

細葉卷丹鱗片薄層培養與葉片培養

黃揚融¹⁾ 陳盈君¹⁾ 張正^{1,2)}

關鍵字：台灣原生百合、培植體厚度、葉段長度

摘要：細葉卷丹，又稱條葉百合、野小百合，主要分布在台灣、日本、中國、韓國和俄羅斯等地區，台灣為其分布之最南限。但在台灣已經近百年沒有在野外發現其蹤跡，2011年在苗栗通霄再度發現細葉卷丹。本研究透過鱗片培養進行種原保存與繁殖。為了建立細葉卷丹有效的組織培養繁殖系統，測試不同類型的培植體和培植體大小對於其再生小鱗莖的影響。結果顯示將厚度 1.5 mm 和 2.0 mm 的鱗片薄層培植體培養在添加 0.1 mg l⁻¹ NAA 和 0.1 mg l⁻¹ BA 的 MS 培養基中有較好的芽體形成率，平均每個培植體形成芽體數分別為 2.5 和 2.3 個。將 0.5 cm 長的葉片培植體培養在添加 0.5 mg l⁻¹ TDZ 和 1.0 mg l⁻¹ NAA 的 NN 培養基中有較好的芽體形成，平均每個培植體可以形成 1.6 個芽體。本研究建立有效繁殖台灣原生細葉卷丹的組織培養系統，以做為種原保存和奠定後續研究之基礎。

前 言

細葉卷丹 (*Lilium callosum* Sieb. et Zucc.) 屬於百合科 (Liliaceae) 百合屬 (*Lilium*) 卷瓣組 (Sinomartagon) 植物，又稱條葉百合、野小百合，原生在台灣、日本、中國、韓國和俄羅斯等地區，主要分布在海拔 182-640 m 之山坡或草叢中，目前已十分罕見，台灣則為其分布之最南限 (Wilson, 1925; 楠元, 1970; 梁, 1980; Ying, 2000)。根據在 1914 年 8 月間採集標本位置為當時新竹大湖支廳單蘭 (今苗栗卓蘭)，至今已近百年沒有在台灣野外發現，幾乎被認定在野外已經滅絕。2011 年在苗栗通霄則再度有細葉卷丹植株被發現。

Tran Thanh Van 等 (2003) 定義薄層細胞培養 (thin cell layer, TCL) 是從不同的植物器官切除的薄層培植體 (莖段、葉、根、花序、花原基或花器、子葉、上/下胚軸、頂端分生組織或胚) 進行培養。TCL 可以依據不同的植物組織器官、細胞大小及離體培養的環境變

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生、博士班研究生、副教授。

2) 通訊作者。

化，已經有許多研究嘗試成功，經由各種明確可行的模式和系統，以了解植物細胞有不同的反應機制，近 40 年的研究，已經涵蓋了大量的植物物種範圍和領域的研究 (Tran Thanh Van *et al.*, 2003; Bakhshaie *et al.*, 2010; Chattopadhyaya *et al.*, 2010; Dobranszki and Teixeira da Silva, 2011; Teixeira da Silva and Dobranszki, 2013)。葉片培養之培植體具有容易取得、不受限於季節因素和不會無破壞供體植株之特性 (Bacchetta *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014)。目前利用組織培養技術進行大量繁殖或是保存的百合屬植物有鐵炮百合 (*L. longiflorum*) (Nhut *et al.*, 2001a; Nhut *et al.*, 2001b; Nhut *et al.*, 2001c; Nhut *et al.*, 2002)、細葉百合 (*L. pumilum*) (Jin *et al.*, 2014)、宜昌百合 (*L. leucanthum*) (Tang *et al.*, 2010)、莉黛柏蕊百合 (*L. ledebourii*) (Bakhshaie *et al.*, 2010)、乙女百合 (*L. rubellum* Baker.) (Niimi, 1984)、豔紅鹿子百合 (*L. speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Daker.) (錢與張, 2008; Chang *et al.*, 2000) 和野百合 (*Lilium brownii* F. E. Brown ex Miellez) (楊等, 2015)。目前台灣細葉卷丹雖然再度被發現，但在野外仍未觀察到穩定族群。本研究目的主要發展細葉卷丹有效組織培養的鱗片和葉片繁殖系統，以保存細葉卷丹的種質資源和作為後續研究之材料。

材料及方法

一、植物材料

細葉卷丹材料採集於苗栗縣通霄鎮，採取 3 片鱗片，並保留原生植株於原棲地。採集之鱗片編入本研究室的原生百合屬植物的蒐集名錄編號，透過鱗片培養進行種原保存與繁殖擴增數目，並將再生植株馴化出瓶並栽培在溫室中。本研究之材料則選取溫室中栽培鱗莖之飽滿鱗片進行初代培養後建立之瓶苗進行以下各項試驗。

二、鱗片厚度對培植體再生之影響

以鱗莖周徑達到 3 cm 組織培養苗的飽滿外部鱗片作為材料，去除鱗片頂端和基部，以橫切的方式將鱗片切成 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mm 厚的橫向薄層細胞 (transverse TCL;tTCL) 培植體，接種到再生培養基中，以 MS (Murashige and Skoog, 1962) 配方為基礎，添加 100 mg l⁻¹ myo-inositol、30 g l⁻¹ Sucrose、170 mg l⁻¹ NaH₂PO₄、1 g l⁻¹ Casein Hydrolysate、0.1 mg l⁻¹ NAA (α -naphthaleneacetic)、0.1 mg l⁻¹ BA (N⁶-benzyladenine) 與 8.0 g l⁻¹ agar, pH 值利用 0.1 N NaOH 與 HCl 校正為 5.7，使用 20 mm × 150 mm (直徑×長) 的 PYREX[®] (no. 9820) 試管，每支試管分裝 10 ml 的培養基，隨後利用單層鋁箔紙霧面朝上包覆瓶口；或用蘭花瓶，每瓶分裝 100 ml 的培養基，隨後用瓶塞蓋緊瓶口，經滅菌釜 121°C、1.2 kg/cm² 高溫高壓滅菌 15 分鐘，試管斜放製作斜面，待冷卻後備用。每個處理 3 重複，每個重複 5 個試管，每個試管 1 個培植體，培養在 25±1°C，黑暗培養 4 週，再移到光強度為 68 μ mol m⁻² s⁻¹，每日 12 小時光照的光環境下培養 4 週，每 4 週調查一次，調查項目包括培植體存活率、再

生率、新芽體數及新根數。培養 8 周後，新生小鱗莖自原培植體剝離後繼代培養至鱗莖生長培養基 (LD4)，培養基成分為 MS 基礎培養基添加 100 mg l^{-1} *myo*-inositol、 30 g l^{-1} Sucrose、 170 mg l^{-1} NaH_2PO_4 、 1 g l^{-1} Casein Hydrolysate、 0.1 mg l^{-1} NAA、 1 g l^{-1} 活性碳和 8.0 g l^{-1} agar，pH 值利用 0.1N NaOH 與 HCl 校正為 5.7，培養容器為蘭花瓶，滅菌條件詳如上述。

三、葉段長度對葉片基部培植體再生的影響

選擇鱗莖周徑達到 3 cm 組織培養苗的成熟葉片之葉基部作為培植體，葉段長度從成熟鱗片葉的葉片與鱗片連接處向上測量 0.5、1.0、1.5 和 2.0 cm，切取之葉段則平放於葉片再生培養基進行培養，培養基成分為 NN 基礎培養基 (Nitsch & Nitsch, 1969)，添加 100 mg l^{-1} *myo*-inositol、 30 g l^{-1} Sucrose、 170 mg l^{-1} NaH_2PO_4 、 1 g l^{-1} Casein Hydrolysate 和 8.0 g l^{-1} agar，並參考 Xu 等人 (2009) 蘭州百合葉片培養的研究，使用 0.5 mg l^{-1} TDZ 和 1.0 mg l^{-1} NAA，pH 值利用 0.1N NaOH 與 HCl 校正為 5.7。培養容器為 $20 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ (直徑×長) 的 PYREX[®] (no. 9820) 試管，每支試管分裝 10 ml 的培養基，單層鋁箔紙霧面朝上包覆瓶口；或用蘭花瓶，每瓶分裝 100 ml 的培養基，隨後用瓶塞蓋緊瓶口，經滅菌釜 121°C 、 1.2 kg cm^{-2} 高溫高壓滅菌 15 分鐘，試管斜放製作斜面，冷卻後備用。每個處理 3 重複，每個重複 5 個試管，每個試管放置 1 個培植體，培養溫度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，黑暗培養 4 週，再移到光強度為 $68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，每日 12 小時光照的光環境下培養 4 週，每 4 週調查一次，調查項目包括培植體存活率、再生率、新芽體數及新根數。培養 8 周後，新生小鱗莖自原培植體剝離後繼代至 LD4 培養基，培養基成分、培養容器及滅菌條件如前所述。

結 果

一、鱗片厚度對培植體再生的影響

厚度分別為 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mm 的鱗片 tTCL 培植體培養於再生培養基中 8 週後，厚度 1.5 mm 和 2.0 mm 的 tTCL 鱗片培植體存活率皆為 93%；而在厚度為 0.5 mm 和 1.0 mm 的培植體則皆褐化死亡 (圖 1)，存活率為 0% (表 1)。厚度 1.5 mm 和 2.0 mm 的 tTCL 鱗片培植體有較多芽體形成，平均每個培植體形成芽體數分別為 2.5 和 2.3 個，兩者之間並沒有顯著差異 (表 1)。厚度 1.5 mm 和 2.0 mm 的培植體之間雖然存活率相同，且形成芽體數並沒有顯著差異，但 1.5 mm 培植體的形成芽體生長勢較佳，故接下來的實驗培植體大小皆使用 1.5 mm tTCL 鱗片培植體。

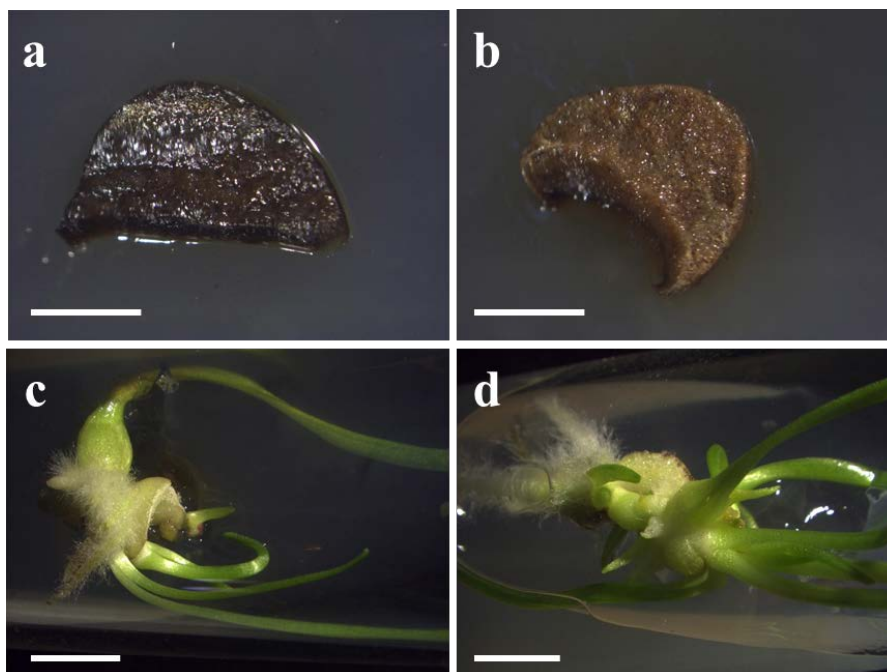


圖 1. 不同厚度的細葉卷丹薄層鱗片培植體培養八週後之形態發生。

(a) 0.5 mm 褐化死亡 bar = 2 mm，(b) 1.0 mm 褐化死亡 bar = 2 mm，(c) 1.5 mm 形成芽體與根部 bar = 5 mm，(d) 2.0 mm 形成芽體與根部 bar = 5 mm。

Fig. 1. The effect of different thickness-TCL-scale explant for morphogenesis in *L. callosum* after culturing 8 weeks.

(a) 0.5 mm browning and necrosis; (b) 1.0 mm browning and necrosis; (c) 1.5 mm formed adventitious shoots and roots; (d) 2.0 mm formed adventitious shoots and roots.

表 1. 鱗片培植體厚度對細葉卷丹薄層培養培養再生之影響。

Table 1. Effects of thickness scale on for regeneration in *L. callosum*.

thickness of scaled TCL explant ^z	Survival rate (%) ^y	No. of regenerated shoots/explant	No. of roots/explant
0.5 mm	0 b ^x	0.0 b	0.0 b
1.0 mm	0 b	0.0 b	0.0 b
1.5 mm	93 a	2.5 a	2.3 a
2.0 mm	93 a	2.3 a	1.1 ab

^z Each treatment had 5 replications, and the experiment was repeated for 3 times.

^y Data was collected 8 weeks after culturing.

^x Different letters within a column indicate significant differences at $p = 0.05$ by LSD test.

二、葉段長度對葉片基部培植體再生的影響

長度分別為 0.5、1.0、1.5 和 2.0 cm 的葉片培植體培養在葉片再生培養基中 8 週後，各處理存活率為 93-100%，但在各處理間並沒有顯著差異。長度 0.5 cm 的葉片培植體形成最多芽體，平均每個培植體形成 1.6 個芽體數 (表 2)，培養 2 週並沒有發現再生的情形，4 週開始有芽體形成，6 週則持續有芽體形成，培養至 8 週則芽體轉綠且抽葉 (圖 2)；0.5、1.0 和 1.5 cm 長的葉片培植體則平均每個培植體形成芽體數為 1.6、1.2 及 1.1，但三者之間並沒有顯著差異；而 2.0 cm 的葉片培植體平均每個培植體只有 0.3 個芽體形成。1.5 cm 的葉片培植體有較多的根數，平均每個培植體形成 2.0 條根 (表 2)；而 0.5、1.0 及 2.0 的葉片培植體平均每個培植體形成根數為 0.4、0.1 和 0.1 個。

表 2. 細葉卷丹不同葉段長度培植體對再生之影響。

Table 2. The effect of *L. callosum* different length leaf explants for regeneration.

Length of leaf-explant ^z	Survival rate (%) ^y	No. of regenerated shoots/explant	No. of roots/explant
0.5 cm	100 a ^x	1.6 a	0.4 b
1.0 cm	93 a	1.2 ab	0.1 b
1.5 cm	93 a	1.1 ab	2.0 a
2.0 cm	93 a	0.3 b	0.1 b

^z Average 15 leaf explant of *L. callosum* for each treatment.

^y after culturing 8 weeks.

^x Different letters within a column indicate significant differences at $p = 0.05$ by LSD test.

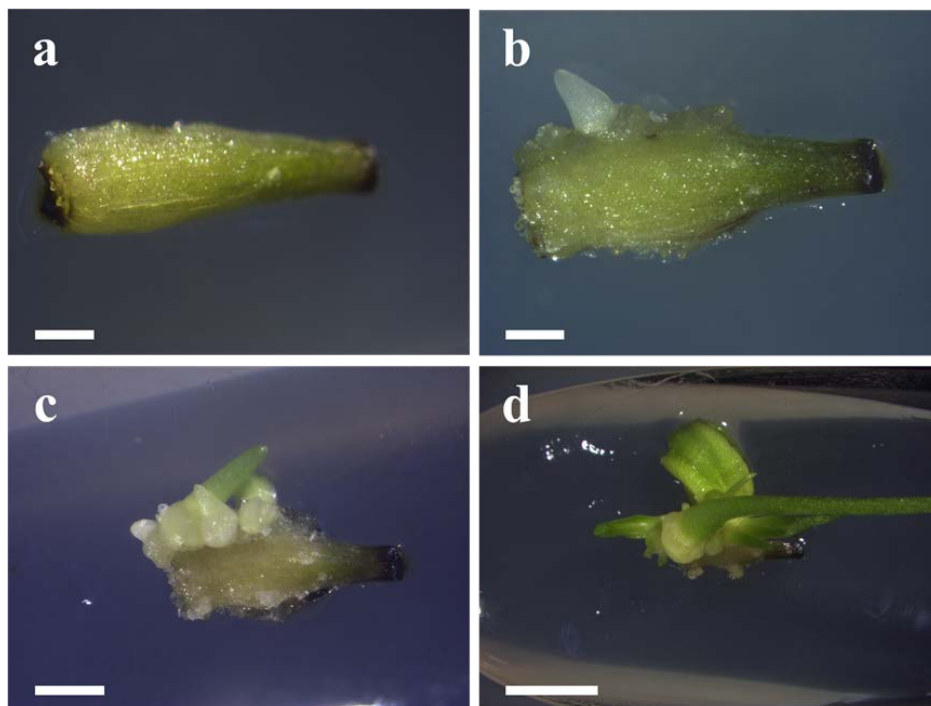


圖 2. 細葉卷丹 0.5 cm 長葉段培植體之形態發生。

培養 (a) 2 週 bar = 1 mm, (b) 4 週 bar = 1 mm, (c) 6 週 bar = 2 mm, (d) 8 週後 bar = 5 mm。

Fig. 2. The morphogenesis of *L. callosum* 0.5 cm long leaf explant after culturing.

(a) 2 weeks, bar = 1 mm, (b) 4 weeks, bar = 1 mm (c) 6 weeks, bar = 2 mm, (d) 8 weeks, bar = 5 mm.

討 論

細葉卷丹瓶內鱗莖鱗片 TCL 培植體的厚度影響其芽體形成和存活率；葉段長度會影響其芽體形成，但不影響培植體之存活率。TCL 鱗片培植體厚度達到 1.5 mm 時，其培植體存活率達到 93%；厚度 0.5 和 1.0 mm 的 TCL 鱗片培植體存活率皆為 0%，此結果表示厚的培植體較容易存活；在 Nhut 等 (2001a) 利用鐵炮百合幼嫩莖的 tTCL 培植體培養 60 天後也發現此現象，0.5 mm 厚的培植體存活率只有 5%，而 1.0 mm 厚的培植體存活率為 80%；楊等 (2015) 的野百合鱗片薄層培養研究中也觀察到此現象，1 mm 厚的鱗片培植體再生率皆為 0%；而 2 mm 厚的培植體再生率為 40%。

Xu 等 (2009) 的研究表明蘭州百合 (*L. davidii* var. *unicolor*) 葉片培植體培養在含有 0.5 mg l⁻¹ TDZ 和 1.0 mg l⁻¹ NAA 的 NN 培養基中，具有最好的芽體形成率和最多的形成芽體數，本研究參考其培養基成分進行葉片培養，亦可獲得芽體形成進行增殖。葉片培植體形

成芽體多從培植體基部切口形成，與 Jin 等 (2014) 細葉百合葉片培養研究相符合。長度 0.5 cm 的葉片培植體獲得最多的芽體形成。本試驗主要目的是建立透過葉片培植體進行有效的芽體形成芽體再生，故長度 0.5 和 1.0 cm 的葉片培植體有較好的芽體形成能力和較少的根部形成，可作為葉片再生之較合適培植體大小。本研究所發展的鱗片 tTCL 鱗片培養和葉片培養能夠有效的擴增台灣原生細葉卷丹數量，並奠定細葉卷丹組織培養研究的基礎，且應用在細葉卷丹的種質資源保存上。

參 考 文 獻

- 梁松筠。1980。中國植物誌(十四卷) 百合屬(*Lilium*)。科學出版社。pp. 150。
- 楊岳翰、李廣榮、曾建興、張正。2015。野百合鱗片之薄層培養。興大園藝 40(1): 65-74。
- 錢昌聖、張正。2008。體外鱗莖直徑、溫度與培養代數對艷紅鹿子百合鱗片器內增殖的影響。興大園藝 33(1): 93-99。
- 楠元司。1970。大隅半島南部の草地の植物。鹿児島大学教育学部研究紀要。自然科学編 21: 55-62。
- Bacchetta, L., P. C. Remotti, C. Bernardini, and F. Saccardo. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74: 37-44.
- Bakhshai, M., M. Babalar, M. Mirmasoumi, and A. Khalighi. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. *Plant Cell Tissue Cult.* 102: 229-235.
- 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* Daker. *Botanical Bul. Academia Sinica* 41:139-142.
- Chattopadhyaya, B., J. Banerjee, A. Basu, S. K. Sen, and M. K. Maiti. 2010. Shoot induction and regeneration using internodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L. *Plant Biotechnol. Rpt.* 4: 173-178.
- Dobranszki, J. and J. A. Teixeira da Silva. 2011. Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple. *Scientia Hort.* 127: 460-463.
- Jin, S., J. Wang, X. Wang, D. Sun, G. Li, A. D. Genovesi, and S. Liu. 2014. Direct and indirect shoot and bulblet regeneration from cultured leaf explants of *Lilium pumilum*, an endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 50: 69-75.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 590-597.

- Nhut, D. T., V. L. Bui, and K. Tran Thanh Van. 2001a. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 44-49.
- Nhut, D. T., B. V. Le, J. A. Teixeira da Silva, and C. R. Aswath. 2001b. Thin cell layer culture system in *Lilium* regeneration and transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 516-523.
- Nhut, D. T., V. L. Bui, M. Tanaka, and K. Tran Thanh Van. 2001c. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissue of *Lilium longiflorum*. *Sci. Hort.* 87: 131-138.
- Nhut, D. T., V. L. Bui, T. M. Nguyen, J. Teixeira de Silva, F. Seiichi, T. Michio, and K. Tran Thanh Van. 2002. Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regulat.* 37: 193-198.
- Niimi, Y. 1984. Bulblet-productivity of explants from scales, leaves, stems and tepals of *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Hort.* 22: 391-394.
- Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Tang, Y. P., X. Q. Liu, R. Wahiti Gituru, and L. Q. Chen. 2010. Callus induction and plant regeneration from in vitro cultured leaves, petioles and scales of *Lilium leucanthum* (Baker) Baker. *Biotechnol. Biotechnological Equipment* 24: 2071-2076.
- Teixeira da Silva, J. A. and J. Dobranszki. 2013. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. *Plant Growth Regulat.* 32: 922-943.
- Tran Thanh Van, K. 2003. The cell layer concept. In: *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*. eds. D. T. Nhut, B. V. Le, K. Tran Thanh Van and T. Thorpe. Kluwer Academic Publishers, U.S.A. pp. 1-16.
- Wilson, E. H. 1925. *The Lilies of Eastern Asia: a Monograph*. Dulau. Boston. pp. 87-88.
- Xu, L. F., F. W. Ma, D. Liang. 2009. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*). *Scientia Hort.* 119: 458-461.
- Yin, Z. F., B. Zhao, W. L. Bi, L. Chen, Q. C. Wang. 2013. Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49: 333-342.
- Ying, S. S. 2000. *Lilium* Tourn. Ex L. p.50. In: *Flora of Taiwan* Second edition. Volume Five. Huang, T. C. (eds.), Department of Botany. National Taiwan University, Taipei. pp. 49-52.

The Scale and Leaf Thin Cell Layer Culture on *Lilium callosum* Sieb. et Zucc.

Yang-Jung Huang¹⁾ Ying-Chun Chen¹⁾ Chen Chang^{1,2)}

Key words: Taiwan native lily, thickness of explant, length of leaf fragment

Summary

Lilium callosum Sieb. et Zucc. which is a perennial herb belong to Sinomartagon of *Lilium* in the Liliaceae was mainly distributed in Taiwan, Japan, China, South Korea and Russia. Taiwan is southern limit of its distribution. *L. callosum* had be never found nearly a hundred years in the wild of Taiwan, but it was found again at Tunghsiao of Miaoli country in 2011. The study used scale culture to species preservation and reproduction. To establish effective tissue culture system of *L. callosum*, we first need to test the effect of different types of explants and explants size on the regeneration of bulblets. The results show that the thickness of 1.5 mm and 2.0 mm scales transverse thin cell layer (tTCL) explants has better shoot regeneration rate than other size explants cultured in MS medium containing 0.1 mg l⁻¹ NAA and 0.1 mg l⁻¹ BA, respectively producing 2.5 and 2.3 regeneration shoot per explant. The 0.5 cm long leaf explants has better shoot regeneration than other size explants cultured in the NN medium containing 0.5 mg l⁻¹ TDZ and 1.0 mg l⁻¹ NAA, producing 1.6 regenerated shoots per explants. Present study established effective tissue culture system to proliferation of Taiwan native *L. callosum* for germplasm conservation and the foundation of subsequent research.

1) Graduate student, PhD student, and Associate professor Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Corresponding author.

