

疊氮化鈉與 γ 射線對蜻蜒屬及擎天屬觀賞鳳梨器官分化過程誘變效應之初探

黃柄龍¹

摘 要

本研究利用觀賞鳳梨癒合組織及去頂短縮莖為材料，以疊氮化鈉及 γ 射線作為誘變劑進行誘變處理。*Guzmania* 'Hilda'癒合組織經疊氮化鈉處理後，培植體均無法存活；*G.* 'Hilda'去頂短縮莖培養於 1/3MS基礎培養基並添加 3.0 mg l⁻¹ BA + 0.5 mg l⁻¹ NAA所組成的增殖培養基，並以 0.5 mM之疊氮化鈉處理 60 分鐘，其存活率為 51.3%，約達半致死劑量；若以 2.0 mM疊氮化鈉處理，則培植體全部褐化。而以 γ 射線照射處理*Aechmea fasciata*、*G.* 'Hilda'、*G.* 'Cherry'、*G.* 'Luna'及*G.* 'Focus'短縮莖培植體，除*G.* 'Focus'之短縮莖經 15 Gy照射，存活率下降至 45.0%之外，其餘各處理均達 74.2-100%。目前，已誘導產生葉部具有鑲嵌條紋的變異性狀，再生植株並出瓶種植。此種觀賞鳳梨誘變方法或許可作為疊氮化鈉或 γ 射線應用在無性繁殖作物誘變育種之參考。

關鍵語：觀賞鳳梨、疊氮化鈉、 γ 射線、誘變育種

前 言

臺灣自 1925 年引進觀賞鳳梨栽培後⁽³⁾，目前市場上常見的觀賞鳳梨以擎天屬為最多^(7,8)。觀賞鳳梨屬鳳梨科，鳳梨科植物族群龐大，造成種原歧異度大；且觀賞鳳梨商業品種的遺傳組成大都為異質的(heterogeneous)，品種間則不易進行雜交。因此如何增加變異率及提高選育的效果，為觀賞鳳梨育種的重要關鍵。

觀賞作物的變異可由植株性狀加以判斷，如花朵特徵(顏色、大小、形態、香氣)、葉部特徵(葉形、大小、著色)、生長習性(密生、攀緣、分枝)、生理特性(改變光週期反應、早花、自然開花)及對逆境的抗性等⁽²⁷⁾。過去 70 年，無論有性及無性繁殖作物，利用誘變技術育成改變植物特性之變異株，均顯著增加⁽¹⁸⁾。康乃馨以 40 Gy的 γ 射線照射後，花瓣產生單瓣及重瓣的變異⁽²⁸⁾；蔓綠絨莖段經 20 Gy的 γ 射線處理後，植株產生葉斑變異及矮化現象⁽⁶⁾；菊花以 γ 射線照射後，也能形成多種不同的花色突變^(20, 24)。鳳梨科植物種子

¹高雄區農業改良場副研究員

亦曾以放射線處理進行誘變育種。傅等人⁽⁹⁾指出，觀賞鳳梨 *Guzmania* 和 *Aechmea* 種子以放射線照射後，部分發芽的植株產生具有鑲嵌條紋的變異性狀，但放射線亦會造成分生組織表層壞死，因而形成嵌合體⁽²⁸⁾，且放射線會誘導產生何種變異難以預測⁽¹⁾，或產生的變異隨著繼代培養時間的增加，變異現象逐漸消失等⁽⁴⁾。

園藝作物利用疊氮化鈉誘變較少，並非所有作物均適合利用疊氮化鈉進行處理⁽²⁵⁾。疊氮化鈉對無性繁殖作物如香蕉，可產生葉形、葉色及矮化的誘變效果⁽¹²⁾，並可抗真菌萎凋病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)⁽¹⁵⁾；芋癒合組織利用疊氮化鈉 0.5 mM 或 1.0 mM 分別處理 120 分鐘或 60 分鐘，再生植株的變異率較高⁽¹⁰⁾；沈等⁽²⁾以疊氮化鈉 1.0 mM 及 1.5 mM 處理夜來香幼嫩花序後，可誘導植株產生花蕾數增加及花色變化或加深等不同的變異；疊氮化鈉亦可誘導牽牛花產生花形態突變，及誘導芭舌蘭形成白花變異株等不同結果⁽¹⁶⁾。由此可知，疊氮化鈉在園藝作物誘變育種上應具有極大的潛力。

觀賞植物新品種育種最重要的就是新奇、富變化，因此也適合利用誘變處理以獲得有用的變異體。目前，已建立觀賞鳳梨癒合組織誘導與植株再生系統，藉由誘導及篩選具分化能力的癒合組織團，可產生叢生狀芽體，並促進其發育成為一完整植株；同時，也建立觀賞鳳梨之直接不定芽誘導技術，藉由去頂及植物生長調節劑之處理，可提升組培苗短縮莖之不定芽的增殖效果。因此，若能應用前述二種組織培養系統並結合誘變技術，即可於短時間內量產誘變試驗所需之大量初始培植體材料，並於實驗室階段中產生大量且具有變異性狀的植物體，提供觀賞鳳梨這類營養繁殖作物另一種育種方法，克服傳統雜交育種上無法達成的目的⁽¹⁴⁾，以加速觀賞鳳梨之品種改良。

組織培養可以克服變異株形成嵌合體的問題⁽²⁴⁾，結合組織培養及誘變技術為植物品種改良的重要工具⁽²³⁾。因此，本研究即以組織培養技術配合疊氮化鈉處理及 γ 射線照射，以期產生變異性狀，獲得優良變異個體。

材料與方法

一、疊氮化鈉不同濃度及處理時間對觀賞鳳梨 *Guzmania* 'Hilda' 癒合組織及去頂短縮莖之影響

本試驗以 *G.* 'Hilda' 花器癒合組織及由癒合組織再生之 1-2 cm 組培苗為材料。組培苗切除頂芽，僅留短縮莖。處理前，疊氮化鈉先配製成 0.1 M 之母液，經 0.45 μ m millipore 過濾消毒後，備用；並以 79.45 ml 0.1M citric acid 及 20.55 ml 0.2 M Na_2HPO_4 配製成 100 ml 之 pH 3.0 磷酸緩衝液；使用時，混合母液及緩衝溶液使成所需之濃度⁽¹¹⁾。將觀賞鳳梨 *G.* 'Hilda' 花器癒合組織

分切成大小約 $0.6 \times 0.6 \text{ cm}^2$ 及切除頂芽的短縮莖培植體，分別以濃度 0、0.1、0.5、1.0、1.5 及 2.0 mM 之疊氮化鈉並配合抽氣處理⁽⁵⁾，處理時間為 60、90 及 120 分鐘，共 18 種處理，每一處理 4 個重複，每個重複 20 個培植體。誘變劑處理達所需時間後，以無菌水沖洗 3 次，每次 5 分鐘，並以濾紙吸乾，藉以消除殘毒，提高存活機率。疊氮化鈉處理後，癒合組織移植培養於大量鹽類濃度減半之 MS (Murashige and Skoog, 1962)⁽²²⁾ 培養基，並添加 1.0 mg l^{-1} NAA + 0.5 mg l^{-1} TDZ 所組成之癒合組織再生培養基(同花器癒合組織誘導與植株再生)；去頂的組培苗短縮莖則培養於 1/3MS 基礎培養基並添加 3.0 mg l^{-1} BA + 0.5 mg l^{-1} NAA 所組成之不定芽增殖培養基(同直接不定芽誘導及植株再生)。培養環境溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，照光培養，光強度 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (日光燈管 FL-30 D/29, 40W, 東亞, 中國電器股份有限公司)，光週明期為 16 小時，暗期為 8 小時。12 週後，調查其存活率及估算半致死劑量，並將增殖的不定芽移植至 1/2MS 基礎培養基，並添加 0.4 mg l^{-1} thiamine HCl、 0.5 mg l^{-1} pyridoxine HCl、 0.5 mg l^{-1} nicotinic acid、 100 mg l^{-1} myo-inositol、 2.0 mg l^{-1} glycine 及 1% sucrose 所組成之生長培養基進行培養。

二、不同劑量之鈷-60 γ 射線照射對觀賞鳳梨去頂短縮莖之影響

本試驗以 *Aechmea fasciata*、G. 'Hilda'、G. 'Cherry'、G. 'Luna' 及 G. 'Focus' 等 5 種觀賞鳳梨之去頂短縮莖為材料。短縮莖培養於裝有 20 ml 不定芽增殖培養基之塑膠培養皿中，不定芽增殖培養基組成份同上。委託行政院原子能委員會核能研究所(Institute of Nuclear Energy Research, Atomic Energy Council, Executive Yuan) 進行鈷-60 γ 射線照射，採一次照射。照射劑量率分別為 0、10、15、20、25 及 30 Gy/min，共 6 種處理，每一處理 3 個重複，每個重複 40 個培植體。照射後之培養環境溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。照光培養，採 16 小時光週明期(光強度 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)，暗期為 8 小時。12 週後，調查不同照射劑量對短縮莖存活率及不定芽增殖能力之影響，並將增殖的不定芽移植至上述之生長培養基培養。

三、變異株篩選

增殖的不定芽以上述生長培養基，進行培養。待組培苗發育完成後，移植至試管外種植，並依葉形(如尖細葉、短圓形葉或皺摺狀葉)、葉色(如白色、淡黃色或淡綠色的異色鑲嵌條紋)及植株型態(如簇生狀葉)等明顯的外觀變異(林和蔡, 2005)進行初步篩選；待將來催花後，調查其變異發生率及選拔具優良性狀單株，變異率估算為外觀明顯變異株數/成活株數 $\times 100\%$ 。

四、統計分析

各處理均經過 3 重複以上試驗，所得數據使用 SAS 軟體(SAS Institute,

Cary, NC)進行 GLM 變異數分析($\alpha = 0.05$)，並以 LSD (Least significant difference)方法統計其差異性。

結果與討論

一、疊氮化鈉不同濃度及處理時間對觀賞鳳梨 *G. 'Hilda'*癒合組織及去頂短縮莖之影響

誘變劑的使用除希望獲得最高的誘變率外，需顧及最低的生理傷害。觀賞鳳梨 *G. 'Hilda'* 花器癒合組織以疊氮化鈉進行誘變處理，無論處理濃度及時間為何，均全數褐化(圖 1A)。雖然癒合組織是一群未組織化、未分化的薄壁細胞團(cell cluster)，可藉由繼代培養大量增生，也可再分化為各種組織、器官或植株，為一高效率的無性繁殖體系⁽²⁹⁾，但可能是因為疊氮化鈉在低pH值時，容易轉變為不帶電的氫氮酸(HN_3 , hydrazoic acid)，較易穿透細胞膜⁽²⁶⁾，使得個體化的細胞對疊氮化鈉忍受性較差，產生較大的生理損傷，因而造成存活率極低。而以疊氮化鈉處理去頂的短縮莖時，如圖 2 所示，濃度低於 0.1 mM 的處理，無論處理時間為 60、90 或 120 分鐘，其存活率均達 80% 以上，未處理疊氮化鈉的對照組則高達 98.8-100% (圖 1B)。本研究中，以濃度 0.5 mM 之疊氮化鈉表現出較佳的處理效果，處理時間為 60 分鐘時，其存活率為 51.3%，約達半致死劑量(圖 1B)；而處理時間為 90 分鐘時，其存活率亦還有 33.8%。然而，當處理時間及處理濃度提高時，存活率亦逐漸下降，疊氮化鈉濃度達 2.0 mM 時，無論處理時間為何均無法存活(圖 1B)，顯示高濃度的疊氮化鈉處理已嚴重影響到培植體的存活率。馮⁽¹¹⁾在聖誕紅 '*Nobel Star*' 子葉期胚誘變處理亦有相同的結果，以疊氮化鈉 0.5 mM 處理 1 小時，存活率達 41%，但當濃度提高到 2.0 mM，則全部的培植體皆白化死亡。非但如此，過高劑量的疊氮化鈉亦可能影響培植體後續的再生能力⁽¹⁷⁾。因此，當無性繁殖作物利用疊氮化鈉進行誘變處理時，除考慮處理濃度與時間外，還需特別注意溶液之pH值，以提高誘變處理效果；或考慮以添加於培養基的處理方式，以減少因抽氣處理所造成之培植體之傷害。

0.5 mM 疊氮化鈉處理 60 分鐘所衍生的不定芽，於生長培養基中可見少數葉部具有鑲嵌條紋的變異植株(圖 1C)。變異株移植至網室種植(圖 1D)，待成熟及開花後，以選拔具優良性狀之單株。

二、不同劑量之鈷-60 γ 射線照射對觀賞鳳梨去頂短縮莖之影響

放射線照射所造成的細胞核傷害為 γ 射線誘變之主要致死原因，且隨著劑量的增加，存活率與突變率亦有所變化，因此應審慎選擇使用之劑量⁽¹⁹⁾。*A. fasciata* 短縮莖以 γ 射線 0-20 Gy 照射後，存活率均可達 98.3% 以上，以

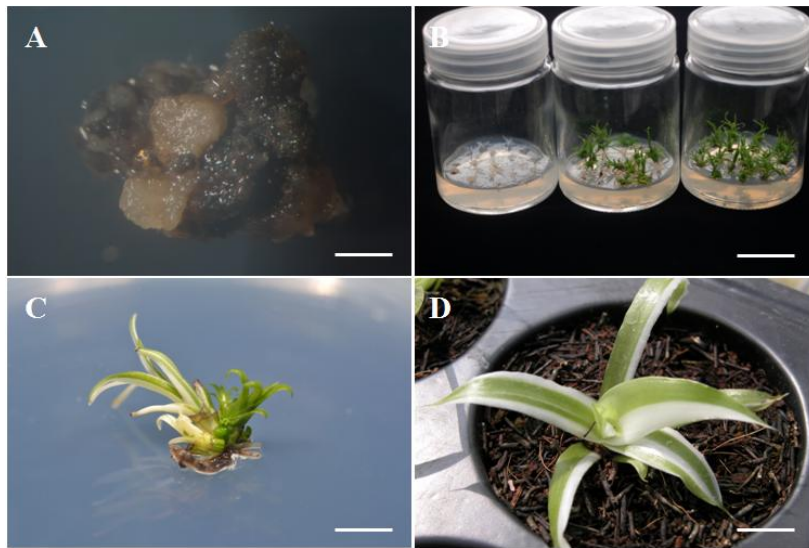


圖 1. 疊氮化鈉處理對觀賞鳳梨 *G. 'Hilda'* 之影響 (A) 致死癒合組織 (bar = 2 mm). (B) 致死劑量，左起：2.0 mM 處理 60 分鐘、0.5 mM 處理 60 分鐘、0 mM 處理 90 分鐘 (bar = 25 mm). (C) 0.5 mM 疊氮化鈉處理 60 分鐘產生之具鑲嵌條紋葉片變異株 (bar = 5 mm). (D) 變異株溫室栽培 (bar = 13 mm)

Fig. 1. Effect of sodium azide treatment on growth from callus and decapitated plantlets of *G. 'Hilda'*. (A) The dead callus (bar = 2 mm). (B) Lethal dose (from left to right): 2.0 mM, 60 min; 0.5 mM, 60 min; 0 mM, 90 min (bar = 25 mm). (C) A mutant with chimerical leaves induced from treatment with 0.5 mM sodium azide for 60 minutes was cultured *in vitro* (bar = 5 mm). (D) A mutant with chimerical leaves cultivated *ex vitro* (bar = 13 mm).

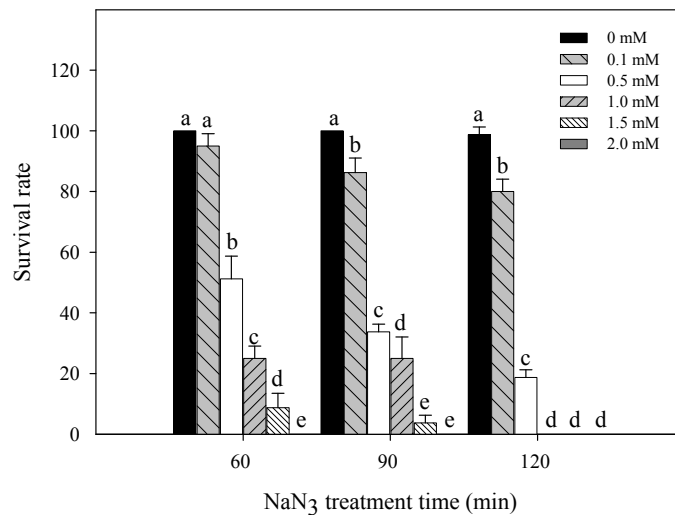


圖 2. 疊氮化鈉不同濃度及處理時間對觀賞鳳梨 *G. 'Hilda'* 去頂短縮莖存活率之影響

Fig. 2. Effect of different concentrations and soaking time of sodium azide on survival rate of decapitated plantlets of *G. 'Hilda'* cultured on 1/3MS basal medium supplemented with 3.0 mg l⁻¹ BA and 0.5 mg l⁻¹ NAA for 12 weeks.

25及30 Gy照射，存活率則分別降至80.8%及74.2% (圖3A)。而G. 'Hilda'、G. 'Cherry'、G. 'Luna'及G. 'Focus'之短縮莖經 γ 射線照射後，其存活率並無依循一定的規則，以15-30 Gy的存活率較高，分別為90.0%、96.7%、98.3%及90.8% (圖3B-E)，只有G. 'Focus'之短縮莖經15 Gy照射後，其存活率下降至45.0%。本研究中，去頂短縮莖經 γ 射線照射後的存活率較對照處理為高，可能是培植體經照射後生長受抑制，導致彼此間的養分競爭減少，故存活率反而增加，此一現象可由對照培植體增殖產生的不定芽之生長較快速獲得驗證。 γ 射線照射後存活的短縮莖，繼代培養於含有 3.0 mg l^{-1} BA + 0.5 mg l^{-1} NAA之不定芽增殖培養基。不同照射劑量對培植體之不定芽增殖能力及不定芽的生長，可產生不同程度的影響，其中，*A. fasciata*短縮莖經劑量25 Gy以上之 γ 射線照射後，增殖培養3個月，其培植體的死亡率明顯較0 Gy之對照組為高，且增殖產生的組培苗生長速度較慢，但增殖效率並無明顯的影響。同樣地，G. 'Hilda'及G. 'Focus'的短縮莖經25 Gy以上之 γ 射線照射後，在增殖培養過程中，其培植體的死亡率亦明顯較對照組為高，不過，其增殖效率及組培苗的生長並無影響。而G. 'Cherry'及G. 'Luna'，以20 Gy以上之劑量處理，除組培苗之生長速度稍微緩慢外，對培植體之死亡率及增殖效率並無影響。培植體受傷或老化會引發褐化，分泌酚類物質並氧化產生quinones，影響培植體的生長⁽²¹⁾，所以，於照射後應更換培養基，避免有毒物質蓄積而危害培植體⁽¹³⁾。本試驗目前尚未觀察到明顯的可視外觀變異株，故可適度提高照射劑量，或採用多次照射之處理方式，使各處理表現之差異顯著，以提升變異率。

結 論

要提升觀賞鳳梨的產業競爭力，除了研發種苗的組織培養繁殖技術，降低成本，還需要開發新品種，建立自有種苗的專利權。然而，觀賞鳳梨許多品種間不易雜交且生長期長，約1-3年的生長才具有開花能力，因而增加了雜交育種的困難。而誘變育種為一種人為創造變異的技術，可直接篩選具染色體變異之植株，不需藉由雜交授粉步驟，即可達到品種改良的目的，適合應用於觀賞鳳梨等營養繁殖作物之育種。目前，已初步篩選出疊氮化鈉誘變之葉片鑲嵌條紋變異株，顯示觀賞鳳梨的誘變處理確實有其可行性，不過，育種工作曠日廢時，且誘變處理所需族群應大，才有獲得優良植株之機會。故應參照試驗研究結果，進行大族群之誘變處理，以提高選拔具優良性狀單株之機率。

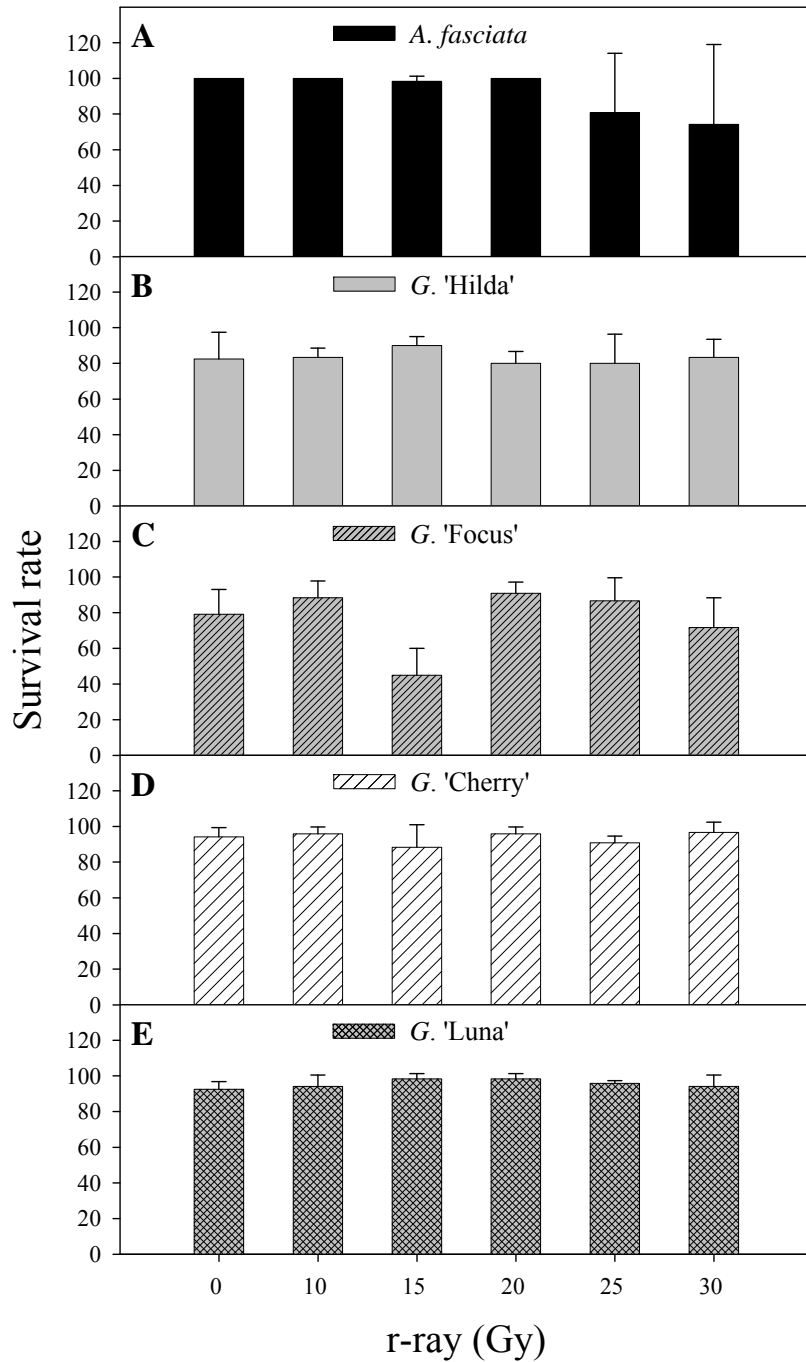


圖 3. 不同劑量 γ 射線照射對觀賞鳳梨去頂短縮莖存活率之影響

Fig. 3. Effect of different doses of γ -ray irradiation on survival rate of decapitated plantlets of bromeliads cultured on 1/3MS basal medium supplemented with 3.0 mg l^{-1} BA and 0.5 mg l^{-1} NAA for 12 weeks.

參考文獻

1. 朱玉、胡燦、蔡瑜卿、陳駿季. 2000. γ 射線照射及葉片培養對彩葉芋變異之影響. 中國園藝 46: 381-388.
2. 沈再木、黃光亮、張平順. 2001. 疊氮化鈉對夜來香品系效應之初報. 中國園藝 47: 129-135.
3. 邱金春、林昭雄. 1987. 觀賞鳳梨組織培養繁殖之研究. 花卉生產改進研討會專集 pp. 130-134.
4. 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.
5. 陳治官、黃真生. 1984. 疊氮化鈉對水稻台農 67 號之誘變效果. 中華農業研究 33: 345-353.
6. 陳威臣、蕭翌柱、蔡新聲. 1999. γ -射線照射蔓綠絨組培苗莖段之誘變研究. 中華農業研究 48: 32-41.
7. 許哲夫. 2004a. 觀賞鳳梨產業發展及品種介紹. 高雄區農業專訊 50: 9-12.
8. 許哲夫. 2004b. 觀賞鳳梨栽培管理技術. 高雄區農業專訊 50: 13-14.
9. 傅仰人、吳麗春、陳昌岑、胡燦、陳家杰. 2000. 輻射照射在觀賞植物誘變育種上之研究. 核研季刊 34: 40-46.
10. 黃柄龍. 2007. 芋癒傷組織植株再生與誘變處理之研究. 行政院農業委員會高雄區農業改良場 95 年報 pp. 62.
11. 馮莉真. 2003. 聖誕紅單節培養及經由體胚之誘變育種. 國立中興大學園藝學系碩士論文.
12. 楊紹榮、李淑英. 1981. 化學誘變劑對香蕉之誘變效果. 中華農學會報 116: 36-47.
13. Ahloowalia, B. S. 1998. *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. In: Jain, M. S., D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia (Eds.), Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers. pp. 293-309.
14. Ahloowalia, B. S. and M. Maluszynski. 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. Euphytica 118: 167-173.
15. 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.
16. Bhat, R. H. 2001. Chemically induced floral morphological mutations in two cultivars of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. *Sci. Hort.* 88: 133-145.
 17. Ganesan, M., P. Bhanumathi, and N. Jayabalan. 2005. Mutagenic effect of sodium azide on somatic embryo regeneration and root growth of cotton (*Gossypium hirsutum* L. CV. SVPR2). *J. Agric. Technol.* 1: 365-380.
 18. Jain, S. M. 2005. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 82: 113-123.
 19. Kleffel, B., F. Walther, and W. Preil. 1986. X-ray-induced mutability in embryogenic suspension cultures of *Euphorbia pulcherrina*. Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. International Atomic Energy Agency. pp. 113-120.
 20. Mandal, A. K. A., D. Chakrabarty, and S. K. Datta. 2000. *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. *Euphytica* 114: 9-12.
 21. Marks, T. R. and S. E. Simpson. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hort. Sci.* 65: 103-111.
 22. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
 23. Muthusamy, A., K. Vasanth, D. Sivasankari, B. R. Chandrasekar, and N. Jayabalan. 2007. Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut. *Biol. Plant.* 3: 430-435.
 24. Nagatomi, S., E. Miyahira, and K. Degi. 2000. Induction of flower mutation comparing with chronic and acute gamma irradiation using tissue culture techniques in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Acta Hort.* 508: 69-73.
 25. Olsen, O., X. Wang, and D. von Wettstein. 1993. Sodium azide mutagenesis: Preferential generation of AT→GC transitions in the barley *Ant8* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8043-8047.
 26. Prina, A. R. and E. A. Favret. 1983. Parabolic effect in sodium azide

- mutagenesis in barley. *Hereditas* 98: 89-94.
27. Schum, A. 2003. Mutation breeding in ornamentals: An efficient breeding method?. Proc. 21st IS on Classical/Molecular Breeding. *Acta Hort.* 612: 47-60.
28. Simard, M. H., M. F. Nicole, and A. Silvy. 1992. Variants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) obtained by organogenesis from irradiated petals. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 29: 37-42.
29. Walden, R. and W. Ruth. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Tibtech.* 13: 324-331.