

體外鱗莖直徑、溫度與培養代數對豔紅鹿子百合 鱗片器內增殖的影響

錢昌聖¹⁾ 張正²⁾

關鍵字：豔紅鹿子百合、鱗片培養、增殖、溫度

摘要：本試驗的目的在於測試體外鱗莖的直徑、溫度與培養代數對豔紅鹿子百合鱗片器內增殖再生能力與幼苗品質的影響，並嘗試找出較合適的增殖環境與方法。體外直徑介於 0.3—0.9 公分的鱗莖不會影響鱗片器內增殖時的再生能力。培養溫度會明顯影響鱗片器內增殖培養再生小鱗莖的發育，以 21°C 的培養溫度較能促進再生小鱗莖生長，且能維持鱗片增殖 3 代後的再生能力。

前 言

豔紅鹿子百合(*Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker; showy lily)在植物分類上屬百合科百合屬，為鹿子百合(*Lilium speciosum* Thunb.)變種，原生地分佈在北臺灣基隆市、台北縣、宜蘭縣及桃園縣，因棲地狹隘破碎呈點狀分佈，再加上人為採集頻度過高，現為極需保護的瀕臨絕種植物(張與李，2008)。

所幸目前在豔紅鹿子百合的研究上多有進展，Chang 等建立豔紅鹿子百合組織培養方法可大量繁殖幼苗(Chang *et al.*, 2000)，曾(2000)建立豔紅鹿子百合癒傷組織大量再生小苗之方法，鐘(2003)定性出豔紅鹿子百合對灰黴病的抗性，張與陳(2004)研究豔紅鹿子百合種子發芽的條件，張(2005)記錄豔紅鹿子百合組織培養苗的生長與開花特性，鄭與應(2006)研究豔紅鹿子百合的棲地及物候學，以上研究多集中在種源保存、繁殖及棲地研究，但並未對鱗片器內增殖培養之環境進行研究探討。

百合組織培養以鱗片培植體再生小鱗莖能力最佳，且再生途徑大多為器官發生，直接由培植體近軸面基部形成小鱗莖(Park, 1996)，故一般組織培養與器內增殖都選用鱗片作為

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。

培植體。培養環境會明顯影響百合鱗片器內增殖培養的再生能力與幼苗品質，其中以培養溫度、培養代數、培植體的大小與光週期等影響最為常見。

據文獻指出，培養溫度會影響東方型百合器內增殖培養芽體與根部的形態發生(張等, 2006)。Park(1996)也指出，培養溫度扮演影響培植體再生、分化與生長的重要因子。此外，鱗片培植體的大小也會影響器內增殖培養的再生能力；以較大的鱗片培植體再生能力較佳，能形成較大的幼苗(Park, 1996；唐等, 2003；張等, 2006)。因此鱗片器內增殖培養與培養溫度及培植體大小息息相關。

本試驗的目的在於測試體外鱗莖的直徑、溫度與培養代數對鱗片器內增殖再生能力與幼苗品質的影響，並嘗試找出較合適的增殖環境與方法。

材料與方法

一、植物材料

試驗植物由台中縣新社鄉種苗改良繁殖場所生產的組織培養苗(種源來自於台北縣雙溪鄉)，以每盆三株種植於含培養土(90%泥炭土+10%珍珠石)的 5 吋盆中，栽培於國立中興大學園藝系之園藝試驗場水牆風扇溫室。以上述鱗莖滅菌後的鱗片經初代培養^(註一)三個月，繼代培養^(註一)3—5 個月，培養於試管內的小鱗莖作為本試驗培植體的來源。

二、試驗方法

1. 體外鱗莖的直徑

選取器內直徑介於 0.3—0.5 cm、0.5—0.7 cm、0.7—0.9 cm 以及 0.9 cm 以上的鱗莖作為培植體的來源。植物材料取得後，除去每一顆鱗莖外層較小的鱗片，以均衡培植體的個別差異。隨後剝取器內不同直徑鱗莖的鱗片，並以向軸面向上的方式接種於培養基上。培養基成分為 MS 的大量元素和全量的維他命(Murashige and Skoog, 1962)、Myo-inositol 100 mg/l、 NaH_2PO_4 170 mg/l、Casein (N-Z-Amine A) 1 g/l、NAA 0.1 mg/l、BA 0.1 mg/l、Sucrose 30 g/l 與 Agar 8 g/l，滅菌後製成斜面培養基。每種處理使用 30 個培植體 (n=30)，試驗時間為 2007 年 10 月 10 日。培養環境為 $25\pm 1^\circ\text{C}$ ，光強度 3200 lux，光週期 12 小時。培養時間為三個月，於每個月記錄鱗片再生形成的小鱗莖數與其根及葉片數。

2. 培養溫度

選取器內直徑 1 公分以上的鱗莖作為培植體的來源，試驗流程及培養環境與體外鱗莖的直徑試驗一致，但培養溫度修改為 17、21 與 25°C (對照組)。試驗時間為 2007 年 10 月 17 日。

3. 培養代數

將培養溫度試驗，其鱗片器內增殖培養再生形成的小鱗莖作為培植體來源，進行培養代數對鱗片器內增殖培養再生與發育的影響，試驗共增殖 3 代。試驗流程及培養環境與培

養溫度試驗一致。試驗時間為 2007 年 10 月 17 日、2008 年 1 月 17 日與 4 月 18 日。

註一：初代培養基成分與鱗片器內增殖培養基相同。繼代培養基成份為初代培養基去除 BA，另外添加 Activated charcoal 1 g/l。初代培養環境與鱗片器內增殖培養相同。繼代培養環境為 12h/day， $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光強度為 5700 lux。

結 果

一、體外鱗莖的直徑

利用體外不同直徑的鱗莖作為鱗片器內增殖培養的培植體來源，試驗結果顯示，體外直徑介於 0.3—0.9 公分的鱗莖並未影響鱗片器內增殖培養的再生能力。不論是鱗片器內增殖培養再生形成的小鱗莖數與其葉片及根部的發育皆不具顯著性的差異(表 1)。各處理的鱗片器內增殖培養後，平均能再生形成 2.7—2.9 個小鱗莖；再生小鱗莖幾乎都無法順利形成展開葉，但再生小鱗莖平均能形成 1—2 條根(表 1)。

二、培養溫度

培養溫度扮演影響培植體再生、分化與生長的重要因子，對豔紅鹿子百合鱗片器內增殖培養也是如此。雖然培養溫度對鱗片器內增殖培養再生形成的小鱗莖數與其葉片發育不具影響，所有處理鱗片平均可再生形成 2.5 個小鱗莖，再生小鱗莖均無法順利形成展開葉(表 2)。但培養溫度會明顯的影響再生小鱗莖根部的發育，當培養溫度為 25°C 時，其鱗片再生形成的小鱗莖平均只能形成 1.3 條根；相較之下當培養溫度為 21 與 17°C 時，其鱗片再生形成的小鱗莖根部發育較佳，平均能形成 1.8—1.9 條根(表 2)。

三、培養代數

以不同培養溫度，其鱗片再生形成的小鱗莖作為培植體來源，再次進行鱗片器內增殖培養。結果顯示培養溫度為 25°C 時，其鱗片器內增殖培養 2 代後，再生形成的小鱗莖葉片與根部的發育較差，平均只能形成 0.5 片鱗片葉與 0.6 條根(表 2)，且鱗片器內增殖培養 3 代後，也呈現相同的反應(表 2)。相較之下當培養溫度為 21 與 17°C 時，其鱗片器內增殖培養 2 代後，再生形成的小鱗莖能形成較多的葉片與根部，尤其是培養溫度為 17°C 時，再生小鱗莖平均可形成 1.3 片鱗片葉與 1.7 條根，但鱗片再生形成的小鱗莖數較少，平均只能形成 1.9 個小鱗莖(表 2)。而鱗片器內增殖培養 3 代於 17 與 21°C 時，可以觀察到以 21°C 的培養溫度較能維持鱗片器內增殖培養數代的再生與生長(表 2)，雖然鱗片再生形成的小鱗莖數有些微的下降至 2.0 個，但再生小鱗莖可形成較多的葉片與根，平均能形成 1.7 片鱗片葉與 1.6 條根(表 2)。此結果顯示 21°C 的培養溫度較能減緩鱗片器內增殖培養多代再生能力下降的反應。

表 1. 豔紅鹿子百合體外鱗莖的直徑對鱗片器內增殖培養再生及生長的影響

Table 6. The effects of *in vitro* bulblet diameter on scale culture of showy lily for proliferation *in vitro*.

Bulblet diameter ^x	No. of bulblet per scale	No. of leaf per bulblet	No. of root per bulblet
0.3~0.5 cm	2.9 a	0.6 a	1.1 a
0.5~0.7 cm	2.7 a	0.5 a	1.2 a
0.7~0.9 cm	2.9 a	0.4 a	1.2 a
Above 0.9 cm	2.8 a	0.7 a	1.5 a

^x 90 days culture.

^y Different letters within a column indicate significant differences at P = 0.05 by Duncan's multiple range test.

表 2. 培養溫度與培養代數對豔紅鹿子百合鱗片器內增殖培養再生及生長的影響

Table 2. The effects of culture temperature and subculture generation on scale culture of showy lily for proliferation *in vitro*.

Treatment ^x	No. of bulblet per scale	No. of leaf per bulblet	No. of root per bulblet
25°C 1 st subculture	2.5 a	0.6 de	1.3 b
25°C 2 ^{ed} subculture	2.7 a	0.5 de	0.6 c
25°C 3 th subculture	2.5 a	0.4 e	0.5 c
21°C 1 st subculture	2.4 ab	0.9 cd	1.9 a
21°C 2 ^{ed} subculture	2.5 a	1.2 bc	1.3 b
21°C 3 th subculture	2.0 bc	1.7 a	1.6 ab
17°C 1 st subculture	2.5 a	0.7 de	1.8 a
17°C 2 ^{ed} subculture	1.9 c	1.3 ab	1.7 ab
17°C 3 th subculture	1.8 c	1.4 ab	1.5 ab

^x 90 days culture.

^y Different letters within a column indicate significant differences at P = 0.05 by Duncan's multiple range test.

討 論

體外直徑介於 0.3—0.9 公分的鱗莖並未影響鱗片器內增殖培養時的再生與發育(表 1)。雖然文獻指出,鱗片的大小會影響百合鱗片培養時的再生能力(Park, 1996; 唐等, 2003; 張等, 2006), 但本試驗似乎不受體外鱗莖直徑的大小所影響。據 Park(1996)的研究指出,較大的鱗片與培養基接觸的面積較多, 因此可以吸收培養基中較多的養分, 促進鱗片再生形成較大的小鱗莖。然而, 本試驗並未秤量再生小鱗莖的鮮重與直徑, 因此無法判斷體外不同直徑的鱗莖是否會影響再生小鱗莖的品質。亦或是因為本試驗體外鱗莖測試的直徑範圍太小, 導致各個處理間差異不顯著。不過慶幸的, 此試驗也得知, 即使以體外直徑為 0.3—0.5 公分的小鱗莖作為培植體來源時, 其鱗片的再生能力與體外直徑為 0.9 公分以上的小鱗莖為材料時一致(表 1), 不過鱗片再生形成的小鱗莖品質還有待證實。雖然本試驗結果並未產生任何差異, 但這也表示豔紅鹿子百合鱗片器內增殖培養時, 可以選用體外直徑較小的鱗莖作為培植體來源, 除了可以降低培植體來源的門檻, 還能達到高增殖倍率的結果。對於短時間內需要大量生產百合小鱗莖的繁殖體系而言, 是一個非常好的訊息。

培養溫度對鱗片器內增殖培養具有顯著的影響, 尤其對鱗片器內增殖培養再生形成的小鱗莖, 其葉片與根部的發育影響最為顯著(表 2)。據文獻指出, 培養溫度為 15°C 時, 不但能避免鱗片培養再生形成的小鱗莖形成休眠(Aguettaz *et al.*, 1990; De Klerk and Langens-Gerrits, 1996), 還能促進組織分化的活性(Ishimori and Niimi, 2007), 因此培養溫度為 17—21°C 時, 其鱗片器內增殖培養再生形成的小鱗莖, 能形成較多的根(表 2), 並且於鱗片器內增殖培養 2~3 代後, 還能維持鱗片的再生能力(表 2)。但 17°C 的培養溫度, 其鱗片再生形成的小鱗莖數似乎有減少的反應。據朱等(2005)研究指出, 較低的培養溫度(5—10°C), 可以誘導鱗片培養再生形成葉片與根部的發育良好的小鱗莖, 但再生小鱗莖的直徑會隨培養溫度的下降而減少, 此反應也符合 De Klerk 與 Langens-Gerrits(1996)的結果。這表示 17°C 的培養溫度似乎不適合鱗片再生芽體發育形成小鱗莖, 因此鱗片再生形成的小鱗莖數會較少。反觀培養溫度為 25°C 的處理, 其鱗片可再生形成較多的小鱗莖, 但再生小鱗莖幾乎無發順利形成展開葉(表 2)。據朱等(2005)的研究指出, 較高的培養溫度(25°C)能促進再生小鱗莖的生長, 但也容易誘導再生小鱗莖產生休眠性。本試驗也有相似的反應, 當培養溫度為 25°C 時, 其鱗片器內增殖培養 2~3 代後, 其再生小鱗莖幾乎無法順利形成展開葉與根, 或許就是因為小鱗莖具休眠性所造成的。整體而言只有 21°C 的培養溫度較適合鱗片器內增殖培養, 不但能誘導鱗片再生形成葉片與根部發育良好的小鱗莖, 還能維持鱗片增殖 3 代後的再生能力。

鑑於上述之結果, 可以得知使用體外直徑較小的的小鱗莖進行鱗片器內增殖培養時, 可縮短植物材料的養成時間, 且不會影響再生能力。培養溫度為 21°C 時, 不但適合鱗片器內增殖培養, 還能促進再生小鱗莖的發育, 且增殖 3 代後還能維持鱗片的再生能力。因此建議豔紅鹿子百合進行鱗片器內增殖時, 可以給予 21°C 的培養溫度, 以體外直徑介於 0.3—0.5 公分的小鱗莖為材料進行鱗片器內增殖培養, 即可達到良好的再生能力。

參考文獻

- 朱旭東、田松青、儲海霞。2005。東方百合試管成球和種球低溫處理的研究。江蘇農業科學。5: 74-76。
- 唐東芹、黃丹楓、唐克軒、錢虹妹、傅佳。2003。東方百合鱗片的組織培養。植物生理學通訊。39: 450-452。
- 張延龍、梁建麗、牛立新。2006。東方百合試管鱗莖膨大的研究。西北農林科技大學學報(自然科學版)。34: 75-78。
- 張正、陳盈君。2004。豔紅鹿子百合種子發芽特性研究。中國園藝。50: 357-372。
- 張正。2005。豔紅鹿子百合組織培養苗生長與開花習性。中國園藝。51: 189-198。
- 張正、李佩芳。2008。豔紅鹿子百合族群遺傳與保育策略。張喜寧教授服務於台灣大學三十五年榮退演講會專集。國立台灣大學園藝學系編印。p.37-49。
- 曾美貞。2000。豔紅鹿子百合鱗片與癒傷組織培養之植株再生。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。78pp。
- 鄭曉雲、應紹舜。2006。台灣的豔紅鹿子百合生物學之研究。臺大實驗林研究報告。20: 31-43。
- 鐘佳玲。2003。豔紅鹿子百合抗灰黴病特性之研究。國立嘉義大學生物科技研究所碩士論文。79pp。
- Aguettaz, P., A. Paffen, I. Delvallée, P. V. D. Linde, and G. J. De Klerk. 1990. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22: 167-172.
- Chang, C., C. T. Chen, Y. C. Tsai, and W. C. Chang. 2000. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 139-142.
- De Klerk, G. J. M. and M. M. Langens-Gerrits. 1996. Development of dormancy in tissue-cultured lily bulblets and apple shoots. p.115-132. In: Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology. Lang, G. A. (eds.). CAB Intl. UK.
- Ishimori, T. and Y. Niimi. 2007. Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium* × *formolongi* 'White Aga' cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 83: 313-318.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Park, N. B. 1996. Effect of temperature, scale position, and growth regulators on the bulblet formation and growth during scale propagation of *Lilium*. Acta Hort. 414: 257-262.

The Influences of *in vitro* Bulblet Diameter, Culture Temperature and Culture Generation on Scale Culture for Proliferation of Showy Lily

Chang-Sheng Chien¹⁾ Chen Chang²⁾

Key words: Showy lily, Scale culture, Proliferation, Temperature

Summary

In attempt to establish the optimal proliferation condition and methods *in vitro*, we examined the influences of *in vitro* bulblet diameter, temperature and culture generation on the regeneration ability and plantlet quality of showy lily scale culture. The bulblet diameter range of 0.3-0.9 cm *in vitro* had no effect of the regeneration ability in scale culture for proliferation. Culture temperature significantly influenced the growth of regenerated bulblet in the scale culture for proliferation. When the culture at 21°C, it significantly enhanced the regenerated bulblet growth and keep the regeneration ability after subculture third generation.

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.

