

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2013)03-0129-07

遗传育种

马铃薯薯形突变体 T-DNA 插入侧翼序列分析

沈云龙, 谢婷婷, 柳俊

(华中农业大学生命科学技术学院, 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室,
国家蔬菜改良中心华中分中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 以‘鄂马铃薯 3 号’为材料, 通过试管薯快速转基因技术获得一个编号为 pCL2b-2 薯形突变系, 本研究通过表型鉴定、侧翼序列扩增和生物信息学等方法对其进行了研究, 目的是分析该突变株表型变化控制机制。结果表明, 该突变体的试管薯和温室收获块茎长宽比在 $p < 0.05$ 水平均显著大于野生型受体薯, 其中试管薯长宽比为 1.78, 野生型试管薯长宽比为 1.33; 温室收获块茎长宽比为 1.50, 野生型块茎为 1.29; 利用 hiTAIL-PCR 技术对 T-DNA 插入位点两侧的侧翼序列分析表明, T-DNA 插入编码异戊烯基转移酶(IPT)基因内部, 该基因为细胞分裂素合成酶基因(*StIPT*), 暗示 *StIPT* 基因可能参与马铃薯薯形发育。

关键词: 马铃薯; 薯形; 异戊烯基转移酶

Flanking Sequence Analysis of a Potato T-DNA Inserted Mutant of Tuber Shape

SHEN Yunlong, XIE Tingting, LIU Jun*

(College of Life Science and Technology/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (HAU), Ministry of Education/National Center for
Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: A tuber shape mutant, pCL2b-2, was obtained by T-DNA inserted transformation on microtuber of potato (*Solanum tuberosum* L.) variety 'E-potato 3' (E3). In this study, we identified the tuber shape, amplified the T-DNA flanking sequences and did some bioinformatics work to analyze the tuber shape control mechanism. The length-width ratio of *in vitro* grown microtubers of the mutant (1.78) was significantly greater than that of the wild type (1.33) ($p < 0.05$). The shape of tubers grown in pots was also significantly different between pCL2b-2 mutant and the wild type, 1.50 vs. 1.29. Flanking sequences of inserted location of the T-DNA were amplified by hiTAIL-PCR. Bioinformatics analysis showed that the T-DNA was inserted into the isopentenyltransferase (IPT) gene which encodes a cytokinins synthetase *StIPT*. It is proposed that *StIPT* may participate in morphogenesis of potato tubers.

Key Words: potato; tuber shape; isopentenyltransferase (IPT)

马铃薯是非谷类作物中最重要的粮食作物, 不仅富含淀粉, 同时还含有蛋白质、维生素 B1、B2 和维生素 C 等, 具有全面的营养价值。马铃薯耐贫瘠、耐干旱, 是许多国家的主食, 在解决粮食问题中具有重要作用。全球马铃薯年产量保持着稳定的

增长, 2011 年已达到 3.74 亿 t, 其中中国作为马铃薯的第一生产大国, 产量达到 8 835 万 t。

块茎是马铃薯营养生殖和作为蔬菜粮食的重要器官, 其发育直接关系到马铃薯的营养以及产量。马铃薯块茎形成包括形态学的建成和贮藏物的积累

收稿日期: 2013-04-29

基金项目: 现代农业技术体系项目(CARS-10-P08); 国家自然科学基金项目(31000736); 高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金课题(20100146120038)。

作者简介: 沈云龙(1988-), 男, 研究生, 研究方向为马铃薯生物技术育种。

* 通信作者(Corresponding author): 柳俊, 教授, 研究方向为马铃薯生物技术育种, E-mail: liujun@mail.hzau.edu.cn。

两个过程。马铃薯生长过程中, 其地下茎节长出侧芽并发育为匍匐茎^[1], 在合适的条件下, 匍匐茎顶端细胞生长方向改变, 经过细胞分裂和细胞膨大过程完成块茎的形成。马铃薯块茎形成过程中积累了大量的碳水化合物、脂类和蛋白质等物质, 其中最显著的是 Patatin 和淀粉的积累^[2]。植物激素在马铃薯块茎发育中起着重要作用, 其中赤霉素(GAs)能促进匍匐茎的形成, 但抑制块茎发育^[3]; 生长素(IAA)不同浓度处理对马铃薯块茎发育影响不同, 其机制尚不明确^[4]; 细胞分裂素(CK)对马铃薯块茎形成具有双向调节作用, 但其调节机制还不清楚。在马铃薯中过量表达拟南芥细胞分裂素氧化酶基因 *AtCKX2*, 植株内源细胞分裂素含量降低, 该转基因株系在非诱导结薯条件下也能结薯, 在诱导结薯条件下, 转基因株系形成的块茎大于对照, 但单株结薯量降低^[5]。

外观品质是马铃薯块茎品质的重要部分, 其中薯形是一些加工性状的重要品质, 如薯片加工要求圆形和椭圆形薯形, 薯条加工要求长柱形或者长椭圆形薯形。目前全世界广泛使用的炸条品种, 只有加拿大在 80 年代初选育的 'Shepody'^[6]。由于控制马铃薯薯形的遗传基础目前并不十分清楚, 马铃薯薯形育种效率一直很低。

本实验室用 pBI21 载体在以 E3 为受体的农杆菌介导的转基因过程中, 获得一批 T-DNA 插入突变株系, 其中编号 pCL2b-2(未发表)的株系在块茎表型上与受体 E3 相比显著增长, 疑是长薯形突变体。本研究对 pCL2b-2 突变体进行了表型观察和插入位点侧翼序列分析, 以期了解薯形变异相关的分子信息, 为薯形发育研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

'鄂马铃薯 3 号'(E3)无菌试管苗为本实验室保存材料。pCL2b 是具有低温诱导活性的块茎特异表达

融合启动子, 由李萌博士改造。pCL2b-2 是以 E3 为受体, 将 pCL2b 连接到载体 pBI121, 利用农杆菌介导的转基因技术获得的转基因株系, 并由实验室保存。

1.2 表型鉴定

E3 和 pCL2b-2 试管苗分别在含 4%蔗糖浓度的 MS 培养基, 长日照(16 h 光照, 8 h 黑暗)培养 3 周后, 将各植株 2~4 茎节转入含 8%蔗糖浓度的 MS 培养基的玻璃试管中, 短日照(8 h 光照, 16 h 黑暗)诱导结薯。每个试管苗含一个茎节, 11~18 个试管苗作为一个重复, 共 3 个重复。将 E3 与 pCL2b-2 试管苗在温室种植, 共 3 个重复, 每重复 8~10 钵, 对 30 g 以上的块茎用于薯形鉴定。薯形采用长宽比统计。

1.3 RB 端载体骨架整合分析

参考曹善汉等^[7]的方法, 在载体 pBI121 靠近右边界序列(RB)的 T-DNA 区设计右边界反向引物 RP-A1, 根据右边界侧翼序列设计右边界正向引物 RP-S1 和 RP-S2 等(图 1, 各引物间距为 500~1 000 bp)。用 RP-A1 依次与正向引物 RP-S1 和 RP-S2 等配对扩增 pCL2b-2 基因组 DNA 中插入的 T-DNA 的 RB 端侧翼序列, 分析载体插入片段的大小, 各引物序列见表 1。

1.4 RB 端侧翼序列扩增

根据基因组中已知的插入序列设计 3 个嵌套的特异性引物 SP1、SP2 和 SP3, 分别和 4 组简并引物组合(表 1), 以 pCL2b-2 基因组 DNA 为模板, 利用 hiTAIL-PCR 技术进行连续的 3 轮 PCR 扩增。将引物 SP1 和 4 个随机引物分别组合进行第 1 轮扩增; 将第 1 轮 PCR 产物进行 40 倍稀释作为第 2 轮反应的模板, 利用 SP2 和通用引物 AC1 进行第 2 轮扩增反应; 将第 2 轮产物 10 倍稀释, 作为第 3 轮反应模板, 用引物组合 SP3 和 AC1 进行第 3 轮扩增, 选择较大的片段测序。PCR 反应体系见表 2, PCR 反应程序参考 Liu 和 Chen^[8], 利用不同的退火温度选择性地从突变体中克隆外源插入序列的侧翼序列。

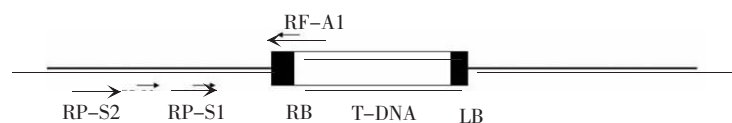


图 1 pBI121 载体骨架整合分析引物位置

Fig 1 Primers for integration analysis on vector pBI121 backbone

表 1 hiTAIL-PCR 及载体骨架整合分析所用的引物序列
Table 1 Primers for hiTAIL-PCR and integration analysis of vector backbone

引物名称 Primer	序列 Sequence
RP-A1	ATTGTCGTTTCCCGCCTTCAG
RP-S1	TTCCGCCAGTTTGCGTGTCTC
RP-S2	GTCACCCCTTTCTCGGTCCTTC
SP1	TGATAGTGACCTTAGGCGACTTTTGAACG
SP2	<u>ACGATGGACTCCAGTCCGGCCCGTATGTGCTTAGCTCATTAACTCCAGAA</u>
SP3	CTCCTTCAATCGTTGCGGTTCTGTC
LAD-1	<u>ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA</u>
LAD-2	<u>ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)N(G/C/T)NNNGGTT</u>
LAD-3	<u>ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A) (G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA</u>
LAD-4	<u>ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T) (G/A/T) N(G/C/T) NNNCGGT</u>
AC1	<u>ACGATGGACTCCAGAG</u>

注：表中划线粗体部分为 hiTAIL-PCR 引物的通用接头。

Note: The underline parts refer to the universal adaptor of primers for hiTAIL-PCR.

表 2 hiTAIL-PCR 反应体系
Table 2 Reaction systems used in hiTAIL-PCR

组份 Component	储存液浓度 Stock concentration	第一轮 Primary reaction	第二轮 Secondary reaction	第三轮 Tertiary reaction
Temple DNA	10 ng/μl	1 μl	1 μl(40×)	1 μl(10×)
LA Taq	5 U/μl	0.1 μl	0.12 μl	0.1 μl
GC Buffer	2×	10 μl	12.5 μl	12.5 μl
SPn	10 μM	0.6 μl(SP1)	0.75 μl(SP2)	0.75 μl(SP3)
LADs	10 μM	2 μl	0.75 μl(AC1)	0.75 μl(AC1)
dNTP	10 mM	0.4 μl	0.5 μl	0.5 μl
ddH ₂ O		5.9 μl	9.38 μl	9.4 μl
总 Total		20 μl	25 μl	25 μl

1.5 插入位点分析

根据测序结果，在马铃薯基因组数据库中进行序列比对，查找 T-DNA 插入位点，并分析插入位点序列信息。对插入位点进行 PCR 扩增检测，进一步确定插入位点的详细信息。

2 结果与分析

2.1 组织培养条件下的表型鉴定

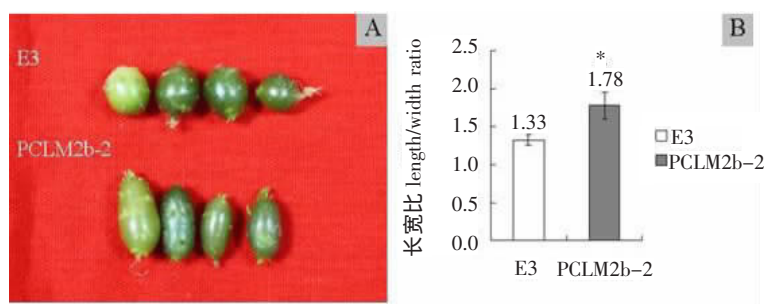
将 E3 和 pCL2b-2 在含 4%蔗糖的 MS 培养基中长日照下培养 3 周后，分别取叶、根和全株进行表型鉴定。结果显示，组织培养条件下，长日照生长 3 周的 pCL2b-2 植株生长正常，与其受体基因型 E3 在植株表型和长势上基本一致(图 2)。

结薯诱导条件下(短日照、8%蔗糖浓度)，



图 2 pCL2b-2 和 E3 表型观察

Figure 2 Characteration of pCL2b-2 mutant and E3



A. 试管薯表型; B. 试管薯薯形长/宽分析; * 表示 $p < 0.05$ 。

A. Phenotype of tuber *in vitro*; B. Statistical analysis of tuber shape with long/width; * means $p < 0.05$.

图 3 pCL2b-2 和 E3 组织培养条件下表型鉴定

Figure 3 Phenotype identification of pCL2b-2 mutant and E3 by culture *in vitro*

pCL2b-2 和 E3 均正常结薯。3 次重复的试管薯长宽比统计表明, pCL2b-2 试管薯长宽比为 1.78, 比对照 E3 超出 33.92%, 统计分析表明, 二者差异达到显著水平(图 3)。

2.2 温室种植条件下的薯形鉴定

将 pCL2b-2 和 E3 同时在温室种植。正常成熟

后, 取薯块大于等于 30 g 的薯进行统计。结果表明, 在温室种植条件下, pCL2b-2 薯形也显著长于 E3, 长宽比增长 16.88%(图 4)。组织培养和温室种植条件下表型鉴定结果证明, T-DNA 的插入没有影响突变株的正常生长, 但薯形显著长于受体基因型 E3。



A. 温室种植条件下块茎薯形; B. 块茎薯形长/宽分析; * 表示 $p < 0.05$ 。

A. Phenotype of tuber *in vivo*; B. Statistical analysis of tuber shape with long/width; * means $p < 0.05$.

图 4 pCL2b-2 和 E3 温室种植条件下表型鉴定

Figure 4 Phenotype identification of pCL2b-2 and E3 by culture *in vivo*

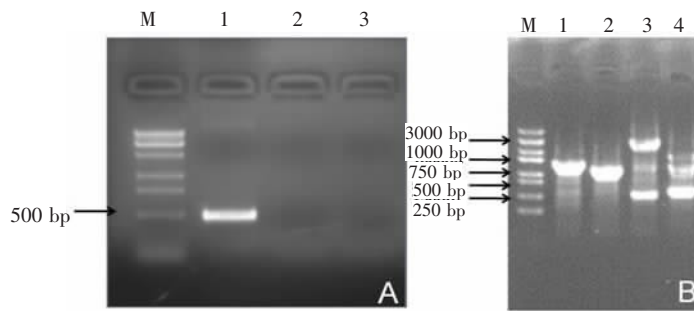
2.3 侧翼序列扩增及插入位点分析

利用引物组合 RP-A1 和 RP-S1 对 pCL2b-2 基因组进行扩增(图 5A), 未扩增出条带, 表明 T-DNA 右边界(RB)旁侧 500 bp 外无载体序列插入到马铃薯基因组中。

在 pBI121 RB 和 NOS-P 区设计 3 个特异性巢式引物 SP1、SP2 和 SP3(表 1), 采用 hiTAIL-PCR 方法扩增 RB 端侧翼序列。用 SP1 分别和随机引物 LAD-1、LAD-2、LAD-3 和 LAD-4 组合(表 1), 以 pCL2b-2 基因组 DNA 为模板进行第 1 轮扩增。将第 1 轮的 4 组扩增产物 40 倍稀释作为模板, 利

用引物组合 SP2 和 AC1 进行第 2 轮扩增(图 5B)。特异性引物与随机引物 LAD-3 扩增出来的片段最长, 更易扩增出插入片段侧翼序列, 将该组合第 2 轮扩增产物 10 倍稀释作为模板, 利用引物组合 SP3 和 AC1 进行第 3 轮扩增, 回收扩增产物, A-T 克隆转化大肠杆菌 DH5 α , 随机挑选 3 个克隆测序获得了 965 bp 的序列, 其中 139 bp 为 T-DNA 上 RB 元件 3' 末端 6 个碱基后的序列(图 6), 进一步证明了载体 pBI121 上 RB 元件 5' 端无片段整合到植物基因组中。

将已扩增的 965 bp 序列中的 826 bp 非 T-



A: pCL2b-2 载体骨架整合分析结果, 泳道 M: DNA marker trans 5K; 泳道 1: 质粒 pBI121 作为阳性对照; 泳道 2: pCL2b-2; 泳道 3: E3 作为阴性对照。A: Integration analysis of vector backbones results of RB on mutants; Lane M: DNA marker trans 5K; Lane 1: pBI121 as a positive control; Lane 2: pCL2b-2; Lane 3: E3 as a negative control.

B: RB 端侧翼序列扩增, 泳道 M: DNA marker trans 2K plus; 泳道 1~4: hiTAIL-PCR 第 2 轮产物, 分别对应第 1 轮引物 LAD-1、LAD-2、LAD-3 和 LAD-4。B: Amplification of flanking sequence on RB; Lane M: DNA Marker Trans 2K plus; Lane 1-4: Products of the secondary reaction according to LAD-1, LAD-2, LAD-3 and LAD-4 in the primary reaction.

图 5 pCL2b-2 RB 端骨架整合分析及侧翼序列扩增

Figure 5 Integration analysis of vector backbone and flanking sequence amplification on pCL2b-2

CTCCTTCAATCGTTGCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTAACCGCTTGTCCCGCGTCATCGGCGGGG
 TCATAACGTGACTCCCTTAATTCCTCCGCTCATGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTCAGTTTAACTATC
 AGTGTTTATTTAGGCTTTTCGAATAAACATTACAATCATTAATATTTTGATCCTTTAACTTTCAAAATATAT
 CTATCACGTGACGCTTATTTTTGGAAAAATCAGTTCCCATTTGACAACATTTTTTCTCATTTAAAAAGAA
 CACAAAATAAAAAATGCTCTCTCGGGAATCTGTTTCATCTGGCCAAACAACCACATGGTAATACTAAAAAA
 TCATATGATTTTTGTGGCCTTACTTCACAGATTGTGCAGCAGCCCATGGACACACATTCAGCCATCCCG
 TCTGCCTCAACAGGTGCCAGCGTCTTAGGTAATTTCTATTTCCCTTATATGATACTTCTTCTCCTTCTCCA
 ATGCCATTGTTACCCCATACCCGCACCATCCAAAATCCTATTTCCAGCCACAATTCACCACATCCAACGT
 TTCAACCTCACCAGTTCATATTTCTCCCCAGTTAAATGCTCAGCCGCAATCCACAATTATCACTTACCA
 ACGCCGAAATAAGTCCACTGGTCTTTGATCCAGAATCCTCTAGTACAACCCGTTCTTATCACTTGTCT
 CAACCTCCCATGGACACACAATCTTCTTTGTAACCTCTACCTCTACAGTGACGCCCCACTCATCACATG
 ATTACTCGGTCTAAAACCAATAGGCTTAAGCCTAAACAATTACACTTCTACCTACCTAGAACCTTTAA
 GCAAGCTCAACAAGTCCCACTGGCATAAAGCTATGAGAAATGAATTTGATGCCTTAGTTGAGAACC
 GAACATGGGATTTTGTACCATGTGATCCTTCCAAACATGCGGCCGCTCTGGAGTCCATCGTA

下划线部分为 T-DNA 部分序列。

The underline sequences are parts of T-DNA.

图 6 RB 端侧翼序列扩增

Figure 6 Flanking sequence amplification of RB

DNA 序列在马铃薯基因组数据库(PGSC)中进行序列比对, 发现该片段与异戊烯基转移酶(IPT)基因第 4 个内含子的 822 bp 片段同源性达到 89%。结果表明在 pCL2b-2 基因组中, T-DNA 插入位点是异戊烯基转移酶(IPT)基因的第 4 个内含子, 该基因在 PGSC_DM_v3.4_gene 数据库中的编号为 PGSC0003DMG400035440, 名称为 *StIPT*。该基因全长 8 607 bp, 由 6 个外显子和 5 个内含子组

成。

为了进一步确定 pCL2b-2 的 T-DNA 是简单插入到 *StIPT* 基因的第 4 个内含子还是替换掉了该内含子的某一段序列, 本研究在 T-DNA 左边界序列(LB)前端设计了引物 T-DNA LB-1a: 5'-ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCT-3', 在 *StIPT* 基因 T-DNA 插入位点 3' 端 417bp 处设计引物 T3-S2: 5'-GCATCCATTGCTTGAACGGAGGTT-3', 用

上述引物对 pCL2b-2 基因组 DNA 进行了扩增, 得到了 606 bp 序列(图 7)。

将 606 bp 片段分别与 pBI121 和 *StIPT* 基因序列比对, 结果显示, 扩增片段中 103 bp 为 *StIPT* 第 4 个内含子部分片段, 与 RB 端扩增的 *StIPT* 内含子序列相隔 317 bp; 剩余的 503 bp 为 T-DNA 上 LB 元件

5' 端 113 个碱基前的序列。载体 pBI121 T-DNA 全长 6195 bp, 在农杆菌介导的转基因过程中, T-DNA 上 RB 元件(25 bp)及其边界 6 bp 和 LB 元件(26 bp)及其边界 113 bp 未插入到 *StIPT* 基因中, 而 T-DNA 上剩余片段替换了 *StIPT* 第 4 个内含子的 317 bp 片段(图 8)。

ACAACGTCGTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCCG
CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCCGAGCCTGAATGC
CGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTA
AATCGGGGGCACCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATT
TGGGTGATGTTACAGTACTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTC
CACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATCTCT
TTTGATTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCCTGCTGGGGCA
AACCAGCGTGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCATGTGTTTTGAGATAGGACTGTAAACTT
TGAAATTCGTCACCACCATCATGTAATAAGATGAATTTTGGTGTTAAACCTCCGTTCAAGCAATG
GATGC

下划线部分为 *StIPT* 基因部分序列, 其他部分为 T-DNA 上序列。

The underline sequences are parts of *StIPT* gene; the rest belongs to T-DNA.

图 7 LB 端侧翼序列扩增

Figure 7 Flanking sequence amplification of LB

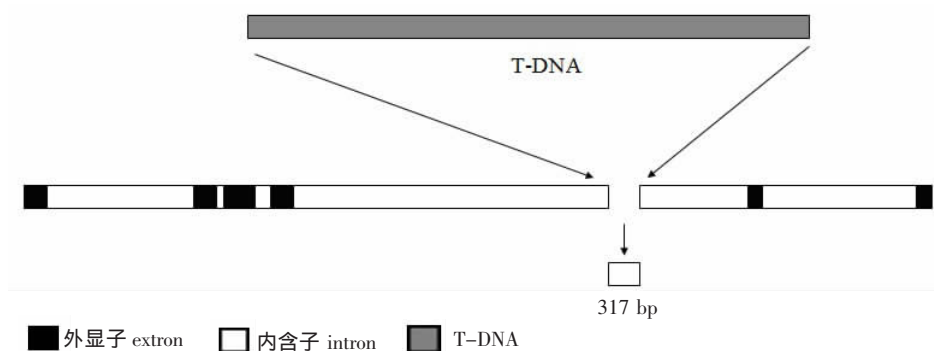


图 8 *StIPT* 基因 T-DNA 插入分析

Figure 8 Analysis of T-DNA insertion into *StIPT*

3 讨论

IPT 基因最初在根癌农杆菌中发现, 是细胞分裂素合成的限速酶^[9]。在拟南芥中已证实了编码异戊烯基转移酶的 9 个家族成员, 分别为 *AtIPT1*–*AtIPT9*^[10]。有研究表明, 在马铃薯中超量表达农杆菌 *IPT* 基因获得的三个转基因株系 1、11 和 13, 顶端优势降低, 节间多且短, 叶片变短, 同时根变少^[11]。转基因株系细胞分裂素含量增加, 其中一个编号 11

的株系细胞分裂素含量增加了 40%。一些株系在非诱导条件下可发生匍匐茎, 在诱导条件下提前结薯^[12]。但到目前为止, 尚没有突变马铃薯自身 *IPT* 基因的相关报道。本研究首次报道插入突变马铃薯 *StIPT* 基因后, 植株薯形发生改变, 证实 *StIPT* 基因在马铃薯植株形态建成中可能发挥重要作用。但该基因突变后, 与野生型植株相比, 马铃薯突变体并未表现出其他形态变化。我们推测, 其可能原因是 *StIPT* 基因仅在块茎发育过程中特异表达或该位

点突变对 *StIPT* 基因表达水平的影响较小。

最近研究显示, 在马铃薯中过量表达拟南芥细胞分裂素氧化酶基因 *AtCKX2*, 植株内源细胞分裂素含量降低, 影响结薯^[5]。本研究通过分析 *StIPT* 基因突变体植株表型, 推测 *StIPT* 基因突变后, 植株体内细胞分裂合成受到影响。突变体内源细胞分裂素/生长素的比例发生变化, 使得马铃薯块茎发育过程中, 薯形由圆形发育为长椭圆形。

内含子是基因在转录后加工过程中剪切掉的非编码序列, 同时也参与基因的表达调控。内含子 5' 和 3' 末端的剪切位点高度保守, 其剪切的准确性决定了基因能否正常表达。除去剪切位点, 内含子并非无意义的碱基序列。猪肌球蛋白基因 *MyHC* 第 2 个内含子中含有 1 个 75 bp 的正调控元件, 能通过调控 *MyHC* 的转录起始来增强该基因的表达; 而与该元件偶联的显性负调控元件长 81 bp, 能下调该基因的表达^[13]。内含子中能增强基因表达的元件与增强子不同, 它对序列的顺序和元件所处的位置有很强的依赖性^[14]。Salgueiro 等^[15]发现玉米泛素基因第 1 个内含子含有类似启动子的序列, 能发挥启动子的功能。*ESR α* 是猪雌激素受体 α 基因, 其第 1 个内含子的突变会影响猪的脂肪沉积量和产仔量^[16, 17]。与此相似, 本研究中 *StIPT* 基因第 4 个内含子的 317 bp 片段可能含有调控该基因表达的功能元件, T-DNA 的替换使得 *StIPT* 损失了该调控元件, 从而改变了 *StIPT* 基因的表达水平。

[参 考 文 献]

- [1] Fernie A R, Willmitzer L. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1459–1465.
- [2] Weeda S M, Kumar G N M, Knowles N R. Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. *Planta*, 2009, 230(1), 73–84.
- [3] Kloosterman B, Navarro C, Bijsterbosch G, *et al.* StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development [J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(2): 362–373.
- [4] Vreugdenhil D, Struik P C. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 1989, 75(4): 525–531.
- [5] Raspor M, Motyka V, Žizkova E, *et al.* Cytokinin profiles of AtCKX2-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro* [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2012, 31(3): 460–470.
- [6] 李云海, 陈丽华, 赵德柱. 马铃薯薯条专用型品种‘夏波蒂’[J]. *云南农业科技*, 2003, 6: 32.
- [7] 成善汉, 谢从华, 柳俊, 等. 马铃薯转基因株系载体骨架的整合分析[J]. *海南大学学报*, 2006, 3: 305–308.
- [8] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *BioTechniques*, 2007, 43: 649–656.
- [9] Akiyoshi D E, Klee H, Amasino R M, *et al.* T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis [J]. *PNAS*, 1984, 81(19): 5994–5998.
- [10] Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakinoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate [J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(1): 128–138.
- [11] Sergeeva L I, Bruijn S M D, Koot-Gronsveld E A M, *et al.* Tuber morphology and starch accumulation are independent phenomena: evidence from *ipt*-transgenic potato lines [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 108: 435–443.
- [12] Machackova I, Sergeeva L, Ondrej M, *et al.* Growth pattern, tuber formation and hormonal balance in *in vitro* potato plants carrying *ipt* gene [J]. *Plant Growth Regulation*, 1997, 21(1): 27–36.
- [13] Chang K C. Critical regulatory domains in intron 2 of a porcine sarcomeric myosin heavy chain gene [J]. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2000, 21(5): 451–461.
- [14] Donath M, Mendel R, Cerff R, *et al.* Intron-dependent transient expression of the maize *GapA1* gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(4): 667–676.
- [15] Salgueiro S, Pignocchi C, Parry M A J. Intron-mediated gusA expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42(4): 615–622.
- [16] Short T H, Rothschild M F, Southwood O I, *et al.* Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines [J]. *Journal of Animal Science*, 1997, 75 (12): 3138–3142.
- [17] Okura T, Koda M, Ando F, *et al.* Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution [J]. *International Journal of Obesity*, 2003, 27: 1020–1027.

敬请关注 2013 年中国马铃薯大会 时间：7 月 13 日
地点：重庆巫溪