

羥脯氨酸選拔耐逆境葡萄之研究

江 亭 頤¹⁾ 陳 京 城²⁾

關鍵字：熱逆境、甲基磺酸乙酯、脯氨酸。

摘要：本研究利用'巨峰'葡萄之莖頂進行甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate)誘變處理後，測試不同濃度之羥脯氨酸(hydroxyproline)對其生長之影響，並測定經處理後培植體之脯氨酸(proline)含量，作為選拔耐逆境葡萄之參考。試驗結果顯示，未經 EMS 誘變之莖頂，以不同濃度之羥脯氨酸培養，濃度越高存活率越低，且培植體基部有褐化及不易發根之情形。經 EMS 誘變處理之莖頂再經過不同濃度之羥脯氨酸篩選後所獲得之誘變後代 M₂V₄、M₂₀V₃及 M₂₅V₃，於高溫 36°C 下處理後的存活率及脯氨酸含量明顯較對照組高，且 39°C 下處理後其脯氨酸含量也顯著較對照組高。綜合而言，以葡萄莖頂為材料，經 EMS 誘變及羥脯氨酸篩選後，可以成功獲得較耐高溫逆境之後代，此方法可以做為未來耐逆境葡萄新品系選育時之參考。

前 言

近年來，全球暖化導致氣候發生變遷，伴隨而來的是極端氣候發生的頻率大為提高(林等，2011)，而與全球暖化最密切相關的不外乎是氣溫上升，高溫若伴隨著水分逆境則會使果樹發生生理障礙、生育受阻、光合作用效率變差、營養蓄積變少，導致花芽分化、開花授粉、受精著果不正常(施，2011)等問題。因此，作物之育種及生產環境管理或改變之研究以因應氣候變遷，為現今世界各國都在著手進行之方向。

甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS)為目前廣泛使用的化學誘變劑，其作用機制為使 DNA 序列上產生單一點突變(point mutation) (李，1972；van Harten, 1998；Kodym *et al.*, 2003)，利用 EMS 誘變後再搭配藥劑進行後續篩選，如：PEG (polyethylene glycols)、NaCl 及 hydroxyproline，再以低溫、高溫或缺水、淹水等處理，則可依耐旱、耐熱、耐鹽、

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。

耐冷及耐淹水之育種需求，進行果樹之離體誘變育種，可縮短果樹之育種時程並獲得欲得到之耐逆境性狀。

本研究之目的為利用'巨峰'葡萄之莖頂進行 EMS 誘變處理後，測試不同濃度之 hydroxyproline 對培植體生長之影響，並以 hydroxyproline 作為篩選耐逆境之藥劑，將篩選後之誘變後代進行高溫處理，分別觀察其存活率、生長情形及測定脯胺酸(proline)之含量，以此研究結果做為建立耐逆境葡萄新品系選拔系統之基礎。

材料與方法

一、試驗材料

試驗材料為'巨峰'葡萄之莖頂，初代培養之材料採自種植於臺中市霧峰區國立中興大學園藝試驗場葡萄中心之'巨峰'葡萄生長勢較強之副梢，先去除可剝除之葉片，再將莖頂浸泡於75%酒精中10分鐘之後將其移入無菌操作台中，於解剖顯微鏡下剝除不要的葉片，直至剩下生長點或含一對葉原體，再放置於液態紙橋培養基中培養，其培養基之配方為 MSMO (Murashige and Skoog basal salt with mineral organics, Sigma)、3% (w/v) sucrose、1ppm BA (6-benzylaminopurine, Sigma)，將 pH 值調整為 5.8。培養約 2 週後，若無褐化死亡或是汙染情形，則可作為其後續處理之材料。

二、誘變處理

培養約 2 週之莖頂以每 30 個放入 50 ml 錐形瓶中，瓶中加入經 Millex 0.22 μm (minipore) 濾膜過濾之 EMS 0.2% (v/v) 溶液 15 ml，再以鋁箔紙及石臘膜封口，於震盪器中以 80 rpm 進行震盪處理 2 小時，對照組則以無菌水處理 2 小時，震盪處理溫度維持在 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。處理後於無菌操作台中以無菌水清洗 3 次，再種植於 MSBA 培養基中恢復培養(recovery culture)約 1 個月，若無褐化死亡者不再繼代，直接作為後續處理之材料。MSBA 培養基含有 MSMO、3% (w/v) sucrose、1 ppm BA 及 0.6% (w/v) agar，pH 5.8。

三、Hydroxyproline 處理並標定篩選後代

1. 為尋求適合篩選莖頂最適當之 Hyp 濃度，將未經 EMS 誘變過之莖頂，於 MSBA 培養基中測試含不同濃度之 Hyp，分別以 0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 mM 進行處理，並觀察其存活率，以作為後續篩選條件之依據。每重複 10 個莖頂，每一處理 3 重複。

2. 將 EMS 處理且經恢復培養 1 個月後之莖頂，分別於含有不同 Hyp 濃度之 MSBA 培養基中進行處理 1 個月，其濃度分別為 0.5、0.6、0.8 及 1.0 mM，每重複 10 個莖頂，每一處理 3 重複。Hyp 測試 1 個月後，再移至 MSBA 培養基中進行恢復培養 1 個月，再分別提高 Hyp 濃度至 0.7、0.8、1.0mM 進行第 2 次測試 1 個月，再恢復培養 1 個月，其後將部分植株從 MSBA 培養基移至生長培養基中繼代，將莖頂由叢生芽之形態抽長為幼梢形態，以利後續之高溫篩選。生長培養基含有 1/2 MSMO、3% (w/v) sucrose、200 ppm

activated charcoal、2 ppm IBA、0.8% agar, pH 5.8。誘變後之植株以 M₁、M₂、M₃ 依序標號，而其增殖繼代一次則標為 V₁，增殖繼代 2 次則標為 V₂，以此類推。

四、高溫篩選

分別選定經 Hyp 測試 0.5 mM 再移至 0.7 mM、0.8 mM 再移至 1.0 mM 以及僅經 1.0 mM 篩選之後代 M₂V₄、M₂₀V₃ 及 M₂₅V₃ 之植株，置於 36、39 及 41°C 之生長箱中進行測試，光週期為 16/8(明/暗)小時，光強度為 3000 Lux，每重複以 5 個枝條為單位，每一處理為 4 重複，放置期間瓶口以石臘膜封緊再以保鮮膜將蘭花瓶外部包裹，以防培養基水分之散失。

五、存活率調查

篩選過程中若植株持續生長且沒有褐化則判定為存活；高溫處理後，植株沒有褐化則判定為存活。

六、測量 proline 含量之變化

取經高溫處理後之植株 0.5g 與 10 ml 的 3% 磺基水楊酸溶液(aqueous sulfosalicylic acid)於冰浴上研磨，再將其萃取液以 8000 xg 離心 5 分鐘，取 2 ml 的上清液與 2 ml 的酸性茚三酮(acid-ninhydrin)及 2 ml 的冰醋酸(glacial acetic acid)放入試管中，於 100°C 下反應 1 小時，反應後放入冰浴中降溫。反應後之混和液再用 4 ml 之甲苯(toluene)震盪混和 15-20 秒，回溫後再以分光光度計 520 nm 測量其 O.D.值。Proline 的濃度以下列公式計算： $(\mu\text{g proline/ml} / 115.5 \mu\text{g}/\mu\text{mole}) / [(g \text{ sample}) / 5] = \mu\text{moles proline/g}$ 的植株鮮重(Bates *et al.*, 1973)。

結 果

一、莖頂於不同 Hyp 濃度處理後之存活率

莖頂經 0.2、0.4、0.5、0.6、0.8 及 1.0 mM 處理後之存活率分別為 93.3%、73.3%、66.7%、60.0%、23.3% 及 13.3% 與對照組 100% 之存活率有顯著之差異(表 1)。以生長情形來看，不論 Hyp 處理濃度為多少，其新生之葉片皆會有褐化之情形，而對照組則無此現象，且隨著 Hyp 處理濃度的增加，其生長情形會減緩，濃度若高於 0.5 mM，其生長情形明顯下降，甚至有直接褐化之情形。

二、EMS 誘變後之莖頂，經不同濃度 hydroxyproline 篩選後之存活率

經誘變後之莖頂，於第一次處理分別種至含有 0.5、0.6、0.8 及 1.0 mM 之培養基，其存活率分別為 33.3%、56.7%、53.3% 及 33.3%，與對照組及未經 EMS 處理後之空白組之存活率 100% 相比，有顯著差異(表 2)。若以生長情形來看，Hyp 處理組與對照組相比，其生長較緩慢，且處理濃度高於 0.5 mM，則基部褐化情形會隨著濃度的增加而增加；生長勢會隨著濃度增加而降低，對照組有發根之情形，但在 Hyp 處理組，不論處理濃度的高低，皆無發根之情形。

表 1. 不同濃度 Hydroxyproline 對'巨峰'葡萄組培莖頂存活率之影響。

Table 1. Effects of different concentrations of hydroxyproline on survivals of 'Kyoho' grapevine shoot apexes.

Hyp conc.	Survival (%) ^z
0 mM (CK)	100±0 a ^y
0.2 mM	93.3±11.5 ab
0.4 mM	73.3±11.5 bc
0.5 mM	66.7±20.8 c
0.6 mM	60.0±10.0 c
0.8 mM	23.3±5.8 d
1.0 mM	13.3±11.5 d

^z Survival percentages were recorded after 57 days of Hyp treatments. Ten explants per replicate. Three replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation; Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

表 2. 經 EMS 誘變之'巨峰'葡萄莖頂於不同濃度 Hydroxyproline 培養之存活率(第一次測試)。

Table 2. Survivals of EMS treated 'Kyoho' grapevine shoot apexes cultured in different concentrations of hydroxyproline (first test).

Hyp conc.	Survival (%) ^z
Blank (without EMS and Hyp treatment)	100±0 a ^y
0 mM (CK)	100±0 a
0.5 mM	33.3±20.8 b
0.6 mM	56.7±20.8 b
0.8 mM	53.3±11.5 b
1.0 mM	33.3±25.2 b

^z Survival percentages were recorded after 38 days of Hyp treatments. Ten explants per replicate. Three replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation; Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

經第一次 Hyp 處理再經第一次恢復培養(recovery)後，其 0.5、0.6、0.8 及 1.0mM 之存活率分別為 45.0%、53.3%、50.0%及 16.7%，與對照組 100%之存活率呈現顯著差異(表 3)，而其生長情形也仍與對照組有明顯差異，0.6、0.8 及 1.0 mM 經 recovery 後，其基部仍有褐化之情形，且有經過 Hyp 處理組仍然沒有發根之現象。

將第一次 recovery 後之 0.5、0.6、0.8 mM 處理組植株進行第二次 Hyp 處理，分別提高濃度至 0.7、0.8 及 1.0 mM，處理後其存活率分別為 30.3%、33.3%、10.0%，而沒有再提高濃度之 1.0 mM 其存活率為 15.0%，與空白組及對照組之存活率 86.7%及 90.0%相比，均有顯著差異(表 4)。而以生長情形來看，對照組經繼代後有些許褐化之情形，0.5、0.6、0.8 mM 種至提高濃度 0.7、0.8 及 1.0 mM 之莖和葉片較細、小且弱，基部仍然有褐化之情形，而沒有再提高濃度之 1.0 mM 其褐化之情形較趨緩。

經第二次 Hyp 處理後再進行第二次 recovery 後，其 0.5 至 0.7 mM、0.6 至 0.8 mM、0.8 至 1.0 mM 及 1.0 mM 之存活率分別為 30.0%、33.3%、15.0%及 15.0%，與對照組之存活率 100%呈顯著差異(表 5)，而由提高濃度後的生長情形可以觀察到基部及部分莖及頂梢褐化之現象，且莖及葉片較細、小，生長勢較弱，而沒有提高濃度之 1.0 mM，其生長勢有恢復之情形。

三、誘變及篩選後之後代，經高溫處理後之存活率

EMS 誘變及 Hyp 篩選過之後代經不同高溫處理後之存活率分別為在 36°C 下對照組為 15.0 %、M₂V₄為 20.0 %，M₂₀V₃及 M₂₅V₃之存活率皆為 55.0 % (表 6)；而在 39°C 下對照組的存活率為 35.0 %，M₂V₄為 40.0 %，M₂₀V₃為 60.0 %，M₂₅V₃為 45.0 %，但同一組內，36°C 與 39°C 處理間並無顯著差異，而溫度高達 42°C 時，不論對照組或是經誘變及篩選之後代均無存活，但在 27°C 之下，對照組以及經誘變及篩選之後代其存活率皆為 100%。若以生長情形來看，溫度於 27°C 時，幼梢均能正常生長，溫度高於 36°C 以上其生長受阻，對照組有葉片黃化、褐化之情形，且幼梢抽長較短，而經誘變且篩選過之後代 M₂V₄、M₂₀V₃、M₂₅V₃，幼梢能抽長但較纖細，葉片也有些許黃化之情形，經高溫處理者，其根部皆有褐化之情形，而處理溫度高達 42°C 時，則不論對照組或是經過誘變及篩選之後代，均整株褐化死亡。

四、高溫處理後培植體 proline 含量之變化

溫度 27°C 下其 proline 的含量分別為對照組 0.503 μmole/g FW、M₂V₄為 0.828 μmole/g FW、M₂₀V₃為 0.792 μmole/g FW、M₂₅V₃為 0.218 μmole/g FW，在 36°C 下，對照組為 0.519 μmole/g FW、M₂V₄為 1.237 μmole/g FW、M₂₀V₃為 1.346 μmole/g FW、M₂₅V₃為 1.611 μmole/g FW，在 39°C 下，對照組為 1.601 μmole/g FW、M₂V₄為 2.588 μmole/g FW、M₂₀V₃為 2.411 μmole/g FW、M₂₅V₃為 2.319 μmole/g FW (表 7)。處理溫度越高時其 proline 含量呈現較高之趨勢，M₂V₄及 M₂₀V₃在不同溫度處理下，其 proline 含量均較對照組高；M₂₅V₃在 27°C 時較對照組低，但在高溫的 36°C 及 39°C 處理組也較對照組高。

表 3. 經 EMS 誘變之'巨峰'葡萄莖頂於不同濃度 Hydroxyproline 處理後再經 1 個月恢復培養之存活率(第一次測試)。

Table 3. Survivals of EMS and different concentrations of Hydroxyproline treated 'Kyoho' grapevine shoot apexes after 1 month of recovery (first test).

Hyp conc.	Survival (%) ^z
Blank (without EMS and Hyp treatment)	100±0 a ^y
0 mM (CK)	100±0 a
0.5 mM	45.0±7.1 b
0.6 mM	53.3±25.5 b
0.8 mM	50.0±17.3 bc
1.0 mM	16.7±13.5 c

^z Survival percentages were recorded after 32 days of recovery.

^y Mean ± standard deviation; Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

表 4. 經 EMS 誘變之'巨峰'葡萄莖頂於不同濃度 Hydroxyproline 培養後之存活率(第二次測試)。

Table 4. Survivals of EMS treated 'Kyoho' grapevine shoot apexes cultured in different concentrations of hydroxyproline (second test).

Hyp conc.	Survival (%) ^z
Blank (without EMS and Hyp treatment)	86.7±11.5 a ^y
0 mM (CK)	90.0±10.0 a
0.5 mM 1 month + recovery 1 month + 0.7 mM 1 month	30.0±17.3 b
0.6 mM 1 month + recovery 1 month + 0.8 mM 1 month	33.3±11.5 bc
0.8 mM 1 month + recovery 1 month + 1.0 mM 1 month	10.0±10.0 bc
1.0 mM 1 month + recovery 2 months	15.0±5.0 c

^z Survival percentages were recorded after 32 days of Hyp treatment. The explants used in this test were from the first test.

^y Mean ± standard deviation; Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

表 5. 經 EMS 誘變後之'巨峰'葡萄莖頂於不同濃度 Hydroxyproline 處理後再經恢復培養 1 個月之存活率(第二次測試)。

Table 5. Survivals of EMS and different concentrations of hydroxyproline treated 'Kyoho' grapevine shoot apexes after 1 month of recovery (second test).

Hyp conc.	Survival (%) ^z
0 mM (CK)	100±0 a ^y
0.5 mM 1 month + recovery 1 month + 0.7 mM 1 month + recovery 1 month	30.0±17.3 b
0.6 mM 1 month + recovery 1 month + 0.8 mM 1 month + recovery 1 month	33.3±11.5 bc
0.8 mM 1 month + recovery 1 month + 1.0 mM 1 month + recovery 1 month	15.0±5.0 c
1.0 mM 1 month + recovery 3 months	15.0±5.0 c

^z Survival percentages were recorded after 31 days of Hyp treatment. The explants used in this test were from the first test.

^y Mean ± standard deviation; Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

表 6. EMS 誘變之'巨峰'葡萄莖頂經不同濃度 Hydroxyproline 篩選再經高溫處理後之存活率。

Table 6. Survivals of EMS and different concentrations of hydroxyproline treated 'Kyoho' grapevine shoot apexes after 1 month of different temperature treatments.

Temp.	Survival (%) ^z			
	CK	M ₂ V ₄	M ₂₀ V ₃	M ₂₅ V ₃
27°C	100±0 ^y a ^x A ^w	100±0 aA	100±0 aA	100±0 aA
36°C	15.0±30.0 bB	20.0±40.0 bB	55.0±37.9 bA	55.0±41.2 bA
39°C	35.0±47.3 bA	40.0±46.2 bA	60.0±40.0 bA	45.0±52.6 bA
42°C	0±0 bA	0±0 bA	0±0 cA	0±0 cA

^z Survival percentages were recorded after 28 days of different temperature treatments.

^y Mean ± standard deviation.

Means separation within the same columns ^x or rows ^w by the LSD test at $p \leq 0.05$.

表 7. EMS 誘變之'巨峰'葡萄莖頂經不同濃度 Hydroxyproline 篩選再經高溫處理後其 proline 之含量。

Table 7. Proline contents of EMS and different concentrations of hydroxyproline treated 'Kyoho' grapevine shoot apices after 1 month of different temperature treatments.

Temp.	Proline content ($\mu\text{mole/g FW}$) ^z			
	CK	M ₂ V ₄	M ₂₀ V ₃	M ₂₅ V ₃
27°C	0.503±0.037 b ^y B ^x	0.828±0.076 cA	0.792±0.010 cA	0.218±0.014 cC
36°C	0.519±0.020 bD	1.237±0.027 bC	1.346±0.054 bB	1.611±0.033 bA
39°C	1.601±0.051 aC	2.588±0.067 aA	2.411±0.035 aB	2.319±0.076 aB

^z Proline contents were recorded after 28 days of different temperature treatments.

Means separation within the same columns ^y or rows ^x by the LSD test at $p \leq 0.05$.

討 論

脯胺酸(Proline)的累積與植物的逆境容忍具有關聯性，且 proline 被認為是滲透調節物質(osmolyte)、ROS 清除劑以及具有保護分子的功能(molecular chaperone)，可以穩定細胞結構，進而保護細胞避免受到逆境傷害(Krasensky and Jonak, 2012)。在某些研究中，鹽害耐受性較高之植物，其 proline 的累積也較高，且植物在面臨乾旱環境時，proline 的含量也會累積(Dar *et al.*, 2016)。較耐鹽害的紫花苜蓿相較對鹽害敏感的紫花苜蓿，其 proline 含量會快速累積(Fougere *et al.*, 1991)。而稻米在缺水逆境下，其葉片也會累積大量的 proline (Hsu *et al.*, 2003)。

在本研究中，於高溫逆境下，葡萄細胞之 proline 含量會增加，且經 EMS 誘變之植株後代其 proline 含量與存活率均有高於對照組之趨勢(表 6、表 7)，此與 Kueh 與 Bright (1981) 利用疊氮化鈉對大麥成熟胚進行誘變處理，再以 4 mM hydroxyproline 篩選後可獲得 proline 濃度較高之後代的結果相似，且同樣的試驗也在水稻(Hasegawa and Inoue, 1978)及花椰菜(Deane *et al.*, 1995)中得到相同的結果，可能在 hydroxyproline 處理與 proline 含量累積之間存在著某種調控機制(Deane *et al.*, 1995)，此仍待後續進行研究做進一步之探討。

目前已經有水稻、小麥、大麥、花椰菜及香蕉曾以 hydroxyproline 作為藥劑進行耐逆境後代篩選。Deane 等人(1995)實驗結果發現 hydroxyproline 可以作為很好的耐抗性篩選工具，本研究之結果也可以做為未來選拔耐逆境葡萄時之參考。Fuller 等人(2006)在試驗中發現有部分的誘變後代，僅有些許或是沒有抗性，且 proline 含量也沒有顯著改變之情形，學者認為可能跟在繼代期間誘變後代有逆境逃避(escapes)、回復突變(revertants)或是表觀遺傳(epigenetics)影響之情形有關，未來可以針對誘變篩選後之後代，其耐逆境的性狀是否為可逆性或是性狀可穩定表現做進一步之探討。

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。
- 林彥蓉、郭素真、吳永培。2011。全球暖化下臺灣耐逆境水稻之育種策略及發展。因應氣候變遷作物育種及生產環境管理研討會專刊。pp. 65-78。
- 施昭彰。2011。溫帶果樹對氣候變遷的育種及生產管理之應變。因應氣候變遷作物育種及生產環境管理研討會專刊。pp. 191-199。
- Bates, L. S., R. P. Waldren, and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Dar, M. I., M. I. Naikoo, F. Rehman, F. Naushin, and F. A. Khan. 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In: *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*. Iqbal. N, R. Nazar, and N. A. Khan (eds.), Springer India. pp. 155-166.
- 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.
- Fougere, F., D. Le-Rudulier, and J. G. Streeter. 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 96: 1228-1236.
- Fuller, M. P., E. M. R. Metwali, 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.
- Hasegawa, H. and M. Inoue. 1983. Induction and selection of hydroxyl-L-proline resistant mutant in rice (*Oryza sativa* L.) *Jpn. J. Breed.* 33: 275-282.
- Hsu, S. Y., Y. T. Hsu, and C. H. Kao. 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biol. Plant.* 46: 73-78.
- Kodym, A. and R. Afza. 2003. Physical and chemical mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* 236: 189-204.
- Krasensky, J. and C. Jonak. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangement and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 63: 1593-1608.
- Kueh, J. S. H. and S. W. J. Bright. 1981. Proline accumulation in a barley mutant resistant to trans-4-hydroxy-L-proline. *Planta* 153: 166-171.
- van Harten, A. M. 1998. *Mutation breeding: theory and practical applications*. Cambridge University Press, UK.

Studies on Hydroxyproline Selection for Stress Tolerant Grapevines

Ting-Yi Jiang ¹⁾ Ching-Cheng Chen ²⁾

Keyword : heat stress, EMS (ethyl methanesulphonate), proline.

Summary

EMS (ethyl methanesulphonate) was used as a mutagen to induce mutations on 'Kyoho' grapevine shoot apices cultured *in vitro*. The progenies of EMS treated explants were then selected by different concentrations of hydroxyproline (Hyp). Proline contents were analyzed after heat treatments as a reference for selecting stress tolerant grapevines. The results indicated that the survival rate of shoot apices declined corresponding with the increase in hydroxyproline concentration. In addition, the bases of the explants turned brown and were difficult to root. The progenies of EMS treated apices, M₂V₄, M₂₀V₃, M₂₅V₃, were selected by Hyp. After 36°C heat treatment, the survival rate and proline content in the mutant lines were significantly higher than those in the control. The proline contents in the mutant lines after 39°C treatment were also significantly higher than the control. In summary, it is possible to obtain heat stress tolerant grapevine progenies by using shoot apices as EMS treatment material and then selected by hydroxyproline. This method could be used for selecting new stress tolerant grapevine lines in the future.

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

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