

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2015)05-0269-05

转正义和反义 *PPase* 基因对马铃薯块茎 休眠相关生理指标的影响

文义凯¹, 张 宁¹, 常 璟¹, 司怀军^{1, 2*}, 王 蒂²(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃省干旱生境作物学省部
共建国家重点实验室培育基地, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 将转正、反义无机焦磷酸酶(*PPase*)基因马铃薯‘甘农薯2号’块茎分别贮藏于4℃和25℃下90 d, 测定其*PPase*活性和无机Pi含量等生理生化指标。结果表明, 在25℃贮藏温度下, 与未转基因对照相比, 转正义*PPase*基因的两个株系(G-2-4和G-2-5)块茎中*PPase*活性、Pi与可溶性糖含量均增加, 与未转基因对照相比差异显著, G-2-4的淀粉含量与未转基因对照相比显著降低。转反义*PPase*基因的两个株系(G-1-1和G-1-2)*PPase*活性、Pi与可溶性糖含量均降低, 与未转基因对照相比差异显著, G-1-2淀粉含量与未转基因对照相比极显著增加。与25℃贮藏温度相比, 4℃贮藏温度下转正、反义基因株系块茎中的*PPase*活性、Pi、可溶性糖和淀粉含量的变化趋势与25℃贮藏温度基本一致, 但其*PPase*活性、Pi含量和淀粉含量高于25℃贮藏温度下的转基因株系块茎, 而其可溶性糖含量低于25℃贮藏温度下的转基因株系块茎含量。

关键词: 马铃薯; 块茎; 无机焦磷酸酶基因; 生理指标

Effect of Transgenic Sense and Antisense *PPase* Gene on Physiological Indexes Related to Potato Tuber Dormancy

WEN Yikai¹, ZHANG Ning¹, CHANG Jing¹, SI Huaijun^{1,2*}, WANG Di²

(1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Gansu Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Gansu Provincial Key Laboratory of
Aridland Crop Science, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Tubers of the transgenic sense and antisense *PPase* gene of the potato cultivar 'Gannongshu 2' were stored at 4℃ and 25℃ for 90 days, respectively. *PPase* activity, Pi content and other physiological indexes related to tuber dormancy were measured. The results showed that when tubers were stored at 25℃, *PPase* activity, Pi and soluble sugar contents of two transgenic sense lines (G-2-4 and G-2-5) were higher than those of the non-transgenic plants, and the difference was significant. The starch content of G-2-4 was obviously lower compared with non-transgenic plants, and the difference was significant. Two transgenic antisense lines (G-1-1 and G-1-2) exhibited obviously lower *PPase* activity, Pi and soluble sugar contents compared with non-transgenic plants, and the differences were highly significant. The starch content of G-1-2 was highly significantly higher than that of non-transgenic plants. The changing trend of the physiological indexes of the transgenic sense and antisense potato tubers under 4℃ was similar to those stored under 25℃. However, the transgenic potato tubers exhibited higher *PPase* activity, Pi and starch contents, while soluble sugar content was lower than those stored under 25℃.

Key Words: potato; tuber; inorganic pyrophosphatase gene; physiological index

收稿日期: 2015-08-28

基金项目: 甘肃省农业科技创新项目(GNCX-2012-49); 国家自然科学基金项目(31160298); 甘肃省杰出青年基金项目(1308RJDA011)。

作者简介: 文义凯(1984-), 男, 硕士, 实验师, 主要从事马铃薯遗传育种研究。

*通信作者(Corresponding author): 司怀军, 教授, 主要从事马铃薯生物技术育种和分子生物学研究, E-mail: hjsi@gsau.edu.cn。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是全球范围内总产量位居第四的非谷类粮食作物, 仅次于水稻、小麦和玉米^[1], 主要分布在中国的东北、华北、西北和西南等地。马铃薯种薯的休眠程度影响着出苗的早晚和产量的高低, 当块茎作为食品加工原料时, 需要较长的休眠期, 便于运输贮藏^[2]。收获后块茎休眠期的长短主要依赖于马铃薯基因型、生长发育和贮藏过程中的环境条件^[3]。因此, 对马铃薯休眠与发芽机理进行系统的研究和调控, 对马铃薯的贮藏保鲜以及栽培种植和产业发展具有十分重要的意义。

植物细胞中的无机焦磷酸(Pyrophosphate, PPi)含量非常丰富, 并且主要位于细胞质中^[4,5]。PPi是一种类似于ATP的高能化合物, 水解后产生一定的自由能供给机体代谢。当蔗糖合成酶水解时, 一分子蔗糖需要水解一分子PPi作为能量供给, 而蔗糖代谢途径中的两步酶促反应中都需要PPi^[6]。通过无机焦磷酸酶(Pyrophosphatase, PPase)将PPi催化分解为磷酸(Pi)。PPi是马铃薯块茎糖代谢的一个重要协同底物。在生物合成淀粉时, PPi的循环利用是通过叶绿体膜或液泡膜上的PPi转运体, 包括果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶(PFP)及PPase在内的酶等实现的^[7]。细胞质中的合成反应以及质体中的分解反应, 是通过调节PPi含量的高低来进行, 对调节蔗糖-淀粉相互转换起到重要作用, 而细胞质中蔗糖降解途径的能量是由质体中产生的PPi提供的, 抑制蔗糖的降解以及促进淀粉的合成, 就需要通过PPase去除PPi来完成。因此, PPi是联系马铃薯块茎细胞质和质体中蔗糖降解、淀粉合成以及淀粉贮藏器官中糖酵解代谢的纽带^[2,8]。王鹏等^[9]研究发现, 淀粉磷酸化酶和淀粉酶等酶活性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。Sonnewald^[10]发现在马铃薯芽的发育与生长过程中, 是由马铃薯块茎休眠解除后变为一个源器官来支持。在此过程中, 碳水化合物的变化, 即淀粉降解形成可溶性糖是与块茎发芽诱导有关的重要因素之一。

Hajirezaei 和 Sonnewald^[11]成功将PPase基因转入到马铃薯块茎中, 细胞质中的PPi含量明显降低, 并延长了转基因马铃薯块茎休眠期, 但由于是利用ST-LS1这种非特异表达的茎叶特异启动子所驱动的, 从而阻碍了转基因植株以及块茎的生

长发育。Farre等^[12]则利用Patatin B33这种块茎特异表达的启动子, 将PPase基因转入到马铃薯块茎中, 研究发现, 转基因微型马铃薯比未转基因的马铃薯发芽时间提前6~7周, 并能够保持稳定遗传, 说明对马铃薯休眠和发芽的调控可以通过对细胞质中PPi的调控得以实现。本研究以CaMV 35S强组成型启动子驱动的正义和反义PPase基因转基因马铃薯‘甘农薯2号’的块茎为试验材料, 通过测定块茎休眠相关生理生化指标的变化, 以期探讨PPase基因对马铃薯块茎休眠特性的影响, 从而为马铃薯块茎休眠性状的改良提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马铃薯栽培品种‘甘农薯2号(G2)’, 生育期130~150 d, 薯块休眠期长, 属晚熟类型。将前期研究获得的由组成型启动子CaMV 35S驱动的正义PPase基因马铃薯株系(G-2-4和G-2-5)和反义PPase基因马铃薯株系(G-1-1和G-1-2), 以及未转基因对照的微型薯种植于温室中^[13~15], 收获后各选取200粒薯型一样, 无病虫害的转基因马铃薯块茎分别放置于4℃和25℃黑暗条件下, 贮藏90 d后进行生理生化指标的测定。

1.2 测定方法

用紫外分光光度法通过测定单位时间内溶液中释放出的无机磷(Pi)含量测定PPase活性^[16]。无机磷含量的测定参照张永成和田丰^[17]的钼蓝比色法。葡萄糖含量的测定采用葡萄糖氧化酶法, 果糖、蔗糖和可溶性总糖的测定采用蒽酮-硫酸法^[18]。淀粉含量的测定参照张永成和田丰^[17]的比重法。

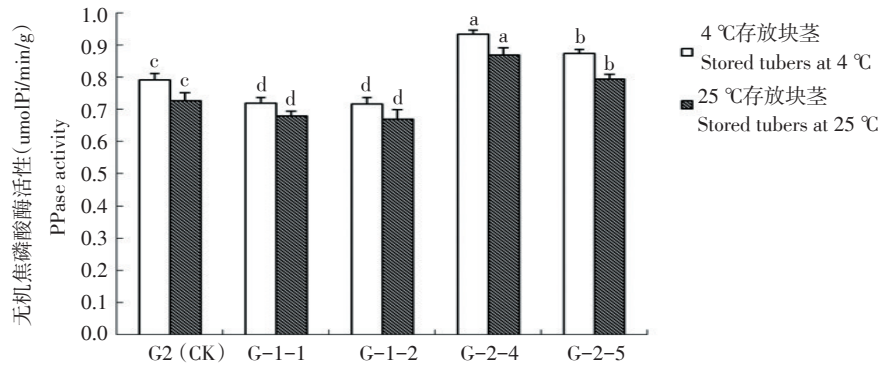
1.3 数据分析

所有生理指标测定试验均重复3次, 采用Microsoft Excel 2003和DPS v8.01专业版软件进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 不同贮藏温度下转正、反义PPase基因对块茎PPase活性和Pi含量的影响

从图1和图2可以看出, 4℃贮藏温度下转正义PPase基因马铃薯株系(G-2-4和G-2-5)的块茎PPase活性和Pi含量与G2(对照)相比均有显著性增高, PPase活性分别提高了17.5%和10.3%, Pi含量



G2: 未转基因对照; G-1-1, G-1-2: 转反义 *PPase* 基因马铃薯株系; G-2-4, G-2-5: 转正义 *PPase* 基因马铃薯株系。邓肯氏新复极差法检测差异显著性, 小写字母表示 0.05 水平差异显著性, 下同。

G2: Non-transgenic control; G-1-1, G-1-2: antisense transgenic potato lines; G-2-4, G-2-5: sense transgenic potato lines. Significantly difference at 0.05 level of probability with different small letters by Duncan's multiple range test. The same below.

图1 不同贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎的 *PPase* 活性
Figure 1 PPase activity of tubers of transgenic sense and antisense *PPase* gene plants under different storage temperatures

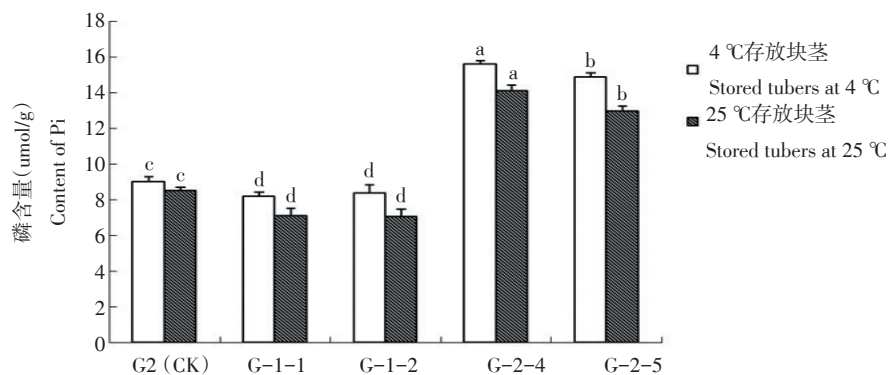


图2 不同贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎的 Pi 含量
Figure 2 Content of Pi in tubers of transgenic sense and antisense *PPase* gene plants under different storage temperatures

分别增加了 73.4% 和 65.4%。而 4 °C 贮藏温度下转反义 *PPase* 基因马铃薯株系 (G-1-1 和 G-1-2) 的块茎 *PPase* 活性和 Pi 含量与 G2 相比均有显著性降低, *PPase* 活性分别降低了 9.3% 和 9.5%, Pi 含量分别降低了 9.2% 和 6.7%。25 °C 贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯贮藏块茎 *PPase* 活性和 Pi 含量与 G2 比较的变化趋势与 4 °C 贮藏温度大致相似, 但 4 °C 下贮藏块茎的 *PPase* 活性和 Pi 含量均高于 25 °C 下的贮藏块茎。

2.2 不同贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因对块茎可溶性糖含量的影响

由表 1 可以看出, 在 25 °C 贮藏温度下, 与 G2 相比, 转反义 *PPase* 基因马铃薯株系 (G-1-1 和 G-

1-2) 块茎的果糖、可溶性总糖、蔗糖和葡萄糖含量分别降低了 14.36%、8.68%、8.61%、21.89% 和 32.10%、11.24%、11.37%、19.59%, 且差异均达到极显著水平。转正义 *PPase* 基因马铃薯株系 (G-2-4 和 G-2-5), 其果糖、可溶性总糖、蔗糖和葡萄糖含量分别提高 29.71%、24.22%、20.57%、35.21% 和 41.57%、29.91%、27.54%、31.17%, 差异也均达到极显著水平。

由表 2 可以看出, 在 4 °C 贮藏温度下, 转正义 *PPase* 基因马铃薯株系 (G-2-4 和 G-2-5) 块茎的果糖、可溶性总糖、蔗糖和葡萄糖含量分别较 G2 提高了 13.02%、19.60%、16.18%、26.24% 和 32.32%、25.57%、15.11%、28.80%, 且差异均达到极显著水

表 1 25 ℃贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎的可溶性糖含量
Table 1 Soluble sugar content of tubers of transgenic sense and antisense *PPase* gene potato under 25 ℃ storage temperature

株系 Plant line	可溶性总糖含量(mg/g·FW) Soluble total sugar	果糖含量(mg/g·FW) Fructose	蔗糖含量(mg/g·FW) Sucrose	葡萄糖含量(mg/g·FW) Glucose
G2(CK)	237.61 Bb	9.19 Cc	81.44 Bb	12.61 Bb
G-1-1	216.98 Cc	7.87 Dd	74.43 Cc	9.85 Cc
G-1-2	210.91 Cc	6.24 Dd	72.18 Cc	10.14 Cc
G-2-4	295.17 Aa	11.92 Bb	98.19 Aa	17.05 Aa
G-2-5	308.69 Aa	13.01 Aa	103.87 Aa	16.54 Aa

注：邓肯氏新复极差法检测差异显著性，小写字母表示0.05水平差异显著性，大写字母表示0.01水平差异显著性，下同。

Note: Significantly difference at 0.05 level of probability with different small letters in the same column; significantly difference at 0.01 level of probability with different capital letters by Duncan's multiple range test. The same below.

表 2 4 ℃贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎的可溶性糖含量
Table 2 Soluble sugar content of tubers of transgenic sense and antisense *PPase* gene potato under 4 ℃ storage temperature

株系 Plant line	可溶性总糖含量(mg/g·FW) Soluble total sugar	果糖含量(mg/g·FW) Fructose	蔗糖含量(mg/g·FW) Sucrose	葡萄糖含量(mg/g·FW) Glucose
G2(CK)	221.19 Bb	8.91 Bb	80.08 Bb	12.12 Bb
G-1-1	194.16 Cc	7.27 Cc	66.25 Cc	8.95 Cc
G-1-2	189.59 Dd	5.72 Dd	68.10 Cc	7.81 Cc
G-2-4	264.54 Aa	10.07 Aa	93.04 Aa	15.30 Aa
G-2-5	277.74 Aa	11.79 Aa	92.18 Aa	15.61 Aa

平。转反义 *PPase* 基因马铃薯株系(G-1-1和G-1-2)块茎的果糖、可溶性总糖、蔗糖和葡萄糖含量分别较G2降低了18.41%、12.22%、17.27%、26.16%和35.80%、14.29%、14.96%、35.56%，差异也均达到极显著水平。

2.3 不同贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎中淀粉含量的变化

由表3可以看出，在25 ℃温度下，转正义 *PPase* 基因马铃薯块茎(G-2-4和G-2-5)淀粉含量较G2减少7.10%和3.43%，G-2-4达到显著性变化；在4 ℃温度下其淀粉含量较G2减少4.97%和6.24%，差异达到显著水平。转反义 *PPase* 基因马铃薯块茎(G-1-1和G-1-2)淀粉含量较G2在25 ℃温度下增加6.91%和11.69%，G-1-2达到极显著性变化；在4 ℃温度下增加7.85%和9.17%，差异达到极显著水平。

3 讨 论

PPi作为植物体内糖代谢途径中多步反应的协

表 3 在25 ℃和4 ℃贮藏温度下转正、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎中淀粉含量

Table 3 Starch content of tubers of transgenic sense and antisense *PPase* gene plants under 25 ℃ and 4 ℃ storage temperatures

株系 Plant line	4 ℃块茎淀粉含量 (μmol/g·FW) Starch at 4 ℃	25 ℃块茎淀粉含量 (μmol/g·FW) Starch at 25 ℃
G2(CK)	23.56 Bb	19.84 BCb
G-1-1	25.41 Aa	20.21 Bb
G-1-2	25.72 Aa	22.16 Aa
G-2-4	22.39 BCc	18.44 Cc
G-2-5	22.09 Cc	19.16 BCbc

同因子(Co-substrate)，在马铃薯块茎细胞质和质体中的蔗糖降解、淀粉合成和糖酵解等代谢中都起到至关重要的作用。PPi含量的高低还能协调细胞质和质体中的合成与分解反应，最终调节蔗糖-淀粉的相互转换。PPase是以PPi为底物的水解酶，因此，可以利用强组成性启动子CaMV35S驱动的

PPase 基因在马铃薯中增强或抑制表达, 对光合原初产物向蔗糖合成进行调控, 进而调控蔗糖代谢途径, 最终达到通过分子手段对马铃薯块茎的休眠与发芽特性进行调控^[14,15]。

本研究结果表明, 贮藏于 4 ℃ 和 25 ℃ 温度下的转正义、反义 *PPase* 基因马铃薯块茎休眠相关的生理生化指标发生了显著变化。转正义 *PPase* 基因马铃薯块茎 *PPase* 活性和 Pi 含量较未转基因对照均有显著性增高; 而转反义 *PPase* 基因马铃薯块茎 *PPase* 活性和 Pi 含量较未转基因对照均有显著性降低。基于 *PPase* 主要功能在于能够将 PPi 水解为 Pi, 因此, 无机 Pi 含量的变化反映了 *PPase* 活性的高低, 这与张春风^[15]研究基本一致。在不同贮藏温度下, 转反义 *PPase* 基因马铃薯块茎的各种糖含量分别较未转基因对照极显著降低; 转正义 *PPase* 基因马铃薯块茎较未转基因对照极显著升高。转正义 *PPase* 基因块茎淀粉含量较未转基因对照在 4 ℃ 贮藏温度下均有显著降低, 25 ℃ 贮藏温度下, 只有 G-2-4 的淀粉含量显著低于未转基因对照; 转反义 *PPase* 基因马铃薯块茎的淀粉含量较未转基因对照在 25 ℃ 贮藏温度下有明显增加, 4 ℃ 贮藏温度下淀粉含量极显著增加。转正义 *PPase* 基因马铃薯块茎增强了 *PPase* 基因的表达, *PPase* 活性增强, 加快了 PPi 的去除速率, 调节了 PPi 和 Pi 的比例, 促进了蔗糖代谢途径中向着蔗糖生化合成方向进行^[2,6]。而转反义 *PPase* 基因马铃薯块茎中 *PPase* 活性的降低对蔗糖积累起到了一定的抑制作用, 调节了蔗糖/淀粉比例。马铃薯从种植到收获贮藏的整个过程中影响因素众多, 加之利用外源基因调控植物生长代谢的复杂性, 对于如何利用 *PPase* 基因调控马铃薯块茎休眠特性仍需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] 关明阳. 世界马铃薯的生产现状及展望 [J]. 马铃薯杂志, 1993, 7 (2): 126-128.
- [2] 司怀军, 张宁, 王蒂. 马铃薯块茎休眠和发芽的分子机理及调控策略 [J]. 中国马铃薯, 2007, 21(2): 104-107.
- [3] Kotch G P, Ortiz R, Peloquin S J. Genetic analysis by use of potato haploid populations [J]. Genome, 1992, 35: 103-108.
- [4] Edwards J, ap Rees T, Wilson P M, *et al.* Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissue of *Pisum sativum* L. [J]. Planta, 1984, 162: 188-191.
- [5] Weiner H, Stitt M, Heldt H W. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves [J]. Biochim Biophys Acta, 1987, 893: 13-21.
- [6] Femie A R, Willmitzer L, Trethewey R N. Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology [J]. Trends in Plant Sci, 2002, 7: 35-41.
- [7] Lunn J E, Douce R. Transport of inorganic pyrophosphate across the spinach chloroplast envelope [J]. Biochem J, 1993, 290: 375-379.
- [8] Kunit M J. Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast [J]. Gen Physiol, 1952, 35: 423-449.
- [9] 王鹏, 连勇, 金黎平. 马铃薯块茎休眠及萌发过程中几种酶活性变化 [J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 33-36.
- [10] Sonnewald U. Control of potato tuber sprouting [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6: 333-335.
- [11] Hajirezaei M, Sonnewald U. Inhibition of potato tuber sprouting: Low levels of cytosolic pyrophosphate lead to nonsprouting tubers harvested from transgenic potato plants [J]. Potato Res, 1999, 42: 353-372.
- [12] Farre E M, Bachmann A, Willmitzer L, *et al.* Acceleration of potato tuber sprouting by expression of a bacterial pyrophosphatase [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 268-272.
- [13] 刘海英, 李有忠, 柳娜, 等. 马铃薯无机焦磷酸酶基因 cDNA 克隆及其反义植物表达载体构建 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 131-135.
- [14] 李有忠. 马铃薯遗传转化体系的优化及无机焦磷酸酶基因导入的研究 [D]. 甘肃农业大学, 2008: 22-26.
- [15] 张春风. 转 *PPase* 基因马铃薯块茎休眠和发芽特性的分析与评价 [D]. 甘肃农业大学, 2009: 44-48.
- [16] Jukka K H, Reijo J L. A New and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase [J]. Analytical Biochemistry, 1981, 113: 313-317.
- [17] 张永成, 田丰. 马铃薯试验研究方法 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 152-153, 168-169.
- [18] 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 136-138.