

## 怀山药微型块茎形成过程中的生理生化变化

李明军<sup>1,2,3,\*</sup>, 刘世宇<sup>1</sup>, 刘雯<sup>1</sup>, 李俊华<sup>1,2,3</sup>, 张晓丽<sup>1,2,3</sup>, 赵喜亭<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>河南师范大学生命科学学院, 河南新乡453007; <sup>2</sup>河南省绿色药材生物技术工程实验室, 河南新乡453007; <sup>3</sup>河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南新乡453007

**摘要:** 怀山药脱毒试管苗经诱导可形成脱毒微型块茎, 其作为繁殖体比试管苗具有优势。以继代培养的脱毒试管苗带芽茎段为外植体, 接种于含60 g·L<sup>-1</sup>蔗糖的MS液体培养基中, 采用黑暗震荡的培养方式进行微型块茎诱导, 分别在外植体时期、出芽期、芽伸长期、微型块茎形成期、膨大期和成熟期取材进行相关生理生化指标的测定。结果表明, 微型块茎形成过程中可溶性总糖、葡萄糖和果糖含量变化趋势基本一致, 均在微型块茎形成期达最大值; 蔗糖和淀粉逐渐积累, 含量逐步升高; 蔗糖合成酶(SS)合成方向活性与蔗糖磷酸合成酶(SPS)活性分别在微型块茎成熟期和膨大期达最大值, 共同促进微型块茎内蔗糖的积累; 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)和淀粉合成酶(SSS)分别在酶活性最高时与淀粉合成积累量呈极显著相关; IAA、ABA和ZR含量均与微型块茎形成正相关, JA与微型块茎形成无明显相关。

**关键词:** 怀山药; 微型块茎; 诱导形成; 生理生化变化

怀山药(*Dioscorea opposita*)属于薯蓣科(Dioscoreaceae)薯蓣属多年生缠绕草质藤本植物, 因产于古怀庆府(今河南省焦作市辖区)一带而得名, 是著名的“四大怀药”之一。铁棍山药是怀山药中的极品, 药食兼优, 近年来, 因其独特的药用和食用价值逐渐被更多人了解, 在生产中越来越受到重视(任广跃等2015)。由于长期进行营养繁殖, 怀山药患病毒病而导致其产量和品质严重下降, 这一直是怀山药生产上急需解决的重要问题之一(李明军等2003)。利用茎尖组织培养技术获得怀山药脱毒试管苗, 是解决怀山药种质退化、提高产量、改善品质的一条有效途径(李明军2004)。某些植物在一定的培养条件下可诱导试管苗叶腋处形成试管块茎, 如马铃薯(柳俊2001)、三叶半夏(王海丽2005)和大薯(林红等2011)等, 其中脱毒马铃薯试管块茎早已工厂化生产并大规模应用, 研究表明马铃薯试管块茎在遗传稳定性、植物学、生理生化特性上与常规块茎无异。怀山药试管苗也可诱导形成微型块茎(李明军等2000, 2004, 2008), 其较试管苗具有易储存、易运输、田间易操作、便于国际间种质交流等优势, 更有利于怀山药脱毒种苗的工厂化生产和推广应用。

微型块茎的诱导形成是具有一定可塑性的复杂的生理过程, 涉及到形态、生理、生化和遗传等多方面因素(Strunik等1999)。本实验室已建立了怀山药微型块茎诱导形成的方法(王医鹏2013; Li等2014), 并对其形成过程中的形态学(Li等2015)、生理生化变化、转录组学和蛋白组学等进

行了系统的研究。本文报道的是其中的生理生化变化, 目的是探讨微型块茎形成过程中各类物质的变化规律, 以期为怀山药脱毒微型块茎的高效诱导形成及规模化生产与应用提供理论依据。

## 材料与方法

### 1 植物材料

实验所用材料为河南师范大学河南省绿色药材生物技术工程实验室继代培养的铁棍山药(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun)试管苗。

### 2 方法

#### 2.1 微型块茎的诱导

微型块茎诱导培养基为添加60 g·L<sup>-1</sup>蔗糖的MS液体培养基(pH=5.8~6.2)。在无菌条件下, 将怀山药试管苗切成约2 cm的带芽茎段, 置于摇床内黑暗震荡培养, 温度为28~30°C, 转速为120 r·min<sup>-1</sup>。从接种0 d时开始, 每7 d(直至第42天)对其叶腋处取材并在-80°C条件下保存, 用于进行相关生理生化指标的测定。

#### 2.2 主要有机物含量测定

采用蒽酮比色法(张志良和瞿伟菁2003)测定

收稿 2017-02-15 修定 2017-04-14

资助 国家自然科学基金(81274019)、中医药行业科研专项子课题(201407005-08)、河南省创新型科技人才队伍建设工程(C20130037)和河南省高等学校重点科研项目(15A180044)。

致谢 湖南省植物激素与生长发育重点实验室肖浪涛教授在植物内源激素测定方面提供帮助。

\* 通讯作者(E-mail: limingjun2002@263.net)。

可溶性糖含量, 包括可溶性总糖、蔗糖、果糖和葡萄糖。采用蒽酮硫酸比色法(邹琦1995)测定淀粉含量。

### 2.3 相关酶活性的测定

测定蔗糖合成相关酶活性所用粗酶液的提取参考滕建北等(2011)的方法, 测定淀粉合成相关酶活性所用粗酶液的制备参考Jiang等(2004)的方法。蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS)活性和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SPS)活性测定参考薛应龙(1985)的方法, SS分解方向活性的测定参考Lowell等(1989)方法; 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase, AGPase)活性测定参考Nakamura等(1989)方法, 淀粉合成酶(starch synthase, SSS)活性测定参考Nakamura等(1989)和Jiang等(2003)的方法。

### 2.4 内源激素的测定

3-吲哚乙酸(3-indoleacetic acid, IAA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、玉米素核苷(zeatin riboside, ZR)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)的分析采用液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)法(Huang等2014; Xia等2010)。

### 2.5 数据处理与分析

实验数据使用Excel 2010软件进行数据整理与制图, 使用SPSS 17.0软件进行邓肯氏新复极差

多重比较分析( $P < 0.05$ ), 实验重复3次。

## 实验结果

### 1 怀山药微型块茎一步诱导法模型的建立

将带芽茎段接种于培养基并置于摇床内培养4周后即有微型块茎的形成, 6周后微型块茎直径可达0.6 cm左右。基于外植体形成过程的形态学观察和接种后培养时间, 将微型块茎的诱导形成过程分成6个阶段, 分别是外植体时期(0 d)、出芽期(7 d)、芽伸长期(14~21 d)、微型块茎形成期(28 d)、膨大期(35 d)和成熟期(42 d) (图1), 该方法我们称之为微型块茎形成的一步诱导法(Li等2015)。这一诱导方法操作简便, 为微型块茎诱导形成过程中生理生化变化规律及分子机理的研究提供了一个理想的模型。

### 2 怀山药微型块茎形成过程中主要有机物的含量变化

由图2可知, 可溶性总糖含量及果糖含量出现先下降后上升再下降的变化, 葡萄糖含量出现先上升再下降的变化, 蔗糖含量出现先下降再上升的变化, 淀粉含量呈逐渐上升的趋势。可溶性总糖含量、葡萄糖和果糖含量均在微型块茎形成期(28 d)达最大值, 随后在膨大期(35 d)和成熟期(42 d)略有下降; 蔗糖与淀粉含量同在微型块茎成熟期(42 d)时达最大值。

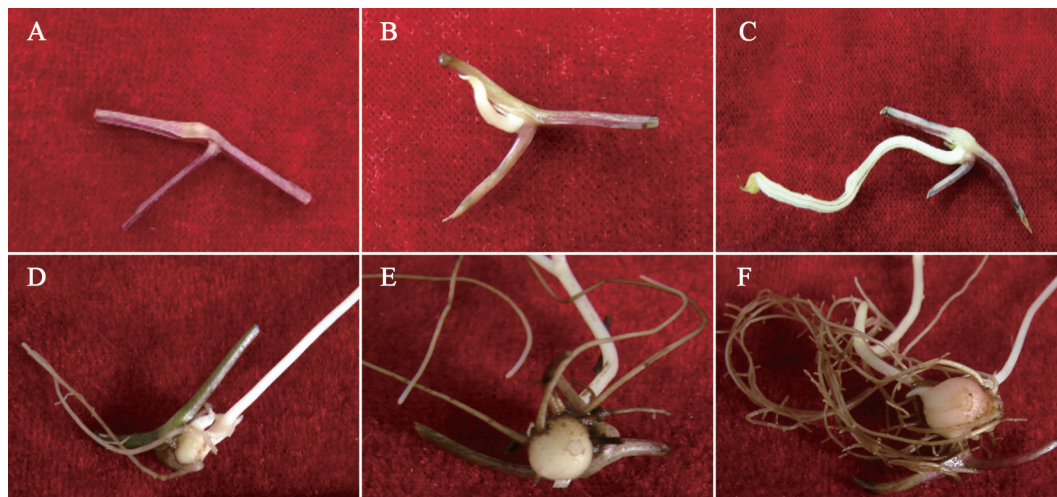


图1 怀山药微型块茎形成的形态学观察

Fig.1 Microtuber formation in single nodal segment cultures of *D. opposita*

A: 外植体时期(0 d); B: 出芽期(7 d); C: 芽伸长期(21 d); D: 微型块茎形成期(28 d); E: 微型块茎膨大期(35 d); F: 微型块茎成熟期(42 d)。

### 3 怀山药微型块茎形成过程中蔗糖合成相关酶活性变化及其与蔗糖含量的相关性分析

#### 3.1 蔗糖合成相关酶活性变化

从图3-A和B可以看出SS分解方向活性与SPS活性均出现先下降后上升再下降的变化, 并且均在微型块茎膨大期(35 d)时出现峰值, 其中SS分解方向活性最大值为 $474.91 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 。从图3-B中可以看出SS合成方向活性出现先下降后波动上升的变化, 最后在微型块茎成熟期时达到最大值 $55.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 。在整个诱导过程中, SS分解方向活性与其合成方向活性数值差异均较大。

#### 3.2 蔗糖合成相关酶活性与蔗糖含量的相关性分析

从表1可看出, SS分解方向和其合成方向活性在芽伸长期(21 d)分别与蔗糖含量呈显著负相关和极显著负相关, SS合成方向活性又在微型块茎成熟时与蔗糖含量呈极显著正相关, 此时的蔗糖含量达到最高; SPS活性在微型块茎形成期和膨大期时与蔗糖含量分别呈显著正相关和极显著正相关。

### 4 怀山药微型块茎形成过程中淀粉合成相关酶活性变化及其与淀粉含量的相关性分析

#### 4.1 淀粉合成相关酶活性变化

从图4可以看出, AGPase活性和SSS活性在培

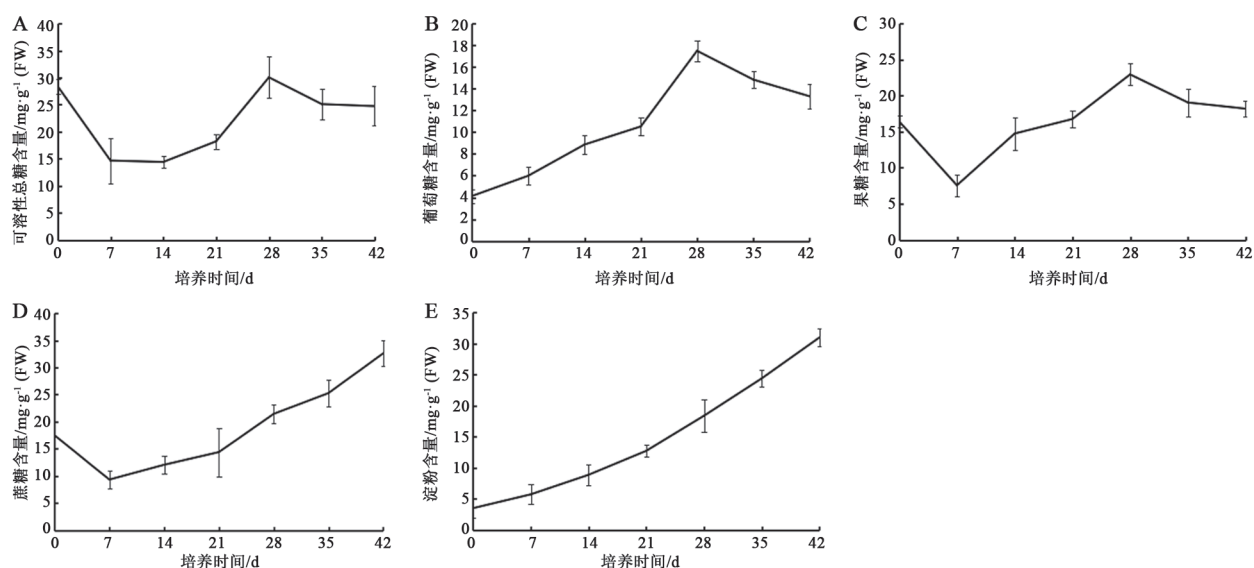


图2 怀山药微型块茎形成过程中主要有机物的含量变化

Fig.2 Changes in major organic contents during *D. opposita* microtuber of formation

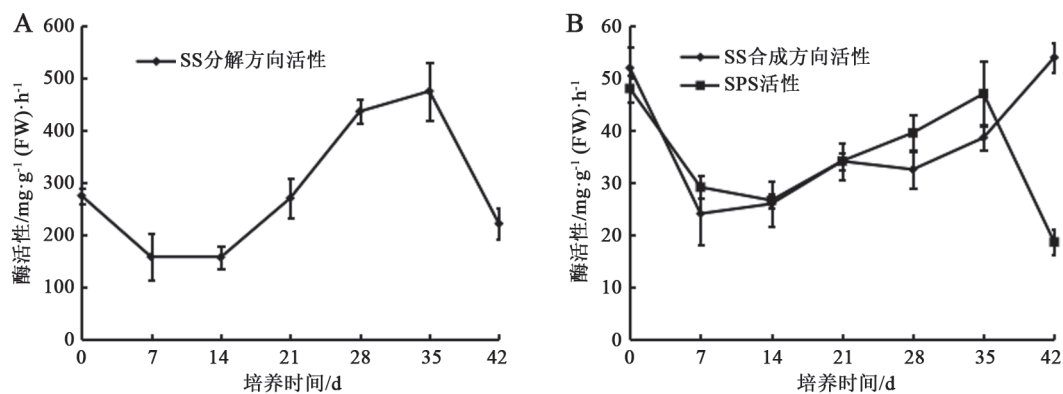


图3 怀山药微型块茎形成过程中蔗糖相关酶的活性变化

Fig.3 Changes in activities of sucrose-related enzymes during *D. opposita* microtuber formation

表1 怀山药微型块茎形成过程中蔗糖合成相关酶活性与蔗糖含量的相关性分析

Table 1 Correlation analysis of activities of sucrose biosynthesis-related enzymes and sucrose contents during *D. opposita* microtuber formation

培养时间/d	SS分解方向活性与蔗糖含量相关系数	SS合成方向活性与蔗糖含量相关系数	SPS活性与蔗糖含量相关系数
0	0.74*	0.89**	0.02
7	0.18	0.16	0.15
14	-0.74	-0.55	-0.21
21	-0.80*	-0.97**	0.23
28	0.09	0.46	0.71*
35	0.62	0.55	0.87**
42	0.59	0.93**	-0.34

\*表示在 $P < 0.05$ 水平上显著相关, \*\*表示 $P < 0.01$ 水平上极显著相关。下表同此。

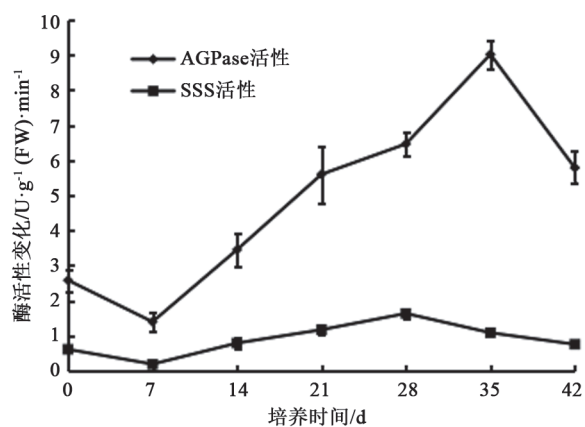


图4 怀山药微型块茎形成过程中淀粉合成相关酶活性变化  
Fig.4 Changes in activities of starch biosynthesis-related enzymes during *D. opposita* microtuber formation

养阶段呈现先下降后上升再下降的变化趋势, AGPase活性在35 d时达最大值, 为 $9.02 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ; SSS活性在28 d时达最大值, 为 $1.63 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ , AGPase的活性在微型块茎形成的各个时期均显著高于SSS活性, 说明微型块茎中淀粉的合成主要由AGPase催化。

#### 4.2 淀粉合成相关酶活性与淀粉含量的相关性分析

从表2可看出, 大多数时期AGPase活性都与淀粉含量呈正相关, 尤其是在芽伸长期(14 d)、微型块茎形成期(28 d)和膨大期(35 d)均达到极显著正相关; SSS活性也在微型块茎形成期与淀粉含量达到极显著正相关。微型块茎成熟期(42 d)时, 淀粉含量达到最大值, 与两种酶活性均呈显著性负相关。

#### 5 怀山药微型块茎形成过程中内源激素含量的变化

由图5可知, IAA含量在诱导初期变化不明显,

表2 怀山药微型块茎形成过程中淀粉合成相关酶活性与淀粉含量的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of activities of starch biosynthesis-related enzymes and starch contents of *D. opposita* microtuber formation

培养时间/d	AGPase活性与淀粉含量相关系数	SSS活性与淀粉含量相关系数
0	-0.53	-0.08
7	0.72*	0.58
14	0.87**	0.41
21	0.69	0.74*
28	0.79**	0.89**
35	0.99**	-0.18
42	-0.71*	-0.69*

21 d后开始上升, 至微型块茎形成期(28 d)达最大值, 后又逐渐下降; ZR含量虽然在14和28 d时出现2次小峰值, 但在整个培养阶段总体无明显升高或下降趋势; ABA含量先逐渐升高, 至28 d时达最大值后下降, 35 d后又上升; JA含量先下降, 后在7~35 d期间小幅度增减, 35 d后大幅度上升。

## 讨 论

糖类的积累、分配和转移是块茎形成和发育的物质基础。本研究对怀山药微型块茎形成过程中糖和淀粉含量及其相关酶活性、内源激素含量等生理生化变化进行了研究。结果表明, 在微型块茎形成期, 葡萄糖、果糖、蔗糖、可溶性总糖及淀粉含量均呈现上升的趋势, 此时的营养物质主要用于微型块茎的细胞分裂、细胞体积增大,

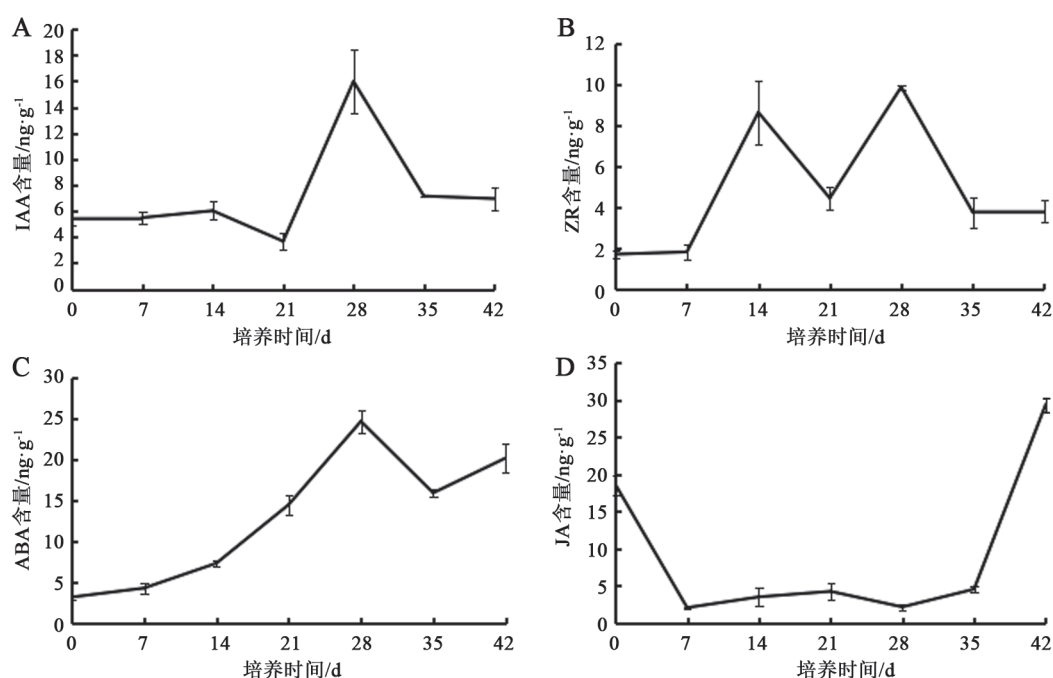


图5 怀山药微型块茎形成过程中内源激素的含量变化

Fig.5 Changes in the levels of endogenous hormones during *D. opposita* microtuber formation

之后膨大期时用于微型块茎形态建成的比例继续增大, 导致葡萄糖、果糖和可溶性总糖含量均呈现下降趋势。这一现象与莲藕根状茎膨大过程中生理生化变化的规律(李良俊等2006)是相似的。

在高等植物糖代谢过程中, SS和SPS是2种控制蔗糖合成的关键酶。SS具有分解和合成蔗糖的双重属性, 能够促进蔗糖进入各种代谢途径, 催化的主要反应是: 蔗糖+尿苷二磷酸(UDP) $\leftrightarrow$ 尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)+果糖, 此反应可逆(乔亮2012)。SPS催化的主要反应是: UDPG+6-磷酸果糖 $\rightarrow$ 6-磷酸蔗糖+UDP, 反应实际上是SPS和磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP)以复合体形式存在共同起作用的, 反应不可逆(黄东亮等2012)。本实验研究表明, 在微型块茎诱导形成过程中SS分解方向较其合成方向占主体地位, 这与通常认为蔗糖合成酶主要起分解蔗糖作用相符合(张明方和李志凌2002)。SS合成方向与SPS在块茎膨大期和成熟期时活性均较高, 分别达到极显著相关水平, 两者共同促进微型块茎内蔗糖的积累。这与蔗糖积累型作物如甘蔗(罗海玲2006)和甜菜(邵科2014)等的研究结果一致。综上所述, 蔗糖水平的提高主要与SPS活性的提高相关联。

AGPase和SSS在植物淀粉生物合成过程中有着重要的作用。AGPase是植物淀粉糖代谢过程中的一个限速酶, 催化还原糖向淀粉方向转化。SSS催化腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG)与葡聚糖反应, 从而延长淀粉链。本实验研究表明, 在微型块茎诱导形成时期, AGPase活性和SSS活性在多个时期与淀粉含量呈极显著相关, 对淀粉的合成有着关键作用。陈会鲜等(2016)对木薯的研究表明, AGPase的活性与淀粉积累速率呈极显著正相关; 谢鹏等(2012)认为板栗果实发育过程中SSS活性与淀粉合成关系密切, 对淀粉积累起着重要作用。这些均与本实验结果一致。

植物组织培养过程中新生器官的分化和生长, 受培养基中各成分配方和环境条件的影响, 其主要作用机理在于通过影响内源激素平衡而起作用。因此, 内源激素对怀山药微型块茎的诱导形成具有重要的调控作用。本实验研究表明, IAA在块茎形成时含量最大, 这与我们前期研究外源生长素对怀山药储藏器官的形成有促进作用相一致(李明军等2008), 与胡云海和蒋先明(1992)研究发现在高浓度蔗糖的配合下, IAA有促进马铃薯微型薯膨大的作用也是一致的。ZR促进了芽的生长,

并对块茎的形成有利,这与甘薯块根分化与膨大过程中ZR的作用(王庆美等2005)一致;ABA表现出对怀山药微型块茎的形成有促进作用,这一结果与半夏试管块茎诱导形成过程中ABA的变化结果(盛玮等2010)一致,而连勇等(2002)得出ABA可能不直接参与马铃薯试管薯的形成。JA在怀山药微型块茎成熟期时含量大幅度升高,其他时期含量较低,对微型块茎的形成无明显促进作用,而其在马铃薯(秦忠群和王季春2006)、半夏(盛玮等2010)的块茎形成中发挥了重要作用。对于ABA和JA作用在不同物种之间的差异,其机制还需要进一步的研究。

### 参考文献

- Chen HX, Luo XL, Cao S, Guo YJ, Wang Z, Luo X, Shan ZY (2015). The research of the relationship between starch accumulation and the activity of cassava's ADP-glucose pyrophosphorylase and its isozymes. *Chin J Trop Crop*, 36 (1): 097-102 (in Chinese with English abstract) [陈会鲜, 罗兴录, 曹升, 郭雅静, 王战, 罗璇, 单忠英(2015). 木薯AGPase及其同工酶活性与淀粉积累的关系. *热带作物学报*, 36 (1): 097-102]
- Hu YH, Jiang XM (1992). The effect of plant hormones on tuberization of potato microtubers in vitro. *J Potato*, 16 (1): 14-22 (in Chinese with English abstract) [胡云海, 蒋先明(1992). 植物激素对微型薯形成的影响. *马铃薯杂志*, 16 (1): 14-22]
- Huang DL, Li SX, Liao Q, Qin CX, Lin L, Fang FX, Li YR (2012). Advances on sucrose phosphate synthase in plants. *J Chin Biotechnol*, 32 (6): 109-119 (in Chinese with English abstract) [黄东亮, 李双喜, 廖青, 秦翠鲜, 林丽, 方锋学, 李杨瑞(2012). 植物蔗糖磷酸合成酶研究进展. *中国生物工程杂志*, 32 (6): 109-119]
- Huang Z, Kabir MH, Xiao Y, Liu Q, Tong J, Xiao L (2014). Principles and Practice of ABA Analysis. In: Zhang DP (ed). *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. Springer Netherlands, 431-446
- Jiang H, Dian W, Liu F, Wu P (2004). Molecular cloning and expression analysis of three genes encoding starch synthase II in rice. *Planta*, 218 (6): 1062-1070
- Jiang H, Dian W, Wu P (2003). Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme. *Phytochemistry*, 63 (1): 53-59
- Li LJ, Xu C, Chen JL, Cao BS (2003). Changes of carbohydrates during lotus rhizome development of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Yangzhou Univ (A&L Sci Ed)*, 24 (3): 72-78 (in Chinese with English abstract) [李良俊, 许超, 陈建林, 曹蓓生(2003). 莲藕膨大过程中碳水化合物变化的初步研究. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 24 (3): 72-78]
- Li MJ (2004). *Tissue Culture and Application of Dioscorea opposita* Thunb. Beijing: Science Press, 117-129 (in Chinese) [李明军 (2004). 怀山药组织培养及其应用. 北京: 科学出版社, 117-129]
- Li MJ, Chen MX, Guo JL, Hong SR, Zhang XL, Xu X, Liu P (2004). The effect of growth regulation substance and carbohydrate on the induction of tubers of *Dioscorea opposita* Thunb. *Acta Agric Boreali Sin*, 19 (3): 69-72 (in Chinese with English abstract) [李明军, 陈明霞, 郭君丽, 洪森荣, 张晓丽, 徐鑫, 刘萍(2004). 生长调节物质和糖对怀山药微型块茎诱导形成的影响. *华北农学报*, 19 (3): 69-72]
- Li MJ, Deng L, Liu XY, Zhao XT, Zhang XL, Liu WY (2008). Effects of auxin and cytokinin on the induction of microtuber of *Dioscorea opposita* Thunb. *J Henan Agri Sci*, (11): 102-106 (in Chinese with English abstract) [李明军, 邓丽, 刘欣英, 赵喜亭, 张晓丽, 刘文英(2008). 生长素和细胞分裂素对怀山药微型块茎诱导形成的影响. *河南农业科学*, (11): 102-106]
- Li MJ, Li JH, Liu W, Liu LY, Lu J, Niu J, Liu XY, Yang QX (2014). A protocol for in vitro production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 78 (6): 1005-1009
- Li MJ, Li JH, Wang YP, Liu W, Guo XB, Li SJ, Han LL, Song ZH, Zhao XT, Yang QX (2015). A simple method for microtuber production in *Dioscorea opposita* using single nodal segments. *Pak J Bot*, 47 (2): 665-668
- Li MJ, Liu P, Zhang JB (2000). In vitro microtuberization of *Dioscorea opposita*. *Plant Physiol Commun*, 36 (1): 41 (in Chinese with English abstract) [李明军, 刘萍, 张嘉宝(2000). 怀山药微型块茎的离体诱导. *植物生理学通讯*, 36 (1): 41]
- Li MJ, Zhang F, Chen MX, Yu XL (2003). Study on virus diseases of *Dioscorea opposita*. *Chin Traditional Herbal Drugs*, 34 (11): U003-U005 (in Chinese) [李明军, 张峰, 陈明霞, 于相丽(2003). 怀山药病毒病的研究. *中草药*, 34 (11): 附3-5]
- Lian Y, Zou Y, Dong HR, Jin LP, Lin H (2002). The changes of several endogenous phytohormones during microtuber formation in vitro in *Solanum tuberosum* L.. *Acta Horti Sin*, 29 (6): 537-541 (in Chinese with English abstract) [连勇, 邹颖, 东惠茹, 金黎平, 林桓(2002). 马铃薯试管薯形成过程中几种内源激素的变化. *园艺学报*, 29 (6): 537-541]
- Lin H, Huang XL, Zhou SQ, Xu Y, Huang DY (2011). Induction of the microtuber of *Dioscorea alata* L. in vitro. *Chin Agric Bull*, 27 (12): 112-116 (in Chinese with English abstract) [林红, 黄小龙, 周双清, 许云, 黄东益(2011). 大薯微型块茎的离体诱导. *中国农学通报*, 27 (12): 112-116]
- Liu J (2001). Studies on the mechanisms and regulation of in vitro tuber formation in potato (PhD thesis). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [柳俊(2001). 马铃薯试管块茎形成机理及块茎形成调控(博士论文). 武汉: 华中农业大学]
- Lowell CA, Tomlinson PT, Koch KE (1989). Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol*, 90 (4): 1394-1402
- Luo HL (2006). The relationship between sucrose content and maturity with activities of enzymes related to sucrose metabolism in sugarcane (Master's thesis). Nanning: Guangxi University (in Chinese with English abstract) [罗海玲(2006). 甘蔗含糖特性和成熟期与蔗糖代谢相关酶的关系研究(硕士论文). 南宁: 广西

- 大学]
- Nakamura Y, Yuki K, Park SY, Ohya T (1989). Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant Cell Physiol*, 30 (6): 833–839
- Qiao L (2012). Preliminary study of the rice sucrose synthase gene family (Master's thesis). Jinan: Shandong University (in Chinese with English abstract) [乔亮(2012). 水稻蔗糖合成酶基因家族的初步研究(硕士论文). 济南: 山东大学]
- Qin ZQ, Wang JC (2006). Effect of gibberellins ( $GA_3$ ) and methyl jasmonate (MeJA) on endogenous hormones and development of potato in aeroponics. *J Chin Potato*, 20 (1): 5–11 (in Chinese with English abstract) [秦忠群, 王季春(2006). 赤霉素( $GA_3$ )与茉莉酸甲酯(MeJA)对雾培马铃薯内源激素与生长发育的影响. *中国马铃薯*, 20 (1): 5–11]
- Ren GY, Ren LY, Zhang W, Duan X, Luo L, Zhu WX (2015). Optimizing microwave-assisted vacuum freeze-drying of *Dioscorea opposita* by orthogonal array design. *J Food Sci*, 36 (12): 12–16 (in Chinese with English abstract) [任广跃, 任丽影, 张伟, 段续, 罗磊, 朱文学(2015). 正交试验优化怀山药微波辅助真空冷冻干燥工艺. *食品科学*, 36 (12): 12–16]
- Shao K (2014). The relationship among increasing root weight, sugar content and sucrose metabolism related enzymes in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and its physiological basis and practice of nutritional regulation (PhD thesis). Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese with English abstract) [邵科(2014). 甜菜(*Beta vulgaris* L.)块根和含糖率增长与蔗糖代谢酶的关系及其营养调控的生理基础与实践(博士论文). 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Sheng W, Xue JP, Zhang AM, Chang L, Fan CC (2010). Variation of endogenous hormones in formation of microtubers of *Pinellia ternata* *in vitro*. *China J Chin Materia Medica*, 35 (8): 943–945 (in Chinese with English abstract) [盛玮, 薛建平, 张爱民, 常莉, 范成成(2010). 半夏试管块茎形成过程中内源激素的变化. *中国中药杂志*, 35 (8): 943–945]
- Strunik PC, Vreugdenhil D, Eck H, JCV, Bachem W, Visser RGF (1999). Physiological and genetic control of tuber formation. *Potato Res*, 42 (2): 313–331
- Teng JB, Wan DG, Cai Y, Zhu YL (2011). Dynamic study on sucrose synthase activity of *Dendrobium loddigesii* rolfe. *J Anhui Agric Sci*, 39 (2): 644–645 (in Chinese with English abstract) [滕建北, 万德光, 蔡毅, 朱意麟(2011). 美花石斛蔗糖合成酶活性动态研究. *安徽农业科学*, 39 (2): 644–645]
- Wang HL (2005). Rapid producing of virus-free *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. and *in vitro* tubers formation (Master's thesis). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [王海丽(2005). 三叶半夏脱毒快繁及离体块茎诱导(硕士论文). 杭州: 浙江大学]
- Wang QM, Zhang LM, Wang ZL (2005). Formation and thickening of tuberous roots in relation to the endogenous hormone concentrations in sweetpotato. *China Agri Sci*, 38 (12): 2414–2420 (in Chinese with English abstract) [王庆美, 张立明, 王振林(2005). 甘薯内源激素变化与块根形成膨大的关系. *中国农业科学*, 38 (12): 2414–2420]
- Wang YP (2013). Studies on induction and germination of microtubers *in vitro* of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun (Master's thesis). Xinxiang, Henan: Henan Normal University. (in Chinese with English abstract) [王医鹏(2013). 铁棍山药微型块茎诱导形成及其萌发的研究(硕士论文). 河南新乡: 河南师范大学]
- Xia L, Yang Y, Lin W, Tong J, Huang Z, Xiao L (2010). Determination of both jasmonic acid and methyl jasmonate in plant samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chinese Sci Bull*, 55 (21): 2231–2235
- Xie P, Guo SJ, Xiong H, Li GH, Lv WJ (2012). Changes in sugar, starch, some enzymes involved and their relationships during the development of Chinese chestnut. *Acta Horti Sin*, 39 (12): 2369–2376 (in Chinese with English abstract) [谢鹏, 郭素娟, 熊欢, 李广会, 吕文君(2012). 板栗果实糖和淀粉积累及相关酶活性关系的研究. *园艺学报*, 39 (12): 2369–2376]
- Xue YL (1985). *Laboratory Manual of Plant Physiology*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 148–150 [薛应龙(1985). *植物生理学实验手册*. 上海: 上海科学技术出版社, 148–150]
- Zhang MF, Li ZL (2002). Sucrose-metabolizing enzymes in higher plants. *Plant Physiol Commun*, 38 (3): 289–295 (in Chinese with English abstract) [张明方, 李志凌(2002). 高等植物中与蔗糖代谢相关的酶. *植物生理学通讯*, 38 (3): 289–295]
- Zhang ZL, Qu WJ (2003). *Experimental Instruction of Plant Physiology*. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 127–132 (in Chinese) [张志良, 瞿伟菁(2003). *植物生理学实验指导*. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 127–132]
- Zou Q (1995). *Guide of Plant Physiology and Biochemistry Experiment*. 1st ed. Beijing: China Agriculture Press, 53–56 (in Chinese) [邹琦(1995). *植物生理生化实验指导*. 第1版. 北京: 中国农业出版社, 53–56]

## Physiological and biochemical changes in *Dioscorea opposita* during the process of microtuber formation

LI Ming-Jun<sup>1,2,3,\*</sup>, LIU Shi-Yu<sup>1</sup>, LIU Wen<sup>1</sup>, LI Jun-Hua<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Xiao-Li<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Xi-Ting<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China; <sup>2</sup>Engineering Laboratory of Biotechnology for Green Medicinal Plant of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007, China; <sup>3</sup>Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007, China

**Abstract:** Microtubers may provide a feasible alternative to in-vitro-grown plantlets as a means of micropropagation. In this study, changes in physiological and biochemical parameters were followed during the process of microtuber formation in *Dioscorea opposita*. Microtubers were produced from single nodal segments incubated in MS basal medium supplemented with 60 g·L<sup>-1</sup> sucrose in a rotary shaking condition. During the process of microtuber formation, the contents of soluble sugar, glucose and fructose showed similar changes and simultaneously reached the highest levels. The microtuber formation was associated with gradual accumulation of sugar and starch. The activities of sucrose synthase in direction of sucrose synthesis and sucrose phosphate synthase reached the maximum levels in the microtuber mature stage and the microtuber enlargement stage, respectively, indicating that they work in concert to promote the accumulation of glucose in microtuber. The levels of adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase and starch synthase were significantly correlated with the accumulation of starch synthesis. The levels of 3-indoleacetic acid, abscisic acid and zeatin riboside but not jasmonic acid showed a positive association with the process of microtuber formation.

**Key words:** *Dioscorea opposita*; microtuber; induced formation; physiological and biochemical changes

---

Received 2017-02-15 Accepted 2017-04-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grand No. 81274019), the Subproject of the Traditional Chinese Medicine Industry Special Project (Grand No. 201407005-08), the Innovation Scientists and Technicians Troop Construction Projects of Henan Province (Grand No. C20130037), and the Key Research Fund of Higher Education of Henan Province (Grand No. 15A180044).

\*Corresponding author (E-mail: limingjun2002@263.net).