

AGNIESZKA HARA-SKRZYPIEC

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy
Platanowa 19, 05-831 Młochów
E-mail: a.hara@ihar.edu.pl*

REGULACJA TUBERYZACJI W ZIEMNIAKU

WPROWADZENIE

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) jest trzecią, najważniejszą, po pszenicy i ryżu, rośliną uprawną na świecie (<http://faostat.fao.org/>), a ponad połowa jego światowej produkcji przypada na kraje rozwijające się. Ziemniak wciąż ma status rośliny zabezpieczającej populację człowieka przed głodem. Wytwarzanie bulw, czyli tuberyzacja odbywa się z różną efektywnością, zależnie od genotypu i warunków środowiska. Anatomiczne i fizjologiczne czynniki towarzyszące tuberyzacji zostały dobrze poznane. Ostatnie dwie dekady badań przeprowadzonych na poziomie biochemicznym i molekularnym pozwoliły na identyfikację genów kluczowych, regulujących powstawanie bulw.

Tuberyzacja jest złożonym procesem, z którym wiążą się liczne zmiany anatomiczne, morfologiczne i fizjologiczne. Dzięki gatunki ziemniaka oraz rośliny *S. tuberosum* pochodzące z podgatunku *andigena* charakteryzują się wytwarzaniem bulw wyłącznie w warunkach dnia krótkiego (ang. short day, SD). W przypadku niektórych gatunków oraz odmian

uprawnych *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, tuberyzacja ma miejsce w szerokim zakresie długości dnia (AKSENOVA i współaut. 2012). W sprzyjających warunkach fotoperiodycznych na skutek percepcji światła dochodzi do indukcji sygnału, który transportowany z liści do części podziemnych rośliny inicjuje tuberyzację. Wierzchołek pędu podziemnego, stolonu, po zakończeniu wzrostu na długość, wskutek podziałów komórek we wszystkich kierunkach zaczyna grubieć, dając początek bulwom. W pewnej odległości od wierzchołka stolonu różnicuje się warstwa komórek prozenchymatycznych. Na zewnątrz tworzy się warstwa miękiszu przekształcająca się w korę pierwotną, a do wnętrza różnicuje się warstwa rdzeniowa (GABRIEL i ŚWIEŻYŃSKI 1977).

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie wiedzy o procesie tuberyzacji w roślinach ziemniaka w oparciu o poznanie biochemii tego procesu i genomu ziemniaka oraz wpływu czynników środowiska.

ŚRODOWISKOWE UWARUNKOWANIA PROCESU TUBERYZACJI

Indukcja tuberyzacji jest wypadkową odpowiedniego stanu fizjologicznego rośliny, jak również wielu czynników środowiskowych, z których najważniejszymi są zawartość azotu w glebie, temperatura środowiska i fotoperiod (JACKSON 1999).

Wysokie stężenie azotu w glebie negatywnie wpływa na proces tuberyzacji w

roślinach ziemniaka. Przeniesienie roślin do gleby o niskiej zawartości tego pierwiastka umożliwi zawiązanie bulw. Stosowanie dolistnego nawożenia azotowego nie ma wpływu na powstawanie bulw. Wysoki poziom azotu jest w stanie zahamować tuberyzację, ale jego rola nie jest decydująca. Pomimo obniżenia nawożenia azotowego, przy nie-

sprzyjających tuberyzacji warunkach takich jak długi dzień czy wysoka temperatura, nie obserwowano zawiązywania bulw (KRAUSS 1985).

Wysoka temperatura, zarówno w warunkach dnia długiego jak i krótkiego, hamuje tuberyzację. W wysokiej temperaturze następuje obniżenie poziomu asymilatów kierowanych do podziemnych części rośliny, co jest także obserwowane w warunkach dnia długiego. Wysoka temperatura gleby ujemnie wpływa na tuberyzację, hamując przekształcanie się wierzchołka stolonu w bulwę. Wykazano, że optymalnymi warunkami dla produkcji bulw jest temperatura w zakresie 14–20°C. W przypadku wysokich temperatur nocnych 25–27°C obserwowane jest znaczące obniżenie plonu bulw (EWING i STRUIK 1992, MENZEL 1980).

Fotoperiod ma istotny wpływ na rozwój całej rośliny, w tym tworzenie bulw. W okre-

ślonych warunkach fotoperiodu fitochromy przekazują sygnał, który przemieszcza się z liści poprzez floem do części podziemnych ziemniaka, indukując tuberyzację (ABELEND A i współaut. 2011). Istotną rolę w fotoperiodycznej regulacji tuberyzacji pełni fitochrom B (PHYB), co zostało potwierdzone w doświadczeniu z wykorzystaniem transgenicznych form *S. tuberosum* subsp. *andigena* z zahamowaną ekspresją genu fitochromu B (JACKSON i współaut. 1996). Rośliny te były zdolne do zawiązywania bulw, pomimo zastosowanych niesprzyjających tuberyzacji warunków dnia długiego. Wprowadzenie do roślin ziemniaka genu *phyB* z *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity) prowadziło do zwiększonej inhibicji tuberyzacji w warunkach dnia długiego (THIELE i współaut. 1999, AKSENOVA i współaut. 2002).

ZNACZENIE SACHAROZY ORAZ HORMONÓW ROŚLINNYCH W REGULACJI TUBERYZACJI

Głównymi procesami biochemicznymi zachodzącymi w roślinie, mającymi zasadnicze znaczenie w procesie tuberyzacji, są synteza skrobi (TAUBERGER i współaut. 2000) oraz akumulacja białek zapasowych (TAYLOR i współaut. 1998). Podczas tuberyzacji ważny jest wystarczająco wysoki poziom węglowodanów. Zawiązywaniu się bulw towarzyszy aktywacja fotosyntezy, akumulacja asymilatów w części nadziemnej i ich transport do części podziemnej rośliny. Sacharoza, jako główna forma transportu cukrów w roślinach, pełni rolę cząsteczki sygnałowej, zarówno w procesie tuberyzacji, jak i kwitnienia (SHEEN i współaut. 1999, SUÁREZ-LÓPEZ 2005). Badania przeprowadzone na roślinach *in vitro* wykazały, że tuberyzacja ziemniaka w dużym stopniu zależy od poziomu sacharozy. Związek ten w bulwach bierze udział w aktywacji m.in. genów patatyny, inhibitora proteinaz II czy ADP-pirofosforylasy glukozy (XU i współaut. 1998). W czasie wzrostu stolonu w roślinie ziemniaka ma miejsce apoplastyczny transport sacharozy, podczas którego jest ona hydrolizowana przy udziale kwaśnej inwertazy. W czasie indukcji tuberyzacji transport apoplastyczny zostaje zastąpiony przez transport symplastyczny, w którym kluczową rolę odgrywa enzym syntaza sacharozy (CZYŻEWSKA i MARCZEWSKI 2009). Wykazano, że rolę cząsteczek sygnałowych w procesach rozwojowych roślin, w tym w

tuberyzacji ziemniaka, pełnić mogą transportery sacharozy. Rośliny transgeniczne *S. tuberosum* z podgatunków *tuberosum* oraz *andigena* z zahamowaną ekspresją genu transportera sacharozy *StSUT4* charakteryzowały się zdolnością do zawiązywania bulw, pomimo niesprzyjających tuberyzacji warunków dnia długiego (ang. long day, LD). Obniżona ekspresja genu *StSUT4* w roślinach transgenicznych skutkowałą spadkiem poziomu mRNA genu *StCO*, co wiąże się ze zwiększoną ekspresją genu *StFT* sprzyjającego tworzeniu się bulw nawet w warunkach nieindukcyjnych. Ponadto, w roślinach transgenicznych stwierdzono zwiększoną akumulację sacharozy i skrobi oraz zwiększony transport sacharozy do podziemnych części rośliny, co ma miejsce w czasie tuberyzacji (CHINCINSKA i współaut. 2008, 2013).

Gibereliny są grupą hormonów roślinnych, mających istotny wpływ na proces zarówno inicjacji, jak i indukcji tuberyzacji (EWING 1995). Za główną formę giberelin (GA) występujących w ziemniaku uważa się GA₁ i jej formę prekursorową GA₂₀. Główny szlak metaboliczny syntezy GA w ziemniaku przebiega według schematu: G₁₂-GA₅₃-GA₄₄-GA₁₉-GA₂₀-GA₁. Ostatnie, kluczowe etapy w biosyntezie giberelin katalizowane są przy udziale enzymów oksydazy GA₂₀ (GA20ox) oraz oksydazy GA₃. Głównym enzymem odpowiedzialnym za inaktywację bioaktyw-

nych form GA jest enzym oksydaza GA₂ GA-2ox(ang. GA2 oxidase 1) (HEDDEN i PHILLIPS 2000). Wykazano, że transgeniczne rośliny ziemniaka z nadekspresją genu *StGA20ox1* charakteryzowało opóźnione formowanie się bulw w warunkach dnia krótkiego, w porównaniu z roślinami z zahamowaną ekspresją tego genu. Obniżony, za sprawą supresji ekspresji genu *StGA20ox1* (ang. GA20 oxidase 1), poziom giberelin nie zniósł negatywnego wpływu dnia długiego na formowanie się bulw (JACKSON i współaut. 2000). Podobne wnioski z badań z wyciszeniem genów *StGA20ox1* i *StGA3ox2* wysnuli CARRERA i współaut. (2000) oraz BOU-TORRENT i współaut. (2011). KLOOSTERMAN i współaut. (2007) wykazali wzmożoną ekspresję genu *StGA20ox1* na początkowym etapie zawiązywania bulw, jeszcze przed pojawieniem się wyraźnych symptomów tuberyzacji. Wpływ *StGA20ox1* na tuberyzację stwierdzono w badaniach roślin *in vitro*. Zależności tej nie znaleziono dla roślin uprawianych w glebie. Rośliny z wyłączonym genem odpowiedzialnym za przekształcenie G₁₂ w G₅₃, a tym samym z obniżonym poziomem endogennych giberelin były zdolne do tuberyzacji przy dniu długim, po co najmniej trzymiesięcznym okresie przetrzymywania w takich warunkach. Przeniesienie roślin do warunków dnia krótkiego powodowało natychmiastowe zawiązywanie się bulw. Wyniki doświadczenia wskazują na istnienie złożonej fotoperiodycznej regulacji tuberyzacji, łączącej w sobie negatywną regulację w dniu krótkim poprzez GA oraz stymulację w warunkach dnia krótkiego za sprawą odpowiedniego fotoperiodu (VAN DEN BERG i współaut. 1995). Badania JACKSON i współaut. (1996) wykazały, że rośliny transgeniczne z zahamowanym genem *phyB* mają zdolność tuberyzacji w warunkach dnia długiego. W liściach i nadziemnych częściach tych roślin wykazano podwyższony poziom GA₁, GA₈ i GA₂₀ i obniżony poziom GA₂₉, w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Badania stanowią potwierdzenie udziału fitochromu B w hamowaniu tuberyzacji oraz jego wpływu na zawartość bioaktywnych form GA (MARTINEZ-GARCIA i współaut. 2002).

Cytokiny są kolejną grupą hormonów roślinnych, które mają wpływ na proces tuberyzacji. Dolistne traktowanie roślin roztworem cytokinin (Ck) nie ma wpływu na formowanie się bulw. Wykazano, że bezpośrednio działanie hormonów na stolon warunkuje inicjację tuberyzacji (PALMER i SMITH 1970). Wpływ cytokinin na inicjację tubery-

zacji wiąże się ze stymulacją przez hormony podziałów komórkowych (ROMANOV 2009). W przeprowadzonych w warunkach *in vitro* badaniach na 6 odmianach oraz na liniach transgenicznych wykazano, że w stymulacji tuberyzacji przy udziale Ck istotnym jest odpowiedni poziom sacharozy w pożywce (AKSENOVA i współaut. 2000, ROMANOV i współaut. 2000). Wykorzystana w doświadczeniach kinetyna stymulowała inicjację tuberyzacji. W czasie formowania bulw obserwowano zasadniczy wzrost poziomu endogennych Ck w stolonach oraz rozwijających się bulwach (MAUK i LANGILLE 1978, OBATA-SASAMOTO i SUZUKI 1979). Wykazano ponadto udział Ck w aktywacji enzymów związanych z biosyntezą skrobi, co wiąże się z akumulacją skrobi w bulwach (PALMER i BARKER 1973). Zwiększoną zawartość cytokinin zidentyfikowano na wczesnych etapach tuberyzacji. Po 4-6 dniach od jej inicjacji zawartość hormonów spadała. Ck nie pełniły roli w późniejszych etapach wzrostu bulwy (EWING 1995, RODRIGUEZ-FALCON i współaut. 2006).

Do grupy związków wpływających na tworzenie się bulw należą kwas jasmonowy (JA) i produkty jego metabolizmu, które przemieszczają się do stolonów w czasie inicjacji tuberyzacji (PELACHO i MINGO-CASTEL 1991). JA wpływa na kierunek podziałów komórkowych oraz warunkuje grubienie stolonu. Wykazano, że JA i jego pochodne indukują zmiany w orientacji mikrotubul, podobne do wywoływanych przez inhibitor syntezy GA, wpływając na podziały komórkowe w sposób przeciwny do GA (ABDALA i współaut. 2002). Dodatek kwasu jasmonowego i jego metylowanych form nie wpływa na ilość powstających bulw, ale w znaczący sposób stymuluje ich wzrost (SARKAR i współaut. 2006).

Wpływ kwasu abscysynowego (ABA) na przyspieszenie formowania się bulw wykazano w doświadczeniach na ziemniakach z podgatunku *andigena* i *tuberosum* (WAREING i JENNINGS 1980). ABA wpływa na supresję wzrostu wydłużeniowego stolonu i stymuluje inicjację tuberyzacji. Stymulujący efekt działania ABA na formowanie się bulw wiąże się z jego optymalnym stężeniem, zróżnicowanym w zależności od odmiany (HUSSEY i STACEY 1984). ABA stymuluje tuberyzację zarówno przy wysokim, jak i niskim stężeniu sacharozy oraz osłabia hamujące działanie GA na inicjację tuberyzacji (LESIŃSKA i SEKRECKA 2007). Nie obserwuje się zasadniczych zmian w zawartości ABA w czasie inicjacji tubery-

zacji (EWING 1995). Przypuszcza się, że kwas abscysynowy nie pełni roli w bezpośredniej, hormonalnej regulacji formowania bulw, ale jest negatywnym regulatorem GA (CLAASSENS i VREUGDENHIL 2000).

W przypadku kolejnej grupy hormonów roślinnych, auksyn, ich rola w procesie regulacji tuberyzacji nie jest do końca wyjaśniona. Istnieją przykłady badań wskazujących na negatywny wpływ tej grupy związków na inicjację tuberyzacji w roślinach *S. tuberosum* z podgatunku *andigena* (KUMAR i WAREING 1979). W przypadku dodania kwasu indoliloctowego (IAA) do pożywki, jego wpływ na proces zawiązywania się bulw zależny był od genotypu oraz zawartości sacharozy. Przy ni-

skim stężeniu cukru, dodatek hormonu wiązał się ze wzrostem liczby zawiązanych bulw, z kolei przy stężeniu sacharozy 5-8%, na ogół obserwowano mniejszą liczbę zawiązanych bulw (AKSENOVA i współaut. 2000). Badania wskazują, że poziom endogenego IAA przed inicjacją tuberyzacji wzrasta po czym spada, pozostając na niskim poziomie w czasie całego procesu wzrostu bulwy. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazano, że dodatek IAA do pożywki skutkowało znaczącym zwiększeniem wagi bulw w roślinach z podgatunku *andigena* i niektórych odmianach z podgatunku *tuberosum* (AKSENOVA i współaut. 2000, ROMANOV i współaut. 2000).

GENETYCZNE UWARUNKOWANIA TUBERYZACJI

W latach 80. XX w. CHAILAKHYAN i współaut. (1981) przeprowadzili doświadczenia na roślinach ziemniaka (podkładki) szczepionych zrazami tytoniu i stwierdzili, że w sprzyjających warunkach fotoperiodycznych kwitnieniu tytoniu towarzyszyła jednoczesna tuberyzacja. Wskazuje to na istnienie genetycznych powiązań pomiędzy kwitnieniem i tuberyzacją, dwoma zjawiskami bardzo istotnymi dla roślin ziemniaka. Dokładne poznanie mechanizmu zegara okołodobowego oraz procesu kwitnienia u *Arabidopsis* stały się punktem wyjścia w poszukiwaniu wspólnych elementów pomiędzy kwitnieniem a tuberyzacją. Zegar okołodobowy pełni bardzo ważną rolę w rozwoju i regulacji procesów życiowych roślin związanych z cyklem dnia i nocy (LOCKE i współaut. 2005). Głównym elementem mechanizmu kwitnienia jest białkowy produkt genu *CONSTANS* (*CO*). Ekspresja genu *CO* jest regulowana za pomocą czynników transkrypcyjnych *CDF1* (ang. cycling DOF factor 1) oraz *CDF2*, wytwarzanych przez roślinę w nocy. W ciągu dnia ekspresja *CDF1* i *CDF2* jest hamowana przy udziale kompleksu białka *GIGANTEA* i *FKF1* (ang. flavin-binding kelch repeat F-BOX1). Prowadzi to do wytworzenia białka *CO*, które indukuje ekspresję genu *FLOWER LOCUS T* (*FT*), umożliwiając zakwitanie rośliny (NAKAMICHI i współaut. 2005, SAWA i współaut. 2007).

Pierwszym potwierdzeniem roli genu *CO* w regulacji tuberyzacji były badania na transgenicznym roślinach *S. tuberosum* subsp. *andigena* z wprowadzonym z *A. thaliana* genem *CO* (MARTINEZ-GARCIA i współaut. 2002). Nadekspresja genu *CO* powodowała znaczące

opóźnienie tuberyzacji w sprzyjających procesowi warunkach dnia krótkiego. Eksperymenty przeprowadzone na roślinach szczepionych dowiodły, że nadekspresja genu *CO* w liściach hamuje proces formowania się bulw. GONZALEZ-SCHAIN i współaut. (2012) zidentyfikowali w roślinie ziemniaka gen *StCO* i zaklasyfikowali go do grupy genów odpowiedzialnych w roślinach za regulację procesów zależnych od fotoperiodu, podobnie jak gen *CO* u rzodkiewnika oraz gen *Hd1* (ang. heading date 1) u ryżu (PUTERILL i współaut. 1995, YANO i współaut. 2000). Opisany przez autorów gen *StCO* charakteryzował się wysokim podobieństwem do innych podobnych do *CO* genów, *St-sCOL1* (ang. short CO-like 1) i *St-lCOL1* (ang. long CO-like 1), zidentyfikowanych w ziemniaku (DROBYAZINA i KHAVKIN 2006, 2011). Rośliny z wyciszonym genem *StCO* tuberyzowały w nieindukcyjnych dla tworzenia bulw warunkach dnia długiego. Z kolei u roślin z nadekspresją tego genu obserwowano opóźnienie tuberyzacji. Wyciszenie genu *StCO* u roślin prowadzonych w warunkach dnia krótkiego nie wpływało na tuberyzację.

Potwierdzenie udziału genu *CO* w regulacji tuberyzacji stało się punktem wyjścia dla badań mających na celu ustalenie, czy podobnie jak w procesie kwitnienia, w tuberyzacji białko *FT* pełni główną rolę cząsteczki sygnałowej. Wprowadzenie do roślin *S. tuberosum* subsp. *andigena* genu *Hd3a* z ryżu będącego ortologiem genu *FT* u *Arabidopsis*, umożliwiło otrzymanie roślin transgenicznych, które były zdolne do zawiązywania bulw w nieindukcyjnych warunkach dnia długiego (NA-

VARRO i współaut. 2011). W doświadczeniach prowadzonych na roślinach szczepionych autorzy wykazali także, że rośliny z transgenem, niezależnie od tego, czy były szczepione na roślinie typu dzikiego czy w szczepieniu stanowiły podkładkę, tuberyzowały w warunkach dnia długiego. W stolonach roślin typu dzikiego stanowiących podkładkę zidentyfikowano białkowy produkt genu *Hd3a* (ang. heading date 3a), nie stwierdzono zaś obecności jego transkryptu, co wskazuje, że cząsteczką sygnałową w procesie inicjacji tuberyzacji było białko genu *Hd3a*, a nie jego transkrypt.

Badania nad poznaniem genomu ziemniaka doprowadziły do identyfikacji genów *STSP6A*, *StSP5G*, *StSP3D* wykazujących duże podobieństwo do genów *FT* z rzodkiewnika SFT (ang. single-flower truss), z pomidora oraz *Hd3a* z ryżu warunkujących kwitnienie (NAVARRO i współaut. 2011). Z badań wynika, że ekspresja genu *StSP6A* (ang. self-pruning 6A) silnie pozytywnie korelowała z tuberyzacją. Ekspresja tego genu miała miejsce zarówno w liściach, jak i w stolonach roślin w warunkach dnia krótkiego oraz w roślinach z zablokowanym genem *PHYB* tuberyzujących niezależnie od fotoperiodu. Potwierdzeniem istotnej roli genu *StSP6A* w procesie zawiązywania bulw jest ich powstawanie w roślinach transgenicznych z nadekspresją tego genu, pomimo niesprzyjających tworzeniu bulw warunków dnia długiego. Wyciszenie tego genu powodowało znaczące opóźnienie w formowaniu bulw. W przeprowadzonej analizie odmian o różnej wczesności, autorzy obserwowali korelację pomiędzy zwiększonym poziomem transkryptów genu *StSP6A* w liściach a wcześniejszą tuberyzacją. Stwierdzono ponadto, że ekspresja genu *StSP6A* w stolonach była opóźniona względem jego ekspresji w liściach. NAVARRO i współautorzy (2011) wykazali, że w warunkach dnia dłu-

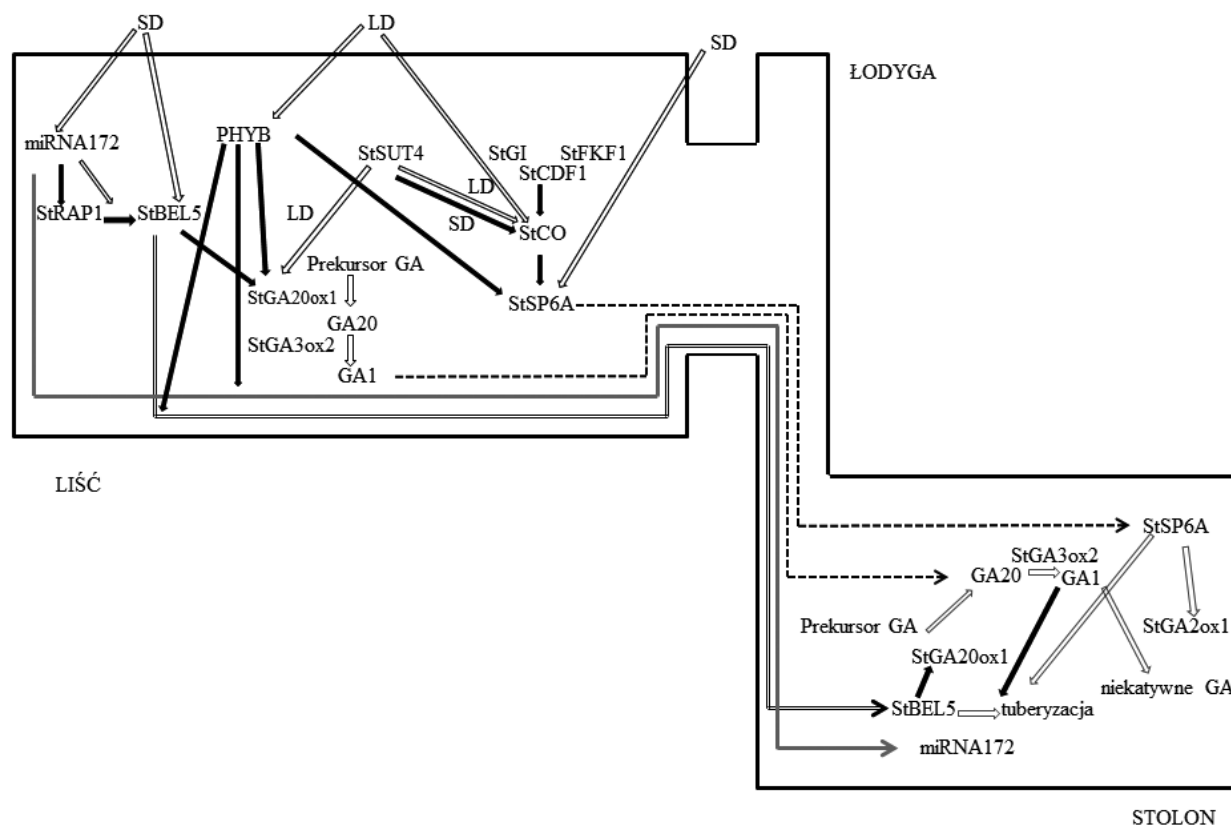
giego następowała represja ekspresji genu *StSP6A* warunkowana działaniem genu *StCO*. Przeniesienie roślin do warunków dnia krótkiego prowadziło do zawiązania bulw. Zaobserwowano, że kolejny zidentyfikowany gen *StSP3D* (ang. self-pruning 3D), ściśle związany z regulacją procesu kwitnienia, nie ma znaczącego wpływu na tuberyzację. Rośliny transgeniczne z nadekspresją genu *StSP3D* oraz rośliny typu dzikiego zawiązywały bulwy w tym samym czasie. Wykazano ponadto rolę genu *StSP5G* (ang. self-pruning 5G) jako negatywnego regulatora tuberyzacji (NAVARRO i współaut. 2011).

W obrębie QTL występującego na chromosomie V warunkującego dojrzałość roślin zidentyfikowano gen *StCDF1*, będący ortologiem genu *CDF1* u *A. thaliana* (VISKER i współaut. 2003, KLOOSTERMAN i współaut. 2013). Został on uznany za gen kandydujący, który może być powiązany z procesem tworzenia bulw. Analiza sekwencji genu *StCDF1* u osobników różniących się fenotypem pod względem wczesności zawiązywania bulw umożliwiła identyfikację trzech różnych alleli tego genu: *StCDF1.1*, *StCDF1.2* i *StCDF1.3* (KLOOSTERMAN i współaut. 2013). Ich różne kombinacje warunkowały fenotyp późny, wczesny bądź pośredni. Rezultatem nadekspresji wariantu genu warunkującego wczesną dojrzałość rośliny (*StCDF1.2*), w roślinie o fenotypie późnym, było wcześniejsze formowanie się bulw. Wywołanie nadekspresji genu *StCDF1.2* w roślinach *S. andigenum* umożliwiło tuberyzację w warunkach dnia długiego. Genotypy wczesne w warunkach dnia krótkiego charakteryzowały się zwiększoną ekspresją genu *StSP6A* w porównaniu z roślinami o fenotypie późnym. W warunkach dnia krótkiego nie stwierdzono ekspresji genu *StSP5G*, która była wysoka w genotypach o fenotypie późnym przy dniu długim.

ROLA TRANSPORTU CZĄSTECZEK SYGNAŁOWYCH W REGULACJI TUBERYZACJI

Pierwsze doniesienia o możliwości transportu wirusowego RNA w postaci kompleksów rybonukleoproteinowych przez plasmodesmy (RYABOV i współaut. 1999, HAYWOOD i współaut. 2002) oraz przykłady cząsteczek mRNA transportowanych w roślinach na duże odległości za pośrednictwem floemu (HAYWOOD i współaut. 2005) nadały kierunek poszukiwaniom cząsteczki sygnałowej odpowiedzialnej za indukcję tuberyzacji. W roślinach

ziemniaka transport długodystansowy cząsteczek mRNA został potwierdzony dla podobnego do BEL1 czynnika transkrypcyjnego, StBEL5 (ang. BEL-type homeodomain factor 5) (CHEN i współaut. 2003). Wykazano, że białko to wraz z czynnikiem transkrypcyjnym typu KNOTTED1-POTH1 (ang. potato homeobox 1) wpływają na proces tuberyzacji poprzez regulację fitohormonów. Czynniki te są białkami homeobokowymi zaliczanymi do



Ryc. 1. Model regulacji procesu tuberyzacji w ziemniaku (wg SUÁREZ-LÓPEZ 2013, zmieniona).

Linia czarną przerywaną i szarą oznaczone są odpowiednio przypuszczalny przepływ białek lub GA oraz miRNA172 z liści do stolonu. Linia podwójną czarną oznaczone jest przemieszczanie się mRNA. Strzałkami bez wypełnienia i strzałkami czarnymi oznaczone są odpowiednio indukcja i inhibicja powstawania transkryptów lub białek wpływających na proces tuberyzacji.

nadrodziny TALE (BÜRGLIN 1997). Wykazano, że nadekspresja genów *StBEL5* i *POTH1* prowadzi do przyspieszenia procesu tuberyzacji oraz zwiększenia plonu. Podczas gdy rośliny z nadekspresją genu *StBEL5* charakteryzowały się normalną budową liści, nadekspresja genu *POTH1* prowadziła do powstania zaburzeń w ich pokroju (CHEN i współaut. 2003). Poziom RNA genu *POTH1* w liściach i stolonach jest stały, podczas gdy akumulacja RNA genu *StBEL5* wzrasta w odpowiedzi na warunki dnia krótkiego. Wynika z tego, że to *StBEL5* pełni rolę głównej cząsteczki sygnałowej w procesie inicjacji tuberyzacji. Promotor *StBEL5* w wiązkach przewodzących liści jest aktywowany światłem, pozostaje zaś nieaktywny w łodygach. Akumulacja RNA genu *StBEL5* wzrasta w odpowiedzi na warunki dnia krótkiego. Obecność RNA genu *StBEL5* w komórkach floemu łodyg świadczy o możliwości transportu RNA z liści do łodyg, a stąd do części podziemnej rośliny

(BANERJEE i współaut. 2006). W warunkach dnia długiego mRNA genu *StBEL5* jest akumulowany głównie w liściach i łodygach. Przypuszcza się, że akumulacja ta wiąże się z wpływem PHYB, który może warunkować modyfikację białek chaperonowych towarzyszących RNA genu *StBEL5* w przepływie z liści do stolonów (SARKAR 2008). Istotnym elementem związanym z regulacją przepływu transkryptów genu *StBEL5* stanowią sekwencje nie podlegające translacji (UTR). Dowodem tego jest zdolność do tuberyzacji w nieindukujących warunkach dnia długiego u roślin z nadekspresją genu *StBEL5* o pełnej długości wraz z sekwencjami UTR (HANNAPPEL 2010). W części stolonowej białka *POTH1* i *StBEL5* wiążą się z sekwencją promotorową genu *GA20ox1* prowadząc do represji jego transkrypcji (ROSIN i współaut. 2003, CHEN i współaut. 2004).

Istotną rolę w tworzeniu bulw pełni także mikroRNA172, którego główną funkcją

jest udział w regulacji rozwoju generatywnego u różnych gatunków roślin (AUKERMAN i SAKAI 2003, MARTIN i współaut. 2009). Podwyższony poziom cząsteczek miRNA172 znaleziony został w roślinach w indukujących tuberyzację warunkach dnia krótkiego. Autorom udało się zidentyfikować w roślinie ziemniaka gen *RAP1* (ang. related to APETALA2 1), kodujący białko złożone z 454 aminokwasów, wykazujące homologię z AP2 i AP2 podobnymi białkami. Gen *RAP1* zawiera sekwencję kodującą komplementarną do miRNA172. Ilość transkryptów genu *RAP1* negatywnie korelowała z poziomem akumulacji cząsteczek miRNA172, co wskazuje, że *RAP1* może stanowić gen docelowy dla miRNA172. Rośliny transgeniczne z nadekspresją

miRNA172 charakteryzowały się zdolnością do wytwarzania bulw, pomimo warunków dnia długiego. Autorzy wykazali możliwość przenoszenia sygnału do indukcji tuberyzacji poprzez szczepienie roślin. Nadekspresja miRNA172 w części nadziemnej rośliny była wystarczająca, aby indukować tuberyzację, co nie było możliwe kiedy nadekspresja miRNA172 zachodziła wyłącznie w roślinie stanowiącej podkładkę. Ekspresja miRNA172 jest regulowana przez fitochrom B. W stolonach roślin anty-PHYB tuberyzujących w tym samym czasie, zarówno w warunkach dnia krótkiego, jak i długiego, ma miejsce znaczący przyrost ilości cząsteczek miRNA172, porównywalny z poziomem cząsteczek w warunkach dnia krótkiego.

PODSUMOWANIE

Proces tuberyzacji jest złożony i podlega regulacji przez wiele czynników. Badania wykazały, że na przebieg tuberyzacji wpływ ma układ zależności wielu genów, ich transkryptów oraz produktów białkowych. W warunkach dnia długiego ma miejsce hamowanie tuberyzacji przy udziale PHYB, *StCO*, *StSUT4*. Z kolei w warunkach dnia krótkiego dochodzi do uruchomienia mechanizmu umożliwiającego zawiązywanie bulw, którego głównymi elementami są gen *StSP6A*, mRNA genu *StBEL5* oraz mikroRNA172. Istotną rolę w kontroli procesu tuberyzacji pełnią także fitohormony, których działanie na poszczególne etapy formowania się bulw zostało dobrze poznane. Wartą podkreślenia w hormonalnej kontroli tuberyzacji, jest rola giberelin jako negatywnego regulatora. Działanie GA

wiąże się ze stymulacją wzrostu wydłużeniowego stolonów oraz hamującym działaniem na inicjację tuberyzacji i wzrost bulw. Ważną funkcję wśród hormonów roślinnych w procesie formowania się bulw odgrywa kwas abscysynowy pełniący rolę negatywnego regulatora giberelin. ABA hamuje elongację stolonów oraz działa na proces indukcji i inicjacji tuberyzacji stymulująco, podobnie do cytokinin, kwasu jasmonowego i jego pochodnych.

Optymalizację tuberyzacji osiągnąć można poprzez dobór odpowiednich warunków środowiskowych. Inną drogą prowadzącą do osiągnięcia największej wydajności procesu tuberyzacji mogą być zmiany statusu hormonalnego oraz zmiany ekspresji genów biorących udział w procesie zawiązywania bulw na drodze modyfikacji genomu rośliny.

REGULACJA TUBERYZACJI W ZIEMNIAKU

Streszczenie

Tuberyzacja, czyli tworzenie bulw, jest zasadniczym procesem biologicznym w rozwoju i plonowaniu roślin. Wytwarzanie bulw to złożony proces rozwojowy, na który składają się czynniki genetyczne, biochemiczne i środowiskowe. Długość dnia odgrywa kluczową rolę w mechanizmie zawiązywania bulw. W indukujących tuberyzację warunkach dnia krótkiego dochodzi do powstania cząsteczki sygnałowej, który transportowany do podziemnych części rośliny, stolonów, uruchamia tuberyzację. Istnieje wiele przesłanek świadczących o istnieniu genetycz-

nych powiązań pomiędzy dwoma istotnymi dla ziemniaka procesami, tuberyzacji i kwitnienia. Elementami wspólnymi obu zjawisk jest odpowiedź na fotoperiod i udział cząsteczek sygnałowych przemieszczających się z liści do stolonów. Jeden z FT podobnych genów zidentyfikowany w ziemniaku pełni w mechanizmie tuberyzacji kluczową rolę podobną do roli genu FT w procesie kwitnienia. Dokładne poznanie mechanizmu tuberyzacji jest kluczowe w tworzeniu strategii hodowlanych mających na celu zwiększenie plonu bulw i poprawienie jego jakości.

REGULATION OF TUBERIZATION IN POTATO

Summary

Tuberization is a biological process essential for production of potatoes, the third most important food crop in the world. Tuberization is a complex, developmental process of potato which involves interactions between genetic, environmental and biochemical factors. Day length is critical for tuber formation. Under inductive condition of short day, a systemic signal is synthesized and transported to underground stolons to induce tuberization. There is evidence in-

dicating the existence of a common genetic regulatory pathway of flowering and tuberization, the two most important processes in potato plant. These processes are similar in the response to photoperiod and involvement of phloem-mobile signals. One of FT-like genes identified in potato plays similar role as that FT in flowering control. Understanding of tuber formation is essential to create breeding strategies to improve tuber yield and quality.

LITERATURA

- ABDALA G., CASTRO G., MIERSCH O., PEARCE D., 2002. *Changes in jasmonate and gibberellin levels during development of potato plants (Solanum tuberosum)*. Plant Growth Regul. 36, 121–126.
- ABELEND A. J. A., NAVARRO C., PRAT S., 2011. *From the model to the crop: genes controlling tuber formation in potato*. Curr. Opin. Biotechnol. 22, 287–292.
- AKSENOVA N. P., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOVSKAYA S. A., KOSSMANN J., WILLMITZER L., ROMANOV G. A., 2000. *Transformed potato plants as a model for studying the hormonal and carbohydrate regulation of tuberization*. Russ. J. Plant Physiol. 47, 370–379.
- AKSENOVA N. P., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOVSKAYA S. A., GUKASYAN I. A., GATZ C., ROMANOV G. A., 2002. *Tuber formation and growth of in vitro cultivated transgenic potato plants overproducing phytochrome B*. Russ. J. Plant Physiol. 49, 478–483.
- AKSENOVA N. P., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOVSKAYA S. A., SERGEEVA L. I., ROMANOV G. A., 2012. *Hormonal Regulation of tuber formation in potato plants*. Russ. J. Plant Physiol. 59, 451–466.
- AUKERMAN M. J., SAKAI H., 2003. *Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes*. Plant Cell 15, 2730–2741.
- BANERJEE A. K., CHATTERJEE M., YU Y., SUH S.-G., MILLER W. A., HANNAPEL D. J., 2006. *Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway*. Plant Cell 18, 3443–3457.
- BOU-TORRENT J., MARTINEZ-GARCIA J. F., GARCIA-MARTINEZ J. L., PRAT S., 2011. *Gibberellin A1 metabolism contributes to the control of photoperiod-mediated tuberization in potato*. PLoS ONE DOI: 10.1371/journal.pone.0024458
- BÜRGLIN T. R., 1997. *Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals*. Nucl. Acids Res. 25, 4173–4180.
- CARRERA E., BOU J., GARCÍA-MARTÍNEZ J. L., PRAT S., 2000. *Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants*. Plant J. 22, 247–256.
- CHAILAKHYAN M. K., YANINA L. I., DEVEDZHIAN A. G., LOTOVA G. N., 1981. *Photoperiodism and tuber formation in grafting of tobacco onto potato*. Dok. Akad. Nauk. 257, 1276–1280.
- CHEN H., ROSIN F. M., PRAT S., HANNAPEL D. J., 2003. *Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation*. Plant Physiol. 132, 1391–1404.
- CHEN H., BANERJEE A. K., HANNAPEL D. J., 2004. *The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of GA20ox1*. Plant J. 38, 276–284.
- CHINCINSKA I. A., LIESCHE J., KRÜGEL U., MICHALSKA J., GEIGENBERGER P., GRIMM B., 2008. *Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response*. Plant Physiol. 146, 515–528.
- CHINCINSKA I., GIER K., KRÜGEL U., LIESCHE J., HE H., GRIMM B., 2013. *Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production*. Front. Plant Sci. 4, 1–12.
- CLAASSENS M. M. J., VREUGDENHIL D., 2000. *Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation?* Potato Res. 43, 347–369.
- CZYŻEWSKA D., MARCZEWSKI W., 2009. *Metabolizm skrobi w bulwach ziemniaka*. Post. Bioch. 55, 441–446.
- DROBYAZINA P. E., KHAVKIN E. E., 2006. *A structural homolog of CONSTANS in potato*. Russ. J. Plant Physiol. 53, 698–701.
- DROBYAZINA P. E., KHAVKIN E. E., 2011. *The structure of two CONSTANS-LIKE1 genes in potato and its wild relatives*. Gene 471, 37–44.
- EWING E. E., 1995. *The role of hormones in potato (Solanum tuberosum L.) tuberization*. [W:] Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. DAVIES P. J. (red.). Kluwer Academic, Dordrecht, 698–724.
- EWING E. E., STRUIK P. C., 1992. *Tuber formation in potato: induction, initiation and growth*. Hortic. Rev. 14, 89–98.
- GABRIEL W., ŚWIEŻYŃSKI K. M., 1977. *Hodowla ziemniaka*. [W:] *Hodowla i nasiennictwo ziemniaka*. GABRIEL W., ŚWIEŻYŃSKI K. M. (red.). Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 9–230.
- GONZÁLEZ-SCHAIN N. D., DÍAZ-MENDOZA M., ŻURCZAK M., SUÁREZ-LÓPEZ P., 2012. *Potato CONSTANS is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner*. Plant J. 70, 678–690.
- HANNAPEL D. J., 2010. *A model system of development regulated by the long-distance transport of mRNA*. J. Integr. Plant Biol. 52, 40–52.
- HAYWOOD V., KRAGLER F., LUCAS W. J., 2002. *Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling*. Plant Cell 14 (Suppl.), 303–325.
- HAYWOOD V., YU T.-S., HUANG N.-C., LUCAS W. J., 2005. *Phloem long-distance trafficking of GIBBEREL-*

- LIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development.* Plant J. 42, 49–68.
- HEDDEN P., PHILLIPS A. L., 2000. *Gibberellin metabolism: new insight revealed by genes.* Trends Plant Sci. 5, 523–530.
- HUSSEY G., STACEY N. J., 1984. *Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (Solanum tuberosum L.).* Ann. Bot. 53, 565–578.
- JACKSON S. D., 1999. *Multiple signaling pathways control tuber induction in potato.* Plant Physiol. 119, 1–8.
- JACKSON S. D., HEYER A., DIETZE J., PRAT S., 1996. *Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato.* Plant J. 9, 159–168.
- JACKSON S. D., JAMES P. E., CARRERA E., PRAT S., THOMAS B., 2000. *Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B.* Plant Physiol. 124, 423–430.
- KLOOSTERMAN B., NAVARRO C., BIJSTERBOSCH G., LANGE T., PRAT S., VISSER R. G. F. i współaut., 2007. *St-GA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development.* Plant J. 52, 362–373.
- KLOOSTERMAN B., ABELENDA J. A., GOMEZ M. M. C., OORTWIJN M., DE BOER J. M., KOWITWANICH K. i współaut., 2013. *Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes.* Nature 495, 246–250.
- KRAUSS A., 1985. *Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones and tuberization.* [W:] Potato Physiology. Li P. H. (red.). London Academic, 209–231.
- KUMAR D., WAREING P. F., 1979. *Studies on tuberization of Solanum andigena. II. Growth, hormones and tuberization.* New Phytol. 73, 833–840.
- LESIŃSKA M., SEKRECKA D., 2007. *Czynniki indukujące tuberyzację w warunkach in vitro – przegląd literatury.* Biuletyn IHAR 243, 141–149.
- LOCKE J. C., SOUTHERN M., KOZMA-BOGNAR L., HIBBERD V., BROWN P. E., TURNER M. S., MILLAR A. J., 2005. *Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis.* Mol. Sys. Biol. 1, 1–9.
- MARTIN A., ADAM H., DÍAZ-MENDOZA M., ŻURCZAK M., GONZÁLEZ-SCHAIN N. D., SUÁREZ-LÓPEZ P., 2009. *Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172.* Development 136, 2873–2881.
- MARTINEZ-GARCIA J. F., GARCIA-MARTINEZ J. L., BOU J., PRAT S., 2002. *The Interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization.* Plant Growth Regul. 20, 377–386.
- MAUK C. S., LANGILLE A. R., 1978. *Physiology of tuberization in Solanum tuberosum L. cis zeatin riboside in potato plant. Its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod.* Plant Physiol. 62, 438–442.
- MENZEL C. M., 1980. *Tuberization in potato in high temperatures. Response of gibberellin and growth inhibitors.* Ann. Bot. 46, 259–265.
- NAKAMICHI N., KITA M., NIINUMA K., ITO H., NISHIWAKI T., MURAYAMA Y., IWASAKI H., OYMA T., 2005. *Arabidopsis clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7, PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-depend photoperiodic pathway.* Plant Cell Physiol. 48, 822–832.
- NAVARRO C., ABELENDA J. A., CRUZ-ORÓ E., CUÉLLAR C. A., TAMAKI S., SILVA J. i współaut., 2011. *Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T.* Nature 478, 119–122.
- OBATA-SASAMOTO H., SUZUKI H., 1979. *Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization.* Physiol. Plant. 45, 320–324.
- PELACHO A. M., MINGO-CASTEL A. M., 1991. *Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons in vitro.* Plant Physiol. 97, 1253–1255.
- PALMER C. E., BARKER W. G., 1973. *Influence of ethylene and kinetin on tuberization of potato Solanum tuberosum L. stolons cultured in vitro.* Ann. Bot. 37, 85–95.
- PALMER C. E., SMITH O. E., 1970. *Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of Solanum tuberosum L. cultured in vitro.* Plant Cell Physiol. 11, 303–314.
- PUTERILL J., ROBSON F., LEE K., SIMON R., COUPLAND G., 1995. *The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors.* Cell 80, 847–857.
- RODRIGUEZ-FALCON M., BOU J., PRAT S., 2006. *Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response.* Annu. Rev. Plant Biol. 57, 151–180.
- ROMANOV G. A., 2009. *How do cytokinins affect the cell?* Russ. J. Plant Physiol. 56, 269–290.
- ROMANOV G. A., AKSENOVA N. P., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOVSKAYA S. A., KOSSMANN J., WILLMITZER L., 2000. *Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberization parameters of different cultivars and transgenic lines of potato in vitro.* Plant Growth Regul. 32, 245–251.
- ROSIN F. M., HART J. K., HORNER H. T., DAVIES P. J., HANNAPEL D. J., 2003. *Overexpression of a Knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation.* Plant Physiol. 132, 106–117.
- RYABOV E. V., ROBINSON D. J., TALIANSKY M. E., 1999. *A plant virus-encoded protein facilitates long distance movement of heterologous viral RNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1212–1217.
- SARKAR D., 2008. *The signal transduction pathways controlling in plant tuberization in potato: an emerging synthesis.* Plant Cell Rep. 27, 1–8.
- SARKAR D., PANDEY S. K., SHARMA S., 2006. *Cytokinins antagonize the jasmonates action on the regulation of potato (Solanum tuberosum L.) tuber formation invitro.* Plant Cell Tissue Organ Cult. 87, 285–295.
- SAWA M., NUSINOW D., KAY S., IMMAIZUMI T., 2007. *FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis.* Science 318, 261–265.
- SHEEN J., ZHOU L., JANG J.-C., 1999. *Sugars as signaling molecules.* Curr. Opin. Biol. 2, 410–418.
- SUÁREZ-LÓPEZ P., 2005. *Long-range signaling in plant reproductive development.* Int. J. Dev. Biol. 49, 761–771.
- SUÁREZ-LÓPEZ P., 2013. *A critical appraisal of phloem-mobile signals involved in tuber formation induction.* Front. Plant Sci. 4, 1–7.
- TAUBERGER E., FERNIE A. R., EMMERMANN M., RENZ A., KOSSMAN J., WILLMITZER L., TRTHEWEY R. N., 2000. *Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate.* Plant J. 23, 43–53.
- TAYLOR M. A., GEORGE L. A., DAVIES H. V., 1998. *cDNA cloning and characterization of an α-glucosidase gene from potato (Solanum tuberosum L.).* Plant J. 13, 419–425.
- THIELE A., HEROLD M., LENK J., QUAIL P. H., GATZ C., 1999. *Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development.* Plant Physiol. 120, 73–81.

- VAN DEN BERG J. H., SIMKO J., DAVIES P. J., EWING E. E., HALINSKA A., 1995. *Morphology and [¹⁴C]gibberellin A₁₂ metabolism in wild-type and dwarf Solanum tuberosum ssp. andigena growth under long and short photoperiods*. J. Plant Physiol. 146, 467-473.
- VISKER M. H., KEIZER L. C., VAN ECK H. J., JACOBSEN E., COLON L. T., STRUIK P. C., 2003. *Can QTL for late blight resistance on potato chromosome 5 be attributed to foliage maturity type?* Theor. Appl. Genet. 106, 317-325.
- WAREING P. F., JENNINGS A. M. V., 1980. *The hormonal control of tuberization in potato*. [W:] *Plant Growth Substances*. SKOOG F. (red.). Springer-Verlag, New York, 293-300.
- XU X., VAN LAMMEREN A., VERNER E., VREUGDENHIL D., 1998. *The role of gibberellin, abscisic acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro*. Plant Physiol. 117, 575-584.
- YANO M., KATAYOSE Y., ASHIKARI M., 2000. *Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS*. Plant Cell 12, 2473-2483.