

香豆素和寡糖素对马铃薯试管结薯的影响*

陈善娜¹ 李琼红¹ 王丽华¹ 聂为民¹ 王军²

(¹ 云南大学生物系, 昆明 650091)

(² 云南师范大学生物系, 昆明 650092)

摘要 本研究将生理活性物质香豆素、人参寡糖素和黑节草寡糖素分别加入含有 BAP5.0 mg/l、蔗糖 8% 的 MS 基本培养基中, 用于诱导马铃薯试管结薯, 并与加入矮壮素诱导的结薯效果作了比较。结果表明, 在加入 100 mg/l 香豆素时, 试管结薯的数量与使用 500 mg/l 矮壮素效果相近似。使用 50 mg/l 人参寡糖素或 10 mg/l 黑节草寡糖素时, 试管结薯的数量明显超过或略超过用 500 mg/l 矮壮素的效果。对 4 种处理下获得的试管薯进行了过氧化物酶的同工酶及酶活性的测定。结果表明, 这 4 种不同的外源生长调节剂在使用浓度恰当时, 所结薯块的过氧化物酶同工酶谱和过氧化物酶活性是近似的。

关键词 马铃薯; 试管结薯; 香豆素; 寡糖素; 矮壮素; 过氧化物酶同工酶

EFFECT OF COUMARIN AND OLIGOSACCHARINS ON IN VITRO TUBERIZATION OF POTATO

CHEN Shan-Na¹, LI Qiong-Hong¹, WANG Li-Hua¹,
NIE Wei-Min¹, WANG Jun²

(¹ Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

(² Department of Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

Abstract The physiological active substances coumarin and oligosaccharins extracted from *Dendrobium candidum* and *Panax ginseng* were added into the medium (MS+5.0 mg/l BAP+8% sucrose) to induce *in vitro* tuberization of potato. The effect were compared with those of adding chlorocholine chloride (CCC) on inducing *in vitro* tuberization. The results showed that when 100 mg/l coumarin was added, the effect on amount of tuberization approximated to the effect of using 500 mg/l CCC. When 50 mg/l oligosaccharins extracted from *Dendrobium candidum* and 10 mg/l oligosaccharins extracted from *Panax ginseng* were used, the amount of tuberization was obviously or slightly more than that using 500 mg/l CCC. Analysis of peroxidase isozymes and its activity indicated that the peroxidase activity in the induced tubers and its isozymes spectrum were obviously similar when these four different

growth regulators were used appropriately.

Key words Potato; *in vitro* tuberization; Coumarin; Oligosaccharin; Chlorocholine chloride; Peroxidase isozymes

马铃薯试管结薯是一项新兴的生物工程技术, 在影响试管结薯的各种生长调节剂中已发现细胞分裂素, 特别是 6-苄基氨基嘌呤 (BAP) 在不同的基因型中对微型薯诱导具有至关重要的作用。赤霉素 (GA_3) 抑制块茎形成过程, 这种抑制作用可通过在培养基中增加矮壮素 (CCC) 得以克服⁽¹⁾。Dodds⁽²⁾ 所报道的诱导块茎配方为 MS (液体) +500—700 mg/l CCC+2.0—5.0 mg/l BAP+8%蔗糖。为了探索更有效和更经济的诱导试管结薯的培养配方, 我们试用了国产的不同浓度香豆素 (Coumarin) 和近年来发现的一类新的调节分子——寡糖素⁽³⁾, 即昆明植物研究所生理室从植物中提取的人参寡糖 (OP), 黑节草寡糖 (OD) 代替 Dodds 配方中所使用的矮壮素, 对不同的外源生长调节剂诱导试管薯的效果, 进行了比较。

过氧化物酶广泛存在于植物各种组织和器官中, 并有许多同工酶, 在植物生长发育和代谢中具有多种生理功能。外界因素包括激素通过过氧化物酶同工酶影响器官的生理和发育, 并可能在细胞的生长和分化的调节中起作用⁽⁴⁾。本文也研究了不同外源生长调节剂在诱导无病毒试管薯形成时, 对过氧化物酶同工酶和过氧化物酶活性的影响。

材料和方法

1. 无病毒马铃薯试管苗的增殖

无病毒马铃薯试管苗的无性繁殖系来自国际马铃薯中心 (CIP) 与中国合作的单位, 有 805-1, I-850 和 Mira 3 个品种, 分别代号为 W, I 和 AB。液体培养基 MS+ GA_3 0.4 mg/l +BAP0.5 mg/l +2%蔗糖。固体培养基 MS+ GA_3 0.25 mg/l +NAA0.01 mg/l +3%蔗糖+8%琼脂。pH5.6—5.8。在无菌条件下, 将长约 2 cm 的茎尖剪下转接到固体培养基的果酱瓶里, 将 4 段带有 3—5 个节的无菌试管苗切段转接到盛有液体培养基的果酱瓶里。在 22—25℃ 条件下, 每天光照 12.5 小时, 光强 2200—2500 lx 的培养室里培养, 经 15—20 天便可形成 20—30 个生长良好的苗丛, 供诱导结薯试验。

2. 试管结薯的诱导

结薯的基本培养基是 MS+500 mg/l CCC+5.0 mg/l BAP+8%蔗糖。pH5.6—5.8。在此基础上设计用不同浓度的香豆素 (0, 50, 100, 150, 250 mg/l); 不同浓度的黑节草寡糖素和人参寡糖素各 0, 10, 50 mg/l 取代基本结薯培养基中的 CCC。在无菌条件下将增殖好的苗丛内的培养基换成结薯的培养基, 培养温度在 22—25℃, 光照 400 lx, 培养 2 周后, 自发现第一个小薯形成开始每 7—9 天记录统计每瓶结薯增加数直至收获。每种处理重复 10 瓶以上。

3. 过氧化物酶同工酶、过氧化物酶活性的测定

取各种处理诱导的薯块材料各 0.1g+1.5 ml Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液在冰浴上匀浆, 在冰冻离心机 4℃ 以 4000 转/分离心 15 分钟, 8000 转/分离心 20 分钟, 取上清

液测过氧化物酶活性和过氧化物酶同工酶。

过氧化物酶活性测定按文献^[5]的方法, 取上述酶液 0.2 ml, 加入反应混合液 3 ml, 摇匀, 立即计时, 用岛津 UV-120-02 型分光光度计在 470 nm 处比色, 连续读取 3 分钟内光密度变化值。以缓冲液为对照。

过氧化物酶同工酶测定采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板型电泳, 按文献^[6]的方法稍加改良, 不连续凝胶系统, 浓缩胶浓度 2.5%, 分离胶浓度 7.5%, pH8.3 的 Tris-Gly 缓冲液。过氧化物酶同工酶用联苯胺染色法, 照相并绘图。

结果和讨论

1. 不同浓度的香豆素、寡糖素对试管结薯的影响

分别以不同浓度的香豆素; 人参寡糖素 (OP); 黑节草寡糖素 (OD) 加入 MS+5.0 mg/l BAP+8%蔗糖的诱导结薯培养基中, 以前述 3 个品种为试验材料, 培养出现第一个薯块后 4—6 周, 收获薯块。与同样条件下用 500 mg/l CCC 作为诱导因子所得的薯块数量作比较, 结果见表 1 和表 2。

3 个品种的供试材料表明: 香豆素 (Coum) 50—150 mg/l 均能促进无病毒马铃薯试管薯的形成。在 Coum100 mg/l 的浓度时, 3 个品种的结薯数与用 CCC500 mg/l 处理所得的结薯数十分接近。

表 1 香豆素和矮壮素对试管薯形成的影响 (块茎数/瓶)

Table 1 Influence of coumarin and CCC on *in vitro* tuberization (tuber No. / flask) .

Genotype	CCC(mg/l)		Coum(mg/l)			
	500	0	50	100	150	250
W	13.6	2.1	8.8	13.4	8.2	4.2
I	8.2	1.0	7.4	8.9	6.8	2.3
AB	9.8	1.3	8.4	9.7	7.9	3.0

表 2 寡糖素和矮壮素对试管薯形成的影响 (块茎数/瓶)

Table 2 Influence of oligosaccharin and CCC on *in vitro* tuberization of potato (tuber No. / flask).

Genotype	CCC(mg/l)		OP(mg/l)		OD(mg/l)	
	500	0	10	50	10	50
W	13.6	0	4.5	15.3	13.8	5.5

寡糖素对试管薯的形成具有比香豆素更好的效果, 从表 1 和表 2 可知人参寡糖素 (OP) 50 mg/l 诱导效果明显超过 CCC500 mg/l 和 Coum100 mg/l, 黑节草寡糖素 10 mg/l 时略超过 CCC500 mg/l 和 Coum100 mg/l 的效果。寡糖素在诱导块茎上的此种效果在国内外尚未见报道。

另外, 在每 7—9 天薯块形成数量的观察中发现, 香豆素和寡糖素诱导的薯块在培

养的 25—30 天是薯块猛增阶段, 而矮壮素诱导薯块的猛增阶段大约在 30—38 天。在缩短诱导期的效果上, 香豆素、寡糖素优于矮壮素。

2. 过氧化物酶活性

矮壮素是通过对抗赤霉素生物合成而对生长起作用的植物生长调节剂, 前人的实验和本实验均证明了它可促进试管薯的形成, 但机制不明, 有人认为它是植物的第二信使, 最终可引起激素相应的效应⁽⁷⁾。香豆素属于酚类抑制剂, 它对生长的抑制作用归因于吲哚乙酸氧化酶活性的增高。香豆素与吲哚乙酸对过氧化物酶具有竞争作用⁽⁸⁾。目前普遍认为植株的过氧化物酶活性与植株的生长呈负相关⁽⁹⁾。从表 3 和诱导实验可知, 随着外源香豆素浓度的增大, 马铃薯块茎的过氧化物酶活性也相应增大。超过 100 mg/l 以后, 对薯块的形成有抑制作用。超过 250 mg/l 以后, 植株发黄, 枯萎甚至死亡。值得注意的是起到诱导薯块的较好效果的不同调节剂的不同浓度如 Coum100 mg/l, CCC500 mg/l, OP50 mg/l, OD10 mg/l, 其过氧化物酶的活性几乎是相等的 (均在 21 左右)。

表 3 不同生长调节剂诱导薯块(W 品种)的过氧化物酶活性测定

Table 3 Measurement of activity of peroxidase *in vitro* tubers of W species induced by different regulators.

CCC(mg/l)		Coum(mg/l)			OP(mg/l)		OD(mg/l)	
500	0	100	150	250	10	50	10	50
过氧化物酶活性(peroxidase activity) ($\Delta A_{470} / \text{min} \cdot \text{gFW}$)								
21.12	18.32	20.25	29.81	34.88	24.32	20.82	20.57	21.07

3. 过氧化物酶同工酶

从图 1 所示, 不同品种的马铃薯植株的过氧化物酶同工酶谱带是不同的, 这是品种的特异性所造成。在 AB 品种块茎的同工酶谱中可看到有着较好效果的 Coum100 的酶谱几乎和 CCC500 的相同。不同浓度 Coum 诱导的薯块是在开始结薯后 50 天左右取下分析的。如 Coum70 和 Coum100, Coum150 处理的同工酶谱极为相似, 而 Coum250 的酶谱差异较大, 诱导效果也较差。

图 2 是另一批诱导材料在开始结薯后 40 天左右取下分析的, 其酶谱与图 1 不同, 表现出不同诱导时期的差异, 但同一批诱导的特别是不同生长调节剂在诱导效果较好的浓度, 其谱带图差异也不大。同工酶谱上区带的显色深浅可反映酶活性的相对量, 这和酶活性的测定有一致性。这可能说明体内的 IAA 被外源生长调节剂调到某一恰当值的范围, 而 IAA 这一恰当值正是靠具有相应酶谱的过氧化物酶同工酶和相应的总酶活性来维持的。

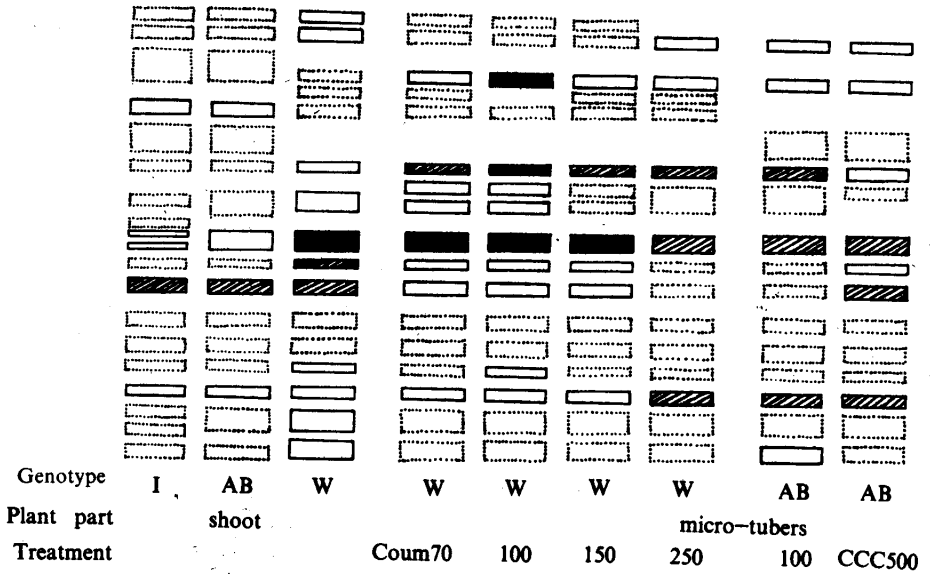


图 1 不同生长调节剂处理诱导的薯块的过氧化物酶同工酶谱

Fig. 1 Peroxidase isozyme spectrum of tubers induced under different regulator treatments.

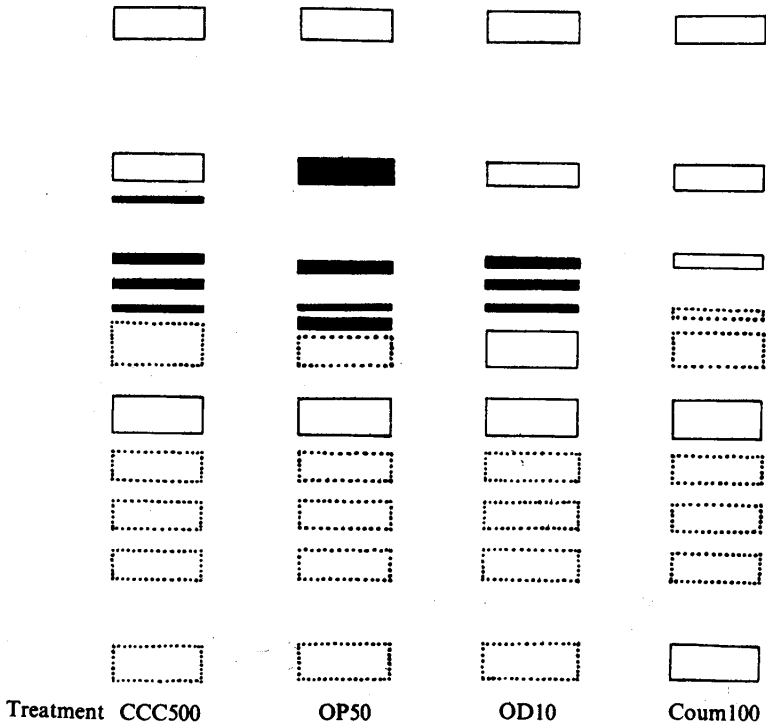


图 2 不同生长调节剂处理诱导的同一品种 (W) 的薯块的过氧化物酶同工酶谱

Fig. 2 Peroxidase isozyme spectrum of tubers of the same species (W) induced under different regulators.

马铃薯薯块的形成可说是植物体适应其诱导培养基的条件而作用体内酶系统和代谢过程, 导致特定基因表达的结果。

本研究表明香豆素和寡糖素在使用浓度适当时, 对诱导马铃薯试管结薯有肯定的作用。这些生理活性物质在马铃薯无病毒种薯生产上的应用, 有进一步研究和开发的必要。

致谢 中国科学院昆明植物研究所王世林先生提供寡糖素样品。云南大学生物系张迦德同志绘图, 何淑清、黄勇、李天星同志参加部分工作。

参考文献

- 1 Dodds J H, Tovar P, Chandra R. et al. Improved methods for *in vitro* tuber induction and use of *in vitro* tubers in seed program. Proceedings: Symposium on Improved Potato Planting Material. Asian Potato Association, 1988: 49—64.
- 2 Pilar Tovar, Rolando Estrada, Lieselotte Sckildo Rentschler et al. Induction and Use of *In Vitro* Potato Tubers. International Potato Center, 1985: 13(4): 1—5
- 3 王克夷. 寡糖素——一类新的植物调节分子. 植物生理学通讯 1989; (4): 56—58
- 4 丁宝莲, 沈曾佑, 张志良等. 烟草叶肉细胞壁过氧化物酶同工酶的研究. 植物生理学报 1982; 8(2): 127—132
- 5 华东师大生物系植物生理室. 植物生理学实验指导. 上海: 人民教育出版社, 1980: 143—144
- 6 吴少伯. 植物组织中的蛋白质及同工酶——聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳. 植物生理学通讯 1979; (1): 30—31
- 7 亨逊斯坦恩 K H. 南京农业大学园艺系. 植物激素的应用与钙调素研究进展. 南京: 南京农业大学出版社, 1990: 4—5
- 8 李宗霆. 植物生长物质. 广州: 华南师范大学出版社, 1985: 20—22
- 9 梅慧生. 植物同工酶研究的某些进展. 植物生理学通讯 1981; (3): 1—7