园 艺 学 报 2003, 30 (3): 291~295
Acta Horticulturae Sinica

抑制脂氧合酶对马铃薯试管块茎形成及膨大的影响

马崇坚[1] 柳 俊[2] 谢从华[1*]
([1] 华中农业大学园艺林学学院，武汉 430070；[2] 华中农业大学生命科学技术学院，武汉 430070)

摘 要：采用 LOX 活性抑制剂对马铃薯试管苗进行处理，探讨 LOX 对块茎发生的影响。结果显示，经抑制剂处理的试管苗，其植株及块茎内的 LOX 活性以及内源 JA 含量明显下降，同时块茎形成株率、单株块茎形成数及平均块茎质量等皆明显降低。试验分析显示，匍匐茎中的 LOX 活性及内源 JA 含量最高，证明 LOX 在马铃薯块茎形成及膨大中起着重要作用，其作用途径可能是通过影响 JA 的生物合成来对块茎的发生及生长进行调控。

关键词：马铃薯；试管块茎形成；脂氧合酶；茉莉酸
中图分类号：S 532 **文献标识码**：A **文章编号**：0513-353X (2003) 03-0291-05

众多研究发现，植物中普遍存在脂氧合酶 (lipoxgenase, LOX)，但不同植物或同一植物的不同器官间存在差异，成熟果实中的 LOX 高于未成熟果实，随着叶的发育其 LOX 活性呈下降趋势[1]。近年来的研究表明，LOX 在植物生长发育、成熟衰老及抵御机械创伤和病虫害侵染等胁迫过程中起重要作用[2,3]。由 LOX 催化产生的一系列产物，如茉莉酸 (jasmonic acid, JA)、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate) 以及块茎酮酸 (tuberonic acid) 等在马铃薯块茎形成中扮演着重要的角色[4~7]。这些茉莉酸类物质 (jasmonates, JAs) 在微管重排、细胞扩大、块茎膨大中发挥着重要作用，而 LOX 作为茉莉酸生物合成的关键酶，可能同样参与了块茎的形成过程[8~10]。Kolomiets 等[10]发现 LOX 的转录跟匍匐茎的形成以及块茎的发生、发展等密切相关。原位杂交显示，其转录积累在匍匐茎顶端和亚顶端区域，尤其是在块茎膨大期间，细胞生长最为活跃的薄壁组织的液泡中积累最多。他们还发现，LOX 活性被抑制可能导致块茎产量减少、块茎体积变小以及块茎形成受阻。Kolomiets 等[11]还研究发现在块茎形成前期能检测到 LOX 的大量积累，但在叶片、花、茎段、茎尖以及腋芽中检测不到 LOX 的转录积累。至于 LOX 是通过调控 JA 的生物合成或是通过其它途径来参与块茎的形成，至今仍无明确的试验证据。作者采用 LOX 的抑制剂处理马铃薯试管苗单节段，研究其对试管块茎形成和 JA 生物合成的影响，从而进一步探讨 LOX 在块茎形成过程中的作用与机制。

1 材料与方法

以栽培品种‘鄂马铃薯 1 号’及‘米拉’脱毒试管苗为材料，取试管苗中部 (去顶端及基部) 单节段进行接种培养。试验分两组：一组将两品种单节段接种在含 8% 蔗糖的 20 mL MS[12] 液体培养基中，另一组将单节段接种于含有 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的 LOX 抑制剂水杨苷异羟肟酸 (salicylhydroxamic acid, SHAM) 和 8% 蔗糖的 MS 液体培养基中。每瓶 25 节，置于 16 h/d 光照、温度为 (20±1)℃ 条件下预培养 28 d (由于 28 d 后米拉已开始形成块茎，而 21 d 各处理未普遍形成块茎，故 JA 和 LOX 的测定取样为 21 d)，再转入 (20±1)℃、8 h/d 光照块茎诱导条件下培养 56 d。每处理中每品种各选 10 瓶用于观察生长情况及接种培养 84 d 后调查试管块茎数量和称量质量，10 瓶用于检测 LOX 的活性以及内源 JA 的含量。试验时将试管块茎及摘去块茎的试管苗植株进行单独取样并检测。

收稿日期：2002-08-16；修回日期：2003-01-23
基金项目：国家自然科学基金资助项目 (39970464)
* 通讯作者。E-mail: Xiech@public.wh.hb.cn

LOX 提取及活性检测参照罗云波等[2]的方法进行。参照 Liu 等[13]的方法提取茉莉酸。根据试管苗本身特点，去除了聚乙烯吡咯烷酮（polyvinypyrrolidone，PVP）去杂步骤。同时参照 Liu 等[13]及谈锋[14]的方法加以改进，用 Waters 公司 2010 型高效液相色谱系统在 210 nm 检测 JA 含量，色谱柱为Nova-pak C_{18}柱（Waters 3.9 mm ID. × 150 mm，10 μm P.S.），浓度梯度洗脱，流速为 0.8 mL·min^{-1}。样品高速离心后取上清液进样，进样量为 10 μL。样品内源激素含量以内标法定性，以外标法峰面积定量。

2 结果与分析

2.1 抑制剂处理对 LOX 活性的影响

各处理接种后第 21、56、84 天（分别代表块茎形成前、大量形成和成熟阶段）的 LOX 活性分析示于图 1。由图 1 可见，在接种培养后第 21 天各处理（除对照‘米拉’外）均处于未开始形成块茎时期，其试管苗植株内 LOX 活性较低，其中添加 LOX 抑制剂 SHAM 的两处理要明显比两品种对照低。前两者的 LOX 活性仅在 10 ΔA_{236}·min^{-1}·g^{-1} FM 左右，而后两者则均高于 30 ΔA_{236}·min^{-1}·g^{-1}FM。米拉此时已开始形成块茎，其 LOX 活性最高达 56.6 ΔA_{236}·min^{-1}·g^{-1} FM。

在接种培养后第 56 天各处理均已开始大量形成块茎时，摘去块茎的试管苗植株中的 LOX 活性均比第 21 天时高，此时块茎中的 LOX 活性均低于试管苗植株。不管是在试管苗还是试管块茎中，添加 LOX 抑制剂的处理 LOX 活性明显低于对照。

第 84 天时，LOX 活性在植株和块茎中均进一步上升，但植株与块茎间的差异并不显著。与前期结果相似，加入抑制剂的处理，其 LOX 活性均显著低于对照。

2.2 不同植株部位 LOX 活性差异

试验发现米拉试管苗植株不同部位的 LOX 活性亦存在着较大差异（图 2）。匍匐茎中 LOX 活性达 115.6 ΔA_{236}·min^{-1}·g^{-1} FM，显著高于植株的其它部位，叶片次之。刚形成的小块茎（直径 < 2 mm）中

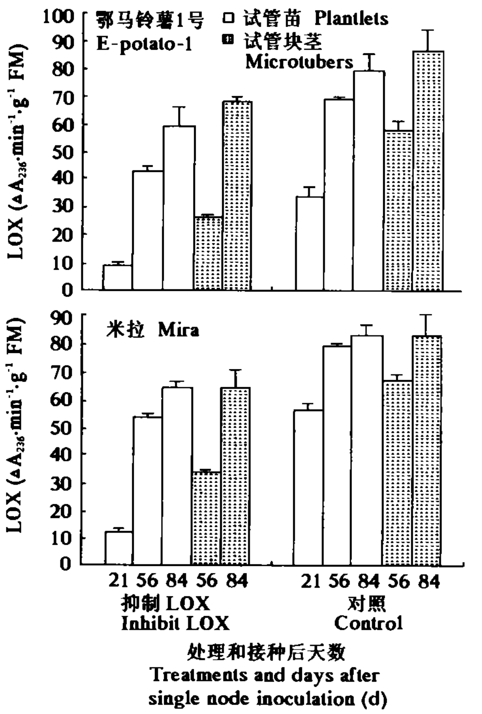

图 1 不同处理间 LOX 活性的差异

Fig. 1 The LOX activity of plantlets and microtubers

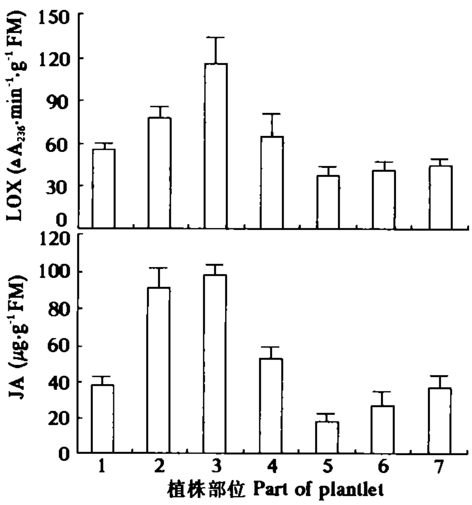

图 2 ‘米拉’品种接种 56 d 后试管苗不同部位的 LOX 活性及内源 JA 含量

1. 茎尖；2. 叶片；3. 匍匐茎；4. 直径 < 2 mm 的试管块茎；5. 茎段；6. 腋芽；7. 试管苗植株

Fig. 2 The activity of LOX and concentration of endogenous JA in different parts of plantlets of ‘Mira’ cultivars in the eighth week after single node inoculation in vitro

1. Shoot tips; 2. Leaves; 3. Stolons; 4. Tubers of diameter < 2 mm; 5. Stem segments; 6. Axillary buds; 7. Plantlets

亦较高，但与茎尖的差异不显著；而茎段、腋芽及试管苗植株中相对较低。这一结果表明，块茎形成部位的 LOX 活性高于其它部位。植株不同部位的内源 JA 含量与 LOX 的活性的分布基本一致，即匍匐茎及叶片中最高，两者都明显高于植株的其它部位或器官（图 2）。同样，小块茎中的内源 JA 含量亦较高，而茎段、腋芽等中则最低。

2.3 LOX 抑制剂处理对 JA 合成的影响

与 LOX 活性表现较为相似的是，添加 LOX 抑制剂的处理，内源 JA 含量亦明显比对照低，而米拉品种的内源 JA 含量亦比鄂马铃薯 1 号略高，随着试管苗的衰老，其内源 JA 含量亦上升（图 3）。

综合分析 LOX 活性变化与 JA 含量的变化，可看出两者间存在着极显著的直线相关（图 4）。内源 JA 含量的升降与 LOX 活性的强弱一致，证明 LOX 的活性直接调控着 JA 的生物合成。

2.4 LOX 活性对试管块茎形成数量和块茎质量的影响

试验中观察到，培养基中加有 LOX 抑制剂的处理，其试管苗块茎形成明显延迟，块茎形成能力明显降低（表 1）。鄂马铃薯 1 号和米拉加抑制剂的试管苗块茎形成株率分别为 68.3% 和 75.4%，其单株块茎形成数亦在 0.8 个/株以下，均显著低于对照。鄂马铃薯 1 号加抑制剂处理的平均块茎质量 66 mg，明显低于对照的 91 mg，而米拉加抑制剂处理与对照差异不明显，但添加抑制剂的处理的有效块茎率（质量 > 50 mg 的块茎数占块茎总数的比例）显著低于对照。结果还表明，品种间的块茎形成数和块茎大小具有明显差异，且与 LOX 活性所表现的差异一致。相对于对照其试管苗的伸长较快，植株较细，节间距较长。

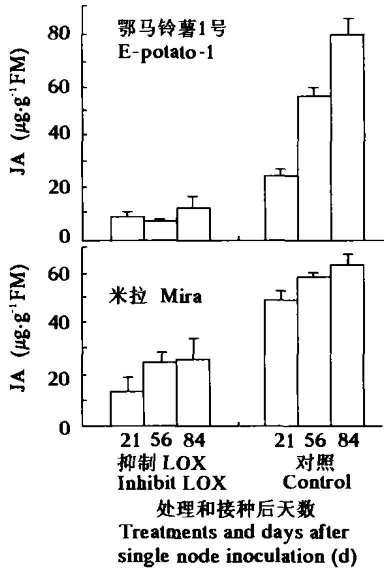

图 3　试管苗不同处理间 JA 含量的差异

Fig. 3　The content differences of JA in plantlets

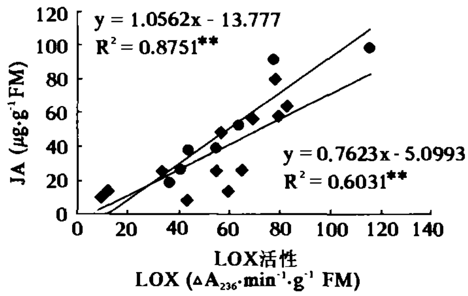

图 4　试管苗内源 JA 含量与其 LOX 活性的相互关系

（◆表示不同处理试管苗 LOX 活性及 JA 含量关系，数据来自图 1 及 3；●表示植株不同部位两者关系，数据来自图 2）

Fig. 4　The relationship between the endogenous jasmonic acid (JA) and LOX activity in the plantlets

（◆Data were derived from fig.1 to fig.3, and different parts of the plantlets, ●Data were derived from fig.2）

表 1　不同处理块茎形成株率、单株块茎形成数、平均块茎质量等经济性状统计

Table 1　Number, mass of microtubers under different conditions in vitro

品种 Cultivar	处理 Treatment	结薯天数(接种后天数) Tuber initiation (Days after transfer)	块茎形成株率 Percentage of plantlets formed tubers(%)	单株块茎形成数 No. of tubers per plantlet	平均块茎质量 Mean tuber mass(mg)	有效块茎率 Percentage of effective tubers(> 50 mg)(%)
鄂马铃薯 1 号 E-potato-1	对照 Control	42	81.6 b	0.96 b	91 a	63.4 b
	LOX 抑制剂 With LOX inhibitor	49	68.3 c	0.80 c	66 b	47.2 c
米拉 Mira	对照 Control	20	97.1 a	1.28 a	89 a	71.0 a
	LOX 抑制剂 With LOX inhibitor	24	75.4 b	0.77 c	88 a	62.7 b

* 邓肯氏新复极差测验，不同字母表示差异达显著水平（P = 0.05）。

* Mean value for replicates test; the same letter indicated no significance at the 5% level as determined by Duncan's Multiple Range Test.

3 讨论

综合分析表1及图1的结果可以看出，抑制LOX活性的处理，其块茎形成株率和单株块茎形成数均低于对照，块茎形成时间亦推迟4～7 d，同时还影响了块茎大小，证明LOX活性与块茎的形态发生和生长发育有密切的关系。

众多研究表明，LOX可能在植物生长发育过程中发挥重要作用[1～3]。脂氧合酶作为JA生物合成的关键酶，在研究JA对马铃薯形成的影响时亦逐渐被重视起来，许多研究指出LOX在块茎形成的调控中起到了较为重要的作用[7,10,11]。从本试验结果看，通过对马铃薯试管苗单节段添加LOX酶活性抑制物SHAM进行处理后，马铃薯植株及块茎中的LOX活性都明显降低，同时其块茎形成株率、单株块茎形成数、平均块茎质量（米拉除外）以及有效块茎率等都表现出明显的下降。这与Kolomiets等[10]通过反义基因抑制LOX活性的结果较为一致，从而证明LOX在马铃薯块茎形成中发挥着重要的作用。

试验同时证明，LOX酶活性与JA的生物合成呈极显著的直线相关关系。抑制LOX活性，同时也降低了内源JA的含量。且LOX活性随植株部位和生长阶段的变化与内源JA生物合成的变化规律相符，表明LOX活性与JA的生物合成有关。有研究证明，JA及其衍生物是块茎形成的诱导物质[5,7]，本试验还进一步观察到LOX活性和JA含量以块茎形成部位最高。因此可以推测，LOX对块茎形成和生长的影响可能是通过调控JA的生物合成来实现的，且这种调控还具有一定的组织特异性[9～11]。因此，在今后的研究中，可以利用生理生化或基因工程的方法提高LOX酶活性进而增加内源JA的积累，从而达到促进试管块茎形成并提高其产量的目的。

本试验还证明，抑制LOX活性会影响块茎大小，这与LOX催化合成的JA等化合物参与了植物组织微管重排等过程有关[3,8,15,16]。本试验中在植株不同部位和发育时期均检测到了LOX活性和JA的生物合成，可见两者除在块茎形成及膨大方面具有一定作用外，还可能在植株生长发育中担负其它的生理生化功能[1,3,17]。

参考文献：

1 Siedow J N. Plant lipoxygenase: structure and funtion. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., 1991, 1: 101～109

2 罗云波，生吉萍，李 钰，等．番茄脂肪氧合酶与乙烯释放量的关系．园艺学报，1999，26（1）：28～32

3 Dubbs W E, Grimes H D. Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. Plant Physiology, 2000, 123: 1269～1279

4 Koda Y, Kikuta Y, Tazaki H, et al. Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. Phytochemistry, 1991, 30: 1435～1438

5 Koda Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Int. Rev. Cytol., 1992, 135: 155～199

6 Matsuki T, Tazaki H, Fujimori T, et al. The influences of jasmonic acid methyl ester on microtubules in potato cells and fomation of potato tubers. Biosci. Biotech. Biochem., 1992, 56: 1329～1330

7 Koda Y. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. Phsiol. Plant, 1999, 100: 639～646

8 Fujino K, Koda Y, Kikuta Y. Reorientation of cortical microtubules in the subapical region during tuberization in single-node stem segments of potato in culture. Plant Cell Physiol., 1995, 36, 891～895

9 Royo J, Vancanneyt G, Perez A G, et al. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression pat-terns. J. Biol. Chem., 1996, 271: 21012～21019

10 Kolomiets M V, Hannapel D J, Chen H, et al. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. The Plant Cell, 2001, 13: 613～626

11 Kolomiets K V, Hannapel D J, Gladon R J. Potato lioxygenase genes expressed during the early stages of tuberization. Plant Physiol., 1996, 112: 446

12 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant, 1962, 15: 473～497

13 Liu J, Xie C H, Liao Y, et al. Effects of endogenous gibberellic acid and abscisic acid on the induction of potato microtubers in vitro. In: Liu Q,

Kokubu J. Proceedings of 1st Chinese-Japanese symposium on sweetpotato and potato. Beijing: Beijing Agricultural University, 1995. 267 ~ 275

14 谈 锋. 植物激素的高效液相色谱. 植物生理学通讯, 1986, (5): 15 ~ 23

15 Paliyath G, Droillard M J. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. Plant Physiol. Biochem., 1992, 30: 789 ~ 812

16 GÖbel C G, Feussner I, Schmidt A, et al. Profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. J. Bio. Chem., 2001, 9: 6267 ~ 6273

17 Sembder G, Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular action of jasmonates. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1993, 44: 569 ~ 589

The Effects of Inhibiting Lipoxygenase on Microtuber Formation and Growth of *Solanum tuberosum* L. in Vitro

Ma Chongjian[1], Liu Jun[2], and Xie Conghua[1]

([1] *College of Horticulture and Forestry Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430070, *China*; [2] *College of Life Science and Technology*, *Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: The single node segments of plantlets of potato cultivars 'Mira' and 'E-potato-1' were cultured with salicylhydroxamic acid, the inhibitor of LOX, to identify the effects of LOX on tuberization in vitro. The results showed that activity of LOX in both the plantlets and tubers as well as the concentration of jasmonic acid (JA) were decreased markedly in the treatments with inhibitor, accompanying by the declines of percentage of tuber formation by plantlets, the number of tubers per plantlet and mean tuber mass. The activity of LOX in stolons was the highest. It indicated that LOX plays important roles in tuberization and tuber bulking of potatoes, possiblely through the regulation of JA biosynthesis.

Key words: Potato; Microtuberization; Lipoxygenase; Jasmonic acid