魏灵敏,段延碧,龙雯虹,等. PP_{333}处理对休眠期山药珠芽内源激素的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(2):81 – 84.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2018.02.022

PP_{333} 处理对休眠期山药珠芽内源激素的影响

魏灵敏[1], 段延碧[2], 龙雯虹[1], 张雪梅[3], 孟金贵[1]
(1. 云南农业大学园林园艺学院,云南昆明 650201; 2. 云南农业大学农科实验教学示范中心,云南昆明 650201;
3. 云南农业大学农学与生物技术学院,云南昆明 650201)

摘要:以采收 60 d 的牛尾山药珠芽为试材,分别用浓度 5、25、45、65、85 mg/L 的 PP_{333}溶液将珠芽浸泡后,用酶联免疫测定法(ELISA)测定珠芽异戊烯基腺苷(iPA)、玉米素核苷(ZR)、二氢玉米素核苷(DHZR)、赤霉素(GA_3)4 种内源激素的含量,并分析这 4 种内源激素比值及相关性。结果表明:GA_3 在珠芽的休眠期至生长期起着双重作用,即休眠期抑制珠芽萌发、生长期促进珠芽生长;ZR 含量在休眠期至生长期始终远高于 DHZR、GA_3 和 iPA 的含量;在休眠期 GA_3 促进珠芽休眠的进程,ZR 克服萌发抑制的因子并解除休眠,珠芽的休眠和萌发主要由 ZR 和 GA_3 含量的平衡和拮抗来调控;PP_{333}能提高萌芽期珠芽 ZR 含量,并降低休眠期珠芽 GA_3 含量,用 85 mg/L PP_{333}处理珠芽可以使珠芽提前 7 d 破除休眠。

关键词:山药;珠芽;酶联免疫;多效唑;内源激素;破眠
中图分类号: S632.101　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2018)02 – 0081 – 04

山药(*Dioscorea opposita*)是我国大众化菜药兼用的滋补食品,药用价值高,有健脾、固精、补肺、益肾的功能[1]。生产上用茎段进行繁殖,繁殖系数低,生产成本高。赵冰等对山药栽培特性进行观测,发现只有用珠芽对山药进行更新复壮,才可解决山药长期栽培后出现种性退化的问题,但珠芽发芽需数月之久,影响生产上的适时播种[2]。

通常认为,休眠由内源激素控制,休眠的起始、终止和调控以及休眠阶段的各层次变化均受激素调节[3]。前人对山药珠芽的激素调控进行了一定的研究,龙雯虹等探索出用多效唑针刺珠芽中部可促进珠芽发芽,并用不同浓度的多效唑和矮壮素水溶液处理不同休眠期的山药珠芽,证明了 1 ~ 10 mg/L 多效唑水培能显著打破采后 60 d 的珠芽休眠[4];在此基础上,王军民等用多效唑和氯吡脲配施对山药珠芽及中后期长势的影响进行了相关研究[5];苗丽娟等发现 2% 和 5% 的双氧水促进收获后 60 d 的珠芽提早出芽[6];另外,龙雯虹等分别测定了不同生长阶段的山药珠芽内源激素 IAA、ZR、DHZR、GA_3 和 ABA 的含量,探讨了 GA_3/ABA 的比值变化,发现生长期 ZR 的含量变化大,且 GA_3 含量较高[7],并对珠芽休眠期内源激素含量做了相关研究,证明珠芽发芽需要 GA_3 含量降低和 ZR 含量升高,PP_{333}使 GA_3 含量下降速度加快,缩短了珠芽的休眠期[8]。

前人用 10 mg/L 的 PP_{333}处理珠芽后对内源激素 GA_3 的含量进行了测定[8],但仍不能解释 PP_{333}等生长抑制剂对休眠期珠芽效应不同的现象。同时,珠芽的休眠是由萌发抑制物和生长促进物间的平衡所决定,为此该研究测定了不同浓度 PP_{333}处理后休眠期珠芽的赤霉素(GA_3)、细胞分裂素异戊烯基腺苷(iPA)、玉米素核苷(ZR)和二氢玉米素核苷(DHZR)含量变化,并对激素间的平衡关系进行了探讨,旨在探索出休眠期珠芽内源激素的变化规律及对多效唑的响应,为将来研究对珠芽进行外源激素的调控打下基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

牛尾山药种苗来源于云南省禄丰县,选取当年无病虫害、饱满的山药珠芽为试验材料。

1.2　PP_{333}处理山药珠芽

将收获后放于室内 60 d 的珠芽用多菌灵 500 倍液浸泡 10 min 后用清水洗净,擦干珠芽表面水分,用 5、25、45、65、85 mg/L PP_{333}溶液浸泡珠芽 24 h 后,取出珠芽装于培养皿,用湿润蛭石培养。以蒸馏水处理作对照,每处理 100 粒珠芽,重复 3 次。每隔 7 d 随机各取 5 粒珠芽,切碎混匀后置入液氮中冷冻 15 min 后,放入 – 20 ℃ 冰箱以备测定内源激素 iPA、ZR、DHZR、GA_3 的含量,取样直到珠芽发芽为止。

1.3　内源激素含量测定

激素的提取方法:称取样品 0.5 ~ 1.0 g,在弱光和冰浴条件下,加入 2 mL 80% 甲醇提取液(含 1 mmol/L 二叔丁基对甲苯酚)研磨成浆,转入离心管中,再用 3 mL 提取液洗研钵 3 次,4 ℃ 提取 4 h,其间手动摇离心管数次;4 h 后 4 ℃ 下 3 500 r/min、离心 8 min,取上清液转入 10 mL 定容瓶中,剩下残渣用 3 mL 提取液 4 ℃ 下提取 1 h,离心后取上清液转入 10 mL 定容瓶中,将剩下残渣用 2 mL 提取液提取、离心,合并所有上清液,定容至 10 mL,即得激素提取液。

激素的测定方法:取 1 mL 提取液 – 氮气吹干 – 样品稀释液溶解 – 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定激素,测定方法和

收稿日期:2016 – 08 – 18
基金项目:国家自然科学基金(编号:31460322);云南农业大学研究生科技创新项目(编号:2015ykc32)。
作者简介:魏灵敏(1991—),女,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事野生植物资源保护与利用研究。E – mail:754945007@qq.com。
通信作者:龙雯虹,副教授,主要从事薯蓣资源的评价与利用研究。E – mail:lwh57@sina.com。

试剂盒由中国农业大学化控中心提供。

1.4　数据处理

试验数据采用 Excel 软件和 SPSS 软件进行处理和分析。

$$内源激素含量(ng/g)=\frac{N\cdot V_2\cdot V_3\cdot B}{V_1\cdot W}。$$

式中:N 为测定浓度;V_2 为提取液总体积;V_3 为定容稀释液体积;B 为稀释倍数;V_1 为真空浓缩上清液体积;W 为植物样品鲜质量(g)。

2　结果与分析

2.1　休眠期至生长期内源激素含量变化

如图 1 所示,GA_3 和 ZR 含量变化呈现“下降—上升—下降—上升”的趋势,iPA 和 DHZR 含量经历了 2 个波峰后,最后均呈现出上升的趋势。至培养 7 d 时,DHZR、ZR 和 iPA 的含量均出现下降;在 7 ~ 21 d 时,ZR 和 GA_3 含量呈现急速的下降趋势,iPA 和 DHZR 含量则经历了 1 个波峰,且在 21 d 时,iPA 和 DHZR 含量与它们最开始的激素水平相持平;在休眠后期(21 ~ 35 d),GA_3 含量随着休眠的深入而不断升高,DHZR、ZR 和 iPA 的含量呈波动式上升;在萌芽期(35 ~ 42 d),除 iPA 含量上升外,其他激素含量均下降到最低值;在生长期(42 ~ 56 d),4 种激素含量表现出明显的上升趋势,且在 56 d 均达到了峰值;ZR 含量在整个休眠期至生长期始终远高于 DHZR、GA_3 和 iPA 的含量。

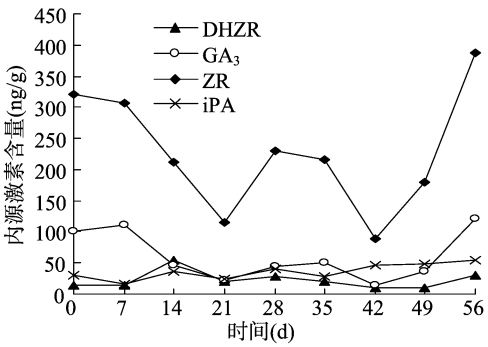


图1　未经PP_{333}处理的山药珠芽休眠期至生长期内源激素含量的变化

2.2　休眠期至生长期内源激素含量比值的动态变化

如图 2 所示,在休眠期(0 ~ 35 d),iPA/GA_3、DHZR/GA_3 和 ZR/GA_3 比值呈现“下降—上升—下降”的趋势;在萌芽期(35 ~ 42 d),iPA/GA_3、DHZR/GA_3 和 ZR/GA_3 比值均呈现上升的趋势,其中 iPA/GA_3 比值上升最为明显,由此可知,培养 35 ~ 42 d 时 GA_3 含量的下降,促使 iPA/GA_3、DHZR/GA_3 和 ZR/GA_3 的比值回升,促进了休眠的解除。在生长期(42 ~ 56 d),随着 GA_3 含量的快速上升,激素间的比值则快速下降。

在休眠期至生长期,GA_3 与 iPA 含量呈正相关,相关系数是 0.574;ZR 与 GA_3 含量呈显著正相关,相关系数是 0.894;ZR 与 iPA、iPA 与 DHZR、ZR 与 DHZR、GA_3 与 DHZR 含量均呈不相关,表明它们之间关系不紧密。

2.3　PP_{333}处理后内源激素含量的动态变化

如图 3 所示,DHZR 含量在培养 14 d 达到高峰,但随后迅速下降,在 21 ~ 35 d DHZR含量有较小的起伏;在 35 ~ 42 d

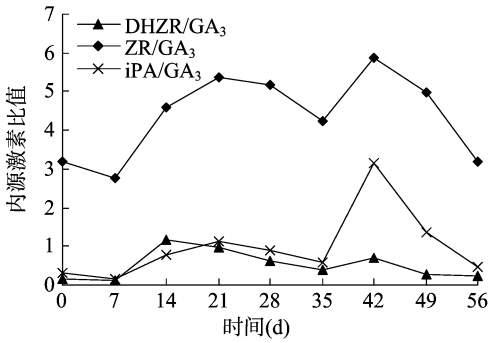


图2　未经 PP_{333} 处理的山药珠芽休眠期至生长期内源激素含量比值的变化

时,85 mg/L PP_{333}处理呈现大幅度的上升,且高于其他处理的含量,这一阶段其他处理没有明显变化。方差分析表明,相同浓度的处理在不同时期珠芽 DHZR 含量差异极显著(F = 4.741,P = 0.000 < 0.01);同时期不同浓度处理间 DHZR 含量差异不显著。

在 PP_{333}处理 0 ~ 7 d,45 ~ 65 mg/L 的 PP_{333}处理 ZR 含量呈现上升趋势,其余处理则呈现下降趋势;在休眠中期(7 ~ 21 d),除 85 mg/L PP_{333}处理经历了 1 个波峰外,这一阶段其他处理则急速下降至最低值;在萌芽期(35 ~ 42 d),45 mg/L PP_{333}和 85 mg/L PP_{333}处理呈现大幅度的上升,这一阶段其他处理表现为下降趋势;在休眠破除时(42 d),所有处理的含量均高于对照,说明 PP_{333}对 ZR 含量有一定的促进作用。方差分析表明,相同浓度的处理在不同时期珠芽的 ZR 含量差异极显著(F = 11.825,P = 0.000 < 0.01);同时期不同浓度处理间 ZR 含量差异不显著。

经 PP_{333}处理过的珠芽 iPA 含量在休眠中期(7 ~ 21 d)表现为“低浓度促进、高浓度抑制”的趋势;在萌芽期(35 ~ 42 d),所有处理均呈现大幅度的上升。方差分析表明,同时期不同浓度处理间 iPA 含量差异不显著;相同浓度处理在不同时期珠芽的 iPA 含量差异显著(F = 2.561,P = 0.017 < 0.05)。

经 5 ~ 65 mg/L PP_{333}处理的珠芽 GA_3 含量在 0 ~ 21 d 均表现下降趋势,这可能是因为 PP_{333}的作用机理是抑制植物内部 GA_3 的产生。在休眠后期(21 ~ 35 d),5 ~ 65 mg/L PP_{333}的处理均经历了 1 个波峰,对照在这一阶段持续上升;在萌芽期(35 ~ 42 d),GA_3 保持低含量水平;在生长期(42 ~ 56 d),全部处理 GA_3 含量呈现快速的上升趋势。方差分析表明,相同浓度的处理在不同时期珠芽的 GA_3 含量差异极显著(F = 7.019,P = 0.000 < 0.01);同时期不同浓度处理间 GA_3 含量差异不显著。

2.4　PP_{333}处理后内源激素间比值的动态变化

如图 4 所示,各处理的激素比值变化趋势基本一致,在培养 0 ~ 21 d 时,DHZR/GA_3、iPA/GA_3 和 ZR/GA_3 的比值均出现大幅度上升;在休眠中期(21 ~ 35 d),4 种激素之间比值继续下降,由于生长促进类激素 iPA、DHZR 含量下降到较低水平,GA_3 含量此时呈现缓慢上升的趋势,使得 DHZR/GA_3、iPA/GA_3 比值基本小于 1,此时 ZR/GA_3 的比值呈现先下降后上升的趋势,为珠芽的萌发做准备;在萌芽期(35 ~ 42 d),GA_3 含量缓慢下降,使 DHZR/GA_3 和 iPA/GA_3 的比值有回升趋势;在生长期(42 ~ 56 d),DHZR/GA_3、iPA/GA_3 和 ZR/GA_3

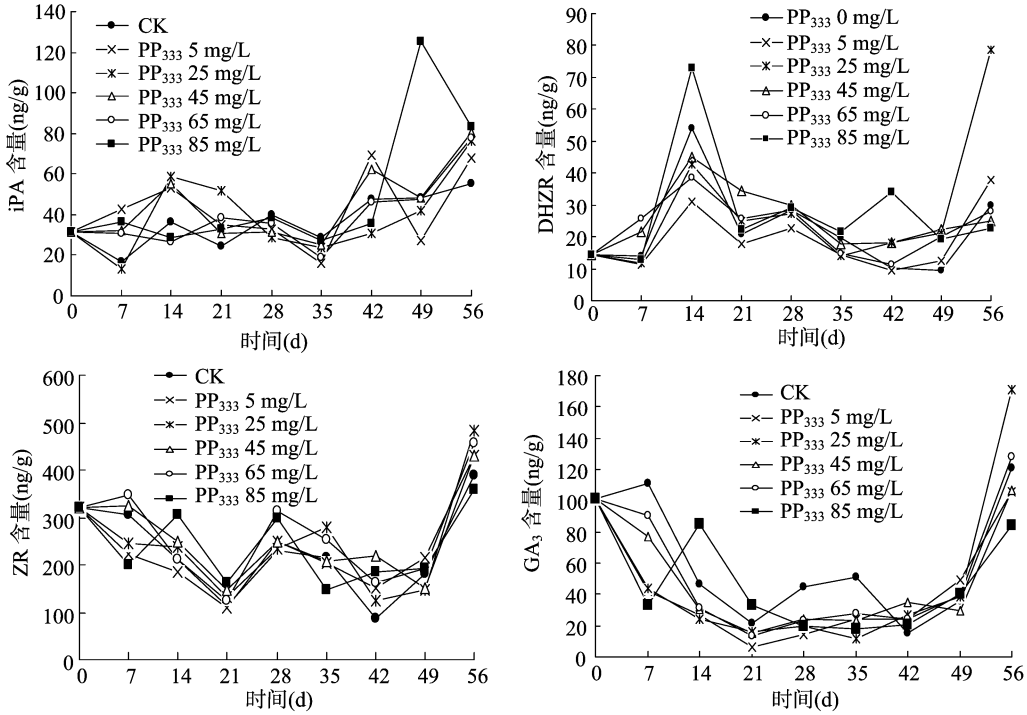


图3　PP_{333} 处理后内源激素含量的动态变化

的比值均表现出不同程度的下降趋势，这可能是生长期间 GA_3 含量远高于 ZR、iPA、DHZR 的含量而导致的结果。

珠芽激素（iPA + ZR + DHZR）/GA_3 的比值在休眠期至生长期经历了 2 个波峰，在休眠期（0 ~ 28 d），所有处理均呈上升趋势，而在处理 14 ~ 21 d 85 mg/L PP_{333} 处理（iPA + ZR + DHZR）/GA_3 比值低于其他处理的比值，在处理 42 d 时，85 mg/L PP_{333} 处理比值远高于其他处理。由此可知，PP_{333} 在休眠期能促进细胞分裂素含量的增加，以 85 mg/L PP_{333} 处理的效果最为明显，其他浓度 PP_{333} 处理的激素比值则与对照的比值差异不显著。

3　结论与讨论

3.1　内源激素与珠芽休眠萌发的关系

该试验结果表明，iPA含量变化与山药珠芽的发育过程

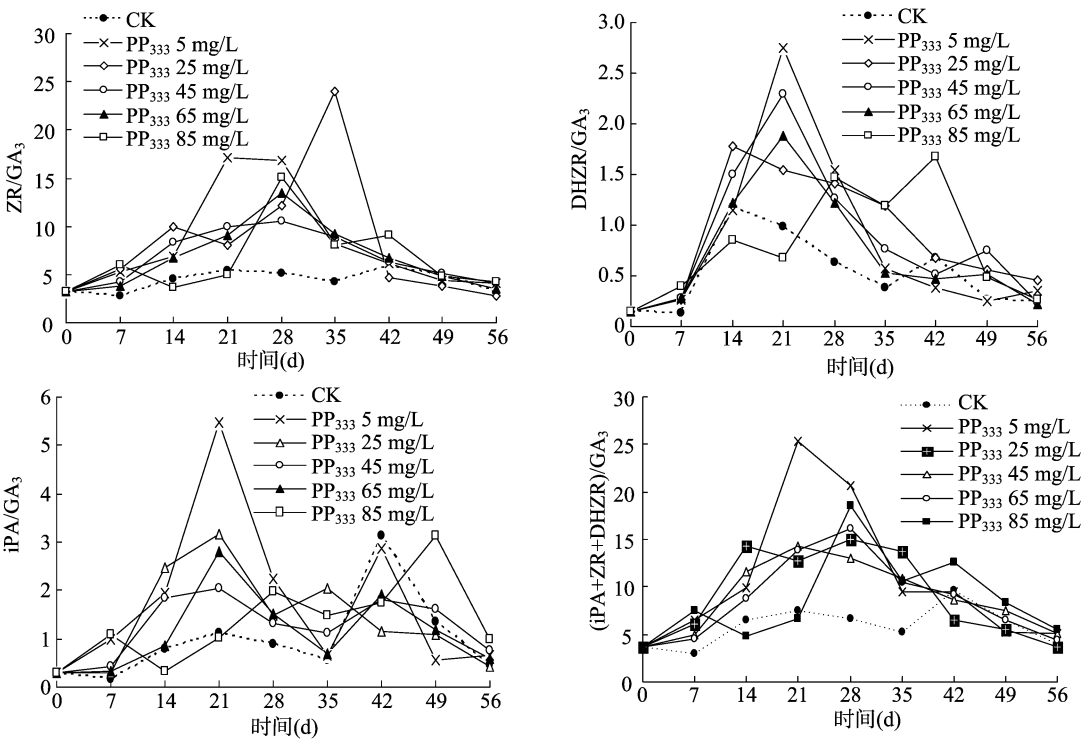


图4　PP_{333} 处理后内源激素间比值的动态变化

相一致。休眠期 iPA 含量一直较低,原因可能是休眠的珠芽在聚集能量以抵御寒冷的气候和为珠芽提供过冬的营养物质,又或者 iPA 可能并未直接参与休眠的解除。在生长期 iPA 含量急速上升,由此猜测 iPA 的作用在于珠芽解除休眠后的萌发生长。经初步分析,iPA 含量增加是因为营养需求增加,反之亦然。

种子休眠的解除总是与赤霉素类物质的积累相伴发生[9]。未经 PP_{333} 处理的珠芽 GA_3 含量经历先升再降最后升高的过程,在休眠期低温促进了 GA_3 的合成,促使 GA_3 含量的持续升高,这与龙雯虹等的研究[10]一致,而经 PP_{333} 处理的珠芽经历了下降再升高的过程,即 PP_{333} 抑制休眠期 GA_3 的升高,而休眠解除时 GA_3 含量达最低值,这一结果与前人研究 GA_3 抑制珠芽发芽的结论[11-12]一致,至生长期 GA_3 含量升高,可能是因为 GA_3 需较高水平才有利于种子细胞分裂、伸长和种子发育所需的养分吸收[13],因此 GA_3 在珠芽的休眠期至生长期起着双重作用,即先抑制萌发、后促进生长,有关这一现象的内在机理还需进一步探索。

ZR 具有抵消萌发抑制物质、调控种子发育中的物质和能量代谢的作用[14]。本试验结果表明,ZR 含量随着休眠程度的加深而增加,由此推测 ZR 在休眠期加快了细胞分裂分化的速度,加厚了珠芽的外皮,提高了对珠芽的保护能力。在休眠期 DHZR、GA_3 和 iPA 含量上升的作用是促进细胞分裂,高含量的生长促进类激素 ZR 迅速降低减少了对 GA_3 的制约,使 GA_3 在珠芽的休眠中发挥主要作用。随着休眠的解除,ZR 含量快速上升,此时,细胞分裂素可能促进细胞分裂和扩大,诱导了珠芽的分化。因此,ZR 能够克服萌发抑制的因子,解除休眠,促进珠芽的萌发。

DHZR 含量在休眠至萌发期较其他激素低,休眠期 DHZR 含量上升是为了聚集能量,休眠后期的缓慢下降可能是受到低温和 GA_3 共同抑制作用。

3.2　珠芽休眠期至萌发期内源激素间的平衡关系

由内源激素间比值变化可以看出,较低的 DHZR/GA_3、iPA/GA_3 和 ZR/GA_3 比值有利于休眠。其中 DHZR/GA_3 和 iPA/GA_3 通过低比值减少对休眠的抑制,从而对休眠发挥间接的调控作用。ZR/GA_3 比值进入休眠期迅速下降,休眠后期又明显回升,与休眠进程相一致,因此认为 ZR 与 GA_3 间的平衡变化对休眠的调控起主要作用。

根据内源激素间的相关性分析,iPA 与 GA_3、ZR 与 GA_3 的相关性较紧密,且 iPA/GA_3 和 ZR/GA_3 比值变化趋势相同,说明 GA_3 解除休眠作用与内源激素平衡有关,但内源激素之间具体的协同作用机理有待进一步研究。

3.3　PP_{333} 对珠芽内源激素的影响

本试验发现,5 ~ 65 mg/L PP_{333} 处理的珠芽和对照同时萌发,在解除休眠期 85 mg/L PP_{333} 处理的珠芽 GA_3 含量最低,这一变化使处理比对照提前 7 d 发芽,这与龙雯虹等研究的 PP_{333} 处理能加快珠芽休眠后期 GA_3 含量下降的速度,使珠芽提前发芽的结论[8]相一致,也与王鹏等在马铃薯的休眠研究中认为 GA_3 在调节萌发和解除休眠时起重要作用,抑制剂和细胞分裂素起辅助作用的结论[15]一致。同时,萌发期不一致或许是珠芽对不同浓度 PP_{333} 处理的感应程度不同。

经 PP_{333} 处理的珠芽 ZR 含量在萌芽期均高于对照,GA_3 含量在休眠期均低于对照,说明 PP_{333} 有助于提高萌芽期 ZR 含量,降低休眠期 GA_3 含量。通过内源激素间的比值关系,可以看出山药珠芽的休眠进程取决于多种内源激素的平衡,而不是取决于单一激素的含量,所以笔者认为山药珠芽促成栽培的研究不应仅仅局限于通过施用外源 PP_{333} 解除珠芽休眠,而应充分利用其他植物激素,同时重视对外部环境因素综合而深入的研究,寻求打破山药珠芽休眠的有效方法,从而促进山药的周年商业生产。

参考文献:

[1]沈而安. 保健抗衰说山药[J]. 药膳食疗研究,1999(4):21.

[2]赵　冰,吴晓嫄,江晓云,等. 山药零余子栽培特性的初步研究[J]. 特产研究,2003,25(1):1-3,12.

[3]段成国,刘焕芳,李宪利. 内源激素对落叶果树芽休眠的调控[J]. 河北果树,2005(2):1-3.

[4]龙雯虹,肖关丽,王　琼,等. 多效唑和矮壮素破除山药零余子休眠的效应[J]. 中国蔬菜,2011(12):56-59.

[5]王军民,何龙飞,李创珍,等. 多效唑和氯吡脲配施对山药零余子及中后期长势的影响[J]. 中国科技信息,2012(21):69-70.

[6]苗利娟,韩锁义,张新友,等. 双氧水和赤霉素打破怀山药零余子休眠的效应[J]. 西南农业学报,2014,27(1):453-455.

[7]龙雯虹,郭华春,肖关丽,等. 山药珠芽生长过程中激素和糖类物质含量的变化[J]. 园艺学报,2011,38(4):753-760.

[8]龙雯虹,王　琼,肖关丽,等. 山药珠芽休眠期内源激素含量的变化及多效唑破除休眠的效应[J]. 西南农业学报,2013,26(5):1996-2000.

[9]Mohammad M,Smith D L. Plant hormones and seed germination[J]. Environmental and Experimental Botany,2014,99(3):110-121.

[10]龙雯虹,肖关丽,王　琼,等. 黄独珠芽浸提液对大白菜种子发芽的影响及休眠期内源激素含量的变化[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2012,37(8):51-54.

[11]Okagami N,Nagao M. Gibberellin-induced dormancy in bulbils of *Dioscorea*[J]. Planta,1971,101(1):91-94.

[12]Okagami N. Dormancy in bulbils of several herbaceous plants:Effects of photoperiod,light,temperature,oxygen and gibberellic acid[J]. Journal of Plant Research,1979,92(1):39-58.

[13]谭志一,董毅敏,高秀英,等. 毛白杨冬芽休眠解除过程中脱落酸及赤霉素含量的变化[J]. 植物学报:英文版,1985(4):47-52.

[14]王三根. 细胞分裂素和植物种子的生长和萌发[J]. 种子,1999(4):35-37.

[15]王　鹏,连　勇,金黎平. 赤霉素解除马铃薯块茎休眠的调控敏感位点初探[J]. 中国马铃薯,2002,16(2):67-69.