

马铃薯试管块茎诱导过程中总 RNA 的变化^{*}

柳俊, 宋波涛, 谢从华, 黄健, 聂碧华

(华中农业大学, 湖北 武汉 445000)

摘要: 试验以南中 552 (N552) 脱毒试管苗为材料, 设计采用了 5 种蔗糖浓度和 5 种光照时间共 25 个处理, 测定分析了各处理试管块茎诱导前后总 RNA 的变化规律。结果显示, 除连续光照下各蔗糖浓度处理的总 RNA 含量变化幅度较小外, 其它处理在培养过程中总 RNA 含量均存在不同程度的变化差异。光照处理后总 RNA 含量上升的处理能正常形成块茎。培养期间总 RNA 含量上升到一定程度后, 即呈下降趋势的处理无块茎形成或形成极少。不同处理可能启动了不同的基因表达系统, 进而导致了试管块茎的形成差异。

关键词: 马铃薯; 试管块茎; 总 RNA

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2002) 01-001-04

1 前言

马铃薯试管块茎的诱导生产与应用, 不仅对于马铃薯种薯生产具有重要的实践意义, 而且亦可为以变态器官为繁殖体的植物种子繁殖提供一条新的模式途径。而试管块茎的高效诱导是其应用的前提, 这一关键技术的突破又取决于对其发生条件及形成机制的了解程度。自然条件下, 马铃薯块茎形成是其系统发育的结果, 它亦受相应的发育基因所控制。离体培养条件下, 通过人工调控诱导马铃薯试管块茎的形成, 同样亦是相关基因表达的结果。然而, 培养条件下的基因调控取决于我们对于有关基因表达的了解程度, 但目前这方面的相关研究还比较薄弱, 这也是影响试管块茎批量生产技术发展的重要限制因素。基因表达必然涉及到 RNA 的合成, 尽管目前还不清楚试管块茎诱导形成过程中涉及到多少基因, 哪些基因直接控制块茎的形成, 但块茎诱导过程中 RNA 含量的变化可以从一定程度上反映基因表达

与关闭的情况。根据诱导条件的不同, 通过 RNA 表达量的差异与试管块茎形成的差异比较, 可以在一定程度上提供块茎形成过程中基因表达模式的有关信息, 为块茎形成的分子机理研究提供一定基础。

2 材料与amp;方法

2.1 试验材料和处理

试验材料: 马铃薯品种 N552 的脱毒试管苗。

培养基处理: 培养基为 MS 分别附加 2%、4%、6%、8% 和 10% 蔗糖。

光照时间处理: 连续光照 (24 h/d); 长日照 (16 h/d) 培养 4 周后分别转入全黑暗 (0 h/d)、短日照 (8 h/d) 和继续长日照 (16 h/d) 培养。

2.2 培养与取样

取试管苗中部 2~4 节, 去除叶片保留叶柄, 单节段接种于各处理培养基上, 每培养盒接种 20 节, 每处理 10 盒。接种好的材料置于温度 20℃, 每天光照 16 h 下培养 4 周, 然后按光照处理分别置于不同光照时间处理下培养, 连续光照的 1 组自接种开始即置于连续光照下培养。取样从培养第 3 周后开始, 每周取样一次, 每次一盒用于 RNA 抽取, 培养过程中观察各处理开始形成试管块茎的时间, 培养第 8 周统计结薯情况。

* 国家自然科学基金资助项目 (39970464)

收稿日期: 2001-11-08

2.3 RNA 抽提

RNA 抽提采用改良异硫氰酸胍提取法, 为避免 RNase 污染, 所有试验试剂、用品均用 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 处理并高温灭菌, 所有试验步骤均带手套操作。

2.4 RNA 浓度测定

RNA 浓度测定采用紫外分光光度计法。紫外分光光度计使用“岛津 UV-2401PC”, 根据单位体积在 260 nm 波长下的吸光值换算单位体积的浓度, 再根据取样鲜重换算成 ug/gFW 的总 RNA 浓度。

3 结果

3.1 培养过程中总 RNA 含量的变化趋势

除连续光照下各蔗糖浓度处理的总 RNA 含量变化幅度较小外, 其它处理在培养过程中总 RNA 含量均存在不同程度的变化差异。成苗阶段 16 h/d 光照条件下, 不同的蔗糖浓度导致植株总 RNA 含量出现明显差异。第 3 周到第 4 周 4%、6% 和 10% 蔗糖浓度的处理, 其总 RNA 均有上升。而 2% 和 8% 蔗糖浓度的处理则表现下降。到第 4 周植株总 RNA 含量依次为 4% > 6% > 10% > 2% > 8% (图 1a-d)。

16 h/d 光照下培养 4 周后进入不同光照的处理, 各蔗糖浓度间在光照处理初期 (光照处理的第 1 周) 表现出了明显不同的变化。4% 蔗糖浓度的总 RNA 含量急剧下降; 6% 蔗糖浓度的总 RNA 在 0 h/d 和 8 h/d 光照条件下降低较快, 在 16 h/d 光照条件下亦有下降趋势; 10% 蔗糖浓度的处理除在 0 h/d 光照条件下略有上升外, 在 8 h/d 和 16 h/d 均呈下降。而 8% 蔗糖浓度的处理在所有光照条件下均表现出较快的上升趋势。

3.2 处理间 RNA 含量变化差异与试管块茎形成的关系

试验处理的试管块茎形成时间及试管薯形成情况观察结果列于表 1。各光照条件下 2% 蔗糖浓度的处理及 24 h/d 光照的处理均未有块茎形成, 故其结果未统计在表中。

连续光照条件下, 各处理总 RNA 含量变化较小, 亦未形成块茎。图 1d 显示, 在 24 h/d 光照条件下, 各蔗糖浓度处理植株的总 RNA 含量一直较缓慢地增至第 6 周, 其后缓慢下降, 仅 2% 蔗糖浓度的处理在后期有所变化。处理间差异亦较小, 该光照条件下无一处理形成了正常块茎。

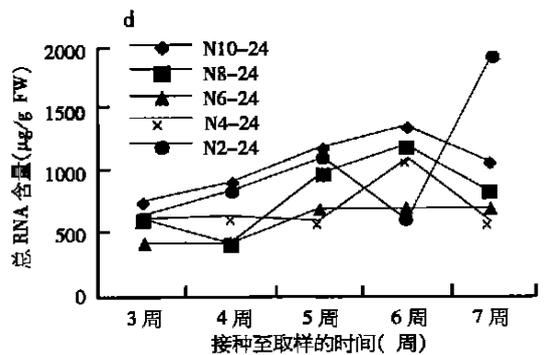
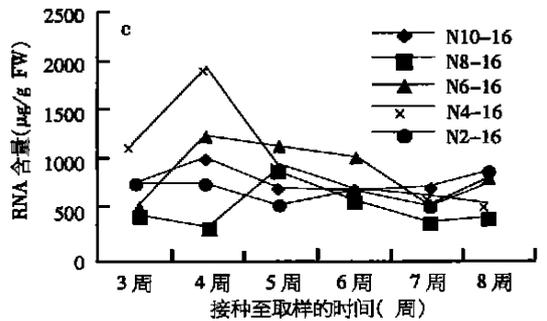
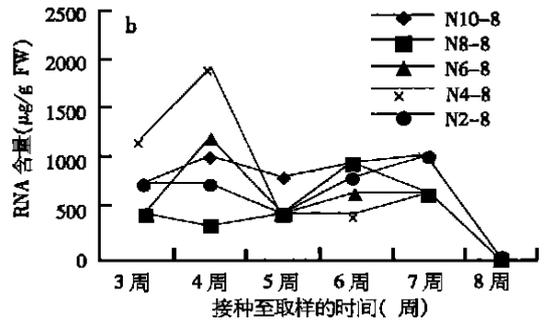
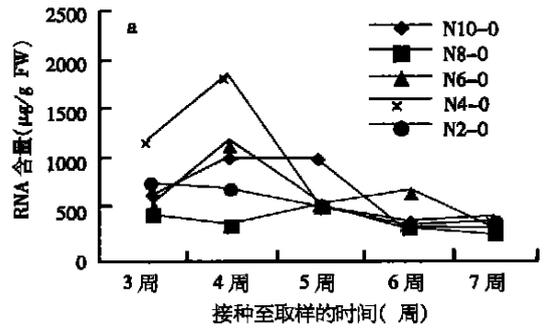


图 1 N552 不同处理总 RNA 含量的变化

a、b 和 c 为在光照 16h/d 下培养 4 周后分别转入光照 0h/d、8h/d、16h/d 的处理; d 为光照 24h/d 的处理。

培养期间总 RNA 含量上升到一定程度后, 即呈下降趋势的无块茎形成或形成极少。如图 1c 所示, 2%、4%、6%和 10%蔗糖浓度处理一直在光照 16 h/d 下培养接种后第 5 周植株的总 RNA 均不同程度下降, 这些处理中, 仅 4%蔗糖浓度有 2.3%的植株形成了块茎, 其余均未有块茎形成。6%蔗糖浓度在 0 h/d 和 8 h/d 光照条件下亦反映出相同趋势 (图 1a, b)。

表 1 不同处理试管块茎形成情况统计

培养基蔗糖浓度 (%)	光照时间 (h/d)	初始结薯时间* (d)	平均单株结薯数 (个)	结薯株率 (%)
4	0	33	0.28	27.7
4	8	40	0.30	30.1
4	16	56	0.02	2.3
6	0	49	0.20	12.0
6	8	55	0.04	4.0
6	16	—	0.00	0.0
8	0	31	0.76	66.1
8	8	38	0.47	44.8
8	16	55	0.12	11.5
10	0	42	0.48	44.0
10	8	49	0.32	28.0
10	16	—	0.00	0.0

* 初始结薯时间为接种至第 1 个试管块茎形成的天数。

光照处理后总 RNA 含量上升的植株能正常形成块茎。如在 0 h/d 光照下培养 1 周, 8%蔗糖浓度的处理其植株总 RNA 含量由 235.294 $\mu\text{g/gFW}$ 上升至 535.885 $\mu\text{g/gFW}$ (图 1a), 该处理的结薯株率达 66.1%, 单株结薯数 0.76 个 (见表 1)。

4 讨论

光照时间和蔗糖浓度已证明与马铃薯试管块茎的形成具有密切关系^[1,2], 高蔗糖浓度、短日照和全黑暗具有促进结薯的功能, 被认为是块茎形成的诱导条件^[3]。在适宜的诱导条件下, 植株体内的“块茎诱导物质”和“块茎抑制物质”达到一种动态平衡, 从而促进了块茎的形成, 这种动态平衡可能是相关基因表达与关闭的结果, 亦可能是某些基因的表达强度发生了变化, 从而导致了 RNA 总含量水平上的变化。崔凯荣等^[4]在小麦体细胞胚诱导研究中也观察到, 愈伤组织转入胚性诱导培养后, RNA 合成速率迅速增加, 到第 4 天达到高值。其含量为诱导前 3.3 倍, 且在整个体细胞胚发

育中一直保持这一水平。

不同蔗糖浓度的处理在前期长日照 (16 h/d) 培养下, 总 RNA 含量差异较大, 因此可以看出不同处理可能启动了不同的基因表达系统, 进而导致转入全黑暗 (0 h/d)、短日照 (8 h/d) 和继续长日照 (16 h/d) 处理中其 RNA 的消长状况不同。而这一消长状况与块茎形成具有明显的相关性, 这一期间总 RNA 浓度呈上升趋势的处理均表现出结薯频率高于其它处理, 证明了在试验所涉及的调控因素中, 光照与蔗糖浓度的相互作用对块茎形成调控十分重要。在本试验处理范围内, 短日照或全黑暗加高蔗糖浓度的处理 (0 h/d+8%蔗糖、0 h/d+10%蔗糖、8 h/d+8%蔗糖) 在进入相应的光照处理后, 植株的总 RNA 含量上升, 其结薯株率达到 44%~66%。而在不利于结薯的全光照条件下, 各蔗糖浓度处理的总 RNA 含量变化较其它光照处理的小, 且未能形成正常块茎。

如果说诱导初期植株总 RNA 含量上升与块茎形成相关基因表达可能有关, 那么本试验的结果还显示, 块茎形成相关基因在诱导表达后两周内即可能关闭, 表现在总 RNA 含量在这段时间后有下降趋势, 这与块茎形成持续的时间基本吻合 (Xie, 1989)。然而, 到底哪些基因是块茎形成相关基因, 还需要经过进一步试验研究, 但至少这种基因应具备下列特征: 与蔗糖和光照诱导有关; 与调节植株体内的“块茎诱导物质”和“块茎抑制物质”的平衡状态有关; 表达与块茎发育同步或稍超前表达, 且在块茎形成部位特异表达。

参考文献

- [1] 柳俊, 谢从华, 黄大恩. 马铃薯试管块茎形成机制的研究—处理暗与光照时间对试管块茎形成的影响 [J]. 马铃薯杂志, 1994, 8 (3): 138—141.
- [2] Garner N and Blake J. The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. *Ann Bot*, 1989, 63: 663—674.
- [3] Struik P C, Vreugdenhil D, Vaneck H J, Bachem C W and Visser R G F. Physiological and genetic control of tuber formation. *Potato Res*, 1999, 42: 313—331.
- [4] 崔凯荣, 王晓哲, 陈雄等. 小麦体细胞胚发生中 DNA, RNA 和蛋白质的合成动态 [J]. 核农学报, 1997, 11 (4): 209—214.
- [5] Xie C. Physiology of tuber growth and tuber size control in potato (*Solanum tuberosum* L.). Ph D thesis. London: Wye College, University of London, 1989.

专用肥对马铃薯产量及效益的影响

娄春荣¹, 孙文涛¹, 肖千明¹, 肖世盛²

(1. 辽宁省农业科学院土壤肥料研究所, 辽宁 沈阳 110161; 2. 朝阳市蔬菜服务中心, 辽宁 朝阳 122000)

摘要: 针对马铃薯的吸肥特性和土壤养分含量状况, 科学配制而成的马铃薯专用肥, 每公顷施 750 kg 专用肥, 比常规施肥, 无论生育状况、产量、品质还是商品性均明显提高, 其效益增加显著。I 型专用肥、II 型专用肥和 III 型专用肥分别比常规施肥每公顷增产 5456、6060 和 7575 kg, 增产幅度分别为 20.47%、22.72% 和 28.40%; 增值分别为 2026.5 元、3979.5 元和 4811 元, 增值幅度分别为 25.3%、50.0% 和 60.0%。

关键词: 马铃薯; 专用肥; 产量; 效益

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2002) 01-004-03

1 前言

马铃薯复栽大葱是我省村屯周边高产高效经济田一种栽培模式。近年来, 在新一轮农业结构调整中, 该栽培模式有扩大趋势, 仅台安县西佛镇就已接近 666.7 hm²。但在我们深入农村调查过程中发

现, 绝大部分农民在栽培马铃薯施肥时, 不根据土壤供肥能力和作物需肥特性, 均采用常规施肥技术, 如不管什么作物均以尿素和磷酸二铵为主, 施用量也没有多大变化。据此, 我们于 2000 年选择了台安县西佛镇作为试验基地, 已取得可靠的试验数据, 供全省类似地区参考。

2 材料与方法

供试土壤为耕性碳酸盐草甸土, 有机质含量 11.2g/kg、速效氮 120mg/kg、速效磷 21.2mg/kg、

收稿日期: 2001-08-25

作者简介: 娄春荣 (1966-), 男, 农学硕士, 副研究员, 从事土壤肥料及多种专用肥的研制工作。

RNA VARIATION DURING MICROTUBER INDUCTION OF POTATOES

LIU Jun, SONG Bo-tao, XIE Cong-hua, HUANG Jian, NIE Bi-hua

(Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 445000)

ABSTRACT: Virus-free plantlets of cv. N552 of potato (*S. tuberosum*) produced *in vitro* were used for the experiments. The variation of the total RNA was analysed before and after microtuberization for twenty-five treatments with different sucrose concentrations and day-lengths. The results showed that a marked variation in RNA concentration was observed in all the treatments except for the plantlets growing at consecutive light. Microtubers formed in the treatments that showed increase in RNA concentration after the induction, and no or less tubers accompanied with the treatments in which RNA concentration increase initially and then sharply declined. It was assumed that difference in tuber formation may result from a systematic difference in gene expression that was caused by the induction treatments.

KEY WORDS: potato; tubers *in vitro*; total RNA