

马铃薯休眠阶段中内源激素变化的研究*

杨柏云, 连 勇**, 章敏华, 罗丽萍, 蔡奇英

(南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330047)

摘要: 实验以早熟马铃薯品种费乌瑞它 (Favorita) 和中熟品种夏波蒂 (Shepody) 的脱毒试管苗为材料, 诱导结薯, 研究离体块茎在休眠与萌芽过程中不同时期的内源激素 GA_3 , KT, IAA 和 ABA 含量的变化。结果表明: ①KT, GA_3 , IAA, 三种激素含量随着休眠的解除呈明显上升趋势; ②ABA 的含量甚微, 品种费乌瑞它仅在第一期及品种夏波蒂仅在第一和第二时期检测出微量, 此后均未检出, 可见 ABA 的含量呈下降趋势。

关键词: 马铃薯; 休眠; 内源激素

中图分类号: S532, S330.3*3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3635 (2004) 06-0321-05

1 前 言

马铃薯一般为无性繁殖, 其块茎既可食用也可作为种质材料, 但块茎收获后要经过一定的休眠期才能发芽。马铃薯品种不同, 其块茎休眠期的长短不同; 用处不同, 对休眠期的要求也不同。马铃薯块茎的休眠直接关系到生产与消费, 在栽培过程中, 种薯块茎休眠程度影响着田间的出苗期、出苗率、整齐度、植株长势和产量形成过程等, 最终关系到经济产量的高低。当块茎作为食品和加工原料时, 需要休眠期较长, 原因是一旦块茎休眠解除, 会造成水分、养分的大量消耗, 有毒成分龙葵素含量上升, 薯块就会失去食用和食品加工价值。由于缺少对马铃薯块茎休眠机理的了解, 人为调控技术发展缓慢, 严重制约了马铃薯种薯生产的发展和块茎作为食品工业加工原料的充分利用。如何使马铃薯块茎的休眠和发芽受到人为控制, 是当今马铃薯产业中亟待解决的问题。本文研究了马铃薯离体块茎休眠与发芽过程中不同时期各种内源激素含量的变化, 阐明离体块茎休眠生理与内源激素的相互关系, 为以后更深入地研究马铃薯休眠生理机理打下基础, 并为马铃薯离体块茎的发芽和调控技术提供科学依据。

收稿日期: 2004-07-06

作者简介: 杨柏云 (1960-), 男, 教授, 从事生物技术研究。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 通讯作者: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京, 100081

2 材料与amp;方法

2.1 实验材料

实验材料采用早熟品种费乌瑞它 (Favorita) 和中熟品种夏波蒂 (Shepody) 茎尖脱毒后继代 1 年的脱毒试管苗, 取去掉顶芽及基部 2 个芽的中部芽段, 每段带有 1 个芽节。

2.2 母株培养

诱导试管薯的母株试管苗采用浅层液体静置培养。将带有 1 个叶片的茎段, 接在装有 30 mL 壮苗培养基的 250 mL 三角瓶中, 并使它悬浮于培养基表面, 每瓶接 25 个茎段。大约在 3 周后每个茎段生长成一株带有 5~6 个节的健壮试管苗, 把这些健壮试管苗做为诱导试管薯的母株。壮苗培养基: MS 基本培养基, 附加食用蔗糖 3.0% 和 B_9 5.0 mg/L, pH 5.8; 培养温度: $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$; 光照: 16 h/d; 光强: 2000 lx。

2.3 试管薯诱导

把培养母株三角瓶内的壮苗培养基倒掉, 加入诱导培养基, 在光照 16 h/d 下培养 48 h 后, 转入全黑暗条件诱导试管薯。诱导培养基: MS 基本培养基, 附加食用蔗糖 8.0%, pH 5.8; 诱导温度: 18°C 。大约 45 d 后, 在超净工作台上收取微型试管薯, 用无菌水冲洗残留在试管薯表面的培养基, 并在工作台上晾干, 封存在三角瓶中, 放入 4°C 冰箱 1 周, 准备实验。

2.4 实验方法

在试管薯诱导成功后, 根据离体块茎休眠与萌

芽的状态, 分 5 个不同阶段, 即①新收块茎; ②贮藏 20 d 块茎; ③贮藏 40 d 块茎; ④萌动块茎; ⑤芽长 1mm 块茎。

2.4.1 内源激素提取

提取纯化内源激素基本上参照丁静等^[1-3]的方法并略加修改。每组实验准确称取 1 g 块茎, 做 3 组重复, 2 个实验品种共 6 个样品。每个样品中加入 0.1 g 水不溶性 PVP, 用 20~30 mL 80% 甲醇加液氮研磨, 研磨液移入蒸馏瓶, 置入 4℃ 冰箱中浸提过夜。过滤, 重复 3 次, 减压 35℃ 下旋转蒸馏仪蒸去多余水分和甲醇, 用 0.1 mol/L HCL 调 pH 至 3.0。加入乙酸乙酯, 在分液漏斗中进行萃取, 重复 4 次, 无水 Na₂SO₄ 去水相。减压 35℃ 下旋转蒸馏仪蒸去多余乙酸乙酯并蒸干, 加入 1 mL 80% 甲醇, 超声波清洗器清洗后溶解, 移入 1.5 mL 离心管中, 最后置于 -4℃ 冰箱中保存、待测。

2.4.2 使用仪器

内源激素测定采用吴秀英等^[4]报道的方法, 采用 Shimadzu SLC-6A 高压液相色谱仪, Hi-bar Lichtosorb RP-18 (10 μm) 250 mm 柱, Spp-6AV 紫外检测器波长 254 nm。

3 结果与分析

3.1 各个阶段内源激素含量

由表 1 和表 2 可见, 在马铃薯离体块茎休眠与发芽过程中, 各种内源激素含量有所不同。

表 1 费乌瑞它各阶段内源激素含量 (μg/g 鲜重)

时期	KT	GA ₃	IAA	ABA
1	3.744	194.865	6.473	0.169
2	3.996	288.542	8.967	
3	6.789	624.238	9.134	
4	9.199	1096.887	14.619	
5	13.523	2496.976	16.255	

注: 表中时期 1—新收块茎; 2—贮藏 20 d 块茎; 3—贮藏 40 d 块茎; 4—萌动块茎; 5—芽长 1 mm 块茎 (以下同)。

表 2 夏波蒂各阶段内源激素含量 (μg/g 鲜重)

时期	KT	GA ₃	IAA	ABA
1	2.556	213.9	4.606	0.112
2	6.386	652.656	5.731	0.035
3	9.139	1328.57	10.284	
4	11.214	1851.017	10.599	
5	17.961	3038.339	20.476	

3.2 不同阶段内源激素含量的变化趋势比较

由表 1、表 2 可见, 在马铃薯离体块茎休眠与发芽过程中, 各阶段内源激素含量有不同变化趋势, 且不同内源激素的变化趋势不一样。

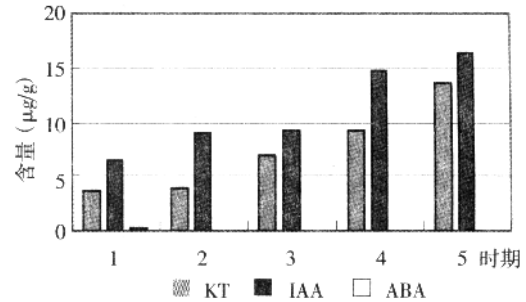


图 1 费乌瑞它 KT、IAA 和 ABA 含量

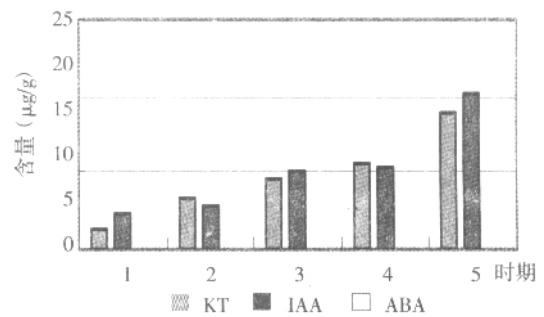


图 2 夏波蒂 KT、IAA 和 ABA 含量

从图 1 和图 2 可见, 在马铃薯离体块茎休眠至休眠解除的五个时期中, 内源 IAA 和内源 KT 的含量相差不大, 普遍是内源 IAA 含量略高于内源 KT 含量。而在整个块茎的休眠期和发芽期, 内源 ABA 的含量都很少, 2 个品种都只是在第一时期检测到微量, 后面 4 个时期 ABA 的含量甚至降低到无法检测。并从表 1 和表 2 可见, 内源 GA₃ 的情况正好相反, 含量很高, 是内源 KT 和内源 IAA 含量的 100 多倍, 更是远远高于内源 ABA 的含量。

3.3 各种内源激素含量在休眠与发芽过程中的变化

3.3.1 KT

从图 3 和图 4 可见, 实验的 2 个品种中内源 KT 的含量变化趋势都十分明显, 含量在 0~20 μg/g 的范围内波动, 呈明显上升趋势。从图 3 和图 4 分析, 在马铃薯块茎休眠至休眠解除整个过程中的第一时期到第三时期, 内源 KT 含量的变化不大, 只是稍微有所增加, 此时马铃薯离体块茎正处在从新收块茎到贮藏 40 d 时。接下来从第四到第五时期, 正是马铃薯离体块茎从萌动到发芽的阶段, 内源 KT 的变化最为明显, 增幅最大。

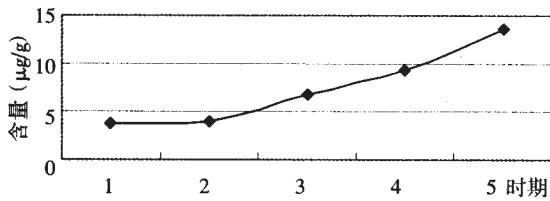


图3 费乌瑞它内源 KT 含量变化趋势

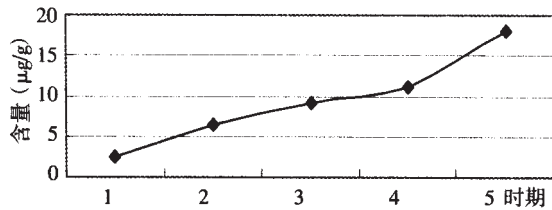


图4 夏波蒂内源 KT 含量变化趋势

3.3.2 GA₃

与本实验中其它内源激素比较, 实验的 2 个品种中内源 GA₃ 的含量都要远远高于 IAA, KT 和 ABA, 最高时达到 3038.339 μg/g。在马铃薯离体块茎休眠至休眠解除的整个过程中, 内源 GA₃ 的含量变化趋势也是非常明显的, 费乌瑞它品种从 194.865 μg/g 到 2496.974 μg/g, 同样夏波蒂品种从第一时期的 213.9 μg/g 到 3038.339 μg/g, 与其它 3 种内源激素相比较, 变化幅度最大。从图 5 和图 6 的结果分析, 实验的 2 个品种都是在从第四到第五时期那个阶段的增幅最大, 也最明显, 此时马铃薯离体块茎正处在萌动到发芽的阶段。

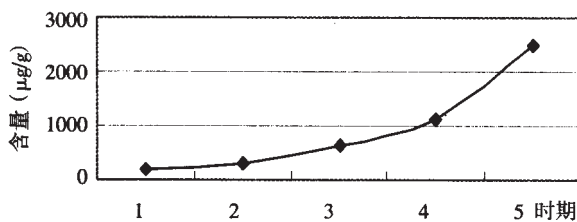


图5 费乌瑞它内源 GA₃ 含量变化趋势

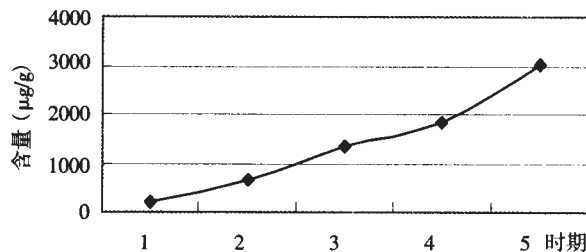


图6 夏波蒂内源 GA₃ 含量变化趋势

3.3.3 IAA

从图 7 和图 8 可以看出, 实验的 2 个品种中内源 IAA 的含量在 5~20 μg/g 的范围内变化, 变化呈上升趋势。其中品种费乌瑞它的离体块茎在从第三时期到第四时期的阶段中含量有较大提高; 另一品种夏波蒂的离体块茎在从第四时期到第五时期的阶段中含量也有较大提高, 此时马铃薯离体块茎正处于开始萌动和发芽的阶段。与内源 KT 和内源 GA₃ 相比较, 内源 IAA 的变化相对没有那么显著。

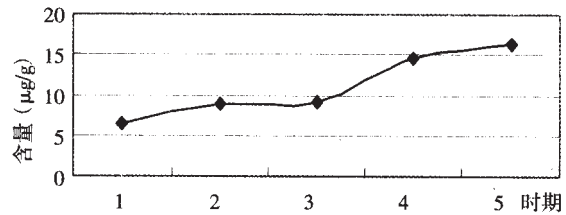


图7 费乌瑞它内源 IAA 含量变化趋势

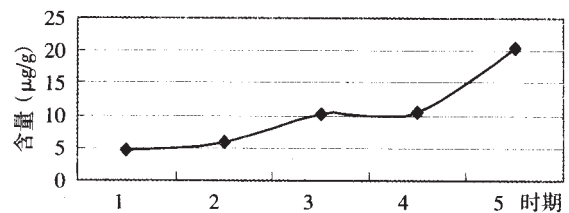


图8 夏波蒂内源 IAA 含量变化趋势

3.3.4 ABA

从表 1 和表 2 的数据可以看出, 在马铃薯离体块茎休眠与发芽的过程中, 内源 ABA 的含量一直很少, 实验的 2 个品种中内源 ABA 的含量均低于 1 μg/g。其中费乌瑞它的离体块茎只是在第一时期检测出微量, 以后四个时期的含量都检测不到; 另一品种夏波蒂的离体块茎也只是在第一时期和第二时期检测出微量, 同时第二时期的含量更低于第一时期, 以后三个时期的含量也都检测不到, 可以推测, 在马铃薯离体块茎的休眠与发芽过程中, 内源 ABA 的含量呈下降趋势。

4 讨论

马铃薯块茎是由匍匐茎膨大形成, 离体块茎收获后, 有一个很长的休眠期, 当块茎进入休眠状态后, 即使在合适的发芽条件下 (黑暗, 15~25℃, 高湿度), 于短期内也不能发芽^[9], 必须经过一段时间的储藏后才能萌芽生长。块茎休眠受多种因素控制, 植物激素是控制马铃薯块茎生长、休眠及萌芽

的因素之一。研究者们则根据植株体内激素含量的变化对种薯生长发育过程中发生的各种生理现象进行探讨和解释^[6]。关于内源激素对休眠的调控, 目前研究倾向于抑制因子/促进因子平衡调节休眠假说, 即当某种因子占优势时, 块茎就表现该因子所控制的性状, 这和种子休眠的调节模式相一致。也就是说, 块茎中促进生长类的植物激素与抑制生长类的植物激素之间存在着某一种平衡关系, 这种平衡关系随着储藏时间及条件的变化而改变^[7]。

在马铃薯离体块茎休眠与发芽的过程中, 各种内源激素的变化受多种因素的影响。从本实验看出, 在离体块茎休眠与发芽过程中, 随着块茎休眠的逐渐解除, 2 个实验品种中的各种内源激素含量的变化都是非常明显的。为方便对内源激素的变化进行分析, 实验在诱导结薯培养基内没有加入任何外源诱导激素。

内源 ABA 是在马铃薯离体块茎休眠机理研究方面最早的一种。早在 Hemberg (1961 年) 等提取到对块茎休眠起始和维持发生作用的复合体物质 β -抑制物时, 就发现当块茎形成时内源抑制因子增加, 这种物质能够抑制块茎茎尖生长。该因子在块茎休眠时含量最高, 随着休眠的解除, 茎尖开始生长时, 含量迅速减少。J.W.Cornforth (1966) 证明, ABA 是 β -抑制物的内源成分之一, 并发现人为消耗 ABA 可以打破休眠^[8], 故大多认为内源 ABA 是马铃薯离体块茎休眠的主要调控子。从本实验研究结果可以看出内源 ABA 在块茎休眠期和发芽期的含量都很少, 而且是在刚刚收获的块茎中含量最高, 在块茎休眠解除时 ABA 含量下降。在块茎休眠解除时 ABA 含量的下降对种薯的萌发有利, 这与前人报道的 ABA 是休眠种子抑制物质的结论相一致^[9]。块茎休眠解除时, ABA 的临界浓度点尚未被发现, 本实验结果显示, 内源 ABA 的含量很少, 除费乌瑞它在第一时期及夏波蒂在第一时期和第二时期能检测出微量外, 此后便检测不到, 无法对 IAA/ABA, KT/ABA 和 GA₃/ABA 的变化趋势进行分析。但是, 通过对夏波蒂第一时期和第二时期上述比值的比较, 可见 IAA/ABA, KT/ABA 和 GA₃/ABA 的变化呈上升趋势, 这与 L.Amen 提出的种子受控 ABA 类抑制物质和 GA₃ 类促进物质相互作用的促进抑制平衡假说相符^[9]。

内源 GA₃ 可逆转 ABA 的抑制作用。有实验证

明, 对休眠块茎使用外源 GA₃ 可以提前解除休眠, 并一致认为 GA₃ 对块茎休眠起促进作用。本实验研究结果表明, 在马铃薯离体块茎休眠至休眠解除的整个过程中, 内源 GA₃ 的含量远远高于其它几种内源激素的含量, 并且含量的变化趋势最为显著。内源 GA₃ 在块茎休眠生理的研究中具有重要意义, 这与李曙轩提出的马铃薯休眠主要受制于 GA₃ 刺激的论点相一致^[6,10]。ABA 和 GA₃ 对马铃薯块茎的休眠和萌芽可能具有协同和负反馈调节作用。所谓协同作用是指两种激素相对含量或其比值决定着块茎的休眠阶段。所谓负反馈调节作用是指由激素含量水平所决定, 处于某一休眠阶段的块茎由于受其抑制或促进生长, 使激素的相对含量发生改变, 从而使块茎进入下一个阶段。以往的研究结果表明, 块茎的休眠并不是单一激素作用的结果, 只有当几种激素之间处于一定的平衡状态时, 才可显示促进某一阶段的开始或保持某一生长状态^[7]。

目前关于内源 KT 对马铃薯离体块茎休眠的调节的研究还不多见。本试验结果表明, 内源 KT 和内源 IAA, GA₃ 的变化一致呈上升趋势, 很可能内源 KT 与内源 GA₃ 共同对块茎休眠的解除起促进作用。这些结果与 Webb 揭示的层积期间糖槭种子 ABA、GA₃ 和细胞分裂素含量变化的规律相一致^[9]。

内源 IAA 对马铃薯离体块茎休眠机理影响方面的研究也不多见。对酶活性研究的部分结果表明, 离体块茎内源 IAA 浓度的调节可能与过氧化物酶的调控有关^[11]。过氧化物酶是 IAA 侧链氧化酶, 可控制 IAA 的浓度。在休眠的不同阶段, 过氧化物酶的活性有很大变化。当离体块茎处于休眠状态时, 过氧化物酶的活性偏高, 使 IAA 浓度与活性降低, 块茎处于休眠状态; 当离体块茎处于萌芽状态时, 过氧化物酶的活性降低, IAA 的浓度与活性提高, 块茎解除休眠状态。对不同时期离体块茎中过氧化物酶的酶活性进行分析发现, 在马铃薯离体块茎从休眠到解除休眠的过程中, 过氧化物酶的酶活性呈下降趋势。这与本实验所得内源 IAA 的含量随着马铃薯离体块茎休眠解除呈明显上升趋势的结果相一致。

从生理学的角度来看, 马铃薯块茎的休眠期是从匍匐茎顶部膨大开始到块茎发芽生长为止, 而一般认为, 马铃薯块茎的休眠是从块茎收获开始到块茎顶芽萌发结束。本实验选定的第一时期乃始于新

薯块的收获。

本实验中, 费乌瑞它是早熟品种, 生育期为 60 d 左右, 休眠期大约是 50~55 d 左右。夏波蒂是中熟品种, 生育期是 95 d 左右, 休眠期大约是 80~85 d。品种的生育期愈长, 休眠期也愈长。从本实验的结果来分析, 内源激素 ABA 的含量很少, 除费乌瑞它在第一时期及夏波蒂在第一、第二时期能检测出微量外, 此后便检测不到。夏波蒂之所以在第二时期也能检测到微量, 正是该品种为中熟品种, 休眠期较费乌瑞它为长的原因, 内源 ABA 的下降过程也相应有个更长时间。

本实验划分出新收块茎等 5 个阶段。正因为两个不同生育期品种的休眠期长短不同, 才导致从第三时期 (贮藏 40 d 块茎) 到第四时期 (萌动块茎) 所需时间的不同, 即费乌瑞它需 20 d 左右, 而夏波蒂却在 40 d 左右。尽管如此, 但其内源激素的变化趋势均一致呈上升的趋势, 所不同的是各内源激素在此阶段的变化幅度不一致。费乌瑞它的各内源激素的变化比夏波蒂的变化幅度更大、更明显, 而夏波蒂内源激素的变化趋势在此阶段要更迟缓些。这些变化从图 3~8 均可以看出。此外, 从图 7、图 8 还可以看到, 内源激素 IAA 的变化在两个品种中都出现了一个迟缓期, 费乌瑞它出现在第二、第三阶段, 夏波蒂则出现于第三、第四阶段, 这一点也与两个品种的休眠期长短不一致有关。

从本文可见, 内源激素 GA_3 , ABA, KT 和 IAA 在马铃薯离体块茎休眠与发芽的整个过程中起着重要的调控作用。马铃薯块茎休眠与种子休眠一样, 与植

物内源激素的含量有关, 而更与各类激素之间的平衡、特别是促进生长类激素与抑制生长类激素之间的比例及平衡有关。对于各类内源激素之间的相互调控关系的具体作用机制还有待进一步探讨^[9,12]。

参 考 文 献

- [1] 丁静, 沈镇德, 方亦雄. 植物内源激素的提取分离和生物鉴定[J]. 植物生理学通讯, 1979, 3(2): 27.
- [2] 罗正荣, 朱丽华. 植物组织中赤霉素含量的高效液相色谱测定[J]. 植物学通讯, 1987, 4(6): 50-53.
- [3] 谈锋. 植物激素的高效液相色谱法[J]. 植物生理学通讯, 1986, 7(5): 15.
- [4] 吴秀英, 王瑞萍, 袁晓燕, 等. 用高压液相色谱及气相色谱测定几种植物的内源激素[J]. 植物学通报, 1985, 3(2): 45-52.
- [5] Reust W. EAPR working group. Physiological age of the potato[J]. Potato Research, 1986, 29:268-271.
- [6] 李曙轩. 植物生长调节剂与蔬菜生产[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992, 283-297.
- [7] 蒙美莲, 刘梦芸. 马铃薯块茎生长过程中内源赤霉素和脱落酸含量的变化[J]. 马铃薯杂志, 1996, 10(1): 8-12.
- [8] Cornforth J W, G Millborrow Ryback. Indification and estimation of (+)abscisic acid in plant extracts by spectropolarimetry[J]. Nature, 1966, 210:627-628.
- [9] Turbull J, T Hankle. The control of bud dormancy in potato tubers[J]. Planta, 1985, 165: 366-376.
- [10] 李曙轩. 植物生长调节剂与农业生产 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1989, 63-65.
- [11] 张勇飞, 王军. 马铃薯萌芽前后的过氧化物酶和多酚氧化酶同工酶变化的初步研究 [A]. 陈伊里. 中国马铃薯研究进展 [C]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1999: 58-61.
- [12] 李秉真, 乌云. 山楂种子休眠与后熟期间内源激素的变化 [J]. 植物生理学通讯, 1993, 34(4): 254-256.

DYNAMIC CHANGES OF SEVERAL ENDOHORMONES DURING DORMANCY OF POTATOS

YANG Bo-yun, LIAN Yong, ZHANG Min-hua, LUO Li-ping, CAI Qi-ying

(Life Science and Food Technology College of Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: Virus free plantlets *in vitro* of potato cvs. Favorita and Shepody were used for the experiment. The changes of endohormones GA_3 , KT, IAA, and ABA during the dormancy and sprouting of microtubers *in vitro* were investigated. The results showed that the contents of GA_3 , KT, and IAA in dormant microtubers were much lower than those in dormancy released ones; the content of ABA was detected only in the first stage, and therefore it may be conclude that ABA decreased abruptly in dormancy released microtubers.

KEYWORDS: potato; dormancy; endohormones