

综 述

生物工程技术在马铃薯遗传 育种研究中的应用

戴 朝 曦

(甘肃农业大学 农学系)

2 细胞工程技术的应用*

2.1 马铃薯的原生质体培养

原生质体培养是进行植物遗传操作和细胞融合与杂交的基础,同时也是获得体细胞变异的一个重要来源。自从1960年 Cocking^[20]首次发表由烟草叶片分离原生质体的方法以来,原生质体培养方法经过30年的不断改进,已在生物工程技术研究中得到了广泛应用。马铃薯原生质培养最早的工作始于 Lorenzini (1973)^[31],他用普通栽培种的块茎细胞游离出了原生质体并得到了愈伤组织,但他们都未得到分化苗。1977年, Butenka等^[33]由普通栽培种原生质体分化出了苗,但具有不正常的染色体数。与此同时,美国的 Shepard等^[34]研究出了分离和培养马铃薯原生质体较完善的方法,从一个在美国大面积种植的品种 Russet Burbank 的叶肉细胞游离出了原生质体并得到了一些生长正常的植株。后来,他们的方法经过了部分修改,并为一些研究者采用,多次获得成功。1978年 Binding 等^[35]用与 Shepard 不同的培养基和培养方法,从普通栽培种的一些双单倍体无性系的组织培养苗叶片游离出原生质体,并得到了分化苗。进入80年代

以后,有不少关于对培养方法进行某些改进的报道(参看 Grun 等的评述^[36])。笔者在进行马铃薯原生质体的研究过程中,对这些方法都作过试验,发现它们各有利弊,都不十分完善。针对培养中存在的问题和立足于过程的尽量简化和高效,对培养方法进行了改进,取得了良好效果,多次试验证明具有较高的重复性^[37]。现将近年来马铃薯原生质体培养不同方法的差异以及进行的改进简要地评述如下。

a. 关于游离原生质体所用供体材料的选择 在早期,原生质体培养采用温室生长的幼嫩叶片。这种材料虽然取材容易,可以获得大量质量较好的原生质体,但其最大缺点是污染严重,往往由于不可能排除污染而不能采用。后来人们改用组织培养苗幼嫩叶片或幼嫩茎段。这种方法虽然能排除污染,但需要事先培养大量试管苗,要花费大量的人力和物力,不能连续取材,而且试管苗提供的叶片年龄不一致,有的叶片表面看起来幼嫩,但实际上年龄已老,因而游离出原生质体后,具有分裂能力的细胞并不很多。笔者曾将马铃薯实生籽消毒后在无菌条件下发芽,用刚展开的幼嫩子叶和下胚轴游离原生质体,效果很好。用子叶和下胚轴代替试管苗进行原生质体的游离和培养有以下优点:

①实生籽消毒容易,易获得大量无菌组织,

* (上接本卷第166页)

(2)刚发芽不久的实生苗子叶及下胚轴细胞年幼, 具有较强的分裂能力和成苗的能力, 游离原生质体后能获得较高的植板效率和苗的分化率; (3)能在短期内获得大量同龄组织, 能连续进行试验, 节省人力和物力。其缺点是: 由于现有马铃薯品种的实生籽都是杂结合的, 实生苗个体之间有分离, 因而不能保持原品种的特性, 如果目的在于改良某个品种的个别特性, 则实生苗不宜采用。但是, 如果目的是要通过原生质体培养获得大量变异, 为育种提供材料, 则用实生苗比用无性系的试管苗更能提供丰富的基因和变异个体。近年来, 也有用其他形式的组织或细胞培养原生质体的报道。如: Tavazna 等^[33]用悬浮培养的无叶绿素的叶片细胞, Laine 等^[39]用根尖细胞, Jones 等^[40]用块茎的薄壁细胞等等, 都成功地获得了有分裂能力的原生质体并分化出了苗。采用这些组织或细胞的优点除了取材容易外, 还能得到无色的原生质体, 在与叶肉细胞得来的绿色原生质体融合的时候, 可以作为一种标记性状把融合的细胞分离出来。但是, 在这些组织以及悬浮细胞中存在大量的染色数目变化的细胞, 由它们分化出的苗大多生长不正常, 不如用叶肉细胞和子叶或下胚轴细胞好。

b. 关于游离和纯化原生质体的方法 在有关原生质体培养的报道中, 游离和纯化原生质体的方法有两种主要区别: 一是漂浮法, 二是沉降法。漂浮法以 Shepard 的方法为代表, 在游离和纯化原生质体过程中始终用分子量较大、浮力较大的蔗糖作为渗透压调节剂, 原生质体从游离到洗涤纯化全都处于溶液的表层。根据笔者的经验这种方法的优点是: 可以避免游离原生质体时原生质体因振荡被组织碎片撞击所引起的破裂; 在多次洗涤纯化过程中也不易被离心力挤压而损坏, 以及所用的药剂比较简单、成本较低等。但是, 此法对离心力要求比较严格, 掌

握不好, 原生质体不易漂浮起来, 常常会浪费掉一些好的原生质体。沉降法以 Binding 等为代表, 用分子量较小的甘露醇作为渗透压调节剂, 在洗涤过程中原生质体与破碎细胞一起沉到底部, 最后用高分子量物质如 Percoll 或 Ficoll 等进行漂浮。这种方法的优点是对离心力要求不甚严格, 操作比较简单, 但在游离和清洗过程中易造成原生质体的损坏, 而且最后漂浮纯化原生体所用的药剂 Percoll 或 Ficoll 价格昂贵。此外, 也有少数人采用将高浓度蔗糖 (20% 左右) 加入试管底部的衬垫法, 虽然有利于细胞碎片与原生质体的分离, 但在界面上收集原生质体比较困难, 也容易产生原生质体的浪费和清洗不净等问题。根据笔者的经验, 对于马铃薯原生质体培养以漂浮法较好。用一种特制的细颈离心瓶收集原生质体可避免原生质体的浪费。采用不同的蔗糖浓度和不同的离心速度分次漂浮的方法可减少原生质体的浪费, 效果较好。若在清洗过程中漂浮失败, 也可用沉降法处理。

c. 关于原生质体的培养基和培养方法 马铃薯原生质体培养所用的培养基大多数由 Shepard (1980)^[41]的配方或按 Kao 和 Michayluk (1975)^[42]的 KM 培养基配方经过适当修改而成。所有培养基的共同特点都是不含或只含有少量的 NH_4^+ 离子, 因为铵离子对原生质体有不利作用。这些培养基组成都比较复杂, 如 Shepard 的培养基分为高盐和低盐两种, 在培养时用双层培养法, 十分繁琐; V—KM 培养基中的有机成分十分复杂, 加入了一些氨基酸, 既不经济也不一定有用。笔者在研究中将 Shepard 等的 CL 培养基和 R 培养基综合在一起, 并进行一些修改, 获得了良好结果。事实证明培养基是完全可以简化的, 有些有机添加物并不一定需要, 有些物质加上了反而有害。笔者在进行马铃薯的一些品种和野生种原生质体培养研

究中发现, 原生质体培养初期直到愈伤组织形成的阶段不同基因型对培养的专性选择作用不强, 但在苗分化阶段, 不同基因型表现的差异很大, 对培养基的要求有较强的专化性, 因此, 在分化苗的阶段应多设计和多应用几种不同的培养基, 以满足不同基因型的要求。

在培养方法方面, 不少人用琼脂糖包埋的双层培养法, 把半固体状的琼脂糖在冷到30℃左右时与稀释成一定浓度的原生质体悬浮液混合, 涂布在固体的琼脂培养基表面。实践证明, 这种培养方法比较繁琐, 在琼脂糖包埋和更换培养基的过程中, 很容易破坏原生质体。琼脂糖包埋原生质体后, 空气交换受到影响, 对原生质体生长不利, 更不利于随着原生质体的分裂增殖改变培养基的渗透压。根据笔者的经验, 用液体浅层静止培养的方法能得到满意的率果, 具有较多的优点。当然, 在需要进行单细胞系选择的情况下, 半固体培养方法能把细胞固定起来, 建立起一个个的单细胞系, 不会发生多个细胞系聚集在一起的现象, 这是它比液体培养优越之处。此外, 据Carlberg等 (1983)^[44] 的报道, 用一个内有切有小口的十字形隔板的塑料培养皿, 在相对的两格中加入用半固体琼脂糖包埋的原生质体, 另外相对的两格加入含有1% 活性炭的琼脂固体培养基, 能显著地提高原生质体形成无性系的效率, 培养的时间愈长, 差异愈显著。他们认为, 这可能是由于活性炭能吸收破碎和死亡的原生质体释放出来的有害物质的缘故。在培养的光温条件方面, 据大多数的研究报道以及笔者的经验, 以25℃左右为宜。原生质体培养初期只能用200lux以下的弱光照射, 或黑暗培养, 强光对原生质体细胞壁的形成及分裂不利。

关于马铃薯原生质体单个细胞的分离和培养, 近年来也有研究报道。如 Hunt 和

Helgson (1989)^[45] 在 Kao等^[42] 的KM培养基上进行了修改, 并加入了0.1%~0.2%的脱脂脂肪酸的牛血清, 用多孔培养板, 半固体的琼脂糖包埋培养, 在普通栽培种和野生种 *Solanum cardiophyllum* 中, 均高频率地得到了单细胞无性系和植株分化, 植板效率达37%~75%。

d. 原生质体培养过程中发生的体细胞变异 据Shepard 的报道 (1980)^[41], 他们对来自同一个品种的1700个原生质体无性系中选出的396个无性系进行了两年的田间观察, 发现有许多无性系与原始供体品种“Russet Burbank”在形态和生理上有很大的差异。例如: 在株型方面, 有69个无性系由长节间的松散型变为短节间的紧凑型; 在块茎形态方面, 有不少无性系与原供体品种不同, 有的还表现结薯期早, 由不结实变为多实等。特别有价值的是发现了一些抗早疫病 (*Alternaria solani*) 和抗晚疫病 (*Phytophthora infestans*) 0、1、2、3、4号小种的无性系。此外还发现了一些白化或培养缺陷型突变, 可以作为体细胞融合中的选择标记。Sree Ramulu等 (1984)^[46] 分析了原生质体培养过程中DNA含量及染色体数目的变化。发现, 在原生质体发育早期以及愈伤组织形成和增殖过程中, 不少细胞发生核内复制, 从而引起染色体多倍化或形成非整倍体。他们认为在原生质体培养过程中发生的这种变异虽然本质上与组织培养中发生的体细胞变异相同, 但频率较高, 这可能是由于原生质体培养的早期培养基中有较高的生长素与细胞分裂数比例的缘故。DNA合成和有丝分裂是受一些因子独立地控制的, 有些调节因子能控制由G₁到S期或由G₂到S期生长素和细胞分裂素的组合和配比对于控制DNA合成和有丝分裂起着重要的作用。当DNA合成到有丝分裂这一段失控或者没有连续的细胞分裂时, 核内复

制就可能发生。他们用细胞分光光度计测定原生质体培养早期核 DNA 含量时发现, 游离出的原生质体 DNA 绝大多数均为4C, 培养3~4天后大量细胞 DNA 含量由4C变为8C, 而细胞的第一次分裂恰好发生在这个时期; 培养7~8天后, 除4C和8C外, 还发现有约5%的细胞为16C, 也有一些细胞处于4C~8C之间。近年来还有不少关于原生质体培养过程中发生染色体数目变化的报道, 不再一一列举。

但是, 对于在原生质体培养过程中, 染色体的不稳定性发生在原生质体培养早期的观点也有不同的看法。例如, Fish 和 Karp (1986)^[47]用 Tomas 等 (1982)^[43]曾用过的一个在原生质体培养中染色稳定性很差的品种“Maris Bard”为材料(4x 整倍体仅4%), 将同一次分离的原生质体分别在包括 Thomas 培养基在内的四种具有不同组成和不同激素浓度和配比(有的还加有2, 4-D)的培养基上培养, 但在取材和分化培养基上进行了改进(用试管苗的纯粹叶肉细胞代替茎叶细胞、分化培养基用BAP代替玉米素), 以及采取尽量缩短愈伤组织培养时期, 分化过程在芽原基形成和芽伸长阶段采用不同激素的培养基等措施, 使染色体的稳定性大大提高, 4x 的整倍体率平均达到60%, 此一比率在原生质体培养初期所用的四种培养基之间无显著差异。因此, 他们认为, 原生质体培养早期的培养基组成和激素浓度并不是造成染色体不稳定的原因。造成不稳定性向的主要因素是供体材料的来源和分化培养基中激素的影响。愈伤组织中存在有较复杂的非整倍或超倍数体细胞, 但只要分化培养基适当, 可以起到选择1x 整倍体细胞的作用, 从而使分化苗中的染色体稳定性提高。他们还发现, 在分化培养基上能直接生根, 根系发育快的苗, 80%以上为1x 的整倍体, 而必须转到生根培养基上才能长

根的苗, 绝大多数为超倍数体。若按此进行试管苗选择, 可以更进一步提高4x 整倍体的频率。

原生质体培养过程中发生的体细胞变异除了大多数为染色体数目的变异外, 还有少量的基因突变和染色体结构变异, 这在一些文献中也有报道。原生质体培养中发生的变异与细胞或组织培养中发生的变异一样, 可以为育种提供新的材料, 但同时也形成所谓“背景杂音”, 给定向遗传操作带来干扰和困难。因此, 深入研究发生变异的原因, 找出控制的办法, 这不仅在原生质体培养中, 而且在整个细胞和组织培养中都是十分重要的。

2.2 马铃薯的体细胞融合和杂交

马铃薯体细胞融合和杂交与其它茄科植物相比, 虽然起步较晚, 但进展较快, 特别是近几年来, 有不少关于体细胞融合和杂交成功的报道, 在方法上作了不少改进, 使融合率大大提高。最早获得成功的是 Melchers 等 (1978)^[40], 他们用马铃薯双单倍体的一个叶绿素缺失突变体与番茄的一个变种 *Carasiforme* 进行原生质体融合, 获得了杂种植株。这是一个属间杂种, 称为“马铃薯—番茄”(Pomato) 或“番茄—马铃薯”(Topato)。但是, 所有杂种植株都是畸形的, 既不能结薯, 也不能结番茄, 结实很小, 具有完全的不育性, 染色体数目为50~72, 没有一株是 $2n = 48$ 的异源四倍体。但 DNA 限制性酶切片断和酶的分析表明, 含有两个亲本的成分, 有些杂种含有马铃薯的质体 (Pomatoes), 而另一些含有番茄的质体 (Topatoes)。1982年, Butenko 等^[46]将栽培种的一个品种的原生质体与二倍体野生种 *S. chacoense* ($2n = 24$) 融合, 得到了两种缺乏叶绿素的植株, 一株能正常发育, 但染色体数目为 $2n = 60$ 而不是 72。1982年,

Binding等^[50]用马铃薯普通栽培种的双单倍体与一个能抗除草剂“阿特拉津(atrazine)”的龙葵(*Solanum nigrum*, $2n=72$)进行原生质体融合(这两个种是有性杂交不亲和的,而且抗“阿特拉津”的特性在龙葵中是母性遗传的)获得了融合植株,染色体数目为 $2n=90$,有9个无性系表现两个亲本的特性和有抗“阿特拉津”的能力。1983年Shepard等^[52]用从原生质体培养得来的马铃薯叶绿素缺乏突变体($2n=48$)与番茄($2n=24$)进行体细胞融合,得到了4个植株,它的染色体数目为两个亲本之和($2n=72$),但经过切段繁殖以后,染色体数目发生了变化,有丧失番茄染色体的趋向,在第二无性世代,有的无性系形态趋向马铃薯,有的趋向番茄。1984年,Barsby^[52]等用来自品种“Russet Burbank”的一个白化突变体与不形成块茎的一个野生二倍体种*Solanum brevidens*进行体细胞融合,得到了具有两亲本中间性状的有生活力的绿色植株,染色体数目在72~96之间,花粉败育,只形成无籽果实。1985年, Austin等^[54],成功地将来自野生种*Solanum brevidens*的对马铃薯卷叶病毒(PLRV)的抗性通过融合转移到普通栽培种中。同时,他们还进行了普通栽培种内不同双单倍体品系间的融合试验^[55],获得的再生植株大部分为四倍体,在生活力方面强于亲本,同工酶分析和形态分析都证明是来自品系间的杂种而不是自体融合的产物,这对于克服品系间由于有性杂交的不亲和性引起的种质转移障碍是有实用意义的。Sidorov等(1987)^[56]用由普通栽培和与二倍体*S. phureja*杂交产生的一个二倍体叶绿素缺乏突变系的原生质体与用钴⁶⁰辐射处理过的一个二倍体野生种*Solanum pinnatisectum*的原生质体融合,获得了些对称的和非对称杂种植株,并发现在杂种中有重组的叶绿体DNA,他们认为

用辐射处理过的原生质体进行融合有利于获得野生种部分基因的转移,在远缘体细胞融合中是有用的。Uijtewaal等(1987)^[57]用8个一单倍体进行了融合试验,发现:在用一单倍体进行单独原生质体培养时,只有二倍体和四倍体的再生苗出现;但在用不同品系的一单倍体融合时,除大部分为四倍体外,还有少量三倍体出现,显然一倍体的原生质体也参加了融合。同工酶谱分析表明,四倍体和三倍体大部分都是杂种,但在愈伤组织中却发现有不少愈伤组织存在纯结合体的谱带,并且从分化上看,纯结合细胞系的分化比杂合体落后,说明同质融合体的再生能力比杂合体融合体弱。这一点对于进行马铃薯体细胞杂交极为有利,可以不加任何选择条件获得杂种。此外,他们还发现,一单倍体或双单倍体的温室生长植株的生活力、生长势等方面的表现与原生质体培养过程中一些特性(如植板效率,分化能力,分化苗的生活力和长势等)并无明显的相关性。因此认为,无法从供体植株的表现预测其在原生质体培养或细胞融合中的效果。Deimling等(1988)^[58]用11个具有利用价值农艺性状的双单倍体(包括种间杂种,由一单倍体加倍得来的纯种和由离体培养中选出的一个抗镰刀菌或晚疫病毒毒素的品系)、2个四倍体和一个用农杆菌转化的抗潮霉素(hygromycin)的品系,进行了大量的融合试验,由15个不同组合获得了6009个再生植株,在 $(2x)+(2x)$ 的融合中得到了10%以上的杂合体。他们也发现杂合体的生活力以及植株形态和块茎产量方面都显然不同于同质融合或未融合的再生植株,很容易鉴别,因此认为在马铃薯体细胞杂交实践中,无需采用特别的选择杂种的方法,甚至同工酶谱的分析也可以省略,块茎产量是最好的选择指标。这些表现为在实践中利用体细胞融合和杂交技术提供了十分有利的条件,使前述的

“分解—综合育种”方案在马铃薯育种中实际应用成为可能。

在融合方法方面,除了用PEG的化学融合法外,自从80年代初发现电场能促进原生质体融合以来,经过一些技术改进,现在电融合技术已开始 in 植物体细胞融合中应用。研究表明,原生质体在高频交变电场中细胞表面会发生电极化,形成偶极子,在非均匀电场中细胞沿着电力线方向朝电场强度高的方向移动,形成念珠排列并相互接触。如果紧接着施加瞬时高压直流电脉冲,则原生质膜会在面向电极的区域发生瞬时的破裂,从而导致相互接触的原生质体间产生融合。电融合方法具有操作简便、效率高、易控制和同步性较好等特点,因而受到人们的重视。近年来,在马铃薯体细胞融合中也有一些关于电融合的研究报道。例如,1986年,Putte等^[50]在150伏/厘米的交变电场下,用1.2~2千伏/厘米,50微秒的直流电脉冲,使普通栽培种双单倍体与二倍体种*S. phureja*发生了体细胞融合,得到了18个

真正的杂种植株。1987年De Vries和Tempelaar^[60]用1兆和100~200伏/厘米场强的交变电场和1~3千伏/厘米,10~500微秒的脉冲,用几个抗氨基酸类似物的双单倍体品系作材料,也得到了融合的体细胞杂种。1988年,Fish等^[61]用100伏/厘米、1兆赫电场和1.25~1.50千伏/厘米,10微秒的方形脉冲,以及脉冲后在20秒钟内使电场逐渐降至零的方法,用普通栽培种的双单倍体与二倍体野生种*S. brevidens*进行了较大规模的电融合试验,总融合率达到20%~30%,得到了大量的愈伤组织和分化苗,形态及同工酶鉴定证明,21株是真正的杂种并得到了一些四倍体植株。今后随着方法和技术的不断改进,这种方法将会愈来愈多地在体细胞融合中应用。

马铃薯体细胞融合的研究虽然起步较晚,但进展是比较快的,现已从理论研究阶段进入实际应用阶段,已开始有育种实践中发挥作用。

(待续)

(上接242页)

地区仍然是必要的。马铃薯实生种子可在当地生产,也可以向某些亚洲国家购买。

延长栽培季节,增加种植面积。南太平洋国家一般栽培季节都在6~9月。而巴布亚新几内亚和西萨摩亚只有一小部分地区在其它时间栽种。

这种一季作物在收获时期出现马铃薯过剩而更严重的是在其余的季节里却缺少马铃薯。利富岛和塔纳岛在生长季节外的12月16日播种,每公顷产量分别可达到29吨和27吨。这说明良好的农业措施,特别是培土和良种的应用,能获得高产。斐济目前大面积种植的甘蔗(有轻微青枯病)能与马铃薯间作,至少能充分供应马铃薯4~6个月。

如上述生长季前后播种马铃薯取决于良种的供应,这种生产方法需要进一步发展。斐济、汤加和新喀里多尼亚具有很大的生产潜力,因为销路、土壤和良好的贮存设施,使他们能够利用现有技术迅速扩大马铃薯生产。巴布亚新几内亚和瓦努阿图生产的基本条件差影响了马铃薯生产。西萨摩亚和库克群岛的马铃薯青枯病(BV)问题不易解决,索罗门群岛的相对繁荣给那里的马铃薯生产以小小的刺激。法属玻里尼西亞有一个有力的发展马铃薯生产的计划,该计划甚至在有马铃薯青枯病的情况下正在收到成功。值得其它国家借鉴。

周士杰译自《World crops》(1986.6)

陈毅行校