

羥脯胺酸選拔耐逆境鳳梨之研究

吳馨宇¹⁾ 陳京城²⁾

關鍵字：甲基磺酸乙酯、誘變育種、低溫逆境

摘要：本研究以'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨為材料，以 EMS 誘變條件與羥脯胺酸篩選之試驗結果顯示，'台農 17 號'鳳梨組培瓶苗以 0.4% EMS 24 小時為誘變條件，處理後 35 天存活率為 62.5%，而羥脯胺酸 18 mM 培養 28 天之存活率為 47.5%。'台農 20 號'鳳梨組培瓶苗以 0.4% EMS 24 小時為誘變條件，於處理後 35 天也有 62.5% 的存活率，羥脯胺酸 18 mM 培養 28 天存活率則只有 27.5%。因此，'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨對 EMS 之耐性相近，但'台農 20 號'對羥脯胺酸之耐性則低於'台農 17 號'鳳梨。'台農 17 號'鳳梨 EMS 誘變品系 TN17M1-36-2 及'台農 20 號'EMS 誘變品系 TN20M1-4 與 TN20M1-6 之第二子代 (P2)，均較未誘變系顯著含有較高脯胺酸含量，而在經由低溫 (5°C，14 天) 處理後，前述誘變系脯胺酸含量顯著上升，且也有較高之存活率，結果顯示，EMS 誘變可產生較耐逆境之後代，且羥脯胺酸可用於鳳梨誘變植株耐逆境後代之篩選。

前 言

台灣鳳梨栽培過程中，容易於冬末春初的開花階段遭受低溫影響，造成開花時間不一致，或者植株受寒害影響，造成花序不全、果形不整、植株葉片受損等損害。或在夏季，果實成熟期因日曬強度過強，而導致日燒，增加耗損。夏季瞬間雨量之增加，除了增加病蟲害發生機會外，瞬間豪大雨造成田間排水不及，容易發生淹水逆境，使植株無法正常生長。果實採收後，大部分鳳梨品種於低溫貯藏期間，容易發生黑心病，造成產銷鏈產品的損耗。而'台農 17 號'和'台農 20 號'於田間栽培中，低溫影響所造成的影響，為植株呈現葉片尖端焦枯、果實裂果等現象。兩品種對低溫之反應以'台農 17 號'植株受到影響較少，'

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

台農 20 號'植株寒害情形較為嚴重。

EMS (ethyl methanesulfonate, 甲基磺酸乙酯)為具高度隨機性與點誘變特性之烷類誘變劑,相較於物理性誘變方法而言,在操作門檻與藥劑取得上相對簡單,因而廣泛運用於作物育種。不論是對環境與非環境性逆境、植株型態改變等育種目標,皆可利用 EMS 誘變技術來獲得變異後代(李, 1972; Kodym and Afza, 2003; Leitao, 2012)。羥脯胺酸(hydroxyproline, Hyp)為作物育種上主要應用於初步篩選之藥劑,經由羥脯胺酸處理得到具有多項逆境抗性之候選品系及取得累積大量脯胺酸(proline, Pro)的植株。在園藝作物育種上之應用,目前以蔬菜為主,如:具耐寒及抗凍性花椰菜選拔、耐鹽性的番茄品系選育等(Swaaij *et al.*, 1986; Deane *et al.*, 1995; Fuller *et al.*, 2006)。

本研究利用羥脯胺酸 (*trans*-4-hydroxy-L-proline, Hyp)作為耐逆境鳳梨品系篩選藥劑,對經過 EMS 誘變處理之'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組培小苗進行篩選,並測試不同誘變系之脯胺酸含量與低溫逆境耐受性,以做為未來鳳梨耐逆境育種之參考。

材料與方法

試驗一、EMS 誘變'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組織培養小苗之適當條件

一、試驗材料:

取'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨冠芽,由基部依序剝去葉片取得短縮莖,以 1%次氯酸鈉 (sodium hypochlorite)添加 0.1% (v/v)Tween 20 經超音波震盪器震盪滅菌 15 分鐘,後進入無菌操作台以無菌水進行清洗 3 次,切下短縮莖上休眠芽,置入生長培養基:1/2 MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar, pH 5.8, 培養 3~4 週。當小苗長至 1 cm 時,繼代至增殖培養基:1/2 MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar、0.2 ppm NAA、2 ppm BA, pH 5.8。培養 8 週後分孽植株截切後,繼代至生長培養基成長至株高 0.8 cm、葉片數目約 10 片之小苗進行試驗。

二、試驗方法:

將小苗去除根部後,'台農 17 號'鳳梨使用濃度 0.4% (v/v) EMS 溶液,分別處理 12、18、24、30、36 小時,對照組 (CK)植株以無菌水處理 12 小時,空白組 (BK)植株不進行任何處理;'台農 20 號'鳳梨以濃度 0.2%、0.4%、0.6% (v/v) EMS 溶液,分別處理 3、6、12、24 小時,對照組 (CK)植株以無菌水處理 3 小時,空白組(BK)植株不進行任何處理。處理過程以溫度 27°C、100 rpm 轉速進行震盪培養,處理完成後於無菌操作台以無菌水清洗 3 次,植入生長培養基:1/2 MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar, pH 5.8。完成操作後每 7 天對植株進行調查,並計算每週存活植株個數。白化、植株心部褐化並超過 1/2 植株面積,視為植株已死亡。連續調查 35 天後,取得存活條件。每 10 株為一重複,進行 4 重複試驗。

試驗二、羥脯胺酸篩選'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組培小苗之適當條件

一、試驗材料：

初代及繼代培養方法同試驗一，當小苗生長至株高 1.5-2 cm 時進行試驗。

二、試驗方法：

將植株切去根部後移入生長培養基，培養基分別添加 6、9、12、15、18 mM Hyp (*trans*-4-hydroxy-L-proline, Sigma)，每 10 株為一重複，每一處理進行 4 重複。然後每週進行觀察並調查各植株生長狀態。白化、植株心部褐化並超過 1/2 植株面積，皆視為植株已死亡。

試驗三、低溫處理'台農 17 號'及'台農 20 號'鳳梨經 EMS 誘變及羥脯胺酸篩選後之組培小苗

一、試驗材料：

初代及繼代培養方法同試驗一，當小苗生長至株高約 0.8 cm 時進行試驗。

二、EMS 誘變處理：

'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組培小苗切除根部後，皆以 0.4% (v/v) EMS 溶液於溫度 27°C、100 rpm 轉速進行震盪培養，分別處理 30 小時及 24 小時，之後進入無菌操作台以無菌水清理 3 次，每 10 株為一重複，每處理 4 重複，對照組 (CK) 以無菌水處理，空白組 (BK) 則完全不處理。

三、後代篩選程序：

誘變後植株，於生長培養基培養 4 週，之後將存活者依次編號，各植株視為獨立系，種植至增殖培養基進行第一次增殖，此為誘變品系增殖第一次子代 (P1)。增殖培養 8 週後，各品系挑選株高 0.8 cm、葉片數目小於 10 片之植株，切除根系與膨大基部組織，繼代至含有濃度 18 mM Hyp 的培養基，'台農 17 號'與'台農 20 號'誘變品系分別培養 4 週與 3 週，取得存活植株為各誘變品系第一子代選拔系。經 Hyp 篩選後存活植株，切除根系與褐化部分後，於生長培養基培養 1 週後，繼代至增殖培養基，經過 2~3 個月後獲得各誘變品系增殖第二子代 (P2)。

四、低溫處理：

誘變品系增殖第二子代(P2)植株定植於生長培養基後，各品系皆分為低溫處理組與對照組。低溫處理組放置於溫度 5°C、光照週期 16/8 小時 (日/夜) 之生長箱進行 2 週培養，處理後移回至室溫 (26°C) 培養 13 天後進行存活率調查，並於第 21 天取樣進行脯胺酸含量測定。

五、脯胺酸含量測定：

脯胺酸含量測定參照 Abrahám 等 (2010) 之方法，各品系取全株 0.1 g 樣品以液態氮冷凍後，儲存於 -40 °C 下備用。隔日加液態氮低溫研磨使樣品均質，並加入 1 ml 3% 磺基水楊酸溶液 (sulfosalicylic acid, Sigma)，以離心力 17000 ×g 離心 5 分鐘後取上清液 0.1 ml 加入 0.5 ml 的混合反應劑 (reaction mixture)：0.2 ml 冰醋酸 (glacial acetic acid, Sigma)、0.1

ml 3% 磺基水楊溶液、0.2 ml 茚三酮酸性溶液 (acidic ninhydrin)，放置於 96°C 水浴中加熱 60 分鐘。反應完成後置於冰上，以 1 ml 甲苯 (toluene, Sigma) 混合搖晃 20 秒後，靜置 5 分鐘以上使有機層與水層分離，後取有機層以分光光度計量測吸收值 (ABS)。其中茚三酮酸性溶液以 20 ml 6M 磷酸 (phosphoric acid solution, Sigma)、30 ml 冰醋酸、1.25 g 茚三酮 (ninhydrin, Sigma) 之比例加熱溶解完全後，儲藏於 4°C 使溶液顏色安定。脯胺酸濃度與吸收值計算公式：測得脯胺酸濃度 (ppm) = (測得吸收值 - 0.024) / 0.0115。樣品脯胺酸含量：樣品脯胺酸含量 (μmole / g FW) = (測得脯胺酸濃度 × 1 ml × 36) / (115.13 × 樣品重量)。

結 果

試驗一、EMS 誘變'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組織培養小苗之適當條件

以 EMS 誘變處理'台農 17 號'鳳梨組培小苗結果如表 1 所示。EMS 0.4% 12hr、EMS 0.4% 18hr 及 EMS 0.4% 24hr，在處理後 35 天存活率分別為 87.5%、75.0% 及 62.5%，而 EMS 0.4% 30hr 與 EMS 0.4% 36hr，於處理後第 7 天則只有 32.5% 與 27.5% 的存活率。顯示隨著處理時間增加，植株存活率顯著下降。

表 1. EMS 處理對'台農 17 號'鳳梨組培苗存活率之影響。

Table 1. Effect of EMS treatment on survival of 'Tainung No. 17' pineapple plantlets cultured *in vitro*^z.

| EMS Conc. (%) | Duration of treatment (hr) | Survival (%) | | |
|----------------------|----------------------------|------------------------|---------------|---------------|
| | | Day 7 | Day 21 | Day 35 |
| 0 (H ₂ O) | 12 | 100 ± 0 a ^y | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| 0.4 | 12 | 97.5 ± 4.3 a | 87.5 ± 10.9 b | 87.5 ± 10.9 b |
| 0.4 | 18 | 87.5 ± 4.3 b | 80.0 ± 12.2 b | 75.0 ± 11.2 b |
| 0.4 | 24 | 77.5 ± 14.8 b | 70.0 ± 14.1 b | 62.5 ± 10.9 b |
| 0.4 | 30 | 32.5 ± 14.8 c | 27.5 ± 16.4 c | 27.5 ± 16.4 c |
| 0.4 | 36 | 27.5 ± 14.8 c | 22.5 ± 14.8 c | 20.0 ± 14.1 c |

^z The percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants incubated) × 100 %. Ten plantlets per replicate, 4 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation (n = 4). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

以不同濃度與不同時間處理'台農 20 號'鳳梨組織培養小苗，以確定較適合之 EMS 濃度與處理時間，結果如表 2 所示。處理後 7 天，0.4% EMS 24hr 之存活率為 65.0%，0.6% EMS 24hr 之存活率為 2.5%。在處理後第 35 天時，0.4% EMS 24hr 之存活率為 62.5%，而 0.6% 24hr 之存活率則為 0%。EMS 0.4% 及 0.6% 之處理，均隨處理時間之增加，存活率隨之下降。而較適當之處理條件為 EMS 0.4% 24hr，其存活率 62.5% 較接近 LD₅₀ (半致死率)。

表 2. EMS 處理對'台農 20 號'鳳梨組培苗存活率之影響。

Table 2. Effect of EMS treatments on survival of 'Tainung No. 20' pineapple plantlets cultured *in vitro*^z.

| EMS Conc. (%) | Duration of treatment (hr) | Survival (%) | | |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|---------------|---------------|
| | | Day 7 | Day 21 | Day 35 |
| 0% (H ₂ O) | 3 | 100 ± 0 a ^y | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| 0.2% | 3 | 100 ± 0 a | 97.5 ± 4.3 a | 97.5 ± 4.3 a |
| 0.2% | 6 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| 0.2% | 12 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 95.0 ± 5.0 a |
| 0.2% | 24 | 92.5 ± 8.3 a | 90.0 ± 10.0 a | 90.0 ± 10.0 a |
| 0.4% | 3 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| 0.4% | 6 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 87.5 ± 16.4 b |
| 0.4% | 12 | 100 ± 0 a | 92.7 ± 4.2 a | 80.7 ± 6.1 b |
| 0.4% | 24 | 65.0 ± 5.0 b | 65.0 ± 11.2 b | 62.5 ± 14.8 b |
| 0.6% | 3 | 100 ± 0 a | 97.5 ± 4.3 a | 92.5 ± 4.3 a |
| 0.6% | 6 | 100 ± 0 a | 97.5 ± 4.3 a | 90.0 ± 7.1 a |
| 0.6% | 12 | 100 ± 0 a | 97.5 ± 4.3 a | 77.5 ± 8.3 b |
| 0.6% | 24 | 2.5 ± 4.3 c | 2.5 ± 4.3 c | 0 ± 0 c |

^z The percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants incubated) × 100 %. Ten plantlets per replicate, 4 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation (n = 4). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

試驗二、羥脯胺酸篩選'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組培小苗之適當條件

利用不同濃度羥脯胺酸進行'台農 17 號'組織培養小苗之篩選結果如表 3 所示。組培苗經植入 6、9、12、15、18 mM Hyp 培養基後連續 5 週觀察其生長情形。培養至第 7 天時，除了 18 mM Hyp 的存活率為 95.0% 之外，其餘處理組存活率皆為 100%；第 14 天時，

12、15、18 mM Hyp 的存活率分別是 93.0%、80.0%、75.0%，其餘處理組存活率均為 100%；至第 21 天，12、15、18 mM Hyp 的存活率分別是 90.0%、70.0%、65.0%，其餘處理組存活率仍為 100%；進入第 28 天時，所有處理組存活率皆下降，6、9 mM Hyp 兩處理組存活率皆下降至 97.5%，而 12、15、18 mM Hyp 的存活率分別下降至 87.5%、62.5%、47.5%；而培養至第 35 天，除了 6 mM Hyp 仍維持與第 28 天時相同的存活率外，9、12、15、18 mM Hyp 數值皆有小幅下降，分別為 90.0%、77.5%、47.5%、22.5%。而在植株狀態上，'台農 17 號'組培小苗於 21 天至 28 天培養過程中，部分存活植株於葉腋形成分蘗植株。

利用不同濃度羥脯胺酸進行'台農 20 號'組織培養小苗篩選，結果如表 4 所示。連續 5 週調查存活率，第 7 天時，所有處理組存活率皆為 100%；第 14 天，除了 18 mM Hyp 處理組存活率為 80.0%之外，其餘處理組仍維持存活率為 100%；至第 21 天時，12、15、18 mM Hyp 的存活率分別是 92.5%、80.0%、57.5%，其餘處理組存活率仍為 100%；至第 28 天觀察時，除了 6 mM Hyp 處理組外，其餘處理組存活率皆下降，9、12、15、18 mM Hyp 的存活率分別下降至 92.5%、82.5%、50.0%、27.5%；而至第 35 天，所有處理組存活率皆明顯下降，6 mM Hyp 由存活率 100%下降至 75.0%，9、12、15、18 mM Hyp 則分別下降至 62.5%、50.0%、20.0%、15.0%。處理濃度越高，存活率下降速度越快。

表 3. 不同濃度羥脯胺酸對'台農 17 號'鳳梨組培苗存活率之影響。

Table 3. Effect of different Hydroxyproline concentrations on survival of 'Tainung No. 17' pineapple plantlets cultured *in vitro*^z.

| Hyp conc. (mM) | Survival(%) | | | | |
|-------------------|------------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | 7 Days | 14 Days | 21 Days | 28 Days | 35 Days |
| 0 (CK) | 100 ± 0 a ^y | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| 6 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 97.5 ± 5.0 a | 97.5 ± 5.0 a |
| 9 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 97.5 ± 5.0 a | 90.0 ± 11.5 a |
| 12 | 100 ± 0 a | 92.5 ± 9.6 a | 90.0 ± 11.5 a | 87.5 ± 9.6 b | 77.5 ± 12.6 b |
| 15 | 100 ± 0 a | 80.0 ± 14.1 b | 70.0 ± 8.2 b | 62.5 ± 9.6 b | 47.5 ± 26.3 b |
| 18 | 95.0 ± 10.0 a | 75.0 ± 12.9 c | 65.0 ± 17.3 c | 47.5 ± 9.6 c | 22.5 ± 12.6 c |

^z The percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants cultured) × 100 %. Ten plantlets per replicate, 4 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation (n = 4). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 4. 不同濃度羥脯胺酸對'台農 20 號'鳳梨組培苗存活率之影響。

Table 4. Effect of different Hydroxyproline concentrations on survival of 'Tainung No. 20' pineapple plantlets cultured *in vitro*^z.

| Hyp conc. (mM) | Survival (%) | | | | |
|-------------------|------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | 7 Days | 14 Days | 21 Days | 28 Days | 35 Days |
| 0 (CK) | 100 ± 0 a ^y | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| 6 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 75.0 ± 0.0 b |
| 9 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 92.5 ± 8.3 a | 62.5 ± 10.0 c |
| 12 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 92.5 ± 8.3 a | 82.5 ± 10.9 b | 50.0 ± 4.3 c |
| 15 | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a | 80.0 ± 21.2 b | 50.0 ± 14.1 c | 20.0 ± 4.3 d |
| 18 | 100 ± 0 a | 80.0 ± 7.1 b | 57.5 ± 4.3 c | 27.5 ± 8.3 d | 15.0 ± 8.3 d |

^z The percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants cultured) × 100 %. Ten plantlets per replicate, 4 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation (n = 4). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

試驗三、低溫處理'台農 17 號'及'台農 20 號'鳳梨經 EMS 誘變及羥脯胺酸篩選後之組培小苗

'台農 17 號'鳳梨組培苗誘變後第一增殖子代 (P1)，經過 18mM 羥脯胺酸篩選，存活培植體增殖為第二增殖子代 (P2)，以此為材料進行 5°C 2 週低溫培養後，使植株回溫 14 天並調查其存活率結果如表 5 所示。在存活率部分以 TN17M1-36-2 P2 系之 90% 最高，且處理前後植株脯胺酸含量也最高 (表 6)。各品系在低溫處理後之脯胺酸含量均有增加之趨勢，且各誘變系 P2 植株在低溫處理前後之脯胺酸含量均高於未誘變之對照組。

'台農 20 號'鳳梨組培苗進行 5 °C 2 週低溫培養後，使植株回溫 14 天並調查其存活率結果如表 7 所示。TN20M1-6 P2 在低溫處理後有最高存活率 100%。各誘變系相較於無誘變處理之 TN20 系，皆呈現較高存活率。而低溫處理前後之脯胺酸含量如表 8 所示，未經處理前各誘變系除 TN20M1-5 P2 外，脯胺酸含量相較於未誘變之 TN20 均顯著較高。而在低溫處理後，TN20M1-4 P2 與 TN20M1-6 P2 在脯胺酸含量上，顯著高於未經低溫處理之植株。

表 5. 低溫處理對'台農 17 號'鳳梨組培苗存活率之影響。

Table 5. Effect of cold treatment on survival of 'Tainung No. 17' pineapple plantlets cultured *in vitro*.

| Lines | Survival (%) ^z |
|--------------------------|---------------------------|
| TN17 | 60 |
| TN17M1-3 P2 ^y | 80 |
| TN17M1-36-2 P2 | 90 |
| TN17M1-36-4 P2 | 50 |

^z The percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants treated) × 100 %. The plantlets were treated at 5°C for 2 weeks.

^y P₁: the first proliferated generation after EMS treatment. P₂: the second proliferated generation after EMS treatment and 18 mM Hyp selection.

表 6. 低溫處理對'台農 17 號'鳳梨組培苗脯胺酸含量之影響。

Table 6. Effect of cold treatment on proline concentration of 'Tainung No. 17' pineapple plantlets cultured *in vitro*.

| Lines | Proline conc. (μmole / g FW) | |
|---------------|-------------------------------|---------------------|
| | Before treatment | After treatment |
| TN17 | 2.187 ± 0.191 dB ^z | 31.697 ± 5.969 cA |
| TN17M1-3P2 | 5.529 ± 2.925 cA | 33.051 ± 20.336 cA |
| TN17M1-36-2P2 | 10.770 ± 1.967 aB | 104.466 ± 23.741 aA |
| TN17M1-36-4P2 | 7.429 ± 1.928 bB | 53.414 ± 16.447 bA |

^z Mean ± standard deviation (n = 3). Means within the same column or row followed by the same small or capital letter are not significantly different at 5% level by LSD test and t-test, respectively. The plantlet were treated at 5°C for 2 weeks.

表 7. 低溫處理對'台農 20 號'鳳梨組培苗之存活率。

Table 7. Effect of cold treatment on survival percentage of 'Tainung No. 20' pineapple plantlets cultured *in vitro*.

| Lines | Survival (%) ^z |
|--------------------------|---------------------------|
| TN20 | 0.0 |
| TN20M1-1 P2 ^y | 28.6 |
| TN20M1-4 P2 | 60.0 |
| TN20M1-5 P2 | 25.0 |
| TN20M1-6 P2 | 100 |

^z The percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants treated) × 100 %. The plantlets were treated at 5°C for 2 weeks.

^y P₁: the first proliferated generation after EMS treatment. P₂: the second proliferated generation after EMS treatment and 18 mM Hyp selection.

表 8. 低溫處理對'台農 20 號'鳳梨組培苗脯胺酸含量之影響。

Table 8. Effect of cold treatment on proline concentration of 'Tainung No. 20' pineapple plantlets cultured *in vitro*.

| Lines | Proline conc. (μmole / g FW) | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------|
| | Before treatment | After treatment |
| TN20 | 3.470 ± 0.108 c ^y | ND |
| TN20M1-1P2 ^z | 10.416 ± 2.611 a | ND |
| TN20M1-4P2 | 11.340 ± 8.622 aB | 27.248 ± 6.237 bA |
| TN20M1-5P2 | 4.475 ± 1.672 c | ND |
| TN20M1-6P2 | 7.101 ± 2.985 bB | 34.100 ± 3.739 aA |

^z P₁: the first proliferated generation after EMS treatment. P₂: the second proliferated generation after EMS treatment and 18 mM Hyp selection.

^y Mean ± standard deviation (n = 3). Means within the same column or row followed by the same small or capital letter are not significantly different at 5% level by LSD test and t-test, respectively. The plantlets were treated at 5°C for 2 weeks. ND: not determined.

討 論

本研究以'台農 17 號'與'台農 20 號'鳳梨組培小苗，進行 EMS 誘變濃度試驗。'台農 17 號'鳳梨組培小苗以 0.4% EMS 誘變之結果 (表 1)顯示，在第 35 天時，處理組 0.4% EMS 24 小時有 62.5% 的存活率，而在其餘處理時間上，0.4% EMS 30 小時者，於第 7 天即只有 32.5% 的存活率，而在 35 天時只剩 27.5%。於調查過程發現部分小苗心部有回綠現象或自行分蘗，與前人 (陳，2012)討論中所提到的現象相似，因此推論此為鳳梨本身修復機能之呈現，因此部分葉片受傷與白化無法完全判定植株確實死亡，此現象在羥脯胺酸篩選試驗中亦有發生。'台農 20 號'鳳梨組織培養苗，以相同於'台農 17 號'鳳梨組培苗的大小，進行不同濃度與不同時間的 EMS 誘變試驗。於 0.2% EMS 處理 3、6、12、24 小時，皆與未處理組存活率上並無顯著差異。而 0.6% EMS 24 小時處理者於第 7 天只有 2.5% 的存活率 (表 2)。與'台農 17 號'比較，0.4% EMS 24 小時之處理組於第 35 天時之存活率也是 62.5%，顯示兩者對 EMS 之耐性相近。

由羥脯胺酸處理之結果 (表 3、表 4)發現，'台農 17 號'鳳梨組培苗在培養 35 天後之存活率較'台農 20 號'高，顯示'台農 17 號'對羥脯胺酸有較高之耐受性，且經低溫處理後，'台農 17 號'之存活率為 60% (表 5)，但'台農 20 號'之存活率為 0% (表 6)，因此，羥脯胺酸之耐受性可能與耐低溫逆境之間有相關性。

由'台農 17 號'與'台農 20 號'誘變品系與未誘變營養系進行比較可發現，經由 5°C 低溫處理前後脯胺酸含量，可發現各誘變品系於逆境處理前，脯胺酸含量皆顯著高於未誘變者 (表 6、表 8)。而低溫處理後有較高存活率的 TN17M1-36-2 P2、TN20M1-4P2 與 TN20M1-6 P2 品系，本身即與對照組在脯胺酸含量有顯著差異，此部分與 Deane 等 (1995)對花椰菜進行誘變後，對照誘變系與非誘變系脯胺酸含量有相似的結果。Fuller 等 (2006)認為 Hyp 可作為一個篩選機制，但其逆境型態與效果相對於直接處理逆境而言，相對來說強度較弱，但脯胺酸累積量的增加確實有助於增加植物體對逆境耐抗性的能力。

本研究結果證明，以 EMS 誘變鳳梨組培苗可產生較耐逆境之後代，而羥脯胺酸對鳳梨組培苗誘變植株進行增殖子代篩選，能選拔出對低溫逆境較具有耐抗性之品系。

參 考 文 獻

- 李文權。1972。烷類誘變劑的作用及其誘變效果。科學農業 20: 229-242。
- 陳家慧。2012。'台農 17 號'鳳梨甲基磺酸乙酯誘變育種之研究。國立中興大學園藝學系碩士論文。pp. 14-20。
- Abrahám, E., C. Hourton-Cabassa, L. Erdei, and L. Szabados. 2010. Methods for determination of proline in plants. *Methods Mol Biol.* 639: 317-31
- Deane., C. R., M. P. Fuller, and P. J. Dix. 1995. Selection of hydroxyproline - resistant

- proline-accumulating mutants of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*).
Euphytica 85: 329-334.
- Fuller, M. P., E. M. R. Metwali, A. M. H. Eed, and A. J. Jellings. 2006. Evaluation of abiotic stress resistance in mutated populations of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*).
Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 86: 239-248.
- Kodym, A. and R. Afza. 2003. Physical and chemical mutagenesis. Method Mol. Biol. 236: 189-204.
- Leitao, J. M. 2011. Chemical mutagenesis. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. pp. 135-158.
- Swaaij, A. C., E. Jacobsen, J. A. K. W. Kiel, and W. J. Feenstra. 1986. Selection, characterization and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: Tolerance to NaCl and freezing stress. Physiol. Plant. 68:359-366.

Studies on Hydroxyproline Selection for Stress Tolerant Pineapples

Hsin-Yu Wu ¹⁾ Ching-Cheng Chen ²⁾

Key Words: EMS, mutation breeding, cold stress

Summary

Using 'Tainung No. 17' and 'Tainung No. 20' pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) as plant material, the optimal treatment conditions for EMS mutagenesis and hydroxyproline selection were tested. In addition, cold tolerance and proline contents of EMS induced mutants were also examined.

The results of EMS mutagenesis treatment and hydroxyproline selection condition for 'Tainung No. 17' tissue culture plantlets indicated that the survival rates were 62.5% 35days after 0.4% EMS 24 hours treatment and 47.5% after 28 days of 18 mM hydroxyproline incubation. For 'Tainung No. 20' pineapple, the survival rates were also 62.5% in the treatment of 0.4% EMS 24 hours, but only 27.5% after 28 days of 18 mM hydroxyproline incubation. As a result, the tolerance for EMS treatment was similar for 'Tainung No. 17' and 'Tainung No. 20' pineapples, but the tolerance for hydroxylproline was lower for 'Tainung No. 20' than for 'Tainung No. 17' pineapple.

The second generation progenies (P2) of 'Tainung No. 17' pineapple EMS mutant TN17M1-36-2 and 'Tainung No. 20' pineapple EMS mutants TN20M1-4 and TN20M1-6 had higher proline contents than the control plantlets. The proline contents of the above mutants were significantly increased after cold treatment (5°C, 14 days) and had higher survival rates than the control. The results showed that EMS treatment could generate stress tolerant progenies and hydroxyproline could be used for stress tolerant progeny selection.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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