

鳳梨白化苗 EMS 誘變及繼代增殖系統之建立

陳家慧¹⁾ 陳京城²⁾

關鍵字：白化苗、誘變、增殖

摘要：本研究利用不同的培養基配方測試'台農 17 號'鳳梨組培苗之白化苗誘導率，結果顯示，種植於含有 NAA 之全量 MSMO 培養基之培植體經暗期培養 8 週後其白化苗誘導率皆顯著高於未添加 NAA 之對照組。而以 EMS 溶液處理白化苗後其側芽萌芽率為依據，0.01% 1hr 為接近 LD₅₀ 之處理條件。白化苗增殖系統方面，頂芽扦插苗之新生白化苗誘導率較側芽扦插苗需要較短時間即可達到最大新生白化苗誘導率；前者培養 5 週後白化苗誘導率為 96.9%，後者培養 11 週後誘導率只有 65.1%。頂芽扦插苗平均節位數為 8.1 節，而側芽扦插苗僅有 6 節。將白化苗莖段種於含有全量 MSMO 培養基並進行照光處理 2 週後側芽陸續萌發，並發育成一新生植株。此白化苗繼代增殖系統，可用於鳳梨誘變育種。

前 言

將植物部份器官組織切離植物母體，於無菌環境下培養於適當配方的培養基中，在人工控制之氣候環境下誘導分化發育成完整植株或進行增殖作用的過程稱為植物組織培養 (Caponetti *et al.*, 2005; George, 2008)。最早關於鳳梨組織培養之報告於 1960 年提出，此後 1970 至 1980 年代中期之研究多著重於鳳梨組培系統之建立(馬及王, 1977; Mathews *et al.*, 1979; Dewald *et al.*, 1988)，從 1980 年後期至今則是利用不同比例的植物生長調節劑 (Plant growth regulators) 進行試驗，以尋求具有最佳增殖倍率的培養基配方 (Escalona *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2004; Hamad and Taha, 2008)。

Kiss 等人於 1995 年發表可進行大量微體繁殖鳳梨組培苗之新方法；將'Cayenne'品種鳳梨組培苗切除大部分地上部組織，僅留下距離基部 5~8 mm 之短縮莖，將其培植於含有

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。

10 μM NAA 的 MS 培養基並進行暗化處理約，40~50 天後即可誘導出鳳梨白化苗，再將其移植於含有 BA 及 kinetin 之 N6 培養基，可有效誘導側芽再生植株。之後亦有研究指出 MS 培養基添加 BA 或 NAA 等植物生長調節劑於暗化處理皆可誘導鳳梨白化苗之產生 (Barboza and Caldas, 2001; Praxedes *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010)。

果樹作物傳統育種面臨幼年期長、植株體積龐大、基因型複雜、難以得到純系及後代選拔時間長等問題 (Ahloowalia, 2001)。人為誘變育種透過不同誘變處理，提升植株細胞之突變率，以增加可篩選出具有優良性狀後代之機會 (van Harten, 1998)，根據誘變物質的不同可分為物理性誘變與化學性誘變，其中 EMS (ethyl methanesulfonate) 由於毒性較低且具有高度的誘變效力，為最常利用於植物誘變育種之化學藥劑。目前 EMS 已利用於許多果樹作物上，如蘋果 (Webster *et al.*, 1986)、香蕉 (Bhagwat and Duncan, 1998; Bidabadi *et al.*, 2011)、葡萄 (Khawale *et al.*, 2007)、枇杷 (Wang *et al.*, 2007) 等。本研究測試 '台農 17 號' 鳳梨白化苗 EMS 適當誘變條件以及建立一白化苗增殖系統，探討利用鳳梨白化苗作為誘變材料之可能性。

材料與方法

試驗一、白化苗誘導

1. 試驗材料：

使用材料為 '台農 17 號' 鳳梨 4~5cm 高之組培苗，切除根部後，由基部開始將葉片一一拔除，中心之 1~2 片嫩葉直接切短長度至與短縮莖齊高。

2. 誘導培養基：

本試驗共使用 3 種培養基，分別為全量 MSMO、全量 MSMO 添加 5 μM NAA，以及全量 MSMO 添加 10 μM NAA。其餘成份皆為 3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar，pH 調整至 5.8。

3. 白化苗誘導處理：

將切除葉片之 '台農 17 號' 鳳梨組培苗短縮莖分別種植於含上述之培養基之指形瓶進行暗期培養，培養環境溫度維持在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 。每 7 支指型瓶為一重複，每處理 3 重複，試驗重複進行 3 次。暗期處理後 6 週及 8 週後計算白化苗誘導率，當節間抽出超過 3 節即視為誘導成功。本試驗數據於 Excel 統計整理完成後，以 SAS (Statistic Analysis System) 9.2 版軟體進行 ANOVA (Analysis of Variation)，分析各處理間之差異顯著性。

試驗二、白化苗 EMS 誘變

1. 試驗材料：

取用誘導成功之 '台農 17 號' 鳳梨白化苗。每 2 個節位切成一段以進行 EMS 誘變處理。

2. EMS (ethyl methanesulphonate) 誘變處理：

將帶有兩個節位的白化苗莖段分別以 0.001% 及 0.01% (v/v) 之 EMS 溶液進行 1 小時之誘變處理，對照組則以無菌水處理 1 小時；以上處理皆用 100 rpm 之速度進行震盪培養，培養溫度維持在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 。處理後於無菌操作台以無菌水清洗 3 次，將邊緣死亡之組織切除後種植於含有全量 MSMO 之生長培養基，培養條件如試驗一。種植 6 週後計算其側芽萌芽率。每 10 段白化苗雙節莖段為一重複，每處理各進行 3 重複，試驗重複進行 2 次。當每節間帶有的側芽萌芽並生長至約 3mm 的芽體時即視為萌芽且存活，當莖段約 60% 面積褐化且種植 6 週後側芽仍無萌芽者則視為芽體死亡。

試驗三、白化苗繼代增殖系統之建立

1. 試驗材料：

取用誘導成功之'台農 17 號'鳳梨白化苗，將其植株分成頂芽及側芽兩部分，側芽以每兩個節位切成一莖段。

2. 白化苗再次誘導試驗：

將'台農 17 號'白化組培苗之雙節莖段及頂芽分別種植於含 $5\mu\text{M}$ NAA 之全量 MSMO 培養基中，進行暗期培養，培養環境溫度維持在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 。側芽雙節莖段於暗期培養 2 週後開始每週計算萌芽率，暗期 4 週後開始計算白化苗節間數，頂芽不列入計算；頂芽扦插則在暗期 1 週後開始每週計算第一個新增側芽節位之生長率，同時計算其新生節位數，頂芽不列入計算。每 7 支指型瓶為一重複，每處理 3 重複，試驗重複進行 3 次。

3. 芽體誘導植株：

重新抽出之白化苗(包含側芽雙節扦插及頂芽扦插)植株約 7 cm 高時，將其切成 2~3 段後，莖段橫躺種植於含有全量 MSMO 的培養基中照光培養，誘導側芽萌芽，培養條件如試驗一。種植後每 2 週計算芽體萌芽率。本數據於 Excel 統計整理完成後，以 Excel 進行 T-test 統計分析處理間之差異顯著性。

結 果

試驗一、白化苗誘導

將 4~5 cm 高之'台農 17 號'鳳梨組培苗切除葉片後，分別種植於含有全量 MSMO、全量 MSMO 添加 $5\mu\text{M}$ NAA 及全量 MSMO 添加 $10\mu\text{M}$ NAA 等 3 種培養基中。經過暗期培養 6 週後，種植於全量 MSMO 之植株有 68.3% 的白化苗誘導率，而種植於添加 $5\mu\text{M}$ NAA 及添加 $10\mu\text{M}$ NAA 培養基之植株其白化苗誘導率皆為 87.3%。暗期培養 8 週後，種植於不含 NAA 之全量 MSMO 培養基之植株其白化苗誘導率為 87.3%，而有添加 NAA 之兩種培養基其白化苗誘導率皆顯著高於對照組：添加 $5\mu\text{M}$ NAA 之培養基其白化苗誘導率為 98.4%，添加 $10\mu\text{M}$ NAA 之培養基其誘導率為 100%(表 1)。圖 1 為不同培養基誘導之白化

苗生長情形；種植於不含 NAA 的全量 MSMO 培養基之植株根系生長情形較種植含有於 NAA 培養基之植株差。

表 1. 不同培養基對'台農 17 號'鳳梨白化苗誘導率之影響^z

Table 1. Effect of different medium on the induction percentage of etiolated 'Tainung No.17' pineapple shoots.

Medium	Culture period	
	6 weeks	8 weeks
MSMO	68.3 ± 22.5 ^y a ^x	87.3 ± 7.3 b
MSMO+ 5μM NAA	87.3 ± 13.8 a	98.4 ± 2.8 a
MSMO+10μM NAA	87.3 ± 14.6 a	100.0 ± 0.0 a

^z The percentage of induction = (the number of etiolated shoots / the total number of plantlets) × 100 %. Seven plantlets per replicate, 3 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation.

^x Mean separation within columns by Least Significant Difference(LSD)test, P=0.05.

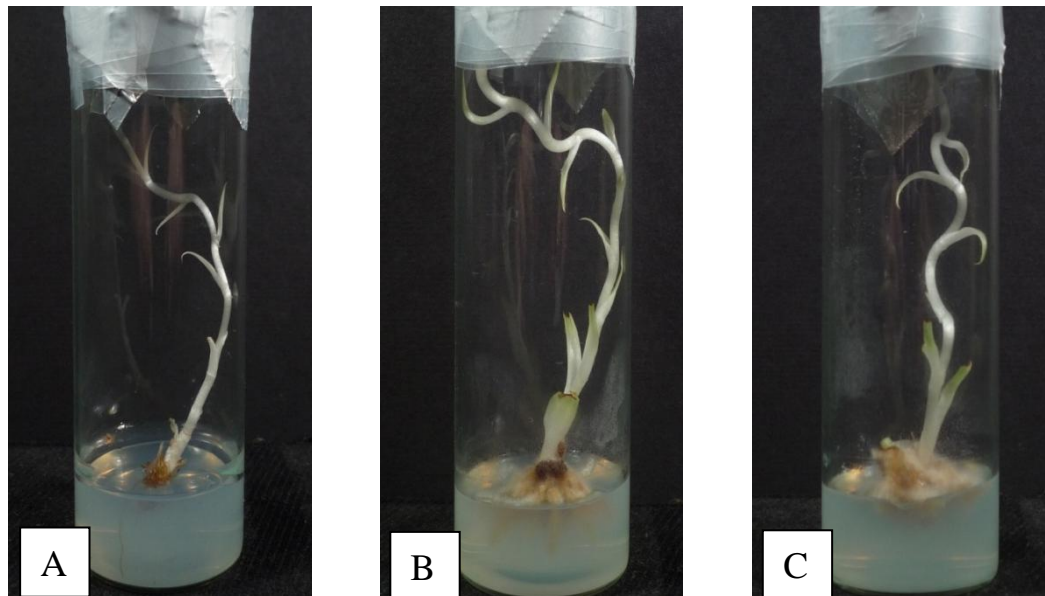


圖 1. 不同培養基所誘導之'台農 17 號'鳳梨白化苗之生長情形。

Fig. 1. Growth of etiolated 'Tainung No.17' pineapple shoots cultured in different medium.

A: MSMO medium; B: MSMO+5μM NAA; C: MSMO+10μM NAA.

試驗二、白化苗 EMS 誘變

將白化苗以兩個側芽為單位切成一段，浸泡於不同濃度的 EMS 溶液中 1 小時進行誘變處理後，其側芽之萌芽率如表 2 所示；浸泡無菌水的對照組側芽萌芽率為 36.7%，經 0.001% EMS 溶液浸泡 1 小時之處理組其萌芽率為 28.2%，0.01% EMS 處理 1 小時之萌芽率則降至 16.7%。

試驗三、白化苗繼代增殖系統建立

將白化苗分成側芽雙節插及頂芽扦插，分別種植於含有 5 μ M NAA 的全量 MS 培養基中進行暗化培養，調查白化苗的再生率及植株生長情形。側芽雙節插在種植後 4 週開始萌芽，此時的萌芽率為 7.9%；不包括植株之頂芽，其平均節數為 0.8 節。種植後第 12 週其萌芽率為 65.1%，為此處理之最高萌芽率；此時有 2/3 之植株其株高約 7 cm 高；不包括植株之頂芽，其平均節數為 6 節(表 3)。

白化苗之頂芽在種植後 1 週開始出現第一個新生節位，此時新生節位出現之比例為 38.1%；不包括植株之頂芽，其平均節數為 1 節。種植後僅需 6 週即可達到最高萌芽率，其值為 96.9%；種植後 8 週有 2/3 的植株其株高約 7 cm 高；不包括植株之頂芽，其平均節數為 8.1 節(表 4)。

表 2. 不同濃度之 EMS 對'台農 17 號'白化苗側芽芽體萌芽率之影響

Table 2. Effect of different EMS concentrations on the regeneration rate of lateral buds of etiolated 'Tainung No.17' pineapple shoots.

Treatment ^z	Regeneration (%) ^y
CK	36.7 \pm 16.2 ^x a ^w
0.001% EMS	28.2 \pm 7.6 a
0.01% EMS	16.7 \pm 20.4 a

^zThe explants were incubated in sterile water (CK), 0.001% EMS and 0.01% EMS solutions for 1hr, respectively.

^yThe regeneration rate = (the number of buds regenerated / the total number of buds) \times 100 %. Ten buds per replicate, 3 replicates per treatment.

^x Mean \pm standard deviation.

^w Mean separation within columns by Least Significant Difference(LSD)test, P=0.05.

表 3. '台農 17 號'鳳梨白化苗側芽扦插後之生長情形

Table 3. Growth of lateral buds of etiolated 'Tainung No.17' pineapple shoots.

Culture period	Regeneration rate of lateral buds (%) ^z	Number of nodes
1 week	0.0 ± 0.0 ^y	0.0 ± 0.0
2 weeks	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3 weeks	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4 weeks	7.9 ± 6.9	0.8 ± 0.6
5 weeks	19.0 ± 12.4	1.1 ± 0.7
6 weeks	49.2 ± 6.0	1.8 ± 0.1
7 weeks	60.3 ± 3.6	2.4 ± 0.3
8 weeks	61.9 ± 4.8	2.9 ± 0.3
9 weeks	63.5 ± 7.3	3.6 ± 0.5
10 weeks	63.5 ± 7.3	4.3 ± 0.5
11 weeks	65.1 ± 6.0	4.9 ± 0.4
12 weeks	65.1 ± 6.0	6.0 ± 0.4

^z Two lateral buds per cutting. Regeneration rate = (the number of buds regenerated / the total number of buds) × 100 %. Fourteen buds per replicate, 3 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation.

表 4. '台農 17 號'鳳梨白化苗頂芽扦插後之生長情形

Table 4. Growth of apical buds of etiolated 'Tainung No.17' pineapple shoots .

Culture period	Appearance rate of first new node (%) ^z	Number of nodes
1 week	38.1 ± 17.2 ^y	1.0 ± 0.2
2 weeks	81.0 ± 12.6	2.6 ± 0.3
3 weeks	92.1 ± 7.3	3.8 ± 0.2
4 weeks	93.7 ± 5.5	4.7 ± 0.3
5 weeks	96.9 ± 2.8	5.5 ± 0.4
6 weeks	96.9 ± 2.8	6.6 ± 0.2
7 weeks	96.9 ± 2.8	7.2 ± 0.3
8 weeks	96.9 ± 2.8	8.1 ± 0.2

^z Appearance rate of first new node = (the number of apical buds had their first new node appeared/ the total number of apical buds) × 100 %. Seven buds per replicate, 3 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation.

表 5. 不同芽體扦插之白化苗其繼代新生芽梢誘導率

Table 5. The induction rate of new shoots from etiolated plantlets of different buds cuttings.

Culture period	Etiolated plantlets regenerated from lateral bud cutting ^z	Etiolated plantlets regenerated from apical bud cutting
2 weeks	27.2 ± 1.1 ^y a ^x	18.9 ± 4.2 b
4 weeks	44.4 ± 3.9 a	36.9 ± 6.4 a
6 weeks	54.3 ± 3.2 a	43.8 ± 4.5 b

^zData was record when lateral buds with 1 mm green new shoots. Induction rate = (the number of lateral buds regenerated / the total number of lateral buds) × 100 %. Seven explants per replicate, 3 replicates per treatment.

^y Mean ± standard deviation.

^x Mean separation within columns by T-test, P=0.05.

綜合以上結果，圖 2 為白化苗初代誘導及增殖系統之模式圖。將 4~5 公分高之鳳梨組培苗切除葉片後，種植於含有 5 μ M NAA、全量 MSMO 之白化苗誘導培養基，暗期培養 2 個月後可誘導出白化苗植株。將白化苗植株分為頂芽及雙節側芽莖段分別種植於白化苗誘導培養基，前者 2 個月後可得到約 7 cm 高之新生白化苗，後者則需經 3 個月的培養時間。其新生白化苗側芽種植於含有全量 MSMO 之生長培養基進行照光處理，種植後 2 週開始有芽體萌芽，從而獲得增殖之鳳梨植株。

討 論

本研究以 4~5 cm 高之'台農 17 號'鳳梨組培苗為材料，去除葉片後，種植於不同培養基進行暗期培養 8 週後可成功誘導出鳳梨白化苗植株，其中又以有添加 NAA 之培養基其誘導率比未添加之對照組高，此結果與前人研究報告之結果一致(Kiss *et al*, 1995; Barboza and Caldas, 2001)。

本研究進一步利用 EMS 誘變白化苗莖段，以 0.01% EMS 處理之萌芽率為 16.7%，約為對照組之一半，顯示以 0.01% EMS 處理 1 小時之鳳梨白化苗側芽可達到約 LD₅₀之萌芽率，此處理條件可用於將來以白化苗做為 EMS 誘變材料時之參考。

在白化苗繼代增殖系統方面，利用白化苗頂芽扦插之植株與雙節側芽扦插之植株比較，前者達到最大新生白化苗誘導率之所需時間較短，且經由頂芽誘導出之新生白化苗的節位數多於由側芽誘導出的植株。Kiss 等人(1995)將誘導出之鳳梨白化苗種植於含有 BA 之 N6 培養基，種植 8~10 天後可觀察到側芽節位開始膨起；種植 18~20 天後有芽體開始萌芽，

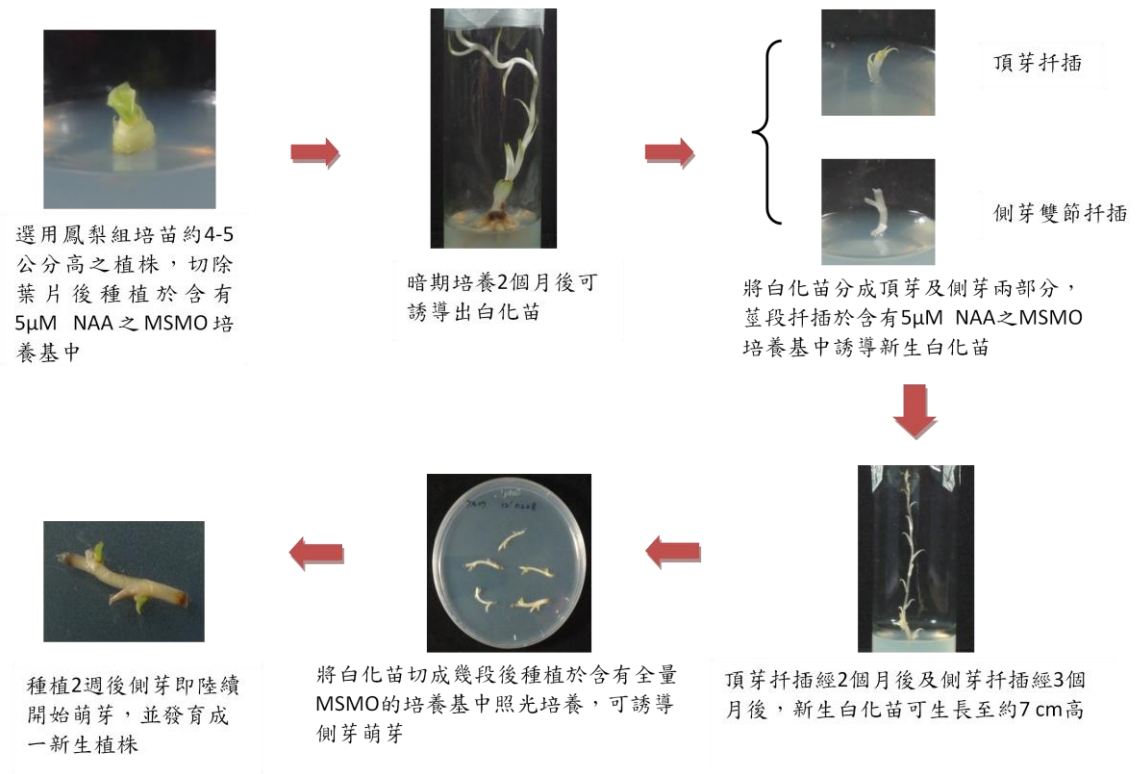


圖 2. 鳳梨白化苗繼代增殖系統

Fig. 2. The proliferation system of etiolated pineapple shoots.

此結果與本研究之結果相似。雖然側芽扦插白化苗進行照光培養後側芽萌芽顯著高於頂芽扦插白化苗，但整體萌芽數量兩者並無太大差別，因此，頂芽是較適當之誘變材料，可以較快獲得誘變後代。圖 2 為根據試驗結果而設計之白化苗繼代增殖系統。白化苗側芽萌芽情形不佳之狀況可以考慮在全量 MS 培養基中添加 NAA 等 Auxin 類之生長調節劑誘導發根，加強白化苗植株吸收養分之能力，以提升側芽之萌芽率。

Predieri (2001)認為單一芽體為較佳之植物誘變處理材料，其原因為方便進行後代追蹤。單一芽體內亦可能具有多個生長點，無法確定哪個生長點細胞真正被誘變，因此針對頂芽進行繼代作業為一較有效率之去除嵌合體後代追蹤方法。一般鳳梨增殖並非透過單一芽體，而是植株種植於適當增殖培養基下，細胞直接器官發生以產生新生植株，因此從中獲得同質性誘變植株之機率相對較低，且誘變後代之追蹤作業也較困難，而鳳梨白化苗誘導及增殖系統的建立則有助於解決此項問題，使鳳梨誘變作業操作得以與其他以單一芽體繼代之作物相當之誘變效率。

參 考 文 獻

- 馬溯軒、王淑娥。1977。鳳梨之組織培養繁殖。中國園藝 23: 107-113。
- Ahloowalia, B. S. and M. Maluszynski. 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167–173.
- Barboza, S. B. S. C. and L. S. Caldas. 2001. Etiolation and regeneration in the *in vitro* multiplication of hybrid PE x SC-52 pineapple. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 417-423.
- Bhagwat, B. and E. J. Duncan. 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa spp.*, AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. *Sci. Hortic.* 73: 11-22.
- Bidabadi, S. S., M. Mahmood, S. Meon, Z. Wahab, and C. Ghobadi. 2011. Evaluation of *in vitro* water stress tolerance among EMS – induced variants of banana (*Musa spp.*, AAA), using “morphological, physiological and molecular” traits. *J. Crop Sci. Biotech.* 14: 255-263.
- Caponetti, J. D., D. J. Gray, and R. N. Trigiano. 2005. History of plant tissue culture and cell culture. pp.9-15. In: Trigiano, R. N. and D. J. Gray (eds.). *Plant development and biotechnology*. CRC Press.
- Carvalho, A. C. P., M. V. M. Pinheiro, G. M. G. Dias, and J. P. S. Morais. 2009. *In vitro* multiplication of ornamental pineapple by shoot etiolation and regeneration. *Hortic. Bras.* 27: 103-108.
- Dewald, M. G., G. A. Moore, W. B. Sherman, and M. H. Evans. 1988.. Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 7: 535-537.
- Escalona, M., J. C. Lorenzo, B. Daquinta, M. Fundora, Z. Borrot, C. G. Espinosa, E. Arias, and E. Aspiolea. 1999. New system for *in-vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Trop. Fruit News* 29: 3-5.
- George, E. F.. 2008. Plant tissue culture procedure - background. pp. 1-28. In: George, E. F., M. A. Hall, and G.-J. De Klerk (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Springer.
- Hamad, A. M. and R. M. Taha. 2008. Effect of Benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation and growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Smooth Cayenne. *J. Applied Sci.* 8: 4180-4185.
- Khan, S., A. Nasib, and B. A. Saled. 2004. Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pak. J. Bot.* 36: 611-615.
- Khawale, R. N., V. Yerramilli , and S. K. Singh. 2007. Molecular marker-assisted selection of *in vitro* chemical mutagen-induced grapevine mutants. *Curr. Sci.* 92: 1056-1060.

- Kiss, E., J. Kiss, G. Gyulai, and L. E. Heszky. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience* 30: 127-129.
- Mathews, V. H. and T. S. Rangan. 1979. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* culture of pineapple. *Sci. Hortic.* 11: 319-328.
- Praxedes, S. C., A. F. Silva Jr., F. L. B. Figueiredo, M. L. Figueiredo, F. A. A. Câmara, and O. F. Oliveira. 2001. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. *Caatinga* 14: 13-15.
- Predieri, S.. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 64:185-210.
- Souza, B. M., J. E. Kraus, L. Endres, and H. Mercier. 2003. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 733-739.
- Souza, F. V. D., A. M. M. E. Canto, A. S. Souza, M. A. Pereira, and C. Costa. 2010. Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. *Rev. Bras. Frutic.* 32: 612-617.
- van Harten, A. M. 1998. Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge Univ. Press.
- Wang, Y. Q., L. J. Q. Luo, and Q.X. Deng. 2007. Morphology, POD isozyme and RAPD analyses of plants regenerated from EMS-treated shoot tips in 'Dawuxing' loquat. *Acta Hort.* 750: 149-154.
- Webster, A. D. and T. R. Sparks. 1986. The influence of micropropagation and chemical mutagens on the growth and precocity of Cox's Orange Pippin and Bramley' seedling apple. *Acta Hort.* 180: 25-34.

Establishment of EMS Mutagenesis and Proliferation System of Etiolated Pineapple Shoots

Chia-Hui Chen ¹⁾ Ching-Cheng Chen ²⁾

Key words: pineapple, etiolated shoots, EMS mutagenesis

Summary

The influence of different mediums on the induction rate of etiolated 'Tainung No.17' pineapple shoots was tested. Plantlets cultured on the MSMO medium contained NAA had higher induction rate of etiolated shoots than those cultured on the MSMO medium without NAA after 8 weeks of culture in darkness. Base on the regeneration rate of lateral buds of the EMS treated etiolated plantlets, the treatment of 0.01% EMS 1hr was close to the LD₅₀. In the study of the proliferation of etiolated shoots, apical bud cuttings had an induction rate of 96.9% in 5 weeks of culture and lateral bud cutting had only 65.1% in 11 weeks of culture. The average number of nodes per shoot regenerated from apical bud cutting was 8.1, while lateral bud cutting had only 6 nodes per shoot. Segments of etiolated shoots were placed on MSMO medium and incubated in lightness. The lateral buds started to regenerate after 2 weeks of culture and then grew into new plantlets. This proliferation system of etiolated shoots could be utilized in the mutation breeding of pineapple.

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

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

