

马铃薯块茎休眠及休眠调控研究进展

张丽莉¹, 陈伊里¹, 连 勇²

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 中国农科院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 系统介绍了马铃薯块茎休眠的总体特征以及休眠块茎在细胞生理学方面的研究进展。同时还论述激素对马铃薯块茎休眠的调节作用, 并提出了一些打破休眠的方法。

关键词: 马铃薯块茎; 休眠; 生理调控; 内源激素; 外源激素

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 06-352-05

块茎是由地下器官膨大而形成的, 块茎上长有腋芽, 用于无性繁殖, 而腋芽存在一定时期的生长削弱, 即所谓的休眠。马铃薯块茎是由匍匐茎顶端(近顶芽3~4个腋芽处)膨大形成的^[1]。块茎形成的同时, 伴随着物质的积累, 当块茎成熟收获后, 块茎上的芽即使处于最适宜的条件也不能萌发, 便认为进入休眠状态。尽管商品薯的休眠通常定义为从收获后开始, 到块茎上的芽开始生长结束。但是从生理角度讲, 休眠始于块茎形成的初始。1985年欧洲马铃薯委员会对休眠作了统一定义, 即在最适宜的发芽条件下, 块茎也不发芽生长的生理状态^[2]。此时的休眠块茎仍保持着生命活力, 维持着最低的生理功能。

1 休眠的总体特征

从发育的观点看, 马铃薯块茎是高度被抑制的茎。顶芽是茎最末端的芽, 芽眼类似于腋芽。休眠的开始被认为是在块茎刚形成时^[3]。Lang等^[2]认为休眠的原因分以下几种: (1) 不利的环境因子(Ecodormancy); (2) 外部条件引起的, 影响结构的生理抑制因子(Paradormancy); (3) 影响结构的内部生理抑制因子^[2](Endodormancy)。上述三种

情况在马铃薯块茎休眠过程中都存在。块茎形成及收获后的一段时期, 马铃薯所有的芽(芽眼)都处于生理休眠(Endodormancy)。一段时间以后, 生理休眠解除, 侧芽分生组织受顶芽抑制(顶端优势)。休眠打破后芽的生长受环境抑制(Ecodormancy)。生理休眠时间的长短及强度受遗传因素和环境因素的影响。块茎形成时所处的环境条件对休眠期的长短有影响; 低温和潮湿的条件延长休眠期, 而高温和干燥的条件可以缩短休眠期^[4]。在3~25℃之间, 块茎的休眠期与收获后的储存温度成负相关。温度低于3℃处于胁迫条件, 导致提早发芽。在大幅度变化的环境中或应用化学物质都能导致休眠的快速解除。这些处理的作用机理还不清楚, 块茎休眠的遗传方式十分复杂。块茎休眠的数量性状的基因座(QTL)分析表明至少有9个不同的位点与块茎休眠有关。非常有趣的是, 尽管有不同的发育起源, 马铃薯种子和块茎休眠期长短之间有一定的关系^[5]。

2 休眠的细胞生理学

详细的形态分析显示块茎收获后, 块茎处于休眠状态时, 不能观测到芽的生长^[6]。在分子水平上, 休眠块茎芽部的分生组织很少有分裂相, 当休眠结束后芽开始生长, 处于分裂中期的细胞也随着增加^[7]。尽管有丝分裂处于静止状态, 但休眠分生组织仍然有代谢活动。许多研究表明休眠分生组织摄取和掺入RNA和蛋白质的前体。芽的生长消

收稿日期: 2003-10-10

基金项目: 国家863计划2001A241133资助项目, 国家自然科学基金C02021001资助项目。

作者简介: 张丽莉(1976-), 女, 东北农业大学作物遗传育种
硕士研究生

耗与掺入的前体增加量相一致。利用显微光密度计进行细胞学分析结果表明在休眠分生组织中有²C核酸的积累^[8]。他们又观测到³H-胸腺嘧啶掺入到与DNA修复过程有关的休眠核酸中,虽然其含量低但可以检测到。随后利用细胞流量计数器对从芽中分离出来的核酸进行研究,其结果也证实了这些观察,并且表明休眠分生组织细胞被停滞在细胞周期的G₁期(G₁期是在有丝分裂前期和随后的DNA复制期之间的阶段,在下一个有丝分裂之前),而早于DNA的复制。研究发现所有的真核生物在细胞周期中都有两个调控点G₁/S、G₂/M,第一个调控点G₁/S决定着染色体是否复制,只有条件成熟时,才开始DNA的合成,即进入S期。第二个调控点G₂/M,决定着细胞是否进行有丝分裂,即进入M期。Campbell发现马铃薯块茎分生组织细胞休眠时,主要停滞于G₁/S期,当休眠解除时,G₂期细胞百分比增加^[9]。Michelle等^[10]在研究豌豆腋芽时发现,休眠核仁中G₁:G₂的比例为3:1,而S期的核仁则更低。可见,在休眠分生区,细胞分裂主要停滞于G₁期,而且物种不同比例不同。休眠细胞位于G₁起,不能进入S和M期,不能完成细胞分裂,因此,在休眠时仅有很少的细胞分裂发生,细胞大都处于静止状态。近来研究发现,休眠细胞通过两个调控点,主要是靠一系列细胞周期蛋白激酶CDKs的活化和抑制来调控的。同时也有报道细胞通过细胞周期进入有丝分裂,是和蛋白质磷酸化和脱磷酸化的级连反应有关。而一些激酶和调控蛋白的活化和磷酸化相偶联,因此,这可能是由于蛋白质磷酸化和脱磷酸化活化或抑制了某些激酶的活性。

研究真核细胞的细胞周期有赖于一组高度保守的蛋白质激酶的活动,这组蛋白质激酶被证实是cdc-2激酶^[11]。这些异源二聚体激酶的催化活性受与它相关的另一组蛋白质激酶细胞周期蛋白磷酸化酶的调控。RNA-蛋白质印记法分析判断cdc-2激酶mRNA和蛋白质在休眠分生组织中表现^[9]。因此,一些不确定的生化因素使得休眠马铃薯块茎上的芽的细胞周期被停滞,可能是有丝分裂细胞周期蛋白缺乏和/或激酶亚基的磷酸化形式不合适,这一问题还没有解决。此外,尝试着把特殊的RNA或蛋白质与休眠状态相联系,迄今还没有获得成功。同样地,调节进入和解除休眠的分子过程

还不知道。

3 休眠的生理调控

块茎的休眠受多种因素控制,既有一些生长物质的调控,又有激酶及一些蛋白因子的调控,但目前研究的都不是非常清楚。目前的研究比较赞成抑制因子/促进因子平衡调节休眠的说法,即当某种因子占优势时,块茎将表现该因子所控制的性状,这和种子休眠的调控模式是一致的。

3.1 内源激素对块茎休眠的调节

3.1.1 脱落酸(ABA)

马铃薯块茎收获后,即便在合适的发芽条件下也不发芽,必须经过一段时间的储藏后才能萌芽生长。许多学者认为,这是因为在块茎中有一种促进生长的植物激素与抑制生长的植物激素间存在着一种平衡关系,这种平衡随着储藏时间及条件而发生变化。最初的研究工作主要在内源抑制因子方面,Hemberg^[12]对马铃薯块茎休眠进行研究时,他从马铃薯中提取到一种复合体物质 β -抑制物,这种物质对马铃薯块茎休眠起始有作用,又对块茎休眠维持起作用。随后Cornforth^[13]证明ABA是 β -抑制物的内源成分之一。此后,ABA被认为是块茎休眠的主要调控物质。ABA对休眠起抑制作用,但是这种作用可被GA₃所逆转,要保持其有效性,ABA必须持续或重复施用。外源ABA不能诱导非休眠块茎进入休眠,只能暂时抑制非休眠块茎上芽的生长^[14]。

3.1.2 赤霉素(GA)

块茎休眠的解除可能是块茎中的一些促进物质起作用。在休眠期间GA₃含量较低,在休眠结束及芽开始生长时含量迅速增加。并且对块茎使用外源GA₃也能够终止休眠。已经有报道称外源赤霉素(尤其GA₃)可以促进休眠马铃薯发芽^[15]。通过浸种或茎秆喷施,均能促进打破休眠。同时也与马铃薯块茎休眠的其他方面有关,不同的外源赤霉素的效果有变化^[16]。这种变化可能与栽培品种有关,也可能与休眠处理的时间有关。

3.1.3 细胞分裂素(CTK)

人工合成的和自然产生的细胞分裂素都能打破马铃薯块茎的休眠和刺激芽的生长^[17]。他还观察到,对于处理前已经储存过的马铃薯,外源细胞分裂素的效果比较好。接下来的研究证实了这一观察

同时也证明了收获后立即使用外源细胞分裂素对随后的发芽所起的作用不大, 但是细胞分裂素的作用随着储存时间的延长而增大, 同时休眠程度减弱^[16,18]。Suttle 对这一难控制的时期进行了研究, 他发现细胞分裂素作用效果的变化不是代谢失活的结果, 而是敏感性的变化 (即可利用的受体和/或活性)。

早期利用生物测定进行的研究表明在发芽的块茎中类似细胞分裂素物质的活动有所增加^[19]。休眠块茎的生理性创伤能诱导发芽, 也导致类似细胞分裂素物质活动的增加。接下来利用免疫探测的方法进行研究证实了这些结果, 也暗示细胞分裂素含量的增加可能早于发芽开始^[5]。在这方面的研究中, 发现在休眠解除和芽开始生长之前, 有生物活性的细胞分裂素含量有所增加。由于储藏温度而被抑制发芽的块茎中也有类似的现象。这就说明了细胞分裂素含量的增加不是芽生长的结果, 而很可能是引起芽生长的原因。在接下来的研究中, 在芽开始生长之前, 内源玉米素含量也有类似的增加, 而且内源玉米素在解除休眠方面的作用和外源的玉米素效果一样^[20]。只有 10% 的 C¹⁴ 标记的外源顺势的玉米素转变为反势异构体, 这就暗示着顺势异构体最有可能具有生物活性。大多数的调查者认为顺势玉米素及其衍生物是没有生物活性的。然而, 这些观察都暗示这两种细胞分裂素的异构体都参与马铃薯块茎休眠的调节。下一步需要研究的是这两种异构体在块茎休眠过程中是如何相互作用的。

3.1.4 植物生长素 (AUXINS)

植物生长素是最早被发现的一类内源激素, 也是最早作为马铃薯块茎休眠最有潜力的调节物被研究的。早期的数据有些矛盾。利用 *Avena* 测定法, 早期的工作者发现内部酸性的生长素与块茎休眠状态没有明显的关系^[11]。通常在已经发芽的块茎, 可以发现内源生长素增加, 这就表明生长素不参与休眠的调控, 它只是后来芽生长所必需的。外源生长素类似物质如 IAA、NAA 的作用使得其作用更加模糊。后来的研究表明, 低水平的 IAA 可以促进从非休眠块茎上分离下来的芽的生长, 而对从休眠块茎上分离下来的芽无效。弱生长素 phenylacetic acid 促进休眠块茎上芽的生长, 即打破休眠^[21]。最近用比较先进的分析技术研究也没能证实这一说法。利用 HPLC 法和银光检测法结合观测

时, 在 8 个月低温储藏过程中, 自由态的 IAA 水平没有变化^[22]。在发芽块茎中自由态 IAA 含量水平降低。在另一个研究中, 储藏在 3 °C (由于低温胁迫而不能发芽) 条件下, 在芽生长之前, 芽眼中的自由态和结合态的 IAA 含量都激增, 又对特殊组织进行了重点研究, 这以后才能解释那些不一致的结论^[5]。

3.1.5 乙烯

乙烯对马铃薯休眠的调控, 到目前为止, 意见仍未统一。Rosa^[23], Denny^[24] 便发现外源乙烯可以打破块茎的休眠。并且他们发现乙烯氯代物比乙烯效果更好。因此, 他们认为乙烯对块茎休眠解除起促进作用。但是还有一些报道说乙烯对块茎休眠起抑制作用。Burton^[25] 发现, 高浓度乙烯抑制块茎休眠解除。Irena Rylski^[26] 发现, 块茎用乙烯短期处理, 则促进发芽, 用乙烯长期处理, 则抑制发芽, 已解除休眠期的块茎, 用乙烯长期处理, 则抑制芽的伸长。但是在马铃薯块茎中内源乙烯浓度很低, 仅在块茎发芽期含量才稍有增加, 因此不能作为芽的内源抑制剂。如果乙烯作为一个对缩短休眠起作用的因子, 在发芽开始前就应测到乙烯含量增加, 但目前还未发现。因此, 乙烯对块茎休眠调控的研究仍存在许多问题。

3.2 其他外源因素

3.2.1 茉莉酸

所有的马铃薯组织都能产生茉莉酸, 它是脂肪酸的衍生物, 具有广泛的生理活性^[27]。茉莉酸的一个衍生物, 13-羟基茉莉酸已被证实是马铃薯和其它块茎植物自然结薯的促进物。关于茉莉酸对不同类型休眠所起的作用的研究结果有些矛盾。茉莉酸用于刚收获的马铃薯, 可以延长芽的受抑制期^[5]。关于茉莉酸在块茎休眠期间含量的变化还未报道。茉莉酸可能是块茎休眠的调节物, 但是还没有被证实。

3.2.2 酚类物质

酚酸在植物代谢中起着重要作用, 块茎休眠至休眠解除过程中, 常伴随酚含量的变化, 酚类物质可能也参与马铃薯块茎休眠的调控。在植物中有两类酚酸, 一类以结合态形式存在; 另一类以自由态形式存在。其中自由态的酚酸和休眠的维持相一致, 它的含量下降和上升, 伴随着休眠的缩短和延长, 并且自由态的酚酸通常和 ABA 的变化相一致,

这些显示酚酸可能参与马铃薯块茎的休眠和发芽的调控。目前认为^[28], 酚类物质对休眠的调控可能通过对细胞分裂的抑制起作用, 已发现, 香草酸、香豆酸等能显著抑制根部的细胞分裂。也有报道说^[29], 酚酸对 rRNA 的合成有抑制作用, 并作为内源信号对蛋白质合成有抑制作用, 这些都可能是对休眠起作用的原因。

4 休眠的分子生物学研究

块茎休眠的分子机理是相当复杂的, 可能涉及到许多相关基因及蛋白。关于休眠调控的复杂程度, Borgmann^[30]通过库 (小的发育中的块茎) 源 (储藏中的块茎) 块茎作了说明, 他提取块茎中的蛋白质, 然后按照等电点和分子量来分离它们。他发现了 1072 条多肽, 其中 296 (28%) 种是库块茎, 185 (17%) 种是源块茎, 591 (55%) 种是两者普通发育阶段的蛋白。一些特定的库蛋白被作为发育蛋白和关键酶, 参与碳水化合物的代谢, 而源蛋白则通过质膜有输出作用。研究显示休眠控制的多基因特性。

使用 cDNA-AFLP 方法对马铃薯块茎从休眠到发芽的整个过程进行 mRNA 指纹分析, 对差异表达带进行了分离、克隆、测序和序列的同源性分析, 将马铃薯块茎休眠和发芽过程中差异表达的基因大致分为: ①调节基因; ②与光和能量代谢相关的基因; ③与外界逆境胁迫相关的基因; ④与植物激素 (IAA) 代谢相关的基因; ⑤未知同源性及其功能基因。这一结果表明, 马铃薯块茎的休眠虽然是其生长发育生命周期中一个相对静止时期, 但整个过程仍然不断地有不同类型的活性基因表达^[31]。这种多样性表现了马铃薯块茎休眠和发芽在分子水平上的复杂性。也为众多因子影响马铃薯块茎休眠提供了分子方面的佐证。

5 打破休眠的方法

现已发现有许多方法可以解除马铃薯块茎休眠。有化学方法, 也有物理方法。曾广泛使用的兰地特 (氯乙醇, 二氯乙烷, 四氯化碳的混合体, 比例为 7:3:1)。但是兰地特毒性高, 并且使用块茎易腐烂, 因此, 不适合于一般商品生产。巯基乙醇、硫脲、二硫化物等一些含硫化合物, 也可以解除休眠^[32]。如二硫化碳已被印度、巴西等国使用,

但是也因毒性大而没有推广。溴代乙烷也被作为休眠块茎的休眠解除剂, 但因为环境问题及处理比较困难也没有被广泛使用。GA₃ 对休眠解除十分有效, 但是只有把块茎切伤后施用, 效果才能更好, 这在商业生产中不现实。GA₃ 施用在茎杆上, 也能缩短块茎休眠期^[33], 但施用的最适浓度, 应和所用的材料及材料所处的休眠阶段有关, 较高的浓度用于刚收获的新块茎, 较低浓度用于较老的块茎及多处切伤的块茎。这是一种较好的解除休眠方法, 但目前还没有太多的研究。

Burton 等^[34]发现, 储藏温度影响块茎的休眠, 休眠可以通过变温处理来解除。短期低温 (0~5℃) 或短期预高温 (28~32℃) 然后在合适的温度黑暗储藏, 均可以缩短休眠^[35]。因此, 通过调节储藏温度来调节休眠, 亦被认为是一种较好的方法。

另外通过调节 CO₂/O₂ 含量的方法也可以打破休眠^[32], CO₂ 是组织代谢活跃调控因子。

6 结束语

马铃薯块茎休眠是一个非常复杂的生物学过程, 众多的环境、生理和遗传因子对生产和储藏过程中马铃薯的休眠和发芽都有直接和间接的影响。作为发育进程, 休眠几乎影响农业生产的每个方面。马铃薯的休眠和发芽对于马铃薯的栽培、块茎生产和加工工业都极为重要。随着生产发展的需要, 休眠的研究被提上日程。许多关于休眠的停滞及解除机理及休眠调控技术的研究已被提出。对解调节休眠过程的每一个内部因子越加了解, 将有助于提出新方法来调控休眠, 使其更加有利于生产者和消费者。

参 考 文 献

- [1] 连勇. 马铃薯块茎发育与休眠 [A]. 高新技术与马铃薯产业 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2002, 86-92.
- [2] Lang G A, J D Early, G C Martin, et al. Endo-para-dormancy: physiology terminology and classification for dormancy research. Hortiscience. 1987, 22 : 371-377.
- [3] Burton W G. Concepts and mechanism of dormancy. In: Ivins J D, Milthorpe F L (eds). The growth of the potato [M]. Butterworth, London, 1963, 17-41.
- [4] Krijthe N. Observations on the spouting of seed potatoes [J]. European Journal of Potato Research, 1962, 5: 316-333.

- [5] Suttle J C. The role of endogenous hormones in potato tuber dormancy. *Dormancy in Plant*, 2000.
- [6] Van Ittersum M K, Aben F B, Keijzer C J. Morphological changes in tuber during dormancy and initial sprout growth of seed potatoes [J]. *Potato Research*, 1992, 35: 249—260.
- [7] Lesham B, Clowes F A L. Rates of mitosis in shoot apices of potatoes at the beginning and end of dormancy. *Annals of Botany*, 1972, 36: 687—691.
- [8] Macdonald M M, Osborne D J. Synthesis of nucleic acids and protein in tuber buds of *Solanum tuberosum* during dormancy and early sprouting. *Physiol Plant*, 1988, 73: 392—400.
- [9] Campbell M A, Suttle J C, Sell T W. Changes in cell cycle status and expression of p^{34cdc2} kinase during potato tuber meristem dormancy. *Physiologia Plantarum*, 1996, 98: 743—752.
- [10] Devitt M L, Stafstrom J P. Cell cycle regulation during growth—dormancy cycles in pea axillary buds. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 255—265.
- [11] Nigg E A. Cyclin—dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, 1995, 17: 471—480.
- [12] Hemberg T. Potato rest. *Potato Physiology*, 1985, 354—388.
- [13] Cornforth J W, Millborrow Ryback G. Indification and estimation of (+) abscisin in plant extracts by spectropolarimetry [J]. *Nature*, 1966, 210: 627—628.
- [14] EI—Antably H M M, Wareing P F, Hillman J. Some physiological responses to D, L—abscin (dormin). *Planta*, 1967, 73: 74—90.
- [15] Rappaport L, Wolf N. The problem of dormancy in potato tuber and related structures. *Symp Soc Exp Biol*, 1969, 23: 219—240.
- [16] Turnbull C G N, Hanke D E. The control of bud dormancy in potato tubers. Evidence for the primary role of cytokinins and a seasonal pattern of changing sensitivity to cytokinin. *Planta*, 1985, 165: 359—365.
- [17] Hemberg T. The action of some cytokinins on the rest—period and the connect of acid growth—inhibiting substances in potato. *Physiologia Plantarum*, 1970, 23: 850—858.
- [18] Suttle J C. Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. *Plant Physiology*, 1998, 118: 843—848.
- [19] Van Staden J, Brown N A C. Investigation into the possibility that potato buds synthesize cytokines. *Journal of Experimental Botany*, 1979, 30: 391—397.
- [20] Suttle J C, Banowitz G M, Huckle L L. Changes in cis—zeatin/cis—zeatin riboside levels and biological activities during postharvest storage of potato tubers. *Plant Physiology*, 1997, 114: s164.
- [21] Zimmerman P W, Hitchcock A E. Experiments with vapors and solutions of growth substances. *Contributions of the Boyce Thompson Institute*, 1939, 10: 481—501.
- [22] Sukhova L S, Machackova I, Edeer J, et al. Changes in the levels of free IAA and cytokinins in potato tubers during dormancy and sprouting. *Biol Plant*, 1993, 35: 387—391.
- [23] Rosa J T. Shortening the rest period of potato with ethylene gas. *Potato News Bull*, 1925, 2: 363—365.
- [24] Denny F E. Hastening the sprouting of dormancy potato tubers. *Am J Bot*, 1926, 13: 118—125.
- [25] Burton W J. Studies on the dormancy and sprouting of potatoes. *Planta*, 1985, 165: 366—376.
- [26] Rylska I, Pappaport L, Pratt H K. Dual effect of ethylene on potato dormancy and sprout growth. *Plant Physio*, 1974, 53: 658—662.
- [27] Van den Bergh J H, Ewing E E. Jasmonates and their role in plant growth and development, with special reference to the control of potato tuberization; a review [J]. *American Potato Journal*, 1991, 68: 781—794.
- [28] Vaughan D, Ord B. Influence of phenolic and morphological changes in roots of *Pisum sativum* [J]. *Journal Science Food Agriculture*, 1990, 52: 289—299.
- [29] Korableva N P, Morozova T A. Role of the growth inhibitors. *Dokl AN USSR*, 1973, 212: 1000—1002.
- [30] Borgmann K, Sinaha P. Changes in the two dimensional protein pattern and in gene expression during the sink—to—source transition of potato tubers. *Plant Science*, 1994, 99: 97—108.
- [31] 周志钦. 马铃薯从休眠到发芽过程差异表达基因的分析 [J]. *西南农业大学学报*, 2001, 6, 23 (3): 213—215.
- [32] Burton W G. The physics and physiology of storage. In: Harris P M (ed). *The Potato Crop: The Scientific Basis for Improvement*, Chapinan and Hall, London, pp, 545—566.
- [33] Ittersum M k van, K Scholte. Shortening dormancy of seed potatoes by a haulm application of gibberellic acid and storage temperature regimes [J]. *American Potato Journal*, 1993, 70: 7—19.
- [34] Burton W G. *The Potato*, Ed 3. Longman Scientific and Technical, Essex, UK, pp, 470—504.
- [35] Marimus J. The effect of temperature and light during storage of young seed potato on initial plant development at early potato planting [J]. *Potato Research*, 1992, 35: 389—401.

第五届世界马铃薯大会

敬请关注: 马铃薯专业委员会学术年会 2004 年 3 月召开