

## 組織培養鳳梨植株葉緣刺變異之研究

林 孟 璇<sup>1)</sup> 陳 京 城<sup>2)</sup>

關鍵字：葉緣刺、鳳梨、RAPD

**摘要：**本研究主要調查不同品種鳳梨在相同培養條件下之增殖倍率，以及在不同組織培養方式下，增殖植株之葉緣刺變異情形，並以 RAPD 分子標誌分析植株遺傳歧異度。試驗結果顯示，在相同之培養條件下，不同鳳梨品種之增殖倍率明顯不同；'台農 4 號'繁殖倍率最低 0.6 倍，而'MD-2'繁殖倍率最高 5.8 倍。就兩種不同繁殖方式及繼代次數而言，增殖培養之植株隨著繼代次數增加，葉緣刺變異率也隨之上升，同一繼代次數不同品種間之葉緣刺變異率差異很大，增殖第 2 代(V<sub>2</sub>)之平均值以'台農 17 號'之 89.71% 最高，而'MD-2'最低只有 12.48%。在芽球培養的部分，'台農 11 號'及'台農 13 號'之葉緣刺變異率有隨著繼代次數增加而增加之趨勢；而'台農 17 號'不同世代間之變異率差異不顯著；'MD-2'之葉緣刺變異率非常高，介於 73.2-92.18% 之間。經 RAPD 分析，不論是增殖或芽球培養的方式，隨著繼代次數的增加，遺傳相似度降低，因此建議欲進行鳳梨組織培養增殖植株時，繼代次數不宜太多，以免造成葉片全緣有刺之植株增加。

### 前 言

鳳梨 (*Ananas comosus* L.Merr.) 屬於鳳梨科 (Bromeliaceae) 鳳梨屬 (*Ananas*) 多年生之草本熱帶果樹，目前台灣鳳梨的栽培面積約為 11,746 頃，主要種植地區分佈在台灣西南部，為南投縣、嘉義縣、臺南市、高雄市及屏東縣 (農業統計年報，2020)。

傳統的鳳梨繁殖方式費力且耗時，而組織培養能在短時間內生產大量且一致的苗株 (Firoozabady and Gutterson, 2003)。鳳梨組織培養雖然能快速增殖苗株，但植株極易產生變異，且所需技術性及設備成本均較高。體細胞變異之產生可能為植株培養前已發生變異，或組織培養過程中引起之變異 (Bairu *et al.*, 2011)。變異之植株可能因染色體倍性改變、染色體變異、嵌合體的產生或 DNA 甲基化等改變而造成植株及母株性狀之差異 (Karp, 1994；

---

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。

Bairu *et al.*, 2011; Bednarek and Orłowska, 2020)。瞭解影響鳳梨組織培養之體細胞變異的原因，能更方便快速生產大量且性狀一致之苗株。

近年來分子生物技術興起，改變以肉眼可見之植株外觀特徵當作遺傳標誌因子的分類方式，目前多以研究 DNA 分子標誌為主。在農業上之應用主要可分為植物之品種鑑定、種子純度品質鑑定、檢測基因轉殖之作物、基因定位及輔助育種之選拔等 (陳及吳, 2007)。常見的 DNA 分子標誌有 RFLP、RAPD、AFLP、ISSR、SSR 及 SNP 等方式 (Newton *et al.*, 1999; Tingey and Tufo, 1993; Brookes, 1999; Maughan *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 2002; Semagn *et al.*, 2006)。其中 RAPD 可不用事前瞭解 DNA 之序列，需要之 DNA 量少、多型性高且迅速簡便又花費少，因此常被用以進行目標作物之選拔及分析遺傳歧異度 (Soneji *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2015)。

本研究主要目的在於測試'台農 11 號'、'台農 13 號'、'台農 17 號'及'MD-2'等 4 個鳳梨品種，經由芽體直接再生與經由芽球增殖等兩種不同組織培養繁殖方式，經過繼代培養後所獲得之植株，計算其葉緣刺之變異率，之後利用 RAPD 分子標誌技術，分析其不同繼代次數之植株的遺傳歧異度。

## 材 料 與 方 法

### 試驗一、不同品種鳳梨之組織培養增殖

#### (一) 材料

以組織培養繼代 2 次以上之'台農 4 號'(TN4)、『台農 11 號』(TN11)、『台農 13 號』(TN13)、『台農 17 號』(TN17)、『台農 20 號』(TN20)及'MD-2'(MD2)鳳梨組培苗，高度約 4-5 cm 之苗株為材料。

#### (二) 方法

將苗株剝除外圍較老之葉片，留約 4-5 片葉，將其根與 1/2 至 1/3 之葉片前端部分切除，放入增殖培養基 (proliferation medium) 中，培養基成分為 1/2 M S (Murashige and Skoog basal salt)、3% sucrose、2 ppm BA (6-benzyladenine)、0.2 ppm NAA (naphthaleneacetic acid)、0.8% agar，pH=5.8。培養條件為  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照強度為 3,000 lux，光週期為 16/8(明/暗)小時，培養 1 個月後進行調查。

### 試驗二、不同組織培養方式及繼代次數之鳳梨葉緣刺變異率分析

#### (一) 材料

組培室中繼代 2 次以上之'TN11'、'TN13'、'TN17'及'MD2'鳳梨組培苗，高度約 4-5 cm 之苗株。

#### (二) 試驗設計

利用兩種不同成分之培養基，分別為增殖培養基及芽球 (bud cluster medium) 培養基，將 4 個不同品種的鳳梨植株進行繁殖，增殖培養時間為 6 個月，共增殖兩代分別為 V<sub>1</sub> 及 V<sub>2</sub>；芽球培養時間為 1.5 個月，共增殖 4 代分別為 V<sub>1</sub>、V<sub>2</sub>、V<sub>3</sub> 及 V<sub>4</sub>，爾後將植株移至生長培養基 (growth medium) 中，培養基成分為 1/2 MS、3% sucrose、0.8% agar，pH = 5.8。待植株長至 6 cm 以上出瓶，當植株出瓶後葉片長 10 cm 以上時進行葉緣刺之調查。

### (三) 方法

#### 1. 增殖培養

每一品種選 4 株生長良好之苗株為培植體，將苗株剝除外圍較老之葉片，留 4-5 片葉，將其根與 1/2 至 1/3 之葉片前端部分切除，放入增殖培養基中，培養基成分同試驗一、(二) 方法。培養條件為 26.0 ± 1°C，光照強度為 3000 lux，光週期為 16/8 (明/暗) 小時，每 3 個月更換一次培養基，培養 6 個月後，將每一培植體長出之小芽分割 4 株移至生長培養基中培養 1 個月，待植株生長至 4-5 cm 時，再移至增殖培養基 (V<sub>2</sub>)，而每一培植體剩餘之小芽移至生長培養基中繼續培養 (V<sub>1</sub>)。

#### 2. 芽球培養

將苗株剝除外圍較老之葉片，留約 4-5 片葉，將其根與 1/2 至 1/3 之葉片前端切除，放入芽球培養基中，培養基成分為 1/2 MS、3% sucrose、16 ppm BA、1 ppm NAA、0.8% agar，pH = 5.8。培養條件為 26 ± 1°C，光照強度約 3000 lux，光週期為 16/8 (明/暗) 小時。培養 6 週後切下培植體基部膨大組織，分割成長、寬約為 0.5-0.8 mm 之塊狀體，一半放入生長培養基中培養，一半放入芽球培養基中繼續增殖，共增殖 4 代，'TN11'、'TN17' 及 'MD2' 每一世代 5 重複，'TN13' 每一世代 4 重複。

#### 3. 生長培養

當植株在芽球培養基中培養 1.5 個月後，或在增殖培養基中培養 6 個月後，將植株移入 1/2 MS 之生長培養基 (growth medium) 中繼續培養，培養基成分為 1/2 MS、3% sucrose、0.8% agar，pH = 5.8。

#### 4. 出瓶

當植株高度約 6 cm 以上時，將其出瓶移植至 72 格穴盤中，栽培介質為泥炭土：珍珠石：蛭石 = 2：1：1，先在室內進行健化約 1 個月後，再移至網室繼續培養。

### (四) RAPD 分析

#### 1. Genomic DNA 萃取

稱取 1 g 之葉片基部白色嫩組織放入研鉢中，加入液態氮將樣品研磨至粉狀，以 Plant Genomic DNA Mini Kit (Viogene) 進行 genomic DNA 萃取。每一世代各取 3 株進行分析。

#### 2. 引子選用

選用已經測試可產生較多明顯條帶之 Operon RAPD 引子共 6 支進行分析；引子包括 OPG-03、OPJ-19、OPH-03、OPAF-11、OPAG-06 及 OPAG-08。

#### 3. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 反應溶液包含 25 ng genomic DNA、2.5 mM Buffer、1 unit Taq DNA polymerase、0.2 mM dNTP 及 1.0  $\mu$ M primer，最後以無菌水將其溶液定量至 25  $\mu$ l。以 DNA 聚合酶反應器(機型：Gene Amp PCR System 2700)進行 PCR，反應條件為 94°C 6 min，接著以 94°C 45sec、40°C 45 sec、72°C 1 min 為一循環，共進行 35 次循環，最後做 72°C 7 min 的 extension 反應，最終存於 4°C 之下。

#### 4. DNA 瓊脂凝膠

使用 agarose 粉末(agarose ITM, AMERSCO)加熱溶於 0.5X TBE Buffer (Tris-Borate-EDTA Buffer, Biomate)配置成 1.2% 瓊脂溶液。待瓊脂溶液降溫至約 50~60°C 時，加入 0.05  $\mu$ l/ml EtBr (ethidium bromide, USB)並混合均勻，倒入電泳槽鑄膠模型並插上齒梳，待膠片凝固後備用。將膠片固定於含有 0.5X TBE Buffer 之迷你水平電泳槽 (MJ-105 Mini Horizontal Gel Electrophoresis System, MAJOR SCIENCE)，添加 0.5X TBE Buffer 至液體淹過膠片為止。取 PCR 產物與 6X dye (0.05% bromophenol blue 及 30% glycerol)混合均勻，注入膠片樣品槽裡。同時注入 100bp DNA ladder (Cat#AM0091, Able-Biochemical)作為對照組比對。利用 70 伏特進行電泳，待電泳完成後將膠片置於 UV 燈下 (Vilber Lourmat)進行 DNA 膠片顯影分析。

#### 5. 相似度分析

根據 DNA 膠片顯影的結果進行條帶分析，選取明顯之條帶製作 DNA 條帶圖譜，有出現的條帶標記“+”，反之則標記“-”。相似度依照 Nei 及 Li (1972)的計算方法，其公式為： $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ， $S_{xy}$  為相似度， $N_{xy}$  表示比較 X、Y 個體皆有之條帶， $N_x$  表示 X 個體所擁有之條帶數， $N_y$  則為 Y 個體自有之條帶數。

## 結 果

### 試驗一、不同品種鳳梨之組織培養增殖

將 6 個不同品種之鳳梨苗放入增殖培養基中增殖一個月，其增殖倍率如表 1 所示，'MD2'有最高的繁殖倍率 5.8 倍，而'TN4'有最低的繁殖倍率 0.6 倍。增殖一個月後的培植體如圖 1 所示，'TN4'在短縮莖處幾乎沒有增生的白色組織，而是芽體直接增生，且觀察到 6 個品種中唯有'TN4'有根系的生長。目測'TN13'之基部增生組織最多，而'MD2'之增生芽體最多且密集。'MD2'屬於葉片尖端有刺之品種，'TN20'為白邊型葉緣無刺之品種，而'TN4'為葉片全緣有刺之品種，從試驗結果得知，在相同之培養條件下，不同鳳梨品種之增殖倍率明顯不同，顯示遺傳特性是決定鳳梨離體培養效率之重要影響因子。

表 1. 增殖培養基對不同品種鳳梨離體增殖培養之倍率影響

Table 1. Effect of proliferation medium on the multiplication rate of plantlets of different pineapple cultivars cultured *in vitro*.

Cultivar	Multiplication rate <sup>z</sup>
TN4	0.60 ± 0.89 <sup>y</sup> c <sup>x</sup>
TN11	1.80 ± 1.80 bc
TN13	3.00 ± 1.00 b
TN17	3.80 ± 1.64 b
TN20	5.60 ± 2.41 a
MD2	5.80 ± 1.64 a

<sup>z</sup> Multiplication rate was recorded after four weeks of cultivation.

<sup>y</sup> Mean ± standard deviation (n=5).

<sup>x</sup> Mean separation within the column by Least Significant Difference (LSD) test, P<0.05.

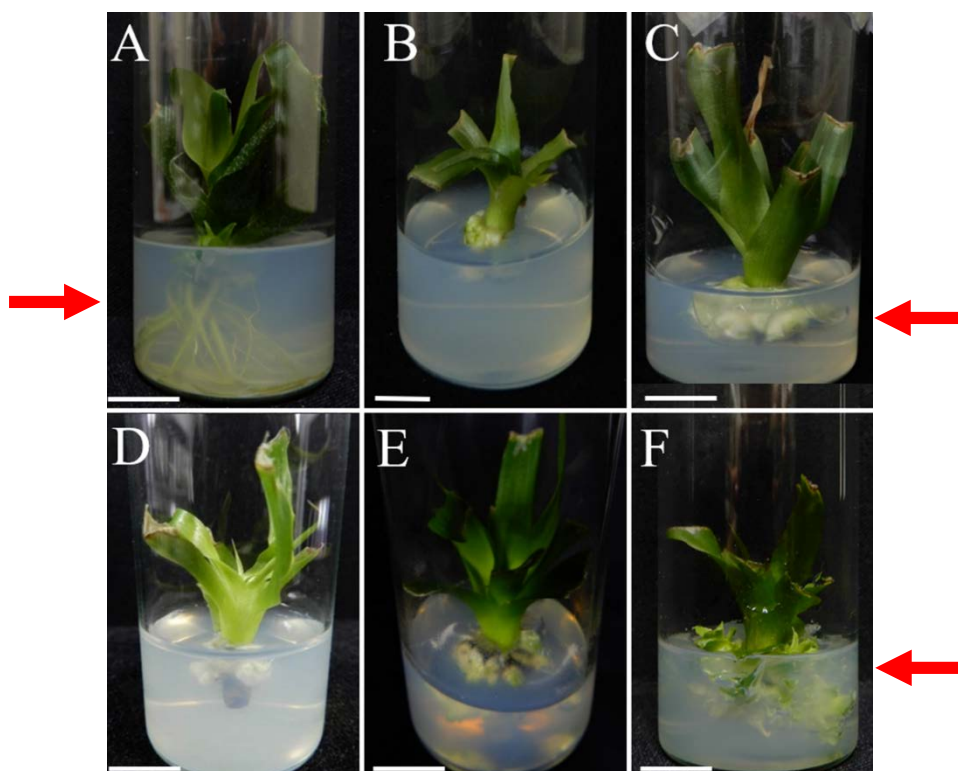


圖 1. 不同品種鳳梨植株在增殖培養基中培養 4 週之情形。

Fig. 1. Different cultivars of pineapple plantlet cultured in the proliferation medium for 4 weeks.

A: TN4; B: TN11; C: TN13; D: TN17; E: TN20; F: MD2 (bar = 1 cm).

## 試驗二、不同組織培養方式及繼代次數之鳳梨葉緣刺變異率分析

### (一)葉緣刺變異率

#### 1.增殖培養

不同繼代次數增殖培養之植株的葉緣刺變異率如表 2 所示，'TN11' V<sub>1</sub> 之葉緣刺變異率為 43.95%，V<sub>2</sub> rep 1-V<sub>2</sub> rep 4 之葉緣刺變異率介於 29.98%-70.05%，平均 44.82%。'TN13' V<sub>1</sub> 之葉緣刺變異率為 5.05%，V<sub>2</sub> rep 1-V<sub>2</sub> rep 4 之葉緣刺變異率介於 16.15%-87.13%，平均 39.13%。'TN17' V<sub>1</sub> 之葉緣刺變異率為 73.83%，V<sub>2</sub> rep 1-V<sub>2</sub> rep 4 之葉緣刺變異率為 87.83%-91.03%，平均 89.71%。'MD2' V<sub>1</sub> 之葉緣刺變異率為 7.78%，V<sub>2</sub> rep 1-V<sub>2</sub> rep 4 之葉緣刺變異率為 7.45%-17.63%，平均 12.48%。4 個品種之平均變異率排序為：'TN17' > 'TN11' > 'TN13' > 'MD2'。

#### 2.芽球培養

不同繼代次數芽球培養之植株的葉緣刺變異率如表 3 所示，'TN11' V<sub>1</sub>-V<sub>4</sub> 之葉緣刺變異率介於 16.62%-56.92%，其中以 V<sub>4</sub> 之變異率最高，葉緣刺變異率有隨著繼代次數增加而增長之趨勢。'TN13' V<sub>1</sub>-V<sub>4</sub> 之葉緣刺變異率為 5.2%-21.75%，其中以 V<sub>4</sub> 之變異率最高，葉緣刺變異率也有隨著繼代次數增加而增長之趨勢。'TN17' V<sub>1</sub>-V<sub>4</sub> 之葉緣刺變異率為 0%-5.46%，變異率很接近，不同世代間無顯著差異。'MD2' V<sub>1</sub>-V<sub>4</sub> 之葉緣刺變異率非常高，介於 73.2%-92.18%之間。4 個品種之變異率排序為：'MD2' > 'TN11' > 'TN13' > 'TN17'。

### (二)RAPD 之分析

#### 1.增殖培養

'TN11'之增殖培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數 55 條，其中有 7 條為多型性條帶，佔總條帶數的 12.73% (表 4)，6 支引子中有 2 支具有多型性，佔總引子數的 33.33%。OPAG-06 產生之總條帶數為 12 條，產生 3 條多型性條帶。OPAG-08 產生之總條帶數為 11 條，產生 4 條多型性條帶。經 RAPD 分析後之相似度如表 6 所示，V<sub>1</sub> 平均相似度為 93.94%，V<sub>2</sub> 與 V<sub>1</sub> 相比之平均相似度分別為 V<sub>2a</sub> 93.13%、V<sub>2b</sub> 92.32% 及 V<sub>2c</sub> 92.53%。

'TN17'之增殖培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數 49 條，其中有 6 條為多型性條帶，佔總條帶數的 12.24% (表 4)，6 支引子中有 2 支具有多型性，佔總引子數的 33.33%。OPG-03 產生之總條帶數為 12 條，產生 4 條多型性條帶；OPAG-06 產生之總條帶數為 10 條，產生 2 條多型性條帶。經 RAPD 分析後之相似度如表 6 所示，V<sub>1</sub> 平均相似度為 100%，V<sub>2</sub> 與 V<sub>1</sub> 相比之平均相似度分別為 V<sub>2a</sub> 97.96%、V<sub>2b</sub> 94.56% 及 V<sub>2c</sub> 98.64%。

'TN13'及'MD2'之增殖培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數為 52 條及 43 條，均無多型性條帶產生 (表 4)。

#### 2.芽球培養

'TN11'之芽球培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數 49 條，其中有 7 條為多型性條帶，佔總條帶數的 14.29% (表 5)，6 支引子中有 2 支具有多型性，佔總引子數的 33.33%。OPJ-19 產生之總條帶數為 12 條，產生 4 條多型性條帶。OPH-03 產生之總條帶數為 9 條，

表 2. 不同品種鳳梨經小苗增殖之葉緣刺變異

Table 2. Variation rate of leaf spines in plants of different pineapple cultivars propagated from plantlets.

Cultivar	Subculture cycle <sup>z</sup>	Variation rate (%) <sup>y</sup>
TN11	V <sub>1</sub>	43.95 ± 21.41 <sup>x</sup> a <sup>w</sup>
	V <sub>2</sub> rep 1	40.15 ± 29.84 a
	V <sub>2</sub> rep 2	29.98 ± 24.11 a
	V <sub>2</sub> rep 3	39.13 ± 32.58 a
	V <sub>2</sub> rep 4	70.05 ± 18.35 a
	V <sub>2</sub> average	44.82 ± 28.58 B <sup>v</sup>
TN13	V <sub>1</sub>	5.05 ± 6.15 a
	V <sub>2</sub> rep 1	16.15 ± 14.62 a
	V <sub>2</sub> rep 2	27.08 ± 33.01 a
	V <sub>2</sub> rep 3	26.15 ± 40.09 a
	V <sub>2</sub> rep 4	87.13 ± 16.09 b
	V <sub>2</sub> average	39.13 ± 38.38 B
TN17	V <sub>1</sub>	73.83 ± 10.18 a
	V <sub>2</sub> rep 1	87.83 ± 15.84 a
	V <sub>2</sub> rep 2	90.00 ± 5.49 a
	V <sub>2</sub> rep 3	89.98 ± 13.87 a
	V <sub>2</sub> rep 4	91.03 ± 14.29 a
	V <sub>2</sub> average	89.71 ± 11.70 C
MD2	V <sub>1</sub>	7.78 ± 9.69 a
	V <sub>2</sub> rep 1	7.45 ± 7.02 a
	V <sub>2</sub> rep 2	15.65 ± 28.82 a
	V <sub>2</sub> rep 3	17.63 ± 20.90 a
	V <sub>2</sub> rep 4	9.18 ± 9.45 a
	V <sub>2</sub> average	112.48 ± 17.34 A

<sup>z</sup> Four plantlets from each cultivar were cultured in 1/2MS + 0.2 ppm NAA + 2 ppm BA medium for 6 months. Four plantlets from the original explants were kept in the propagation medium for the next subculture cycle (V<sub>2</sub>), and the rest (V<sub>1</sub>) were moved to the growth medium.

<sup>y</sup> Variation rate of leaf spines: number of whole spine (SW) plant/total number of plant × 100%

<sup>x</sup> Mean ± standard deviation (n=4).

<sup>w</sup> Mean separation within the column in the same cultivar by Least Significant Difference (LSD) test,  $P < 0.05$ .

<sup>v</sup> Means followed by the same capital letter were not significantly different by Least Significant Difference (LSD) test,  $P < 0.05$

表 3. 不同品種鳳梨經芽球增殖之葉緣刺變異率

Table3. Variation rate of leaf spines in plantlets of different pineapple cultivars propagated from bud clusters.

Cultivar	Subculture cycle <sup>z</sup>	Variation rate (%) <sup>y</sup>
TN11	V <sub>1</sub>	23.18 ± 12.24 <sup>x</sup> ab <sup>w</sup>
	V <sub>2</sub>	16.62 ± 18.19 a
	V <sub>3</sub>	45.28 ± 23.61 ab
	V <sub>4</sub>	56.92 ± 30.34 b
TN13	V <sub>1</sub>	5.20 ± 6.24 a
	V <sub>2</sub>	12.03 ± 10.79 a
	V <sub>3</sub>	21.33 ± 16.46 a
	V <sub>4</sub>	21.75 ± 18.89 a
TN17	V <sub>1</sub>	5.46 ± 5.08 a
	V <sub>2</sub>	5.04 ± 5.37 a
	V <sub>3</sub>	0.00 ± 0.00 a
	V <sub>4</sub>	3.34 ± 7.47 a
MD2	V <sub>1</sub>	82.58 ± 35.12 a
	V <sub>2</sub>	92.18 ± 13.34 a
	V <sub>3</sub>	73.20 ± 34.36 a
	V <sub>4</sub>	86.20 ± 19.92 a

<sup>z</sup> Plantlets were cultured in 1/2MS + 1 ppm NAA + 16 ppm BA medium for 45 days in each subculture cycle. After each subculture cycle, half of the bud cluster were moved to the growth medium, and half of the bud cluster were kept in the bud cluster medium for the next subculture cycle (V<sub>2</sub>-V<sub>4</sub>).

<sup>y</sup> Variation rate of leaf spines: number of whole spine (SW) plant/total number of plant × 100%

<sup>x</sup> Mean ± standard deviation. n=5 for TN11, TN17 and MD2; n=4 for TN13.

<sup>w</sup> Mean separation within the column in the same cultivar by Least Significant Difference (LSD) test, *P* < 0.05.



產生 3 條多型性條帶。經 RAPD 分析後之相似度如表 7 所示，V<sub>1</sub> 平均相似度為 93.2%，與 V<sub>1</sub> 相比各代之平均相似度分別為 V<sub>2</sub> 95.69%、V<sub>3</sub> 96.6% 及 V<sub>4</sub> 94.56%。

'TN13' 之芽球培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數 44 條，其中有 3 條為多型性條帶，佔總條帶數的 6.82% (表 5)，6 支引子中有 2 支具有多型性，佔總引子數的 33.33%。OPG-03 產生之總條帶數為 10 條，產生 1 條多型性條帶；OPAF-11 產生之總條帶數為 8 條，產生 2 條多型性條帶。經 RAPD 分析後之相似度如表 7 所示，V<sub>1</sub> 平均相似度為 98.49%，與 V<sub>1</sub> 相比各代之平均相似度分別為 V<sub>2</sub> 97.98%、V<sub>3</sub> 98.49% 及 V<sub>4</sub> 96.47%。

'TN17' 之芽球培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數 49 條，其中有 7 條為多型性條帶，佔總條帶數的 14.29% (表 5)，6 支引子中有 2 支具有多型性，佔總引子數的 33.33%。OPG-03 產生之總條帶數為 10 條，產生 5 條多型性條帶；OPJ-19 產生之總條帶數為 10 條，產生 2 條多型性條帶。經 RAPD 分析後之相似度如表 7 所示，V<sub>1</sub> 平均相似度為 100%，與 V<sub>1</sub> 相比各代之平均相似度分別為 V<sub>2</sub> 97.96%、V<sub>3</sub> 97.28% 及 V<sub>4</sub> 94.56%。

'MD2' 之芽球培養後代經 RAPD 分析，產生總條帶數 50 條，其中有 3 條為多型性條帶，佔總條帶數的 6% (表 5)，6 支引子中有 2 支具有多型性，佔總引子數的 33.33%。OPAF-11 產生之總條帶數為 7 條，產生 1 條多型性條帶。OPAG-08 產生之總條帶數為 7 條，產生 2 條多型性條帶。經 RAPD 分析後之相似度如表 7 所示，V<sub>1</sub> 平均相似度為 96%，與 V<sub>1</sub> 相比各代之平均相似度分別為 V<sub>2</sub> 97.33%、V<sub>3</sub> 97.11% 及 V<sub>4</sub> 96.98%。

表 4. 不同品種鳳梨之增殖後代植株使用 RAPD 引子所產生之條帶數及分佈範圍  
 Table 4. Number of DNA fragments and molecular size range produced by RAPD primers in plants of different pineapple cultivars propagated from plantlets

Primer	Sequence 5' to 3'	Total fragments				Polymorphic fragments				Molecular size range (bp)
		TN11	TN13	TN17	MD2	TN11	TN13	TN17	MD2	
OPG-03	GAGCCCTCCA	12	10	12	9	0	0	4	0	340-2440
OPI-19	GGACACCACT	6	8	7	9	0	0	0	0	300-1500
OPH-03	AGACGTCCAC	6	9	6	8	0	0	0	0	360-1500
OPAF-11	ACTGGGCCCTC	8	7	8	5	0	0	0	0	600-2000
OPAG-06	GGTGGCCCTC	12	9	10	6	3	0	2	0	200-2800
OPAG-08	GGCATCGGCT	11	9	6	6	4	0	0	0	180-2500
Total		55	52	49	43	7(12.73%) <sup>z</sup>	0	6(12.24%)	0	

<sup>z</sup> The percentage data in parenthesis were based on the percentage of polymorphic fragments to total fragments.

表 5. 不同品種之鳳梨芽球增殖後代植株使用 RAPD 引子所產生之條帶數及分佈範圍

Table 5. Number of DNA fragments and molecular size range produced by RAPD primers in plants of different pineapple cultivars propagated from bud clusters

Primer	Sequence 5' to 3'	Total fragments				Polymorphic fragments				Molecular size range (bp)
		TN11	TN13	TN17	MD2	TN11	TN13	TN17	MD2	
OPG-03	GAGCCCTCCA	08	10	10	11	0	1	5	0	340-2400
OPI-19	GGACACCACT	12	07	10	07	4	0	2	0	320-3000
OPH-03	AGACGTCCAC	09	05	06	08	3	0	0	0	350-1500
OPAF-11	ACTGGGCCTC	07	08	08	07	0	2	0	1	600-1860
OPAG-06	GGTGGCCCTC	07	07	08	10	0	0	0	0	230-2580
OPAG-08	GGCATCGGCT	06	07	07	07	0	0	0	2	300-1500
Total		49	44	49	50	7(14.29%) <sup>z</sup>	3(6.82%)	7(14.29%)	3(6%)	

<sup>z</sup> The percentage data in parenthesis were based on the percentage of polymorphic fragments to total fragments.

表 6. 鳳梨經不定芽增殖後代之 RAPD 分析條帶平均相似度

Table 6. Average similarity between adventitious shoot propagated pineapple plants based on the RAPD analysis.

Cultivar	Subculture cycle	Similarity with V <sub>1</sub>
TN11	V <sub>1</sub>	93.94% (between V <sub>1</sub> plants)
	V <sub>2a</sub>	93.13%
	V <sub>2b</sub>	92.32%
	V <sub>2c</sub>	92.53%
TN17	V <sub>1</sub>	100% (between V <sub>1</sub> plants)
	V <sub>2a</sub>	97.96%
	V <sub>2b</sub>	94.56%
	V <sub>2c</sub>	98.64%

表 7. 鳳梨經芽球增殖後代之 RAPD 分析條帶平均相似度

Table 7. Average similarity between bud cluster propagated pineapple plants based on the RAPD analysis.

Cultivar	Subculture cycle	Similarity with V <sub>1</sub>
TN11	V <sub>1</sub>	93.2% (between V <sub>1</sub> plants)
	V <sub>2</sub>	95.69%
	V <sub>3</sub>	96.60%
	V <sub>4</sub>	94.56%
TN13	V <sub>1</sub>	98.49% (between V <sub>1</sub> plants)
	V <sub>2</sub>	97.98%
	V <sub>3</sub>	98.49%
	V <sub>4</sub>	96.47%
TN17	V <sub>1</sub>	100% (between V <sub>1</sub> plants)
	V <sub>2</sub>	97.96%
	V <sub>3</sub>	97.28%
	V <sub>4</sub>	94.56%
MD2	V <sub>1</sub>	96% (between V <sub>1</sub> plants)
	V <sub>2</sub>	97.33%
	V <sub>3</sub>	97.11%
	V <sub>4</sub>	96.98%

## 討 論

本研究探討在相同增殖條件下，6 個不同品種鳳梨之增殖情形。結果顯示'MD2'及'TN20'有較多的芽體增生，而'TN4'之增殖倍率最低，不同鳳梨品種之增殖倍率明顯不同，顯示遺傳特性是決定鳳梨離體培養效率之重要影響因子。DeWald 等人 (1988) 選擇三個不同葉緣刺型態的品種，'Perolera'為葉緣無刺之品種，'PR-1-67'為全緣有刺之品種，而'Smooth Cayenne'為尖端有刺之品種。在增殖第 13 個月後，'Perolera'從單芽培養中獲得的小苗數量為 210-380 株，'PR-1-67'為 300-350 株，'Smooth Cayenne'為 40-85 株，不同品種間植株增殖倍率明顯不同，但增殖植株數量沒有因為葉緣刺的多寡而影響。在本研究中'TN4'在增殖 1 個月後不但有最低的增殖倍率，且是唯一長根的品種(圖 1-A)，顯示此增殖培養基配方可能有助於'TN4'之發根，因而抑制芽體增生，導致其增殖效率較差。因此，不同品種之遺傳特性不同，在增殖培養時，均必需找到合適之培養條件，以增加其效率。

不同品種鳳梨在相同培養基及增殖時間下，其以不定芽直接增生植株之葉緣刺變異率明顯不同，4 個品種之平均變異率排序為：'TN17' > 'TN11' > 'TN13' > 'MD2' (表 2)。以繼代次數來看，4 個品種之  $V_2$  平均變異率均大於  $V_1$ ，但同一繼代數不同 replication 之間的葉緣刺變異率差異極大。而經芽球培養增生之植株的葉緣刺變異率排序為：'MD2' > 'TN11' > 'TN13' > 'TN17' (表 3)，其中'TN11'及'TN13'之葉緣刺變異率有隨著繼代次數增加而增長之趨勢，而'TN17'及'MD2'不同世代間則無顯著差異。'TN17'及'MD2'葉緣刺類型為尖端有刺，基因型為異質型 *ppSs*，Collins 及 Kerns (1946) 認為，葉緣尖端有刺之'Smooth Cayenne' (*ppSs*)，因其基因型為異質型而對刺之表現較不穩定，容易因氣候環境及栽培條件的影響而有葉緣刺增加之情形，推測此為'TN17'及'MD2'在兩種培養條件下分別有較高葉緣刺變異率差異之原因。

為了確定葉緣刺之表現型變異之來源，本研究利用 RAPD 分子標誌技術，選用條帶數較多之引子 (陳及陳, 2011; 陳, 2012) 進行分析。增殖培養所得之植株經 RAPD 分析之結果如表 4，'TN13'及'MD2'均無產生多型性條帶，符合前述葉緣刺變異率之結果。而'TN11'之  $V_2$  對  $V_1$  之相似度介於 92.32%-93.13%，'TN17'之  $V_2$  與  $V_1$  之相似度介於 94.56%-98.64% 之間 (表 6)，'TN17'有較高之相似度，且相同代數之重複擁有不同程度之相似度，顯示即使繼代次數相同，但培植體之個體間仍存在差異，且不論是'TN11'或'TN17'之  $V_2$  相似度均小於  $V_1$ 。芽球培養所得之植株經 RAPD 分析之結果如表 5 所示，其中以'TN13'及'MD2'有較少之多型性條帶，'TN17'及'MD2'之  $V_2$ - $V_4$  與  $V_1$  相比，相似度隨著繼代次數增加而有降低之趨勢 (表 7)，而'TN11'及'TN13'則是在  $V_3$  時稍微升高，至  $V_4$  時相似度均有下降之趨勢，證明繼代次數越多，植株越容易發生變異，與初代之植株相比相似度越低。Lin 等人 (2019) 取 5 株不同型態之體細胞變異鳳梨植株及對照組測量甲基化程度，與對照組相比，體細胞變異植株之基因組中 mCG 及 mCHG 有較高程度之甲基化，而 mCHH 有較低程度之甲基化，且大部分的 DNA 甲基化變異分佈在基因體中，因此表明癒傷組織培養之植株，

可能是受到 DNA 甲基化的影響而造成植株表現型之差異。Roostika 等人 (2015) 利用 RAPD 分子標誌技術分析經繼代培養 10 代以上、組織培養四年之 'Smooth Cayenne' 無性繁殖系 Simadu 的遺傳變異，與母株相比，具有高度的遺傳多型性，10 支引子共產生 73 條條帶，其中高達 70 條為多型性條帶，佔總條帶數之 95.9%，其相似係數介於 0.32-0.91 之間，且高達 82.3% 之植株具有與母株不同之表現型，因此作者認為長時間的組織培養有較高的機率及風險導致鳳梨植株體細胞變異，且作者表示比起間接器官發生及體胚發生之增殖方式，更推薦使用直接器官發生之增殖方式，產生變異之機率較低，在大量營養繁殖時，較能夠生產與母株相同之苗株，以穩定母株之優良性狀表現。

## 參 考 文 獻

- 行政院農業委員會。2020。農業統計年報。農業統計資料查詢系統。  
< <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx> >
- 陳昫皓、陳京城。2011。鳳梨 EMS 誘變及 RAPD 分子標誌分析。植物種苗 13:37-51。
- 陳哲仁、吳明哲。2007。分子標誌在農業生技產業上之應用。農業生技產業季刊 9: 49-55。
- 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。
- Bairu, M. W., A. O. Aremu, and J. Van Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63: 147-173.
- Bednarek, P. T. and R. Orłowska. 2020. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 140: 245-257.
- Brookes, A. J. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.
- Collins, J. L. and K. R. Kerns. 1946. Inheritance of three leaf types in the pineapple. *J. Hered.* 37: 123-128.
- 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.
- Firoozabady, E. and N. Gutterson. 2003. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Rep.* 21: 844-850.
- Lin, W., X. O. Xiao, H. Zhang, Y. Li, S. Liu, W. Sun, X. Zhang, and Q. Wu. 2019. Whole-genome bisulfite sequencing reveals a role for dna methylation in variants from callus culture of pineapple (*Ananas comosus* L.). *Genes* 10: 877.
- Maughan, P. J., M. A. Saghai-Marroof, G. R. Buss, and G. M. Huestis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 392-401.

- Newton, A. C., T. R. Allnutt, A. C. M. Gillies, A. J. Lowe, and R. A. Ennos. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends Ecol. Evol.* 14: 140-145.
- Reddy, M. P., N. Sarla, and E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Roostika, I., N. Khumaida, and S. W. Ardie. 2015. RAPD analysis to detect somaclonal variation of pineapple *in vitro* cultures during micropropagation. *Biotropia* 22: 109-119.
- Semagn, K., Å. Bjørnstad, and M. N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Bot.* 5: 2540-2568.
- Soneji, J. R., P. S. Rao, and M. Mhatre. 2002b. Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 307.
- Tingey, S. V. and J. P. del Tufo. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101: 349.
- Urasaki, N., S. Goeku, R. Kaneshima, T. Takamine, K. Tarora, M. Takeuchi, C. Moromizato, K. Yonamine, F. Hosaka, S. Terakami, H. Matsumura, T. Yamamoto, and H. Matsumura. 2015. Leaf margin phenotype-specific restriction-site-associated DNA-derived markers for pineapple (*Ananas comosus* L.). *Breed. Sci.* 65: 276-284.

## Studies on Variation of Leaf Margin Spine in Tissue Culture Pineapple Plants

Meng-Xuan Lin<sup>1)</sup> Ching-Cheng Chen<sup>2)</sup>

Key words: Leaf margin spine, Pineapple, RAPD

### Summary

This study mainly investigated the variation of leaf margin spine of different pineapple cultivars under different tissue culture conditions. The genetic divergence of propagated plants was analyzed by RAPD molecular markers. The results showed that the proliferation rates of different pineapple cultivars were significantly different under the same culture condition. 'Tainung No. 4' had the lowest proliferation rate of 0.6 and 'MD-2' (MD2) had the highest proliferation rate of 5.8. In terms of the two different propagation methods and the number of subcultures, the variation rate of leaf margin spines in the proliferation culture increased with the number of subcultures. The variation rate of leaf margin spines between the same generation was very different, the  $V_2$  average value of 'TN17' was the highest (89.71%) and 'MD2' was the lowest (12.48%). In the part of the bud cluster culture, the variation rate of leaf margin spines of 'Tainung No. 11' and 'Tainung No. 13' tended to increase with the number of generations. The variation rate of 'TN17' was very low and there was no significant difference between different generations. The variation rate of leaf margin spines of 'MD2' was very high, ranging from 73.2% to 92.18%. According to RAPD analysis, regardless of the way of proliferation or bud cluster culture, the genetic similarity decreases with the increase of the number of subcultures. Therefore, it is recommended that the number of subcultures should not be too many when pineapple tissue culture is to be used to propagate plants, so as to avoid whole spiny leaf plants increased.

---

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

2) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.