



知识介绍

马铃薯蛋白基因及其 在研究块茎形成和品种改良中的作用

邬信康

(吉林农业大学)

马铃薯块茎是植株地下茎向膨大分化而成的一种贮藏器官, 累积有大量的淀粉和某些特定的块茎蛋白。长期以来, 制约块茎形成的因素曾被广泛地研究, 尽管取得了某些进展, 但对其分子机制却所知甚微。近年来, 随着分子生物学的发展, 利用重组DNA和基因转移技术, 为研究块茎形成机理和品种改良提供了一条新途径。

1 影响块茎形成的因素

马铃薯的块茎形成, 既受环境因子的影响, 也受激素调节。一些早期的研究, 强调光合产物和碳氮比的作用, 增加叶面积和光强度, 低温以及少施氮肥, 有利于块茎形成。相反, 生长后期氮肥过多或由于高温逆境引起光合产物向块茎分配的减少, 均会抑制块茎形成。Krauss等通过水培试验表明, 高氮营养液阻碍块茎的形成, 降低氮素营养水平则块茎迅速形成, 而如把低氮营养液中生长的植株重新转到高氮营养液中时, 已经形成的块茎又常常会逆转成匍匐茎状生长。

光周期是控制块茎形成过程的另一重要因素, 短光照有利于块茎发育而长光照则有利于营养生长。块茎形成的临界周期因温度而异。Kumar和Warcing等将处于短日照下的植株的茎或叶嫁接到长日照下的植株上可诱导块茎形成, 据此提出了“成茎激素”

控制块茎形成的假说, 这种激素是由处于短日照下的茎或叶产生的, 并可嫁接传递。60年代后期, Palmer和Smith将匍匐茎离体培养在含细胞激动素和高浓度蔗糖的培养基上, 诱导了块茎形成。此后陆续发现脱落酸、香豆素、生长素及乙烯衍生物的具有刺激块茎形成的作用, 但激素的作用既有正效应, 也有负效应, 如赤霉素明显地抑制块茎的形成, 因此目前尚不能说已经找到了真正的“成茎激素”。近年来从生长于短日照条件下的马铃薯叶中提取出来的茉莉酮酸衍生物对块茎形成具有重要作用, 但详细机制尚不清楚。

2 利用马铃薯蛋白作为研究块茎形成的生化指标

马铃薯蛋白是一组分子量为40KD的糖蛋白, 它是马铃薯块茎中的主要贮藏蛋白, 约占成熟块茎中可溶性总蛋白量的40%。马铃薯蛋白不同于普通贮藏蛋白的显著特点之一是它具有酶活性, Andrews等利用杆状病毒系统对该蛋白的cDNA的表达试验结果指出, 它具有脂酰基水解酶和转移酶活性。

马铃薯蛋白一般只存在于块茎中, 无论是已经形成块茎和未形成块茎的植株, 其茎和叶中均检测不出这种蛋白质。非块茎诱导

植株的匍匐茎也不存在此蛋白质, 但当块茎发育时则迅速累积。与此相应的是, 马铃薯蛋白的 mRNA 在发育的块茎中也十分丰富, 而在茎、叶和非诱导植株的匍匐茎中也检测不到。

块茎通常在地下匍匐茎上形成, 但也能在腋芽上形成。当腋芽或单叶茎切段生长在短日照条件下时可形成块茎, 这种块茎的马铃薯蛋白和其它贮藏蛋白的含量与地下块茎相同。而当腋芽或单叶茎切段生长在长日照条件下时则发育成营养枝, 这些营养枝也不含有马铃薯蛋白。形成块茎的另一种方法是将匍匐茎顶端切段或腋芽在黑暗条件下离体培养在含细胞激动素和 8%~10% 的蔗糖培养基上, 这些块茎也含有大量的马铃薯蛋白和其它贮藏蛋白。但如在光下培养在只含 1%~2% 的蔗糖培养基上, 则培养植株上的茎和叶无马铃薯蛋白。

马铃薯蛋白由 1 个多基因簇编码, 每单倍体基因组由 10~15 个基因组成, 典型的四倍体品种约有 40~60 个拷贝。从所分离出来的一些基因来看, 它们都具有高度同源的编码区, 都含有 6 个内含子。根据 5' 侧非翻译区有无 22bp 的插入序列可分为两类, 即类型 I 和类型 II, 前者无插入序列, 编码块茎中马铃薯蛋白 mRNA 的 98%~99%, 后者有插入序列, 仅编码 1%~2% 的马铃薯蛋白。类型 II 还有一点与类型 I 不同, 就是它在根中也有微量表达, 但根中的马铃薯蛋白, 在免疫反应和电泳谱带上与块茎中的有明显差别, 这可能是由于翻译后加工所造成的。类型 II 的基因数等于或略大于类型 I, 但其中多数为假基因。

根据限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 和脉冲电泳分析结果, 马铃薯蛋白多基因簇拷贝位于第 8 染色体的 1.4 百万碱基对的 DNA 片段上, 但这一座位的详细结构尚不清楚。

3 利用马铃薯蛋白基因在转基因植株中的表达研究影响块茎形成的因素

把类型 I 和类型 II 马铃薯蛋白基因的 5' 侧启动子序列 (2.5Kb) 连接到 T₁ 质粒双元载体 PB1101.1 的 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因上, 转入农杆菌株 LBA4404, 然后与马铃薯叶片共培养, 获得转基因的马铃薯植株, 以此来测定究竟马铃薯蛋白基因的哪一部分参与其组织特异性表达的调控。试验结果指出, 含有类型 I 马铃薯蛋白基因 5' 侧 2.5Kb 顺序的植株块茎的提取液, 具有高度的 β -葡萄糖苷酸酶基因活性。但在一般条件下, 无论是正形成块茎的植株或尚未形成块茎的植株, 在其根、茎和叶中, β -葡萄糖苷酸酶基因部无明显表达。含有类型 II 马铃薯蛋白基因 5' 侧顺序的植株的块茎, β -葡萄糖苷酸酶基因只有微量的表达 (相当于类型 I 的 1%~2%), 同时正如所预期的, 在根中也有所表达。

虽然类型 I 马铃薯蛋白基因只能在块茎和附着有块茎的匍匐茎中表达, 但在某些条件下也能在茎和叶中诱导表达。单叶茎切段在诱导光周期条件下生长, 从腋芽形成的块茎中可累积总蛋白量 40% 的马铃薯蛋白, 叶柄中约有 4%。如把腋芽摘掉以阻止块茎形成, 则叶柄中马铃薯蛋白含量可达到总蛋白量的 20%~40%。但尽管这些单叶茎切段的叶柄中的马铃薯蛋白、淀粉和其它贮藏蛋白的含量达到了正常成熟块茎的水平, 却未见有明显的细胞增生和膨大, 由此可见马铃薯植株的块茎形成实际上包含两个独立的过程: ①形态发生和细胞增生过程; ②淀粉和蛋白质累积过程。前已述及, 单叶茎切段的腋芽是发育成块茎还是枝条, 取决于光周期,

即在短日照下形成块茎, 在长日照下形成枝条, 而如把腋芽除去, 则不论在短日照下还是长日照下, 叶柄中都累积有大量的马铃薯蛋白和淀粉, 这进一步说明, 淀粉和蛋白质的累积过程不仅可以独立于块茎形态发生过程, 而且这两个过程的调节机制也是不同的。

把含有类型 I 马铃薯蛋白/ β -葡糖苷酸酶嵌合基因的马铃薯转基因植株的茎节间切段进行离体培养, β -葡糖苷酸酶基因在叶和茎中一般不表达, 当培养基中加入 300~400mM 的蔗糖时则此酶活性在叶和茎中可达到相当于块茎的同样水平的表达。葡萄糖、果糖等某些 α -双糖都有诱导表达作用, 但这一作用不是由于渗透效应引起的, 因在同样条件下, 肌醇无此作用, 说明光合产物对块茎形成起着重要作用。

体细胞组织中马铃薯蛋白基因的蔗糖诱导表达作用和淀粉累积作用与经典的研究结果相符, 即高水平的光合产物有利于块茎形成。当转基因植株的茎节间切段培养在 300mM 的蔗糖培养基上时, 细胞激动素、赤霉素和有效氮量都不会影响 β -葡糖苷酸酶的表达活性, 而当培养基中蔗糖浓度降低到 80mM 时, 在无氮培养基上, 外植体的 β -葡糖苷酸酶活性, 同样能获得最好表达, 而在高氮培养基上则只有微量表达。培养基中如含有赤霉素, 则 β -葡糖苷酸酶诱导表达所需的蔗糖浓度也相应提高。上述氮和赤霉素在不同蔗糖浓度下对类型 I 马铃薯蛋白基因表达的影响与它们对块茎形成的直接影响是十分一致的。

利用马铃薯蛋白基因从分子水平上阐明了影响块茎形成的因素, 并查明类型 I 基因的 5'侧启动子区段调控该蛋白的组织特异性表达, 块茎形成是一个复杂的过程, 包括生长、发育、代谢、分配的综合变化, 这一过程由许多因子组成, 具有不同的调节模式,

弄清其机制, 对于马铃薯的遗传改良, 具有重要意义。

4 马铃薯蛋白基因在品种改良中的作用

据记载, 茄科植物共有 3500 种, 其中只有 160 个野生种和 7 个栽培种能形成块茎。一些试验资料指出, 大多数具有块茎的种易于与其相近的种杂交并产生高度可育的后代, 说明它们是进化较晚的种群。

烟草和番茄也是茄科植物, 但都不能形成块茎。番茄和马铃薯属同一族, 同一亚科, 具有类型 I、II 马铃薯蛋白高度同源的 DNA 序列。烟草和马铃薯属不同亚科, 未发现同源序列。但不论是烟草和番茄, 其内源基因都是不能由蔗糖诱导表达的, 然而却都具有类型 I 马铃薯蛋白基因蔗糖诱导表达所必需的作用因子。把类型 I 马铃薯蛋白/ β -葡糖苷酸酶嵌合基因插入到烟草和番茄植株中, 都能在植株的茎和叶中受高浓度蔗糖诱导而有效表达。以烟草为例, 其表达活性约为马铃薯的 1/10, 蔗糖诱导表达的剂量效应曲线却是一致的。

上述例子说明, 烟草、番茄和马铃薯一样, 不仅具有马铃薯蛋白基因蔗糖诱导表达的必需因子, 而且诱导表达的模式也基本相似, 据此可以认为, 不管是具有块茎的植物还是无块茎植物, 它们控制体细胞贮藏组织分化的生化机制至少是部分相同的, 即具有共同的起源。近年来有关番茄和马铃薯的 DNA 限制性片段长度多态性分析的资料又为研究块茎形成的进化过程提供了线索。番茄的马铃薯蛋白基因同源区段位于第 8 染色体的长臂, 只有 3~5 个拷贝, 而且都是类型 II 基因, 但在其第 3 染色体的中部有 1 个类型 I 基因, 这个基因是可以蔗糖诱导表达的, 前已述及, 马铃薯的糖蛋白基因是一

个多基因簇, 每单倍体基因组由10~15个基因编码, 这10~15个基因也位于第8染色体的长臂上, 但类型I和类型II各约50%左右, 在第3染色体中部也有1个类型I基因。可见马铃薯蛋白基因在番茄和马铃薯基因组中的分布是一致的, 只是在第8染色体上基因的类型和拷贝数两者有差别, 类型I基因拷贝数在马铃薯第8染色体的集中可能是在进化过程中发生的基因重排的结果。以上假说从生化机制上说明了块茎形成的可能的进化过程, 至于在形态上如何发展变化形成块茎这样一种贮藏器官, 有待于深入研究。这些问题无论在理论上和实际上都是具有重大价值的。

由于马铃薯蛋白基因特别是类型I基因及其启动子在器官特异性表达及蔗糖诱导表达中起着重要的作用, 这就为利用这些基因通过遗传工程方法改良马铃薯品种打下了基础。

马铃薯蛋白基因及其启动子在品种改良中的应用可从以下几方面考虑。

第一, 马铃薯块茎中蛋白质含量约占鲜重的2%, 其总蛋白中10%为马铃薯蛋白。马铃薯蛋白是由马铃薯蛋白基因编码的, 因而增加马铃薯基因组中马铃薯蛋白基因的拷贝数就可以合成更多的马铃薯蛋白, 从而提高块茎中蛋白质的含量。现在已经分离出了马铃薯蛋白基因, 并把它与 β -葡糖苷酸酶基因和新霉素磷酸转移酶基因连接, 再与Ti质粒二元载体共组, 转入农杆菌, 将此农

杆菌与马铃薯叶片或茎尖共培养就很容易将重组质粒中的马铃薯蛋白基因整合到马铃薯细胞基因组, 从而增加其拷贝数。

第二, 马铃薯蛋白基因的启动子是个活性很高的强启动子, 现在已经分离出了这个启动子, 同样把它与 β -葡糖苷酸酶报道基因和新霉素磷酸转移酶基因连接, 再与Ti质粒二元载体共组, 这是个理想马铃薯遗传工程载体, 只要用特定的核酸内切酶切开, 连接上所需的外源基因(如高蛋白基因、某种必需氨基酸基因、脂肪及糖基因等), 用农杆菌转入马铃薯细胞, 马铃薯蛋白基因的启动子就能启动这些基因在块茎中高水平的表达, 从而改进和提高块茎的营养成分。

第三, 培育抗病虫的马铃薯品种。利用类型I马铃薯蛋白基因启动子与某些能产生对病原菌和害虫有毒物质的基因(内毒素基因)重组, 转入马铃薯植株, 即可获得抗病、虫的马铃薯品种。内毒素基因可从细菌、真菌中分离, 如苏芸金杆菌的毒蛋白基因; 也可以从植物体本身提取, 如昆虫的胰蛋白酶抑制剂基因等。

总之, 运用遗传工程方法改良马铃薯品种是大有可为的。据报道, 美国学者计划在未来5年内培养出超级马铃薯, 这种马铃薯不仅含有营养完全的蛋白质、脂肪、糖等成分, 而且转入某种编码药物的多肽的基因, 还能治疗和预防疾病。为使我国的马铃薯生产提高到一个新阶段, 我们必须积极开展这方面的研究。

(上接203页)

bola curve. The value of IP was better when the total concentration of nitrogen was 30~40mM. The tuberization of microtuber can be enhanced by reducing the total nitrogen or decreasing the value of $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{NH}_4^+ - \text{N}$. The best combination was $(\text{NO}_3^- - \text{N}) = 17.325\text{m.M}$ and $(\text{NH}_4^+ - \text{N}) = 16.612\text{m.M}$.