

低温对东方百合试管鳞茎解除休眠及生长的影响

冯晶红, 张秀娟, 贾桂霞*

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京100083

摘要: 以东方百合‘索邦’和‘西伯利亚’鳞片为外植体得到的一代试管小鳞茎为试材, 研究0℃冷藏不同时间对试管鳞茎生理指标变化, 以及试管鳞茎解除休眠和移栽后生长发育的影响。结果表明, 冷藏0~28 d内, 随着冷藏时间的延长, 试管鳞茎出苗率逐渐增加, 冷藏处理28 d达到最高, 之后逐渐降低。冷藏期间, 试管鳞茎中淀粉含量持续降低, 而可溶性总糖和还原性糖含量表现出先升高后下降的趋势, 冷藏处理28 d的含量最高。同时, 随着冷藏时间的延长, IAA和ZR含量逐渐升高, ABA含量逐渐下降, 而GA₁₊₃含量表现出先上升后下降的趋势, 并且也在冷藏处理28 d时含量达到峰值。另外, 采用隶属函数值对低温处理的试管苗栽培1年后所收获种球的数量、质量等指标进行评价, 结果显示, 均以低温处理28 d时达到最大值。由此得出, 0℃低温处理试管小鳞茎28 d为解除休眠及促进生长发育的最适处理时间。

关键词: 东方百合; 试管鳞茎; 解除休眠; 出苗率; 生理指标

Effects of Low Temperature on Dormancy Breaking and Growth after Planting for Oriental Lily Bulblets Regenerated *in vitro*

FENG Jing-Hong, ZHANG Xiu-Juan, JIA Gui-Xia*

National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: This study was performed to investigate the effects of low temperature on the physiological and biochemical indexes, the dormancy breaking and the growth after planting of the first generation bulblets regenerated *in vitro* from scale segments of *Lilium* oriental hybrid ‘Sorbonne’ and ‘Siberia’. The results indicated that the germination rate of the bulblets after cold storage increased as the cold storage time extended, reaching the maximum value at the 28th day, and then gradually decreased. The starch content in the bulblets continued to reduce, while the contents of total soluble sugar and reducing sugar kept increasing to the highest value at the 28th day and then decreased. At the same time, the IAA and ZR contents of bulblets increased, while ABA content gradually decreased along with the extension of refrigeration time. However, the GA₁₊₃ contents appeared increasing overall at first, then declined after 28 d as well. The further study demonstrated that the low temperature process had a strong positive effect on the growth after planting for one year. The subordinate function value of indexes of harvested bulb quantities and qualities reached the peak at the 28th day. The research suggests that storing the lily bulblets regenerated *in vitro* under low temperature (0℃) for 28 d is the most suitable for dormancy breaking and growth in soil.

Key words: oriental lily; *in vitro* bulblets; dormancy breaking; germination rate; physiological indexes

百合是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本球根花卉, 花大、色艳、花型丰富, 是世界四大切花之一。长期以来, 我国切花生产所用商品种球一直依赖进口, 为了降低成本, 实现种球国产化, 采用组织培养方法能够在较短时间内获得大量优质、健康的种苗和切花种球(赵庆芳等2003)。但是, 组织培养获得的试管小鳞茎会出现休眠现象(Kim等1994; de Klerk和Gerrits 1996; Langens-Gerrits等2003), 未解除休眠的鳞茎种植后

会出现发芽率不高或发芽后不能正常生长和开花等问题(赵祥云等1999; 郭志刚和张伟1999)。低温处理是目前最常用的打破百合鳞茎休眠的方法(Aguettaz等1990; 孙红梅等2004; 夏宜平等2006),

收稿 2013-09-27 修定 2013-10-21

资助 国家自然科学基金(31071819)和北京市园林绿化局计划项目(YLHH201300103)。

* 通讯作者(E-mail: gxjia@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62336063)。

研究表明,无论是组织培养方式获得的试管鳞茎,还是其他繁殖方法获得的鳞茎,打破休眠的有效温度在15℃以下(Delvallée等1990;孙文艺等2009;曹毅等2002;黄作喜等2002)。目前,国内外关于低温处理打破百合鳞茎休眠的研究主要针对于商品种球,关于试管小鳞茎打破休眠的研究较少。已有的研究结果显示,在低温打破鳞茎休眠过程中,碳水化合物和内源激素发生了一系列的变化,从而影响根系、幼叶萌发,以及移植成活率和生长健壮度(黄作喜等2002;孙文艺等2009;Shin等2002),但不同温度条件下组织培养获得的小鳞茎打破休眠时对低温冷量的要求不同,所需低温时间也不同。目前的报道仅以试管鳞茎移栽后的出苗率作为有效低温处理的标准(徐琼等2012;Aguettaz等1990;Shin等2002;Langens-Gerrits等2003;Delvallée等1990;黄作喜等2002;Nikolić等2008),对于试管鳞茎移栽后的生长发育状况未见报道。

东方百合杂种系的‘索邦’和‘西伯利亚’为我国切花生产中的主栽品种,因此,在低温(0℃)条件下,系统研究其试管小鳞茎经过不同冷藏时间处理后生理生化的变化,并对不同处理时间的试管鳞茎移栽后的出苗率以及移栽1年后收获种球的数量和质量进行跟踪调查,以此研究百合试管鳞茎解除休眠的机理并确定相应的评价指标,从而提高东方百合试管鳞茎的贮藏质量,改善试管鳞茎贮藏技术,为实现百合种球生产国产化提供依据和参考。

材料与方法

1 材料

试验材料以东方百合(*Lilium oriental hybrid*)‘索邦’(‘Sorbonne’)和‘西伯利亚’(‘Siberia’)鳞片为外植体进行繁殖得到的第一代组织培养苗,由北京市大东流组培室生产,培养温度为(23±2)℃,光周期为12 h/12 h(光照/黑暗),光强为96~104 μmol·m⁻²·s⁻¹,其中试管鳞茎的直径在1 cm以上。

2 方法

2.1 试管鳞茎的冷藏处理及出苗率统计

采用完全随机区组试验设计,将‘索邦’和‘西伯利亚’组织培养苗置于0℃的冷库中,分别在冷

藏0、7、14、21、28、35和42 d(共7个处理)时移栽于直径为15 cm的塑料种植钵中。移栽前,用清水洗净根部残留的培养基,去掉茎叶,留根;基质为草炭和珍珠岩(体积比2:1),用800倍的多菌灵溶液消毒。移栽试验在北京市大东流苗圃日光温室中进行,温室内日间平均温度17℃,夜间平均温度为12℃,湿度控制在70%~80%。每个处理30株,3次重复,在移栽10、20和30 d后统计不同处理的出苗率。

2.2 碳水化合物和内源激素的测定

冷藏期间,分别取不同处理时间的试管鳞茎,准确称量1.0 g,迅速在液氮中冷冻并于-80℃冰箱中保存备用。淀粉含量和总可溶性糖含量用蒽酮法测定;还原糖含量用3,5-二硝基水杨酸比色法测定;蔗糖含量用可溶性糖含量减去还原性糖含量得到(李振国1999)。每处理3次重复。

内源激素的提纯参照丁静等(1979)和陈华君等(1991)的方法并加以改进,将提取过程中的过滤改为低温离心,提高提取效率。测定采用高效液相色谱(HPLC)法,用外标法定量,植物激素标样IAA、GA₃、ABA、ZR均为Sigma公司的产品。色谱条件为:Agilent 1100 Series高效液相色谱仪,Agilent C18柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。测定IAA、GA₃、ABA的流动相为色谱甲醇和0.1 mol·L⁻¹乙酸的混合溶液(3:97, V/V),测定ZR的流动相为色谱甲醇和pH 7.0超纯水的混合溶液(3:97, V/V),柱温箱控制在30℃,二极管阵列检测器检测。IAA、ABA、GA₃、ZR的检测波长分别为280、260、210、267 nm,流速为1 mL·min⁻¹。每处理3次重复。

2.3 种球数量和质量的测定和统计

移栽的试管鳞茎种植1年后收球,分别对不同处理的收球率、种球周径和质量进行测定,其中收球率=(收获的种球数/移栽的种球数)×100%。用SPSS (Version 13.0)对数据进行方差分析,利用Duncan进行多重比较,并用隶属函数法对种球形态指标进行综合分析(苏国兴和洪法水2002)。

结果与讨论

1 不同冷藏时间对试管鳞茎移栽后出苗率的影响

分别在移栽10、20和30 d后对‘索邦’和‘西伯

利亚'试管鳞茎的移栽出苗率进行统计, 结果显示, 两个品种在不同处理下的出苗率表现类似的规律: 未经冷藏直接移栽, 均不出苗, 说明组织培养获得的小鳞茎存在严重的休眠现象; 随着冷藏时间的延长, 出苗率逐渐增加, 冷藏28 d时的试管鳞茎出苗率达到最高, 两个品种分别为97.3%和98.4%; 但当冷藏时间超过28 d后, 出苗率显著降低, 冷藏42 d后移栽的试管鳞茎几乎全部枯死(表1)。可见,

0 °C低温处理的时间显著影响试管小鳞茎的出苗率, 但当低温处理时间超过一定期限后, 试管小鳞茎因冷藏时间过长, 体内养分消耗过大, 致使移栽后小鳞茎的缓苗时间较长, 后期生长受到抑制, 表明东方百合试管小鳞茎打破休眠的低温处理时间应在一定期限内, 超过或者短于这个期限, 出苗率均有降低的趋势; 这与徐琼等(2012)的研究结果一致。

表1 不同冷藏时间对试管鳞茎出苗率的影响

Table 1 Effects of different cold storage time on the germination rate of bulblets *in vitro*

移栽时间/d	冷藏时间/d														%
	'索邦'							'西伯利亚'							
	0	7	14	21	28	35	42	0	7	14	21	28	35	42	
10	0	0	10.1	21.1	41.0	25.0	14.3	0	0	0	11.1	21.1	13.1	10.1	
20	0	0	31.1	44.4	70.2	54.7	32.2	0	0	0	16.7	54.2	44.4	23.1	
30	0	22.2	60.0	86.7	97.3	88.9	63.3	0	0	33.3	81.1	98.4	86.7	55.4	

2 冷藏期间试管鳞茎碳水化合物含量的变化

在冷藏期间, 试管鳞茎内的可溶性总糖含量呈先升高再下降的趋势, 均在冷藏28 d时达到最高值(图1-A); 还原性糖含量也呈先升高再下降的趋势, 但升高趋势明显较可溶性总糖含量的变化缓和, 也在冷藏28 d时含量达到最高值(图1-B); 而在整个冷藏期间, 淀粉含量逐渐降低(图1-C)。本实验中, 冷藏28 d时可溶性总糖和还原性糖含量均达到最高值, 参照荷兰百合种球生产企业判断鳞茎冷藏是否完成的标准, 即以测定鳞片中可溶性糖含量出现下降作为判断冷藏打破休眠的标准(夏宜平等2006), 确定此时试管鳞茎的休眠已打破。

3 冷藏期间试管鳞茎内源激素含量的变化

由图2-A可看出, 在冷藏期间, '索邦'和'西伯利亚'试管鳞茎中ABA含量均逐渐下降, 这与刘艳萍(2007)研究亚洲百合种球'普瑞头'打破休眠时出现的变化趋势相同, 说明0 °C条件下小鳞茎能很快进入解除休眠阶段。图2-B显示, '索邦'和'西伯利亚'试管鳞茎在冷藏期间GA₁₊₃含量呈现相似的趋势, 即: 先上升后下降, 均在在28 d时达到峰值, 分别为81.22和87.36 ng·g⁻¹ (FW), 可见低温处理28 d是小鳞茎打破休眠的最为关键的时刻。由图2-C

可见, 两个品种试管鳞茎中IAA含量均随着冷藏时间的延长呈现逐渐升高的趋势。ZR作为主要的细胞分裂素之一, 是促进百合鳞茎萌发的因素之一。由图2-D可以看出, 两个品种的ZR含量在冷藏0~21 d期间呈现缓慢上升的趋势, 21 d以后上升明显, 21~35 d期间上升最显著。图2-E~G显示的是生长促进类激素与生长抑制类激素比值的变化, 从中可以看出, 随着小鳞茎休眠的解除, GA₁₊₃/ABA比值的变化规律与GA₁₊₃含量的一致(图2-B和F), 即先上升后下降, 在冷藏28 d时比值最大, 为1.4; 而IAA/ABA、ZR/ABA的比值呈直线上升(图2-E和G), 其中ZR/ABA比值一直低于1.0, 这与王中轩等(2013)、刘艳萍(2007)的研究结果类似。植物内源激素的调控是导致植物休眠的另一个因素, 在内源激素中ABA是百合鳞茎萌发的抑制剂, 而GA和ZR、IAA是萌发的促进剂(杨世杰2000)。同时, 内源激素对植物休眠的调控相当复杂, 不仅涉及某一种激素的含量, 还和生长促进类激素与生长抑制类激素之间的比例和平衡有关(罗丽兰等2007; 孙红梅等2006)。综合分析试管鳞茎出苗率及其碳水化合物含量变化结果可知, 各激素都影响了小鳞茎的休眠, 其中ABA、GA₁₊₃、IAA影响

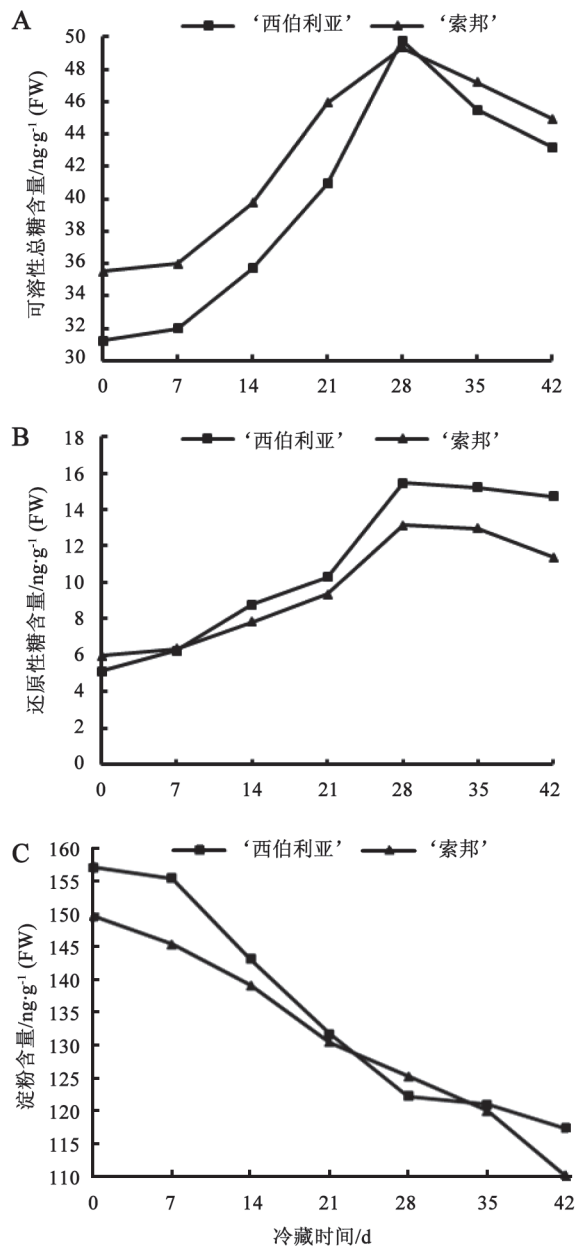


图1 冷藏期间试管鳞茎碳水化合物含量的变化

Fig.1 Changes of carbohydrate content in bulblets *in vitro* during cold storage

最为显著; 另外, 尽管在冷藏处理过程中, ZR/ABA 比值一直低于1.0, 但在两个品种试管鳞茎打破休眠的关键时期, ZR含量及ZR/ABA都发生了显著变化, 说明ZR对试管鳞茎打破休眠的影响很灵敏, 极少量的变化都可以促进鳞茎的萌发, 这与刘艳萍(2007)的研究结果类似。综上所述, 内源激素 ABA、GA₁₊₃、IAA及ZR可作为试管鳞茎休眠是

否完成的检测依据。

4 不同冷藏时间对试管鳞茎移栽后收获种球的影响

移栽的试管鳞茎种植1年后收球, 测定种球的收球率和质量, 并用隶属函数法进行分析, 结果表明, 经不同时间冷藏处理的试管鳞茎移栽后的收球率差异显著: '索邦'在冷藏28 d时移栽, 收球率最高, 达到86.71%, 冷藏21和35 d的收球率其次, 分别为76.67%和65.56%; '西伯利亚'在冷藏28 d时移栽, 收球率最高达到83.33%, 冷藏21和35 d的收球率分别为62.31%、62.17% (表2)。

对于'索邦'而言, 未经冷藏处理而直接进行移栽, 收获种球的周径最大, 为7.68 cm, 显著高于冷藏7、14和35 d时移栽的。种球质量以冷藏处理21 d的最大, 为15.98 g, 显著高于0、7、28和35 d处理的。综合收球率、周径、质量3项指标, 对其进行隶属函数法分析, 结果显示, 冷藏处理28 d的隶属函数值S(I)最高, 为0.84; 冷藏21 d的其次, 为0.81; 未经冷藏处理的种球周径和质量虽然比较高, 但由于收球率太低, S(I)只有0.62。因此, 东方百合'索邦'试管鳞茎适宜的冷藏时间是28 d, 这与前面实验结果一致。

对于'西伯利亚'而言, 冷藏0、7、14、21和28 d时移栽收获种球的周径差异不显著, 其中冷藏14 d时移栽收获种球的周径最大, 为7.99 cm; 而冷藏处理35 d的最小, 为5.12 cm。种球质量以冷藏处理21 d的最大, 为13.71 g; 未经冷藏处理的其次, 为13.68 g。对收球率、周径、质量3种指标进行隶属函数法分析的结果显示, 冷藏处理28 d的S(I)最高, 为0.92; 其次是冷藏处理21 d的, 为0.91; 未经冷藏处理的种球周径和质量虽然比较高, 但由于收球率太低, S(I)只有0.51; 冷藏处理14 d的种球周径最大, 但收球率和质量均较低, S(I)只有0.81。因此, 东方百合'西伯利亚'试管鳞茎适宜的冷藏时间也是28 d。

综合分析试管鳞茎移栽的出苗率结果可知, 东方百合试管鳞茎低温冷藏28 d是打破休眠的最适处理方式, 试管鳞茎移栽后不仅表现出苗快和整齐, 且移栽后种球发育状况最佳, 这与Langens-Gerrits等(2003)和Nikolić等(2008)的研究结果一致。表明低温处理的时间对试管小鳞茎移栽后的发育有显著的影响。

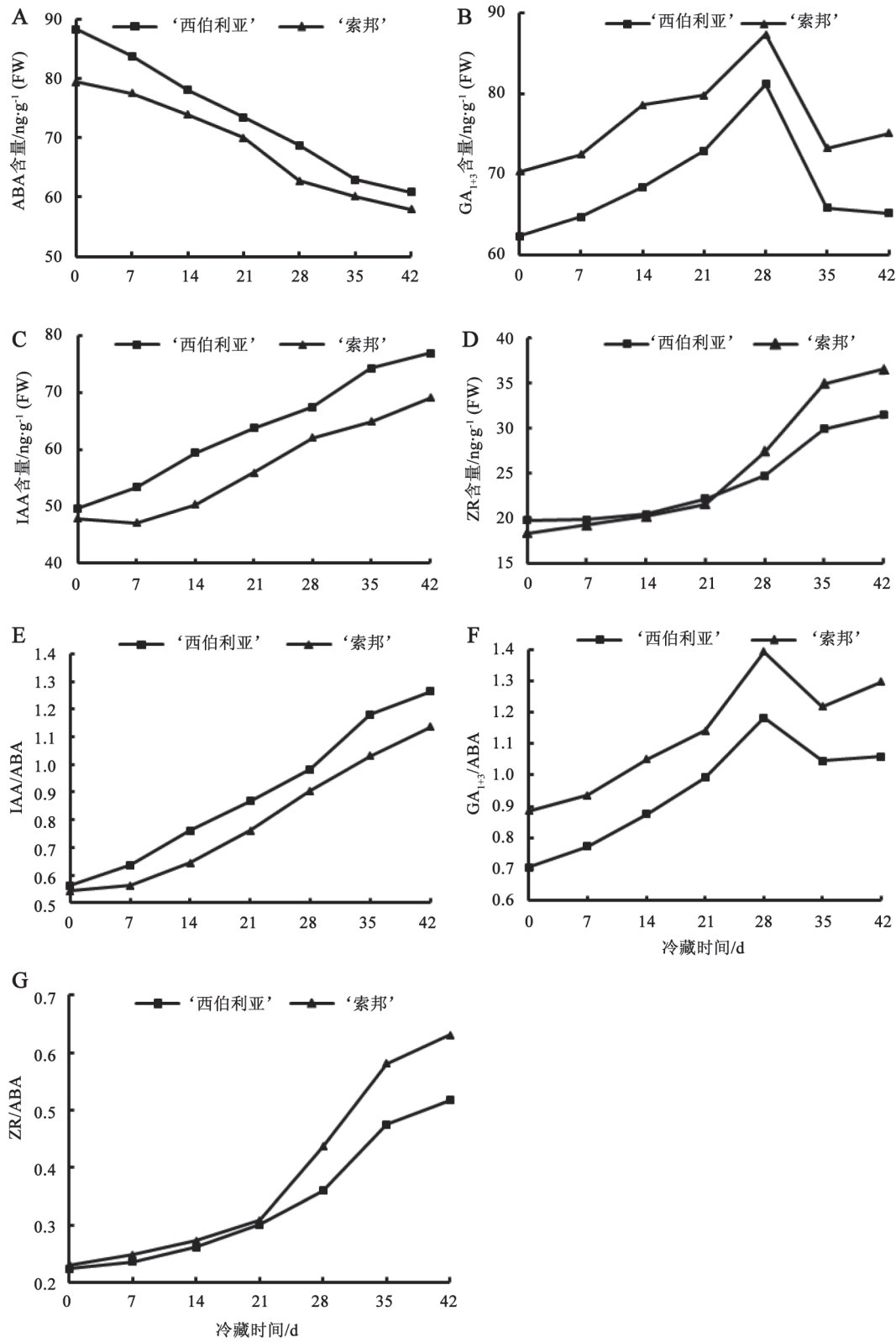


图2 冷藏期间试管鳞茎内源激素含量的变化

Fig.2 Changes of endogenous hormone contents in bulblets *in vitro* during cold storage

表2 不同冷藏时间对移栽1年后种球的影响

Table 2 Effects of different cold storage time on bulbs after planting for one year

冷藏时间/d	‘索邦’				‘西伯利亚’			
	收球率/%	周径/cm	质量/g	S(I)	收球率/%	周径/cm	质量/g	S(I)
0	11.23 ^d	7.68 ^a	12.41 ^b	0.62	6.67 ^d	7.59 ^b	13.68 ^a	0.51
7	8.34 ^d	6.08 ^b	11.73 ^b	0.52	12.23 ^c	7.22 ^b	9.96 ^c	0.66
14	25.65 ^c	5.51 ^c	14.48 ^a	0.66	18.89 ^c	7.99 ^a	10.40 ^b	0.81
21	76.67 ^{ab}	7.12 ^a	15.98 ^a	0.81	62.31 ^b	7.93 ^a	13.71 ^a	0.91
28	86.71 ^a	7.08 ^a	11.88 ^b	0.84	83.33 ^a	7.64 ^a	11.49 ^b	0.92
35	65.56 ^{ab}	5.63 ^c	10.18 ^c	0.65	62.17 ^b	5.12 ^c	7.12 ^d	0.61

数据采用Duncan法统计分析,不同小写字母表示在5%水平上差异显著。

参考文献

- 曹毅,周荣,黎明星,张长进(2002). 低温及乙烯利处理鳞茎对药百合的影响. 种子, (1): 35~36
- 陈华君,王天华,金幼菊(1991). 用GC-MS-SIM测定植物中IAA含量方法的研究. 北京林业大学学报, 13 (3): 56~61
- 丁静,沈镇德,方亦雄,马秀香,李琳,倪晋山(1979). 植物内源激素的提取分离和生物鉴定. 植物生理学通讯, (2): 27~39
- 郭志刚,张伟(1999). 球根类. 北京: 清华大学出版社, 24~45
- 黄作喜,李正明,熊丽,吴丽芳,屈云慧,吴学尉(2002). 高温季节百合组培苗的移栽技术. 林业科技开发, 16 (5): 55~56
- 李振国主编(1999). 现代植物生理学试验指南. 北京: 科学出版社, 302~303
- 刘艳萍(2007). 百合鳞茎低温解除休眠过程中生理生化变化研究 [学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 罗丽兰,石雷,张金政(2007). 低温对解除百合鳞茎休眠和促进开花的作用. 园艺学报, 34 (2): 517~524
- 苏国兴,洪法水(2002). 桑品种耐盐性的隶属函数法之评价. 江苏农业学报, 18 (1): 42~47
- 孙红梅,李天来,李云飞(2004). 百合鳞茎发育过程中内源激素变化初探. 华中农业大学学报, 35: 277~281
- 孙红梅,李天来,李云飞(2006). 兰州百合鳞茎发育及低温解除休眠过程中内源激素的变化. 植物研究, 26 (5): 570~576
- 孙文艺,刘雅莉,王跃进,张宗勤(2009). 亚洲百合‘普利安娜’试管苗的生根及移栽技术研究. 西北农业学报, 18 (6): 272~276
- 王中轩,杨森,杜运鹏,贾桂霞(2013). ‘黄天霸’百合鳞茎低温解除休眠过程中形态和生理的变化. 福建农林大学学报(自然科学版), 42 (1): 29~34
- 夏宜平,黄春辉,何桂芳,郑慧俊(2006). 东方百合鳞茎冷藏解除休眠的养分代谢和酶活性变化. 园艺学报, 33 (3): 571~576
- 徐琼,师桂英,贺新红,徐秉良,梁巧兰,张文利(2012). 低温处理对东方百合种球成花特性的影响. 中国农学通报, 28 (10): 183~188
- 杨世杰主编(2000). 植物生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 171
- 赵庆芳,曾小英,丁兰,余立萍,张彦明(2003). 东方百合组织培养和快速繁殖研究. 西北师范大学学报(自然科学版), 39 (1): 66~68
- 赵祥云,王树栋,陈新露,刘建斌(1999). 百合. 北京: 中国农业出版社
- Aguettaz P, Paffen A, Delvallée I, van der Linde P, de Klerk GJ (1990). The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. Plant Cell Tiss Org, 22: 167~172
- de Klerk GJ, Gerrits MM (1996). Development of dormancy in tissue-cultured lily bulblets and apple shoots. In: Lang GA (ed). Plant Dormancy: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. Wallingford, UK: CAB International, 115~131
- Delvallée I, Paffen A, de Klerk GJ (1990). The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. II. The effect of temperature. Physiol Plantarum, 80 (3): 431~436
- Kim KS, Davelaar E, de Klerk GJ (1994). Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. Physiol Plantarum, 90: 59~64
- Langens-Gerrits MM, Miller WBM, de Klerk GJ (2003). Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regenerated *in vitro*. Plant Growth Regul, 40: 267~275
- Nikolić M, Mišić D, Maksimović V, Jevremović S, Trifunović M, Subotić A (2008). Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture *in vitro*. Arch Biol Sci, 60 (1): 5P~6P
- Shin KS, Chakrabarty D, Paek KY (2002). Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated *in vitro*. Sci Hortic-Amsterdam, 96: 195~204