

马铃薯体细胞染色体加倍的研究

王 清, 王 蒂, 司怀军, 戴朝曦

(甘肃农业大学农业生物工程研究所, 兰州 730070)

摘 要: 体细胞染色体加倍是“分解—综合育种”方案的重要环节之一, 随着科学技术的发展, 染色体加倍技术已由秋水仙素加倍法、组织培养加倍法发展到细胞融合加倍法。本文简述了各种染色体加倍方法及影响因素、存在的问题和发展前景。

关键词: 马铃薯; 体细胞; 染色体加倍

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2001) 06-0343-06

长期以来, 品种间杂交及芽变选择一直是马铃薯品种选育的主要方法, 可是, 马铃薯普通四倍体栽培种具有高度的基因杂合性及基因分离的复杂性, 其基因库异常狭窄, 抗病、抗逆和加工品质基因极其缺乏^[1], 导致这一育种进程愈来愈慢, 选育具有高产、优良加工性状兼并抗病、抗逆的马铃薯品种极端困难。尽管二倍体野生种具有丰富的基因资源, 可由于倍性差异无法与四倍体杂交结实, 而现代生物学为解决这一问题提供了理论与物质基础。

早在 1963 年, Chase^[2]就提出了“分解育种方案”, 即: 将四倍体栽培种或优良品系通过染色体降倍技术降为二倍体, 在二倍体水平上进行选择与杂交, 再将杂交后代通过加倍恢复到四倍体水平; 1979 年, Wenzel^[3]等根据当时的科技发展又提出综合运用单倍体诱导技术、染色体加倍技术、细胞融合技术的“分解—综合育种”方案。至今为止, 通过花药花粉培养及孤雌生殖已获得大量马铃薯单倍体品系^[58]; 通过秋水仙素及组织培养加倍法获得了众多的纯合四倍体^[53, 17, 18]; 通过体细胞融合技术得到了许多具有应用价值的马铃薯育种材料^[59]。

倍性操作具有重要的理论和实际意义。首先, 将四倍体栽培种降至二倍体水平并与野生种杂交, 可将野生种丰富的抗性和品质基因转入栽培种之中, 以扩充栽培品种基因库。其次, 对一单倍体马铃薯进行二次加倍使其成为纯合四倍体, 然后选择两种不同的纯合四倍体杂交, 可获得具有强大杂种优势的 F1 代不分离实生种子, 从而彻底解决病毒病所引起的马铃薯品种退化问题, 节省连年制种所耗费的人力物力。因此, 倍性操作是分解—育种方案的重要环节, 而染色体加倍技术是获得纯系以及杂交品系用于生产的关键步骤。

1 秋水仙素加倍法

秋水仙素是微管特异性药物, 低浓度的秋水仙素可以阻断微管蛋白组装成微管而破坏纺锤体的形成; 由于复制的染色体在细胞分裂时不能分向两极, 从而导致细胞的染色体加倍。

1.1 秋水仙素的应用

最初, 染色体加倍方法主要借助于秋水仙素对块茎芽眼、腋芽生长点及种子处理, 以便在众多的处理材料中选择加倍植株。1939 年 Johnstone^[4]用含有 1% 秋水仙素的羊毛脂膏处理块茎芽眼; 随后, 许多学者将块茎直接浸入不同浓度秋水仙素溶液或对芽眼进行秋水仙素涂抹^[5]、浸泡及脱脂棉浸药的覆盖^[6], 但加倍效果不佳, 加倍率均小于 1%。后来, Koopmans^[9]等将实生种子放在浸有

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目, 项目编号 ZS981-036N

收稿日期: 2001-08-18

王清 (1966—), 女, 甘肃农业大学博士, 从事马铃薯生物技术研究。

0.1~0.5%秋水仙素滤纸上或1%琼脂冻^[8]上处理,可由于秋水仙素的毒害作用,种子萌发率及染色体加倍频率很低。Lamm^[7]等为了克服这一问题,采用先萌发种子,再对实生苗生长点、二倍体杂种实生苗腋芽生长点^[8]进行秋水仙素处理,或在低温(4℃)下用秋水仙素溶液浸泡种子,再将药液已深入到组织内部的实生种子于培养基上萌发^[57],这些方法大大提高了种子成活率与染色体加倍率。

1.2 秋水仙素加倍法存在的问题

尽管在细胞有丝分裂中,秋水仙素能够阻止纺锤体形成而使染色体加倍,但在实际应用也存在着许多问题,1)秋水仙素处理块茎芽眼及植株生长点时,药液易干涸而影响加倍效果;2)秋水仙素具有毒害作用,常常使材料在处理过程中的死亡,且不利于种子的萌发与根的生长;3)经秋水仙素处理的材料,普遍存在着细胞倍性嵌合现象,完整倍性的加倍植株频率低。Frandsen^[14]在对实生苗和实生种子进行秋水仙素处理中发现,50%的实生苗产生了倍性嵌合现象,嵌合植株的L1、L2及L3胚层加倍率各不相同;Maine^[31]也得到类似的结论,他在对85个经秋水仙素处理的马铃薯双单倍体检查时,发现只有一个双单倍体的L2与L3胚层倍性相同,而L1胚层普遍不同于其他两个胚层。象这种倍性嵌合体在生长过程中或在下一无性繁殖世代中能否保持加倍的特性,必然依赖于生长点是否受到秋水仙素的影响,依赖于生长过程中2X细胞与4X细胞的生存竞争。这种细胞倍性嵌合的分离群体将会造成倍性育种选择的困难。这一系列问题,限制了秋水仙素加倍法在实践中的应用。

2 组织培养加倍法

由于染色体复制与细胞分裂受控于不同基因,因此,在愈伤组织诱导及培养过程中常常导致细胞染色体组发生内源多倍化。组织培养加倍法就是利用愈伤组织生长过程中的这种DNA快速复制与细胞分裂不同步来达到染色体加倍的目的。Owen^[17]等通过流式细胞仪对Phureja植株、试管苗和原生质体进行了DNA含量分析,也对一单倍体、双单倍体、四倍体品系的植株及相应一单倍体基因型的愈伤组织进行细胞倍性测定,结果发现,由一单倍

体诱导的愈伤组织中具有DNA的1C、2C和4C峰,说明愈伤组织内部总有一些细胞经历着一个或多个多倍化过程,并且细胞具有广泛的变异倍性^[18]。

利用外植体进行愈伤组织的自然加倍在许多作物如:烟草、甜菜、小麦、胡萝卜等均有报道。由于愈伤组织生长在易于控制的无菌微环境下,再生苗来自于单细胞而使加倍植株倍性完整,很少产生嵌合现象,这种优势使之成为一种快速而有效的染色体加倍方法。

2.1 影响染色体加倍率的因素

2.1.1 基因型与染色体加倍率

Kaburu^[25]、Sonnino^[20]等曾探讨过基因型与加倍频率的关系,发现不同的基因型愈伤组织的再生苗频率与再生苗加倍的频率不同,两者呈正相关;Carputo^[24]等对四种不同基因型的马铃薯双单倍体材料进行愈伤组织诱导加倍,得到0~47%的加倍变化频率;笔者在对9种不同倍性、不同基因型的马铃薯材料进行诱导加倍中,也得到类似结果,加倍频率由0变化至75.1%,证实基因型是影响加倍率及再生苗频率的重要因素。

2.1.2 外植体与染色体加倍率

愈伤组织诱导过程中,由于不同组织器官生理生化状态差异,尤其是内源激素水平的差异导致它们打破原有细胞的分化状态恢复细胞分裂能力的大小不同;而这种内在的生理生化状态与内源激素水平的差异,必然影响不同外植体愈伤组织的分化能力和加倍频率。马铃薯茎、叶、叶柄及根等组织器官经创伤诱导均可形成愈伤组织;可是,由于自身差异,不同组织细胞再生苗加倍的频率不同。对茎、叶和叶柄诱导的愈伤组织再生苗倍性检查结果表明,再生苗加倍频率以叶片最优,茎次之,叶柄最低;但若以试管苗为材料进行愈伤组织诱导,茎段外植体更具优势^[53]。

2.1.3 外植体倍性水平与染色体加倍频率

低倍性材料形成的愈伤组织更易发生有丝分裂的反常,更易进行染色体的核内复制,从而引起染色体加倍。Owen^[60]通过流式细胞仪对马铃薯一单倍体和双单倍体DNA含量分析中指出,一单倍体在进行DNA复制期间,其多倍化细胞明显高于双单倍体加倍细胞;Angela^[61]的实验也证明,一单倍体愈伤组织再生苗几乎全部多倍化,其中50%

的再生植株加倍为纯合四倍体, 而二倍体愈伤组织再生苗仅有 60% 左右加倍为四倍体; Pijnacker^[30]认为, 愈伤组织形成一周内的细胞多倍化频率取决于基因型及原材料的倍性水平, 一周以后的多倍化变化频率主要依赖于培养基。甚至在对一单倍体试管苗进行保存时, 也容易产生染色体的自然加倍^[51]。

2.1.4 愈伤组织培养时间与染色体加倍频率

在愈伤组织细胞的增殖过程, 试管苗叶片愈伤组织形成的前 15 d 内, 体细胞多倍化频率已达 77%, 而温室的马铃薯叶片愈伤组织细胞多倍化频率高达 87%^[33]。总体来说, 愈伤组织培养时间与染色体加倍频率成正相关^[54]。可随着愈伤组织培养时间的延长, 细胞染色体的异常率也会增加^[26, 35], 而伴随染色体加倍率与异常率提高的同时, 愈伤组织再生苗频率急剧下降^[54]。

2.1.5 外在条件与染色体加倍频率

培养基激素种类及浓度是影响染色体加倍最重要的外在条件。生长素类物质如: 2, 4-D、NAA、IAA 均可诱导愈伤组织的形成^[27]; 生长素与细胞分裂素的比例及浓度可调控愈伤组织的根芽分化^[33, 34]; 而适当改变愈伤组织培养过程中生长调节剂的浓度, 将导致多倍化的频率发生改变^[53]。2, 4-D 在三种诱导剂中作用最强, 可以高频率诱导马铃薯愈伤组织并产生加倍细胞, 但也使愈伤组织细胞中染色体发生极大变异^[55]; NAA 是一种较为适宜的生长调节剂, 其诱导愈伤组织的能力强于 IAA, 弱于 2, 4-D^[25]; NAA 浓度不仅影响愈伤组织的质量, 而且影响再生苗频率及染色体加倍率。较高的 NAA 浓度可导致较低的愈伤组织再生苗分化率和很高的染色体加倍率; 相反, 低浓度 NAA 则产生高频率的再生苗分化率与低频率的染色体加倍率, 只有当 NAA 浓度较为适宜时 (2mg/L), 可得到较高的再生苗分化率 (达 60~70%) 和再生苗的染色体加倍率 (50~60%), 为选择所需倍性植株提供了更多的机会^[53]。

生长素及细胞分裂素有可能分别调控核分裂基因与胞质分裂基因, 两者浓度适宜时, 将启动核分裂基因与胞质分裂基因同时表达而产生正常倍性的子细胞; 两者浓度不协调时, 尤其是生长素浓度较高时, 胞质分裂基因将被抑制, 而引起体细胞染色体多倍化的发生。因此在成功诱导了愈伤组织之

后, 如何大量促使细胞经历多倍化途径, 无疑是染色体加倍方法的关键所在。

2.2 加倍植株的育性问题

经双单倍体加倍的植株可以产生正常花粉, 但纯合四倍体大多不开花, 或者能够开花可花粉败育^[51], 从而造成杂交困难。纯合二倍体也有类似现象, 在浆果数目、每一浆果结实数上明显少于原亲本材料, 花粉稀少不能萌发^[52]。因此, 组织培养加倍法产生的纯合二倍体及纯合四倍体只能作为母本, 且可避免去雄这一烦琐程序; 如果作为父本, 在育种中没有实际应用价值。

3 原生质体培养及体细胞融合的染色体加倍方法

细胞融合技术在马铃薯育种中具有特殊的意义, 通过对同一单倍体或四倍体花粉原生质体的自体融合, 可节省花药、花粉培养途径并在短期内高频率的获得纯合四倍体, 为生产不分离的杂交马铃薯实生种子提供亲本, 以彻底摒除病毒积累引起的马铃薯退化这一棘手问题; 其次, 对具有优良特性的两种双单倍体品系的异体融合, 可获得综合双亲细胞核与细胞质基因的体细胞杂种, 从而获得更强的杂种优势; 用具有优良抗性基因的野生种与双单倍体品系或栽培种花粉原生质体的异体融合产生四倍体杂种植株, 再通过无性繁殖迅速固定基因资源, 为常规育种提供材料。因此, 20 世纪 80 年代以来, 体细胞融合技术得以迅速发展。

化学融合法与电融合法是细胞融合的两种主要方法, 前期细胞融合主要采用这两种方法对大量体细胞进行随机融合, 近年来又出现对雌雄配子、体细胞的成对融合及不对称原生质体融合。融合技术的不断创新及使用材料的广泛性使体细胞融合在倍性育种中独树一帜。

3.1 化学融合法

化学融合方法起始于 20 世纪 30 年代。1937 年, Michel^[35]使用 NaNO_3 对高等植物与绿藻进行了原生质体融合; 1958 年, Okada^[36]由紫外线灭活的仙台病毒诱导了体外培养细胞的融合, 而 Carlson^[37]于 1972 年通过 NaNO_3 将两类烟草原生质体融合并得到了杂种植株; Melchers^[38]最早应用 PEG 于马铃薯上, 他通过对马铃薯双单倍体与番茄的一个变种进行融合, 成功的获得了跨种杂种

植株, Butenko^[39]等也得到了正常的杂种马铃薯植株。目前, 使用最多的化学融合剂为聚乙二醇(PEG), 由PEG与高钙离子相结合诱导原生质体进行融合的方法由于费用低而被广泛应用。然而, PEG是一种有毒的化学物质, 其融合频率受PEG分子量大小、浓度及融合时间的影响, 同时也受到洗脱液中pH、Ca²⁺浓度及原生质体密度与质量的影响^[40], 使其融合频率仅达10%~15%; 而适量的二甲亚砜(DMSO)、伴刀豆蛋白A及链霉菌白附加物可明显提高融合频率^[41]。但PEG对原生质体的毒害作用, 常使融合细胞受到伤害而死亡。

3.2 电融合方法

电融合法是利用高频交流电压对两电极间原生质体悬浮液进行作用, 使原生质体偶极化并在电场中排列成串, 当施加高压直流电脉冲时, 原生质膜发生可逆性击穿, 从而导致原生质体融合。各种电气参数、材料基因型、原生质体质量与密度是影响电融合频率的重要因素。

3.2.1 电气参数与细胞融合频率

交变电场中的各种电气参数是影响融合频率最重要的因素。在特定电流频率下, 细胞移动形成串珠链, 轮转, 变形, 细胞融合的每一步各有其适宜频率, 这一频率会随品种、外植体类型、生理状态及原生质体质量的不同而改变。交流电场场强决定了原生质体成串的速度与质量, 场强过低, 成串困难; 场强过高, 在短时间内形成过长的原生质体串, 且原生质体被拉成长椭圆形而导致多细胞融合及融合频率的下降。戴朝曦等^[41]在利用尖波电融合仪对二倍体马铃薯原生质体处理时发现, 不同基因型达到最佳融合效果所要求的电气参数有异, 但在1.1 MHz, 120~157 (V_{pp}/cm) 峰—峰电压场强下处理25~50 s, 再用1.25~1.5 KV/cm直流高压脉冲冲击630 us左右, 对大多数基因型都可得到60%左右的融合率。

3.2.2 基因型、原生质体质量、密度与细胞融合频率

基因型、原生质体质量、密度是影响融合频率、融合细胞倍性的内在因素。

不同基因型对融合条件要求不同, 而适宜的原生质体密度与良好的原生质体质量是融合细胞可否利用的基本条件。同一基因型的原生质体具有同种电荷, 彼此易于接触, 进行自体融合时细胞成串所

要求的电场峰—峰电压值明显小于异体融合, 马铃薯81-11、81-15双单倍体品系在120/VPP·cm⁻¹左右的峰—峰电压下, 可得50%~60%的自体融合频率, 而81-11、81-15与Chacoense、S. Phureja原生质体的异体融合则需150/VPP·cm⁻¹左右的峰—峰电压才可达到相同的融合频率^[41]。

大密度原生质体的随机融合频率较高, 但会获得不同倍性的融合细胞; 在没有特殊处理条件下, 密度过低, 不利于原生质体接触, 融合频率会随之下降。锁定电场电压(200~230V/cm)下, 当原生质体密度为5×10⁴时, 可以得到理想的细胞串及融合频率^[43]。高频率的两细胞融合是最佳的实验结果, 但也往往随着基因型、原生质体密度和电气参数的不同难以实现。然而, Hunt和Helgson^[44]对KM培养基及培养方法的改进, 高频率得到了单细胞无性系分化; 孙蒙祥等^[45]应用微滴培养与微室饲养诱导了烟草体细胞原生质体分裂并形成小细胞团, 且发现性细胞的成对融合比体细胞更易进行; 这种微量细胞的培养和两两细胞的融合, 使我们看到了成对原生质体融合技术在马铃薯遗传育种中应用的曙光。

不同组织的原生质体融合频率及融合细胞的分裂频率具有极大差异。较老叶片组织或表皮的原生质体融合频率不高、融合细胞不易分裂, 而分生组织生长点的原生质体质量极佳, 不仅融合频率高, 融合细胞分裂能力也强^[42]。

3.3 原生质体培养、融合的再生植株染色体的变异

从马铃薯外植体分离出原生质体后, 要获得再生植株必须经过细胞壁再生—细胞分裂—愈伤组织—细胞分化的过程, 其中每一步都可能导致细胞发生变异, 尤其是染色体数目、倍性水平、染色体组型和结构的变异^[46, 47, 48, 49]。李耿光对四倍体小叶白×多子白马铃薯叶肉原生质体再生植株检查后发现: 再生植株的染色体数目表现出极大变异, 正常的四倍体植株很少, 而非整倍体再生植株所占比例极高, 其中P01甚至达到93%^[50]。Shepard等^[40]在利用Burbank进行原生质体培养中发现: 再生植株无论在块茎形状、产量、植株形态以及抗病性上都发生了变异, 这种变异无疑是染色体或基因发生改变所致。

马铃薯双单倍体异体融合的再生植株在众多方

面均呈现双亲的综合性状^[58], 但也会产生变异性状^[59]。与小麦和黑麦草原生质体杂种细胞^[60]、裸燕麦与小麦杂种细胞相同^[61], 马铃薯异体融合杂种细胞系染色体数目均高于双亲, 但绝大多数以双亲染色体的和数目为主; Waara^[62,63]等发现双单倍体品系间或双单倍体与野生种的融合细胞杂种植株大多为四倍体, 同时也存在六倍体、八倍体和非整倍体; Austin^[64]等对四倍体与二倍体马铃薯的融合则以六倍体为主, 但也具有少量四倍体与八倍体。显然, 这种遗传上的稳定性与不稳定性与实验材料的倍性密切相关。

4 展 望

原生质体培养与融合技术的加盟, 赋予了马铃薯倍性育种新的内涵。过去, 二倍体有性杂交后代, 必须通过秋水仙素或组织培养加倍方法使之恢复到四倍体水平才能在生产中应用。可现在, 通过野生种体细胞原生质体与优良栽培种花粉原生质体融合, 再对杂种细胞进行自体融合就可实现 Chase 当年的设想, 而不必进行染色体降倍及品系或品种间杂交就能得到四倍体杂种植株, 从而快速实现野生种的优良抗性 & 品质基因向栽培种的转移。特别是随着成对融合技术、花粉原生质体分离技术的日益成熟, 使我们能够在短期内得到马铃薯纯合四倍体而无需进行倍性检测这一烦琐过程。而非对称融合技术的应用, 能够克服一般情况下融合细胞综合双亲全部遗传物质的特性, 从而有目的的进行部分基因转移^[56]。但秋水仙素与组织组织加倍法仍有自身优势, 特别是当某一亲本具有不利的胞质基因时, 利用上述两种方法调整亲本倍性仍有积极的作用。

参 考 文 献

- [1] 戴朝曦, 曲秀兰, 孙顺娣等. 生物工程技术在马铃薯育种中应用的研究 [J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 1994, 30 (增刊): 11—17.
- [2] Chase S. C. Analytical breeding of *Solanum Tuberosum*. Can. J. Gen. Cyt. 1963, 5: 359—363.
- [3] Wenzel G. O. Comparison of single cell culture derived *Solanum Tuberosum* plant and model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Genet. 1979, 55: 49—55.
- [4] Johnstone, F. E. Chromosome doubling in potatoes induced by Colchicine treatment. Amer. Potato J. 1939, 16: 288—303.
- [5] Kavalakaki & M. Matsutani. Chromosome doubling in dihaploid potato induced by tuber treat with Colchicine. Eur. Potato J. 1966, 9: 129—136.
- [6] R. Kessel & P. R. Rowe Production of intraspecific aneuploids in the genus *Solanum*. I. Doubling the chromosome number of seven diploid species. Euphytica 1975, 24, 65—75.
- [7] Lamm R. Cytogenetic studies in *Solanum set. Tuberarium Hereditas* 1945, 31: 1—128.
- [8] Ross. R. W. LA. Dionne & R. W. Hougas Doubling the chromosome number of selected *solanum* species. Eur. Potato J 1967, 10: 37—52.
- [9] Koopmans. A. Cytogenetic studies on *Solanum Tuberosum* L. and some of its relatives. Genetica 1951, 24: 193—337.
- [10] Howard. M. W. Potato cytology and genetics. Bibliog. Genet., 1961, 19: 87—216.
- [11] Beawish K. F. O. C. Cooper & R. W. Hougas Induced tetraploid *solanum* species and species hybrids, meiosis and use in breeding. Amer. J. Bot. 1957, 44: 305—310.
- [12] Swaminathan. M. S. Notes on induced polyploid in tuber bearing *Solanum* species and their crossability with *Solanum Tuberosum*. Amer. Potato J 1951, 28: 472—483.
- [13] J. G. TH. Hermesen & A. J. E. Oeboer, The effect of Colchicine treatment on *Solanum Acaule* and *S. Bulbocastanum*. A complete analysis of ploidy chimeras. in *s. bulbocastanum*. Euphytica 1971, 20: 171—180.
- [14] N. O. Frandsen, Chromosome verdoppelung und chimärenbildung nach Colchicinbehandlung haploider kartoffelsamen. Eur. Potato J. 1967, 10: 1—15.
- [15] Karp. A. R. Risiott, M. G. K. Jone & S. W. J. Bright, Chromosome doubling in monoploid and dihaploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. Plant Cell Tissue Organ. cult. 1985, 3: 37, 363—373.
- [16] Jensen G. J. Chromosome doubling techniques in haploid in high plant. P. 153—190, 1974.
- [17] H. R. Owen, R. E. Veileu, D. Levy AND D. L. Ochs, Environmental, genotypes and ploidy effects on endopolyploidization with a genotype of *Solanum Phureja* and its derivatives. Genome. 1988, Vol 30: 506—510.
- [18] Sree Ramulu, K & Dijkhuis. P. Flow cytometric analysis of polysomaty and in vitro genetic instability in potato. Plant Cell Rep. 1986, 5: 234—237.
- [19] Jacobsen E. Doubling dihaploid potato clones via leaf tissue culture, Z. Pflanzenzüchtg. 1977, 80: 80—82.
- [20] A. Sonnino. M. Iwanaga & A. Henostroza. Chromosome number doubling of $2x$ potato lines with diverse genetic background through tissue culture. Potato Rec. 1988, 31: 627—631.
- [21] Hermesen J. G. TH. MS. Rammanna. S. Roest & G. S. Bokelmann. Chromosome doubling through adventitious shoot formation in vitro cultivated leaf explants from dihaploid interspecific potato hybrids. Euphytica 1981, 30: 239—243.
- [22] 朱明凯, 程天庆, 高湘玲等. 双单倍体马铃薯染色体加倍的方法 [J]. 马铃薯杂志, 1987, 1: 1—3.

- [23] S. Roest & G. S. Bokelmann. In vitro adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato (*Solanum Tuberosum* L.) I. Vegetative propagation in vitro through adventitious shoot formation. *Potato Rec.* 1980, 23; 167—181.
- [24] T. Cardi. D. Carputo & L. Frusciante. In vitro shoot regeneration and chromosome doubling in $2x$ and $3x$ potato clones. *American Potato Journal* 1992, Vol69; 1—12.
- [25] H. Kaburu M' Ribu & Richard E. Villeux. Effect of genotype, explant, subculture interval and environmental conditions on regeneration of shoots from in vitro monoloids of a diploid potato species, *Solanum Phureja* Juz. & Buk. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 1990, 23; 171—179.
- [26] 闫凤英, 刘贵仁, 严仁玲等. 石刁柏花粉离体培养及再生植株的研究 [J]. *西北植物学报*, 1993, 13; 265—269.
- [27] B. S. Ahloowalia, Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphytica*. 1982. 31; 755—759.
- [28] Webb. K. J. Osifo e. O & Henshaw G. G. Shoot regeneration from leaflet disc of six cultivars of potato. *Plant Sci. Lett* 1983, 30; 1—8.
- [29] Wheeler VA. Evans NE. Foulger D. Webb K J. Karp A. Frankling & Bright S. WJ, Shoot formation from exlants cultures of fourteen potato cultivars and studies of Cytology and Morphology OF regenerated plants. *Ann. Bot.* 1985, 55; 309—320.
- [30] Laas P. Pijnacker & Margriet A. Ferwards. Effect of sucrose on polyploidization in early callus cultures of *Solanum Tuberosum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1990, 21; 153—157.
- [31] De. Maine MJ and JA Fantes, The result of colchicine treae, tment of dihaploids and their implication reparding effcency doubling and potato histogeny. *Potato Res.* 1983. 26; 289—294.
- [32] H. Kaburu M' Ribu and Richard E. Veillenx, Fertility of doubling monoloids of *Solanum Phureja*. *American Potato Journal* 1992, J 69; 447—459.
- [33] L. P. Pijnacker, K. Sree Ramulu, P. Dijkhuis & M. A. Ferwerda. Flow cytometric and karyological analysis of polyso-maty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes. *Theor Appl Genet.* 1989. 77; 102—110.
- [34] 江苏农学院主编. 植物生理学 [M]. 中国林业出版社, 218—220.
- [35] Michel, W, Uber Die Experimentelle Fusion Pflanzlicher proto-plasten. *Arch. Exp. Zellforsch. Besonders Gewebe zuaht.* 1937, 20, 230—252.
- [36] Okada, K. Et Al. 1988, *Plant Cell Rep.* 7; 333—336.
- [37] Carlson P. S. Et Al. Parasexual interspecific plant hybridiza-tion. *Proc. Natt. Acad. Sci. USA* 1972, 69; 2292.
- [38] Melchers. G. Et Al. Somatic hybrid polmts of potato and toma-to regenerated from fused protoplasts. *Carberg Res. Comm.* 1978, 48; 203—218.
- [39] Butenko, R. G. Et Al. Somatic hybridization of *Solanum Tuberosum* and *S. Chaconase* by fusion. *Advances in protoplast research*, 1980, 293—300.
- [40] 奚元龄, 颜昌敬编译. 植物细胞培养手册 [M]. 农业出版社; 143—144.
- [41] Kamey. T. Studies on plant cell fusion. Effect of dextran and pronase e on fusion. *Cytologia* 1979, 44; 449.
- [42] 戴朝曦、孙顺娣、李继红等. 马铃薯体细胞电融合技术的研究 [J]. *兰州大学学报 (自然科学版)*, 1994, 30; 82—87.
- [43] 田振东. 提高马铃薯体细胞电融合成对融合频率的技术研究 [C]. 甘肃农业大学硕士研究论文, 2000.
- [44] Hunt. G. J. and J. P. Helgson, A medium and simplified procedure for growing single cells from *Solanum* species. *Plant Science* 1989, 60; 251—257.
- [45] 孙蒙祥等. 烟草雌性细胞原生质体的融合实验 [J]. *植物学报*, 1995, 37 (1); 1—6.
- [46] Creissen, C. and A. Karp. Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Cul-ture*, 1985, 4; 171—183.
- [47] Fish. N. and A. Karp. Improvements in regeneration from protoplasts of potato and studies on chromosome stability I. The effect of initial culture media. *Theor. Appl. Genet.* 1986, 72; 405—412.
- [48] Karp, A. R. S. Nelson, E. Thomas and S. W. J. Bright.; Chromosome variation in protoplast derived potato plants. *Theor. Appl. GENet*, 1982, 63; 265—272.
- [49] Sree Ramulu, K, P. Dijkhuis and S. Roset, Phenotypes varia-tion and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid (*Solanum Tuberosum* L. cv. Bintje). *Theor. Appl. Genet*, 1983, 65; 329—338.
- [50] 李耿光等. 马铃薯原生质体再生植株表现型变异和染色体数目变化 [J]. *植物学报*, 1992, 34 (9); 712—716.
- [51] 王蒂、王清、戴朝曦等. 马铃薯单倍体试管苗长期继代培养的遗传变异 [J]. *中国马铃薯研究进展*. 哈尔滨工程大学出版社, 1999, 245—249.
- [52] H. Kaburu. M' Ribu & Richard. E. Veilleux, Fertility of doubled monohaploids of *Solanum Phureja*. *American Potato Journal*, 1992, Vol69; 447—459.
- [53] 王清, 戴朝曦. NAA 浓度对马铃薯双单倍体染色体加倍的影响 [J]. *兰州大学学报 (自然科学版)*. 1995, 31 (遗传学专辑); 11—14.
- [54] 王清. 用组织培养法进行马铃薯体细胞染色体加倍 [J]. *甘肃农业大学学报*, 1996, Vol. 31; 155—159.
- [55] 王清, 王蒂, 戴朝曦等. 奈乙酸、2, 4—D 对马铃薯愈伤组织细胞染色体倍性的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 1997, Vol 32; 304—307.
- [56] 刘继红、邓秀新. 枳椇与 PAGE 橘柚原生质体非对称融合再生杂种胚状体 [J]. *园艺学报*, 2000, 27 (3); 207—209.
- [57] 王清. 利用秋水仙素结合组织培养对马铃薯双单倍体染色体加倍的研究 [J]. *中国马铃薯学术研讨文集*, 1996, 黑龙江科学技术出版社.

马铃薯腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶研究进展

成善汉¹, 柳俊², 谢从华¹

(1. 华中农业大学园艺系, 武汉 430070; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 是马铃薯淀粉合成的限速酶, 有关该酶的酶学特性、表达规律及分子生物学已进行了较为深入和系统的研究。异源表达和突变研究表明, 该酶的小亚基具催化活性, 大亚基具变构调节作用。化学修饰和位点定向突变方法分析已发现了 AGPase 的底物、激活因子和抑制因子结合位点。此外, 通量控制系数、反义抑制和反向遗传学等多种方法已阐述了该酶是淀粉合成关键酶的原因。

关键词: 马铃薯; 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; 亚基; 结合位点; 淀粉合成

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2001) 05-0349-06

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是总产和栽培面积仅次于小麦、水稻和玉米之后的第四大粮食作物^[1], 其块茎的贮藏物质主要是淀粉, 约占块茎干物重的 70%~80%, 块茎淀粉不仅用于医药、食品和饮料生产, 还可以用作造纸、包装、纺织和化工原料等。因而获得高含量、多用途、不同结构的淀粉已经成为育种工作者的技术攻关课题之一。

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPP 或者 AGPase) 是植物淀粉生物合成过程中的一个起关键性调节作用的酶。研究表明, AGPase 对淀粉合成的一般控制系数在 0.3~0.6^[2], 且植物组织中淀粉合成的曲线与

AGPase 积累曲线基本一致, 抑制 AGPase 的活性将导致淀粉合成的部分或全部终止^[3,4]。因而, 全面了解 AGPase 的研究进展, 对我们采用不同的方法来提高淀粉含量和改良马铃薯品质具有重要意义。

1 AGPase 的酶学特性

1.1 催化和调节性质

已经纯化出来的马铃薯 AGPase 分子量约为 206 KD, 是由 51 KD 大亚基和 50 KD 的小亚基组成的异源四聚体^[5], 定位于块茎、匍匐茎、根、叶和茎中, 块茎和叶中含量较多^[6]。AGPase 催化淀粉合成前体物质 ADPG 的形成 ($G-1-P + ATP \leftrightarrow ADPG + PPi$)^[7]。作为淀粉合成第一步, AGPase 存在两种方式的调节作用, 一是变构调节, 通过激活因子 3-PGA 与抑制因子 Pi 的比率来控制酶的活

收稿日期: 2001-06-15

作者简介: 成善汉 (1975—), 男, 华中农业大学园艺系 99 硕士生。

[58] Austin S. and M. A. Baer, Interspecific fusion in *S. Tuberosum*. *Theor. Appl.* 1985, 71: 172—175.

[59] Mattheij W. M. and R. Eijlander et al, Interspecific hybridization between the cultivated potato *S. Tuberosum* subsp. *S. Tuberosum* L. and the wild species *S. Circaeifolium* subsp. *Circaeifolium* Bitter Exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens, *Theor. Appl. Genet.* 1992, 83: 459—466.

[60] 陈文品等, 小麦与多年生黑麦草原生质体的电融合及杂种愈伤组织的形成 [J]. *植物学报*, 1992, 34 (4) 284—290.

[61] 刘国才, 刘永钧. 通过“供体-受体”原生质体融合将裸燕麦部分基因组转移给普通小麦 [J]. *实验生物学报*, 1995, VOL. 28, NO. 1 95—102.

[62] Chaput M. H and D. Sihachakr et al, Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes: BF15 (H2), Aminca (H6) and Cardinal (H3), *Plant Cell Rep.* 1990, 9: 411—414.

[63] Waara S. and L. Pijnacker et al, A cytogenetic and phenotypic characterization of somatic hybrid plants obtained after fusion of two different dihaploid clones of potato (*S. Tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1992, 85: 470—479.

[64] Austin S. and M. K. Ehlenfeldt et al, Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *S. Tuberosum* AND *S. Brevidense*; phenotypic variation under field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 1986, 71: 682—690.