

'台農 4 號'鳳梨誘變育種之研究

陳 瑀 芳¹⁾ 陳 京 城²⁾

關鍵字：甲基磺酸乙酯、白化苗、離體培養

摘要：本研究以'台農 4 號'鳳梨組培苗為材料，探討甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate; EMS)誘變處理之最適條件。以組培小苗(5-8 mm)為誘變材料，0.6% EMS 處理 12、14、16 小時，存活率分別為 96.7%、76.7%、63.3%，然而若浸泡 18 小時，其存活率則僅有 20%，半致死率(LD₅₀)之處理時間應界於 16 至 18 小時。發根率方面，顯示出誘變處理時間愈長，植株恢復生長勢所需時間愈長。以組培大苗(4-5 cm)為誘變材料，經 EMS 處理後，進行暗期處理誘導白化苗，植株存活率隨著 EMS 濃度與處理時間增加而降低。組培白化苗方面，以 0.01%之 EMS 溶液，浸泡 1 小時植株存活率為 20.0%；對照組為 36.7%，具顯著差異。整體而言，經誘變處理後之各種培植體存活率均隨著 EMS 濃度與處理時間增加而降低。

前 言

鳳梨屬鳳梨科(Bromeliaceae)鳳梨屬(*Ananas*)之多年生草本單子葉植物，原產於南美洲，包括巴西中南部、阿根廷北部以及巴拉圭等地區(Hassan and Othman, 2011)，鳳梨為僅次於香蕉與芒果之全世界第三大熱帶果樹(FAO, 2012)。

鳳梨葉緣形態，主要可分為整片葉葉緣皆有刺之“spiny”、葉緣前端小部分有刺，而葉緣中段及基部均無刺之“spiny tip”，以及整片葉子葉緣均無刺、葉形狹長、葉背具有一層銀白色厚蠟粉，且葉緣由下往上捲曲之“piping”(Collins and Kerns, 1946; Collins 1960)。鳳梨葉緣之刺使農民於田間工作時必須身著厚實衣物以避免刺傷，影響田間操作，造成管理上的不便，故選育果實品質優良且葉緣無刺之鳳梨新品種，是鳳梨育種之一重要目標(Loison-cabot and Lacoecilhe, 1990; Chan, 1993; Suneerat, 2009)。台灣早年主要生產品種

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。

之一'台農 4 號'鳳梨，因其果肉纖維細緻、耐貯運、食用時可以手剝食，免削果皮之品種特性，曾經為外銷之主力品種(程等人，2002)。但因其整片葉緣皆有刺造成栽培管理上不便，降低果農栽培意願，致使栽培面積減少且逐漸被其他新育成如僅葉緣前端有刺之'台農 17 號'及整片葉均無刺之'台農 20 號'所取代(程等人，2002；林，2004)。若能利用育種方法選育出無刺之'台農 4 號'鳳梨，其栽培管理方便性與管理效率皆能提高，應可提升農民栽種意願。

誘變育種為使用物理或化學誘變劑以誘導植物染色體 DNA 產生變異，再於變異株之中篩選符合選拔目標之突變體(mutant)，進而得到新品種(李，1972；林及蔡，2005)。陳氏(2012)以台農 17 號鳳梨為材料，利用 EMS 誘變處理，選育出耐低溫之後代。本研究參考陳氏(2012)之方法，以'台農 4 號'鳳梨組培苗為材料，經 EMS 誘變劑處理，測試 EMS 濃度與處理時間之最適條件，以及誘變出少刺或無刺植株之可行性。

材料與方法

一、材料

(一)'台農 4 號'鳳梨初代培養

以'台農 4 號'鳳梨冠芽上之休眠芽進行初代培養。將冠芽上之葉片由基部至頂端依序剝除，露出短縮莖，然後以 1% 次氯酸鈉(Sodium hypochlorite)溶液添加 0.05% Tween 20，置入超音波震盪器震盪滅菌 15 分鐘。然後於無菌操作台上以無菌水清洗 3 次後，將冠芽上之休眠腋芽切下，放入生長培養基中培養；生長培養基：1/2 MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar，pH 調整至 5.8。培養條件為光強度 2500-3000 Lux、溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期為 16/8 (明/暗)小時。

(二)'台農 4 號'鳳梨繼代培養

培養於生長培養基之休眠芽萌芽後並生長至約 1 cm 長時轉移至增殖培養基進行芽體增殖培養；增殖培養基：1/2 MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar、0.2 ppm NAA (naphthaleneacetic acid)(Sigma)、2 ppm BA (6-benzylaminopurine)(Sigma)，pH 調整至 5.8。待培植體基部增生小芽且小芽長約 2 mm 時即視為一增殖新苗。將新苗切下並移入生長培養基中培養，待其生長至約 1 cm 長時再移至增殖培養基培養。利用上述重複循環增殖方式可培育出大量之'台農 4 號'組培苗，以供後續實驗之用。

(三) 試驗材料

1. '台農 4 號'鳳梨組培小苗

種植於生長培養基之'台農 4 號'鳳梨組培小苗植株生長至 5-8 mm 長時，將其根部及基部黃化葉片切除後，即可進行誘變處理。

2. '台農 4 號'鳳梨組培大苗

種植於生長培養基之'台農 4 號'鳳梨組培苗生長至 4-5 cm 長之大苗時，將根部切除，接著由基部最外層之葉片開始將葉片一片片剝除，而短縮莖中心處 1-2 片嫩葉則將其切短與短縮莖齊高，即可進行誘變處理。

3. '台農 4 號'鳳梨組培白化苗

種植於生長培養基之'台農 4 號'鳳梨組培苗生長至 4-5 cm 長時，將根部切除，接著由基部最外層之葉片開始將葉片一片片剝除，而短縮莖中心處 1-2 片嫩葉則將其切短與短縮莖齊高。將處理後之'台農 4 號'鳳梨組培大苗種植於指形瓶白化苗培養基且予以暗期培養，溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，以誘導出'台農 4 號'鳳梨組培白化苗，然後將白化苗每 2 個節位切成一段，進行誘變處理。

二、試驗方法

(一)'台農 4 號'鳳梨組培小苗

取'台農 4 號'鳳梨組培小苗，浸泡於濃度為 0.4% (v/v) 之甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate; EMS)(Sigma)溶液中，處理時間為 20、22、24 小時；0.6% (v/v) 之 EMS 溶液，處理時間為 12、14、16、18 小時。對照組以無菌水取代 EMS，處理時間為 12 小時。浸泡時皆行震盪培養，速度為 100 rpm、溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。處理後於無菌操作台上以無菌水清洗 3 次後，種植於生長培養基中培養，培養條件同初代培養。每 10 株小苗為一重複，每處理 3 重複。

(二)'台農 4 號'鳳梨組培大苗

取'台農 4 號'鳳梨組培大苗，浸泡於濃度為 0.2% (v/v) 之 EMS 溶液中，處理時間為 3、6、9、12、18、24 小時；0.3% (v/v) 之 EMS 溶液，處理時間為 4、6、8、12、16 小時；0.4% (v/v) 之 EMS 溶液，處理時間為 1、3、5、6、7、9、12 小時；0.6% (v/v) 之 EMS 溶液，處理時間為 1、2、4、6、8 小時。對照組以無菌水浸泡 1 小時。浸泡時皆行震盪培養，速度為 100 rpm、溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。處理後於無菌操作台上以無菌水清洗 3 次，種植於指形瓶白化苗培養基中；白化苗培養基：MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar、 $5\ \mu\text{M}$ NAA，pH 調整至 5.8 並予以暗期培養 6 週，溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。每 7 株大苗為一重複，每處理 3 重複。

(三)'台農 4 號'鳳梨組培白化苗

1. 第一次試驗：

取'台農 4 號'鳳梨組培白化苗，浸泡於濃度為 0.001% (v/v)、0.005% (v/v)、0.01% (v/v) 之 EMS 溶液中，處理時間 1 小時。對照組以無菌水浸泡 1 小時。浸泡時皆行震盪培養，速度為 100 rpm、溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。處理後於無菌操作台上以無菌水清洗 3 次，種植於全量生長培養基中；全量生長培養基：MS、3% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) agar，pH 調整至 5.8。培養條件同初代培養。每 10 段為一重複，每處理 3 重複。

2. 第二次試驗：

取'台農 4 號'鳳梨組培白化苗，浸泡於濃度為 0.005% (v/v)、0.01% (v/v)、0.015% (v/v) 之 EMS 溶液中，處理時間為 1、2 小時。對照組以無菌水浸泡 1 小時。浸泡時皆行震盪培

養，速度為 100 rpm、溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。處理後於無菌操作台上以無菌水清洗 3 次，種植於全量生長培養基中，培養條件同初代培養。每 10 段為一重複，每處理 3 重複。

三、調查項目與方法

(一)'台農 4 號'鳳梨組培小苗

1. 誘變處理後存活率調查：

誘變處理後 4 週進行植株存活率調查，當植株全株面積超過 80% 褐化、白化且不再生長即視為死亡。

2. 誘變處理後發根率調查：

誘變處理後分別於第 2 週、第 3 週及第 4 週進行植株發根率調查，當植株基部根長超過 1 mm 即視為發根。

(二)'台農 4 號'鳳梨組培大苗

誘變處理後存活率調查：

誘變處理後 6 週進行存活率調查，當節間抽出超過 3 節即視為存活。

(三)'台農 4 號'鳳梨組培白化苗

誘變處理後萌芽率調查：

誘變處理後 6 週進行萌芽率調查，當一莖段中其一側芽萌芽且生長出約 3 mm 的芽體時即視為萌芽。

結 果

'台農 4 號'鳳梨組培小苗經過不同濃度 EMS 溶液與處理時間之誘變處理後，其植株存活率情形如表 1 所示。EMS 0.4%，浸泡時間 20、22 小時，其存活率皆為 93.3%，而 EMS 0.6%，浸泡時間 12 小時其存活率為 96.7%，皆與對照組之間無顯著差異，而 EMS 0.4% 浸泡時間 24 小時、EMS 0.6%，浸泡時間 14 小時與 16 小時之處理組合存活率降至 83.3%、76.6%、63.3%，低於對照組，若 EMS 0.6%，浸泡時間增至 18 小時，存活率更降至 20.0%。'台農 4 號'鳳梨組培小苗經過不同濃度 EMS 溶液與浸泡時間之誘變處理後，其植株發根率情形如表 2 所示。處理後 2 週時，EMS 0.6%，浸泡時間 12 小時之處理其發根率高於其他處理組合，為 30.0%；對照組則全部發根。而 EMS 0.4%，浸泡時間 20 小時，發根率 6.7%，其他處理組合皆未發根。處理後 3 週之發根率，以 EMS 0.6%，浸泡時間 12 小時最高，為 90.0%；EMS 0.6%，浸泡時間 16、18 小時之發根率最低，分別為 6.7% 與 0%。而 EMS 0.4%，浸泡時間 20、22、24 小時之發根率分別為 43.3%、40.0% 與 40.0%。EMS 0.6%，浸泡時間為 14 小時之發根率為 53.3%。處理後 4 週時，EMS 0.4%，浸泡時間 20、22、24 小時之發根率為 70.0%、80.0%、70.0%；EMS 0.6%，浸泡時間 12、14 小時之發根率為 96.7%、76.7%。而 EMS 0.6%，浸泡時間 16、18 小時之發根率較其他處理組合為低，降至為 40.0% 與 10.0%。

表 1. 不同 EMS 濃度及處理時間對'台農 4 號'鳳梨組培小苗存活率之影響

Table 1. Effects of different EMS concentrations and treatment durations on the survival percentage of 'Tainung No.4' pineapple plantlets cultured *in vitro*.

EMS (%)	Duration (hr)	Survival (%) ^z		
H ₂ O (CK)	12	100.0	± 0.0 ^y	a ^x
0.4	20	93.3	± 11.5	ab
0.4	22	93.3	± 5.8	ab
0.4	24	83.3	± 11.5	b
0.6	12	96.7	± 5.8	ab
0.6	14	76.7	± 5.8	bc
0.6	16	63.3	± 5.8	c
0.6	18	20.0	± 10.0	d

^zThe percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants) × 100%. Ten plantlets per replicates, 3 replicates per treatment. Plantlets were cultured for 4 weeks before evaluation.

^yMean ± standard deviation.

^xMean separation by Least Significant Difference (LSD) test, P=0.05.

表 2. 不同 EMS 濃度及處理時間對'台農 4 號'鳳梨組培小苗發根率之影響

Table 2. Effects of different EMS concentrations and treatment durations on the rooting percentage of 'Tainung No.4' pineapple plantlets cultured *in vitro*.

EMS (%)	Duration (hr)	Rooting (%) ^z								
		2 weeks		3 weeks		4 weeks				
H ₂ O (CK)	12	100.0	± 0.0	a	100.0	± 0.0	a	100.0	± 0.0 ^y	a ^x
0.4	20	6.7	± 11.5	c	43.3	± 25.2	b	70.0	± 17.3	b
0.4	22	0.0	± 0.0	c	40.0	± 10.0	b	80.0	± 17.3	ab
0.4	24	0.0	± 0.0	c	40.0	± 10.0	b	70.0	± 17.3	b
0.6	12	30.0	± 17.3	b	90.0	± 10.0	a	96.7	± 5.8	ab
0.6	14	0.0	± 0.0	c	53.3	± 5.8	b	76.7	± 5.8	b
0.6	16	0.0	± 0.0	c	6.7	± 11.5	c	40.0	± 10.0	c
0.6	18	0.0	± 0.0	c	0.0	± 0.0	c	10.0	± 10.0	d

^zThe percentage of rooting = (the number of rooted explants / the total number of explants) × 100%. Ten plantlets per replicates, 3 replicates per treatment. Plantlets were cultured for 4 weeks before evaluation.

^yMean ± standard deviation.

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

'台農 4 號'鳳梨組培大苗經過不同濃度 EMS 溶液與浸泡時間之誘變處理後，其植株存活率情形如表 3 所示。對照組存活率為 100%，而 EMS 0.2%，浸泡時間 3、6、9 小時，植株存活率分別為 85.7%、61.9%、52.4%；而浸泡時間達 12 小時以上，植株全部死亡。

表 3. 不同 EMS 濃度及處理時間對'台農 4 號'鳳梨組培大苗存活率之影響

Table 3. Effects of different EMS concentrations and treatment durations on the survival percentage of 'Tainung No.4' pineapple large plantlets cultured *in vitro*.

EMS (%)	Duration (hr)	Survival (%) ^z		
H ₂ O (CK)	1	100.0	± 0.0 ^y	a ^x
0.2	3	85.7	± 14.3	b
0.2	6	61.9	± 21.8	cd
0.2	9	52.4	± 16.5	d
0.2	12	0.0	± 0.0	g
0.2	18	0.0	± 0.0	g
0.2	24	0.0	± 0.0	g
0.3	4	38.1	± 8.3	e
0.3	6	9.5	± 16.5	fg
0.3	8	0.0	± 0.0	g
0.3	12	0.0	± 0.0	g
0.3	16	0.0	± 0.0	g
0.4	1	61.9	± 8.3	cd
0.4	3	14.3	± 0.0	f
0.4	5	0.0	± 0.0	g
0.4	6	0.0	± 0.0	g
0.4	7	0.0	± 0.0	g
0.4	9	0.0	± 0.0	g
0.4	12	0.0	± 0.0	g
0.6	1	71.4	± 14.3	c
0.6	2	28.6	± 0.0	e
0.6	4	0.0	± 0.0	g
0.6	6	0.0	± 0.0	g
0.6	8	0.0	± 0.0	g

^zThe percentage of survival = (the number of survived explants / the total number of explants) × 100%. Seven plantlets per replicates, 3 replicates per treatment. Plantlets were cultured for 6 weeks before evaluation.

^y Mean ± standard deviation.

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

EMS 0.3%，浸泡時間 4、6 小時，植株存活率為 38.1%、9.5%；浸泡時間至 8 小時以上，植株全部死亡。EMS 0.4%，浸泡時間 1、3 小時，植株存活率為 61.9%、14.3%；浸泡時間至 5 小時以上，植株全部死亡。EMS 0.6%，浸泡時間 1、2 小時，植株存活率為 71.4%、28.6%；浸泡時間至 4 小時以上，植株全部死亡。

'台農 4 號'鳳梨組培白化苗經過不同濃度 EMS 溶液與不同浸泡時間之誘變處理後，其植株萌芽率情形如表 4 及表 5 所示。第一次試驗使用培養 6 週之白化苗，EMS 濃度分別為 0.001%、0.005%，浸泡時間為 1 小時，植株萌芽率為 33.3%、36.7%與對照組之 36.7%無顯著差異，而 EMS 0.01% 處理 1 小時萌芽率降至 20.0%。第二次試驗使用培養 10 週之白化苗，EMS 濃度為 0.005%、0.01%、0.015%，浸泡時間 1 小時，植株萌芽率分別為 50.0%、50.0%、36.7%；而浸泡時間 2 小時，植株萌芽率為 53.3%、50.0%、53.3%，對照組為 73.3%。除了以 EMS 0.015% 浸泡 1 小時之處理其萌芽率較低外，其他處理組合與對照組間無顯著差異。

表 4. 不同 EMS 濃度及處理時間對'台農 4 號'鳳梨組培白化苗萌芽率之影響

Table 4. Effects of different EMS concentrations and treatment durations on the regeneration percentage of 'Tainung No.4' pineapple etiolated plantlets cultured *in vitro*.

EMS (%)	Duration (hr)	Regeneration (%) ^z
H ₂ O (CK)	1	36.7 ± 15.3 ^y a ^x
0.001	1	33.3 ± 5.8 ab
0.005	1	36.7 ± 5.8 a
0.01	1	20.0 ± 0.0 b

^zThe percentage of regeneration = (the number of regenerated explants / the total number of explants) × 100%. Ten plantlets per replicates, 3 replicates per treatment. Plantlets were cultured for 6 weeks before evaluation.

^yMean ± standard deviation.

^xMean separation by Least Significant Difference (LSD) test, P=0.05.

討 論

EMS 為最常被使用的化學誘變劑之一，其可造成單一點突變(point mutation)，使得鹼基配對改變，進而改變基因序列(李，1972；范及盧，1981)。以 EMS 誘變植株其存活率與 EMS 溶液之濃度與浸泡時間相關，一般隨著 EMS 濃度與浸泡時間增加，植株存活率隨之降低(Bhagwat and Duncan, 1998；Latado *et al.*, 2004；Fang and Traore, 2011)。

表 5. 不同 EMS 濃度及處理時間對'台農 4 號'鳳梨組培白化苗萌芽率之影響

Table 5. Effects of different EMS concentrations and treatment durations on the regeneration percentage of 'Tainung No.4' pineapple etiolated plantlets cultured *in vitro*.

EMS (%)	Duration (hr)	Regeneration (%) ^z
H ₂ O (CK)	1	73.3 ± 15.3 ^y a ^x
0.005	1	50.0 ± 26.5 ab
0.005	2	53.3 ± 15.3 ab
0.01	1	50.0 ± 20.0 ab
0.01	2	50.0 ± 20.0 ab
0.015	1	36.7 ± 15.3 b
0.015	2	53.3 ± 15.3 ab

^zThe percentage of regeneration = (the number of regenerated explants / the total number of explants) × 100%. Ten plantlets per replicates, 3 replicates per treatment. Plantlets were cultured for 6 weeks before evaluation.

^yMean ± standard deviation.

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

本研究以 0.4%、0.6%之 EMS 溶液處理'台農 4 號'組培小苗，得出即使以 EMS 濃度 0.4%、浸泡 24 小時處理植株，其存活率依然高達 83.3%，但 0.6%之 EMS 處理則隨著時間增長，植株存活率逐漸下降(表 1)。小苗誘變後之發根率方面，植株經誘變後 3 週可看出不同處理發根率之差異，且相同 EMS 濃度處理，浸泡時間愈長，植株發根愈晚(表 2、表 7)，顯示處理時間愈長，植株恢復生長勢所需時間愈長，而經誘變處理後 4 週，存活植株皆已恢復生長勢。在選擇適當之 EMS 濃度與處理時間，一般可選擇接近對照組存活率一半之處理組合，即半致死率(LD₅₀) (Latado *et al.*, 2004; Benjavad Talebi *et al.*, 2012; Bidabadi *et al.*, 2012; Aslam *et al.*, 2013)。本研究顯示'台農 4 號'組培小苗誘變試驗，接近半致死率之處理組合為 EMS 濃度 0.6%，浸泡時間 16 至 18 小時(表 1)。

以不同濃度之 EMS 誘變'台農 4 號'鳳梨組培大苗，其植株存活率亦與處理濃度與時間相關。以 0.2% EMS 浸泡 12 小時以上，0.3% EMS 浸泡 8 小時以上，0.4% EMS 浸泡 5 小時以上，及 0.4% EMS 浸泡 4 小時以上，其植株全部死亡(表 3)。因此，可利用濃度(C)與時間(T)之乘積(CT)以推估'台農 4 號'組培大苗存活之臨界處理條件。本研究中，EMS 濃度與時間之 CT 值 2.4 為'台農 4 號'組培大苗存活率之臨界處理條件，CT 值超過 2.4 之處理組合，植株存活率為 0 (表 3)，因此，臨界 CT 值可作為後續試驗設計處理濃度與時間時之參考。

利用不同濃度之 EMS 誘變'台農 4 號'鳳梨組培白化苗，濃度分別為 0.001%、0.005%、

0.01%之 EMS 溶液，僅 0.01%浸泡 1 小時植株萌芽率降至 20.0%，其餘處理萌芽率約在 33.3%至 36.7%之間(表 4)。以 0.005%、0.01%、0.015%之 EMS 溶液浸泡處理 1 及 2 小時，僅 EMS 0.015%浸泡 1 小時之萌芽率為 36.7%，其他組合則在 50.0%至 53.3%之間(表 5)，推測出半致死率(LD₅₀)之處理濃度可選擇 EMS 濃度 0.015%以上，浸泡時間 2 小時以上之處理組合。而比較不同培養週數之白化苗做為試驗材料，以培養 10 週之白化苗其對照組之萌芽率為 73.3%(表 5)，而培養 6 週之白化苗其對照組萌芽率為 36.7%(表 4)，顯示出培養時間愈長，使得植株生長茁壯，白化苗之萌芽率亦較高，未來試驗之處理條件可選擇培養 10 週之白化苗，EMS 濃度為 0.015%以上，浸泡時間可在 2 小時以上。

若以相同濃度 EMS 進行誘變處理，如 0.4% EMS 組培小苗浸泡時間達 24 小時，其存活率仍為 83.3%，而相同濃度下，組培大苗則浸泡時間 3 小時，其存活率僅剩 14.3%。0.6% EMS 組培小苗浸泡時間為 18 小時，其存活率仍有 20.0%，組培大苗只要浸泡 4 小時以上，植株全部死亡(表 1、表 3)。本研究試驗之白化苗 EMS 誘變濃度又較小苗、大苗為低，顯示出三種型態之誘變材料以小苗之生長勢較強，不易受 EMS 影響造成死亡，大苗植株雖大，但因須拔除葉片露出短縮莖，且處理後加以暗期處理致使存活率較低，而白化苗較其它材料又更為幼嫩。以'台農 4 號'組培小苗做為誘變材料，雖可在鳳梨組培初代利用生長培養基、增殖培養基快速得到符合誘變標準之組培小苗做為材料，但因小苗繁殖方式是以切口處體細胞直接誘導器官發生之方式增殖，經誘變後，若要增殖經誘變選拔出的小苗，以增殖培養基培養出之後代若為從切口處體細胞直接器官發生而來，無法正確分辨後代來源是從經誘變後的細胞而來或是由未誘變之細胞而來。另外，若於誘變後當代即產生變異，因變異細胞為莖頂分生細胞誘變而來，亦無法利用植株切口處之體細胞直接器官發生增殖出具誘變之後代。為改善因後代不易追溯或不易繁殖之問題，發展出組培大苗之誘變方式，以鳳梨短縮莖之莖頂分生細胞做為誘變目標，誘變處理後再以遮光方式讓莖頂伸長，誘導出白化苗(Kiss *et al.*, 1995; Barboza and Caldas, 2001)。且白化苗上之新梢皆為原本短縮莖上莖頂分生細胞發育而來，相較於小苗誘變材料更易追蹤後代，可將新梢切下再以照光培養後，即可長成正常之鳳梨植株。直接使用誘導出之白化苗做為誘變材料，因材料取得需要更長時間、須選擇苗體粗細一致，且因白化苗較其他材料更為幼嫩，在 EMS 濃度選擇與浸泡間上需更為謹慎。誘變試驗直接以白化苗做為誘變材料，具有芽體清楚可直接誘變到目標之優點，但因材料製備上準備時間較長且 EMS 濃度與處理時間尚未找到植株之半致死率(LD₅₀)，若能克服材料準備與選擇上之障礙，則可多嘗試各種不同濃度與處理時間之組合，以白化苗做為誘變材料應是最易追溯誘變來源之方法。

本研究利用'台農 4 號'鳳梨組培苗為誘變材料進行之誘變試驗中，已獲得具有葉緣部分有刺及葉緣少刺之植株(圖 1)，將來擴大誘變處理之樣品數，應可獲得更多葉緣少刺，甚至完全無刺之植株。



圖 1. 經 EMS 誘變出之部分有刺(左)及少刺(右)'台農 4 號'小苗。

Fig. 1. Scallop spines (left) and few spines (right) of 'Tainung No. 4' pineapple plantlets derived from EMS mutation induction.

參 考 文 獻

- 李文權。1972。烷類誘變劑(Alkylating agents)的作用及其誘變效果。科學農業 20: 229-242。
- 林榮貴。2004。鳳梨新品種台農 20 號(牛奶鳳梨)之介紹。農業試驗所技術服務 60: 20-22。
- 林學詩、蔡月夏。2005。結合組織培養與放射線照射誘導鳳梨變異之研究。中國園藝 51: 241-248。
- 范基南、盧英權。1981。Sodium Azide 與 EMS 對大麥誘變效果之比較。科學農業 29:61-65。
- 程永雄、黃子彬、徐信次、鄭清煥、呂明雄。2002。農業推廣教材—鳳梨栽培管理技術。行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所。嘉義，臺灣。
- 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。
- Aslam, U., A. A. Khan, H. M. N. Cheema, F. Imtiaz, and W. Malik. 2013. Kill curve analysis and response of ethyl methanesulfonate and γ -rays in diploid and tetraploid cotton. Int. J. Agric. Biol. 15: 11-18.
- Barboza, S. B. S. C. and L. S. Caldas. 2001. Etiolation and regeneration in the *in vitro* multiplication of hybrid PE \times 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. Hort. 73: 11-22.
- Bidabadi, S. S., S. Meon, Z. Wahab, S. Subramaniam, and M. Mahmood. 2012. Induced

- mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). *AJCS* 6: 391-401.
- Chan, Y. K. 1993. Recent advancements in hybridization and selection of pineapple in Malaysia. *Acta Hort.* 334: 33-45.
- Collins, J. L. 1960. The pineapple botany, cultivation, and utilization. Interscience. New York.
- Collins, J. L. and K. R. Kerns. 1946. Inheritance of three leaf types in the pineapple. *J. Hered.* 37: 123-128.
- Fang, J. Y. and S. Traore. 2011. In vitro mutation induction of *Saintpaulia* using ethyl methanesulfonate. *HortScience* 46: 981-984.
- FAO. 2012. World pineapple production quantity. <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>
- Hassan, A. and Z. Othman. 2011. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.), p. 194-217. In: E.M. Yahia (ed.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. vol 4. Woodhead. Cambridge.
- Kiss, E., J. Kiss, G. Gyulai, and L. E. Heszky. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience* 30: 127-129.
- Latado, R. R., A. H. Adames, and A. Tulmann Neto. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 103-106.
- Loison-Cabot, C. and J. J. Lacoeyuilhe. 1990. A genetic hybridization programme for improving pineapple quality. *Acta Hort.* 275: 395-401.
- Suneerat, S. 2009. Pineapple hybridization and selection in Thailand. *Acta Hort.* 822: 57-62.
- Talebi, A. B., A. B. Talebi, and B. Shahrokhifar. 2012. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. *Amer. J. Plant Sci.* 3: 1661-1665.

Studies on Mutation Breeding of 'Tainung No. 4' Pineapple

Yu-Fang Chen ¹⁾ Ching-Cheng Chen ²⁾

Key words: EMS (ethyl methanesulphonate), etiolated plantlets, *in vitro* culture

Summary

The effects of using EMS (ethyl methanesulphonate) as a mutagen on the survival rate of 'Tainung No. 4' pineapple plantlets cultured *in vitro* were examined. The survival rate of plantlets (5-8 mm) in the treatments of 0.6% EMS 12hr, 14 hr and 16 hr were 96.7%, 76.7% and 63.3%, respectively. However, in the treatment of 0.6% EMS 18 hr, the survival rate decreased to 20%. The LD₅₀ treatment should be 0.6% EMS and duration between 16 hr and 18 hr. The growth vigor recovered slowly with increased treatment duration by evaluating the rooting rate of plantlets. Large plantlets (4-5 cm) were treated with EMS followed by dark treatment to induce etiolated plantlets. The survival rate of large plantlets decreased with increased EMS concentration and treatment duration. The survival rate of etiolated plantlets in the treatment of 0.01% EMS 1hr was 20.0%, and that of the control was 36.7%. There were significant difference between two treatments. In summary, the survival rate of different plantlets decreased when EMS concentration and treatment duration increased.

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.