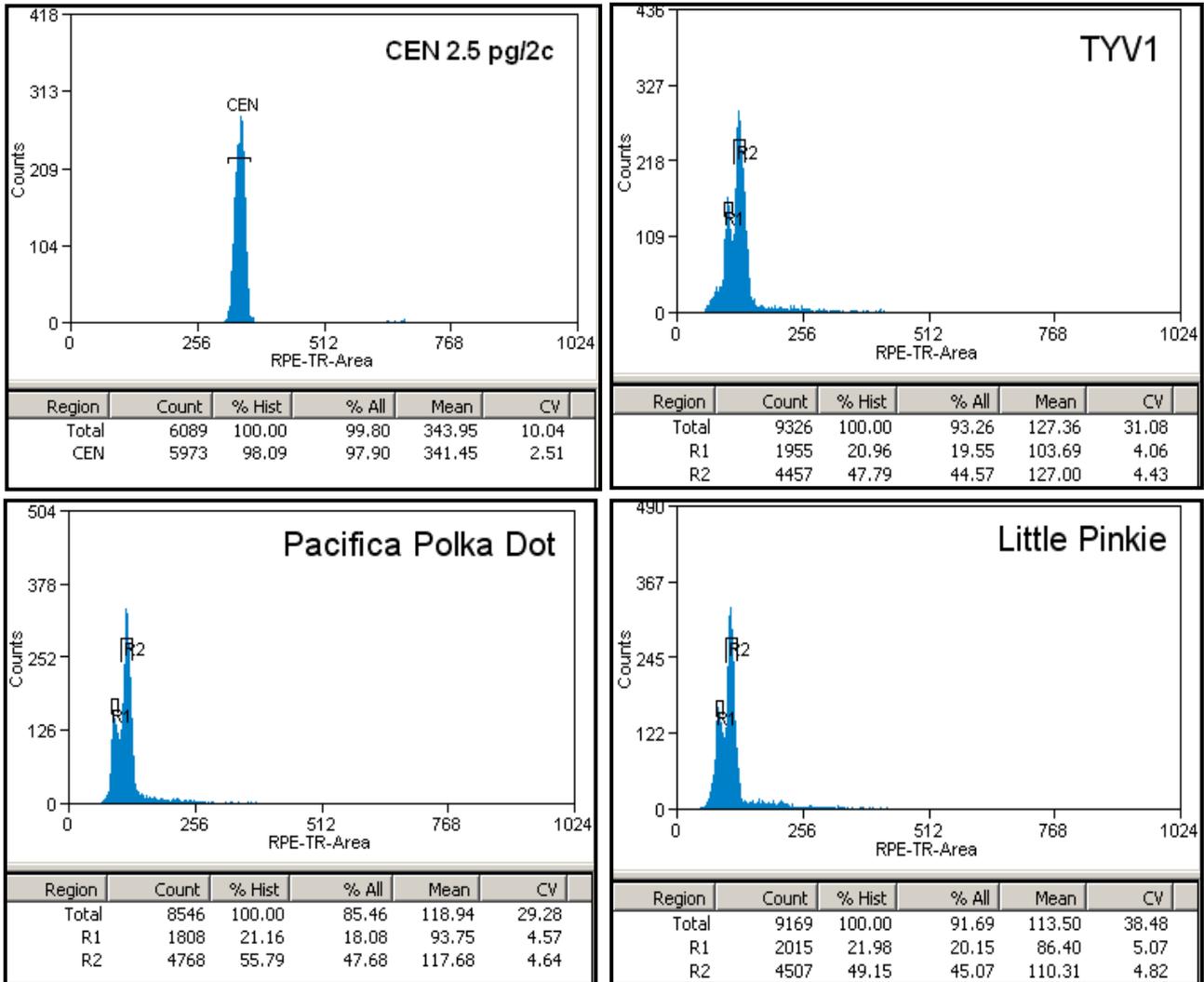


圖 5.1. 雞血紅蛋白、日日春 TYV1、‘Pacifica Polka Dot’及‘Little Pinkie’ DNA 含量分析測定圖譜

Fig. 5.1. Flow cytometry histogram of DNA content determination of chicken erythrocyte nuclei, *Catharanthus roseus* TYV1, ‘Pacifica Polka Dot’ and ‘Little Pinkie’.

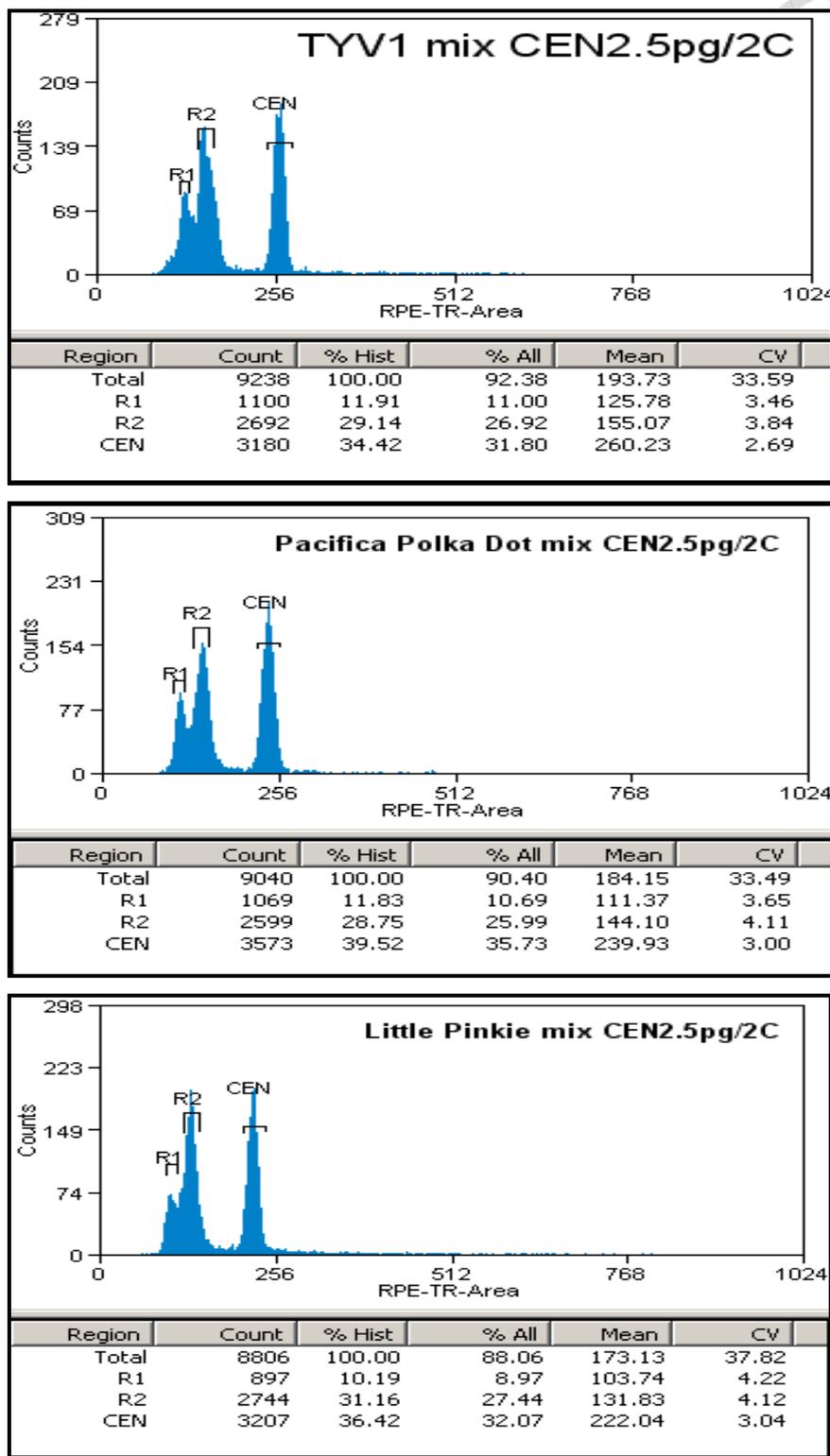


圖 5.2. 日日春 TYV1、‘Pacifica Polka Dot’及‘Little Pinkie’DNA 含量定量分析測定圖譜

Fig. 5.2. Flow cytometry histogram of genome size determination of TYV1、‘Pacifica Polka Dot’ and ‘Little Pinkie’ .

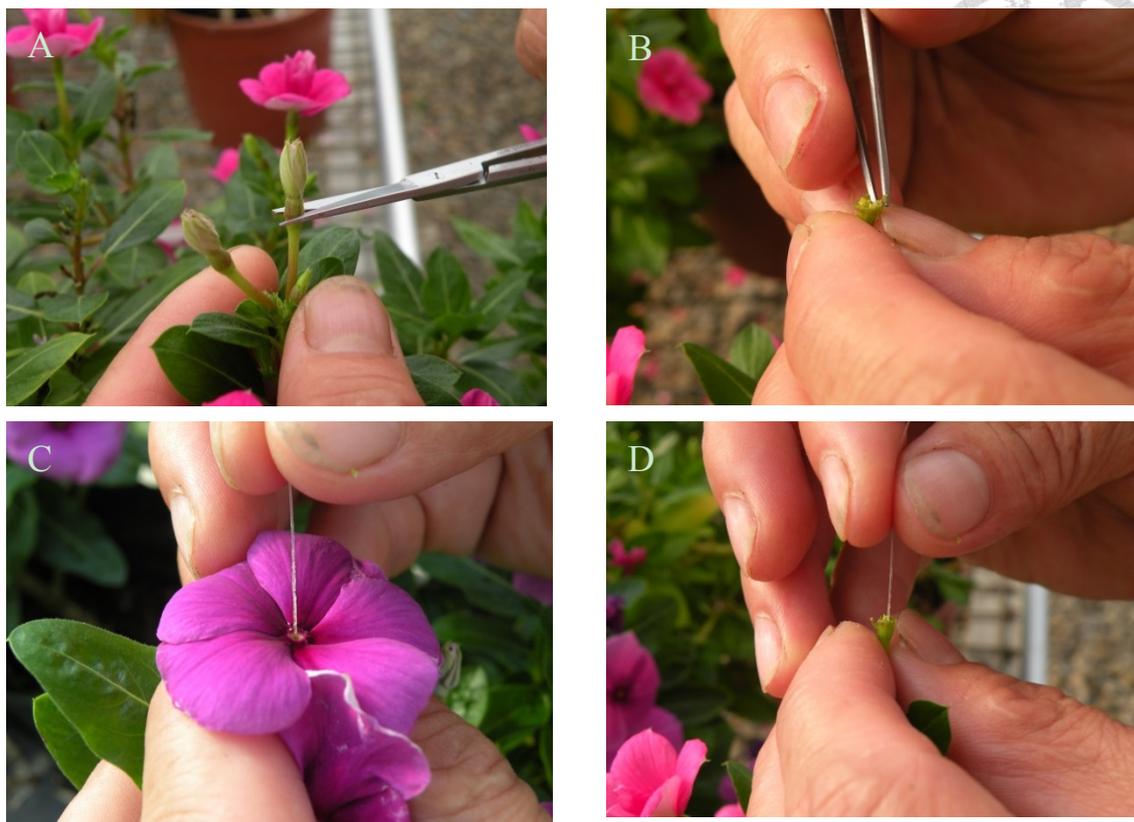


圖 5.3. 日日春雜交授粉流程。(A)花開前一至兩日剪除未展開花瓣，使柱頭及花藥曝露在外，(B)以鑷子將種子親之花藥夾除以除雄避免花粉自交汙染，(C)以碳纖維釣魚線伸入花冠筒黏取花粉親花粉，(D)對可見柱頭頂泌液之花朵進行人工授粉，以釣魚線伸入花冠筒與柱頭間空隙輕輕上下刷動數次，使釣魚線上之花粉沾附於柱頭側面。

Fig. 5.3. Pollination process for *Catharanthus roseus* L. (A) Use small scissors to cut off petals at 1 to 2 d before anthesis to make stigma and anthers visible. (B) Female parent was emasculated with forceps to prevent self-pollination. (C) Pollen was collected by inserting carbon-fibered fish line into the corolla tube. (D) Pollination was done carefully by inserting pollen-adhered fish line into the corolla tube of female parent several times.

第六章 重瓣日日春品種之選育

Chapter 6. Breeding and Selection for Double-flowered *Catharanthus roseus* Cultivars



附加關鍵字：自交二代、授粉、盆花、隱性性狀、營養系品種

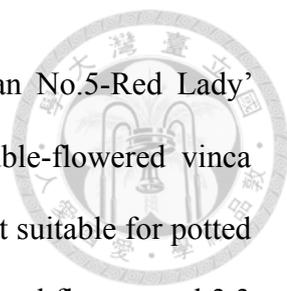
Additional index words: F₂ generation, pollination, potted flower, recessive phenotype,
vegetative cultivar

摘要

以日日春重瓣變異株 TYV1 為種子親與單瓣品系 TYV3 及 TYV4 之花粉親經雜交授粉，得單瓣 F₁ 後裔，選其中 15 株花徑大、生長強勢單株經自交得 F₂ 單重瓣分離世代族群，再經初選及兩次品系比較試驗，選出性狀優良的五個重瓣日日春品系，分別命名為‘桃園 1 號-玫瑰女孩’、‘桃園 2 號-桃花女’、‘桃園 3 號-紅蝴蝶’、‘桃園 4 號-夏雪’及‘桃園 5 號-紅娘’。重瓣日日春新品種側枝數及花朵數多、株高矮，適合盆花栽培，五個重瓣日日春新品種之花形均具兩輪 10 片花瓣，花瓣排列緊密呈漏斗狀，平均花徑 3.3 ± 0.3 cm。本研究選育首度有植物品種保護權的重瓣日日春。

Abstract

Double-flowered vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] TYV1 (female parent) was crossed with single-flowered TYV3 and TYV4 (male parent) and single-flowered F₁ generation was obtained. Fifteen F₁ plants with large flower and vigorous growth from both combinations were selected. Double-flowered F₂ plants were obtained following self-pollinated of these 15 F₁ plants. Five double-flowered lines were selected and named as ‘Taoyuan No.1-Rose Girl’, ‘Taoyuan No.2-Peach Lady’, ‘Taoyuan



No.3-Red Butterfly’, ‘Taoyuan No.4-Summer Snow’, and ‘Taoyuan No.5-Red Lady’ after one selection and two cultivars comparison tests. New double-flowered vinca cultivars have branching and multi-blooming habit, and are compact suitable for potted flowers. Double-flowered vinca have two layers of petal, funnel-shaped flower, and 3.3 ± 0.3 cm flower diameters. The five selected cultivars are the first reported for double-flowered vinca with plant breeders’ right.

前言(Introduction)

日日春在高溫強光下生長良好，對空氣汙染忍受性強，並具開花期長之特性，近年來經不斷的育種改良推出新品種，已成為全球重要的花壇及盆花植物(Ball, 1998；Hogan et al., 2003)。由於全株含有多種可治療腫瘤及高血壓等疾病的植物鹼(terpenoid indole alkaloids)故亦為重要藥用植物(Favali et al., 2004)。

目前的商業流通品種多數由 *Catharanthus* 屬中的 *C. roseus*、*C. longifolius* 及 *C. trichophyllus* 種間雜交所育成(Parker and Vitti, 1985)，主要育種目標為抗病、大花、花瓣重疊及分枝性良好且適合花壇或盆花栽培。另外也選育出枝條軟呈下垂狀，供吊盆栽培使用的懸垂品種，如地中海系列(Mediterranean Series)(鶴島, 2005)，近年來 Goldsmith 種子公司亦推出一生長勢強、大花及抗病的可樂懸垂系列品種(Cora Cascade Series)。

由於原生日日春均為 5 片花瓣的高腳碟狀單瓣花(van Bergen and Snoeijer, 1996)缺乏花型變化，因此長期以來並無重瓣日日春品種推出(National Garden Bureau Inc., 2002)。直到 2008 年日本 Sakata 種子公司的目錄中展示一花瓣基部增生 5 片細長花瓣的品種‘夏の思い出-夏の夢’，為首見多花瓣日日春，但外花瓣分離、內花瓣纖細，花色單一，枝條過長呈下垂狀，觀賞品質有待改進。重瓣花為觀賞花卉重要性狀，主要表現為花瓣數增多，可造成花朵顏色較深、壽命較長、美觀性較高及香味濃等特性(Reynolds and Tampion, 1983)。本研究蒐集到花型突變



成重瓣的 TYV1 品系，增加一輪花瓣而具 10 片花瓣，花瓣寬且重疊，自交之實生苗幼年期葉片皺縮，葉柄長度較長，形態解剖顯示花藥中小孢子母細胞可分裂發育成花粉但花粉量明顯偏少，子房中胚珠數比單瓣品種少(第三章)，除此之外 TYV1 品系雌雄蕊未瓣化可做為雜交育種之親本(第五章)。本章敘述具商業價值重瓣日日春品種選育過程，藉以建立一重瓣日日春之選育模式。

材料與方法(Materials and Methods)

重瓣日日春 TYV1 品系變異自 PanAmerican 種子公司所經銷的‘Pacifica Polka Dot’品種，2001 年收集於桃園縣新屋鄉並以頂梢扦插繁殖方式繁殖成品系保存。育種過程中取 TYV1 品系當做種子親，花粉親為桃紅的 TYV3 及鮭魚紅的 TYV4，兩品系則選自 F₁ 品種‘Titan Burgundy’(種子購自台和園藝公司，臺北，臺灣)的 F₂ 世代中生長勢強、花徑大之單瓣單株，藉無性繁殖成品系。雜交於 2007 年 7 月 2 日至 7 月 6 日在桃園區農業改良場花卉溫室中進行，授粉及種子採收方式參見第五章材料與方法。

將 TYV1 × TYV3 雜交共 30 朵花，播種後獲得之 F₁ 植株皆為單瓣型，從中選出 15 株花徑大及生長勢強者進行自交，共重複 40 朵花。當 F₂ 植株培育至開花後出現單瓣及重瓣分離情形，且花色多樣，選擇其中重瓣型植株進行優良單株選拔，選出之優良單株繁殖成品系，接續進行二次品系試驗，最後從品系試驗中選出具商業潛力之品系進行詳細性狀調查、命名及申請品種保護。TYV1 × TYV4 雜交組合之育種時間、過程和方法與 TYV1 × TYV3 組合相同。

兩組雜交之 F₁ 種子於 2007 年 8 月 16 日播種，F₂ 種子則於 2007 年 12 月 18 日。播種室育苗之環境條件光強度約 50-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，溫度 20-30°C。小苗 30 天後長至兩對葉片時移植至直徑 10.5 cm、容積 400 mL 之黑色軟質塑膠盆，栽培介質與第五章相同，當植株具 5-6 對葉時摘心一次。栽培溫室環境約遮光 30%，光強度在 200-460 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，自然日長 12 至 14.5 小時，平均溫度為 25.7 ± 6.5°C。



當植株開花後調查株高、分枝數、到開花日數、花徑、花色、到發根天數及扦插成活率。株高定義為由介質表面至植株最高處；分枝數為長度大於 5 cm 之側枝數；開花日數為種植後到第一朵花開時之日數；花徑則測量第三朵花盛開時直徑最寬處；花色是以 RHS 色卡(The Royal Horticultural Society, 2007)比對花瓣中佔大面積之顏色；插穗扦插後到根數超過 3 條且長度超過 1 cm 以上時所需日數為發根天數；扦插成活率為扦插 25 天後調查發根數超過 3 條之插穗百分比。品質分級 (quality rating) 於每盆開 5 朵花後調查，人為主觀綜合評量整體之株高比例、分枝性、花形完整度、葉形及葉色等，分五等第給分，5 為極佳，4 為良好，3 為尚可，2 為不佳，1 極差。

試驗皆採完全逢機(Completely Randomized Design, CRD) 設計。試驗結果以 CoStat 6.4 (CoHort Software, USA) 統計軟體進行最小顯著差異(Least significant difference, LSD) 分析比較處理間差異。顯著水準為 $P < 0.05$ 。

結果(Results)

以 TYV1 為種子親與花粉親 TYV3 之組合共雜交 30 朵花，成功 15 朵花且得 18 個果莢，果莢長度為 0.5 - 3.2 cm，清除果莢雜物後得種子約 135 粒，平均每莢種子數為 7.5 ± 6.1 粒，播種育苗後，共育出 41 株 F_1 實生苗，開花後花形單瓣，從中選出 15 株花徑大及生長勢強之單株，選其中 40 朵花進行自交授粉，成功 32 朵花，得 46 個果莢，果莢長度 1.6 - 3.7cm，共得種子約 660 粒，平均每莢種子數為 14.5 ± 4.8 粒。當 F_2 世代開花後顯示單重瓣型及花色皆分離，在 403 株中有 91 棵重瓣型，以株高、分枝數及花徑等性狀綜合考量選出外觀品質較佳的 28 株進行評估，此 28 株進行頂梢扦插繁殖於 2008 至 2009 年間進行單株比較(表 6.1)，並從中選出 16 株在花形、發根數及分枝數上表現良好之單株。獲選單株進行頂梢扦插繁殖成品系，再進行相關性狀的第一次品系比較試驗(表 6.2)，從中再挑選出表現穩定的 8 個品系進行第二次品系比較試驗(表 6.3)，最後從 8 個品系中選出

TYV07S2058 品系命名為‘桃園 1 號-玫瑰女孩’(表 6.7), TYV07S2141 品系命名為‘桃園 5 號-紅娘’(表 6.11)。

以 TYV1 為種子親與 TYV4 為花粉親之組合亦雜交 30 朵花, 成功 11 朵得 15 個果莢, 果莢長度 0.6 - 2.8 cm, 種子調製後約 100 粒, 平均每莢種子數為 7.1 ± 5.6 粒, 播種育苗得 31 株 F_1 實生苗, 開花後從中選出生長勢強及花徑大之 15 株, 再對 40 朵花進行自交授粉, 成功 28 朵得 39 個果莢, 果莢長度 1.4 - 3.2 cm, 種子約 500 粒, 平均每莢種子數為 13.1 ± 4.2 粒, 播種進行育苗栽培, 得 327 株單重瓣混合的 F_2 實生苗, 其中重瓣單株為 66 株。選出 26 株重瓣後代進入觀察試驗(表 6.4), 觀察試驗選出表現良好之 18 株進行頂梢扦插繁殖成品系進行此組合的第一次品系比較試驗(表 6.5), 從這 18 個品系中選出 10 個品系再進行第二次比較試驗(表 6.6), 並選出 TYV07S1153 品系命名為‘桃園 2 號-桃花女’(表 6.8), TYV07S1127 品系命名為‘桃園 3 號-紅蝴蝶’(表 6.9), TYV07S1047 品系命名為‘桃園 4 號-夏雪’(表 6.10)。

五個重瓣日日春品種以書面審查方式申請中華民國植物品種權, 經檢定單位進行實物栽培檢定後送農委會植物品種審定委員會審查, 於 2010 年 12 月 28 日獲得植物品種權保護, 權利期間到 2035 年。

討論(Discussion)

重瓣日日春育種目標為育成多樣花色、花形美觀及花徑大之重瓣品種, 這與 Parker 和 Vitti (1985)進行的日日春種間雜交育種計畫的目標相似, 透過雜交將兩親本理想性狀結合以符合人類需求是植物育種的目的(盧, 1961)。TYV1 品系自交後代外觀及花型花色均和原親本相同, 應為重瓣花形及花色遺傳上之純系, 其外觀為株高矮、分枝多、花瓣為白色, 花朵眼圈顏色紫紅會暈散(Chen et al., 2012)。日日春少有重瓣品種(National Garden Bureau Inc., 2002), 直到 2008 年 Sakata 種子公司的目錄中展示‘夏の思い出-夏の夢’品種這是資料上首見多花瓣的日日春, 但



其花瓣分離、內花瓣細長，花色單一，枝條過長呈下垂狀，觀賞品質有待改進；此品種的改良一直尚未有相關的資料出現，推測此品種可能雌雄蕊不具正常功能無法做為親本。

日日春雖為可自花授粉植物，但實際因雌雄蕊空間隔離，通常足以防止自花授粉的發生，栽培於露天環境中則倚賴具曲管式(siphoning type)口器昆蟲協助授粉而形成果莢(Miyajima, 2004)。重瓣日日春 TYV1 從 2001 年收集到 2007 年之間多年栽培於露天環境中未曾觀察到結莢，主因除花粉量及胚珠數明顯偏少外，可能為重瓣日日春內輪增生花瓣常呈直立狀，5 瓣緊密合生擋住花冠筒上端小孔，大幅阻礙蝶蛾類昆蟲授粉。

當植株養分不需供應種子發育時，有較多的光合產物供給植株本身和花朵生長延長花期，此現象也表現在新育成的重瓣日日春品種上。但因重瓣品種不易自然形成種子的特性，在商業生產上較不利於以種子進行大量繁殖，而應使用扦插繁殖和組織培養供應種苗需求。植物品種間扦插繁殖發根能力常具有差異性存在，為了滿足將來重瓣日日春品種之商業生產需求，在品系試驗時進行扦插發根之速率及成活百分比之調查，以淘汰不易扦插繁殖之品系(表 6.1、6.4)。

重瓣究其本質是控制花器官發育的基因及表達程度變化所致(Reynolds and Tampion, 1983)。重瓣性狀遺傳較複雜，除了隱性遺傳外，還有顯性、不完全顯性以及多基因效應等遺傳方式。在第五章遺傳試驗中，以正反雜交及回交試驗結果顯示重瓣日日春的遺傳是由一對隱性的對偶基因所控制，因此導入不同花色的重瓣後代在 F_2 世代才達成目標， F_2 選拔利用幼苗葉片皺縮之連鎖，於苗期就先將單瓣植株分開僅針對重瓣單株進行評估，在外觀上以分枝數多、葉片較為平整、生長勢強及目標花色做為考量，在花形上因花瓣呈漏斗狀時花瓣間距離排列緊密且遮蔽眼圈使花朵外觀較像重瓣花卉，故花形選擇優先考慮漏斗狀花形之單株，其餘單瓣株淘汰，但此種花形由於外花瓣傾斜向上，故花朵直徑較小，5 個選出之品種平均花徑僅 3.3 ± 0.3 cm。育種流程最後之優良品系各項園藝性狀均達一定

之水準，但考量品種權管理和規費成本，暫時先選 5 個商業栽培常用之顏色品系
進行命名及申請品種權。



表 6.1. 日日春 TYV1 (♀) × TYV3 (♂) 之 F₁ 自交，產生 91 株重瓣花經篩選之 28 棵優良單株之株高、側枝數、到花日數、花徑、花色、發根日數及扦插存活率 (2008/10/3-2009/1/30)

Table 6.1. Plant height, lateral shoot number, days to flowering, flower diameter, flower color, days to rooting, and cutting survival of 28 selected F₂ double-flowered plants from F₂ population of self-crossing TYV1 (♀) × TYV3 (♂) F₁ plants and compared with 'Pacifica Polka Dot' (PPD) (2008/10/3- 2009/1/30).

Code	Plant ht (cm)	Lateral shoot no.	Days to flowering	Flower diameter (cm)	Flower color (RHS code)	Days to rooting	Cutting survival (%)
07S2001	13.8	2.8	43	3.0	RP 68B ^y	21.0	85.0
07S2019	16.0	2.5	48	3.1	RP 73B	22.7	87.1
07S2026	15.5	2.3	47	2.9	RP 68A	23.2	87.5
07S2058	13.1	2.8	39	3.5	RP 68A	20.7	85.0
07S2071	15.2	2.5	49	3.2	RP 67B	22.5	77.1
07S2094	14.1	3.0	40	3.1	RP 71C	22.3	82.9
07S2138	14.5	3.5	37	2.9	RP 71D	24.3	83.3
07S2141	12.6	2.3	44	3.2	RP N74A	21.0	95.8
07S2169	12.6	2.2	42	3.3	RP N74B	20.2	85.0
07S2177	16.9	2.7	45	3.2	RP 62B	20.5	81.3
07S2178	12.9	2.2	42	3.0	RP 68B	21.8	85.4
07S2193	14.2	2.2	40	3.5	RP 62D	20.0	83.3
07S2228	12.9	2.0	38	3.0	RP 65A	20.0	93.4
07S2238	15.0	2.5	46	3.4	RP 64D	20.0	87.5
07S2244	12.1	2.2	39	3.8	RP 64B	20.5	89.6
07S2249	15.6	2.8	45	3.4	RP 65A	21.7	86.7
07S2250	14.8	2.2	40	3.3	RP 62A	19.8	85.0
07S2305	15.1	2.5	41	3.2	RP 73B	20.2	71.3
07S2312	13.3	2.5	39	2.9	RP 73A	21.3	73.3
07S2337	15.0	2.7	38	3.0	RP 73B	22.7	85.4
07S2346	13.8	2.7	41	3.4	RP 65D	21.8	73.3
07S2347	15.9	2.8	49	3.0	RP 67B	22.7	77.1
07S2361	16.6	2.2	43	3.0	RP 71D	19.0	80.1
07S2375	14.4	2.3	39	3.1	RP 71C	21.0	75.4
07S2380	15.1	2.7	43	3.5	RP N74A	23.5	83.3
07S2381	16.7	2.5	42	3.0	RP 64B	19.8	79.2
07S2389	12.6	2.5	40	3.1	RP 67A	20.8	79.2
07S2393	17.1	2.5	46	3.0	RP 65A	23.3	87.1
PPD	11.0	2.3	34	4.7	W NN155	22.2	81.3
LSD ^z (P=0.05)	2.5	0.3	5.7	0.9		2.4	9.3

^zMean separation within columns by LSD test at $P < 0.05$ (n=6).

^yRP, red-purple; W, white.

表 6.2. 日日春 TYV1 (♀) × TYV3 (♂) F₂ 28 株重瓣花植株初選 16 棵優良單株扦插繁殖後進行之株高、葉長、側枝數、花徑、側枝花朵數及品質指數第一次品系園藝性狀比較(2009/3/25-2009/7/2)

Table 6.2. Plant height, leaf length, lateral shoot number, flower diameter, lateral shoot flower number, and quality index of the first horticultural trait comparison for 16 selected F₂ double-flowered lines of TYV1 (♀) × TYV3 (♂) from 28 selected plants compared with 'Pacifica Polka Dot' (PPD) (2009//3/25-2009/7/2).

Code	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Lateral shoot no.	Flower diameter (cm)	Lateral shoot flower no.	Quality index
TYV07S2001	15.1	5.3	2.5	3.4	2.6	4
TYV07S2019	14.8	6.0	2.7	3.1	2.3	4
TYV07S2026	15.8	5.8	2.5	3.2	2.6	4
TYV07S2058	14.9	6.4	2.5	3.4	2.7	4
TYV07S2094	14.1	6.3	2.3	3.3	2.4	3
TYV07S2141	16.7	6.3	2.6	3.0	2.5	4
TYV07S2169	16.2	6.5	2.3	3.4	2.7	3
TYV07S2177	14.8	6.7	2.2	3.2	2.5	3
TYV07S2193	15.3	5.9	3.2	3.4	2.3	4
TYV07S2249	14.2	6.4	2.7	3.0	2.4	4
TYV07S2250	13.3	6.4	2.5	3.1	2.6	3
TYV07S2337	15.1	6.8	2.3	3.1	2.7	4
TYV07S2361	15.4	6.6	2.7	3.5	2.2	3
TYV07S2380	15.6	6.5	2.5	2.9	2.6	4
TYV07S2389	15.5	6.3	2.3	3.2	2.5	4
TYV07S2393	14.8	6.8	3.0	3.1	2.4	3
PPD	13.8	6.1	2.8	4.7	2.5	4
LSD ^z (P=0.05)	1.8	1.7	0.3	0.4	0.3	

^zMean separation within columns by LSD test at $P < 0.05$ (n=6).

表 6.3. 日日春 TYV1 (♀) × TYV3 (♂) F₂ 16 個優良品系經第一次品系比較後選出 8 個優良品系進行之株高、葉長、側枝數、花徑、側枝花朵數及品質指數第二次品系園藝性狀比較(2009/7/4-2009/10/25)

Table 6.3. Plant height, leaf length, lateral shoot number, flower diameter, lateral shoot flower number, and quality index of the second horticultural trait comparison for 8 selected F₂ double-flowered lines of TYV1 (♀) × TYV3 (♂) from 16 selected lines compared with 'Pacifica Polka Dot' (PPD) (2009/7/4-2009/10/25).

Code	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Lateral shoot no.	Flower diameter (cm)	Lateral shoot flower no.	Quality index
TYV07S2001	14.6	5.9	2.7	3.0	2.5	3
TYV07S2019	16.8	5.8	2.7	3.4	2.2	3
TYV07S2058	13.5	6.8	2.5	3.1	2.6	4
TYV07S2141	16.3	6.3	2.5	3.2	2.8	4
TYV07S2193	17.3	6.8	2.8	3.4	2.0	3
TYV07S2249	16.3	6.5	2.8	3.0	1.8	3
TYV07S2380	16.1	6.2	2.5	3.1	2.5	3
TYV07S2389	16.0	6.9	2.5	3.5	2.2	3
PPD	11.8	6.0	2.7	4.7	3.2	3
LSD ^z (P=0.05)	2.6	1.2	0.5	0.4	0.3	

^zMean separation within columns by LSD test at $P < 0.05$ (n=6).

表 6.4. 日日春 TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F₁ 自交，產生 66 株重瓣花 F₂ 植株初選 26 棵優良單株之株高、側枝數、到花日數、花徑、花色、發根日數及扦插存活率 (2008/10/3-2009/1/30)

Table 6.4. Plant height, lateral shoot number, days to flower, flower diameter, flower color, days to rooting, and cutting survival of 26 selected F₂ double-flowered plants from F₂ population of self-crossing TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F₁ plants and compared with 'Pacifica Polka Dot' (PPD) (2008/10/3-2009/1/30).

Code	Plant height (cm)	Lateral shoot no.	Days to flowering	Flower diameter (cm)	Flower color (RHS code)	Days to rooting	Cutting survival (%)
07S1011	14.8	2.7	53	3.0	RP 62D ^y	21.5	85.4
07S1024	13.6	2.5	47	2.9	RP 65C	18.8	82.9
07S1029	13.8	2.8	52	3.1	RP 70B	21.5	83.3
07S1038	14.2	2.0	55	2.8	RP 71D	18.5	81.3
07S1044	13.5	2.7	45	3.1	RP N74A	22.3	64.6
07S1047	13.7	2.8	48	2.9	W NN155C	19.5	87.1
07S1065	14.6	2.7	46	2.9	P N78B	22.0	89.6
07S1083	15.1	2.7	54	3.0	W N155A	21.2	95.8
07S1084	16.4	2.2	51	3.1	RP N74A	20.2	58.3
07S1106	13.2	2.5	44	2.8	RP 62D	22.0	60.4
07S1114	14.2	2.3	47	3.0	P 75C	18.2	80.8
07S1127	14.3	2.3	45	3.1	P 75D	20.8	87.1
07S1129	14.3	2.5	46	3.0	RP 65D	20.2	77.1
07S1153	12.8	3.0	50	3.2	RP 69A	20.0	83.3
07S1164	15.2	2.2	49	3.0	RP 65D	22.5	87.5
07S1166	13.9	2.7	47	2.9	RP 69B	18.5	89.6
07S1173	14.3	2.2	51	2.9	P 75D	20.3	87.5
07S1192	13.3	2.7	53	3.0	RP 69C	24.3	85.0
07S1199	15.3	2.2	51	3.1	P 75C	22.7	82.9
07S1213	14.5	2.2	52	2.8	RP 69B	21.0	84.6
07S1268	14.4	2.5	54	3.3	RP 70D	20.0	82.9
07S1273	14.6	2.7	56	3.3	RP 70B	19.2	80.4
07S1279	13.8	2.2	43	2.9	RP 72B	22.7	97.9
07S1293	13.0	2.7	44	3.0	P N78B	19.7	89.6
07S1303	14.3	2.3	45	2.8	RP 70D	21.3	87.5
07S1316	14.6	2.2	46	3.1	RP 73D	18.7	85.4
PPD	12.0	2.5	35	4.2	W NN155	19.0	91.7
LSD ^z (<i>P</i> =0.05)	1.2	0.3	7.8	0.5		2.5	

^zMean separation within columns by LSD test at *P* < 0.05 (n=6).

^yRP, red-purple; P, purple; W, white.

表 6.5. 日日春 TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F₂ 66 株重瓣花植株初選 18 棵優良單株扦插繁殖後進行第一次品系園藝性狀比較(2009/3/25-2009/7/2)

Table 6.5. Plant height, leaf length, lateral shoot number, flower diameter, lateral shoot flower number, and quality index of the first horticultural trait comparison for 18 selected F₂ double-flowered lines of TYV1 (♀) × TYV4 (♂) from 26 selected plants compared with 'Pacifica Polka Dot' (PPD) (2009/3/25-2009/7/2).

Code	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Lateral shoot no.	Flower diameter (cm)	Lateral shoot flower no.	Quality index
TYV07S1024	14.3	5.3	2.8	2.8	2.3	3
TYV07S1029	12.4	4.8	2.3	3.0	2.7	3
TYV07S1038	12.5	5.5	2.7	3.0	1.8	4
TYV07S1047	12.8	5.5	2.7	2.8	2.3	4
TYV07S1083	14.6	5.0	2.0	3.1	2.5	3
TYV07S1114	14.2	4.7	2.2	2.8	2.6	4
TYV07S1127	14.8	5.1	2.3	3.1	2.1	4
TYV07S1153	13.7	5.0	2.3	3.0	2.8	3
TYV07S1166	13.5	5.3	2.7	2.8	2.7	4
TYV07S1192	13.3	5.2	2.5	3.1	2.4	4
TYV07S1199	14.5	5.3	2.8	3.0	2.6	3
TYV07S1213	13.5	5.3	2.5	2.8	2.6	3
TYV07S1268	13.1	5.6	2.3	3.0	2.5	4
TYV07S1273	14.3	5.5	2.7	3.0	2.4	3
TYV07S1279	12.2	5.0	2.0	2.9	2.6	4
TYV07S1293	12.7	5.4	2.3	3.1	2.2	3
TYV07S1303	12.1	6.0	2.5	2.9	2.6	4
TYV07S1316	15.3	5.0	2.3	2.8	2.7	4
PPD	10.8	5.1	2.3	4.2	2.8	3
LSD ^z (P=0.05)	1.7	1.7	0.7	1.5	0.4	

^zMean separation within columns by LSD test at $P < 0.05$ (n=6).

表 6.6. 日日春 TYV1 (♀) × TYV4 (♂) F₂ 18 個優良品系經第一次品系比較後選出 10 個優良品系進行第二次品系園藝性狀比較(2009/7/4-2009/10/25)

Table 6.6. Plant height, leaf length, lateral shoot number, flower diameter, lateral shoot flower number, and quality index of the second horticultural trait comparison for 10 selected F₂ double-flowered lines of TYV1 (♀) × TYV4 (♂) from 18 selected lines compared with 'Pacifica Polka Dot' (PPD) (2009/7/4-2009/10/25).

Code	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Lateral shoot no.	Flower diameter (cm)	Lateral shoot flower no.	Quality index
TYV07S1038	13.3	4.7	2.5	3.0	2.2	3
TYV07S1047	13.9	4.4	2.8	3.0	2.8	4
TYV07S1114	13.9	4.9	2.8	3.0	2.6	3
TYV07S1127	13.8	4.5	3.5	2.7	2.4	4
TYV07S1153	12.3	5.6	3.2	2.7	2.6	4
TYV07S1192	14.3	5.7	3.3	2.8	2.8	3
TYV07S1268	12.9	5.1	3.2	2.9	2.3	3
TYV07S1279	12.8	4.7	2.8	2.9	2.7	4
TYV07S1303	13.6	5.0	3.0	3.0	2.5	4
TYV07S1316	14.2	5.0	2.7	3.2	2.5	3
PPD	13.4	5.1	3.3	4.2	3.2	4
LSD ^z (<i>P</i> =0.05)	1.2	0.6	0.9	0.8	0.3	

^zMean separation within columns by LSD test at *P* < 0.05 (n=6).

表 6.7. 日日春‘桃園 1 號-玫瑰女孩’植物品種特性表及照片

Table 6.7. Plant character list and photo of *Catharanthus roseus* ‘Taoyuan No.1-Rose Girl’.

公告日期：99 年 12 月 28 日	
申請案編號：990117	申請日期：99 年 10 月 19 日
公開案號：1065	公開日期：99 年 11 月 2 日
證書號碼：A01033 號	發證日期：99 年 12 月 28 日
植物種類：	中名：日日春
	英名：Vinca
	學名： <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
品種名稱：桃園 1 號-玫瑰女孩 (Taoyuan No.1-Rose Girl)	
權利期間：自中華民國 99 年 12 月 28 日至 124 年 12 月 27 日	
品種權人：農業委員會桃園區農業改良場	代表人：李憲明
地址：桃園縣新屋鄉後庄村 16 號	電話：(03)4768216
<p>品種特性概要：</p> <p>一、株型：株高矮，株寬窄。</p> <p>二、枝梢：枝梢花青素呈色弱。</p> <p>三、葉片：葉形橢圓形，葉長短，葉寬中等，葉無斑紋，葉身綠色程度中等，葉柄正面花青素呈色弱。</p> <p>四、花朵性狀：花重瓣，花徑小，外瓣排列接觸、外瓣形狀扇形，重瓣花品種內瓣形狀卷曲管狀型，花瓣正面顏色數 1 種，花瓣正面主要顏色紅紫 RHS68B，有眼圈，眼圈相對於花朵小，眼圈顏色數 1 種，眼圈邊緣顏色呈現對比，眼圈內側呈色紅紫 RHS61C，花托筒外側顏色淺綠，花柱分合情況為合。</p> <p>五、其他：葉柄可區分為兩段。</p>	
 	

表 6.8. 日日春‘桃園 2 號-桃花女’植物品種特性表及照片

Table 6.8. Plant character list and photo of *Catharanthus roseus* ‘Taoyuan No.2-Peach Lady’

公告日期：99 年 12 月 28 日	
申請案編號：990118	申請日期：99 年 10 月 19 日
公開案號：1066	公開日期：99 年 11 月 2 日
證書號碼：A01034 號	發證日期：99 年 12 月 28 日
植物種類：	中名：日日春
	英名：Vinca
	學名： <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
品種名稱：桃園 2 號-桃花女(Taoyuan No.2-Peach Lady)	
權利期間：自中華民國 99 年 12 月 28 日至 124 年 12 月 27 日	
品種權人：農業委員會桃園區農業改良場	代表人：李憲明
地址：桃園縣新屋鄉後庄村 16 號	電話：(03)4768216
<p>品種特性概要：</p> <p>一、株型：株高矮，株寬窄。</p> <p>二、枝梢：枝梢花青素呈色弱。</p> <p>三、葉片：葉形橢圓形，葉長中等，葉寬中等，葉無斑紋，葉身綠色程度中等，葉柄正面花青素呈色弱。</p> <p>四、花朵性狀：重瓣花，花徑中等，外瓣排列分離、外瓣形狀扇形，重瓣花品種內瓣形狀卷曲管狀形，花瓣正面顏色數 1 種，花瓣正面主要顏色粉紅 RHS65D，有眼圈，眼圈相對於花朵中等，眼圈顏色數 2 種，眼圈邊緣顏色呈現擴散，眼圈內側呈色紅 RHS58B，眼圈外側呈色粉紅 RHS65A，花托筒外側顏色淺綠，花柱分合情況合。</p> <p>五、其他：葉柄可區分為兩段。</p>	
	

表 6.9. 日日春‘桃園 3 號-紅蝴蝶’植物品種特性表及照片

Table 6.9. Plant character list and photo of *Catharanthus roseus* ‘Taoyuan No.3-Red Butterfly’

公告日期：99 年 12 月 28 日	
申請案編號：990119	申請日期：99 年 10 月 19 日
公開案號：1067	公開日期：99 年 11 月 2 日
證書號碼：A01035 號	發證日期：99 年 12 月 28 日
植物種類：	中名：日日春
	英名：Vinca
	學名： <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
品種名稱：桃園 3 號-紅蝴蝶 (Taoyuan No.3-Red Butterfly)	
權利期間：自中華民國 99 年 12 月 28 日至 124 年 12 月 27 日	
品種權人：農業委員會桃園區農業改良場	代表人：李憲明
地址：桃園縣新屋鄉後庄村 16 號	電話：(03)4768216
<p>品種特性概要：</p> <p>一、株型：株高矮，株寬窄。</p> <p>二、枝梢：枝梢花青素呈色中。</p> <p>三、葉片：葉形橢圓形，葉長中等，葉寬中等，葉無斑紋，葉身綠色程度中等，葉柄正面花青素呈色強。</p> <p>四、花朵性狀：花重瓣，花徑中等，外瓣排列輕微覆蓋、外瓣形狀扇形，重瓣花品種內瓣形狀長條形，花瓣正面顏色數 1 種，花瓣正面主要顏色紫 RHSN74A，有眼圈，眼圈相對於花朵小，眼圈顏色數 1 種，眼圈邊緣顏色呈現對比，眼圈內側呈色紫 RHSN79C，花托筒外側顏色淺綠，花柱分合情況合。</p> <p>五、其他：葉柄可區分為兩段。</p>	
	

表 6.10. 日日春‘桃園 4 號-夏雪’植物品種特性表及照片

Table 6.10. Plant character list and photo of *Catharanthus roseus* ‘Taoyuan No.4-Summer Snow’

公告日期：99 年 12 月 28 日	
申請案編號：990120	申請日期：99 年 10 月 19 日
公開案號：1068	公開日期：99 年 11 月 2 日
證書號碼：A01036 號	發證日期：99 年 12 月 28 日
植物種類：	中名：日日春
	英名：Vinca
	學名： <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
品種名稱：桃園 4 號-夏雪 (Taoyuan No.4-Summer Snow)	
權利期間：自中華民國 99 年 12 月 28 日至 124 年 12 月 27 日	
品種權人：農業委員會桃園區農業改良場	代表人：李憲明
地址：桃園縣新屋鄉後庄村 16 號	電話：(03)4768216
<p>特性概要：</p> <p>一、株型：株高矮，株寬窄。</p> <p>二、枝梢：枝梢花青素呈色無或極弱。</p> <p>三、葉片：葉形橢圓形，葉長中等，葉寬窄，葉無斑紋，葉身綠色程度中等，葉柄正面花青素呈色無或極弱。</p> <p>四、花朵性狀：花重瓣，花徑小，外瓣排列輕微覆蓋、外瓣形狀扇形，重瓣花品種內瓣形狀卷曲管狀形，花瓣正面顏色數 1 種，花瓣正面主要顏色白 RHSNN155C，有眼圈，眼圈相對於花朵小，眼圈顏色數 1 種，眼圈邊緣顏色呈現對比，眼圈內側呈色紅 RHSN57A，花托筒外側顏色淺綠，花柱分合情況合。</p> <p>五、其他：葉柄可區分為兩段。</p>	
 	

表 6.11. 日日春‘桃園 5 號-紅娘’植物品種特性表及照片

Table 6.11. Plant character list and photo of *Catharanthus roseus* ‘Taoyuan No.5-Red Lady’

公告日期：99 年 12 月 28 日	
申請案編號：990121	申請日期：99 年 10 月 19 日
公開案號：1069	公開日期：99 年 11 月 2 日
證書號碼：A01037 號	發證日期：99 年 12 月 28 日
植物種類：	中名：日日春
	英名：Vinca
	學名： <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
品種名稱：桃園 5 號-紅娘(Taoyuan No.5-Red Lady)	
權利期間：自中華民國 99 年 12 月 28 日至 124 年 12 月 27 日	
品種權人：農業委員會桃園區農業改良場	代表人：李憲明
地址：桃園縣新屋鄉後庄村 16 號	電話：(03)4768216
<p>品種特性概要：</p> <p>一、株型：株高中等，株寬窄。</p> <p>二、枝梢：枝梢花青素呈色弱。</p> <p>三、葉片：葉形橢圓形，葉長中等，葉寬中等，葉無斑紋，葉身綠色程度中等，葉柄正面花青素呈色中等。</p> <p>四、花朵性狀：花重瓣，花徑中等，外瓣排列輕微覆蓋、外瓣形狀扇形，重瓣花品種內瓣形狀卷曲管狀形，花瓣正面顏色數 1 種，花瓣正面主要顏色紅 RHS71C，有眼圈，眼圈相對於花朵大小小，眼圈顏色數 1 種，眼圈內側呈色紅 RHS61A，花托筒外側顏色淺綠，花柱分合情況合。</p> <p>五、其他：葉柄可區分為兩段。</p>	
 	



TYV1



TYV3



TYV07S2001



TYV07S2019



TYV07S2193



TYV07S2249



TYV07S2380



TYV07S2058



TYV07S2389



TYV07S2141

圖 6.1. 以重瓣日日春 TYV1 為種子親與單瓣日日春 TYV3 雜交後取 15 株 F₁ 自交產生 F₂ 世代經一次初次選拔、第一次品系選拔後之第二次品系選拔情形

Fig. 6.1. The second comparison test for double-floweredness in *Catharanthus roseus* by crossing double-flowered TYV1 with single-flowered TYV3.



TYV1



TYV4



TYV07S1038



TYV07S1114



TYV07S1192



TYV07S1279



TYV07S1303



TYV07S1047



TYV07S1268



TYV07S1153



TYV07S1316



TYV07S1127

圖 6.2. 以重瓣日日春 TYV1 為種子親與單瓣日日春 TYV4 雜交後取 15 株 F₁ 自交產生 F₂ 世代經一次初次選拔、第一次品系選拔後之第二次品系選拔情形

Fig. 6.2. The second comparison test for double-floweredness in *Catharanthus roseus* by crossing double-flowered TYV1 with single-flowered TYV4.



圖 6.3. 日日春植株外觀品質分級依據，依五等第給分，5 為極佳，4 為良好，3 為尚可，2 為不佳，1 極差。

Fig. 6.3. Quality index for *Catharanthus roseus* appearance. 5, excellent; 4, good; 3, average; 2, fair; 1, poor. Bar = 10 cm.



第七章 綜合討論與結論

Chapter 7. General Discussion and Conclusions



日日春花型穩定變異少，長期以來缺乏重瓣品種(National Garden Bureau Inc., 2002)，至 2008 年 Sakata 國內通訊販賣春季版的目錄中才首次出現重瓣品種‘夏の思い出-夏の夢’，其新增生花瓣從原花瓣基部突起，與本研究 2001 年台灣桃園所蒐集的 TYV1 花瓣增生模式相同，不過 TYV1 花瓣排列緊密，內圈花瓣寬大美觀具商品價值。因此本研究以重瓣花 TYV1 變異株與變異株親本單瓣太平洋白紅心‘Pacifica Polka Dot’為材料，進行形態解剖觀察、溫度試驗、遺傳方式探討，期望能建立一套重瓣日日春育種模式，有助於重瓣日日春新品種育成。

美國康乃狄克大學的 Parker 博士於 1978 年利用日日春原生種進行種間雜交育種，育出的具花色多樣、多分枝、株形矮及花瓣重疊之新品種，使日日春觀賞品質明顯提升(Curry, 2012)。長春花屬植物種源少，花形均為單瓣缺乏變化(van Bergen and Snoeijer, 1996)，人為誘變可有效增加育種遺傳資源(Chaudhary et al., 2011)，但植株經誘變後雌雄蕊常失去功能，多數無法用於雜交育種。而本研究中自然突變的 TYV1，藉由解剖觀察發現，雖雄蕊花粉數量少，雌蕊子房短，胚珠數少(第三章)，但不論作為種子親或花粉親皆能獲得實生種子(第五章)，並成功雜交育成桃園 1-5 號新品種(第六章)，獲得植物品種權保護。

Boke (1948)將日日春進行切片觀察，指出花冠筒與花瓣連接處，有一近軸(adaxial)分生組織(meristem)。解剖觀察 TYV1 新增生內圈花瓣，於花苞發育的第 2 階段時形成，起源位置為此分生組織，而 TYV1 增生之花瓣，緊密排列於花冠筒與花瓣連接處之小孔邊緣，形成自然隔離。Miyajima (2004)指出多數日日春品種具有雌雄蕊空間的隔離，無法自花授粉，產生種子，需依賴曲管式口器之蝶蛾類昆蟲協助授粉。本研究中 TYV1 花朵在開放 1-2 天後雌雄蕊重疊距離為 0.56 ± 0.01 mm，長度不足以自花授粉。此外，形態觀察中常可見 TYV1 花藥有局部褐化之情形，

並且在進行花粉培養時也不易取得花粉，這些形態特徵造成授粉障礙使 TYV1 無法大量產生種子，這可解釋為何野外不易見到重瓣變異株的原因。

日日春重瓣變異 TYV1 營養生長期的葉片皺縮捲曲，在進入生殖生長期後漸漸回復正常，在本研究中以 TYV1 為親本進行雜交(第五及第六章)，重瓣實生苗初期葉片皆皺縮，至花苞形成後才回復，顯示葉片皺縮捲曲性狀可能與重瓣花性狀連鎖，此特性和重瓣紫羅蘭實生苗表現相同，幼年期有葉片連鎖性狀可供早期篩選指標(Saunders, 1917)。幼年期葉片皺縮性狀，像似染病的異常個體，一般育苗及栽培業者發現後應會立即淘汰，這也可能是長期沒有重瓣品種的原因。溫度試驗中 TYV1 於日夜溫 20/15°C 環境下，葉片皺縮捲曲性狀在開花後卻沒回復，此溫度接近日日春開花的最低溫(Pietsch et al., 1995)，常造成花徑變小且開花延遲現象。推測此溫度可能限制 TYV1 植株葉片伸展，植體內養分累積發生不平衡，使葉片皺縮捲曲，而影響花朵發育及開花時間。

日日春品種間生長及開花對溫度反應不一(鶴島, 2005)，開花最適溫度為 25°C (Faust et al., 2005; Pietsch et al., 1995)。本研究單瓣‘Pacifica Polka Dot’於 30/25°C 處理之生長速度快且開花天數短，於 25/20°C 處理有最大花徑，溫度反應‘Pacifica Polka Dot’和前人研究相同。在 20/15°C 處理中重瓣變異株 TYV1 於葉片生長及開花顯著較‘Pacifica Polka Dot’差(圖 4.2；表 4.1)，且 TYV1 在 30/25°C 下開花延遲，顯示 TYV1 對於溫度適應範圍較‘Pacifica Polka Dot’窄。在商業品種育種選拔時，考量溫帶地區夏季高溫(30°C 以上)時間較短，大部分栽培期處於較冷涼溫度，因而選育出較適應涼溫的品種，如 Cooler 及 Pacifica 等系列(van Bergen and Snoeijer, 1996)。本研究中重瓣變異株 TYV1 為親本進行雜交時，環境平均溫度為 25.7°C，此可能影響實生後代或新品種對溫度之適應性。因此未來重瓣日日春之耐候性選拔，改變環境溫度增加雜交後代對溫度之適應性表現，依本研究結果可供作幼苗時期選拔時之參考。

日日春 TYV1 之重瓣花性狀由一對隱性對偶基因控制，同質或異質顯性時表現單瓣花，與花菸草的重瓣性狀遺傳相同(Zainol and Stimart, 2001)。隱性遺傳性狀



在族群當中容易被顯性覆蓋，且隱性又常伴隨較弱的生殖能力因此自然界中常被淘汰。本研究以流式細胞儀(flow cytometry)分析重瓣日日春 TYV1 及單瓣‘Pacifica Polka Dot’之 DNA 量與二倍體的‘Little Pinkie’無顯著差異，三者植株均為二倍體(第 5 章)。由前人研究指出利用秋水仙素(colchicine)誘變出四倍體日日春，其花徑明顯較二倍體大(Xing 等人, 2012)，對於花徑較小的重瓣日日春，推測如利用秋水仙素處理誘導染色體倍增方式，可望能獲得大花徑或其他優良性狀(抗病性)之後代，有助於後續新品種之育成。作物育種中隱性基因所控制的性狀在 F₂ 世代中出現(盧, 1961)，且遺傳比例僅佔 25%，因此族群數量宜放大才會有足夠重瓣後裔供選拔；於第五章遺傳之結果可獲得驗證(表 5.1、5.2)，未來以 TYV1 或其他重瓣日日春品系進行重瓣雜交育種時，宜增加自交或雜交授粉花朵數，以獲得較多種子，將族群數量放大。

傳統上花卉作物的花型改良多從單調缺乏變化的單瓣花，朝向立體、多樣充滿變化的重瓣花方向演進(Reynolds and Tampion, 1983)，稀少且具雜交結實能力，亟具有商業價值的重瓣變異株 TYV1 給日日春花型改良帶來良好的機會。良好的花卉品種除需具備生育整齊、抗病及生長勢強等特性外，還要有美麗的外表、線條、顏色及香氣等。近年來地球暖化，高低溫變化越來越劇烈，因此耐熱花卉種類及耐熱品種的選育已成為的趨勢(Anderson, 2006)，亦顯示日日春耐候及抗病性選育的重要性，值得進一步研究。

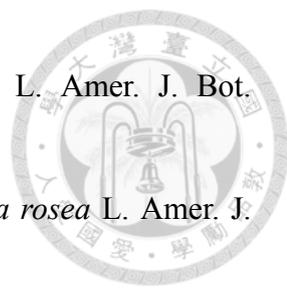


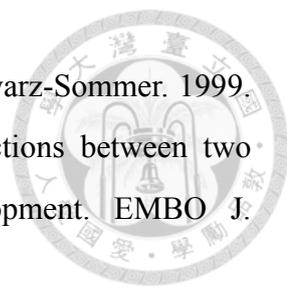
參考文獻(References)

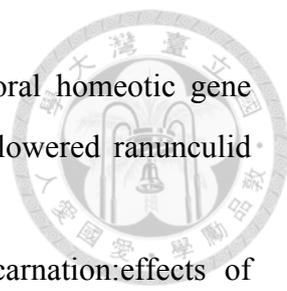


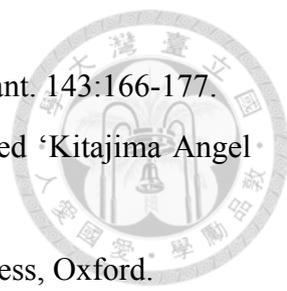
- 呂學義. 2010. 日日春花器構造、花粉活力與微體繁殖再生系統之建立. 國立嘉義大學農學研究所碩士論文.
- 呂學義、周慶原、沈榮壽. 2011. 日日春花器構造與強迫性自花授粉模式. 嘉大農林學報 8:18-33.
- 李雲、張剛、楊際雙. 2008. 熱激鍛鍊對高溫脅迫下菊花生理代謝的影響. 武漢植物學研究 26:175-178.
- 李懋學、張敦方、陳俊愉. 1983. 我國某些野生菊和栽培菊花的細胞學研究. 園藝學報 10:199-205.
- 林壽如. 2002. 臺灣花壇植物之種類與產業現況. 花卉產業現況與未來發展方向研討會專刊. 財團法人台灣區花卉發展協會. 臺北.
- 郭孟樺. 2012. 夏堇與毛葉蝴蝶草種間雜交胚之拯救與多倍體化. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文.
- 姜莉、陳發棣、滕年軍、陳素梅、崔娜欣、願俊杰. 2009. 重瓣和重台蓮品種花芽分化過程的解剖結構比較. 園藝學報 36:1233-1238.
- 陳永漢、姜義展. 1996. 日日春品種介紹. 桃園區農業專訊 18:7-10.
- 陳俊位、林俊義、許振川. 1997. 台灣日日春病害之發生. 臺中區農業改良場研究彙報 54:47-57.
- 陳裕星、柯惠喻、李國基. 2012. 朝天椒大孢子發育與子房組織化學特徵的探討. 臺中區農業改良場研究彙報 116:57-67.
- 陳錦木、李窓明、葉德銘. 2011. 臺灣的花壇植物產業現況與展望, p.154-167. 綠色城市與花卉產業國際研討會論文集. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系編印, 臺北, 臺灣.
- 趙印泉、劉青林. 2009. 重瓣花的形成機理及遺傳特性研究進展. 西北植物學報 4:832-841.
- 歐陽璋、吳文希. 1998. 臺灣長春花病害之調查. 植物病理學會刊 7:147-149.
- 蔡淑華. 1992. 植物組織切片技術綱要. 茂昌圖書有限公司. 臺北.
- 盧守耕. 1961. 現代作物育種學. 臺大農學院出版.
- 鶴島 久男. 2005. 花壇學講座(17)-10. 主な花壇用花きの育種と品種の發達の譜系

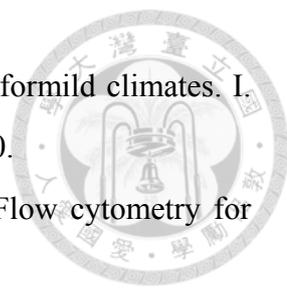
- (IV)-サルビアとビンカ(カサランサス). 農業および園藝 80:602-607.
- Abo El-Nil, M.M. and A.C. Hildebrandt. 1973. Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants. *Can. J. Bot.* 51:2107-2109.
- Almouslem, A.B. and R.A.E. Tilney-Bassett. 1989. The inheritance of flower doubleness and nectary spur in *Pelargonium ×hortorum* Bailey. *Euphytica* 41:23-29.
- Anderson, N.O. 2006. Flower breeding and genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st Century. Springer, London.
- Anderson, J.A. and S.R. Padhye. 2004. Protein aggregation, radical scavenging capacity, and stability of hydrogen peroxide defense systems in heat-stressed vinca and sweet pea leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:54-59.
- Angenent, G.C., J. Franken, M. Busscher, D. Weiss, and A.J. Vantunen. 1994. Co-suppression of the petunia homeotic gene FBP2 affects the identity of the generative meristem. *Plant J.* 5:33-44.
- Armitage, A.M. 2001. Armitage's manuals of annuals, biennials, and half-hardy perennials. Timber Press, Portland, OR.
- Arora, R., M.E. Wisniewski, and R. Scorza. 1992. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. I. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues. *Plant Physiol.* 99:1562-1568.
- Balamurugan, S., R. Manivasagaperumal, and G. Thiyagarajan. 2011. Epicuticular wax studies on *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Arch.* 11:93-96.
- Ball, V. 1998. Ball redbook. 16th ed. Ball Publ, Batavia, Ill.
- Blazich, F.A., P.H. Henry, and F.C. Wise. 1995. Seed germination of annual vinca responds to irradiation and temperature. *HortScience* 30:357-359.
- Blom, T. 1980. Rose research in Veinland, Canada. *Bull. Roses Inc.* June p.45-46.
- Boke, N.H. 1947. Development of the adult shoot apex and floral initiation in *Vinca rosea* L. *Amer. J. Bot.* 34:433-439.

- 
- Boke, N.H. 1948. Development of the perianth in *Vinca rosea* L. Amer. J. Bot. 35:413-423.
- Boke, N.H. 1949. Development of the stamens and carpels in *Vinca rosea* L. Amer. J. Bot. 36:535-547.
- Bold, H.C., C.J. Alexopoulos, and T. Delevoryas. 1987. Morphology of plants and fungi. 5th ed. Harper-Collins, NY.
- Brewbaker, J.L. and B.H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. 50:859-865.
- Cartolano, M., R. Castillo, N. Efremova, M. Kuckenberg, J. Zethol, T. Gerats, Z. Schwarz-Sommer, and M. Vandenbussche. 2007. A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. Nature Genet. 39:901-905.
- Chaudhary, S., V. Sharma., M. Prasad., S. Bhatia., B.N. Tripathi., G. Yadav., and S. Kumar. 2011. Characterization and genetic linkage mapping of the horticulturally important mutation *leafless inflorescence (lli)* in periwinkle *Catharanthus roseus*. Scientia Hort. 129:142-153.
- Chen, C.M. and D.M. Yeh. 2012. ‘Taoyuan No. 1 Rose Girl’: A double-flowered periwinkle, *Catharanthus roseus*. HortScience 47:1175-1176.
- Chen, C.M., T.Y. Wei, and D.M. Yeh. 2012. Morphology and inheritance of double floweredness in *Catharanthus roseus*. HortScience 47:1679-1681.
- Chen, H.H., Z.Y. Shen, and P.H. Li. 1982. Adaptability of crop plants to high temperature stress. Crop Sci. 22:719-725.
- Comba, L., S.A. Corbet, L. Hunt, and B. Warren. 1999. Flowers, nectar, and insect visits: Evaluating British plant species for pollinator-friendly gardens. Ann. Bot. 83:369-383.
- Curry, H.A. 2012. Naturalising the exotic and exoticising the naturalised : Horticulture, natural history and the rosy periwinkle. Environ. History 18:243-365.
- Davidson, C.G. and L.M. Lenz. 1990. Models of inheritance of flower colour and extra petals in *Potentilla fruticosa* L. Euphytica 45:237-246.

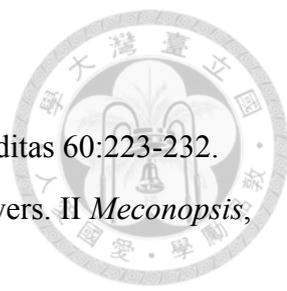
- 
- Davies, B., P. Motte, E. Keck, H. Saedler, H. Sommer, and Z. Schwarz-Sommer. 1999. *PLENA* and *FARINELLI*: Redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18:4023-4034.
- Dhawan, O.P., M.K. Dubey, and S.P.S. Khanuja. 2007. Detection of a true breeding homeotic gene mutant Pps-1 with partially petaloid sepals in opium poppy (*Papaver somniferum* L.) and its genetic behavior. *J. Hered.* 98:373-377.
- Dnyansagar, V. R. and I.V. Sudhakaran. 1970. Induce tetraploidy in *Vinca rosea* Linn. *Cytologia* 35:227-241.
- Dolezel, J., J. Bartos., H. Voglmayr, and J. Greihs. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51:127-128.
- Dwivedi, S., M. Singh, A.P. Singh, S. Sharma, G.C. Uniyal, S. Kumar. 2000. Assessment of genetic divergence for its purposeful exploitation in periwinkle *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *J. Genet. Breed.* 54:95-99.
- Ecker, R., A. Barzilay, and E. Osherenko. 1994. Linkage relationships of genes for leaf morphology and double flowering in *Matthiola incana*. *Euphytica* 74:133-136.
- Faust, J.E. and R.D. Heins. 1994. Quantifying the effect of supplemental lighting on plant temperatures in greenhouses. *HortScience* 29:442.
- Faust, J.E. and R.D. Heins. 1998. Modeling shoot-tip temperature in the greenhouse environment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:208-214.
- Faust, J.E., V. Holcombe., R.N.C. Rajapakse, and D.R. Layne. 2005. The effect of daily light integral on bedding plant growth and flowering. *HortScience* 40:645-649.
- Favali, M., R. Muestti, S. Benvenuti, A. Bianchi, and L. Pressacco. 2004. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: Alkaloid production and structural observations. *Protoplasma* 223:45-51.
- Gaint, S., N. Manda., S. Bhattacharyya, and P.K. Das. 2011. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106:485-493.
- Galimba, K.D., R.T. Theador, M.S. Alessandra, R.M., M. Rainer., T. Gunter and Di

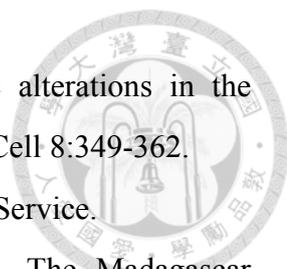
- 
- stilio, Veronica. 2012. Loss of deeply conserved C-class floral homeotic gene function and C- and E-class protein interaction in a double-flowered ranunculid mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 :2267-2275.
- Garrod, J. F. and G. P. Harris. 1974. Studies on glasshouse carnation: effects of temperature and growth substances on petal number. *Ann. Bot.* 38:1025-1033.
- Gupta, S., S. Pandey-Rai., S. Srivastava., S.C. Naithani., M. Prasad., and S. Kumar. 2007. Construction of genetic linkage map of the medicinal and ornamental plant *Catharanthus roseus*. *J. Genet.* 86:259-268.
- Hall, A.E. 1992. Breeding for heat tolerance. *Plant Breed. Rev.* 10:129-168.
- Heinze, W. 1976. Growth and flowering of *Catharanthus roseus*. *Gartenbauwissenschaften* 41:156-159.
- Heursel, J. and F. Garretsen. 1989. Inheritance of corolla size, number of stamens and percentage of plants with petaloid stamens in evergreen azaleas (*Rhododendron* subsect. *obtusum*). *Plant Breed.* 103:304-309.
- Hogan, S. 2003. *Flora: A gardener's encyclopedia*. Timber Press, Portland, OR.
- Holden, D.G. and R.D. Parker. 1985. Seed-germination in *Catharanthus pusillus* (Murr) G. Don and *Catharanthus tricophyllus* (Bak) Pich. *HortScience* 20:186-186.
- Honda, K., H. Watanabe, and K. Tsutsui. 2002. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30 °C. *Euphytica* 126:315-320.
- Hormaza, J.I. and M. Herrero. 1992. Pollen selection. *Theo. Appl. Genet.* 83:663-672.
- Hormaza, J.I. and M. Herrero. 1996. Male gametophytic selection as a plant breeding tool. *Scientia Hort.* 65:321-333.
- Howe, T.K. and W.E. Waters. 1994. Evaluation of *Catharanthus* (*vinca*) cultivars for the landscape. *Proc. Fla. State Hort. Sci.* 107:404-408.
- Huxtable, R.J. 1992. The pharmacology of extinction. *J. Ethnopharm.* 37:1-11.
- Kakani, V.G., P.V.V. Parasad., P.Q. Craufurd, and T.R. Wheeler. 2002. Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant Cell Environ.* 25:1651-1661.
- Kim, J. and M.W. van Iersel. 2011. Slowly developing drought stress increases

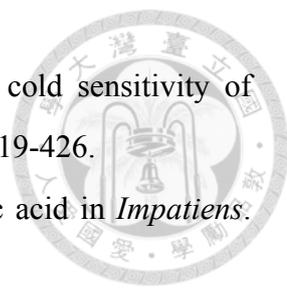
- 
- photosynthetic acclimation of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* 143:166-177.
- Kitajima, O. 2007. U. S. Patent PP17766: *Catharanthus* plant named 'Kitajima Angel Tutu'. United State Patent & Trademark Office.
- Knuth, P. 1909. Handbook of flower pollination. Vol.3. Clarendon Press, Oxford.
- Knuth, P., H. Müller, and J.R.A. Davies. 1906. Handbook of flower pollination. Vol. III. Clarendon Press, Oxford.
- Kotilainen, M., P. Elomaa, A. Uimari, V.A. Albert, D. Yu, and T.H. Teeri. 2000. *GRCDI*, an *AGL2*-like MADS box gene, participates in the C function during stamen development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell* 12:1893-1902.
- Kulkarni, R.N. 1999. Evidence for phenotypic assortative mating for flower colour in periwinkle. *Plant Breed.* 118:561-564.
- Kulkarni, R.N., and K. Baskaran. 2008. Inheritance of pollen-less anthers and thrum and pin flower in periwinkle. *J. Hered.* 99:426-431.
- Kulkarni, R.N. and K. Baskaran. 2013. From herkogamy to cleistogamy - Development of cleistogamy in periwinkle. *J. Hered.* 104:140-148.
- Kulkarni, R.N., K. Baskaran, R.S. Chandrashekar. 1999. Inheritance of morphological traits of periwinkle mutants with modified contents and yields of leaf and root alkaloids. *Plant Breed.* 118:71-74.
- Kulkarni, R.N., K. Baskaran, and Y. Sreevalli. 2005a. Genetics of novel corolla colours in periwinkle. *Euphytica* 144:101-107.
- Kulkarni, R.N., Y. Sreevalli, and K. Baskaran. 2005b. Allelic differences at two loci govern different mechanisms of intraflower self-pollination in self-pollinating strains of periwinkle. *J. Hered.* 96:71-77.
- Kulkarni, R.N., K. Baskaran, R.S. Chandrashekar, and S. Kumar. 1999. Inheritance of morphological traits of periwinkle mutants with modified contents and yields of leaf and root alkaloids. *Plant Breed.* 118:71-74.
- Kulkarni, R.N., Y. Sreevalli, K. Baskaran, and S. Kumar. 2001. The mechanism and inheritance of intraflower self-pollination in self-pollinating variant strain of periwinkle. *Plant Breed.* 120:247-250.

- 
- Lammerts, W.E. 1945. The breeding of ornamental edible peaches formild climates. I. Inheritance of tree and flower characters. Amer. J. Bot.32:53–60.
- Leus, L., K.V. Laere, A. Dewitte, and J.V. Huylbroeck. 2009. Flow cytometry for plant breeding. Acta Hort. 836:221-226.
- Levêque, D., J. Wihlm, and F. Jehl. 1996. Pharmacology of *Catharanthus* alkaloids. Bull. Cancer 83:176-186.
- Levy, A. 1981. *Catharanthus roseus*, p. 166-168. In: Halevy, A.H. (ed.). CRC handbook of flowering Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Levy, A., D. Palevitch, and D. Lavie. 1981. Genetic improvement of *Papaver bracteatum*: Heritability and selection response of thebaine and seed yields. Planta Med. 43:71-76
- Liu, Z.C. and C. Mara. 2010. Regulatory mechanisms for floral homeotic gene expression. Seminars Cell Dev. Biol. 21:80-86.
- Loupassaki, M., M. Vasilakakis, and I. Androulakis. 1997. Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the in vitro germination of avocado pollen grains. Euphytica 94:247-251.
- Mascarenhas, J.P. 1990. Gene activity during pollen development. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41:317-338.
- McSteen, P.C.M., C.A. Vincent, S. Doyle, R. Carpenter, and E.S. Coen. 1998. Control of floral homeotic gene expression and organ morphogenesis in *Antirrhinum*. Development 125:2359-2369.
- Merritt, R.H. and K.C. Ting. 1995. Morphological responses of bedding plants to three greenhouse temperature regimes. Scientia Hort. 60:313-324.
- Milo, J., A. Levy, N. Akavia, A. Ashri, and D. Palevitch. 1985. Inheritance of corolla color and anthocyanin pigments in periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) Z. Pflanzen. 95:352-360.
- Miyajima, D. 2004. Pollination and seed set in vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don). J. Hort. Sci. Biotechnol. 79:771-775.
- Morris, P. 1986. Regulation of product synthesis in cell culture of *Catharanthus roseus*.

- 
- Effect of culture temperature. *Plant Cell Rpt.* 5:427-429.
- National Garden Bureau Inc. 2002. 2002: Year of the Vinca. 8th May 2013.
<http://www.ngb.org/year_of/index.cfm?YOID=7>.
- Niu, G., D.S Rodriguez., and Y.T. Wang. 2006. Impact of drought and temperature on growth and leaf gas exchange of six bedding plant species under greenhouse conditions. *HortScience* 41:1408-1411.
- Ochatt, S.J. 2008. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry Part A* 73:581-598.
- Parker, R.D. 1980. Interspecific hybridization in *Catharanthus*. *HortScience* 15:420.
- Parker, R.D. 1981. Hybrid progenies from interspecific crosses in *Catharanthus*. *HortScience* 16:454.
- Parker, R.D. and J.D. Vitti. 1985. Heritable characters in the genus *Catharanthus* (L.) Pich. *HortScience* 20:186.
- Pietsch, G.M. and W.H. Carlson. 1993. Effects of day and night temperature and light level on *Catharanthus roseus*. *HortScience* 28:502.
- Pietsch, G.M., W.H. Carlson, R.D. Heins, and J.E. Faust. 1995. The effect of day and night temperature and irradiance on development of *Catharanthus roseus* (L.) 'Grape Cooler'. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:877-881.
- Pinchbeck, M. and R.J. McAvoy. 1993. Growth and development of *Catharanthus roseus* under various environmental conditions. *HortScience* 28:520.
- Quinn, D.M., B.K. Behe, J.L. Witt, and R.S. Roark. 1996. Heat tolerance of selection annual cultivars in zone 8. *HortScience* 31:755.
- Raman, K. and R.I. Greyson. 1978. Further observation on the differential sensitivities to plant growth regulators by cultured single and double flower bud of *Nigella damascena* L. *Amer. J. Bot.* 65:180-191.
- Reynolds, J. and J. Tampion. 1983 *Double flowers: A scientific study*. Scientific and Academic Editions, New York.
- Roy, A.M., N. Banerjee., and S. Mandal. 2007. Variations in leaf epidermal micromorphology in mutants of *Catharanthus roseus*. *J. Appl. Biosci.* 33:49-52.
- Royal Horticultural Society. 2007. The Royal Horticultural Society's colour chart. 5th

- 
- ed. Royal Hort. Soc., London, UK.
- Rousi, A. 1968. Cytoplasmic inheritance in *Aquilegia vulgaris*. *Hereditas* 60:223-232.
- Saunders, E.R. 1917. Studies in the inheritance of doubleness in flowers. II *Meconopsis*, *Althaea* and *Dianthus*. *J. Genet.* 6:165-184.
- Scovel, G., H. Ben-Meir., M. Ovadis., H. Itzhaki, and A. Vainstein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor Appl Genet* 96: 117-122.
- Scovel, G., T. Altshuler, Z. Liu, and A. Vainstein. 2000. The *Evergreen* gene is essential for flower initiation in carnation. *J. Hered.* 91:487-491.
- Serrato, C.M.A. 1990. Contribution to the study of marigold (*Tagetes sp.*) flower traits. *Revista Chapingo* 15:151-155.
- Sink, Jr., K.C. 1973. The inheritance of apetalous flower type in *Petunia hybrida* Vilm. and linkage tests with the genes for flower doubleness and grandiflora characters and its use in hybrid seed production. *Euphytica* 22:520-526.
- Souza, D.J. and R.D. Parker. 1979. Chromosome investigations in the genus *Catharanthus*. *HortScience* 14:454.
- Sreevalli, Y., K. Baskaran, R.N. Kulkarni, and S. Kumar. 2000. Further evidence for the absence of automatic and intra-flower self-pollination in periwinkle. *Curr. Sci.* 79:1648-1649.
- Stead, A.D. and K.G. Moore. 1979. Studies on flower longevity in *Digitalis*. *Planta* 146: 409-414.
- Stern, R.A. 1998. Pollen viability in lychee. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:41-46.
- Su, Y.T., J.C. Chen, and C.P. Lin. 2011. Phytoplasma-induced floral abnormalities in *Catharanthus roseus* are associated with phytoplasma accumulation and transcript repression of floral organ identity genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:1502-1512.
- Tooke, F. and N.H. Battey. 2000. A leaf-derived signal is a quantitative determinant of floral form in *Impatiens*. *Plant Cell* 12:1837-1847.
- Überlacker, B., B. Klinge, and W. Werr. 1996. Ectopic expression of the maize

- 
- homeobox genes *ZmHox1a* or *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* 8:349-362.
- USDA. 2010. Census of agriculture. National Agricultural Statistics Service.
- van Bergen, M. and W. Snoeijer. 1996. *Catharanthus* G. Don. The Madagascar periwinkle and related species. Wageningen Agr. Univ. Papers 96:1-120.
- van Iersel, M. W. 1999. Auxin applications affect posttransplant CO₂ exchange rate and growth of bare-rooted vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] seedlings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124:234-238.
- van Iersel, M.W. 2000. Growth respiration, maintenance respiration, and carbon fixation of vinca: A time series analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125:702-706.
- van Iersel, M.W. 2003. Short-term temperature change affects the carbon exchange characteristics and growth of four bedding plant species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:100-106.
- van Iersel, M.W., R.B. Beverly, P.A. Thomas, J.G. Latimer, and H.A. Mills. 1999. Nitrogen, phosphorus, and potassium effects on pre- and post-transplant growth of salvia and vinca seedlings. *J. Plant Nutr.* 22:1403-1413.
- van Steenis, C.G.G.J. 1934. Verspreiding der zaden van *Lochnera rosea* (L.) Rchb. door mieren. *De Tropische Natuur* 34:1-31.
- Vitti, J.D. and R.D. Parker. 1985. Inheritance of floral patterning in *Catharanthus* G. Don. *HortScience* 20:186.
- Walker, D.B. 1975. Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynoecial ontogeny. *Amer. J. Bot.* 62:457-467.
- Wang, C.H., D.M. Yeh, and C.S. Sheu. 2008. Heat tolerance and flowering-heat-delay sensitivity in relation to cell membrane thermostability in chrysanthemum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133:754-759.
- Wang, Y.Q., R. Melzer, and G. Theissen. 2011. A double-flowered variety of lesser periwinkle (*Vinca minor fl. pl.*) that has persisted in the wild for more than 160 years. *Ann. Bot.* 107:1445-1452.

- 
- Weinbaum, S.A., D.E. Parfitt, and V.S. Polite. 1984. Differential cold sensitivity of pollen grain germination in two *Prunus* species. *Euphytica* 33:419-426.
- Weijer, J. 1959. The interaction of gibberellic acid and indoleacetic acid in *Impatiens*. *Science* 129:896-897.
- Xing, S.H., X.B. Guo, Q. Wang, Q.F. Pan, Y.S. Tian, P. Liu, J.Y. Zhao, G.F. Wang, X.F. Sun, and K.X. Tang. 2011. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:793198. (online only)
- Yeh, D.M. and H.F. Lin. 2003. Thermostability of cell membranes as a measure of heat tolerance and relationship to flowering delay in chrysanthemum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:656-660.
- Yeh, D.M. and P.Y. Hsu. 2004. Heat tolerance in English ivy as measure by an electrolyte leakage technique. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79:298-302.
- Zainol, R. and D.P. Stimart. 2001. A monogenic recessive gene, *fw*, conditions flower doubling in *Nicotiana alata*. *HortScience* 36:128-130.
- Zainol, R., D.P. Stimart, and R.F. Evert. 1998. Anatomical analysis of double flower morphogenesis in a *Nicotiana alata* mutant. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:967-972.
- Zhou, M.L., J.R. Shao, and Y.X. Tang. 2009. Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). *Biotech. Appl. Biochem.* 52:313-323.