

学术园地

马铃薯种间体细胞杂种植株的细胞学观察和过氧化物同工酶谱分析*

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

对马铃薯双单倍体品系 81-15 ($2n=2x=24$) 和南美二倍体栽培种 *Solanum phureja* ($2n=2x=24$) 体细胞融合获得的 15 个株系、81-15 和二倍体野生种 *S. chacoense* ($2n=2x=24$) 体细胞融合获得的 10 个株系进行了细胞学鉴定和过氧化物同工酶谱分析。结果表明, 杂种植株除一个株系为非整倍体外 (染色体数为 37), 其余株系均为四倍体 ($2n=2x=48$), 是两个亲本的染色体数之和。与二倍体的双亲相比, 杂种植株的叶下表皮气孔保卫细胞内叶绿体数目较多, 但单位面积气孔数目较少, 明显地表现出了四倍体的特征。杂种植株的过氧化物同工酶谱是其双亲酶谱谱带的总和。

关键词 马铃薯, 体细胞杂种, 细胞学, 过氧化物同工酶

1 前 言

植物体细胞融合和杂交技术在马铃薯的品种改良和育种实践中具有重要的意义。对于获得的体细胞杂种植株, 可以从形态学、细胞学、遗传学、生化分析和分子生物学等方面进行鉴定, 为确定真正的体细胞杂种提供证据。我们用电融合法获得了马铃薯双单倍体品系和南美二倍体栽培种 *S. phureja* 以及二倍体野生种 *S. chacoense* 的体细胞杂种植株^[1], 对杂种植株的形态学观察结果已作了详细的报道^[2]。本文主要报道细胞学观察和

过氧化物同工酶谱分析的研究结果。

2 材料和方法

2.1 供试材料

本试验所用的材料为用电融合法获得的马铃薯普通栽培种 *Solanum tuberosum* 花粉来源的双单倍体品系 81-15 和南美二倍体栽培种 *S. phureja* 以及二倍体野生种 *S. chacoense* 的体细胞杂种植株。杂种植株的来源见文献 [1]。材料的繁殖和保存同文献 [2] 中所述的方法。

2.2 杂种植株的细胞学观察

2.2.1 根尖染色体数目的观察

将继代培养的杂种植株及其亲本的试管

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号 39670480)。

收稿日期: 1998-09-21

苗接于生根培养基中, 该培养基由 MS 附加 0.025mg/L NAA 组成。培养一周长出根后, 取其幼龄根尖, 用 2mmol/L 8-羟基喹啉处理 3~4h, 然后用卡诺氏固定液(无水酒精:冰醋酸为 3:1)固定 8~10h。再以 1N HCl 60 ± 0.5℃下酸解 8 min, 用改良卡宝品红染液染色, 压片后镜检。每个根尖计数 10 个分裂细胞的染色体数。

2.2.2 气孔检查

取继代培养相同时间和相同部位并充分展开的叶片, 撕取下表皮, 平铺于载玻片上。滴一滴 1% I₂-KI 液染色, 观察记载每一下表皮 20 对气孔保卫细胞叶绿体的数量, 并以视野为单位统计各个叶片下表皮的的气孔数, 计 10 个视野的平均值。

2.3 过氧化物同工酶 (POX) 分析

取继代培养 4 周龄的杂种植株及其亲本植株中上部充分展开的叶片 0.5g, 加入 1ml 0.05mol/L Tris-甘氨酸缓冲液 (pH=8.3)。冰水浴中匀浆后, 在 8000 r/min 的转速下离心 10min, 上清液用于电泳分析。用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离过氧化物同工酶, 分离胶浓度为 7.7%, pH=8.9, 浓缩胶浓度为 3.1%, pH=6.7, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH=8.3)。每个样品用微量进样器取 60μl 上清液和 5μl 0.2% 溴酚兰指示剂 (4mg 溴酚兰溶于 2ml 50% 的甘油中) 混合后进行点样。电泳在 4℃ 的冰箱中进行, 开始时电流每管为 2mA, 进入分离胶后电流每管增至 3mA。电泳结束后剥出凝胶放入染色液中染色, 染色液组成为 5ml 联苯胺贮液 (2g 联苯胺溶于 18ml 冰醋酸中, 再加蒸馏水 82ml), 2ml 3% H₂O₂ 和 93ml 蒸馏水。当酶带清晰后用水漂洗干净, 置于 7% 的醋酸溶液中固定和保存, 在日光灯下观察记录酶谱并照相。

3 结果与讨论

3.1 杂种植株的细胞学观察

对杂种植株及其亲本的根尖染色体数和叶片下表皮气孔保卫细胞内叶绿体数进行了

表 1 81-15+S. *phureja* 体细胞杂种植株的倍性观察结果

株系	根尖细胞染色体数	气孔叶绿体数 ^①	气孔数 ^②	倍性
81-15 (亲本)	24	25.65±2.83	22.9±2.56	2x
S. <i>phureja</i> (亲本)	24	23.95±2.52	23.7±2.41	2x
P-1-2	48	36.10±2.77	14.6±2.22	4x
P-1-4	48	35.50±2.93	15.1±2.47	4x
P-2-5	48	33.50±3.44	15.2±2.35	4x
P-2-12	48	34.40±3.78	13.5±2.01	4x
P-3-4	37	32.20±3.96	14.9±2.08	非整倍体
P-4-1	48	35.45±3.47	13.4±1.90	4x
P-4-3	48	34.00±3.23	15.0±2.45	4x
P-8-6	48	33.50±3.85	14.3±2.06	4x
P-8-14	48	32.30±3.23	15.5±4.17	4x
P-9-2	48	36.90±3.23	14.2±2.30	4x
P-9-3	48	36.65±2.62	12.9±1.85	4x
P-10-6	48	33.50±3.63	14.2±1.62	4x
P-10-12	48	32.70±3.73	18.4±2.91	4x
P-14-2	48	34.90±4.34	15.9±3.41	4x
P-14-6	48	34.10±3.46	15.4±2.12	4x

注: ① 为 20 对叶片下表皮气孔保卫细胞内叶绿体数的平均值

② 在 10×20x 下, 10 个单位视野内气孔数的平均值

表 2 81-15 + *S. chacoense* 体细胞杂种植株的倍性观察结果

株系	根尖细胞染色体数	气孔叶绿体数 ^①	气孔数 ^②	倍性
81-15 (亲本)	24	25.65±2.83	22.9±2.56	2x
<i>S. chacoense</i> (亲本)	24	23.45±2.65	26.0±3.02	2x
C-1-1	48	36.00±3.43	19.2±3.01	4x
C-1-6	48	35.40±3.07	17.8±2.39	4x
C-1-16	48	34.25±4.49	16.8±2.90	4x
C-1-23	48	34.35±3.67	18.3±4.57	4x
C-1-28	48	35.35±3.45	14.9±2.38	4x
C-3-1	48	32.65±3.88	15.7±2.26	4x
C-3-4	48	33.95±4.43	16.0±2.00	4x
C-4-2	48	33.80±3.71	15.1±1.73	4x
C-4-3	48	29.05±4.83	14.5±2.27	4x
C-4-6	48	33.80±3.30	14.6±2.32	4x

注：①、②同表 1

细胞学观察和分析 (见表 1, 表 2)。供本研究检测的体细胞杂种植株除 81-15 + *S. phureja* 的一个株系为非整倍体外 (染色体数为 37), 其余所有株系均为四倍体 ($2n=4x=48$) (图版 3)。表明双亲全套核基因组都进行了完全的融合, 得到了倍性恢复到四倍体水平的杂种植株。这可能是由于马铃薯最适宜的倍性水平是四倍体, 那些三细胞及至更多细胞融合所得的融合细胞在培养中由于生活力较差而早已被淘汰的缘故。至于得到的一个非整倍体株系, 有可能是二细胞融合之后在培养过程中部分染色体丢失造成的。另外, 由表 1 和表 2 可以看出, 四倍体杂种植株叶片下表皮气孔保卫细胞内的叶绿体数目较多, 单位视野内气孔数目较少, 而二倍体双亲的叶绿体数目较少, 但单位视野内气孔数较多。由于气孔检查比较方便, 而且与倍性的相关性比较密切, 因此, 用它来检测分化植株的倍性水平能够对田间植株进行大量的检测。

3.2 杂种植株的过氧化物同工酶谱分析

对继代培养的杂种植株及其双亲无菌试管苗叶片的过氧化物同工酶 (POX) 进行了多次测定和分析, 结果表明继代培养的杂种植株及其亲本的酶谱是比较稳定的, 并且杂种植株的酶谱呈现出双亲酶带的总和, 保持

了双亲的特征谱带。个别酶带颜色变深, 宽度加大, 表现为双亲酶带的加强。81-15 + *S. phureja* 的体细胞杂种植株出现了 *S. phureja* 的特征性酶带 a 和 81-15 的特征酶带 g 和 h, 而酶带 c、f 的宽度加大, 颜色变深 (图 1, 图版 4)。81-15 + *S. chacoense* 的体细胞杂种植株具有 *S. chacoense* 的特征酶带 h 和 81-15 的特征性酶带 d, 而酶带 c 宽度加大, 颜色变深 (图 2, 图版 5)。这和 Austin 等^[3]的研究结果相似。

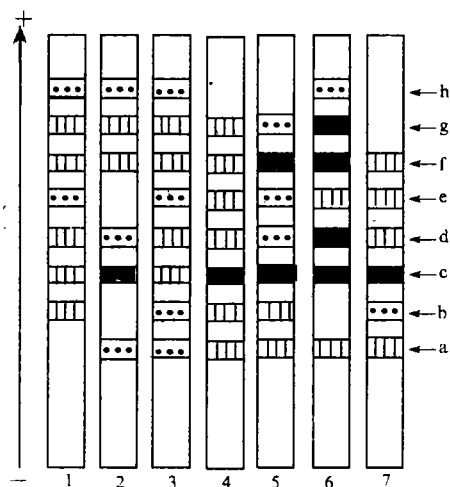


图 1 81-15 + *S. phureja* 杂种植株及其亲本的过氧化物同工酶谱 (1 为 81-15; 2~6 为杂种植株; 7 为 *S. phureja*)

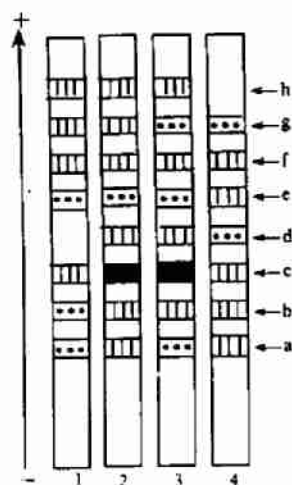
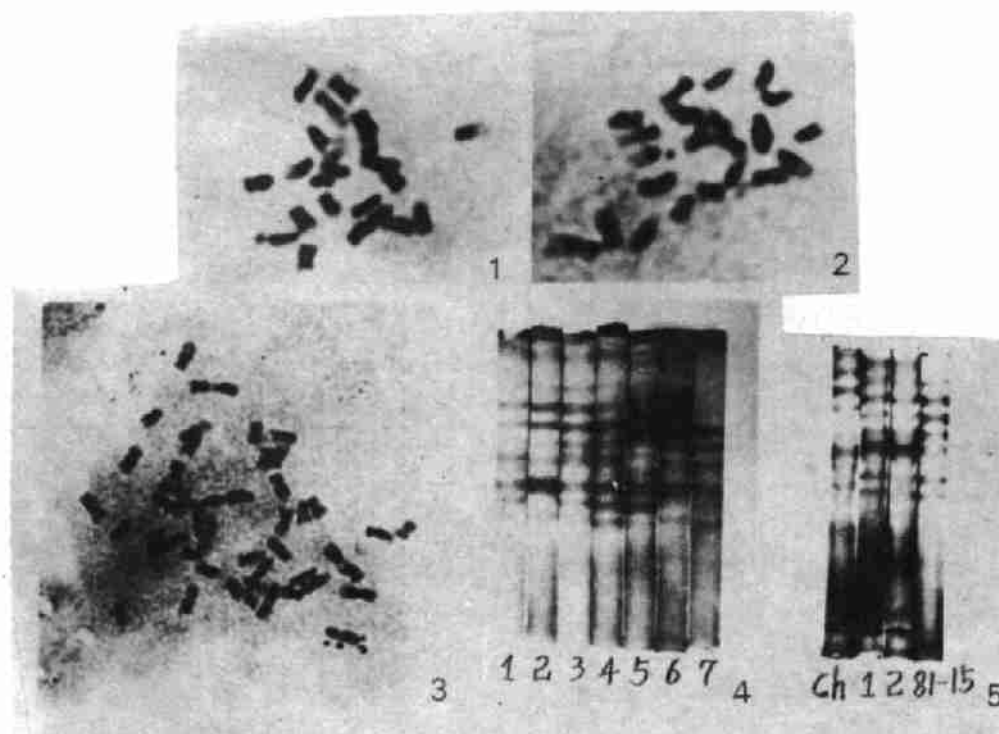


图2 81-15 + *S. chacoense* 杂种植株及其亲本的过氧化物同工酶谱(1为 *S. chacoense*; 2~3为杂种植株; 4为 81-15)

通过以上对电融合法获得的马铃薯种间原生质体融合再生植株的形态学、细胞学观察以及过氧化物同工酶谱的分析,证实了所获得的再生植株为马铃薯种间体细胞杂种植株。从而说明应用这些检验体细胞杂种的方法是完全可以用于较大规模鉴定杂种植株和选择出真杂种的,并不一定需要进行复杂的分子生物学鉴定。

参 考 文 献

- 1 戴朝曦, 孙顺娣, 李继红. 马铃薯体细胞电融合技术的研究. 兰州大学学报, 1994, 30 (增刊): 82~87
- 2 司怀军, 戴朝曦. 马铃薯种间体细胞杂种植株的形态学和农艺性状观察. 马铃薯杂志, 1997, 11 (4): 193~196
- 3 Austin S, M A Baer et al. Intra-specific fusions in *Solanum tuberosum*. Theor Appl Genet, 1985, 71, 172~175



图版说明

- 1、2—融合亲本 81-15 和 *S. phureja* 根尖细胞的染色体 ($2n=2x=24$);
3—81-15 + *S. phureja* 体细胞杂种根尖细胞的染色体 ($2n=4x=48$);
4、5—过氧化物同工酶谱。

萘乙酸、吲哚丁酸、赤霉素对脱毒 马铃薯扦插苗成活率的影响

杨 春 杜 珍 齐海英 王秀英 杜培斌

(山西省农科院高寒作物研究所 大同 037004)

摘 要

试验研究了不同浓度萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、赤霉素(GA₃)混合使用对马铃薯脱毒苗扦插成活的影响。结果表明,以浓度NAA 50mg/L+IBA 50mg/L+GA₃ 3mg/L为扦插处理的最佳组合,成活率最高,生根最好,长势最强。

关键词 马铃薯, 成活率, NAA, IBA, GA₃

收稿日期: 1998-07-17

CYTOLOGICAL OBSERVATION AND PEROXIDASE ISOENZYME ANALYSIS OF INTER-SPECIFIC SOMATIC HYBRID PLANTS IN POTATO

Si Huaijun and Dai Chaoxi

(Institute of Agribiotechnology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

ABSTRACT

The results from the assay of 15 somatic hybrid plants obtained by protoplast electrofusion between an anther culture derived dihaploid of *Solanum tuberosum* strain 81-15 and a South American diploid cultivated species *S. phureja*, and 10 somatic hybrid plants between the 81-15 and a diploid wild species *S. chacoense* by cytological observation and peroxidase isoenzyme analysis showed that the checked somatic hybrid plants were tetraploids ($2n=4x=48$) except one aneuploid plant (chromosome numbers were 37). The chloroplast number of epidemic stomatal guard cells of leaf lower side from somatic hybrids increased and the stomata number per unit area reduced in contrast with their diploid parents. The hybrid plants had not only the peroxidase bands of their both parents, but also wider or darker ones.

KEY WORDS: potato, somatic hybrids, cytology, peroxidase isoenzyme