

光周期对野生卷丹试管苗鳞茎形成及糖代谢的影响

张延龙^{1,2,*}, 张启翔¹, 薛晓娜²

(¹北京林业大学园林学院, 北京 100083; ²西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了探索光周期对百合试管鳞茎生长发育的诱导效应, 寻求试管鳞茎生产的最佳光照参数, 以秦巴山区野生卷丹 (*Lilium lancifolium*) 试管苗为材料, 采用 5 种不同光周期处理 (每天分别暗处理 0、8、12、16 和 24 h), 对试管小鳞茎的发生和膨大、糖含量、淀粉酶活性及其对培养基糖源利用情况进行了测定。研究结果表明: 不同光周期处理对试管小苗的形态建成和生长发育影响显著, 以 16 h 暗处理对小鳞茎的发生和膨大最为有利; 不同培养时期测定表明, 经不同光周期处理的小鳞茎可溶性总糖含量、淀粉含量及淀粉酶活性等呈现一定差异; 经 60 d 培养, 短光照和黑暗处理 (黑暗 12、16 和 24 h) 的小鳞茎淀粉含量比全光照和长光照 (0 和 8 h) 处理的高; 不同光周期处理下试管鳞茎对培养基蔗糖利用率不同, 以短光照 (黑暗 16 h · d⁻¹) 处理的利用效率最高。

关键词: 百合; 野生卷丹; 试管鳞茎; 光周期

中图分类号: S 682.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 06-0957-06

The Effects of the Photoperiods on the Bulblet Formation and Sugar Metabolism Change of Wild *Lilium lancifolium* in Vitro

ZHANG Yan-long^{1,2,*}, ZHANG Qi-xiang¹, and XUE Xiao-na²

(¹College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to get the optimum photoperiod parameter for the production of bulblet by tissue culture, the experiment was conducted with 5 photoperiod treatments (darkness time per day: 0, 8, 12, 16, 24 h) to investigate the effect of photoperiods on the bulblet morphogenesis, amylase activity, as well as the utilization rate of sucrose in the culture medium absorbed by bulblet of the wild *Lilium lancifolium* Thunb. *in vitro*. The results showed that the different periods of darkness had a significant effect on the organ formation (root, leaf and bulblet) and the weight of bulblets in test tube, the treatment 16 h · d⁻¹ darkness had better effect for the bulblet formation and enlargement. There were differences between total soluble sugar content, starch content and the amylase activity in bulblets with different photoperiod treatments. After 60 days culture in the test tube, the starch content in bulblets with treatments of 12, 16, 24 h · d⁻¹ darkness was higher than that with 0, 8 h · d⁻¹. The utilization rate of sucrose in the culture medium for bulblets was also different among all treatments; The 16 h · d⁻¹ darkness was optimum photoperiod

收稿日期: 2009-08-24; 修回日期: 2010-04-26

基金项目: 国家林业局重点科研项目 (2006-73)

* E-mail: zzll22@126.com

treatment for bulblet production with tissue culture technology.

Key words : lily ; wild *Lilium lancifolium* Thunb. ; bulblet *in vitro* ; photoperiod

卷丹 (*Lilium lancifolium* Thunb.) 为百合科百合属多年生球根类植物, 它既有较好的观赏价值, 又可食用。我国野生卷丹种质资源十分丰富 (向地英 等, 2005), 因其富含各种氨基酸、蛋白质、微量元素及活性物质, 具有丰富的营养价值和药用功效 (李红娟 等, 2007)。但是要将野生卷丹驯化栽培, 首先需要解决加快繁殖的问题。目前栽培百合多用鳞片扦插和小子球繁殖, 但增殖系数较小, 难以快速满足生产需求。借助组织培养技术, 采用试管内形成鳞茎已成为许多研究者所探索的快速繁殖方法 (庄志鸿和刘建, 2002; 郭海滨和雷家军, 2006; Kapoor et al., 2009)。已有的百合试管鳞茎报道多集中在培养基成分上, 如对蔗糖、MS 培养基中的大量元素、PP333、NAA 的浓度等方面的研究 (庄志鸿和刘建, 2002; Kumar et al., 2005; Pejman & Morteza, 2007)。在自然界, 百合鳞茎生存于地下黑暗条件, 而离体培养时, 光周期对小鳞茎形成及其糖分代谢机理有何影响, 尚缺乏系统研究。本试验中以陕西秦巴山区野生卷丹为试材, 探索光周期对百合试管鳞茎形成和生长膨大的影响, 进而了解与小鳞茎生长发育密切相关的糖代谢及其对培养基糖源的利用状况, 旨在为开发野生卷丹百合快繁技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2007—2008 年在西北农林科技大学进行, 试验材料取自西北农林科技大学百合种质资源圃, 野生卷丹百合收集于陕西境内的秦巴山区。组培外植体材料来源于以鳞片为外植体诱导形成的丛芽体。

1.2 组培方法

将诱导形成的丛芽体接种于 $MS + 6-BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1} + 30\ g \cdot L^{-1}$ 蔗糖 + $6\ g \cdot L^{-1}$ 琼脂继代培养基上进行扩繁, 丛芽增殖到所需要的数量后, 在无菌条件下将丛芽分割成单个芽, 剪去上部叶片, 接种于 $2MS + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1} + 90\ g \cdot L^{-1}$ 蔗糖 + $6\ g \cdot L^{-1}$ 琼脂的培养基上, 暗处理的时间分别为每天 0、8、12、16 和 24 h, 在 $(23 \pm 2)^\circ C$ 下培养, 光照强度为 $1\ 500 \sim 2\ 000\ lx$, 进行试管鳞茎的诱导。

1.3 小鳞茎生长量的测定

培养 60 d 后进行统计, 从培养基中取出诱导的小鳞茎, 剪去叶片和根, 称鲜样质量。计算鳞茎鲜样质量百分率 (%) = 鳞茎鲜样质量 / 试管小苗总鲜样质量 $\times 100$ 。用游标卡尺测量小鳞茎的直径, 统计叶片数及根数。60 d 培养期间未进行培养基更换, 每水平统计 10 株, 重复 3 次。

1.4 小鳞茎糖含量、酶活性及其对培养基糖分吸收利用率的测定

初培养 20 d 开始取样测定小鳞茎的生长, 之后每隔 10 d 测定 1 次, 到 60 d 为止。参照高俊凤 (2000) 的方法, 用蒽酮比色法测定鳞茎可溶性总糖含量和淀粉含量, 用 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定淀粉酶 (α -淀粉酶 + β -淀粉酶) 活性。每水平下统计 10 株, 重复 3 次。按照如下公式计算小鳞茎对培养基蔗糖吸收利用率: 利用率 (%) = (新制培养基含糖量 - 培养结束期培养基含糖量) / 新制培养基含糖量 $\times 100$ 。

每瓶接种 2 株，每水平下测定 5 瓶，重复 3 次。
数据采用邓肯氏法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 光周期对小鳞茎生长和膨大的影响

试管组培丛芽体不同暗处理培养结果（表 1）表明，光周期对卷丹百合试管丛芽体鳞茎的分化及其生长膨大（直径和鲜样质量）影响显著。暗处理时间加长，有利于提高小鳞茎形成率，暗处理 12 h 以上，小鳞茎形成率可达 100%。当暗时数为 16 h · d⁻¹，培养 60 d 的小鳞茎鲜样质量和直径达到最大，分别为 2.21 g 和 1.56 cm；当暗时数为 12 h · d⁻¹，鳞茎鲜样质量与 16 h · d⁻¹ 的差异不显著，但直径间差异极显著；随着暗处理时数的增加，叶片数大致呈逐渐减少趋势，根长和根粗呈先增大后减小趋势。

表 1 光周期对卷丹百合试管鳞茎生长和膨大的影响
Table1 Effects of photoperiod on the bulblet growth and swelling of *L.lancifolium* in vitro

暗时数/(h · d ⁻¹) Time of darkness	叶片数 Number of leaf	根数 Number of root	根长/cm The length of root	根粗/cm The diameter of root	总鲜样质量/g Total weight	鳞茎 Bulblet			结球率/% Rate of bulblet
						直径/cm Diameter	鲜样质量/g Weight	%	
0	7.8	13.7	2.4	0.21	2.91	1.19cC	0.94cC	32.3	95
8	3.1	6.8	2.6	0.22	1.57	0.98dD	0.66dD	42.0	92
12	4.6	11.3	2.8	0.29	4.36	1.15cC	2.16aA	49.5	100
16	2.8	11.1	1.7	0.21	3.29	1.56aA	2.21aA	67.2	100
24	2.0	6.5	1.2	0.25	2.22	1.39bB	1.19bB	53.6	100

注：不同大写字母表示差异极显著（*P* < 0.01），不同小写字母表示差异显著（*P* < 0.05）。下同。
Note：The capitals mean 0.01 significant level，the small letters mean 0.05 significant level. The same below.

2.2 光周期对小鳞茎可溶性总糖含量的影响

在 60 d 培养期间，不同暗光处理对试管鳞茎可溶性总糖含量影响差别较大（图 1），可以看出，小鳞茎的可溶性总糖含量变化趋势可以明显分为前期升高和后期降低两个阶段，其中黑暗 0 h · d⁻¹ 和 24 h · d⁻¹ 两种处理的前期持续较短（20 d），而 8，12 及 16 h · d⁻¹ 等 3 种处理的前期持续时间较长（30 d）。

在前期，小鳞茎可溶性糖含量升高的趋势受光周期的影响而有所不同：随暗处理时间的加长，如在暗条件（24 h · d⁻¹）下培养 20 d 时，小鳞茎可溶性含糖量达到峰值，为 54.2 mg · g⁻¹ FW，而全光照下为 31.8 mg · g⁻¹ FW，两者分别是初始培养（27.1 mg · g⁻¹ FW）的 2 倍和 1.17 倍。

在后期，自小鳞茎可溶性糖含量达到峰值

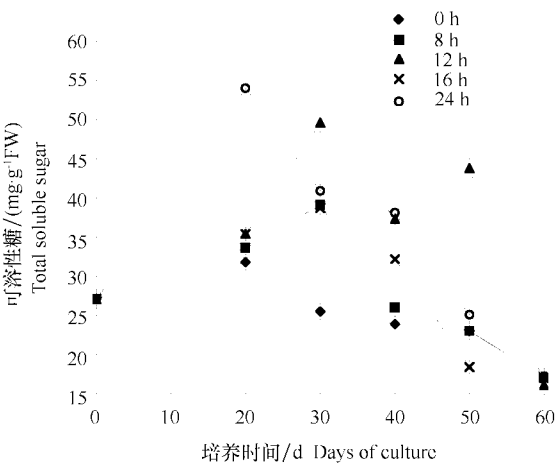


图 1 不同光周期对百合试管鳞茎形成过程中可溶性总糖含量的影响

Fig.1 Effects of different photoperiod on total soluble sugar content during the bulblet formation

后,不同处理下的小鳞茎可溶性糖含量逐渐降低,到 60 d 培养结束时,各光周期处理下鳞茎的可溶性糖含量已无显著差异。

2.3 光周期对小鳞茎淀粉含量及其淀粉酶活性的影响

光周期对卷丹百合试管小鳞茎淀粉含量的影响变化趋势如图 2,在 60 d 的培养期内,除了暗处理 $24\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 外,其它各处理的小鳞茎的淀粉含量变化趋势大致可分为 3 个阶段:快速增加初期(0~20 d),缓慢增加期(20~50 d)和快速增加后期(50~60 d)。比较而言, $0\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $8\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 处理下小鳞茎的淀粉含量增加趋势较为平缓; 12、16 和 $24\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 暗处理在后期淀粉含量增加幅度较大,且在 60 d 培养结束时 3 种处理已无显著差异,但与两种较长光周期处理(暗期 0 和 $8\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$)相比,其小鳞茎淀粉含量差异显著。

不同光处理的小鳞茎淀粉酶活性,随着培养时间推进,除了暗期为 8 和 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 处理在 20 d 时先小幅度升高后降低外,均逐渐降低;在整个培养期内,各处理除了在 20 d 时淀粉酶活性差异较大外,其余时期的差异不显著(图 3)。

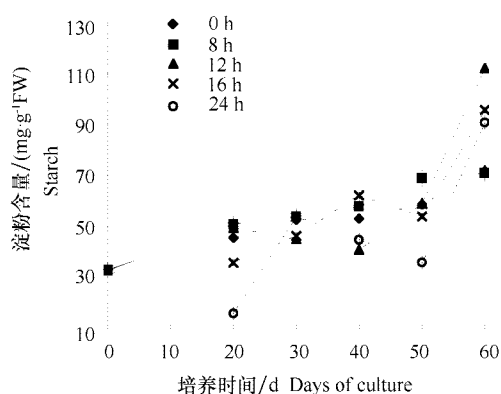


图 2 不同光周期对百合试管鳞茎形成过程中淀粉含量的影响

Fig. 2 Effects of different photoperiods on the starch content during the bulblet formation

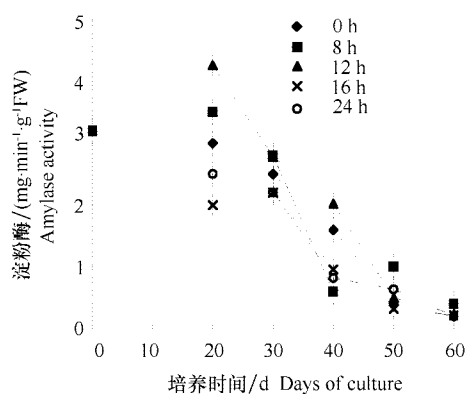


图 3 不同光周期对百合试管鳞茎形成过程中淀粉酶活性的影响

Fig. 3 Effects of amylase activity in different photoperiods during the bulblet formation

2.4 不同光周期下小鳞茎对培养基中蔗糖的利用率

如图 4 所示,各光周期处理的小鳞茎培养 60 d 后对培养基中蔗糖的利用率存在极显著差异。

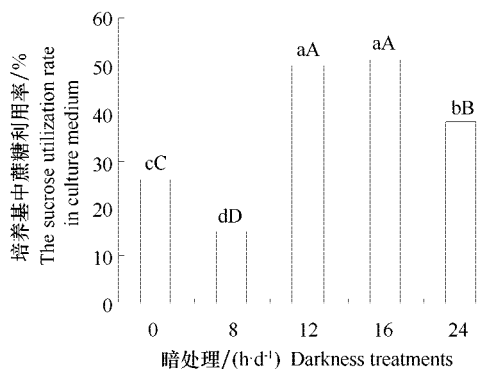


图 4 不同光周期对百合试管鳞茎形成过程中培养基中蔗糖利用率的影响

Fig. 4 Effects of the photoperiods on the sucrose utilization rate in culture medium during the bulblet growth

12 和 16 h · d⁻¹ 两种暗处理下小鳞茎的蔗糖利用率分别为 50.45% 和 49.45%, 二者差异不显著, 但显著优于其它处理, 如 8 h · d⁻¹ 处理下蔗糖利用率仅为 14.05%。

3 讨论

关于光周期对不同植物地下块茎生长发育影响效应的报道并不一致。在马铃薯上, 柳俊和谢从华 (2001) 认为短日照有利于试管马铃薯的膨大, 而沈清景等 (2001) 研究认为, 全黑暗条件对试管马铃薯形成、结薯数量和平均鲜样质量具有极显著的促进作用。本研究中发现, 卷丹百合鳞茎的发生有其自身特点, 从结球率来看, 黑暗并非是诱导结球的必要条件, 在全光照下也可结鳞茎, 其可能的原因是该物种对光暗反应不敏感, 也有本试验条件光照强度较低的原因。

影响百合试管鳞茎膨大有多方面的因素 (Lim et al., 1998; Lian et al., 2003), 本研究表明, 光周期也是重要因素之一。我们认为, 光周期对卷丹百合小鳞茎生长膨大的影响体现在两个方面: 一是直接影响试管培养植株形态建成, 如长光照明显促进根系和叶片等器官的生长, 而不利于鳞茎器官的膨大。结合对不同时期小鳞茎可溶性糖含量变化的测定分析, 培养前期可能是形态建成的关键时期。二是影响试管培养植株光合作用特性, 如暗处理时间过长, 光合作用会因光照减少而受阻, 在一定程度上减少光合产物的积累, 不利于试管鳞茎的膨大; 暗处理时间较短时, 虽然有利于维持较高的光合效率, 但受器官形态建成的特异性影响, 使得光合产物过多地用于植株叶片和根等器官营养消耗需求, 反而不利于小鳞茎的膨大生长。如全天光照条件下, 小鳞茎鲜样质量占总鲜样质量的百分比值最小 (32.3%), 不及 16 h · d⁻¹ 暗处理的一半 (67.2%)。

百合鳞茎的主要营养组成是糖类 (李红娟 等, 2007; 乔永旭 等, 2009), 认识小鳞茎糖代谢的相关机理对于进一步调控其生长发育有重要意义 (孙红梅 等, 2005)。本研究结果表明, 在试管培养过程中, 小鳞茎的可溶性糖含量先升高后降低, 而淀粉含量则是逐渐积累和上升的过程, 到 60 d 培养结束时淀粉含量达到最大 110.4 mg · g⁻¹FW; 淀粉酶是促进淀粉水解利用的关键酶, 在整个试管鳞茎的培养过程中, 小鳞茎组织淀粉酶活性总的表现出下降趋势。由此认为, 在试管鳞茎培养过程中, 淀粉的合成累积一直是小鳞茎生理代谢的主要方向。再结合小鳞茎对培养基糖分利用率的测定结果, 认为卷丹百合在试管培养条件下, 小鳞茎主要依靠培养基中的蔗糖为糖源, 光合作用生产的碳水化合物为辅。

References

- Gao Jun-feng. 2000. Plant physiology experiment technology. Xi'an: World Publishing Corporation: 145–148, 188–190. (in Chinese)
- 高俊凤. 2000. 植物生理学试验技术. 西安: 世界图书出版公司: 145–148, 188–190.
- Guo Hai-bin, Lei Jia-jun. 2006. The bulb scale and bulblet culture *in vitro* of *Lilium lancifolium* Thunb. Chinese Agricultural Science Bulletin, 22 (2): 72–74. (in Chinese)
- 郭海滨, 雷家军. 2006. 卷丹百合鳞片及珠芽组织培养研究. 中国农学通报, 22 (2): 72–74.
- Kapoor R, Kumar S, Kanwar J K. 2009. Bulblet production from node explant grown *in vitro* in hybrid lilies. International Journal of Plant Production, 3 (4): 1–6.
- Kumar S, Kashyap M, Sharma D R. 2005. *In vitro* regeneration and bulblet growth from lily bulbscale explants as affected by retardants, sucrose and irradiance. Biol Plant, 49: 629–632.
- Li Hong-juan, Niu Li-xin, Li Zhang-nian, Zhang Yan-long, Zhang Wei-qiang. 2007. Analysis of the nutrients, bioactive materials and anti-bacterial ability of two edible *Lilium*. Acta Nutrimenta Sinica, 30 (2): 204–205. (in Chinese)
- 李红娟, 牛立新, 李章念, 张延龙, 张卫强. 2007. 两种食用百合鳞茎营养成分和活性物质分析及抑菌性. 营养学报, 30 (2): 204–205.
- Lian Mei-lan, Debasis Chakrabarty, Kee-Yoeup Paek. 2003. Growth of oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. Sci Hort, 97:

- 41–48.
- Lim S ,Seon J H ,Paek K Y ,Han B H ,Son S H. 1998. Development of pilot scale process for mass production of *Lilium* bulblets *in vitro*. *Acta Hort* , 461 : 237–242.
- Liu Jun ,Xie Cong-hua. 2001. The mechanism of potato(*Solanum tuberosum* L.)tuber development and related gene expression. *Chinese Bulletin of Botany* , 18 (5) : 531–539. (in Chinese)
- 柳 俊, 谢从华. 2001. 马铃薯块茎发育机理及其基因表达. *植物学通报* , 18 (5) : 531–539.
- Pejman A ,Morteza K K. 2007. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator , sucrose concentration , harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology* , 10 (4) : 582–591.
- Qiao Yong-xu ,Zhang Yong-ping ,Chen Chao ,Wang Gui-lan ,Di Wei-wei. 2009. Cytological observation on the bulblet induction of *Lilium oriental* 'Sorbonne'. *Acta Horticulturae Sinica* , 36 (7) : 1031–1036. (in Chinese)
- 乔永旭, 张用平, 陈 超, 王桂兰, 底伟伟. 2009. 东方百合‘索邦’诱导小鳞茎发生过程中的细胞学观察. *园艺学报* , 36 (7) : 1031–1036.
- Shen Qing-jing , Ye Yi-xun , Ling Yong-sheng. 2001. Investigation on the inductive factors for producing the miniature potatoes. *Fujian Journal of Agricultural Sciences* , 16 (1) : 54–56. (in Chinese)
- 沈清景, 叶贻勋, 凌永胜. 2001. 马铃薯试管薯诱导因素研究. *福建农业学报* , 16 (1) : 54–56.
- Sun Hong-mei , Li Tian-lai , Li Yun-fei. 2005. Changes of carbohydrate and amylase in lily bulb during bulb development. *Bulletin of Botanical Research* , 25 (1) : 59–63. (in Chinese)
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 2005. 百合鳞茎发育过程中碳水化合物含量及淀粉酶活性变化. *植物研究* , 25 (1) : 59–63.
- Xiang Di-ying ,Zhang Yan-long , Niu Li-xin. 2005. Study on morphological diversity of wild lily from Qinba Mountain and its adjacent area. *Journal of Wuhan Botanical Research* , 23 (4) : 385–388. (in Chinese)
- 向地英, 张延龙, 牛立新. 2005. 秦巴山区及毗邻地区野生百合的形态多样性研究. *武汉植物学研究* , 23 (4) : 385–388.
- Zhuang Zhi-hong , Liu Jian. 2002. Tissue culture of the bulblet formed in tube of *Lilium acapulco*. *Plant Physiology Communications* , 38 (2) : 149. (in Chinese)
- 庄志鸿, 刘 建. 2002. 试管内形成东方百合鳞茎的组织培养. *植物生理学通讯* , 38 (2) : 149.

征 订

《蔬菜学》

本书由方智远院士主编,江苏科学技术出版社出版发行。全书共分7大章,33个小题,44万字,552页,本书较系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就;比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容;简述了21世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体,有利于读者更加深入地了解蔬菜学,研究蔬菜学,是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价:47元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编100081。