

研究  
简报

## 马铃薯 class I patatin 基因在试管块茎形成中的功能

司怀军<sup>1,2</sup> 柳俊<sup>1</sup> 谢从华<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 国家蔬菜改良中心华中分中心/园艺植物生物学教育部重点实验室/华中农业大学, 湖北武汉 430070; <sup>2</sup> 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 将正义反义 class I patatin 基因导入马铃薯品种甘农薯 2 号中, 有 2 个转正义基因株系试管块茎的可溶性蛋白含量和 LAH 活性与对照相比有不同程度的增加, 有 3 个转反义基因株系的可溶性蛋白质含量下降, 并且所有转反义基因植株的 LAH 活性都不同程度地降低。试管块茎的诱导结果表明, 有 1 个转正义基因株系的结薯株率和单株结薯数比对照明显增加, 有 2 个转反义基因株系的结薯株率和单株结薯数比对照明显减少, 说明该 class I patatin 基因参与了马铃薯试管块茎的形成及其调控。

**关键词:** 马铃薯; class I patatin 基因; 转化; 块茎形成

**中图分类号:** S532

## Function of class I patatin Gene in Potato Microtuber Formation

SI Huai-Jun<sup>1,2</sup>, LIU Jun<sup>1</sup> and XIE Cong-Hua<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> National Center for Vegetable Improvement (Central China), Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Huazhong Agricultural University), Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei; <sup>2</sup> College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

**Abstract:** Sense and antisense class I patatin gene were introduced into potato cultivar Gannongshu 2. Two sense lines had a marked higher soluble protein content and LAH activity than the control. Three antisense lines showed a reduction in soluble protein content, but all of antisense lines displayed a decrease in LAH activity. Induction of microtuber demonstrated that one sense line had a significant increase while two antisense lines had a significant reduction in percentage of plantlets formed tubers and number of tubers per plantlet. The results suggested that the class I patatin gene is involved in regulating potato tuber formation.

**Key words:** Potato; class I patatin gene; Transformation; Tuberization

在马铃薯块茎形成过程中, class I patatin 基因表达的时间与部位和块茎形成相吻合, 具有明显的时空一致性, 且 class I patatin 基因具有块茎特异表达的特性, patatin 基因的表达可能与块茎的形成有关<sup>[1,2]</sup>。但目前尚无确切证据证明 patatin 与块茎形成的关系。在马铃薯中, 由于没有缺乏 patatin 基因的突变体或者野生种, 因此通过转正义反义基因技术是研究其生理功能的一种较好途径。

在马铃薯中, patatin 基因为多基因家族, 用基因敲除 (gene knockout) 的方法很难实现 patatin 基因缺失的突变体, 因此, 本实验室从块茎形成特异诱导条件诱导所构建的 cDNA 文库中分离了 patatin 基因家族 class I 的一个 cDNA (GenBank accession AF498099), 然后构建了由强组成型启动子 CaMV 35S 驱动的正义和反义 class I patatin 基因表达载

体, 并将它们导入马铃薯中, 来研究 patatin 基因超强表达或抑制表达之后对块茎形成的影响, 从而直接获得 patatin 基因与马铃薯块茎形成关系的实验证据, 以进一步阐明 patatin 基因的功能。

### 1 材料和方法

#### 1.1 植物材料

用马铃薯四倍体栽培品种甘农薯 2 号的无菌试管薯薄片作为转化的受体材料。

#### 1.2 菌株和质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为 LBA4404, 表达载体为 pBSSP 和 pBSAP, 分别为强组成型启动子 CaMV 35S 驱

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970464)。

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的研究。现在甘肃农业大学生命科学技术学院工作; E-mail: hjsi@gsau.edu.cn。\* 通讯作者 (Corresponding author): 谢从华。Tel: 027-87287381; E-mail: xiech@mail.hzau.edu.cn

Received (收稿日期): 2005-09-27; Accepted (接受日期): 2006-01-13。

动的正义和反义 class I patatin 基因的表达载体,抗性标记为  $Km^r$ ,其结构如图 1。

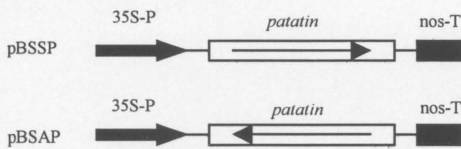


图 1 表达载体 pBSSP 和 pBSAP 结构示意图  
Fig.1 Schematic representation of expression vectors pBSSP and pBSAP

### 1.3 马铃薯遗传转化

采用根癌农杆菌介导的马铃薯试管薯薄片转化方法<sup>[3]</sup>。

### 1.4 转化植株的分子鉴定

1.4.1 PCR-Southern 杂交 按 Edwards 等<sup>[4]</sup>的方法提取植物总 DNA,以 *npt II* 基因的 2 个引物 5'-GCTATGACTGGCA CAACAG-3' 和 5'-ATACCGTAAAGCACGAGGAA-3' 进行 PCR 扩增,预期扩增片段大小为 676 bp。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳后转至尼龙膜,质粒 pBSAP PCR 扩增产物电泳回收的 676 bp 片段,经 DIG 标记后作为探针进行杂交。采用 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒进行探针标记、膜杂交和显色处理。操作按试剂盒说明书进行。

1.4.2 Northern 杂交 用异硫氰酸胍法<sup>[5]</sup>抽提转基因马铃薯和对照的总 RNA,电泳后转至尼龙膜。用 Roche 公司的 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 试剂盒标记正义和反义 mRNA 探针,与尼龙膜上的 RNA 杂交。操作按试剂盒说明书进行。

### 1.5 可溶性蛋白质含量和 LAH 活性的检测

以转化植株再生的试管薯为材料提取可溶性蛋白,含量的测定用 Bradford 法<sup>[6]</sup>。酯酰水解酶 (LAH) 活性的检测用 Racusen 的方法<sup>[7]</sup>。

### 1.6 转基因植株试管内诱导结薯

按柳俊等<sup>[8]</sup>的方法诱导转基因马铃薯在组织培养条件下结薯。每个株系接种 30 盒,每盒 16 株。统计结薯株率、单株结薯数和平均薯重。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的获得和 PCR-Southern 鉴定

用农杆菌介导法获得了批量转化 pBSSP 和 pBSAP 的马铃薯,用 PCR-Southern 杂交证明正义反义 class I patatin 基因已整合到马铃薯基因组中(图 2)。

### 2.2 Northern 杂交分析

在试管块茎开始膨大前 *patatin* 基因大量转录时提取总 RNA 进行 Northern 杂交,结果显示,转正义基因植株中,除株

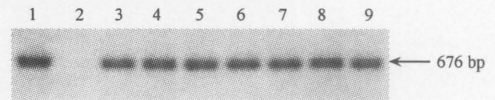


图 2 转基因马铃薯 PCR-Southern 检测  
Fig.2 Detection of transgenic plants by PCR-Southern  
1: 阳性对照;2: 阴性对照;3~9: 转基因植株。  
1: Positive control;2: Negative control;3~9: Transgenic plants.

系 Na4 和 Na7 与对照相比 *patatin* 基因 mRNA 的含量略有下降外,株系 Na3 和 Na8 的均有增加(图 3)。在转反义基因植株中,正义和反义 RNA 均能检测到;而且,由于反义 *patatin* 基因的正常转录导致了内源 *patatin* mRNA 含量的下降(图 4)。

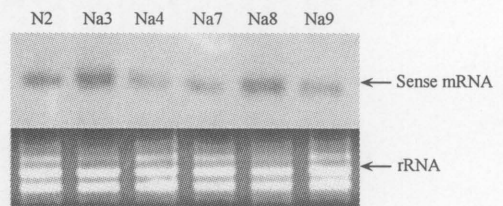


图 3 转甘农薯 2 号正义基因植株 Northern 杂交  
Fig.3 Northern blot of transgenic sense plants of Gannongshu 2  
N2: 甘农薯 2 号, 对照;Na3~Na9: 转基因植株。  
N2: Untransgenic potato;Na3~Na9: Transgenic potato.

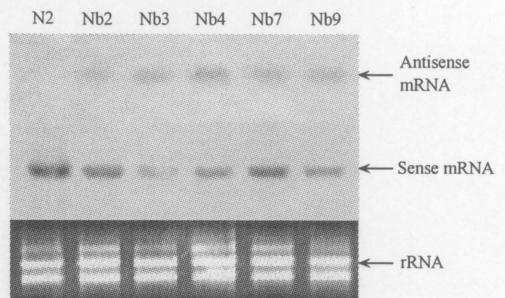


图 4 转甘农薯 2 号反义基因植株 Northern 杂交  
Fig.4 Northern blot of transgenic antisense plants of Gannongshu 2  
N2: 甘农薯 2 号, 对照;Nb2~Nb9: 转基因植株。  
N2: Untransgenic potato;Nb2~Nb9: Transgenic potato.

### 2.3 试管块茎可溶性蛋白质含量和 LAH 活性的测定

在正义转基因植株中,株系 Na3 和 Na8 的可溶性蛋白含量和 LAH 活性与对照相比,均有不同程度的增加,其余株系与对照相比差异不大。在反义转基因植株中,除株系 Nb2 和 Nb7 可溶性蛋白质含量与对照相比变化不大外,其余株系均有所下降,而所有反义转基因植株的 LAH 活性与对照相比都不同程度地减少,其中减少程度最大的 1 个株系 Nb3 比对照甘农薯 2 号下降了 21.7% (表 1, 图 5)。

表 1 转正反义 *patatin* 基因马铃薯试管块茎蛋白质的含量

Table 1 Total soluble protein content of microtuber of transformed sense and antisense potatoes

转正义基因植株 Transformed sense plants	总蛋白质含量 Total soluble protein content (mg/g FW) <sup>a</sup>	转反义基因植株 Transformed antisense plants	总蛋白质含量 Total soluble protein content (mg/g FW) <sup>a</sup>
N2 (CK) <sup>b</sup>	4.91 ± 0.10	N2 (CK) <sup>b</sup>	4.91 ± 0.10
Na3	6.37 ± 0.09	Nb2	4.68 ± 0.21
Na4	4.84 ± 0.07	Nb3	3.97 ± 0.14
Na7	4.83 ± 0.23	Nb4	4.42 ± 0.20
Na8	5.63 ± 0.18	Nb7	4.70 ± 0.25
Na9	5.02 ± 0.13	Nb9	4.36 ± 0.06

注:<sup>a</sup>表示 3 次重复试验的平均值; <sup>b</sup>N2 为甘农薯 2 号。  
Note: <sup>a</sup> values indicate means ± SD of three independent experiments. <sup>b</sup> N2 represents potato cultivar Gannongshu 2.

2.4 正反义 class I *patatin* 基因影响试管薯的形成

与对照相比,转正义基因株系 Na3 的结薯株率和单株结薯数明显增加,株系 Na8 变化不大,株系 Na4、Na7 和 Na9 的单株结薯数和结薯株率明显降低;转反义基因株系 Nb3 和 Nb9 的结薯株率和单株结薯数明显减少,而株系 Nb2、Nb4 和 Nb7 与对照相比,差异不大。结合正义和反义转基因植株的 LAH 活性和单株结薯数发现,在单株结薯数 ( $y$ ) 和 LAH 活性

( $x$ ) 之间存在一种显著的直线相关关系 ( $y = 0.008x - 0.3525, r = 0.782^{**}$ ),这揭示 LAH 活性正相关于马铃薯试管块茎的形成(表 2)。

表 2 转正反义 class I *patatin* 基因对马铃薯试管薯形成的影响  
Table 2 Effect of expression of sense and antisense class I *patatin* on microtuber formation of transgenic plants

株系 Strain	结薯株率 Percent of plantlets formed tubers (%)	单株结薯数 No. of tubers per plantlet	平均薯重 Mean tuber weight (mg)
N2 (CK)	41.1 b <sup>a</sup>	0.41 b	95 a
Na3	70.8 a	0.71 a	88 a
Na4	24.7 c	0.25 c	94 a
Na7	26.4 c	0.26 c	98 a
Na8	46.9 b	0.48 b	103 a
Na9	33.3 bc	0.34 bc	95 a
N2 (CK)	41.1 bc	0.41 bc	95 b
Nb2	49.2 ab	0.49 ab	133 a
Nb3	26.8 d	0.27 d	101 b
Nb4	41.0 bc	0.41 bc	104 b
Nb7	54.9 ab	0.55 ab	103 b
Nb9	31.3 dc	0.31 dc	100 b

注:<sup>a</sup> Duncan's 新复极差测验 ( $P < 0.05$ )。  
Note: <sup>a</sup> Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ )。

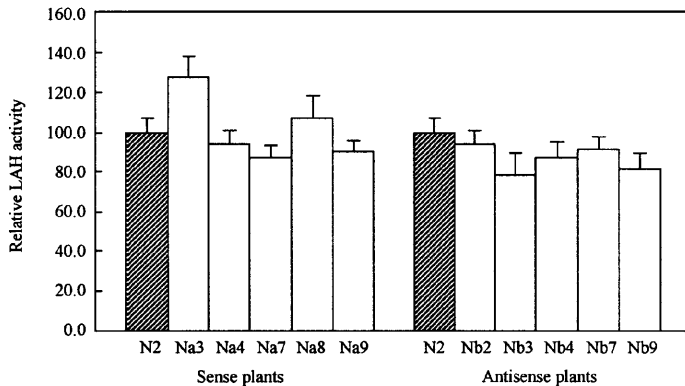


图 5 转甘农薯 2 号正反义基因植株试管块茎 LAH 活性的测定结果  
Fig.5 Relative LAH activity of transformed sense plants(left group)and antisense plants(right group)of Gannongshu 2  
N2:甘农薯 2 号,对照;Na3~Na9:转正义基因植株;Nb2~Nb9:转反义基因植株。  
N2: Untransgenic potato;Na3~Na9: Transgenic sense plants;Nb2~Nb9: Transgenic antisense plants.

3 讨论

在马铃薯中,patatin 由多基因家族编码,在四倍体基因组中大约含有 60 个成员<sup>[9]</sup>。patatin 主要作为块茎中的贮藏蛋白,但与一般的贮藏蛋白不同,patatin 具有 LAH 活性<sup>[7,10]</sup>。在大肠杆菌(未发表资料)和转基因烟草中的表达也证明 patatin 蛋白具有 LAH 活性<sup>[11]</sup>。

Patatin 的 LAH 活性可能对马铃薯芽的生长<sup>[7]</sup>、病原物的侵入和机械损伤的响应<sup>[7,12]</sup>和块茎形成<sup>[1-2]</sup>等多种生理功能有关。由于 class I *patatin* 基因的表达与块茎的形成相吻合,从而推测 *patatin* 基因的表达可能与块茎的形成有关<sup>[1-2]</sup>。patatin 蛋白的

不同功能可能来自于 *patatin* 基因家族具有广泛的 LAH 同工酶<sup>[1]</sup>。

本研究表明,patatin 基因的导入影响了 patatin 的转录及其 LAH 活性(图 4 和图 5),通过增加 patatin 的生物合成可以增加其 LAH 活性。并且 LAH 活性与块茎形成数量具有极显著的直线正相关关系。因此证实,patatin 基因与马铃薯块茎形态建成有关,主要通过其 LAH 活性来调控块茎的形成。这一结论与迄今为止所观察到的马铃薯块茎形成的生理学机制相一致。Koda 等<sup>[11]</sup>发现,作为块茎形成诱导物茉莉酸的生物合成是通过 LAH 催化膜脂降解释放的代谢物进一步反应而合成的。Patatin 作为酯酰水解酶可以降解细胞膜而

释放一系列的不饱和脂肪酸,其中有一大部分为茉莉酸生物合成的前体物质亚麻酸<sup>[14-15]</sup>。

在转反义基因植株中,也只有部分转基因植株产生了反义抑制效果,其他研究者的实验中也曾观察到类似的现象<sup>[16-18]</sup>。一般转基因沉默可能发生在与导入的反义 RNA 序列同源性最高的基因上<sup>[19]</sup>。由于 *patatin* 基因为多基因家族,其不同成员之间可能存在一定差异,因此本研究导入的反义 RNA 可能只是抑制了与其同源性最高的内源 *patatin* 基因,具体原因还需要进一步验证。

## References

- [1] Hendriks T, Vreugdenhil D, Stiekema W J. patatin and four serine proteinase inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 385-394
- [2] Liu J (柳俊). Mechanism and regulation of microtuber formation of potato. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2001 (in Chinese with English abstract)
- [3] Si H-J (司怀军), Xie C-H (谢从华), Liu J (柳俊). An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of microtuber and the introduction of an antisense class I patatin gene into potato. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(6): 801-805
- [4] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 1349
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [7] Racusen D. Lipid acyl hydrolase of patatin. *Can J Bot*, 1984, 62: 1640-1644
- [8] Liu J(柳俊), Xie C-H(谢从华), Huang D-E(黄大恩), Liao Y(廖勇), Wu C-J(吴承金). Research on forming mechanism of potato microtubers-effects of BA on the formation and growth of microtubers. *Chin Potato J* (马铃薯杂志), 1995, 9: 7-11 (in Chinese with English abstract)
- [9] Twell D, Ooms G. Structural diversity of the *patatin* gene family in potato cv. Desiree. *Mol Gen Genet*, 1988, 212: 325-336
- [10] Andrews D L, Beames B, Summers M D, Park W D. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J*, 1988, 252: 199-206
- [11] Si H-J (司怀军), Liu J (柳俊), Xie C-H (谢从华). Expression of a novel cDNA of potato patatin class I gene in transgenic tobacco and its lipid acyl hydrolase activity. *Chin J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 2003, 11(3): 236-240 (in Chinese with English abstract)
- [12] Sonnwald U, Sturm A, Chrispeels M J, Willmitzer L. Targeting and glycosylation of patatin, the major potato tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta*, 1989, 179: 171-180
- [13] Koda Y, Kikuta Y. Wound-induced accumulation of jasmolic acid in tissues of potato tubers. *Plant Cell Physiol*, 1994, 35: 751-756
- [14] Ryan C A. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol Biol*, 1992, 19: 123-133
- [15] Sembler G, Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular action of jasmonates. *Plant Mol Biol*, 1993, 44: 569-589
- [16] Delauney A J, Tabaeizadeh Z, Verma D P S. A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 4300-4304
- [17] Schuch W, Bird C R, Ray J, Smith C J S, Watson C F, Morris P C, Gray J E, Arnold C, Seymour G B, Tucker G A, Grierson D. Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Mol Biol*, 1989, 13: 303-311
- [18] Van der Krol A R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990, 2: 291-299
- [19] Wolters A M A, Visser R G F. Gene silencing in potato: allelic differences and effect of ploidy. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 377-386