

马铃薯块茎休眠及萌发过程中几种酶活性变化

王 鹏, 连 勇, 金黎平

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以马铃薯脱毒试管薯为试验材料, 研究块茎休眠和块茎顶芽萌发生长过程中几种相关酶活性变化。结果表明, 块茎贮藏过程中淀粉酶、淀粉磷酸化酶、过氧化物酶和多酚氧化酶活性的消长, 与块茎形态上的休眠及萌发有密切关系。处于休眠期间的块茎内淀粉酶和淀粉磷酸化酶活性很低, 随着休眠的解除及顶芽萌动活性逐渐增强, 当顶芽开始生长时活性再次降低; 过氧化物酶和多酚氧化酶在块茎休眠时活性较高, 顶芽萌动后活性迅速下降; 不同品种间这四种酶的变化趋势基本相同。

关键词: 马铃薯; 块茎; 休眠; 酶活性

中图分类号: S632.01 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2003)01- 0033- 04

The Research on the Regulation of Enzymes During Dormancy and Dormancy Releasing

WANG Peng, LIAN Yong, JIN Li ping

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: By analysis of the enzymes related to dormancy, it was found that activities of amylase and activities of amylophosphorylase in dormant microtubers were much lower than these in dormant released tubers. It can be concluded that energy was supplied by activating the amylase and amylophosphorylase during dormancy release. Peroxide activity was much higher in dormant microtubers than that in dormant released tubers. High active Peroxidase can reduce the concentration of IAA. Dormancy and dormancy releasing could be regulated by peroxidase since high active peroxidase reduced concentration of IAA which affected tuber dormant releasing. The results also showed polyphenol oxidase activity was higher in dormant microtubers than that in dormant released tubers. Polyphenol oxidase activity decreased lightly during dormancy breaking of potato microtubers. It inferred that polyphenol oxidase regulated the respiration metabolism during potato tuber dormancy as it was the enzyme related to respiration.

Key words: Potato; Tuber; Dormancy; Activities of enzyme

在栽培中块茎作为种薯时, 休眠程度影响着田间出苗的早晚、出苗率、整齐度、植株长势和产量形成过程等, 最终关系到产量的高低。在块茎作为食品和加工原料时, 休眠解除会造成水分、养分大量消耗, 以至丧失应用价值。由于对块茎休眠机理了解的欠缺, 人工调控技术发展缓慢, 严重制约了马铃薯种薯生产的发展和块茎作为工业加工原料的充分利用。因此, 研究块茎休眠的机理, 对于马铃薯栽培和储藏保鲜等具有十分重要的意义。酶是影响代谢的

基本因素, 是活细胞内能催化生化反应的生物催化剂, 酶的活性变化是植物体生理活性变化的具体反映, 它决定着生化过程的速度和方向, 细胞的全部动力都决定于酶的存在。新收获的块茎在整个贮藏期, 从休眠到休眠解除、顶芽萌发生长, 要经过一系列的物质分解和合成, 期间都是在相应酶的作用下引起的各种变化, 块茎休眠与发芽和酶活性变化具有密切的关系^[1]。本文通过对块茎休眠和块茎顶芽萌发生长过程中淀粉磷酸化酶、淀粉酶、过氧化物酶

收稿日期: 2002- 10- 02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070524)

作者简介: 王 鹏(1974-), 男, 在读博士, 主要从事硝酸还原酶基因及启动子的克隆及功能分析研究工作。

和多酚氧化酶活性分析, 试图阐明这些酶在块茎休眠调控中作用, 为进一步深入研究马铃薯块茎休眠机理, 提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以马铃薯早熟品种中薯3号和中晚熟食品加工品种大西洋脱毒试管薯为供试材料, 试管薯诱导采用连勇^[2]的方法。分别于采收当日, 冷藏30 d, 芽眼萌动凸起(中薯3号冷藏60 d、大西洋105 d), 微芽出现(中薯3号冷藏75 d、大西洋120 d), 萌发芽长至2 mm(中薯3号冷藏90 d、大西洋135 d), 芽长1 cm以上(中薯3号冷藏120 d、大西洋150 d)等6个时期取样, 测定各种酶活性。试管薯冷藏条件为4℃、黑暗。

1.2 酶活性测定

1.2.1 淀粉磷酸化酶活性测定参照张志良等^[3]的方法 取各时期块茎样品1 g 冰浴研磨, 浸泡2 h提取酶液。酶活性测定: 取0.5 mol/L pH 6.0的柠檬酸缓冲液0.2 mL, 5%可溶性淀粉溶液0.2 mL, 酶提取液0.05 mL, 水0.45 mL, 以0.1 mol/L葡萄糖-1-磷酸0.1 mL作反应底物, 30℃条件下反应10 min, 加5%三氯醋酸0.5 mL终止反应, 离心除去沉淀, 取上清液在660 nm波长下测无机磷含量, 根据淀粉磷酸化酶标准曲线(图1)换算酶活性。

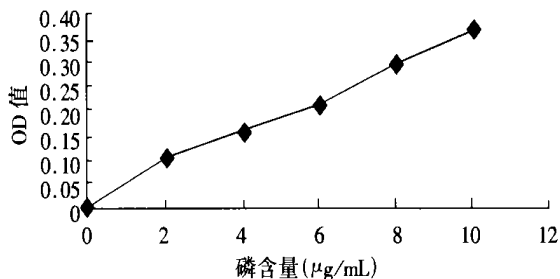


图1 淀粉磷酸化酶标准曲线图

1.2.2 淀粉酶活性测定参照门福义等^[4]的方法

取各时期块茎样品1 g, 于2 mL 0.2 mol/L pH 5.6的柠檬酸缓冲液中, 常温下研磨, 40℃水浴中1 h提取酶液, 活性测定采用DNS法, 于波长520 nm下测吸光值, 根据标准曲线(图2)换算酶活性, 淀粉酶总活性: 麦芽糖 mg/(g·h) = (C组麦芽糖 mg/mL - B组麦芽糖 mg/mL) × 样品稀释倍数/样品重(g) × 作用时间(h)。

1.2.3 过氧化物酶活性测定参照朱广廉^[5]的方法

取各时期块茎样品1 g, 于20 mmol/L KH_2PO_4 中研

磨, 4 000 r/min离心15 min提取酶液, 以 $A_{470}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 蛋白质表示酶活性。

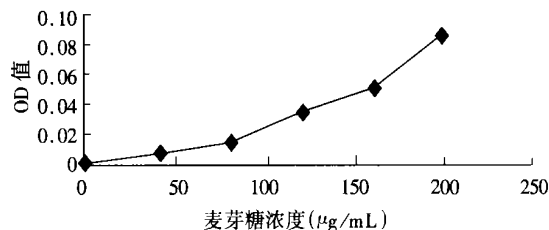
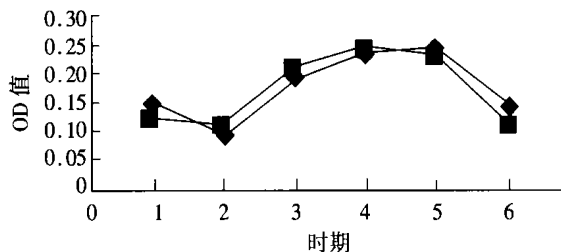


图2 淀粉磷酸化酶标准曲线图

1.2.4 多酚氧化酶活性参照毕玉蓉等^[6]的方法测定 块茎样品按1:1(W/V)比例与0.03 mol/L磷酸缓冲液(内含0.02 mol/L巯基乙醇, 0.001 mol/L EDTA, 5%甘油, 1%的聚乙烯吡咯酮(pH为6.0)混合, 冰浴研磨, 4℃下10 000 r/min离心10 min提取酶液。取含有0.05 mol/L的邻苯二酚的pH 5.8柠檬酸-磷酸缓冲液1 mL, 酶液0.1 mL混合反应, 410 nm下测光密度换算酶活性。

2 结果与分析

2.1 淀粉磷酸化酶活性变化



1. 采收当日; 2. 冷藏30 d; 3. 芽眼萌动凸起时; 4. 微芽出现时; 5. 萌发芽长至2 mm时; 6. 顶芽长1 cm以上(下同)

图3 淀粉磷酸化酶活性变化曲线

测定结果表明, 刚收获的块茎内源代谢仍在持续中, 淀粉磷酸化酶仍很活跃; 随着贮藏时间的延长块茎逐渐进入深度休眠状态^[7], 内源代谢近于停滞, 能量的消耗降至最低点, 此时淀粉磷酸化酶活性变化曲线逐渐下降至谷底; 伴随休眠的解除和顶芽萌动, 酶活性逐渐增强, 当块茎完全解除休眠后淀粉磷酸化酶活性达到最高峰值(图3)。随着芽的不断伸长和块茎萎蔫, 植株代谢中心由块茎向茎叶转移, 块茎内淀粉磷酸化酶活性逐渐降低。在块茎休眠到再次萌发生长过程中, 不同品种间的淀粉磷酸化酶活性变化趋势基本相同, 这种变化主要与块茎的生理状态有关。块茎休眠时需要能量少, 磷酸化酶活性低; 块茎萌动需要大量能量的支持时, 磷酸化酶活性

增加, 促进能源释放。

2.2 淀粉酶活性变化

刚收获和处于休眠期间的块茎淀粉酶活性很低, 几乎无变化; 块茎顶部芽眼有小白点出现即将通过休眠时淀粉酶才开始活跃, 随着芽的萌动生长, 淀粉酶的活性逐渐增强, 当块茎顶芽长至 1 mm 左右时, 淀粉酶活性达到最高峰值; 之后随着芽的继续生长, 块茎内淀粉酶活性逐渐下降(图 4)。淀粉酶的作用是把不可利用的淀粉分解成可利用态的糖, 在块茎萌发和芽初始生长时的异养阶段提供碳营养和能量, 当淀粉分解作用完成后芽生长逐渐进入自养, 淀粉酶活性必然下降。

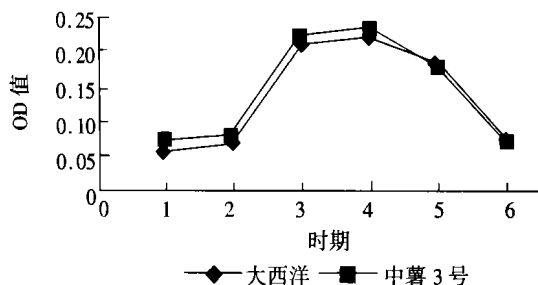


图 4 淀粉酶活性变化曲线

2.3 过氧化物酶活性变化

从图 5 过氧化物酶活性变化曲线上可以看出, 块茎休眠时过氧化物酶活性较高, 顶芽萌动后酶活性迅速下降。过氧化物酶是 IAA 侧链氧化酶, 其作用是控制 IAA 的浓度^[8]。块茎休眠时过氧化物酶活性高, IAA 含量减少促使块茎处于休眠状态; 块茎萌动和芽生长时过氧化物酶活性降低, IAA 含量增加促进萌发和生长。

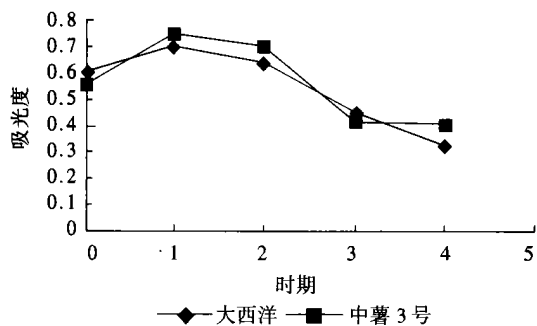


图 5 过氧化物酶活性变化曲线

2.4 多酚氧化酶活性变化

如图 6 所示, 多酚氧化酶仅在块茎休眠时活性较高, 顶芽萌动后酶活性迅速下降。多酚氧化酶是块茎休眠期间分生组织呼吸作用的末端氧化酶系统^[6], 块茎休眠时生理代谢主要是呼吸作用, 但是呼

吸作用弱, 此时多酚氧化酶活性较强; 块茎萌动生长时多酚氧化酶活性趋于平稳。

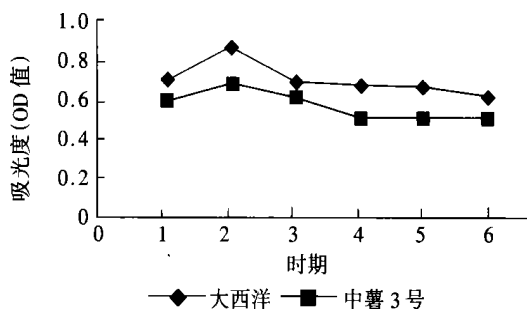


图 6 多酚氧化酶活性变化曲线

3 讨论

磷酸化酶的作用是促进能源释放反应的磷酸代谢, 淀粉酶是水解酶。本试验的测试结果表明, 在块茎休眠期淀粉磷酸化酶及淀粉酶活性较低, 深度休眠时活性下降到最低值; 随着休眠的解除两种酶活性加强, 尤其淀粉酶活性在芽萌动时迅速增强; 待块茎顶芽继续生长时其活性又逐渐下降。这是因为在块茎休眠时体内的各种生理代谢活动很低, 需要能量少, 淀粉磷酸化酶及淀粉酶活性相对较低; 解除休眠时随着块茎细胞内各种生理活动的启动和加强, 需要水解淀粉获得大量的糖及能量, 供应细胞的糖代谢和磷代谢, 因此淀粉磷酸化酶及淀粉酶活性加强, 以满足发芽生长的需要; 当块茎完全解除休眠开始生长后, 芽的生长逐渐由自养型转向异养型, 块茎内淀粉磷酸化酶及淀粉酶完成使命, 其活性必然逐渐下降和消失。说明淀粉磷酸化酶和淀粉酶活性的增加可能是块茎休眠觉醒的标志之一。

过氧化物酶是 IAA 侧链氧化酶, 其作用在于控制 IAA 的浓度^[8], 过氧化物酶活性高使 IAA 含量降低, 过氧化物酶活性低则 IAA 含量增加, IAA 促进打破块茎的休眠。这与本试验结果吻合, 处于休眠状态块茎内过氧化物酶活性较高, 块茎萌动后活性逐渐降低。过氧化物酶可能是调控马铃薯块茎休眠的关键酶之一。

多酚氧化酶是与呼吸代谢有关的酶。块茎解除休眠后多酚氧化酶活性降低, 即使再继续强制休眠活性也很低, 遇不良环境发生二次生长时、以及 GA₃ 等人工打破休眠时, 多酚氧化酶活性都降低^[9]。本试验也得到同样的结果, 块茎休眠时多酚氧化酶活性较高, 说明多酚氧化酶可能是块茎休眠时呼吸系统主要起作用的酶。当块茎休眠结束时多酚氧化酶

的活性降低,可能此时有其他酶系统参与了呼吸作用。说明块茎的休眠与多酚氧化酶活性紧密相关。

马铃薯块茎休眠及休眠解除是一个极为复杂的生理过程,有关块茎休眠机理至今仍没有一个令人信服的解释。酶的活性变化是植物体生理活性变化的具体反映,从本研究的结果看,上述这些酶可能和马铃薯块茎休眠及解除休眠的调控有着密切的关系,有报道认为抗坏血酸氧化酶参与或细胞色素氧化酶也参与了休眠解除的呼吸代谢过程^[9],这些酶受何种机制诱导而起作用的目前仍不清楚,仅为解读马铃薯块茎休眠机理提供参考。

参考文献:

- [1] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 55-60.
- [2] 连 勇. 马铃薯脱毒种薯生产技术[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001. 44-53.
- [3] 张志良. 植物生理实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [4] 门福义, 刘孟芸. 马铃薯栽培生理[M]. 北京: 中国农业出版社.
- [5] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990. 37-39.
- [6] 毕玉蓉, 梁厚果. 烟草愈伤组织多酚氧化酶研究[J]. 实验生物学报, 1988, 21(3): 257-263.
- [7] Lian Yong, Xu Xu-han, Henk Kieft, *et al.* Dormancy of Potato Tubers: An Immuno-Analysis of DNA Synthesis, Zhu Dewei convenors. International symposium on biotechnology application in horticultural crops [M]. Beijing: China Agricultural Sciotech Press, 2000. 263-271.
- [8] 武禄光. 过氧化物酶在色木槭种子休眠向萌发转变中的作用[J]. 东北林业大学学报, 1987, 15(6): 8-14.
- [9] Siegel M R, Sisler H D. Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I. Effect of the antibiotic on cellular metabolism [J]. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1964, 81: 70-82.