鐵炮百合癒傷組織再生系統應用於基因轉殖之研究初報[1]

林學詩、蔡月夏、王啟正[2]

摘要

為進行鐵炮百合基因轉殖，先行建立癒傷組織再生系統，培養大量具有強再生能力之癒傷組織培植體，以供基因轉殖研究用。在誘導癒傷組織方面，由鐵炮百合自交胚珠培養，獲得一生長活力旺盛的癒傷組織細胞系「LG41」，外觀淡黃色，呈粉末狀或小顆粒狀，在含 2,4-D(3.0 mg/l)及 BA(0.25 mg/l)的 MS 培養基上，可不斷產生新的癒傷組織，形成一循環再生系統，移到不含植物生長調節劑的培養基上培養，能再生完整植株。此外，鐵炮百合花絲容易誘導產生癒傷組織，其成功率為 91.8%，因此亦適合作為農桿菌基因轉殖試驗用培植體。以農桿菌轉殖法進行試驗，將鐵炮百合幼嫩花絲浸漬帶有 GUS 和抗 hygromycin 基因的農桿菌液，進行感染，花絲浸漬的時間為 10, 20, 30 分鐘三種處理，花絲與農桿菌共培養時間為 1, 2, 3 日三種處理，分別進行試驗。結果分花絲與農桿菌液浸漬的時間以 30 分鐘效果較佳，與農桿菌共培養的時間以 2 日較佳。花絲培養之後產生綠色癒傷組織，在含有 40 mg/l hygromycin 選擇性培養基上培養，可存活一段時間，但在培養 51 天之後全部褐化。另以基因槍轉殖法進行試驗，先行純化抽取含 GUS 及抗 hygromycin 基因之 DNA，包覆在金粒子上，再以 Bio-Rad PDS1000/He 粒子傳送系統，打進鐵炮百合癒傷組織 LG41 之細胞內。轉殖後取癒傷組織以組織化學法檢測，結果部份細胞呈藍色反應，顯示已有 GUS 基因暫時性表達現象。

（關鍵詞：鐵炮百合、花絲培養、癒傷組織、基因轉殖）

[1.]花蓮區農業改良場研究報告第 171 號。

[2.]花蓮區農業改良場作物改良課副研究員兼課長、技佐、助理研究員。

前言

百合為國內重要的切花作物，2001 年栽培面積 343 公頃，栽培用之種球幾乎全仰賴蘭進口，因此在國內進行百合育種，及種球培育等相關性之研究，有其必要性。百合栽培上較棘手的問題是病蟲害問題，尤其是病毒病、灰黴病、蟲害等，十分嚴重而且不易解決，現有栽培品種多未具有抵抗性，傳統雜交育種亦面臨困境。利用生物技術，可能突破傳統育種的限制，不必透過雜交方式，將抗性基因轉殖到栽培品種，使其具有抵抗性，將是未來育種科技發展的重點。百合基因轉殖之研究，世界上有一些研究單位在進行，惟其成果十分有限，一直到近年才有所突破，最主要的原因有二點：一、百合是單子葉植物，而應用於雙子葉植物基因轉殖很有效的系統，例如農桿菌(*Agrobacterium*)轉殖法，效果並不好，文獻報告只證明百合是農桿菌的寄主之一(Cohen et al. 1992; Langeveld et al. 1995)。二、單子葉植物之細胞再生能力較弱，以致影響轉殖之成功率(Smith and Hood 1995)。因此，除了要研發感染能力更強的農桿菌品系外，還必須開發植物再生能力更佳的細胞系，才能提昇轉殖成功率(Christou

1995)。

在另一方面，基因槍粒子轟炸法(particle bombardment)，在單子葉花卉植物基因轉殖上已經有許多成功的案例。百合方面，Nishihara et al. (1993)報導，應用基因槍法將 GUS 基因打到花粉裡面，得到藍色基因之表達。Leede-Plegt et al. (1997)報導，利用基因槍轉殖之鐵炮百合的花粉來授粉，而後將獲得的種子播種到含有抗生素「kanamycin」的選拔培養基上培養，成功得到轉殖植株，此為世上第一個報導百合基因轉殖成功實例。惟其缺點是：所耗時間太久又費工，轉殖效率也不高。Watad et al. (1997)報導，以百合癒傷組織為材料，利用基因槍將基因打到癒傷組織裡，並加以培養，最後成功地獲得轉殖植株。以懸浮培養之胚性癒傷組織為材料，利用基因槍轉殖法也成功地得到轉殖百合植株(Löffler 1999；Tribulato et al. 1997)。其做法是取百合鱗莖先行誘導產生癒傷組織，再建立一「懸浮培養體系(suspension culture)」，產生較小顆粒狀的胚性癒傷組織，以此種材料作為基因槍轉殖受體，而後獲得轉殖植株。因此，如何開發一有效率的組織培養系統，能產生大量再生能力強的培植體，持續供試驗研究應用，為確保基因轉殖成功之之先決條件(Christou, 1995)。本研究擬先行開發鐵炮百合癒傷組織再生系統，再利用農桿菌及基因槍進行基因轉殖，將抗病、蟲害基因轉殖到百合植株體內，以創造新品種。

材料與方法

一、百合癒傷組織之誘導與植株再生系統之建立

(一)鐵炮百合胚珠培養與癒傷組織之誘導

以台灣原生的鐵炮百合(*Lilium longiflorum* Thunb.)為材料，依據蔡、林(1996)敘述之方法，並採用其培養基配方。在百合花開時進行自交授粉，授粉完後 7 至 10 天，取下子房進行子房橫切片培養；7 週之後再取出膨大之胚珠，進行胚珠培養。再經過一段時間培養之後，胚珠表面長出癒傷組織，每一團癒傷組織各別單獨編號繼代培養；選取生長活力旺盛之癒傷組織團塊，進一步大量繁殖，以建立癒傷組織循環再生系統。

(二)百合花部組織之培養與誘導產生癒傷組織

材料為台灣原生的鐵炮百合(*Lilium longiflorum* Thunb.)，取幼嫩百合花苞(長度 2 公分以內)，在無菌操作箱內，先浸入 95%酒精內，隨即取出在酒精燈上以火點燃，迅速過火作表面消毒。之後剝開外層苞片，取內層的花瓣、和雄蕊花絲，連同小花梗、花苞基部等進行培養。小花梗和花絲整個作為培植體，而花苞基部和花瓣則橫切成約 0.5 公分長作為培植體。

培養基組成份參考 Chang et al. (2000)報告，為全量 MS 加 2,4-D 3.0 mg/l、BA 0.25 mg/l、蔗糖 30g/l、洋菜 8.0 g/l，pH 值 5.8。培養基放置於小型廣口瓶中，每一瓶約 25 ml。每一個廣口瓶中培養 6 個培植體(花絲或花瓣)，試驗重複 7 次，每次取 4 朵花至 14 朵花不等，總共採取 73 朵花進行本試驗。培養 6 週之後調查培植體產生癒傷組織之比率。

另為探討不同濃度之 2,4-D 與 BA 組合，對於誘導百合產生癒傷組織之難易，取鐵炮

百合花絲為培植體進行培養。培養基成份以 MS 為基本，添加 2,4-D (0, 1.0, 3.0 mg/l)與 BA (0, 0.25 mg/l)相組合，其餘成份：蔗糖 30g/l、洋菜 8.0 g/l，pH 值 5.8。試驗於小型廣口瓶中進行，每瓶中放置 6 個花絲，每種處理各重複 10 次，培養 6 週之後調查培植體產生癒傷組織之比率。

二、百合基因轉殖之研究

(一)抗生素 hygromycin 對百合組織培養之影響

由於本試驗所採用之質體(pCAMBIA1301)內帶有抗 hygromycin 基因，可作為篩選指標，而植物對於 hygromycin 有忍耐性，為瞭解百合花絲和癒傷組織對於 hygromycin 之忍耐極限（致死濃度），首先進行各種濃度測試，以 LD3 為基本培養基配方，再添加 hygromycin 濃度為：0 (對照組)、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/l 等，共 7 種處理。試驗於直徑 9 公分之培養皿中進行，每一培養皿倒入大約 25 ml 的培養基，其上放置 6 個（或 6 團）培植體，每一處理各 4 重複。之後每週調查癒傷組織褐化情形，並估算褐化百分比，試驗於 7 週後結束。

(二)農桿菌轉殖法

利用鐵炮百合花絲進行基因轉殖試驗，所使用之農桿菌系為 LBA4404，內含一個雙偶型質體 pCAMBIA1301，具有抗抗生素(hygromycin)基因，再構築一段 GUS 基因和 trypsin inhibitor 基因等，均以 CaMV 35S 啟動子啟動，基因構築為台灣大學葉開溫教授所提供。以 hygromycin 為選拔用藥劑，並以 GUS 組織化學染色之藍色表現為標記。

供測試之培植體為台灣原生鐵炮百合之花絲，由幼嫩花苞取下備用。農桿菌先以 LB 培養基在 37℃之下培養一夜之後，再以液體 LD3 培養基加以稀釋(1:1)。隨即將花絲放入農桿菌液中使其自然感染，再撈起以濾紙吸乾，之後放置於半固體 LD3 培養基上，在 30℃之環境下進行共培養。共培養之培養基有二種，一添加 acetosyringone (AS)，一則否，兩者進行比較，以測試 AS 對轉殖效率之影響。每一個花絲視為一單位，培養 7 週之後調查花絲產生癒傷組織之比率，以及白化比率。

為瞭解農桿菌液浸漬時間長短、及共培養時間長短對轉殖之影響，分別進行二項試驗探討：一、花絲浸漬農桿菌時間為：10、20、30 分鐘等 3 種處理；二、共培養時間為：1、2、3 天等 3 種處理。轉殖處理後取出少量樣品，浸漬於 x-gluc 溶液中（參考 McCabe et al. 1988 所用之方法），置於 37℃恒溫箱中 24 小時，進行組織化學染色，以檢測 GUS 基因表現情形。

(三)基因槍轉殖法

轉殖試驗所用之質體，與前一農桿菌轉殖試驗相同，惟質體先行轉入大腸桿菌體內。含質體之大腸桿菌先行以 LB 培養基大量繁殖，經過培養一夜後，再依循 Lin et al. (2000) 所敘述之方法，抽取純化之質體 DNA，再將其包覆於 1.0μm 之金粒子上備用。

所使用的基因槍為 PDS-1000/He 粒子傳送系統(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)，以高壓氦氣為動力，在真空狀態下，藉高速推力穿透細胞壁，將金粒子以及包覆於其上的 DNA

分子送進植物細胞內。機械裝置設定為：真空狀態 25 inch Hg、推力 1100 psi、射擊距離 6 cm。每一份材料射擊一次，每次射擊使用的金粒子量為 0.5 mg，DNA 量約為 4μg。

供測試之培植體為鐵炮百合癒傷組織細胞系 LG41，外觀呈淡黃色，粉末狀。每一團癒傷織視為一培植體單位，其直徑約 1.0 公分。基因槍轉殖程序依循 Lin et al. (2000)所報告之方式為之，試驗進行前將癒傷組織集中移到培養皿正中心處，直徑為 2.5 公分，基因槍射擊後次日再將癒傷組織移動，分散於培養皿上各處。一次試驗總共處理 12 個培養皿。

射擊 3 天後，取出少量癒傷組織細胞，浸漬於 x-gluc 溶液中（參考 McCabe et al. 1988 所述之方法），放入 37℃恒溫箱中 24 小時，進行組織化學染色，以檢測 GUS 基因表現情形，之後每週重複檢測一次。射擊 30 天後再將培植體移至含 hygromycin (40 mg/l)之選擇性培養基上培養，以便選拔抗性細胞系。

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。

討論

一、百合癒傷組織之誘導與再生系統之建立

在鐵炮百合方面，本試驗研發二個癒傷組織再生系統，一為透過胚珠培養，另一為透過花絲培養而來，癒傷組織繼代培養後以產生小鱗莖的方式，培養成完整植株。由於幼嫩胚珠具有很強的再生能力，因此利用胚珠培養建立再生系統，在其他單子葉花卉植物也甚為常見，

例如百合水仙（Hutchinson et al. 1994; Van Schaik et al. 1996）。此項系統之缺點是胚珠乃由有性生殖而來，後裔植株之遺傳性狀與原來的母株會有差異性存在，因此不適於作商業品種大量繁殖之用，而常應用於遠緣雜交育種研究，以克服種間雜交障礙（Van Tuyl et al. 1991），其優點為繁殖效率高，在短期間內可以大量獲得，且穩定供應試驗研究所需之癒傷組織材料，因此也常被從事基因轉殖研究所採用。

百合植株之器官，可用以誘導產生癒傷組織，建立再生系統後進行量產，例如花柱及花梗（Tribulato et al. 1997a）、花絲（Arzate-Fernandez et al. 1997）、鱗片（Van Harmelen et al. 1997）等，本研究利用鐵炮百合花絲為培植體，誘導產生塊狀癒傷組織，亦可繼代培養，建立一再生繁殖系統。花絲培養後產生癒傷組織的成功率高，且反應迅速，培養一週之後即可見到反應，為良好的試驗材料，可應用於基因轉殖試驗。

前人研究報告指出鐵炮百合 Snow Queen 品種的花柱以及花梗切片培養，會產生二種癒傷組織，一種是塊狀(compact)，容易分化為植物器官；另一種是粉末狀(friable)，分化程度較低，可加以利用作懸浮培養，產生擬胚(Tribulato et al. 1997a)，本研究結果與其結果相類似，花絲培養後產生塊狀癒傷組織，胚株培養則產生粉末狀癒傷組織。

癒傷組織再生系統可否應用於百合種苗大量繁殖，迄無定論，主要必須考慮植株是否有變異現象存在。Priyadarshi and Sen (1992)培養鐵炮百合鱗片癒傷組織，將其置於培養基上三年，其快速再生之能力不減，且檢查其染色體，並無變異現象發生。Arzate-Fernandez et al. (1997)培養鐵炮百合花絲癒傷組織，之後所獲得的植株，經外觀目視，或經同功異構酵素法測定，或染色體檢測，均無變異現象，因此認為是一穩定可行之繁殖法。然而 Van Harmelen et al. (1997) 培養鐵炮百合鱗片癒傷組織，此一癒傷組織置於 20℃黑暗中保存三年仍具有再生能力，400 個再生植株中有 14 株外表具有變異性狀，例如葉色葉形變異、雄不稔、矮化等。本試驗培養鐵炮百合胚珠或花絲癒傷組織，所獲得之植株，其外觀並未發現有變異現象，應可利用於繁殖種苗。

二、百合基因轉殖

單子葉植物細胞對於基因轉殖之選拔用抗生素，如 kanamycin，具有相當大的耐抗性，在鬱金香方面，濃度高達 500 mg/l 時，植株還能存活（Wilmink and Dons 1993），因此在基因轉殖上，必須慎選抗性基因並配合適當篩選藥劑，才能提高轉殖效率。在眾多抗生素中，hygromycin 被認為是一種選拔效率較好的藥劑，應用在單子葉植物水稻基因轉殖方面極為成功，濃度 50 mg/l 即可達到篩選之目的（Rashid et al. 1996）。本試驗中鐵炮百合花絲培植體，以及癒傷組織培植體對於 hygromycin 的最低忍受極限，經測試結果均為 40 mg/l，此一濃度適合作為鐵炮百合基因轉殖試驗之篩選劑量。

基因之啟動子，為影響植物基因轉殖成功率的重要因素之一，Tribulato et al. (1977a)研究結果顯示，基因轉殖試驗常用的啟動子如 CaMV 35S、水稻 actin、玉米 ubiquitin 等，應用於百合癒傷組織基因轉殖試驗，轉入百合細胞的基因均有表達現象。本研究所使用之 GUS 基因是由 CaMV 35S 啟動子所控制，轉入至鐵炮百合癒傷組織細胞之後，同樣有暫時性表達現象，

與其結果相類似。轉殖處理後之培植體在含有 hygromycin 的培養基上存活時間超過 50 天，惟其後並無進一步再生的現象，是否抗 hygromycin 基因未表達，或有其他原因，須進一步試驗探討。

圖片說明

圖 1. 鐵炮百合粉末狀癒傷組織細胞系 LG41

圖 2. 癒傷組織上產生小鱗莖

圖 3. 小鱗莖發育成完整植株

圖 4. 由癒傷組織發育而來之百合植株於田間開花情形

圖 5. 花絲培養於含 40 mg/l hygromycin 之培養基後白化死亡

圖 6. 癒傷組織培養於含 40 mg/l hygromycin 之培養基後褐化死亡

圖 7. 基因槍轉殖處理後部份癒傷組織出現藍色 GUS 基因表達現象

圖 8. 癒傷組織經基因槍轉殖處理後置於含 hygromycin 培養基培養之情形，黃色部份為仍具有活性之癒傷組織

Fig. 1. Friable callus line LG41 of Lilium longiflorum Thunb.

Fig. 2. The bulblets were formed on calluses.

Fig. 3. The bulblets developed into plantlets.

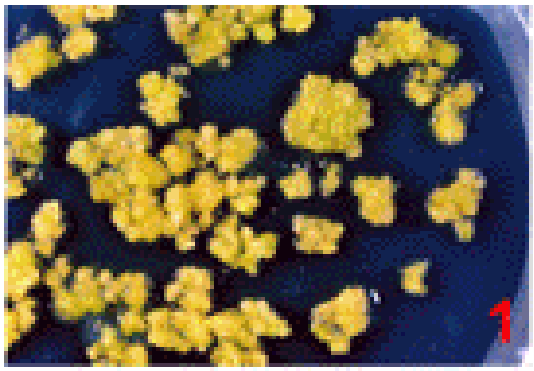
Fig. 4. The lily plants, which were originated from calluses, flowering in the field.

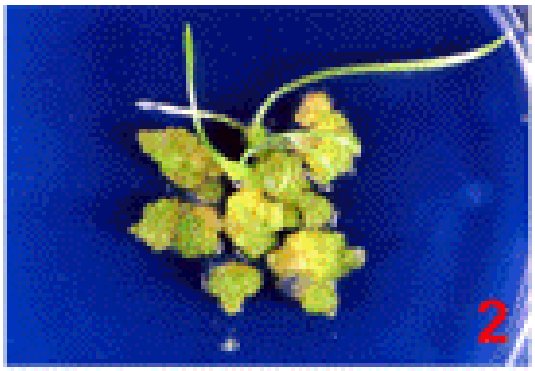
Fig. 5. The filaments turned white and died after cultured on a medium containing 40 mg/l of hygromycin.

Fig. 6. The calluses turned brown and died after cultured on a medium containing 40 mg/l of hygromycin.

Fig. 7. After particle bombardment, some blue staining calluses appeared, which indicated that GUS gene is expressed.

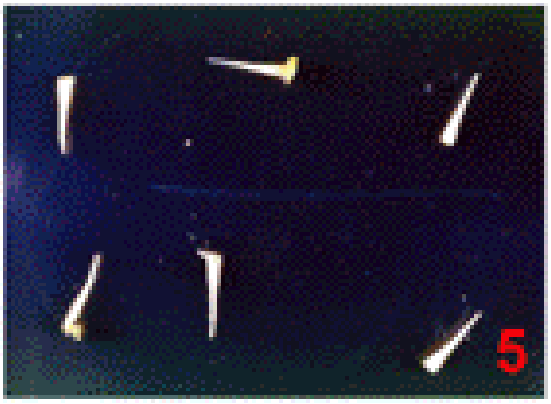
Fig. 8. Calluses were cultured on a medium containing 40 mg/l of hygromycin after particle bombardment. The yellowish calluses are still alive.

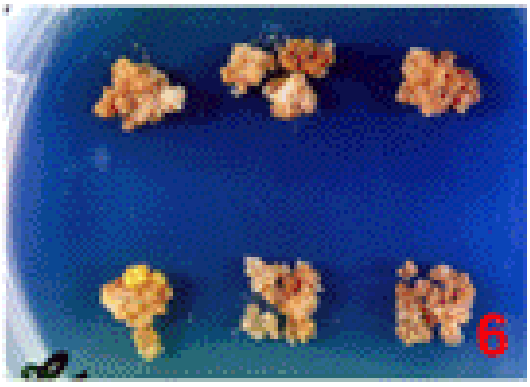


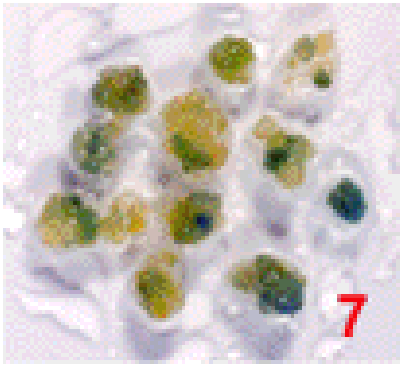


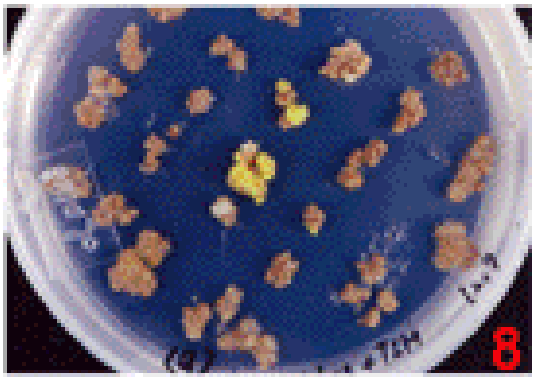












誌謝

本試驗承蒙國立台灣大學植物系葉開溫教授提供相關的農桿菌與質體構築，試驗經費承蒙行政院農業委員會補助(計畫編號：89 生技-2.1-糧-01(07))，謹此致謝。

參考文獻

1.蔡月夏、林學詩 1996 提高百合種間雜交效率之研究 p.88-99 球根花卉產業研討會專集 種苗改良繁殖場編印。

2.Arzate-Fernandez, A.M., T. Nakazaki, Y. Okumoto, and T. Tanisaka. 1997. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). Plant Cell Rep. 16:836-840.

3.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.

4.Cohen, A. and C.P. Meridith. 1992. Agrobacterium-mediated transformation of Lilium. Acta Hort. 325: 611-618.

5.Christou, P. 1995. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. Euphytica 85:13-27.

6.Hutchinson, M.J., J.M. Tsujita, and P.K. Saxena. 1994. Callus induction and plant regeneration from mature zygotic embryos of a tetraploid Alstroemeria (A. pelegrina x A. psittacina). Plant Cell Rep. 14:184-187.

7.Langeveld, S.A., M.M. Gerrits, F.L.M. Derks and P.M. Boonekamp. 1995. Transformation of lily by Agrobacterium. Euphytica 85: 97-100.

8.Leedge Plegt, L.M.v.d., B.C.E. Kronenburg van der Ven, J. Franken, J.M.van Tuyl, A.J. van Tunen, and H.J.M. Dons. 1997. Transgenic lilies via pollen-mediated transformation. Acta Hort. 430: 529-530.

9.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. Sci. Hort. 17:129-136.

10.Lin, H.S., C. v.d. Toorn, K.J.J.M. Raemakers, R.G.F. Visser, M.J. De Jeu, and E. Jacobsen. 2000. Genetic transformation of Alstroemeria using particle bombardment. Mol. Breed. 6:369-377.

11.Löffler, H. J.M. 1999. Genetic modification of bulbous crops: a review. p.170-179. In: T.F. Sheen (eds.) 'The International Symposium on Development of Bulb Flower Industry". Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Taichung, Taiwan.

12.McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinelli, and P. Christou. 1988. Stable transformation of soy bean (Glycine max) by particle acceleration. Bio/technology 6:923-926.

13.Nishihara, M., M. Ito, I. Tanaka, M. Kyo, K. Ono, K. Irifune, and H. Morikawa. 1993.

Expression of the beta-glucuronidase gene in pollen of lily (Lilium longiflorum), tobacco (Nicotiana tabacum), Nicotiana rustica, and peony (Paeonia lactiflora) by particle bombardment. Plant Physiol. 102: 357-361.

14.Priyadarshi, S. and S. Sen. 1992. A revised scheme for mass propagation of Easter lily. Plant Cell Tissue Organ Cult. 30:193-197.

15.Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice. Plant Cell Rep. 15:727-730.

16.Simmonds, J.A. and B.G. Cumming. 1976. Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates. Sci. Hort. 5: 161-170.

17.Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. Crop Sci. 35:301-309.

18.Tribulato, A., P.C. Remotti, and H.J.M. Löffler. 1997a. Lily regenerative callus and cell cultures for transformation. Acta Horti. 430: 299-306.

19.Tribulato, A., P.C. Remotti, H.J.M. Loffler, and J.M. Van Tuyl. 1997b. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. Plant Cell Rep. 17:113-118.

20.Van Harmelen, M.J., H.J.M.Loffler, and J.M. Van Tuyl, 1997. Somaclonal variation in lily after in vitro cultivation. Acta Hort. 430:347-350.

21.Van Schaik, C.E., A. Posthuma, M.J. De Jeu, and E. Jacobsen. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria spp.* L. Plant Cell Rep. 15:377-380.

22.Van Tuyl, J.M., M.P. Van Dien, M.G.M. Van Creij, T.C.M. Van Kleinwee, J. Franken, and R.J. Bino. 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Sci. 74:115-126.

23.Watad, A.A., D.J. Yun, T. Matsumoto, X. Niu, Y. Wu, A.K. Kononowicz, R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa. 1997. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. Plant Cell Rep. 17: 262-267.

24.Wilmink, A. and J.J.M. Dons. 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. Plant Mol. Bio. Rep. 11:165-185.