

食藥用百合品系試管內鱗片再生效率比較

蔡 挹 恆¹⁾ 陳 葦 玲²⁾ 張 正³⁾

關鍵字：野百合、亞洲型百合、試管培養、鱗片再生、小鱗莖

摘要：野百合與卷丹等百合種類為常見之食藥用百合，由於組織培養技術具短時間大量生產一致性種苗之用途，且鱗片為百合屬植物最常應用之培植體，再生小鱗莖能力亦因種類而異，因此本研究以國立中興大學園藝學系花卉實驗室選拔之野百合、卷丹等十個食藥用百合品系組培苗進行三代試管內鱗片再繁殖，比較各品系鱗片再生小鱗莖能力，初步選拔易增殖之品系或種類。三代試管內鱗片再生小鱗莖能力以野百合 L641 與亞洲型百合 L709 再生最佳，平均每個鱗莖鱗片可形成二至三個小鱗莖，且再生能力不因代數增加而弱化。

前 言

百合屬植物可作為切花、盆花等花卉觀賞價值外，部分種類之鱗片可作為食用與藥用之用途（許等，2002；Lee *et al.*, 2007；Wang *et al.*, 2015）。食用方面主要將鱗片作為蔬菜作物烹煮或熬煮為百合羹（龍等，1999；李等，2012；Lee *et al.*, 2007；Yu *et al.*, 2015）；藥用方面主要作為植物性中藥，其性味甘寒，具抗發炎、鎮靜、鎮咳、抗氧化、養陰潤肺與清心安神之效果，可用於治療陰虛久咳、痰中帶血與精神恍惚等症狀（張等，2006；Wang *et al.*, 2015）。中國可供食用與藥用之百合種類約有十種，而卷丹(*Lilium lancifolium* Thumb.)等亞洲型百合以及野百合 (*L. brownii* F.E. Brown ex Miellez等)，為較常見之食藥用百合種類（張等，2006；Okubo, 2014）。

種子繁殖或鱗片扦插繁殖法等方式繁殖能力有限，難於短時間內繁殖大量植株(Taha *et al.*, 2018)，因此需開發易於短時間內大量繁殖之技術。而組織培養技術具快速且大量繁殖一致性後代、生產無病毒與高品質植株、種原保存與縮短生長週期等重要性（龍等，1999

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 行政院農委會臺中區農業改良場副研究員。

3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

；許等，2002；Bhandari and Aswath, 2018)。百合屬植物之鱗片為組織培養最常應用之培植體，再生能力亦佳 (Saadon and Zaccai, 2013；Bakhshaie *et al.*, 2016)，且再生小鱗莖能力因種類而異，因此可以之為基礎進行易增殖種類之初步選拔。因此本研究擬比較野百合、卷丹等十種食藥用百合品系組培苗之三代試管內鱗莖鱗片再生小鱗莖能力，以之為基礎初步選拔易再生小鱗莖之種類或品系，並觀察十種百合之各時期鱗莖鱗片再生小鱗莖變化，以及三個再生世代中小鱗莖再生效率之差異。

材料與方法

一、植物材料

本試驗植物材料為國立中興大學園藝學系花卉實驗室蒐集之野百合、卷丹採集株、大花卷丹食用品種白銀 (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii* Baker) (Kawagishi and Miura, 1996a)和花蓮吉安鄉農會之亞洲型食用百合L709等十個百合品系組培苗(表1)，進行三代器內鱗莖鱗片再生小鱗莖效率，以及出瓶栽植之存活率與生長能力比較。

表1. 參試百合食藥用選拔品系種類及來源。

Table 1. Type and its origin of edible and medicinal lily selected accessions tested in the experiment.

Accession No.	種類(品種)	Origin	Year
L493T	野百合	馬祖北竿選拔株	103
L494T	野百合	馬祖北竿選拔株	103
L560	卷丹	浙江採集	106
L637 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L638 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L639 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L640 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	105
L641 ^z	野百合	金門縣農業試驗所選拔株	104
L708	白銀	購自台中第六市場	106
L709	亞洲型百合	花蓮吉安鄉農會	105

二、百合品系組培苗三代試管內鱗片再生小鱗莖效率比較

(一)培養基製備

1. 鱗片增殖培養基製備

鱗片增殖培養基製備如下，以MS (Murashige and Skoog, 1962)配方為基礎鹽類，添加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 (台灣糖業股份有限公司)、 $170\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (Hayashi Pure Chemical Ind., Co., Ltd.)、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Casein Hydrolysate (Sigma-Aldrich Co.)、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸 (α -naphthaleneacetic acid; NAA) (Sigma-Aldrich Co.)、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苄胺基腺嘌呤 (6-Benzylaminopurine; BA) (Sigma-Aldrich Co.)、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ *myo*-inositol (Sigma-Aldrich Co.)與 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 洋菜 (Agar) (光惠貿易有限公司)，以 0.1 N HCl與NaOH調整pH為5.7，接著以 $20\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ (直徑 \times 長)之試管 (Pyrex No. 9820)分裝培養基，每支試管8 mL，再以單層鋁箔紙亮面朝下之方式封口，經滅菌釜以 121°C 、 $1.2\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 高溫高壓滅菌20分鐘，製成斜面培養基，冷卻後備用。

2. 發根培養基製備

發根培養基製備如下，以鱗片增殖培養基為基礎，移除 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA及加入 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性碳 (Taiwan Active Carbon Corp.)，配製完成後以 $20\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ (直徑 \times 長)之 (Pyrex No. 9820)分裝培養基，每支試管8 mL，再以單層鋁箔紙亮面朝下之方式封口。發根培養基另配製以617 mL蘭花瓶分裝之培養基，每瓶蘭花瓶100 mL。經滅菌釜以 121°C 、 $1.2\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 高溫高壓滅菌20分鐘，試管培養基則另製成斜面培養基，冷卻後備用。

(二)三代試管內鱗片再生小鱗莖能力評估

取鱗莖徑大於 0.8 cm 之組培苗，切除根部與葉片後剝下鱗片，以基部向下且向軸面向上之方式培養於鱗片增殖培養基，每支試管培養一個培植體。各品系均培養20個鱗片，培養條件為溫度 $25^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ 、光週期12 hr與光強度 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之日光燈散射光環境。培養後每兩週調查一次各品系鱗片再生小鱗莖情形至第六週，調查項目包含小鱗莖數、帶葉小鱗莖數與生成癒傷組織鱗片數等項目，並以解剖顯微鏡 (Olympus / SZX10, Japan)搭配CCD影像系統 (ProgRes Scan Digital Colour CCD, Germany)拍照記錄。第六週後將植株自鱗莖鱗片分離，切除根部與葉片後繼代至發根培養基，培養條件為溫度 $25^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ ，光週期12 hr與光強度 $56\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之日光燈光照環境。待鱗莖發育至周徑大於 0.8 cm 時，再進行下一代增殖，共增殖三代，比較各代各品系鱗莖鱗片小鱗莖再生效率。

三、統計分析

本試驗採用完全隨機設計 (complete randomized design; CRD)，並以CoStat軟體 (CoStat Software, CoHort Software, USA)進行最小顯著差異比較法 (least significant difference; LSD)，於 $p\leq 0.05$ 下進行試驗結果之單因子變異數 (one way ANOVA)之顯著差異比較。

結 果

各品系百合試管內鱗片培養後第二週，多數品系可見小鱗莖自鱗片基部形成（圖1、2、3），野百合L637、L638、L641等品系之鱗片於培養後易形成癒傷組織（圖1、2），且以野百合L641於培養後第四週與第六週形成癒傷組織之鱗片比例最高，鱗片再生小鱗莖能力則以L709與野百合L641最佳，培養後第六週每個鱗片可分別形成2.82個與2.67個帶葉與不帶葉之小鱗莖，且第一代至第三代再生能力均無弱化（表2）。鱗片再生小鱗莖效率最差之品系為野百合L637，培養後第六週每個鱗片僅可形成0.75個小鱗莖（表2；圖1）。L493T、L494T、L637、L639等野百合品系第二代小鱗莖繼代後無法發育甚至白化死亡，導致上述四個野百合品系無法進行第三代試管內鱗片再生；而卷丹L560，L638與L640等兩種野百合品系，以及白銀L708第二代小鱗莖繼代後，小鱗莖發育所需時間較長，且無法達到適宜進行試驗之鱗莖徑0.8 cm，因此上述品系於第三代試管內鱗莖鱗片再生時無法以試驗所訂之一代20個鱗莖鱗片進行試驗。野百合L640鱗莖鱗片再生能力亦佳，但由於鱗莖含有花青素呈紫紅色，繼代後易褐化，且第二代鱗莖發育能力有限，於第三代增殖時僅以七個鱗莖鱗片進行試驗。

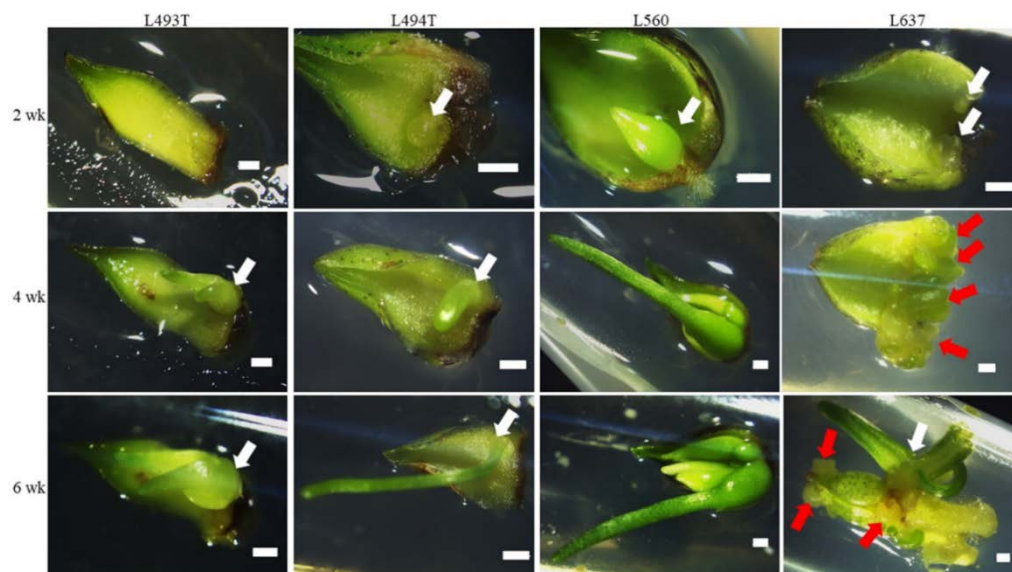


圖1. 野百合及卷丹優良選拔品系試管內鱗片再生小鱗莖能力。

Fig. 1. Ability of *in vitro* bulb scale regenerated bulblets of elite selected line *L. brownii* and *L. lancifolium*.

White arrow indicates well developed bulblets. Red arrow indicates calli and vitrified bulblets. Bar = 1 mm.

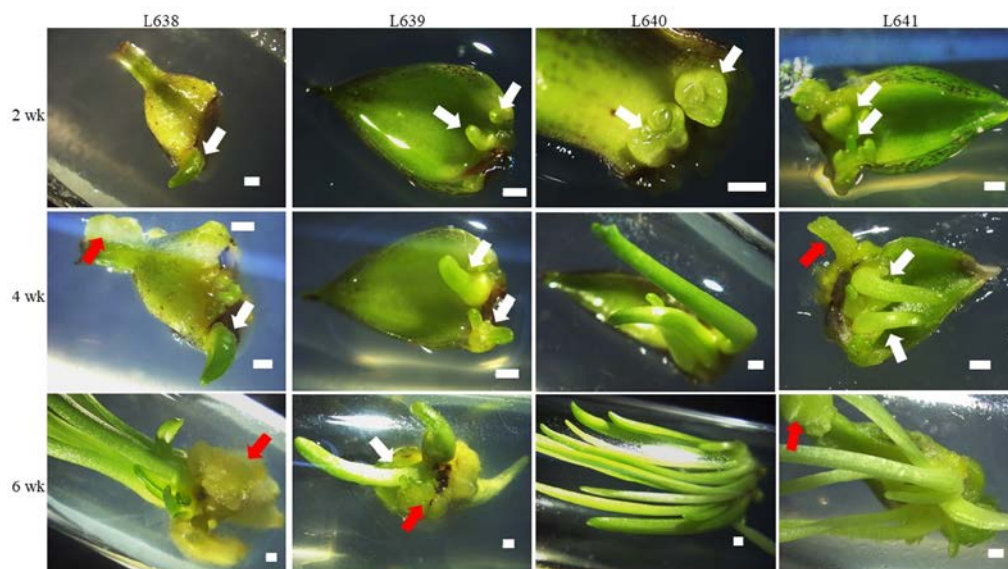


圖2. 野百合優良選拔品系試管內鱗片再生小鱗莖能力。

Fig. 2. Ability of *in vitro* bulb scale regenerated bulblets of *L. brownii*.

White arrow indicates well developed bulblets. Red arrow indicates calli and vitrified bulblets. Bar = 1 mm.

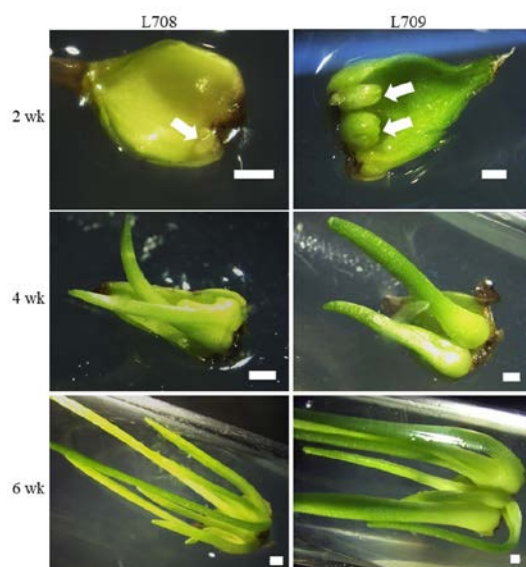


圖3. 大花卷丹'白銀'與亞洲型百合L709優良選拔品系試管內鱗片再生小鱗莖能力。

Fig. 3. Ability of *in vitro* bulb scale regenerated bulblets of Hakugin (L708) and Asiatic lily (L709).

White arrow indicates well developed bulblets. Bar = 1 mm.

表 2. 百合品系第一至三代試管內鱗片再生小鱗莖與小植株效率總和。

Table 2. Sum of efficiency of *in vitro* bulblets and plantlets regenerated from bulb scale of lilies elite lines from first to third generated line.

No. line ^z	Percentage of scales regenerated callus (%) ^y			No. bulblets per scale ^w			No. bulblets with leaves per scale ^v			No. total bulblets and buds on 6 th week ^u
	2 nd week	4 th week	6 th week	2 nd week	4 th week	6 th week	2 nd week	4 th week	6 th week	
L493T	0 ab	0 d	2.5±2.5 d	0.40±0.15 bc	0.95±0.21 bc	1.05±0.22 ab	0.05±0.03 a	0.05±0.03 d	0.05±0.03 e	1.10±0.22 ef
L494T	0 ab	0 d	2.5±2.5 d	0.70±0.16 b	0.63±0.13 c	0.43±0.10 cd	0.05±0.03 a	0.88±0.20 b	1.13±0.21 cd	1.55±0.20 de
L560	0 b	0 d	2.2±2.2 d	0.71±0.17 b	1.42±0.22 ab	1.07±0.19 a	0 a	0.29±0.10 d	0.58±0.14 de	1.64±0.21 de
L637	5.0±3.5 ab ^y	17.5±6.1 bc	55.0±8.0 b	0.13±0.06 c	1.08±0.22 abc	0.60±0.18 bcd	0 a	0.08±0.04 d	0.15±0.08 e	0.75±0.20 f
L638	5.4±3.0 a	28.6±6.1 b	53.6±6.7 b	0.39±0.09 bc	0.75±0.14 c	0.86±0.15 abc	0.04±0.03 a	0.86±0.16 b	1.30±0.25 c	2.16±0.26 bcd
L639	0 ab	7.5±4.2 cd	40.0±7.8 bc	0.43±0.13 bc	1.15±0.18 abc	1.10±0.18 a	0.03±0.03 a	0.33±0.12 cd	0.80±0.21 cd	1.93±0.23 cd
L640	0 b	8.5±4.1 cd	27.7±6.6 c	0.72±0.15 b	1.40±0.23 ab	0.43±0.11 cd	0.02±0.02 a	0.77±0.17 bc	1.85±0.24 b	2.28±0.23 abc
L641	3.3±2.3 ab	40.0±6.4 a	76.7±5.5 a	0.62±0.11 b	1.57±0.18 a	0.73±0.16 abc	0.02±0.02 a	0.95±0.17 b	1.93±0.21 b	2.67±0.21 ab
L708	0 b	0 d	0 d	0.73±0.13 b	0.73±0.14 c	0.75±0.15 abc	0.05±0.04 a	0.91±0.16 b	1.18±0.17 c	1.93±0.20 cd
L709	3.3±2.3 ab	6.7±3.2 cd	8.3±3.6 d	1.43±0.15 a	0.70±0.14 c	0.33±0.09 d	0 a	1.92±0.18 a	2.48±0.18 a	2.82±0.19 a

^z L641 and L709 used 60 bulb scales in experiment, respectively; L638 and L708 used 55 bulb scales in experiment, respectively; L640 used 47 bulb scales in experiment; L560 used 45 bulb scales in experiment; L493T, L494T, L637, and L639 used 40 bulb scales in experiment, respectively.

^y Means ± SE within each column with different letter are significantly different by LSD test at $P \leq 0.05$.

^x Number of bulb scales regenerated callus / number of cultured bulb scales.

^w Number of bulblets without leaf regenerated from bulb scale / number of cultured bulb scales.

^v Number of bulblets with leaf regenerated from bulb scale / number of cultured bulb scales.

^u Sum of no. bulblets without leaf and with leaf regenerated from bulb scale on 6th week.

討 論

卷丹 (*L. lancifolium*)、野百合 (*L. brownii*)與川百合 (*L. davidii*)為較常見之食藥用百合種類 (張等, 2006)。本研究使用之兩個品系野百合L493T與L494T為103年自馬祖北竿採集；五個品系野百合L637、L638、L639、L640與L641為105年自金門採集, 均為食用口感較佳且苦味較低之食藥用野百合選拔單株；卷丹L560為106年自浙江採集；白銀L708為食用品種之大花卷丹 (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii*)或大花卷丹與卷丹之雜交種 (Kawagishi and Miura, 1996a), 於106年購自台中第六市場；L709則來自花蓮縣吉安鄉農會。其中野百合園藝學分類上為喇叭型；卷丹為亞洲型；白銀L708為亞洲型, 主要栽植地為日本北海道, 與天香百合 (*L. auratum*)和卷丹等為日本常見之食用百合種類 (Kawagishi and Miura, 1996a, 1996b; Okubo, 2014); 而L709則依花形判斷其為亞洲型。

百合屬植物所有培植體中以鱗片再生能力最佳 (盧, 2002; Saadon and Zaccari, 2013), 錡 (2017)亦指出各品系野百合試管內鱗莖鱗片再生小鱗莖能力不同, 且部分野百合品系之鱗片易形成癒傷組織。本研究中野百合L637、L638、L639與L641之鱗莖鱗片進行試管內再生時, 有較多鱗片形成癒傷組織, 與錡 (2017)之研究相符。野百合L493T、L494T、L637與L639等品系第二代植株生長勢明顯弱化, 而野百合L637再生之小鱗莖常呈水浸狀, 影響增殖效率, 難以發育至適宜進行試管內鱗莖鱗片再生之鱗莖徑0.8 cm, 甚至再生之植株有白化死亡之情形, 因此上述四個品系之野百合無法進行第三代試管內鱗片再生小鱗莖; 野百合L638、L640, 以及卷丹L560與白銀L708, 第二代植株發育能力有限, 小鱗莖發育需更長時間, 因此第三代試管內鱗片增殖無法以試驗所訂之一代20個鱗片進行試驗。野百合L641與L709之三代植株皆能正常發育, 且野百合L641易形成側芽, 繼代後植株數量常較繼代前增加一倍, 因此極易繁殖, 且生長勢穩定。而L493T、L494T、L637與L639等四種難增殖之野百合品系, 未來可針對其生長特性, 調整培養基配方, 開發適合其鱗片再生小鱗莖之專一性培養基。

本研究亦觀察試驗中十個百合品系之小鱗莖均由鱗片基部形成, 與王等 (2002)和莫等 (2007)提及之野百合單一鱗片再生不定芽之能力以基部最佳相符。Leshem等 (1982)提及將鐵炮百合 (*L. longiflorum*)鱗片以背軸面向下且直立之方式進行試管內鱗片再生, 有最佳小鱗莖發育情形, 推測鱗片再生小鱗莖之器官發生能力存在生長極性差異。Wu等 (2016)提及百合栽培種 (*L. 'Sorbonne'*)鱗片再生小鱗莖過程包含澱粉粒降解、細胞有絲分裂、維管束與輸導組織形成、外帶-內體組織形成、小葉原基與根原基形成、新芽與根部形成等六個階段, 而不定芽經直接器官發生形成。

參 考 文 獻

- 王剛、杜捷、李桂英、梁萬福、幸亨泰。2002。蘭州百合和野百合組織培養及快速繁殖研究。西北師範大學學報38:69-71。
- 杭玲、蘇賓、陳麗新、蘇國秀、程湯、黃卓忠。2001。龍牙百合組培快繁技術研究。廣西農業科學4:183-184。
- 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35:9890-9892。
- 許圳塗、金石文、阮明淑。2002。百合。臺灣花卉發展協會。pp. 23-27, 84-89。
- 張慧芳、蔡寶昌、張志傑、李林。2006。食用百合與藥用百合的成分比較。中醫藥學刊24:436-438。
- 龍雅宜、張金政、張蘭年。1999。百合-球根花卉之王。金質出版社。pp. 7, 48-50。
- 錡虹汝。2017。野百合野生族群花卉性狀之評估與雜交育種。國立中興大學園藝學系碩士論文。台中。63 pp。
- 盧其能。2002。龍牙百合的組織培養和快速繁殖研究。江西農業學報14:43-46。
- Bakhshai, M., S. Khosravi, P. Azadi, H. Bagheri, and J. M. van Tuyl. 2016. Biotechnological advances in *Lilium*. Plant Cell Rep. 35:1799-1826.
- Bhandari, N. S. and C. Aswath. 2018. Standardization of an effective protocol for *in vitro* culture of *Lilium longiflorum* Thunb cv. Pavia. Intl. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7: 1183-1190.
- Kawagishi, K. and T. Miura. 1996a. Changes in nutrient content of spring-planted edible lily (*Lilium leichtlinii* Hook f. var. *maximowiczii* Baker). J. Japan, Soc. Hort. Sci. 65: 339-347.
- Kawagishi, K. and T. Miura. 1996b. Growth characteristics and effect of nitrogen and potassium topdressing on thickening growth of bulbs in spring-planted edible lily (*Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* baker). Jpn. J. Crop Sci. 65: 51-57.
- Lee, K. S., J. Y. Lee, J. W. Lee, E. M. Lee, and M. J. Oh. 2007. Nutritional value in lily scales in *Lilium lancifolium* and *Lilium davidii*. Food 1: 344-346.
- Leshem, B., H. Lilien-Kipnis, and B. Steinitz. 1982. The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets on *Lilium longiflorum* Thunb, bulb scale sections cultured *in vitro*. Scientia Hort. 17: 129-136.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Okubo, H. 2014. History of *Lilium* species in Asia. In: Van Tuyl, J.M. (ed). III Intl. Symp. Genus *Lilium* 1027. pp. 11-26.
- Saadon, S. and M. Zaccari. 2013. *Lilium candidum* bulblet and meristem development. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49: 313-319.

- Taha, L. S., S. S. Sayed, M. M. Farahat, and I. M. El-Sayed. 2018. *In vitro* culture and bulblets induction of Asiatic hybrid lily 'Red Alert'. J. Biol. Sci. 18: 84-91.
- Wang, T., H. Huang, Y. Zhang, X. Li, H. Li, Q. Jiang, and W. Gao. 2015. Role of effective composition on antioxidant, anti-inflammatory, sedative-hypnotic capacities of 6 common edible *Lilium* varieties. J. Food Sci. 80: 857-868.
- Wu, Y., Y. Li, Y. D. Ma, L. Zhang, Z. M. Ren, and Y. P. Xia. 2016. Hormone and antioxidant responses of *Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne' bulblets to humic acid treatments *in vitro*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 92: 155-167.
- Yu, X., J. Zhang, A. Li, Z. Wang, and F. Xiong. 2015. Morphology and physicochemical properties of 3 *Lilium* bulb starches. J. Food Sci. 80: 1661-1669.

Comparison of *In Vitro* Regenerated Efficiency Using Bulb Scale of Edible and Medicinal Lilies Line

Yi-Heng Tsai¹⁾ Wei-Ling Chen²⁾ Chen Chang³⁾

Key words: *L. brownii* F.E. Brown ex Miellez, *Lilium lancifolium* Thunb., *In vitro* culture, Bulb scale regeneration, Bulblet

Summary

Lilium brownii F.E. Brown ex Miellez and *L. lancifolium* Thunb., etc. are common edible and medicinal lilies. Propagation by tissue culture can produce mass amount as well as uniform seedlings in a short time. Bulb scales are the most often used plantlet for *Lilium*, however, the ability of bulblet regenerated from bulb scales *in vitro* were varied with species. Ten edible and medicinal lily selected lines included *L. brownii* and *L. lancifolium*, etc. offered from Lab. Floriculture, NCHU were chosen as experimental materials. Then, the regenerated ability of bulblet *in vitro* within three generations were evaluated. It expected to select lines or cultivars which are easy to propagate primary. According to the results, L641 and L709 had the best ability to regenerate bulblet using *in vitro* bulb scale propagation bulblets, Each bulb scale can produce 2 to 3 bulblets on average. Besides it. the regenerated ability of these two lines were not reduce when the cultural-frequency increasing.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Researcher, Taichung District Agriculture Research and Extension Station.
Chunghwa, Taiwan, R.O.C.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.