

野百合鱗片之薄層培養

楊 岳 翰¹⁾ 李 廣 榮²⁾ 曾 建 興³⁾ 張 正⁴⁾

關鍵字：野百合、薄細胞層培養、植物生長調節劑

摘要：野百合在野外族群數少，鱗片扦插繁殖慢，需用組織培養來繁殖，且薄細胞層培養能快速得到大量植株。野百合鱗片能經由 2 mm 薄層鱗片培養獲得再生植株，其再生位置可從切口處，向軸面或背軸面長出小鱗莖。培養基添加 20 g/l 蔗糖所產生的小鱗莖數最多(2.5 個)。於培養基添加 40 g/l 蔗糖，培植體可再生直徑最大的鱗莖(1.3 mm)。培養基添加 0.1 mg/l BA 和 0.1 mg/l NAA 再生的小鱗莖數最多，為 2.3 個，且小鱗莖平均直徑最大，為 1.1 mm。未添加 NAA 沒有產生根，NAA 濃度在 0.1 到 1 mg/l 之間，發根率隨著濃度提升而下降。培養基添加 NAA 有助於癒傷組織的產生。培養基添加 0.1 mg/l NAA 和 0 或 0.1 mg/l BA 時培植體直接產生根。本方法有利於野百合特殊基因型的繁殖。

前 言

組織培養可快速且大量繁殖種苗，薄細胞層(Thin Cell Layer, TCL) 培養方法為新興的組織培養繁殖技術，是於 1973 年由 Tran Thanh Van 所提出，作者以菸草(*Nicotiana tabacum*) 植物的表皮組織(5 mm × 2 mm)，直接再生出芽體及根組織，使表皮組織具有再生能力(Tran Thanh Van, 1973)。百合新生的幼莖亦可以經薄層培養方式來再生小鱗莖(Nhut, 1998; Nhut *et al.*, 2001a; Nhut *et al.*, 2001b; Nhut *et al.*, 2001c)。

百合組織培養進行大量繁殖時以鱗片培植體再生小鱗莖能力最佳，再生途徑大多為器官發生，直接從培植體向軸面基部形成小鱗莖(Bahr and Compton, 2004)。為了達到在器內百合鱗片再生的目的，可藉由調整植物生長調節劑濃度(Han *et al.*, 2005)、蔗糖濃度(Nhut

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 金門縣農業試驗所所長。
 - 3) 金門縣農業試驗所技士。
 - 4) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

et al., 2001b)、鱗片位置或培植體的種類(唐等, 2003; 潘和胡, 2007; Nhut, 1998;)及光(Lian *et al.*, 2002)等培養相關因子。

金門原生百合在金門植物誌中被鑑定為野百合(*Lilium brownii* F. E. Brown *ex* Mieliez) (呂, 2011)。楊(2014)於金門發現到少數野百合具有特殊性狀, 如鱗莖小開花數卻多、具有濃郁的香味、外花被片紫色條紋顯著。然而族群數量經楊(2014)於 2013-2014 年調查族群數為 2347 株, 開花率 15%, 結果率 54.9%, 自然繁殖慢。因此本研究以鱗片薄層培養的方式來繁殖野百合。

材料及方法

一、植物材料

野百合鱗莖採自金門縣金湖鎮公園路上廢棄花崗岩醫院後方的小路裸岩區, 於實驗室台灣原生百合收集名錄編號為 L123。太武山玉章路上斗門古道採集編號為 L069 經組織培養所再生的植株鱗莖 L069T。

二、鱗片厚度對培植體再生的影響

將野百合(L123 與 L069T)鱗片從鱗莖剝下, 去除泥土後, 在流動的自來水下沖洗 1 小時。噴灑 75% 酒精消毒 30 秒, 接著利用市售 6% 次氯酸鈉(添加 1 滴 Tween-20)滅菌, 先經超音波震盪 5 分鐘後, 再以手搖震盪滅菌 10 分鐘共 15 分鐘, 最後以無菌水漂洗 3 次以上至無泡沫。鱗片以橫切的方式, 大小為 5 mm × 5 mm, 厚度切成 1、2 和 3 mm 培養。

三、培養基配製

再生培養基以 MS (Murashige and Skoog, 1962) 配方為基礎, 添加 100 mg/l *myo*-inositol、30 g/l Sucrose、170 mg/l NaH₂PO₄、1 g/l Casein Hydrolysate、0.1 mg/l NAA (α -naphthaleneacetic)、0.1 mg/l BA (N⁶-benzyladenine)與 8.0 g/l Agar, pH 利用 0.1N 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包覆瓶口, 經滅菌釜 121°C、1.2 kg/cm²高溫高壓滅菌 15 分鐘, 冷卻後備用。

繼代培養基以再生培養基為基礎, 但移除 0.1 mg/l BA, 再添加 1 g/l 活性炭, 皆使用相同的試管型號與滅菌條件。

四、不同蔗糖濃度對培植體再生的影響

取 L123 瓶內鱗莖寬度約 5 mm 的小苗, 將葉片與根去除, 剝取小鱗片後以橫切方式, 切成 1 mm 厚做為培植體, 培養在再生培養基, 添加不同濃度的蔗糖(0、10、20、30 和 40 g/l), 培養環境為 25 ± 1°C, 光強度 5.6 μ mole/m²s, 每日 12 小時光週期環境。每處理 5 個培植體共 3 重複。一個月後調查每個培植體的小鱗莖數和每個小鱗莖的直徑, 並拍照記錄生長情形。

五、不同植物生長調節劑濃度對培植體再生的影響

取試管中(L123)鱗莖直徑約 5 mm 的小苗做為培植體，將葉片與根去除，剝取小鱗片後用橫切方式，切成 1 mm 厚做為培植體。以再生培養基添加不同濃度的植物生長調節劑(0、0.1、0.2、0.5 和 1 mg/l NAA 或 0、0.1、0.2、0.5 和 1 mg/l BA)，培養在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光強度 $5.6 \mu\text{mole/m}^2\text{s}$ ，每日 12 小時光週期環境。每個處理 5 個培植體共 3 重複。一個月後調查培植體的再生小鱗莖數和小鱗莖的直徑，並拍照記錄生長情形。8 週後繼代於繼代培養基，培養環境之光強度為 $56 \mu\text{mole/m}^2\text{s}$ ，每日 12 小時光照。

結 果

一、鱗片厚度對小鱗莖再生的影響

不同厚度的培植體小鱗莖再生如表 1 所示，L123 經滅菌，雖然污染率低(13-27%)，但是褐化率高(60-100%)，培植體再生率以 2 mm 厚度較高(40%)，每個培植體產生的小鱗莖數較多，為 0.5 個，產生癒傷組織率也較高(40%)。雖然 L069T 的污染率較高(47-60%)，但是褐化率為 0%(表 1)。小鱗莖可從切口處(圖 1a)，或是從向軸面和背軸面長出(圖 1b)。

二、蔗糖濃度對小鱗莖再生的影響

野百合薄層鱗片培養在沒有添加蔗糖的培養基可產生 0.2 個小鱗莖，每個小鱗莖平均直徑為 0.6 mm(表 2)。蔗糖濃度在 0 到 20 g/l 之間，培植體所產生的小鱗莖數隨著蔗糖濃度的增加而增加，培養基添加 30 g/l 蔗糖培植體所產生的小鱗莖數則減少為 1.5，而培養基添加 40 g/l 蔗糖時，培植體所產生的小鱗莖數又提升到 2.2，其中以每升添加 20 g 所產生的小鱗莖數最多，每個培植體能產生 2.5 個小鱗莖。小鱗莖直徑隨著蔗糖濃度提升而增加，以添加 40g/l 蔗糖最佳，小鱗莖直徑可達 1.3 mm(表 2)。

由圖 2 可看出培養 4 週後生長速度的不同，培植體培養在未添加蔗糖或添加 10 g/l 蔗糖，生長速度明顯低於有添加蔗糖(20-40 g/l)的培養基，培植體表面才剛開始突起(圖 2a; 2b)，培養基添加 20、30 和 40 g/l 蔗糖子葉已可清楚看見(圖 2c; 2d; 2e)，其中以添加 40 g/l 的培養基生長速度最快，小鱗莖葉片已伸長(圖 2e)。

三、植物生長調節劑濃度對小鱗莖再生的影響

培養基 BA 固定 0.1 mg/l，另添加不同濃度的 NAA 其結果顯示，未添加 NAA 仍可產生小鱗莖，平均每個培植體可產生 0.2 個，平均小鱗莖直徑為 0.7 mm(表 3)。培養基添加 0.1 mg/l NAA 產生的小鱗莖數最多 1.3 個，小鱗莖平均直徑最大 1.1 mm(表 3)。隨著 NAA 濃度提高，癒傷組織的誘導率從 0%增加到 47.1%(表 3)。未添加 NAA 沒有產生根，濃度在 0.1 到 1 mg/l 之間，發根率隨著濃度提升而下降(表 3)。

使用瓶內小鱗莖鱗片做為培植體，未經過滅菌，其褐化率只有 10%甚至 0%(表 4)。不同 NAA 和 BA 濃度的組合，再生率介於 50 到 100%，培養基添加 0.1 mg/l NAA 及 0.1 mg/l BA 培植體有最多的小鱗莖數(2.3)(表 4)。培養基未添加 BA 其癒傷組織誘導率皆低於有添加

NAA 的培養基(表 4)。只有在 0.5 mg/l NAA 和 0.1 mg/l BA 的培養基中有體胚的產生，而培植體直接產生根的植物生長調節劑濃度為添加 0.1 mg/l NAA 和 0 或 0.1 mg/l BA 的培養基(表 4)。

表 1. 培植體厚度對野百合(L123 與 L069T)鱗片薄層培養再生的影響

Table 1. The effects of thickness of explant on scale thin cell culture of *L. brownii* (L123 and L069T) for proliferation

Scale Thickness (mm) ^z	Contamination (%)	Browning (%)	Regenerating rate (%)	Bulblets/explant	callus (%)
L123					
1	13 b ^y	100 a	0 b	0.0 b	0 b
2	0 b	60 b	40 a	0.5 a	40 a
3	27 b	64 b	27 a	0.5 a	27 ab
L069T					
1	47 a	0 c	0 b	0.0 b	0 b
2	53 a	0 c	14 b	0.1 b	0 b
3	60 a	0 c	17 b	0.0 b	17 b

^z Each treat had 5 replications, and the experiment was repeats 3 times

^y Mean in each column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

表 2. 蔗糖濃度對野百合 (L123) 鱗片薄層培養再生的影響

Table 2. The effects of sucrose on scale thin cell culture of *L. brownii* for proliferation.

Sucrose (g/l) ^z	Bulblets per explant (No.)	Bulblets diameter (mm)
0	0.2 b ^y	0.6 b
10	0.8 b	0.6 b
20	2.5 a	1.0 ab
30	1.5 b	1.2 a
40	2.2 a	1.3 a

^z Each treat had 5 replications, and the experiment was repeats 3 times

^y Mean in each column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

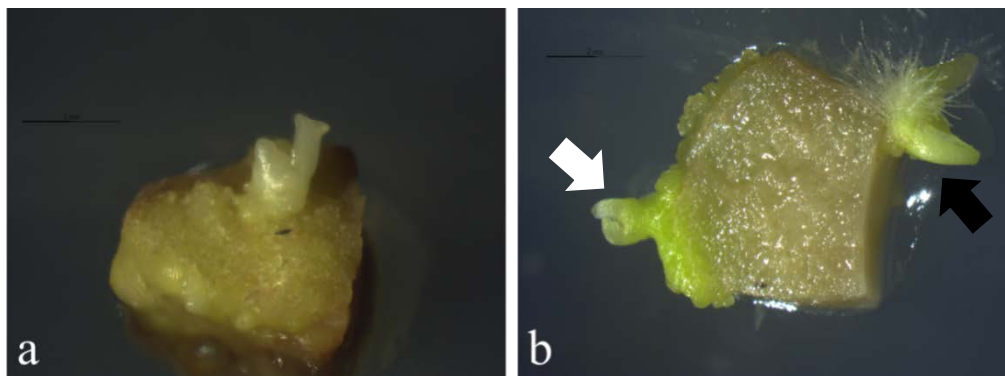


圖 1. 野百合小鱗莖再生位置。a 小鱗莖從切面處長出。b 小鱗莖從向軸面(黑色箭頭)與背軸面(白色箭頭)長出。

Fig. 1. The site of bulblets regeneration of *L. brownii*. (a) The bulblets form on cutting face. (b) The bulblets form on the adaxial side (black arrow) and abaxial side (white arrow).

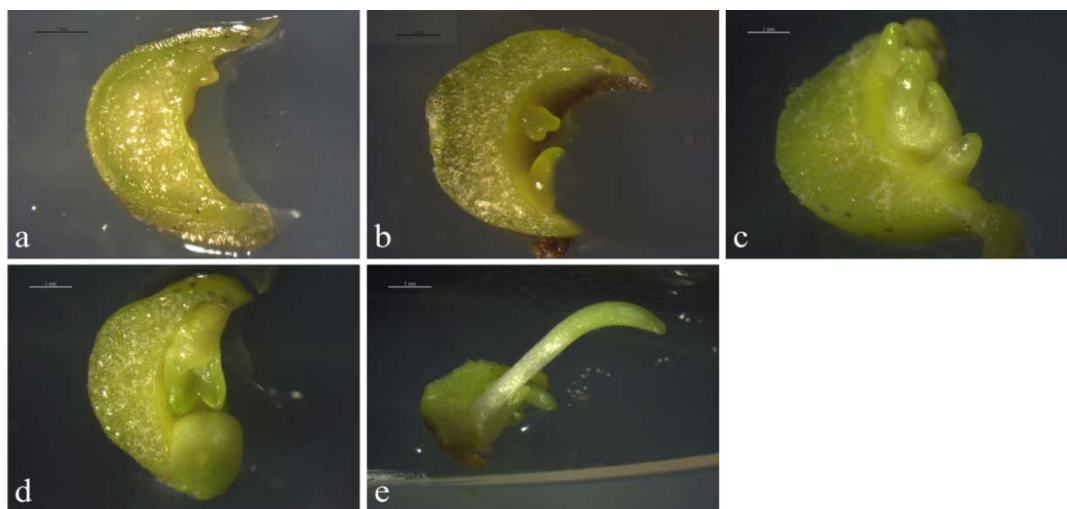


圖 2. 不同蔗糖濃度培養 4 週後對野百合薄層培養的影響。(a) 0% 蔗糖處理培植體表面開始凸起。(b) 1% 蔗糖處理培植體表面小鱗莖成形。(c) 2% 及(d) 3% 蔗糖處理產生葉。(e). 4% 蔗糖處理葉片已伸長。

Fig. 2. The effects of sucrose on scale thin cell culture of *L. brownii* for proliferation after 4 weeks culture. (a) 0% sucrose : The adaxial side of explant starts to break out.(b). 1% sucrose : The explants produce bulblets.(c) 2% and (d) 3% sucrose : The bulblets produce leaves.(e) 4% sucrose : The leaves of bulblets extend.

表 3. NAA 對野百合(L069T)鱗片薄層培養再生的影響

Table 3. The effects of NAA on propagation from thin cell layer of scale of *L. brownii* (L069T) for proliferation.

NAA (mg/l) ^z	Bulblet No. /explant	Diameter of bulblet (mm)	Callus (%)	Rooting (%)
0	0.2 b ^y	0.7 b	0.0 b	0.0 b
0.1	1.3 a	1.1 a	11.1 b	50.0 a
0.5	0.2 b	0.9 a	30.8 a	23.1 ab
1	0.1 b	0.7 b	47.1 a	11.8 b

^z Each treat had 5 replications, and the experiment was repeats 3 times

^y Mean in each column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

討 論

一、鱗片厚度對小鱗莖再生的影響

百合培植體的厚度影響其再生，培植體越厚時，其培植體存活率越高，反之越低(表 1)。第一次以野百合編號 L123 基因型的鱗片實驗，可能是滅菌時間不對，加上技術上的不成熟，導致汙染率雖低，但褐化比例較高，顯示出滅菌時間可能過長。栽培在霧峰葡萄試驗中心的野百合編號 L069T 基因型，以相同的方式滅菌汙染率卻較高，可能是澆水頻度高土壤較潮濕，使鱗莖附帶的汙染源較野採的 L123 嚴重，導致 L069T 做為培植體汙染率較高的原因。因 L069T 為人工網室裡栽培，鱗莖營養狀態較野外採集的 L123 好，褐化率相對於 L123 低。

二、蔗糖濃度對小鱗莖再生的影響

醣類在組織培養時扮演重要的角色，提供植株生長所需的碳源，培養基中蔗糖含量在 3 到 5% 之間較適合鱗莖的生長(Takyama and Misawa, 1983)。本試驗中，以不同蔗糖濃度處理其培植體再生的結果，顯示出以 20 g/l 蔗糖濃度處理所產生的小鱗莖數最多，而小鱗莖直徑則以 40 g/l 蔗糖濃度為最大(表 2)。醣類濃度會直接或間接滲透潛勢影響百合外部型態及內部生理的過程，促進或抑制小鱗莖再生和生長(Takyama and Misawa, 1983)。濃度高會減少小鱗莖再生數，但能促進小鱗莖的生長使葉片快速抽長(圖 2e)。

表 4. NAA 與 BA 對 *L. brownii* (L123) 鱗片薄層培養再生的影響Table 4. The effects of NAA and BA on propagation from thin cell layer of scale of *L. brownii* (L123) for proliferation

Treatment (mg/l) ^z		Browning rate (%)	Regeneration (%)	Bulblet No./ explant	callus (%)
NAA	BA				
0	0	0 a ^y	90 a	0.9 ab	0 b
		0 a	90 a	1.3 a	80 a
		0 a	89 a	0.7 ab	44 ab
		0 a	100 a	1.3 a	25 b
0.1	0	0 a	90 a	1.7 a	20 b
		0 a	100 a	2.3 a	0 b
		10 a	67 b	0.1 b	67 ab
		10 a	67 b	0.9 ab	44 ab
0.2	0	10 a	89 a	0.8 ab	67 ab
		0 a	90 a	1.3 a	80 a
		0 a	100 a	1.3 a	80 a
		0 a	80 ab	0.5 b	80 a
0.5	0	0 a	50 b	0.3 b	50 ab
		0 a	78 ab	0.3 b	67 ab
		0 a	78 ab	0.33 b	78 a
		0 a	60 b	0.3 b	50 ab

^z Each treat had 5 replications, and the experiment was repeats 3 times

^y Mean in each column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

三、不同植物生長調節劑濃度對小鱗莖再生的影響

試驗結果得知，培養基添加不同濃度的 NAA 會明顯的影響野百合器內再生培養的分化過程(圖 2)。BA 濃度固定為 0.1 mg/l 時，沒有添加 NAA 或添加濃度為 0.5 和 1 mg/l 時，每個培植體產生的小鱗莖數較少(表 3)。此反應與王(2002)和張等(2004)的研究相同，當野百合鱗片培養在 MS 培養基添加 1.0 ~ 1.2 mg/l BA 和 0.1 mg/l NAA 的培養基時誘導效果最佳。較高的 Auxin / Cytokinin 比率會促進根部的形成，相對較低的 Auxin / Cytokinin 比

率會促進鱗片再生小鱗莖(Niimi, 1984)，而本試驗中結果相反，未添加 NAA 沒有形成根，添加低濃度的 NAA 發根率較高，NAA 濃度高於 0.5 mg/l 時發根率則下降(表 2)，NAA 濃度 0.5 mg/l 時，再生率跟再生的小鱗莖數相對較低(表 3)。BA 對再生小鱗莖數影響明顯，高濃度的 BA 會誘導鱗片產生叢生芽或短縮芽(莫等，2007；劉等，2008；Niimi, 1984)，亦會抑制小鱗莖根部的形成，在本研究中，較高的 BA 濃度未增加野百合培植體再生小鱗莖的數量(表 4)，但 BA 濃度較高則有相同抑制根部形成的效果。

野百合薄層培養其培植體厚度 2 mm，培養基用 MS 為基礎，另添加 0.1 mg/l NAA、0.1 mg/l BA 與 20 g/l 蔗糖，每個培植體再生數最多。若野外採集鱗莖其直徑為 10 cm，其鱗片長度大於 5 cm、寬度大於 1 cm。取 20 片鱗片利用薄細胞層方式培養，培植體切成 3 mm 寬，厚度 2 mm，每個鱗片可切成 75 個培植體，每個培植體可再生 2.5 個小鱗莖，扣除汙染率，經薄層培養約可獲得 1500 個小鱗莖。薄層培養對特殊基因型能更有效率的繁殖。

參 考 文 獻

- 王剛。2002。百合組織培養及組織培養中的染色體行為。西北師範大學生命科學學系碩士論文。中國。
- 呂福原。2011。野百合。金門植物誌下卷 P266-267。金門國家公園管理處。金門。
- 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。
- 莫昭展、符韻林、戚萌。2007。野百合鱗莖芽的誘導和增殖的初步研究。安徽農業科學 35(31): 9890-9892。
- 張延龍、徐炎、李峰、羅佳、范銘。2004。秦嶺野百合鱗片植株再生體系的建立。西北植物學報 24: 1315-1318。
- 楊岳翰。2014。金門野百合族群與繁殖之研究。國立中興大學園藝系碩士論文。台中。
- 潘佑找、胡琮。2007。野百合的組織培養與植株再生。長江大學學報(自科版)農學卷 4(4): 68-70。
- 劉紅美、令狐克勇、方小波。2008。野百合試管鱗莖誘導與增殖的研究。安徽農業科學 36(21): 8928-8929, 8933。
- Bahr, L. R. and M. E. Compton. 2004. Competence for *in vitro* bulblet regeneration among eight *Lilium* genotypes. HortScience 39: 127-129.
- Han, B. H., B. W. Yae, H. J. Yu and K. Y. Paek. 2005. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. Sci. Hortic. 103: 251-259.

- Lian, M. L., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2002. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Sci. Hortic.* 94: 2365-370.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol plant.* 15: 473-497.
- Nhut, D. T. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Rep.* 117:913-916.
- Nhut, D. T., V. L. Bui, M. Tanaka, and K. Tran Thanh Van. 2001a. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissue of *Lilium longiflorum*, *Sci. Hort.* 87:131-138.
- Nhut, D. T., V. L. Bui, S. Fukai, M. Tanaka, and K. Tran Thanh Van. 2001b. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Reg.* 33:59-65.
- Nhut, D. T., V. L. Bui, and K. Tran Thanh Van. 2001c. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37:44-49.
- Niimi, Y. 1984. Effect of α -Naphthaleneacetic acid and 6-Benzylaminopurine on the development of excised-bulbs (*Lilium rubellum* Baker) cultured *in vitro* both in diffused light and in continuous darkness, and the leaf emergence from the bulbs *in vivo*. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 53: 59-65.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1983. A scheme for mass propagation of *Lilium in vitro*. *Sci. Hortic.* 18: 353-362.
- Tran Thanh Van, K. 1973. *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* 246:44-45.

Thin Cell Layer Culture of Scales of *Lilium brownii*

Yue-Han Yang ¹⁾ Kuang-Jung Lee ²⁾ Chien-Hsing Tseng ³⁾ Chen Chang ⁴⁾

Key words: *Lilium brownii*, thin cell layer culture, plant growth regulator

Summary

The population numbers of *Lilium brownii* are not many in Kinmen, and the scale cutting propagation is slow. *L. brownii* has to use tissue culture to propagate, and thin cell layer culture can get more plants quickly. *L. brownii* is succeed getting plantlets through thin cell layer culture, it can regenerate from cutting face, adaxial side and abaxial side of scale. The most number of regenerative bulblets of explants which culture in the MS medium adding 20 g/l sucrose is 2.5. The biggest bulblets are found in the MS medium with 40 g/l sucrose. The most number of regenerative bulblets of explants which culture in the medium with 0.1 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA is 1.3, and the diameter of regenerative bulblets is 1.1 mm. The rooting rate decreases whit the concentration of NAA from 0.1 to 1 mg/l. The medium with NAA is suitable for the explants produces callus. The explants produce roots directly in the medium with 0.1 mg/l NAA combined with 0 or 0.1 mg/l BA. This method is applicable to *L. brownii* to propagate.

-
- 1) Graduate student, Associate professor Department of Horticulture, Nation Chung Hsing University.
 - 2) Director, Kinmen County Agricultural Research institute.
 - 3) Assistant Technical Specialist, Kinmen County Agricultural Research institute.
 - 4) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.