

赵小强,鹿金颖,陈瑜,等. 马铃薯原生质体培养与体细胞杂交研究进展[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):6-14.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.002

马铃薯原生质体培养与体细胞杂交研究进展

赵小强^{1,2,3,4}, 鹿金颖^{1,2,3,4}, 陈瑜^{1,2,3,4}, 李华盛^{1,2,3,4}

(1. 航天神舟生物科技集团有限公司,北京 100190; 2. 北京市空间生物工程技术有限公司,北京 100190;
3. 中国航天科技集团有限公司空间生物工程研究中心,北京 100190; 4. 北京市国际科技合作基地,北京 100190)

摘要:马铃薯是最早成功进行离体培养并获得体细胞杂种植株的农作物之一。原生质体培养及再生是体细胞杂交的关键环节,体细胞杂交技术可以避免马铃薯因倍性水平和胚乳平衡数造成在常规育种上的难点。本文在介绍马铃薯原生质体培养影响因素和体细胞杂交技术及其在马铃薯遗传育种应用的基础上,主要分析了影响原生质体培养的重要因素,包括基因型、外植体、预处理、分离技术和培养方法等,并且总结了体细胞杂交技术在马铃薯遗传育种中的应用,同时针对存在的问题提出建议与相应对策并进行了展望。

关键词:马铃薯;原生质体培养;体细胞杂交;遗传育种;建议;研究进展

中图分类号: S532.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)22-0006-09

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)属茄科茄属植物^[1],是继小麦、水稻和玉米之后第四大栽培作物^[2]。马铃薯是未来保障全球人口粮食资源的重要作物,预计到2050年全球人口将增至97亿^[3]。我国马铃薯的种植面积位居世界第一,主要分布在西南山区、西北和东北等地区。同时,各航天大国进行了空间生物再生生命保障系统(BLSS)中候选植物物种的筛选,马铃薯因营养价值高、空间占用体积小、繁殖容易、园艺操作简单、株高相对矮等特点被作为BLSS的候选植物物种^[4]。

马铃薯是多倍体,在自然界中存在不同倍性的种质资源,其中二倍体占74.4%,包括绝大多数的原始栽培种和野生种,它们是马铃薯抗病、抗虫和抗逆等优良性状选育的重要种质资源^[5]。马铃薯栽培种的遗传背景较狭窄^[6],生产上应用的普通马铃薯基本为四倍体,但野生种为二倍体,由于倍性水平和胚乳平衡数的差异^[7],许多野生资源的优质基因难以通过传统育种转移到普通马铃薯上。为了充分利用野生种质资源,拓宽栽培马铃薯狭窄的遗传基础,研究人员付出了巨大的努力。体细胞杂

交技术的利用,可以有效克服马铃薯栽培种和野生种因倍性差异引起的生殖隔离,将野生种的优质基因转移至栽培种用来选择改良品种^[8],同时可以避免与转基因相关的生物安全监管问题。随着体细胞杂交技术的发展,研究人员展开了大量马铃薯原生质体融合的研究。本文综述了马铃薯体原生质培养、体细胞杂交的研究进展及其在遗传育种中的研究应用,同时针对存在的问题提出建议和意见并进行了讨论和展望。

1 原生质体的培养

1960年Cocking首次用酶解法制备获得了烟草大量的原生质体^[9]。10年后,Takebe等成功获得经烟草原生质体培养的再生植株^[10]。Lorenzini最早开展马铃薯原生质体培养的研究,他通过游离四倍体马铃薯茎块原生质体,试验只获得了原生质体来源的愈伤组织^[11]。随后,Butenko等对普通栽培种Chacoense叶片原生质体进行培养,试验得到了植株,但植株染色体数目有缺失^[12]。同年,Shepard等通过改进培养方法,获得了商业品种布尔班克叶片原生质体来源形态完整的再生植株^[13]。马铃薯是最早成功进行离体培养并获得体细胞杂种植株的农作物之一^[14]。目前,关于马铃薯原生质体培养的报道较多,但其采用的试验材料和培养方法存在较大的差异。影响原生质体培养的因素较多,主要包括基因型、外植体、预处理、分离技术和培养方法等。

收稿日期:2020-02-26

基金项目:国家外国专家项目(编号:GS20190170001);云南省重点研发计划(编号:2018IB012)。

作者简介:赵小强(1985—),男,甘肃武山人,博士,工程师,从事空间植物育种研究。E-mail:wushan2002zxq@126.com。

通信作者:鹿金颖,博士,研究员,从事空间生物学研究。E-mail:lujinying2001@sina.com。

1.1 原生质体的游离

1.1.1 基因型和外植体的类型 研究表明,基因型是影响茄科茄属植物原生质体再生的重要因素之一^[15-16]。不同基因型的马铃薯在原生质体培养时,可以观察到从原生质体开始培养到肉眼可见的愈伤组织整个阶段无显著差异,但形成的愈伤组织在分化培养基上培养时分化效率存在显著差异^[17],这表明不同基因型在愈伤组织分化阶段对培养基的成分存在敏感性差异。

用来酶解马铃薯原生质体的外植体较为广泛,包括块茎^[18]、根尖^[19]、芽^[15,20]、叶片^[21-28]、悬浮培养细胞^[27,29-32]、实生苗子叶及下胚轴^[33-34]和花粉^[35-36]等。在上述材料中,叶片酶解后可获得在生理和遗传特性上较一致的原生质体,同时植株的培养条件和苗龄等因素对原生质体的产量和活力有较大的影响,因此无菌试管苗被选为获得高质量原生质体的最佳材料。

1.1.2 外植体的预处理 提高原生质体对不利因素的耐受力可获得产量和活力较高的马铃薯原生质体。研究者通常在酶解前或者在酶解过程中对材料进行预处理,通过改变细胞和细胞壁的生理状态来提高原生质体的产量和活力。预处理的方法有:(1)低温处理。李世君等将 25 ℃ 下培养 28 d 的马铃薯无菌苗于 4 ℃ 下过夜,发现低温处理可以有效提高原生质体的活力^[37]。(2)抽真空处理。戴朝曦等将试验材料剪碎后连同酶解液一起置于真空抽气瓶中,在 0.05 MPa 压力条件下抽气 10 min,由于压力有效提高了材料原生质体释放的速度及原生质体的产量,同时由于减少了材料在酶解液中的时间,原生质体的活力也有大幅度提高^[38]。吴旺泽等将材料在酶解前进行低温处理并对组织和酶液进行真空渗透处理,预处理显著提高了原生质体游离速度和原生质体产量^[39]。(3)弱光短周期处理。Shepard 等将材料游离原生质体前进行弱光短光照周期处理,发现此处理可显著提高马铃薯原生质体产量^[13]。(4)叶片离体培养。刘文萍等将马铃薯叶片在 MS 液体培养基 4 ℃ 下处理或者在 FM 液体培养基中 20 ℃ 下黑暗处理 48 h 后转入 CM 培养基中 4 ℃ 下持续 24 h,此处理可显著提高原生质体质量且较多细胞进行分裂^[40]。(5)药物处理。在马铃薯植株培养基中添加乙烯拮抗剂 AgNO_3 ^[41]和 $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ^[42-43]可促进马铃薯原生质体的分离和培养。因此,选择适宜的预处理方法是获得高质量马

铃薯原生质体的重要因子。

1.1.3 外源影响因子 影响原生质体酶解的外源因子主要有酶制剂的类型、酶解液的渗透压、酶解温度、酶解时间和酶解液的 pH 值等。

用于游离原生质体的酶制剂主要有纤维素酶、果胶酶和离析酶。酶制剂的不同组合及浓度是影响原生质体产量和活力的重要因素,具体应根据材料类型和酶制剂活力而选择。对去细胞壁相对容易的材料如幼嫩叶片和下胚轴等,应选择相对温和的酶和较低的浓度;而以愈伤组织细胞悬浮系为材料时,应选用活性较高的酶。酶为生物活性物质,同一类型的酶因不同厂商甚至批次的差异会影响酶的活力,所以应根据多次试验确定^[44]。

酶解液的渗透压是影响原生质体能否成功离解的另一个因素,植物细胞酶解后需适宜的渗透压来维持细胞生长的正常状态,否则会影响细胞的生长和代谢。李韬等研究证明,以蔗糖作为渗透压调节剂时可以减小原生质体的损伤并提高其活力,其效果优于选用甘露醇或葡萄糖 + 甘露醇^[45]。孙海宏等研究证明,用 0.3 mol/L 甘露醇作为渗透压调节剂可获得产量和活力较高的马铃薯叶片原生质体^[28],而一些研究者在培养马铃薯原生质体时采用 0.4 ~ 0.6 mol/L 甘露醇来维持渗透压^[26]。赵小强等在进行草地早熟禾原生质体培养时采用 0.4 mol/L 甘露醇来维持渗透压,并且发现在原生质体培养过程中逐步降低渗透压的浓度有利于愈伤组织的形成^[46]。

游离原生质体酶解液的温度为 25 ~ 30 ℃。陈鹏认为,酶解温度受所用酶的活性和材料类型的影响,马铃薯叶片原生质体酶解的最佳温度为 28 ℃^[31]。孙海宏等研究证明,虽然 28 ℃ 时可获得最高产量的原生质体,但此时原生质体状态差于 (25 ± 1) ℃ 时获得的原生质体,因此建议最佳的酶解温度为 (25 ± 1) ℃^[28]。

酶的活性与 pH 值也较为密切。酶解液的 pH 值常被调节在 4.7 ~ 6.0 之间。常用的 Onozuka 纤维素酶 R-10 和离析酶 R-10 最佳的 pH 值范围分别为 5.0 ~ 6.0 和 4.0 ~ 5.0^[47]。

酶的类型和浓度是影响酶解原生质体的时间和产量的关键的因素;酶解液渗透压是影响获得高质量原生质体并形成愈伤组织的重要因素;酶解温度及 pH 值对马铃薯原生质体的解离和质量也有重要的影响,因此在实际操作过程中必须综合考虑这

些重要因子^[48]。

1.2 原生质体的再生

1.2.1 培养基及培养条件 常用于马铃薯原生质体培养的培养基有 MS^[49]、B5^[50]、KM^[51]、VKM^[52] 和 SKM^[15] 等培养基。游离获得的原生质体从愈伤组织形成到愈伤组织进一步分化所用培养基及组成与组织器官培养愈伤诱导和分化培养基类似^[53-54]。马铃薯原生质体培养时,在培养基中加入甘氨酸、聚乙烯吡咯烷酮和维生素 C 等可有效防止原生质体再生细胞团的褐化现象^[47];在培养基中添加适量的活性炭可促进原生质体细胞的分裂^[55]。进行单个原生质体培养时,在培养基中添加 1.2% 马铃薯块茎浸提液可显著提高细胞分裂的频率^[45]。

原生质体培养在形成大量的愈伤组织之前应置于黑暗或者弱光下培养,这是因为强光会造成原生质体叶绿素分解而导致细胞死亡。在(24 ± 1) °C 黑暗条件下培养的马铃薯原生质体培养 1 d 后,在显微镜下可观察到其体积增大并伴随细胞壁的再生,培养 3 ~ 5 d 后细胞发生第 1 次和第 2 次分裂,但在(28 ± 1) °C 条件下培养时,原生质体能再生出细胞壁但不能进一步分裂^[56]。因此,基于不同的试验材料,选择适宜的培养基和培养条件是马铃薯原生质体培养成功的核心技术。

1.2.2 原生质体的培养方法 原生质体培养方法主要有固体培养、液体培养以及由固液培养方法衍生出的一系列培养方法。各种培养方法在马铃薯原生质体培养中均有使用,其中液体浅层培养法是最常用且效果最佳的培养基,其次是海藻酸钠薄层固液双层培养法^[31]。马铃薯在进行原生质体培养时,当观察到有愈伤组织形成时即可迅速转移至除去维持渗透压的固体培养基中进一步进行继代培养,继代 1 ~ 2 次后转入分化培养基进行分化培养。

2 体细胞杂交

体细胞技术可以克服有性杂交不亲和性的障碍,实现在近缘的种内或种间,远缘的属间甚至科之间形成杂种细胞,扩大遗传变异的重组范围,创造出常规育种技术不能获得的新品种(系),并且原生质体融合不涉及 DNA 的体外重组,无潜在的安全性问题。1980 年,Butenko 等首次对普通四倍体栽培种与二倍体野生种 *S. chacoense* 进行细胞融合,获得了抗 Y 病毒(PVY)的体细胞杂种植株^[57]。随后研究人员进行了较多马铃薯融合研究,产生了几百

个马铃薯体细胞杂种,Tiwari 等对近 40 年马铃薯体细胞杂交做了汇总^[58]。

2.1 原生质体的融合方法

马铃薯原生质体融合常用的方法有电融合法和聚乙二醇法(polyethylene glycol, PEG)。在研究初期,PEG 化学诱导方法被广泛使用,但随着电融合方法的不断改进完善,利用电融合方法获得马铃薯杂种植株的报道越来越多。这可能是和 PEG 法相比较,电融合法具有操作简单,参数易于控制,并且不会对细胞产生毒害作用等优点。在粮食作物中,马铃薯是最先使用电融合技术进行细胞融合的作物^[59]。

2.2 杂种细胞的筛选与鉴定

原生质体融合后的产物包括自身融合的同核体、异源融合的异核体和未发生融合的双亲本的原生质体,而异核体是要选择进一步培养的细胞,因此,要采用特定的方法对杂种细胞进行筛选和鉴定。

2.2.1 杂种细胞的筛选 杂种细胞筛选常用的方法有物理选择法、互补选择法和生长差异选择法。

物理选择法是根据亲本天然颜色不同,选择具有双亲颜色的异核体,如王清等利用子叶原生质体叶绿体含量多但下胚轴原生质体含量少为标记,对马铃薯杂种细胞进行挑选^[60]。

互补选择法是通过转抗性标记植株、双突变体和营养缺陷型突变体对异核体进行选择。Teruo 利用农杆菌介导法将卡那霉素抗性和潮霉素抗性转移至 2 个供试品种,融合后利用同时含有卡那霉素和潮霉素的培养基进行筛选,最终获得杂种植株^[61]。

生长差异选择法是在筛选培养基上只适合杂种细胞正常生长而其他细胞不能正常生长的筛选方法。

2.2.2 体细胞杂种植株的鉴定 通过培养获得杂种细胞再生植株后,为了检测是否为目标融合体须要对植株进行鉴定。目前,筛选鉴定主要从形态学、细胞学和生化及分子生物学等方面进行鉴定。

形态学特征大多由多基因控制,但经常会发生一些异常的改变,所以仅凭形态学特征具有一定的缺陷,故选用其他方法鉴定。

生物化学方法鉴定是通过分析同工酶对体细胞杂种进行鉴定。同工酶常采用过氧化物酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,杂种的同工酶谱带常表现为融合双亲谱带之和,有时部分亲本带会丢失,有时

杂种甚至出现新的谱带。司怀军等对融合而来的马铃薯杂种植株进行过氧化物同工酶谱分析,结果杂种植株过氧化物同工酶表现为双亲酶谱谱带总和^[62]。

分子生物学方法鉴定是一种对杂种高效鉴定的方法。常用的分子标记技术为随机扩增 DNA 多态性(RAPD)、简单重复序列(SSR)、限制性内切酶片断长度多态性(RFLP)和扩增片断长度多态性(AFLP)等。Szczerbakowa 等利用 RAPD 技术分析 *S. nigrum*(+) *S. tuberosum* 杂种植株,杂种植株表现出具有双亲特征条带^[63]。李风云等利用 RAPD 技术分析抗晚疫病的马铃薯二倍体野生种 *S. chacoense* 与感晚疫病的四倍体材料 DY4-5-10 杂种植株,有 8 个引物扩增出两亲本的差异带,在 101 个再生植株中 94 个为杂种^[64]。Fock 等利用 SSR 分子标记技术对 *S. stenotomum*(+) *S. tuberosum* 杂种植株进行了分析鉴定并获得杂种植株^[24];李朋等对青枯病抗性的体细胞杂种与栽培种杂交的后代利用 SSR 分子标记分析鉴定,最终获得 3 个标记可以明确鉴定抗感基因型^[65]。Liu 等利用特定亲本 SSR 标记对不对称杂交后代的基因组成进行了标记^[66]。Helgeson 等利用细胞融合技术将 *S. tuberosum*(+) *S. bulbocastanum* 融合,获得的植株经 RAPD 和 RFLP 鉴定,从而获得了杂种植株^[67]。Rakosy-Tican 等通过对杂种后代利用 SSR 和 AFLP 标记,认为杂种植株对称或者不对称杂交的比例取决于马铃薯的品种^[68]。Tiwari 等利用 AFLP 和 MSAP 分子标记法对 *S. tuberosum*(+) *S. etuberosum* 杂种植株进行遗传和表观变化分析,结果表明,杂种植株和其母本相比较,再生植株在组织培养过程中的表观遗传变异最小(2%~6%)^[69]。此外,分子标记技术还可对细胞质基因组(叶绿体和线粒体基因组)来源进行鉴定,Chandel 等对 *S. tuberosum*(+) *S. cardiophyllum* 杂种后代通过 RAPD、内部简单重复序列多态性(ISSR)、SSR、AFLP 分子鉴定和细胞质基因组进行鉴定,确定了抗晚疫病的杂种植株^[70]。Fock 等对 10 个马铃薯 *S. tuberosum*(+) *S. phureja* 体细胞杂种植株用细胞质特异 SSR 引物进行鉴定,其中 8 株具有 *S. phureja* 叶绿体 DNA,其余 2 株具有 *S. tuberosum* 叶绿体 DNA^[71]。蔡兴奎等用叶绿体 SSR 引物筛选鉴定了马铃薯栽培种 *S. tuberosum* 和二倍体野生种 *S. chacoense* 杂种叶绿体的组成,观察到体细胞杂种中

同时具有单亲本类型和双亲本的重组类型^[72]。

在上述几类鉴定方法中,因分子标记法仅需少量材料即可对杂种植株的核基因组和胞质基因组^[73-74]进行快速分析鉴定,因此被科研工作者广泛采用。近年来,基于绿色荧光蛋白标记的方法可被用来鉴定杂种植株^[75]。因此,选择一种快速、简单、低成本且可靠的方法来鉴定杂种植株显得尤为重要。

3 体细胞杂交技术在马铃薯遗传改良中的应用

3.1 获得抗病新种质

体细胞杂交技术可有效克服马铃薯野生种与栽培种的生殖障碍,通过此技术可以将野生种抗真菌基因、抗细菌基因、抗病毒基因和优良农艺性状基因等转移至普通栽培种中,从而提高栽培品种的整体特性。

3.1.1 抗真菌新种质的获得 栽培种容易感染的真菌病害有晚疫病、早疫病和黄萎病等病害。Helgeson 等利用细胞融合技术获得 *S. tuberosum*(+) *S. bulbocastanum* 的杂种植株,经鉴定杂种植株具有抗晚疫病的特性^[67]。Luthra 等通过对马铃薯种间 *S. tuberosum*(+) *S. cardiophyllum* 融合杂种植株 cph-hybrids 分析,杂种植株对晚疫病表现出良好的抗性,同时干物质的含量和品质均高于亲本^[76]。Smyda-Dajmund 利用细胞融合技术获得 *S. michoacanum*(+) *S. tuberosum* 的杂种植株后再与 *S. michoacanum* 回交,最终获得抗晚疫病的杂种马铃薯植株^[77]。Luthra 等对 *S. tuberosum*(+) *S. pinnatisectum* 杂种植株在大田进行分析,杂种植株较对照对晚疫病表现出明显的抗性,并且品质性状也优于对照^[78]。龙葵(*S. nigrum*)和马铃薯(*S. tuberosum*)经细胞融合后,获得倍性变异幅度较大的杂种植株,经鉴定,杂种整株对晚疫病的抗性与 *S. nigrum* 相当,并且部分杂种植株离体叶片抗性高于 *S. nigrum*^[63]。Tek 等利用体细胞杂交技术获得 *S. tuberosum*(+) *S. brevidens* 杂种植株,部分杂种植株对马铃薯早疫病具有良好的抗性^[25]。Jadari 等利用电融合技术获得 *S. tuberosum*(+) *S. torvum* 杂种植株,所得杂种植株均对黄萎病产生抗性,说明大丽轮枝菌病原菌(*Verticillium dahliae*)抗性转移至马铃薯,从而抑制了马铃薯黄萎病的发生^[79]。

3.1.2 抗细菌新种质的获得 栽培种在种植时容易感染软腐病、青枯病和环腐病等细菌性病害。

Austin 等利用 *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* 可育的体细胞杂种与马铃薯四倍体栽培种回交,获得抗软腐病的马铃薯^[80]。McGrath 等对 *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* 细胞融合的杂种植株系分析,发现抗软腐病的基因稳定导入马铃薯杂种植株中^[81]。Fock 等利用电融合技术对栽培种 *S. tuberosum* 和野生种 *S. stenotomum* 进行细胞的融合,获得抗青枯病与 *S. stenotomum* 相当的杂种植株^[24]。Ahn 等通过分析由 *S. brevidens* (+) *S. tuberosum* 细胞融合而来的杂种植株系,观察到杂种植株系抗青枯病的能力要强于亲本,为进一步获得新种质奠定了基础^[82]。2003年,蔡兴奎利用中薯无性系 3#和 8#与野生种 *S. chacoense* 融合,在我国首次创造出具有青枯病抗性的体细胞杂种^[22],3年之后他们对这些杂合体进行倍性检测,观察到融合后的六倍体后代稳定保持^[83];2016年,他们课题组通过不对称融合技术又获得抗青枯病的杂种植株^[66],这为培育抗青枯病的新品种(系)奠定了坚实的技术。Laurila 等通过细胞融合技术获得了 *S. tuberosum* (+) *S. acaule* 杂种植株,杂种植株根据核基因来源于 *S. acaule* 所占比例,呈现出对环腐病不同程度的抗性^[84]。Tek 等利用体细胞杂交技术获得 *S. tuberosum* 和 *S. brevidens* 体细胞杂种植株,经检测部分杂种品系表现出对马铃薯软腐病良好的抗性^[25]。Yu 等通过电融合获得 *S. melongena* (+) *S. tuberosum* 的杂种后代,后代表现出抗青枯病,说明抗青枯病的特性从茄子成功转移至马铃薯,这为培育抗青枯病马铃薯奠定了基础^[85]。

3.1.3 抗病毒病新种质的获得 野生种 *S. brevidens* 对马铃薯卷叶病(PLRV)、X病毒(PVX)和Y病毒(PVY)都具有显著的抗性,利用细胞融合技术将该品种的抗病毒性转移到不同马铃薯品种中,获得抗病毒病的株系。Rokka 等通过培养体细胞杂种 *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* 三倍体植株花药获得单倍体,该单倍体植株对 PLRV 具有良好的抗性^[86]。Gillen 等通过对 *S. etuberosum* (+) *S. tuberosum* 杂种后代分析,杂种植株表现出对 PLRV 具有较强的抗性^[87]。Nouri - Ellouz 等利用电融合技术获得马铃薯 2 个二倍体杂种植株,在大棚接种马铃薯 Y 病毒,一些杂种植株的症状延迟出现并且感染率降低,其中 1 株表现完全抗马铃薯 Y 病毒^[88]。Nouri - Ellouz 等通过细胞融合获得的马铃薯体细胞杂种 *S. berthaultii* (+) *S. tuberosum* 对土

传真菌和马铃薯 Y 病毒表现出部分抗性^[89]。

3.2 获得抗虫新种质

马铃薯在生长过程中,易遭受蚜虫、甲虫和线虫等虫害的危害。Novy 等通过对 *S. etuberosum* (+) *S. tuberosum* 杂种后代在大田中研究,发现大田中马铃薯桃蚜的生殖力及成虫大小均减小,同时后代表现出对马铃薯桃蚜、PLRV 和 PVY 具有多重抗性^[90]。Thieme 等通过电融合获得 *S. cardiophyllum* (+) *S. tuberosum* 的杂种植株,经鉴定野生种的 *cph* 基因成功转移至商业品种中,杂种植株表现出对马铃薯甲虫的抗性,同时对 PVY 也表现出一定的抗性^[91]。Jeffrey 等将融合获得的 *S. tuberosum* (+) *S. bulbocastanum* 杂种植株再与栽培种回交,在筛选出的 63 个品系中有 9 个品系表现出对绿桃蚜虫的抗性,有 5 个品系表现出对马铃薯蚜虫的抗性^[92]。Cooper - Bland 等对马铃薯的 2 个二倍体进行电融合,获得的杂种植株对马铃薯胞囊线虫表现出一定的抗性^[93]。

3.3 获得抗霜冻新种质

马铃薯易受冷、热和霜等不同类型的非生物胁迫,还面临着全球变暖导致水的限制。马铃薯栽培品种不耐低温,在 $-3.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时很快死亡,而野生种 *S. commersonii* 能在 $-4.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下存活,最低耐 $-11.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[94]。Cardi 等利用体细胞杂交技术获得了 *S. tuberosum* (+) *S. commersonii* 杂种植株,杂种植株表现出抗霜冻性高于亲本 *S. tuberosum* 的特性^[95]。Nyman 等也利用体细胞杂交技术获得了 *S. tuberosum* (+) *S. commersonii* 的体细胞杂种,杂种植株具有抗霜冻特性,说明野生种抗冻基因已转移到栽培种上^[96]。

3.4 获得雄性不育新种质

在预防马铃薯病害的过程中,发现种子可以避免一些病害的传播,因此可以利用细胞融合技术培育新的雄性不育系,以应用于实生种子生产。Perl 等融合了碘乙酰胺处理的马铃薯和 γ 辐射的原生质体(含有 *S. stoloniferum* 胞质),杂种植株呈现出雄性不育的特性,从而阻断了通过实生种子传播的病害^[97]。

3.5 获得耐盐新种质

Trabelsi 等利用 PEG 融合法获得了 *S. tuberosum* (+) *S. vernei* 杂种植株,通过耐盐性试验检测,杂种植株对盐的耐受性增强^[98]。Bidani 等通过分析 *S. tuberosum* (+) *S. berthaultii* 的 3 个杂种

株系 STBa、STBc 和 STBd,结果证明杂交种系耐盐性要高于亲本 BF15^[99],同时 STBc 和 STBd 株系表现出较强的耐盐性,而 STBa 株系的耐盐性处于中间状态^[100]。

4 问题及展望

4.1 建立不同试验材料高效原生质体培养体系

由于马铃薯遗传背景的复杂性,商业栽培种大多为四倍体,而原始栽培种和野生种大多为二倍体;同时,由于基因型的差异很难建立一套应用于所有马铃薯品种的高效原生质体培养体系。因此,要在具体工作中建立不同试验材料高效原生质体培养再生体系。

4.2 融合方法的创新

传统的细胞融合方法主要是电融合和聚乙二醇融合^[101]。而在微重力环境条件下,微重力可以改变细胞融合液体的存在状态,从而有效提高细胞融合效率。“神州四号”飞船中通过电融合获得烟草融合细胞,其融合细胞再生愈伤组织的频率是地面对照的3倍多^[102]。因此,可以在模拟微重力条件下探究不同的融合方法对马铃薯原生质体融合效率的研究,为获得更多的马铃薯杂种植株奠定基础。

4.3 种质资源的创新

马铃薯易受冷、热和霜等不同类型的非生物胁迫,并且栽培种均不耐低温霜冻且马铃薯栽培种种内几乎没有遗传变异^[103],同时还面临着全球气温升高导致缺水的影响。在降水不规律、水资源短缺的地区,马铃薯种植可能会面临严峻的考验。干旱胁迫已经在一定程度上对马铃薯作物造成了严重且持续的负面影响^[104-105]。Beddington 研究发现,将近40%的马铃薯损失是由病虫害引起的。作为保障全球人口粮食资源的重要作物,利用细胞融合技术培育抗生物和非生物耐胁迫马铃薯新品种迫在眉睫^[106]。

4.4 中国空间站种植品种的选育

BLSS 是为航天员生命活动提供物质保障的独立、完整和复杂的系统,高等植物是该系统中最为关键的生物部件,它通过自身的光合作用和蒸腾作用为航天员提供食物、饮水和氧气。因生长环境的制约,各航天大国结合本国的特点进行了 BLSS 中候选植物物种的筛选,马铃薯因生产力高、营养价值高、园艺操作简单和株高相对矮等特点被各国作为 BLSS 的候选植物物种^[4]。中国空间站将于

2022 年前后建成,结合 BLSS 系统对植物物种的需求,为了满足中国空间站马铃薯的顺利种植,利用体细胞杂交技术培育早熟、生长周期短、植株矮、产量相对较高、抗病虫害、逆性强和营养价值高的马铃薯新品势在必行。同时,收集具有这些特性的马铃薯种质建立中国空间站马铃薯种质资源库也显得尤为重要。

参考文献:

- [1] Sarbesh D D, Abdellah B, Jennifer S, et al. Genome editing of potato using CRISPR technologies: current development and future prospective[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, 139(2): 403-416.
- [2] Hameed A, Zaidi S S, Shakir S, et al. Applications of new breeding technologies for potato improvement[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 925.
- [3] 新华社. 联合国报告: 2050 年世界人口将达 97 亿[EB/OL]. (2019-06-18) [2020-01-08]. https://www.sohu.com/a/321369078_267106?_f=index_chan08travelnews_3.
- [4] 刘红. 生物再生生命保障系统理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [5] 金黎平, 杨宏福. 马铃薯遗传育种中的染色体倍性操作[J]. *农业生物技术学报*, 1996, 4(1): 70-74.
- [6] Luthra S K, Gopal J, Sharma P C. Genetic divergence and its relationship with heterosis in potato[J]. *Potato Journal*, 2005, 32(1/2): 37-42.
- [7] Spooner D M, Salas A. Structure, biosystematics, and genetic resources [M]//Gopal J, Paul K S M. *Handbook of potato production, improvement and postharvest management*. New York: Food Product Press, 2006.
- [8] Helgeson J P, Haberland G T, Ehlenfeldt M K, et al. Fertile somatic hybrids of potato and wild *Solanum* species; potential for use in breeding programs[J]. *American Journal of Potato Research*, 1993, 70: 437-452.
- [9] Cocking E C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles[J]. *Nature*, 1960, 187(4741): 962-963.
- [10] Takebe I, Labib G, Melchers G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco[J]. *Naturwissenschaften*, 1971, 58(6): 318-320.
- [11] Lorenzini M. Obtention de protoplasts de tubercule de Pomme de terre[J]. *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Science Paris*, 1973, 276: 1839-1842.
- [12] Butenko R G, Kuchko A A, Vitenko V A, et al. Production and cultivation of isolated protoplasts from mesophyll of leaves of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum chacoense* Bitt[J]. *Soviet Plant Physiology*, 1977, 24(3): 541-546.
- [13] Shepard J F, Totten R E. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration[J]. *Plant Physiology*, 1977, 60(2): 313-316.
- [14] Orczyk W, Przetakiewicz J, Nadolska - Orczyk A. Somatic hybrids

- of *Solanum tuberosum* – application to genetics and breeding[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2003, 74(1): 1–13.
- [15] Hunt G J, Helgeson J P. A medium and simplified procedure for growing single cells from *Solanum* species [J]. *Plant Science*, 1989, 60(2): 251–257.
- [16] Coleman M, Davie P, Vessey J, et al. Intracloonal genetic variation for protoplast regenerative ability within *Solanum tuberosum* cv. record[J]. *Annals of Botany*, 1991, 67(4): 459–461.
- [17] 周宇波, 柳俊, 谢从华, 等. 马铃薯原生质体培养体系改良[J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(5): 469–473.
- [18] Jones H, Karp A, Jones M G. Isolation, culture, and regeneration of plants from potato protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(5): 307–311.
- [19] Laine E, Ducreux G. Plant regeneration from root apical protoplasts of *Solanum tuberosum* cv. BF15[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1987, 126(4/5): 345–354.
- [20] Bokelmann G S, Roest S. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) [J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1983, 109(3): 259–265.
- [21] 何亚文, 李耿光, 张兰英. 马铃薯野生种叶肉原生质体培养及其植株再生[J]. *热带亚热带植物学报*, 1996, 4(3): 72–74.
- [22] 蔡兴奎, 柳俊, 谢从华. 马铃薯叶肉原生质体电融合参数优化及杂种植株再生[J]. *华中农业大学学报*, 2003, 22(5): 494–498.
- [23] Binding H, Nehls R, Schieder O, et al. Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 1978, 43(1): 52–54.
- [24] Fock I, Collonnier C, Luisetti J, et al. Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39(10): 899–908.
- [25] Tek A L, Stevenson W R, Helgeson J P, et al. Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato[J]. *Theoretische und Angewandte Genetik*, 2004, 109(2): 249–254.
- [26] 袁华玲, 金黎平, 黄三文, 等. 二倍体马铃薯叶肉细胞原生质体培养的研究[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(3): 55–59.
- [27] Sadia B. Improved isolation and culture of protoplasts from *S. chacoense* and potato; morphological and cytological evaluation of protoplast-derived regenerants of potato cv. Desiree[J]. *Pakistan Journal of Agriculture Sciences*, 2015, 52(1): 51–61.
- [28] 孙海宏, 周云, 贺苗苗, 等. 二倍体野生种马铃薯 *Solanum pinnatisectum* 原生质体分离纯化与培养的研究[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(1): 140–146.
- [29] Szczerbakowa A, Borkowska M, Wielgat B. Plant regeneration from the protoplasts of *Solanum tuberosum*, *S. nigrum* and *S. bulbocastanum*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2000, 22(1): 3–10.
- [30] 祁新, 赵颖君, 王艳秋, 等. 马铃薯悬浮细胞原生质体培养及植株再生[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(1): 52–55.
- [31] 陈鹏. 马铃薯叶片和悬浮细胞原生质体的分离与培养[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [32] 魏彩霞. 马铃薯“GSAP-H”悬浮细胞原生质体培养与融合研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [33] 戴朝曦, 孙顺娣. 马铃薯实生苗子叶及下胚轴原生质体培养研究[J]. *植物学报*, 1994, 36(9): 671–678.
- [34] Dai C X, Mertz D, Lambeth V. Improved procedures for the isolation and culture of potato protoplasts[J]. *Plant Science*, 1987, 50(1): 79–84.
- [35] 王蒂, 司怀军, 王清. 马铃薯花粉原生质体分离的研究[J]. *园艺学报*, 1999, 26(5): 323–326.
- [36] Wang Y P, Cheng L X, Liang Y C, et al. Isolation and culture of pollen tetrad protoplasts from *Solanum tuberosum* [J]. *American Journal of Potato Research*, 2017, 94(4): 417–424.
- [37] 李世君, 李向辉, 孙勇如. 马铃薯无菌苗叶肉原生质体再生植株[J]. *生物工程学报*, 1989, 5(1): 57–63.
- [38] 戴朝曦, 孙顺娣, 李继红. 马铃薯原生质体培养及体细胞融合和杂交技术研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [39] 吴旺泽, 王蒂, 王清, 等. 马铃薯原生质体游离与培养体系的研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(2): 146–149.
- [40] 刘文萍, 刘建新, 南相日, 等. 二倍体马铃薯原生质体培养与植株再生[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(1): 6–9.
- [41] 李凤云, 蔡兴奎, 盛万民, 等. 二倍体马铃薯试管苗的培养及对叶肉原生质体融合的影响[J]. *中国马铃薯*, 2014, 28(5): 257–263.
- [42] Xu Y S, Pehu E, Malone R, et al. Plant regeneration from protoplasts of *Solanum* species with potential agricultural value (*S. hjertingii*, *S. polyadenium*, *S. capsicibaccatum*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 9(9): 520–522.
- [43] Sarkar D, Sud K C, Chzkrabarti S K, et al. Growing of potato microplants in the presence of alginate-silverthiosulfate capsules reduces ethylene-induced culture abnormalities during minimal growth conservation *in vitro* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 68(1): 79–89.
- [44] Aoyagi H. Development of a quantitative method for determination of the optimal conditions for protoplast isolation from cultured plant cells[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(20): 1687–1694.
- [45] 李韬, 戴朝曦. 提高马铃薯原生质体细胞分裂频率的研究[J]. *作物学报*, 2000, 26(6): 953–958.
- [46] 赵小强, 马晖玲, 林栋, 等. 草地早熟禾新格莱德胚性愈伤组织原生质体培养及植株再生的研究[J]. *草业学报*, 2010, 19(2): 55–60.
- [47] 孙雪梅. 马铃薯原生质体培养研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2011(1): 134–136.
- [48] 李炎林, 蔡柳, 胡新喜, 等. 马铃薯原生质体培养与再生技术研究进展[C]//2017年中国马铃薯大会. 毕节: 中国作物协会马铃薯专业委员会, 2017.
- [49] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473–497.
- [50] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells [J]. *Experimental Cell*

- Research,1968,50(1):151-158.
- [51] Kao K N, Michayluk M R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media[J]. *Planta*,1975,126(2):105-110.
- [52] Binding H, Nehls R. Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. [J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1977,85(3):279-280.
- [53] Hulme J S, Higgins E S, Shields R. An efficient genotype - independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1992,31(2):161-167.
- [54] Ovesna J, Burdova I, Krizkova L, et al. Modification of cultivar - specific regeneration capacity of potato explants by phytohormones and by *Agrobacterium oncogenes* [J]. *Biologia Plantarum*, 1993,35(2):199-208.
- [55] Carlberg I, Glimelius K, Eriksson T. Improved culture ability of potato protoplasts by use of activated charcoal [J]. *Plant Cell Reports*, 1983,2(5):223-225.
- [56] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [57] Butenko R, Kuchko A. Somatic hybridizations of *S. tuberosum* and *S. chaciense* by protoplast fusion [C]//Ferenzy L, Farkas G L. *Advance in protoplast research*. Budapest: Akademiai Kiado Press, 1980:293-300.
- [58] Tiwari J K, Devi S, Ali N, et al. Progress in somatic hybridization research in potato during the past 40 years [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2017,132(2):225-238.
- [59] Puite K J, Roest S, Pijnacker L P. Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* [J]. *Plant Cell Reports*, 1986,5(4):262-265.
- [60] 王清, 黄惠英, 李学才, 等. 二倍体马铃薯体细胞电融合的研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2001,36(4):394-399.
- [61] Teruo I. Somatic cell fusion between diploid potato (*Solanum tuberosum*) lines using transformed antibiotic selection markers [J]. *Plant Science*, 1995,112(2):231-238.
- [62] 司怀军, 戴朝曦. 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 [J]. *中国马铃薯*, 1998,12(4):195-199.
- [63] Szczerbakowa A, Maciejewska U, Zimnoch - Guzowska E, et al. Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity [J]. *Plant Cell Reports*, 2003,21(6):577-584.
- [64] 李风云, 蔡兴奎, 盛万民, 等. 马铃薯叶肉原生质体融合创制抗晚疫病新种质 [C]//2016年中国马铃薯大会. 张家口: 中国作物学会马铃薯委员会, 2016.
- [65] 李朋, 蔡兴奎, 陈琳, 等. 马铃薯体细胞杂种后代青枯病抗性鉴定及分子标记检测 [J]. *中国马铃薯*, 2014,28(6):321-327.
- [66] Liu T, Yan Y, Cai X K, et al. Introgression of bacterial wilt resistance from *Solanum melongena* to *S. tuberosum* through asymmetric protoplast fusion [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016,125(3):433-443.
- [67] Helgeson J P, Pohlman J D, Austin S, et al. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato; a new source of resistance to late blight [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998,96(6/7):738-742.
- [68] Rakosy - Tican E, Thieme R, Nachtigall M, et al. The recipient potato cultivar influences the genetic makeup of the somatic hybrids between five potato cultivars and one cloned accession of sexually incompatible species *Solanum bulbocastanum* Dun [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015,122(2):395-407.
- [69] Tiwari J K, Saurabh S, Chandel P, et al. Analysis of genetic and epigenetic changes in potato somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. etuberosum* by AFLP and MSAP markers [J]. *Agricultural Research*, 2015,4(4):339-346.
- [70] Chandel P, Tiwari J K, Ali N, et al. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*, potential sources of late blight resistance breeding [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015,123(3):579-589.
- [71] Fock I I, Collonnier C, Purwito A, et al. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* [J]. *Plant Science*, 2000,160(1):165-176.
- [72] 蔡兴奎, 柳俊, 谢从华. 马铃薯栽培种与野生种叶肉细胞融合及体细胞杂种鉴定 [J]. *园艺学报*, 2004,31(5):623-626.
- [73] Tiwari J K, Chandel P, Singh B P, et al. Analysis of plastome and chondriome genome types in potato somatic hybrids from *Solanum tuberosum* × *Solanum etuberosum* [J]. *Genome*, 2014,57(1):29-35.
- [74] Tiwari J K, Devi S, Chandel P, et al. Organelle genome analysis in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. pinnatisectum* revealed diverse cytoplasm type in potato [J]. *Agricultural Research*, 2016,5(1):22-28.
- [75] Rakosy - Tican E, Aurori A. Green fluorescent protein (GFP) supports the selection based on callus vigorous growth in the somatic hybrids *Solanum tuberosum* L. + *S. chacoense* Bitt [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015,37(10):201.
- [76] Luthra S K, Tiwari J K, Kumar V, et al. Evaluation of interspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum*) and wild *S. cardiophyllum* for adaptability, tuber dry matter, keeping quality and late blight resistance [J]. *Agriculture Research*, 2019,8(2):158-164.
- [77] Smyda - Dajmund P, Śliwka J, Wasilewicz - Flis I, et al. BC1 and F1 progeny from *Solanum* × *michoacanum* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids, autofused 4 × *S. michoacanum* and cultivated potato [J]. *American Journal of Potato Research*, 2017,94(4):323-333.
- [78] Luthra S K, Tiwari J K, Lal M, et al. Breeding potential of potato somatic hybrids: evaluations for adaptability, tuber traits, late blight resistance, keeping quality and backcross (BC1) progenies [J]. *Potato Research*, 2016,59(4):375-391.
- [79] Jadari R, Sihachak D, Rossignol L, et al. Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *Solanum torvum* S. W. into potato

- (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion[J]. *Euphytica*, 1992, 64(1/2): 39–47.
- [80] Austin S, Pohlman J D, Brown C R, et al. Interspecific somatic hybridization between *Solanum tuberosum* L. and *S. bulbocastanum* Dun. as a means of transferring nematode resistance[J]. *American Potato Journal*, 1993, 70(6): 485–495.
- [81] Mcgrath J M, Christie E W, Geraldine T H, et al. Introgression and stabilization of erwinia tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*[J]. *American Journal of Potato Research*, 2002, 79(1): 19–24.
- [82] Ahn Y K, Park T H. Resistance to common scab developed by somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum* [J]. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 2013, 63(7): 595–603.
- [83] Guo X P, Xie C H, Cai X K, et al. Meiotic behavior of pollen mother cells in relation to ploidy level of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. chacoense* [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(11): 1277–1285.
- [84] Laurila J, Metzler M C, Ishimaru C A, et al. Infection of plant material derived from *Solanum acaule* with *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: temperature as a determining factor in immunity of *S. acaule* to bacterial ring rot[J]. *Plant Pathology*, 2003, 52(4): 496–504.
- [85] Yu Y, Ye W, He L, et al. Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(11): 1687–1701.
- [86] Rokka V M V J. Characterization of haploids derived from somatic hybrids between *Solanum brevidens*, *S. Tuberosum* through anther culture[J]. *Plant Science*, 1995, 112(1): 85–95.
- [87] Gillen A M, Richard G N. Molecular characterization of the progeny of *Solanum etuberosum* identifies a genomic region associated with resistance to potato leafroll virus[J]. *Euphytica*, 2007, 155(3): 403–415.
- [88] Nouri – Ellouz O, Gargouri – Bouzid R, Sihachakr D, et al. Production of potato intraspecific somatic hybrids with improved tolerance to PVY and *Pythium aphanidermatum*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163(12): 1321–1332.
- [89] Nouri – Ellouz O, Mohamed A T, Jbir – Koubaa R, et al. Somatic hybrids between potato and *S. berthaultii* show partial resistance to soil – borne fungi and potato virus Y[J]. *Journal of Phytopathology*, 2016, 164(7/8): 485–496.
- [90] Novy R G, Nasruddin A, Ragsdale D W, et al. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y, and green peach aphid in progeny of *Solanum etuberosum* [J]. *American Journal of Potato Research*, 2002, 79(1): 9–18.
- [91] Thieme R, Rakosy – Tican E, Nachtigall M, et al. Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* L. and two commercial potato cultivars [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(10): 1187–1201.
- [92] Jeffrey A D, Radcliffe E B, Christian A T, et al. Resistance to aphids, late blight and viruses in somatic fusions and crosses of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum bulbocastanum* Dun[J]. *American Journal of Potato Research*, 2012, 89(6): 489–500.
- [93] Cooper – Bland S, de Maine J, Fleming M L M H, et al. Synthesis of intraspecific somatic hybrids of *Solanum tuberosum*: assessments of morphological, biochemical and nematode (*Globodera pallida*) resistance characteristics [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1994, 45(9): 1319–1325.
- [94] Chen H H, Li P H. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber – bearing *Solanum species*[J]. *Plant Physiology*, 1980, 65(6): 1146–1148.
- [95] Cardi T, D’Ambrosio E, Consoli D, et al. Production of somatic hybrids between frost – tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 87(1/2): 193–200.
- [96] Nyman M, Waara S. Characterisation of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and its frost – tolerant relative *Solanum commersonii*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(7): 1127–1132.
- [97] Perl A, Aviv D, Galun E. Protoplast – fusion – derived CMS potato cybrids: potential seed – parents for hybrid, true – potato – seeds [J]. *Journal of Heredity*, 1990, 81(6): 438–442.
- [98] Trabelsi S, Gargouri – Bouzid R, Vedel F, et al. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2005, 83: 1–11.
- [99] Bidani A, Nouri – Ellouz O, Lakhoua L, et al. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum berthaultii* and *Solanum tuberosum* L. showed recombinant plastome and improved tolerance to salinity [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2007, 91(3): 179–189.
- [100] Jbir – Koubaa R, Safa C, Ellouz W, et al. Investigation of the response to salinity and to oxidative stress of interspecific potato somatic hybrids grown in a greenhouse[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 120(3): 933–947.
- [101] 任春梅, 杨柳, 缪倩, 等. 小麦黄花叶病毒单克隆抗体的制备及 ACP – ELISA 检测方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(1): 34–40.
- [102] 李秀根, 陈爱地, 王六发, 等. 空间电融合的烟草原生质体再生植株分析[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2007, 33(5): 361–368.
- [103] 康黎, 彭晓君, 陈琳, 等. 马铃薯抗寒种质资源分类及其利用[J]. *中国马铃薯*, 2019, 33(1): 43–50.
- [104] FAOSTAT. FAO statistical databases[DS]. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>.
- [105] Simelton E, Fraser E G, Mette T, et al. The socioeconomics of food crop production and climate change vulnerability: a global scale quantitative analysis of how grain crops are sensitive to drought [J]. *Food Security*, 2012, 4(2): 163–179.
- [106] Beddington J. Food security: contributions from science to a new and greener revolution [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B Biological Sciences*, 2010, 365: 61–71.