

马铃薯块茎发育过程中的影响因子

王翠松, 张红梅, 李云峰

(河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘 要: 本文介绍了马铃薯块茎发育(块茎诱导、发生、膨大、休眠和复苏)过程中的各种影响因素。

关键词: 马铃薯; 块茎发育; 影响因子

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2003) 01-029-05

马铃薯块茎除了用了食物和饲料外, 还可用于下代植株的发生材料。马铃薯块茎可看作一个膨大的地下茎, 其表面按叶序方式排列着许多腋芽(芽眼)。当块茎作为播种材料播种时, 有些腋芽破除休眠萌发生长, 长到一定阶段后, 茎的叶腋处分化出侧生分生组织, 其中地上部分的腋芽长成侧枝, 地下部分的腋芽长成匍匐茎(stolon)。在适宜的条件下, 匍匐茎停止生长, 其顶部区域的髓细胞和表皮层细胞开始膨大, 而后进行纵裂, 最终导致匍匐茎近顶端部的膨大。当膨大部位直径达 2~4 mm 时^[1], 细胞纵裂停止, 并从环髓部位进行定向分裂和细胞扩大, 一直延续到块茎达到它的最终大小。只有在黑暗条件下, 匍匐茎横向生长, 进而膨大成为块茎; 在光照条件下, 匍匐茎向上生长, 转化成为正常的枝条, 从而失去形成块茎的能力。

大田中的马铃薯植株, 块茎形成的同步性低, 再加上土壤对其产生的影响, 进行块茎发育及其相关过程的研究十分困难。但在离体条件下^[2,3], 当把马铃薯带节的单一茎段接种在含有抗赤霉素(CCC)、细胞分裂素(CTK)和高浓度蔗糖的块茎诱导培养基上, 随着侧芽的生长, 叶腋处可抽生匍匐茎, 不仅匍匐茎可膨大成为块茎, 腋芽也可以直接发育成块茎, 并且同步性频率高。离体条件下培养获得的块茎超显微结构和糖代谢过程中的酶活力^[4], 与田中生长的块茎的情况相当。但离体条

件下块茎的发生方式有所不同, 它对光周期及大部分影响块茎形成的因素不敏感。

块茎诱导、发生、膨大、休眠和复苏是马铃薯块茎的典型生活史。块茎的发生和发育是一个复杂的生物学过程, 单个信息诱导或营养代谢途径的变化, 能够调节块茎的发育过程。有关这方面的研究所取得的进展, 我们将按块茎发育的生活史来介绍。

1 块茎诱导过程中的影响因素

1.1 植物激素在块茎诱导中的作用

除了短日照(或黑暗)、低温和低浓度的氮肥有利于块茎的诱导外^[5], 目前有许多报道介绍了赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTK)、茉莉酮酸及其相关化合物、脱落酸(ABA)等植物激素对块茎的诱导具有十分重要的作用。马铃薯块茎诱导过程中, 研究最清楚的是赤霉素, 目前一致的观点是: 块茎诱导过程中赤霉素的水平下降。外界施加赤霉素可抑制块茎的形成。此外, Carrera 等在转基因研究中也发现高水平的赤霉素抑制块茎形成。Carrera 等通过调节内源赤霉素氧化酶的活性来改变植株体内赤霉素的含量, 赤霉素氧化酶的过量表达可使赤霉素水平提高^[6], 从而导致马铃薯植株需要长时间的黑暗环境来形成块茎。相反, 赤霉素氧化酶活性受到抑制的植株, 在黑暗(或短日照)条件下生长可提早形成块茎。上述结果表明, 低水平的赤霉素有利于块茎的诱导。在离体的条件下, 在马铃薯匍匐茎上外源施加细胞分裂素有利于块茎的诱

导, 因此认为细胞分裂素促进块茎的诱导。但植株体内内源细胞分裂素提高的转基因植株^[7], 块茎形态和复苏呈现与正常植株不同的发育模式。有关块茎诱导的新的植物激素是茉莉酮酸及其衍生物。块茎酸 (Tuberonic acid) 的化学性质与茉莉酮酸相似, 在离体的条件下, Jackson 等发现它也可促进块茎诱导^[5], 认为它具有块茎诱导的信号。但通过 allene 氧化环化酶的表达来提高植株内源茉莉酮酸的水平^[8], 对块茎诱导没有影响。此外, Kolomiets 等发现脂氧合酶活性受抑制的转基因马铃薯植株, 变形块茎数量少^[9], 而对于在正常情况下有利于块茎发生的因素没有反应。抑制脂氧合酶活性, 对脂肪酸氧化途径产物的形成是否有影响的生物化学分析, 到目前为止仍未见报道。但有一点可以肯定的是, 脂肪酸氧化途径中的代谢产物参与块茎的诱导和膨大。

1.2 光敏色素在块茎诱导中的作用

早在 1956 年 Gregory 等发现马铃薯叶片中含有一种刺激物^[10], 当嫁接时发现, 这种刺激物是可以传递的。把烟草的成花诱导植株嫁接到马铃薯芽上, 结果导致块茎的形成, 认为块茎诱导刺激物与成花刺激物具有一定的相似性。Jackson 等在嫁接 (graft) 试验中发现^[11], 光敏色素 B 与一种可传递的块茎形成抑制剂的产生有关。此外, Yanofsky 等利用转基因的马铃薯植株^[12], 发现光敏色素 A 参与昼夜节律钟 (circadian clock) 的重排, 在没有诱导块茎形成的条件下, 延迟块茎的形成。综上所述, 光敏色素 A 和 B 具有抑制块茎诱导的作用。

1.3 蔗糖等碳水化合物在块茎诱导中的作用

在离体的条件下, 必须有高浓度的蔗糖才能成功的诱导块茎形成, 表明蔗糖在块茎诱导过程中起到一定的作用。Riesmeier 等发现蔗糖转运蛋白 (transporter) 的活性受到抑制的转基因植株^[13], 块茎的形成显著的降低。但这种影响不能直接归因于蔗糖运输受阻的结果。可利用的碳水化合物含量的下降也可导致块茎形成较晚。蔗糖处理能刺激块茎的形成, 而淀粉和蔗糖都能够作为块茎的内含物, 只能认为碳水化合物等营养物质的转运对块茎的诱导有重要作用, 在此过程中, 碳水化合物向匍匐茎顶端的转移可能比它本身的合成更重要, 调节这种转移的基因才是块茎诱导的基本因素, 但到目前为止, 仍未分离到这样的基因。

2 块茎发生和膨大过程中的影响因素

块茎发生和膨大除了形态学和匍匐茎向块茎转化早期阶段发生的细胞分裂方面的变化外, 还伴随着大量生理和新陈代谢方面的变化。在块茎膨大过程中, 贮存大量碳水化合物 (主要是淀粉) 和蛋白质, 并且块茎的代谢水平降低, 为此使它成为典型的贮藏营养物质的库 (sink)。

2.1 蛋白质含量的变化

马铃薯块茎鲜重的 2% 左右是蛋白质, 15%~25% 是淀粉, 匍匐茎向块茎的转化过程中, 蛋白质组成发生巨大的变化, 形成许多简单的蛋白质添加物 (protein complement), 它仅由几种高度复杂的蛋白质如马铃薯块茎蛋白 (patatin) 组成。一些学者为了证明块茎发育早期阶段特异的蛋白质的合成是否与块茎发育有关, 而作了大量的试验。后来发现, 这些块茎特异的蛋白质是马铃薯块茎蛋白或各种蛋白酶抑制剂, 它们的合成只是块茎发育过程所伴随的, 并不是必需的, 也排除了它们在块茎发生中的作用。最近, 通过对马铃薯块茎膨大各个阶段的 cDNA 扩大片断长度多态性分析 (cDNA amplified fragment-length polymorphism)^[14], 发现多种基因在块茎膨大中发挥作用。Bachem 等构建了马铃薯转基因植株^[15,16], 其中一个基因与类固醇脱氢酶同源, 另一个基因与可溶性 α -N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白同源, 这两个基因在植株体内独立表达, 互不干扰, 结果发现转基因植株块茎发育中只呈现较小的变化或是多效性的变化, 为此很难估计这两种蛋白质在块茎发育中的作用。

2.2 碳水化合物的代谢作用

在块茎发生和膨大的早期阶段, 淀粉代谢发生巨大变化, 以及发育中的匍匐茎需要大量的碳水化合物如蔗糖作为块茎诱导的最佳条件, 淀粉的形成对块茎发生和膨大是十分重要的, 把它作为块茎发生和膨大的指标不足为奇。然而转基因技术研究表明, 淀粉形成对块茎发生和膨大并不是必需的, 因此不宜作为块茎发生和膨大的指标。Muller-Rober 等人将 AGP 酶 (ADP-葡萄糖焦磷酸化酶, 淀粉合成途径中的关键酶) 一个亚基的反义基因导入马铃薯^[17], 通过钝化 AGP 基因阻断了淀粉合成的途径, 结果表明淀粉合成途径的中断, 并没有限制植株形成块茎的能力。转基因植株与正常植株相比唯

一的变化是结薯数增加, 而个别块茎体积变小。

一直认为的是蔗糖是块茎形成的强诱导剂。有关蔗糖的运输途径, 是共质体运输还是质外体运输, 多年来一直存在争议。Viola 等通过荧光染色和放射性同位素标记技术^[18], 得出结论: 共质体和质外体这两种运输形式都参与把蔗糖运输到发育中的块茎里。此外, Viola 等还发现在块茎发生的过程中^[18], 当匍匐茎处下伸长生长时, 此时蔗糖的运输以质外体运输为主, 而当匍匐茎发育为块茎时, 蔗糖以共质体运输为主。因此, 在早期阶段, 蔗糖运输需专一的运输机制(如需要有蔗糖主动运输蛋白的存在), 而晚期阶段, 不需要主动运输机制。就共质体运输而言, 胞质溶胶应是蔗糖代谢的场所。蔗糖酶和蔗糖合成酶是蔗糖代谢中的关键酶, Appeldoorn 等发现在块茎形成的早期^[2], 蔗糖酶占优势, 一旦淀粉的形成成为蔗糖提供材料, 蔗糖合成酶在蔗糖代谢中占优势。Zrenner 等发现蔗糖合成酶活性受抑制的转基因马铃薯植株^[19], 块茎数量和干重都下降, 这表明蔗糖合成酶对块茎的膨大是至关重要的。通过异源蔗糖酶或蔗糖磷酸化酶的表达来提高蔗糖转移的转基因马铃薯植株, 其代谢机制发生巨大变化, 如糖酵解和呼吸作用加强。Sonnewald 等发现蔗糖酶基因的表达^[20], 可导致块茎数目的减少, 块茎体积的增加。块茎胞质溶胶中的蔗糖水平对与马铃薯块茎发育是一个重要的因素, 胞质溶胶中的蔗糖水平的下降所产生的其他任何变化, 都将使块茎代谢机制发生重排。

2.3 其他

多胺类物质 (polyamines) 一直被认为在块茎发育过程中起到一定作用。利用转基因技术^[21], S-腺甘-蛋氨酸脱氢酶含量增加的转基因植株; 多胺含量增加, 并伴随着块茎数量的增加, 块茎体积的缩小, 这一结果表明多胺在块茎发育中确实起到一定作用。

Tiaden 等发现 ATP/ADP 转运蛋白对块茎发育有巨大的影响^[22], 这种蛋白位于质膜的内表面。通过转基因技术, 获得 ATP/ADP 转运蛋白活性降低的转基因植株, 其块茎数量、淀粉含量和块茎形态均发生变化。

3 块茎休眠和复苏中的影响因素

块茎休眠同块茎的发生和膨大是紧密相关的,

块茎的发生以顶端分生组织进入休眠为前提, 匍匐茎顶端纵裂, 细胞分裂到被第四到第八茎节的细胞分裂所代替时, 顶端分生组织进入休眠。块茎芽眼是依次进入休眠的, 顶端芽眼最后一个进入休眠。在很大程度上, 休眠是一个平行于块茎膨大的过程。

3.1 植物激素在块茎休眠和复苏中的作用

考虑到休眠过程与块茎膨大过程的平行性, 因此认为影响块茎诱导的各种因素, 同样影响块茎的休眠和复苏。一般来说, 低温有利于休眠, 此外, 产生块茎的植物的历史 (history) (如光周期) 和植物本身基因型也影响休眠期。此外, Carrera 等利用转基因技术获得能过量表达 GA-20-氧化酶的转基因植株^[6], 植株体内的 GA 水平提高, 转基因植株块茎能提前复苏, 从而证明 GA 能打破块茎休眠。脱落酸 (ABA) 是 GA 的拮抗物, 有关脱落酸对块茎休眠的作用虽有争议, 但也取得了一些可喜的成就。人们发现在块茎休眠快结束时, 脱落酸的水平下降。此外还发现脱落酸合成抑制剂存在的条件下, 可导致块茎提早复苏, 这些表明一定浓度的脱落酸对保持休眠是必需的。Classens 等通过观察马铃薯休眠行为数量性状的图谱^[23], 发现 8 种数量性状中的 3 种数量性状受脱落酸水平的影响, 因此认为脱落酸在块茎达到完全休眠之前起一定作用。细胞分裂素 (CTK) 可打破休眠, Galis 构建了过量表达 ipt 基因的转基因马铃薯^[7], 细胞分裂素的水平提高, 转基因植株提早复苏。通过施加乙烯合成抑制剂, 或通过外源施加乙烯的试验表明, 乙烯的作用是建立和保持块茎休眠。近年来认为茉莉酮酸对块茎的复苏有重要作用, 然而, 茉莉酮酸含量变化的转基因植株, 并没有为其提供任何证据。

3.2 碳水化合物在块茎休眠和复苏中作用

有关块茎休眠和复苏的另一重要方面是碳水化合物的变化。一直认为淀粉降解是与复苏诱导有关的重要因素, 由于一个正在复苏的块茎无疑需要来自母体块茎的能量 (这些能量大部分来源于淀粉降解)。但 Lorberth 等构建了 R1 酶表达水平显著下降的转基因马铃薯^[24], R1 酶是参与淀粉降解的酶, 转基因植株呈现正常的复苏行为。淀粉磷酸化酶的同工酶受抑制的转基因植株^[25], 其块茎复苏数量多, 休眠数量少, 这表明与大分子碳水化合物

有关的酶在块茎复苏中起到一定作用。

Farre 等发现利用块茎专一启动子表达焦磷酸酶^[26], 并且保持其在一定的水平, 同时表达另外一种无机焦磷酸酶的转基因植株, 提早 6~7 周复苏。发生这种巨大变化的原因仍不清楚。认为焦磷酸酶在蔗糖形成和淀粉降解过程中起到中介体的作用。在有无机焦磷酸酶存在的条件下, 可促进焦磷酸酶催化淀粉降解产生的 Glc-1-P 向 UDP-Glc 的转化, 从而导致蔗糖和细胞壁生物合成的增加, 而蔗糖和细胞壁的合成正是块茎复苏所需要的。尽管提早复苏的现象连续三代进行, 并且比较稳定, 但这种表型似乎只能在特定活动范围内观察到。在不同的启动子作用下^[27], 可强烈表达一种焦磷酸酶的转基因植株, 当胞质溶胶中焦磷酸酶含量低时, 却出现相反的现象, 即植株不能进入复苏, 原因可能在于这些植株焦磷酸依赖果糖磷酸激酶的作用受到抑制导致糖酵解停止的结果。

除了蔗糖和淀粉外, 己糖也被认为对复苏有重要。表达一种胞质溶胶蔗糖酶的转基因植株, 提早的进入复苏, 表明己糖与复苏有重要作用。但这些转基因植株代谢过程中呈现多效性的变化, 难以确定提早复苏就是由于己糖含量变化的结果。这些植株提早复苏, 也有可能是由于植株基础代谢(糖酵解和呼吸作用)加强所致。

参 考 文 献

- [1] Xu X, Vreugdenhil D, and van Lammeren A A M. Cell division and cell enlargement during potato tuber formation [J]. *J Exp Bot*, 1998, 49: 573-582.
- [2] Appeldoorn N J G, de Bruijn S M, Koot-Gronsveld E A M, et al. Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose phosphate during early tuberization of potato [J]. *Planta*, 1997, 202: 220-226.
- [3] Coleman W K, Donnelly D J, and Coleman S E. Potato microtubers as research tools: a review. *Am J Potato Res*, 2001, 78: 47-55.
- [4] Veramendi J, Willmitzer L, and Trethewey R N. In vitro grown potato microtubers are a suitable system for the study of primary carbohydrate metabolism [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37: 693-697.
- [5] Jackson S D. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 1-8.
- [6] Carrera E, Bou J, Garcia-Martinez J L, et al. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. [J] *Plant J*, 2000, 22: 247-256.
- [7] Galis I, Macas J, Vlasak J, et al. The effect of an elevated cytokinin level using the ipt gene and N⁶ benzyladenine on a single node and intact potato plant tuberization in vitro [J]. *J Plant Growth Regul*, 1995, 14: 143-150.
- [8] Harms K, Atzorn R, Brash A, et al. Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid levels in transgenic potato but not to a corresponding activation of JA-responding genes [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1645-1654.
- [9] Kolomiets M V, Hannapel D J, Chen H, et al. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 613-626.
- [10] Gregory L E. Some factors for tuberization in the potato [J]. *Ann Bot*, 1956, 41: 281-288.
- [11] Jackson S D, James P, Prat S, et al. Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 29-32.
- [12] Yanofsky M J, Izaguirre M, Wagmaister J A, et al. Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato [J]. *Plant J*, 2000, 23: 223-232.
- [13] Riesmeier J W, Willmitzer L, and Frommer W B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning [J]. *EMBO J*, 1994, 13: 1-7.
- [14] Bachem C W B, Vanderhoeven R S, Debruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP-analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant J*, 1996, 9: 745-753.
- [15] Bachem C W B, Oomen R J F, Kuyt S, et al. Antisense suppression of a potato alpha-SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 473-482.
- [16] Bachem C W B, Horvath B, Trindade L, et al. A potato tuber expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development [J]. *Plant J*, 2001, 25: 595-604.
- [17] Muller-rober B, Sonnewald U, and Willmitzer L. Inhibition of the ADP glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes [J]. *EMBO J*, 1992, 11: 1229-1238.
- [18] Viola R, Roberts A G, Haupt S, et al. Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 385-398.
- [19] Zrenner R, Salanabout M, Willmitzer L, et al. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants [J]. *Plant J*, 1995, 7: 97-107.
- [20] Sonnewald U, Hajirezaei M R, Kossmann J, et al. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 794-797.

马铃薯病毒病分子检测技术研究进展

袁青¹, 殷幼平², 王中康²

(1. 西南农业大学植保学院, 重庆 400716; 2. 重庆大学基因工程研究中心, 重庆 400044)

摘要: 快速、准确地定性或定量检测马铃薯植株中病毒、类病毒的种类和数量是有效地控制马铃薯病毒病害的需要, 也是马铃薯种薯品质的重要保证。本文就马铃薯病毒检测和病害早期诊断的分子检测新技术的基本原理和研究进展作了较为详尽的介绍与评价。

关键词: 马铃薯; 病毒; 检测; RT-PCR

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2003) 01-033-04

在马铃薯生产中, 普遍存在的病毒和类病毒虽然有十几种, 但在我国广大马铃薯产区危害马铃薯的五种主要病毒分别为马铃薯 X 病毒 (PVX); 马铃薯 A 病毒和 Y 病毒 (PVA, PVY); 马铃薯 S 病毒 (PVS), 马铃薯卷叶病毒 (PLRV); 以及马铃薯纺锤状块茎类病毒 (PSTVd)。因马铃薯栽培品种的抗性差异, 在不同地区几种马铃薯病毒病往往混合发生, 传统的常规生物学鉴定方法固然可靠, 但检测周期较长, 费时费事; 而以病毒包被蛋白抗原及其用免疫动物制备的多克隆或单克隆抗体反应为基础的血清学检测法, 虽然提高了马铃薯病毒病

检测的灵敏度和特异性, 但对于某些含量极少的韧皮部病毒仍显得不够灵敏, 也存在操作步骤烦琐等不足; 近年来迅速发展的以病毒核酸为对象的分子检测技术, 以其快速、特异和灵敏性高的优点, 在包括马铃薯等植物种苗病毒病的鉴定中起着愈来愈大的作用, 为脱毒种苗和病毒的同时检测提供了新的诊断工具。

1 常规的检测方法

马铃薯病毒的检测, 最开始是通过观察植物症状判断所带病毒种类, 这样往往不准确。后来采用指示植物法, 但指示植物法历时长, 并且要求严格的环境条件^[1]。免疫学检测法的发展则显著提高了马铃薯病毒检测的精确度, 其中包括 IG 指示试纸法、免疫吸附电子显微术 (ISEM)、ELISA 法等^[2]。

收稿日期: 2002-10-25

作者简介: 袁青 (1978—), 女, 硕士, 西南农业大学植保学院, 从事马铃薯病毒病分子检测研究。

[21] Pedros A R, MacLeod M R, Ross H A, et al. Manipulations of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers: an increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution [J]. *Planta*, 1999, 209: 153-160.

[22] Tjaden J, Mohlmann T, Kampfenkel K, et al. Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato tuber morphology, yield and composition of starch [J]. *Plant J*, 1998, 16: 531-540.

[23] Claassens M M J, and Vreugdenhil D. Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation? [J] *Potato Res*, 2000, 43: 347-369.

[24] Lerberth B, Ritte G, Willmitzer L, et al. Inhibition of a starch

granule bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 531-540.

[25] Duwenig E, Steup M, Willmitzer L, et al. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism [J]. *Plant J*, 1997, 12: 323-333.

[26] 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.

[27] Hajirezaei M, and 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.