結果

一、胚珠培養產生癒傷組織

培養 360 個鐵炮百合幼嫩胚珠，誘導產生癒傷組織約 30 團，每一團癒組織生長活力各異，每個月繼代培養一次，以防止褐化。經過 218 天後，選拔出一個生長活力旺盛的癒傷組織細胞系，編號「LG41」，其外觀呈粉末狀(friable)或小顆粒狀(granular)，顏色為淡黃色(圖 1)。經繼代培養後，癒傷組織表面上可不斷產生新的癒傷組織，形成一循環再生系統。將此種癒傷組織移到不含生長調節劑的 MS 培養基上培養，則在其表面上產生小鱗莖(圖 2)，經繼代培養之後發育為完整植株(圖 3)，植株移植到田間種植後，於第二年春季開花，以肉眼觀察其外觀性狀，各植株之間無明顯差異存在(圖 4)。

二、花部組織誘導產生癒傷組織

鐵炮百合花朵之小花梗及花苞基部培養後，大多數的培植體均出現黴菌污染現象，因此無法獲得完整的試驗數據，僅花絲和花瓣部份未有發黴情形，試驗結果列如表一所示。花絲培養之後，其基部原連接花瓣之處開始膨大，之後逐漸形成癒傷組織，其外觀呈塊狀(compact)，結構較為緊密。花瓣培養之後亦會產生塊狀癒傷組織，但時間較為延後，其產生的部位主要在花瓣生理極性的基部之切口處。花絲產生癒傷組織比率為 91.8%，花瓣為 31.0%。

表一、鐵炮百合花絲與花瓣培養後產生癒傷組織能力之比較

Table 1. Comparison of callus formation capacity between flower filament and petal of Lilium longiflorum Thunb.

培植體 Explant	產生癒傷組織比率 Callus formation rate (%)
花絲 Filament	91.8±10.8
花瓣	31.0±11.5

Petal

進一步比較不同生長調節劑組合對花絲培養產生癒傷組織之影響，鐵炮百合花絲放置於培養基上，培養 7 天之後，其基部出現膨大現象，部份花絲的切口處開始產生白色不規則狀的癒傷組織，培養時間越久癒傷組織發育的情形越為明顯，然而部份花絲僅膨大並未產生癒傷組織，甚至逐漸褐化。培養 6 週後之調查結果如表二所示。培養於不同組成份的培養基，花絲變化的情形頗為不同，在完全不含植物生長調節劑的 MS 基本培養基、或僅含 BA 的培養基上，花絲僅出現膨大現象，並不產生癒傷組織，而在含有 2,4-D 的 LD1 和 LD3 培養基上，花絲則會產生癒傷組織，且隨著 2,4-D 濃度的增加，其出現的比率有增加的趨勢。另一方面，花絲褐化的比率，則隨著 2,4-D 濃度的增加，而有降低的趨勢。

取花絲培植體所產生的癒傷組織，繼代培養於 LD3 培養基上，二個月後產生小鱗莖，之後萌發成完整小植株。

表二、不同植物生長調節劑組成份對鐵炮百合花絲培養產生癒傷組織之影響

Table 2. The effect of plant growth regulators on callus formation rate of the filaments of *Lilium longiflorum* Thunb.

培養基 Medium			產生癒傷組織比率 Callus formation rate (%)	花絲膨大但無產生癒傷組織比率 Swelled filaments without callus (%)	花絲褐化比率 Browning filaments (%)
代號	BA (mg/l)	2,4-D (mg/l)			
MS	0	0	0.0±0.0	23.3±17.9	68.3±22.8
LD0	0.25	0	0.0±0.0	40.9±31.1	74.2±18.8
LD1	0.25	1.0	98.3±5.3	0.0±0.0	20.0±13.1
LD3	0.25	3.0	100.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

三、百合基因轉殖之研究

（一）抗生素 hygromycin 對百合組織培養之影響

鐵炮百合花絲培養於不含 hygromycin 的 LD3 培養基之後，有 70.8%的培植體在花絲的基部產生癒傷組織，花絲本身則由白色轉變成黃綠色。花絲培養於含有 hygromycin 的培養基，對於癒傷組織的發生有抑制作用，低濃度時(1.25 mg/l)抑制效果不明顯，隨著濃度增加，抑制效果愈為明顯，當 hygromycin 濃度為 20 mg/l 時，所有培養的花絲均無產生癒傷組織；濃度提高至 40 mg/l 時，全部的花絲也均無產生癒傷組織，而且花絲呈白化死亡現象(表三)。

表三、不同 hygromycin 抗生素濃度對鐵炮百合花絲組織培養之影響

Table 3. The effect of hygromycin concentration on callus formation rate of the filaments of Lilium longiflorum Thunb.

Concentration of hygromycin	花絲組織培養後之反應 Response of the filaments cultured

(mg/l)	產生癒傷組織之比率 With callus formation (%)	花絲白化之比率 Turned albino (%)
0(CK)	70.8	8.3
1.25	83.3	4.2
2.5	55.8	19.2
5.0	12.5	25.0
10.0	37.5	4.2
20.0	0.0	79.2
40.0	0.0	100.0

鐵炮百合癒傷組織(LG41)培養於不含 hygromycin 的 LD3 培養基之後，其生長情況極為良好，且未發生褐化現象。癒傷組織培養於含有 hygromycin 的培養基，對百合癒傷組織之發育有抑制效果，低濃度時(2.5 mg/l 以下)效果不明顯，但隨著濃度增加，抑制效果愈為明顯；hygromycin 濃度為 10 mg/l 時，100%的癒傷組織團塊均發生程度不一的褐化現象；濃度提高至 40 mg/l 時，全部的癒傷組織均褐化死亡(表四)。

表四、不同抗生素(hygromycin)濃度對鐵炮百合癒傷組織之影響

Table 4. The effect of hygromycin concentration on the response of callus cultured on Lilium longiflorum Thunb.

Concentration of hygromycin (mg/l)	癒傷組織培養後之反應 Response of the callus cultured	
	具有褐化癒傷組織之細胞團 Percentage of callus aggregate with browning cells (%)	褐化癒傷組織所佔之比率 Percentage of browning callus (%)
0 (CK)	0.0	0.0
1.25	0.0	0.0
2.5	0.0	0.0
5.0	91.7	7.4
10.0	100.0	38.3
20.0	100.0	85.0
40.0	100.0	100.0

（二）農桿菌轉殖法

鐵炮百合花絲經過農桿菌處理之後，置於含 40 mg/l hygromycin 之選擇性培養基上培養，培養 3 週之後，部份花絲變成白化，停止生長，部份花絲長出癒傷組織。試驗最後的結果顯示，花絲和農桿菌液浸漬的時間為 30 分鐘時，培植體產生癒傷組織的比率最高(表五)；而花絲與農桿菌共培養的時間為 2 日時，花絲褐化比率較低，且產生癒傷組織比率較高(表六)。

部份花絲在含有 hygromycin 選擇性培養基上培養之後，產生癒傷組織，顏色由白轉成綠色，可存活一段時間，惟在培養 51 天之後所有的培植均褐化死亡。

表五、農桿菌液浸漬時間長短對鐵炮百合花絲產生癒傷組織之影響

Table 5. The effect of immersion time with Agrobacterium on cultured response of the filaments.

浸漬時間 Immersion time (min)	花絲經農桿菌處理後之反應 The response of filaments	
	變褐化之比率 Browning (%)	產生癒傷組織比率 With callus formation (%)
10	73.8±18.9	2.4±0.6
20	45.2±12.6	23.8±16.3
30	59.5±23.3	33.3±21.5

表六、與農桿菌共培養時間長短對鐵炮百合花絲產生癒傷組織之影響

Table 6. The effect of co-cultured period with Agrobacterium on callus formation of the filaments cultured.

共培養時間 Co-culture period (day)	花絲經農桿菌處理後之反應 The response of filaments	
	變褐化之比率 Browning (%)	產生癒傷組織比率 With callus formation (%)
1	50.0±21.1	25.0±17.5
2	38.9±13.6	33.3±14.9
3	63.9±24.5	25.0±20.4

（三）基因槍轉殖法

鐵炮百合癒傷組織 LG41 經基因槍射擊後次日，表面產生許多暗色流質，並且在其後逐漸轉呈褐色，對於癒傷組織細胞之成長有所阻礙。轉殖後第 3 天取癒傷組織以組織化學法檢測，結果部份細胞呈藍色反應，顯示 GUS 基因已有暫時性表達現象（圖 7）。之後每週固定進行檢測，連續進行三次，每次均測得藍色反應，而且藍色程度愈來愈深，顯示 GUS 基因表達頗為穩定。63 天之後，有少部份癒傷組織在含有 hygromycin 之培養基上仍能存活，其外觀為深黃色顆粒狀（圖 8），惟經繼代培養最後仍全部褐化死亡，未有進一步分化再生的現象。