

赵乙璉, 席梦利. 百合组培鳞茎一次性成球技术体系的构建[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(9): 162–165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.09.022

百合组培鳞茎一次性成球技术体系的构建

赵乙璉, 席梦利

(南京林业大学林学院, 江苏南京 210037)

摘要:为简化百合组培操作流程,减少鳞茎培养基配方的种类,缩短种球繁育周期,满足企业及种球生产用户百合繁育的需求,以百合品种“幸运花束”为试材,通过对百合组培生长过程中的温度、光照等培养环境及激素、蔗糖、培养基等进行优化,并结合实际生产进行了筛选。结果表明,25℃条件下有利于百合鳞茎的发育,温度过高($\geq 30^{\circ}\text{C}$)或过低($\leq 15^{\circ}\text{C}$)都会严重抑制鳞茎的生长;而在光照培养过程中,全暗培养不仅有利于鳞茎的发育,而且节约能源,更能满足实际生产的需求;在激素组合诱导鳞片成芽及促进鳞茎发育的过程中,6-BA 和 NAA 依然是百合组培的最佳组合,但在鳞片诱导成芽及小鳞茎发育膨大的过程中,其激素组合浓度虽有差异,但通过对比研究表明 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 激素组合能够同时满足百合鳞片不定芽诱导和小鳞茎发育的需求;在蔗糖的添加中,60 g/L 的蔗糖浓度有利于百合鳞茎的生长发育,过高易造成鳞茎发育畸形,过低导致营养不足;1/2MS、MS 等 2 种培养基对组培鳞茎根的发育差异性较小、生根状态都良好,且都显著好于 1/4MS 和 2MS。研究表明,MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 60 g/L,琼脂 6 g/L, pH 值 5.8~6.0,在 25℃ 和全暗条件下培养 45 d 的百合组培技术体系,可以满足百合组培规模化实际生产的需求,为百合种球繁育提供技术支撑。

关键词:百合;组培;一次性成球;规模化繁育

中图分类号:S644.104⁺.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)09-0162-04

百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)属于百合科百合属,为多年生宿根草本植物^[1]。作为世界上最重要的商品和公园花卉,在切花、庭院及公园绿化等方面得到广泛的应用^[2],有力助推了乡村产业经济的发展和美丽中国的建设。近年来,随着市场需求和种植面积的增加,百合种球的需求量越来越大,但由于百合株芽、种子和鳞片扦插等传统的繁殖方法存在易带病、感病、种球品质差等缺点^[3],严重制约了百合产业的发展。而百合组培具有保持繁殖系数高、缩短种球繁育周期、种球品质好等特性^[4],有利于百合种球的规模化、标准化生产及百合新品种的培育。

目前,关于百合组培的报道较多,大多以鳞片、叶片为外植体,通过诱导愈伤、转化成苗、鳞茎生根等步骤进行并建立了高效的组培体系^[5]。但由于所需培养基配方较多,培养周期较长,实际操作过

程较为繁琐,生产的百合组培鳞茎质量参差不齐,因此在繁育过程中难以标准化实施及普及。简化组培操作流程,减少鳞茎培养基配方种类,构建一次性成球的百合组培技术体系,才能满足企业及种球生产用户繁育需求。然而关于百合组培鳞茎一次性成球体系的研究却相对较少。百合组培鳞茎一次性成球技术体系,就是通过 1~2 种鳞茎培养基配方,在基本相同的培养环境体系下,培养高品质组培鳞茎的过程。本研究是在传统百合鳞茎组培的基础上,通过对温度、光照等培养环境以及蔗糖、植物生长调节剂、培养基等培养体系的综合优化和筛选,建立了高效的百合组培鳞茎一次性成球的技术体系,可为百合种球规模化组培扩繁提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

供试百合品种为“幸运花束”,选取无病虫害、无机械损伤的“幸运花束”种球中层鳞片为试验材料,用自来水流水冲洗 30 min 后,先用 75% 乙醇浸泡摇动 30 s,再用 0.5% 次氯酸钠消毒 10 min,用无菌水漂洗 4 次后备用。每个试验重复 3 次,每个处理 5 个外植体。试验于 2022 年 1—12 月在南京林

收稿日期:2023-02-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31670603)。

作者简介:赵乙璉(1995—),女,江苏连云港人,博士研究生,从事植物细胞工程及分子细胞遗传学研究。E-mail:719591137@qq.com。

通信作者:席梦利,博士,教授,主要从事植物细胞工程及分子细胞遗传学研究。E-mail:ximenglinifu@126.com。

业大学林学院进行。

1.2 温度及光照对百合组培鳞茎发育的影响

把消毒后的百合鳞片接种于培养基 (MS + 6 - BA 0.8mg/L + NAA 0.3 mg/L + 60 g/L 蔗糖,琼脂 6 g/L, pH 值 5.8 ~ 6.0) 上,分别在 15、20、25、30 ℃ 的温度和全暗条件下培养 45 d,测定其生长变化情况;25 ℃ 条件下,分别在自然光、光—暗 (3 000 lx光照 16 h—黑暗 8 h) 和全暗条件下培养 45 d,测定其生长变化情况。

1.3 不同激素组合对鳞片不定芽诱导的影响

把消毒后的百合鳞片,切成约 5 mm² 的方形小块,在无菌条件下接种到培养基 (MS + 60 g/L 蔗糖,琼脂 6 g/L, pH 值 5.8 ~ 6.0) 上。诱导培养基选择 MS 为基本培养基,配合 2 种激素组合,浓度梯度为 6 - BA (0.5、1.0、1.5 mg/L); NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L),正交组合。在 25 ℃ 和全暗条件下培养 45 d,统计不定芽的诱导率以及观察其生长变化情况。

1.4 蔗糖浓度对鳞茎发育的影响

把消毒后的百合鳞片分别接种于不同浓度蔗糖 (0、30、60、90、120 g/L) 的培养基 (MS + 6 - BA 0.8 mg/L + NAA 0.3 mg/L,琼脂 6 g/L, pH 值 5.8 ~ 6.0) 上,在 25 ℃ 和全暗条件下培养 45 d,测定其生长变化情况。

1.5 不同激素组合对百合鳞茎生长的影响

将鳞片诱导形成的小鳞茎 (直径 0.2 ~ 0.3 cm) 通过继代培养的方式接种于含有不同生长激素组合的培养基中 (MS + 60 g/L 蔗糖,琼脂 6 g/L, pH 值 5.8 ~ 6.0),其激素浓度设置梯度分别为 6 - BA (0.5、1.0、1.5 mg/L), NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L),通过正交试验组合。在 25 ℃ 和全暗条件下培养 45 d,观察统计百合鳞茎生长变化情况。

1.6 不同培养基对百合生根的影响

将鳞片诱导形成的小鳞茎 (直径 0.2 ~ 0.3 cm) 分别接种于 1/4MS、1/2MS、MS、2MS 培养基 (6 - BA 0.8 mg/L + NAA 0.3 mg/L,蔗糖 60 g/L、琼脂 6 g/L, pH 值 5.8 ~ 6.0) 上,在 25 ℃ 和全暗条件下培养 45 d,观察测定其生长变化情况。

2 结果与分析

2.1 温度对鳞茎发育的影响

由表 1 可以看出,在 15、20、25 ℃ 等 3 种温度条件下,试管鳞茎生成数量差异较小,而在 30 ℃ 培养条件下试管鳞茎生成数量显著减少;不同培养温度下鳞茎质量及直径均存在差异,以 25 ℃ 条件下形成鳞茎的质量及直径最大,鳞茎质量由大至小的顺序分别是:25 ℃ > 20 ℃ > 15 ℃ > 30 ℃,鳞茎直径由大至小的顺序分别是:25 ℃ > 30 ℃ > 15 ℃ > 20 ℃;15、20、25 ℃ 等 3 种培养温度下鳞茎生根数较多,差异不显著,而 30 ℃ 温度下鳞茎生根数很少。通过以上指标可以看出,25 ℃ 条件有利于百合鳞茎的发育,温度过高 (≥ 30 ℃) 或过低 (≤ 15 ℃) 都会严重抑制鳞茎的生长发育。

表 1 温度对鳞茎发育的影响

温度 (℃)	每个鳞片上再生鳞茎数 (个)	鳞茎鲜质量 (mg)	鳞茎直径 (cm)	每个鳞茎生根数 (条)
15	2.5 ± 0.56b	232 ± 52.70c	0.61 ± 0.18a	6.2 ± 1.40a
20	3.0 ± 0.50a	297 ± 62.51b	0.55 ± 0.17a	5.9 ± 0.79b
25	2.7 ± 0.27b	368 ± 34.04c	0.78 ± 0.24a	5.7 ± 0.98ab
30	0.5 ± 0.52c	179 ± 38.46d	0.63 ± 0.18b	0.9 ± 0.24c

注:数据为平均值 ± 标准误;同列数据后不同小写字母表示经 Duncan's 新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。表 3 至表 7 同。

2.2 光照对鳞茎发育的影响

从表 2 可以看出,在自然光、光—暗 (3 000 lx光照 16 h—黑暗 8 h) 条件下,平均每个鳞茎分别有 1.5 个和 2.6 个鳞片叶生成,在全暗培养条件下,则只有 0.5 个鳞片叶生成;全暗条件下形成鳞茎的质量、直径及每个鳞茎生根数都显著大于自然光及 3 000 lx光照 16 h—黑暗 8 h 条件;而自然光由于光照环境差异较大,生成的鳞茎质量大小不一,而在光—暗 (3 000 lx光照 16 h—黑暗 8 h) 和全暗 2 种培养条件下生成的鳞茎大小比较一致;在自然光、光—暗 (3 000 lx光照 16 h—黑暗 8 h) 和全暗 3 种培养条件下鳞茎生成的数量生成的数量无显著性差异,而在自然光、光—暗 (3 000 lx光照 16 h—黑

表 2 光照对鳞茎发育的影响

光照条件	每个鳞片上再生鳞茎数 (个)	鳞茎鲜质量 (mg)	每个鳞茎叶数 (个)	鳞茎直径 (cm)	每个鳞茎生根数 (条)
自然光	2.80 ± 0.11b	380.3 ± 2.30c	1.5 ± 0.06b	0.61 ± 0.2a	3.10 ± 0.57b
3 000 lx光照 16 h—黑暗 8 h	3.90 ± 0.17a	417.6 ± 4.04 b	2.6 ± 0.12a	0.65 ± 0.0a	3.52 ± 0.28b
全暗	3.84 ± 0.11a	489.3 ± 5.78a	0.5 ± 0.06c	0.81 ± 0.8a	5.40 ± 0.23a

暗 8 h)和全暗 2 种培养条件下质量却差异显著,全暗培养不仅质量大,而且节省能源。因此,全暗培养是鳞茎发育的最佳培养方式。

2.3 不同激素组合对鳞片不定芽诱导的影响

由表 3 可以看出,百合各激素配比处理间的诱导率差异显著,但对单个鳞片诱导芽数和幼苗长势的影响不明显。当 6-BA 浓度在 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时,鳞片不定芽诱导率都随 NAA 浓度增大而相应增加,并在 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时达到最大,达 80.23%,但此时幼苗长势细弱,无法满足实际生产的需求,随着 6-BA 浓度的继续增大,当 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时,鳞片不定芽诱导率都随 NAA 浓度增大而减少;而当 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 时,鳞片不定芽诱导率和增殖系数虽然不是最高,但鳞茎发育较好,幼苗生长健壮。

2.4 蔗糖浓度对鳞茎发育的影响

由表 4 可见,当蔗糖浓度达到 30 g/L 时形成鳞茎数量最多,平均达 4.23 个,高于其他蔗糖浓度处理,且每个鳞茎生根数最多,在不含蔗糖的培养条

表 3 不同激素组合对百合鳞片不定芽诱导的影响

激素配比 (mg/L)	鳞片诱导率 (%)	单个鳞片诱导 芽数(个)	幼苗长势
6-BA 0.5+NAA 0.1	20.3±0.34g	2.0±0.03d	细弱、黄绿色
6-BA 0.5+NAA 0.3	45.1±0.58f	3.2±0.12c	细弱、浅绿色
6-BA 0.5+NAA 0.5	53.3±1.21e	4.4±0.05b	较细弱、绿色
6-BA 1.0+NAA 0.1	69.7±0.58c	5.6±0.06a	细弱、黄绿色
6-BA 1.0+NAA 0.3	78. ±1.16ab	5.5±0.0a1	健壮、绿色
6-BA 1.0+NAA 0.5	80.2±1.61a	5.8±0.09a	细弱、黄绿色
6-BA 1.5+NAA 0.1	75.8±1.62b	5.6±0.23a	较弱、浅绿色
6-BA 1.5+NAA 0.3	68.6±1.27c	5.4±0.18a	细弱、黄色
6-BA 1.5+NAA 0.5	64.1±0.06d	4.2±0.12b	细弱、黄色

件下几乎没有鳞茎形成或形成的鳞茎很小;蔗糖浓度在 120 g/L 和 90 g/L 时,生成鳞茎的鲜质量都较大,但每个鳞片上再生鳞茎数量都较少,且都畸形最严重,鳞茎发育不正常;只有蔗糖浓度在 30 g/L 和 60 g/L 时形成的鳞茎发育正常,而 60 g/L 的蔗糖条件下形成鳞茎的直径显著大于 30 g/L 条件下形成的鳞茎,故 60 g/L 的蔗糖浓度有利于百合鳞茎的生长发育。

表 4 蔗糖浓度对鳞茎发育的影响

蔗糖浓度 (g/L)	每个鳞片上再生鳞茎数 (个)	鳞茎鲜质量 (mg)	鳞茎直径 (cm)	每个鳞茎生根数 (条)	畸形率 (%)
0	0.68±0.06e	53±1.15e	0.2±0.01d	2.03±0.02e	0±0d
30	4.23±0.05a	403±1.73d	0.5±0.01c	4.74±0.02a	0±0d
60	3.83±0.05b	489±4.33c	0.8±0.02b	3.76±0.28b	5±0.57c
90	2.80±0.02c	512±6.92b	0.8±0.02a	3.26±0.12c	35±1.73b
120	1.82±0.12d	540±2.88a	0.8±0.01a	2.68±0.25d	50±1.15a

2.5 不同激素组合对百合鳞茎生长的影响

从表 5 可以看出,当 6-BA 的浓度为 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时,鳞茎鲜质量都分别随着 NAA 浓度的增加而增大,当激素组合在 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 时达到最大,为 3.8 g,伴随 6-BA 的浓度增加到 1.5 mg/L 时,随着 NAA 浓度的增大,鳞茎分球数逐渐增多,但此时,无论 NAA 浓度的大与小,鳞茎鲜质量都较小。综合以上分析,6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 的激素组合效果最好。

2.6 不同培养基对百合生根的影响

由表 6 可以看出,百合鳞茎在这 4 种培养基上均能生根,但是在生根率、平均根长及根的生长状态等指标上有所差异。在百合生根培养的过程中,随着培养基成分比例的增大,生根率和平均根长都呈现先升高后下降的趋势,其中以 1/2MS 培养基的生根率和平均根长都最大,分别达到 76.7% 和

表 5 不同激素组合对百合鳞茎生长的影响

培养基 编号	激素组合 (mg/L)	鳞茎鲜质量 (g)	鳞茎分球情况 (个)
1	6-BA 0.5+NAA 0.1	2.3±0.12c	0.00±0.00e
2	6-BA 0.5+NAA 0.3	2.8±0.17b	0.00±0.00e
3	6-BA 0.5+NAA 0.5	3.1±0.17b	0.20±0.02e
4	6-BA 1.0+NAA 0.1	3.6±0.12a	0.80±0.30c
5	6-BA 1.0+NAA 0.3	3.8±0.17a	1.10±0.10d
6	6-BA 1.0+NAA 0.5	2.7±0.05b	1.30±0.10d
7	6-BA 1.5+NAA 0.1	2.0±0.06c	2.10±0.10c
8	6-BA 1.5+NAA 0.3	1.2±0.15d	2.60±0.20b
9	6-BA 1.5+NAA 0.5	1.0±0.15d	4.00±0.20a

2.07 cm;1/2MS、MS 等 2 种培养基根的生长状态显著好于 1/4MS 和 2MS 等 2 种培养基,且 1/2MS、MS 等 2 种培养基在生根率及根长方面差异性较小,生根状态良好。因此,1/2MS 及 MS 培养基均可作为百合生根的基本培养基。

表 6 不同培养基对百合生根的影响

培养基	生根率 (%)	平均根长 (cm)	根的生长状态
1/4MS	64.2 ± 0.58c	1.96 ± 0.01a	根细弱,毛状根较短
1/2MS	76.7 ± 1.15a	2.07 ± 0.12a	根较粗壮,毛细根较密
MS	71.8 ± 0.58b	1.98 ± 0.17a	根较粗壮,毛细根较多
2MS	42.4 ± 1.73d	1.02 ± 0.04b	根系粗短,毛细根少

3 结论与讨论

在百合组培繁育过程中,影响百合鳞茎诱导、转化等的关键培养环境及激素种类都已有较多的研究^[6-8]。本研究在前人研究的基础上,对培养基、培养环境等进行了综合研究和优化,并根据实际生产需求合理选择培养基及培养环境,优化了培养体系,简化了繁琐的培养步骤,并没有像张进忠等根据培养效果筛选最优培养基及培养环境^[9-11],而是结合生产需求及对鳞茎生长的影响程度合理简化培养环境及培养基配方。

本研究以百合鳞片为外植体,在培养温度和光暗培养环境过程中,百合鳞茎容易组培成球,这与前人的研究结果^[12-13]较为一致。而在培养基选择上,通过不同大量元素浓度的培养基筛选,发现 MS 培养基不仅满足百合鳞茎的发育,也满足百合生根的需求,这与 Monemi 等在生根培养基的选择上^[14-15]不同。作为组培过程中最重要的碳源物质,蔗糖对鳞茎的膨大具有重要的意义,研究表明适宜的蔗糖浓度为 60 g/L,这与前人研究^[16]一致,组培鳞茎能正常生长,没有形成畸形鳞茎,随着蔗糖浓度的提高,当蔗糖浓度为 90 g/L 和 120 g/L 时,组培鳞茎虽比 60 g/L 蔗糖浓度时要大,但畸形率较高,鳞茎的整体质量下降严重。激素对鳞茎的生长发育具有重要的作用,陈丽静等通过 6-BA 和 NAA 的激素组合筛选了从愈伤到鳞茎生长的全过程^[17-18],而本研究则在他们研究的基础上,通过降低激素浓度组合及优化激素配置,筛选出从鳞片诱导成芽到小鳞茎生长膨大的整个过程。本研究不仅简化了操作步骤及培养基配方,而且也减少了生根培养基的步骤,直接发育成可以炼苗的百合鳞茎,其效率更高,更适用于企业的规模化、标准化生产。

本研究通过优化百合培养条件及配方,研究过程中在筛选最优的基础上,从实际生产需求及百合鳞茎品质等方面综合考量,建立了更加简洁高效的

百合组培鳞茎一次性成球技术体系,即 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 60 g/L,琼脂 6 g/L,pH 值 5.8~6.0,在 25 ℃ 和全暗条件下培养 45 d。该技术体系不仅减少了不同培养时期培养基的配方,缩短了鳞茎成球的培养周期,而且所组培的小鳞茎也完全满足实际生产需求。

参考文献:

- [1] 李介文,杜运鹏,贾桂霞,等. 我国部分百合野生资源的亲缘关系及其分布特点[J]. 北京林业大学学报,2019,41(10):74-82.
- [2] 杨 晶,商万有. 百合的观赏价值研究[J]. 吉林农业,2011(9):171.
- [3] 陈 华,郑传奇,苏海锋. 卷丹百合种球繁育及组织培养技术研究进展[J]. 现代食品,2021(16):29-32,36.
- [4] 吕翠竹,王有国,王 立. 绿花百合组培芽增殖与试管鳞茎膨大的影响因素研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学),2020,40(1):38-45.
- [5] 孙红梅,李 敏,付麟岚,等. 基于文献计量的百合研究趋势分析[J]. 中国农学通报,2021,37(31):151-158.
- [6] 孙明伟,邵小斌,赵统利,等. 切花百合木门组培鳞茎炼苗移栽技术规程[J]. 安徽农业科学,2018,46(3):34-35,43.
- [7] 梁春辉,闫晓东,黄 敏,等. 降低卷丹百合组培褐变技术研究[J]. 亚热带植物科学,2017,46(2):122-125.
- [8] Hossein N, Amir H G. Innovative optimal approach to implement fast propagation tissue culture[J]. Biosciences Biotechnology Research Asia,2017,14(2):615-620.
- [9] 张进忠,韦绍龙,孙嘉曼,等. 兰州百合组培鳞茎发育研究[J]. 广西植物,2016,36(3):297-302.
- [10] 秦新惠,崔兴林,陈学红,等. 不同因子对兰州百合组培小鳞茎膨大的影响研究[J]. 林业科技通讯,2015(12):44-47.
- [11] 孙红梅,宋胜利,申屠玥,等. 亚洲百合花器官组培快繁技术研究[J]. 沈阳农业大学学报,2015,46(1):7-12.
- [12] 崔 祺,贾桂霞. 3 种百合组培快繁体系的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(6):621-626.
- [13] 张 杰,李 洋,孙红梅. LA 系列百合‘Eyeliner’花器官组培快繁技术研究[J]. 西北植物学报,2014,34(9):1894-1899.
- [14] Monemi M B, Kazemitabar S K, Bakhshiee K G, et al. Tissue culture study of the medicinal plant leek (*Allium ampeloprasum* L.) [J]. International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 2014, 3(2):118-125.
- [15] 杜 帅,李 丹,杜喜春,等. 绿花百合组培快繁技术研究[J]. 现代园艺,2014(8):12-13.
- [16] 张彦妮,李兆婷,张艳波,等. 毛百合试管鳞茎形成和膨大的培养优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):74-78.
- [17] 陈丽静,殷小娟,李俊岚,等. 细叶百合鳞片诱导与遗传转化组培体系的建立[J]. 西南农业学报,2013,26(2):718-722.
- [18] Min H K, Young H L, Wook O H, et al. Effects of hot water and chilling treatments of bulblets propagated by tissue culture on sprouting and bulb development in Korean native lilies[J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 2011, 29(2):87-94.