

马铃薯块茎休眠和发芽的分子机理及调控策略

司怀军^{1,2}, 张 宁^{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 兰州 730070)

摘 要: 马铃薯块茎的休眠和发芽对于马铃薯的栽培、块茎生产和加工工业都极为重要。本文综述了马铃薯块茎休眠和发芽的分子生物学研究进展, 着重介绍了通过调控块茎糖代谢中的协同因子——无机焦磷酸来调控块茎休眠和发芽特性的分子策略。

关键词: 马铃薯; 块茎; 休眠; 发芽; 分子调控

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是重要的粮菜兼用和工业原料作物。马铃薯块茎的休眠和发芽对于马铃薯的栽培、块茎生产和加工工业都极为重要。在马铃薯栽培中, 块茎作为种薯时休眠程度影响着田间出苗的早晚、整齐度和产量的高低, 尤其在二季作区, 休眠会延长块茎的发芽和生长, 最终影响产量的提高。当块茎作为食品和加工原料时, 要求有较长的休眠期, 以便运输和贮藏, 休眠解除会造成水分养分大量消耗, 以至丧失商品质量和应用价值。由于对块茎休眠和发芽机理了解的欠缺, 人工调控技术发展缓慢, 从而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^[1]。因此, 研究块茎休眠和发芽的分子机理及调控, 对于马铃薯栽培、贮藏保鲜和产业的发展等具有十分重要的意义。

1 马铃薯块茎休眠和发芽现象

马铃薯块茎收获后, 即使给予最适宜于发芽的各种条件(温度、湿度、氧气等)也不能很快发芽, 必须经一定时间后才能发芽, 这种现象称为块茎的休眠^[2]。休眠时的块茎, 仍保持着生命活动, 维持着最低的生理功能, 只有经过一定的贮藏后, 休眠解除或对块茎强行打破休眠, 块茎才能进一步发芽生长。马铃薯的休眠和发芽是一个非常复杂的生物

学过程, 众多的环境、生理和遗传因子对生产和贮藏过程中马铃薯的休眠和发芽都有直接和间接的影响^[3]。在栽培条件下, 土壤和天气情况如极端的冷湿、干热, 温度以及各种栽培措施如施肥、灌水等对采收后马铃薯的休眠和发芽都有影响。在贮藏条件下, 品种、块茎生理年龄和生化状态、贮藏时间及条件如温度、空气相对湿度、光照、氧气浓度、二氧化碳浓度及马铃薯块茎产生的挥发性物质都直接影响块茎的休眠和发芽^[4]。品种不同休眠期长短有很大差异, 短的1个月, 长的3个月以上。目前对马铃薯块茎休眠和发芽的研究大多集中在贮藏生理、遗传、细胞生物学及激素调控方面。

2 影响马铃薯块茎休眠和发芽的生理因素

Lang等^[5]将休眠的原因分为环境因子(Ecodormancy), 外部生理抑制因子(Paradormancy)和内部生理抑制因子(Endodormancy)。块茎形成及收获后的一段时期, 马铃薯所有的芽均处于生理休眠(Endodormancy)。生理休眠解除后, 芽的生长受环境抑制(Ecodormancy)。生理休眠时间的长短及强度受遗传因素和环境因素的影响, 低温和潮湿的条件延长休眠期, 而高温和干燥的条件可以缩短休眠期^[6]。块茎休眠受多种因素的控制, 既有一些生长物质如脱落酸^[7]、赤霉素^[8]、细胞分裂素^[9]、生长素^[10]、乙烯^[11]、茉莉酸^[12], 又有激酶和一些蛋白因子的调控^[13], 但目前研究的都不是非常清楚。目前众多研究比较赞成抑制因子/促进因子平衡调节休眠的学说, 即当某种因子占优势时, 块茎将表现该因子所控制的性状,

收稿日期: 2006-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571182)

作者简介: 司怀军(1971-), 男, 博士, 副教授, 主要从事马铃薯生物技术育种研究。

这与种子休眠的调控模式是一致的。

3 马铃薯块茎休眠和发芽的分子生物学研究进展

块茎休眠的分子机理是相当复杂的, 可能涉及许多相关基因和蛋白。Van den Berg 等^[14]通过数量性状基因座 (QTL) 研究发现, 至少有 9 个不同的位点与块茎休眠有关, 并且这些 QTLs 单独或通过上位性互作来影响块茎的休眠。周志钦^[15]用 cDNA-AFLP 技术对马铃薯块茎从休眠到发芽整个过程中差异表达的基因进行了 mRNA 指纹分析, 初步确定了马铃薯块茎从休眠到发芽过程中主要差异表达基因及其表达的模式, 将马铃薯块茎休眠和发芽过程中差异表达的基因大致分为调节基因、与光和能量代谢相关基因、与外界逆境胁迫相关基因、与植物激素 (IAA) 代谢相关基因和未知同源性及功能基因。该研究结果表明, 马铃薯块茎的休眠虽然是其生长发育生命周期中一个相对静止的时期, 但整个过程仍然不断地有不同活性的基因表达。

Borgmann 和 Sinha^[16]通过源库关系进行了块茎休眠调控的研究, 从块茎中提取蛋白质进行双向电泳分析, 发现一些特定的库蛋白被作为发育蛋白和关键酶参与碳水化合物的代谢。在块茎发芽的开始, 贮藏块茎转变成源器官而支持芽的发育和生长。在此过程中, 淀粉和蛋白质的降解被启动而形成可溶性糖和氨基酸。因此, 通过调节蔗糖的代谢途径可以调控块茎的发芽特性^[4]。对于特定的代谢途径, 一般是通过抑制或增强反应的速率而进行调控, 但由于基因的精细调控和代谢过程之间的相互影响 (Cross-talk), 使得这些策略变得复杂甚至作用很小。另外, 如果在代谢过程中存在协同底物 (Co-substrates), 将协同底物除去后可以使可逆的反应变为不可逆。在糖代谢中这样的协同因子为无机焦磷酸 (Inorganic pyrophosphate, PPi)。蔗糖代谢在两步酶促反应中需要 PPi (图 1), 使 PPi 成为代谢工程很好的研究对象。(1) 在蔗糖降解形成的尿嘧啶二磷酸葡萄糖 (UDPG) 经 UDPG 焦磷酸化酶的催化转化成葡萄糖-1-磷酸 (G-1-P) 的反应中, 需要 PPi 作为协同因子; (2) 在糖酵解的关键步骤果糖-6-磷酸 (F-6-P) 转化成果糖-1, 6-二磷酸 (F-1, 6-2-P) 的过程中, 该反应可以由果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶 (PF) 催化。PF 催化的反应是可

逆的, 并且依赖于无机磷酸 (Pi) 和 PPi 的比率, 当 PPi 缺乏时, PFP 使 Pi 和 F-1, 6-2-P 转化成 F-6-P 和 PPi。因此, 除去细胞质中的 PPi 可以抑制蔗糖的降解和促进蔗糖的合成^[17]。

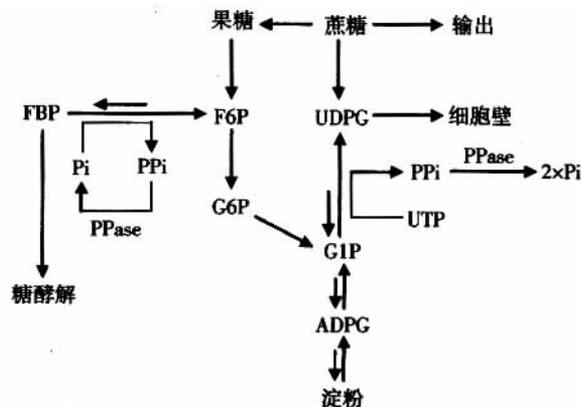


图 1 马铃薯块茎中的蔗糖代谢途径

UDPG- 尿嘧啶二磷酸葡萄糖 (UDP-glucose); Pi- 无机焦磷酸 (inorganic phosphate); PPase- 无机焦磷酸酶 (inorganic pyrophosphatase); G1P- 1-磷酸葡萄糖 (glucose-1-phosphate); ADPG- 腺嘌呤核苷二磷酸葡萄糖 (ADP-glucose); F6P- 6-磷酸果糖 (fructose-6-phosphate); FBP- 1,6-二磷酸果糖 (fructose-1,6-bisphosphate); G6P- 6-磷酸葡萄糖 (glucose-6-phosphate)。

PPi 是一种高能化合物, 其水解释放的自由能与 ATP 相似。PPi 也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。在淀粉的生物合成中, 通过叶绿体膜上的 PPi 转运体^[18], 或由 PFP 或液泡膜焦磷酸酶在内的循环过程实现 PPi 的循环利用^[19]。PPi 水平的高低将细胞质中的合成反应和质体中的分解反应有机协调, 从而在蔗糖-淀粉的转换中起到重要的调节作用^[17]。

植物细胞中 PPi 的含量非常丰富^[20-21], 并且主要位于细胞溶质中, 浓度为 0.2~0.3 mmol·L⁻¹^[22-23]。PPi 代谢是由无机焦磷酸酶 (Inorganic pyrophosphatase, PPase) 催化分解为磷酸, 是蔗糖合成途径的重要调控点之一。PPase 的重要功能是促进合成代谢^[24]。目前, 已从大肠杆菌^[25]、拟南芥^[26]和马铃薯^[27]等物种中克隆出了无机焦磷酸酶 (PPase) 基因, 并且它们之间具有很高的同源性^[27]。通过将细菌可溶性 PPase 在转基因烟草和马铃薯细胞溶质中的表达证明, 细胞溶质中 PPi 具有重要的生理功能^[28-30]。

为了证明 PPase 在马铃薯块茎休眠和发芽中的

调控功能, Hajirezaei 和 Sonnewald^[31]利用光诱导的叶茎特异启动子 (ST-LS1) 驱动的 PPase 基因的表达来降低细胞溶质中的 PPI, 能够延迟转基因马铃薯块茎的发芽, 未转基因对照的块茎在室温下贮藏 4 个月开始发芽, 而部分转基因植株的块茎贮藏 2 年仍不发芽。但由于转基因植株对细胞中的 PPI 非特异性的排除, 从而影响了植株的生长和块茎的发育。Farre 等^[32]利用块茎特异表达 patatin 启动子驱动的大肠杆菌 PPase 基因的表达研究表明, 转基因植株的块茎比未转基因对照块茎的发芽提前 6~7 周。因此, 通过调控细胞溶质中的 PPI 含量可以调控块茎的休眠和发芽^[4]。

4 马铃薯块茎休眠和发芽的分子调控策略

在利用 PPase 基因调控块茎的休眠和发芽时, 启动子的选择是至关重要的^[4, 31-32]。Hajirezaei 和 Sonnewald^[31]利用光诱导的叶茎特异启动子 (ST-LS1) 驱动的 PPase 基因虽然获得了大幅度延长块茎休眠期的转基因马铃薯, 但由于影响了植株的生长和块茎的发育而难于应用于生产实践。基因表达调控最主要的调控位点是转录水平的调控, 而启动子的调控在转录水平调控中又占有十分重要的地位。组织特异型启动子或诱导型启动子能控制基因在特定时期、特定的器官或组织部位表达, 并往往表现出发育调节的特性。这既避免了目的基因在寄主细胞内高表达对寄主细胞生长的影响, 又可使寄主细胞对诸如低温、光照、激素、创伤等特定的环境信号作出反应。因此, 我们利用块茎特异表达 patatin 启动子 CIPP 和已经克隆并鉴定的低温诱导启动子 rd29A^[33], 分别构建 CIPP 和 rd29A 启动子驱动的正反义 PPase 基因植物表达载体, 然后转化优质马铃薯品种, 对马铃薯块茎的休眠和发芽特性进行分子调控, 以培育出块茎休眠期长的马铃薯育种材料或新品种, 以提高马铃薯的贮藏保鲜能力和加工原料的质量; 同时, 培育出块茎休眠期短的马铃薯育种材料或新品种, 以提高马铃薯种薯的质量和第二季作区马铃薯的产量, 从而代替化学药剂的调控, 以降低成本和对环境的污染。

[参 考 文 献]

- [1] 连勇, 金黎平, 丁明亚. 马铃薯块茎发育及休眠调控研究进展 [M]//陈伊里. 中国马铃薯研究与产业开发. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2003: 65-69.
- [2] Hemberg T. Potato rest [M]//Li P H. Potato Physiology. London: Academic Press, 1985: 353-388.
- [3] 张丽莉, 陈伊里, 连勇. 马铃薯块茎休眠及休眠调控研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2003, 17 (6): 352-356.
- [4] Sonnewald U. Control of potato tuber sprouting [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6: 333-335.
- [5] Lang G A, Early J D, Martin G C, et al. Endo-para-dormancy: physiology terminology and classification for dormancy research [J]. Hortiscience, 1987, 22: 371-377.
- [6] Krijithe N. Observations on the sprouting of seed potatoes [J]. European J of Potato Research, 1962, 5: 316-333.
- [7] Suttle J C. Postharvest changes in endogenous ABA levels and ABA metabolism in relation to dormancy in potato tubers [J]. Physiol Plant, 1995, 95: 233-240.
- [8] Turnbull C G N, Hatnke D E. The control of bud dormancy in potato tubers. Evidence for the primary role of cytokinins and a seasonal pattern of changing sensitivity to cytokinin [J]. Plant, 1985, 165: 359-365.
- [9] Hemberg T. The action of some cytokinins on the rest-period and the connect of acid growth-inhibiting substances in potato [J]. Physiol Plant, 1970, 23: 850-858.
- [10] Sukhova L S, Machackova I, Edeer J, et al. Changes in the level of free IAA and cytokinins in potato tuber during dormancy and sprouting [J]. Biol Plant, 1993, 35: 387-391.
- [11] Suttle J C. Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 843-848.
- [12] Van den Bergh J H, Ewing E E. Jasmonates and their role in plant growth and development, with special reference to the control of potato tuberization: a review [J]. American Potato J, 1991, 68: 781-794.
- [13] Campbell M A, Suttle J C, Sell T W. Changes in cell cycle status and expression of p34cdc2 kinase during potato tuber meristem dormancy [J]. Physiol Plant, 1996, 98: 743-752.
- [14] Van den Berg J H, Ewing E E, Plaisted R L, et al. QTL analysis of potato tuber dormancy [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 317-324.
- [15] 周志钦. 马铃薯从休眠到发芽过程差异表达基因的分析 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23 (3): 213-215.
- [16] Borgmann K, Snaha P. Changes in the two dimensional protein pattern and in gene expression during the sink-to-source transition of potato tubers [J]. Plant Science, 1994, 99: 97-108.
- [17] 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.
- [18] Lunn J E, Douce R. Transport of inorganic pyrophosphate across the spinach chloroplast envelope [J]. Biochem J, 1993, 290: 375-379.
- [19] Ferre E M, Geigenberger P, Willmitzer L, et al. A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber [J]. Plant Physiol, 2000, 123: 681-688.

- [20] Edwards J, ap Rees T, Wilson P M, et al. Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissues of *Pisum sativum* L. *Planta*, 1984, 162: 188- 191.
- [21] Smyth D A, Black C C. Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues [J]. *Plant Physiol*, 1984, 75: 862- 864.
- [22] Weiner H, Stitt M, Heldt H W. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 893: 13- 21.
- [23] Takeshige K, Tazawa M. Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina* [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 3262- 3266.
- [24] Kornberg A. On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions [M]//Kasha M, Pullman E. *Horizons in Biochemistry*. New York: Academic Press, 1962, 251- 287.
- [25] Lahti R, Pitkaranta T, Valve E, et al. Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K- 12 [J]. *J Bacteriol*, 1988, 170: 5901- 5907.
- [26] Kieber J J, Signer E R. Cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 345- 348.
- [27] du Jardin P, Rojas -Beltran J, Cebhardt C, et al. Molecular cloning and characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase in potato [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 853- 860.
- [28] Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, et al. Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol [J]. *Planta*, 1992, 188: 238- 244.
- [29] Sonnewald U. Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilates partitioning in leaves of transgenic plants [J]. *Plant J*, 1992, 1: 95- 100.
- [30] Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, et al. Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants [J]. *Plant J*, 1995, 7: 259- 270.
- [31] Hajirezaei M, Sonnewald U. Inhibition of potato tuber sprouting: low levels of cytosolic pyrophosphate lead to non-sprouting tubers harvested from transgenic potato plants [J]. *Potato Res*, 1999, 42: 353- 372.
- [32] Farre E M, Bachmann A, Willmitzer L, et al. Acceleration of potato sprouting by the expression of a bacterial pyrophosphatase [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 268- 272.
- [33] 张宁, 司怀军, 王蒂. 拟南芥 rd29A 基因启动子克隆及其在马铃薯抗胁迫转基因中的应用 [J]. *作物学报*, 2005, 31(2): 159- 164.

农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心 (哈尔滨) 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所

中心简介: 农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)是由黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所承担筹建的, 2001年通过农业部双认证评审。该“中心”是中华人民共和国农业部授权的经国家计量认证的法定检验机构, 是社会公益性的非营利技术服务事业单位。承担着全国范围内的脱毒马铃薯种薯质量检验、仲裁检验、委托检验、市场抽检和检测标准研究修订等任务, 并开展技术咨询, 业务培训等其它有关方面工作。现已发展成为集脱毒马铃薯质量检验、科研和技术服务于一体的综合性质量监督检验机构。

“中心”现有工作人员 30 名, 其中研究员 4 名、副研究员 2 名、博士生 3 名, 硕士生 8 名。下设业务室、检测一室、检测二室, 检测三室和财务室。“中心”配备透射电镜、扫描电镜、光学显微镜、电泳仪、酶标仪、超高速离心机、解剖镜、超薄切片机、紫外分光光度计、超净工作台、电子分析天平等大型精密仪器以及与检测业务相关的其它仪器 30 余台/件。同时, 还建有指示植物检测用防虫网室、自动化智能温室等。

“中心”先后参与起草了中华人民共和国国家标准《马铃薯脱毒种薯》, 中华人民共和国农业行业标准《马铃薯种薯产地检验规程》。多次承担相关领域的国家科技部项目, 国际合作项目, 省攻关项目, 省重大项目等并取得科研成果多项。多次完成农业部下达的全国马铃薯种薯安全普查工作。

在马铃薯脱毒原种生产方面, “中心”收集了国内外生产上主栽品种 80 多个。新筛选品种 3 个(适合加工薯条、薯片、超早熟和高淀粉品种)。先后研制了“水耕气雾法”和“MOD”栽培技术, 并申报了国家专利。现已推广, 并大面积应用。年可生产无主要病毒和类病毒的脱毒试管苗 50 万株, 1-20 克脱毒微型种薯 500 万粒, 已成为黑龙江省最大的脱毒试管苗提供中心和脱毒微型种薯繁育中心。

检测能力: 中心可检验的产品有: 脱毒马铃薯种薯、原种、良种等; 可检测的参数为: 马铃薯病毒(PVX、PVY、PVA、PVS、PVM、PLRV、PSTVd)、马铃薯环腐病、青枯病、癌肿病、黑胫病、晚疫病、有缺陷薯、冻伤、品种纯度、薯类还原糖及淀粉含量的测定等。

地 址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号

联系电话: (86) 0451- 86619234、86689581

传 真: 0451- 86619234

邮 编: 150086

联系人: 李学湛

手 机: 13313630345 E-mail: xuezhanli @tom.com