

马铃薯的分子生物学

发展中国家的现状及未来展望

Jehn H. Dodds

1 马铃薯在发展中国家的重要地位

马铃薯在工业国家中一直被认为是一大作物,而在发展中国家则是小作物。然而,目前发展中国家生产的马铃薯已占世界总产量的1/3。1950年后,发展中国家的马铃薯单产增加了一倍,总产增加了两倍。马铃薯产量的增长超过大多数其它粮食作物,在非洲、亚洲、中美洲和加勒比海增长更快。从价值观念看,马铃薯是发展中国家的第4大粮食作物,仅次于水稻、小麦和玉米。虽然有如此快的增长,发展中国家的马铃薯人均产量仍低于30公斤,其中2/3供食用。由于大多数发展中国家的马铃薯人均消费量仍低于20公斤,增加消费仍大有潜力。西欧的人均消费量为80公斤。

2 可用于马铃薯范畴的生物技术

组织培养和快速繁殖技术在马铃薯生产中的应用,在发达国家和发展中国家都越来越普遍。虽然快繁包括许多迅速增加繁殖体数量的方法,但组织培养技术不仅可广泛应用于提高繁殖速度,而且可以改变种质本身,重要的是组织培养不应理解为一种科学训练方法,而是一系列技术。这些形成一个完整的技术体系的各种技术的复杂程度各

不同。在农业应用方面,其最重要的特点就是综合应用这些技术最大限度地促进马铃薯的生产。

3 组织培养技术

多年来通过微繁、脱毒和种质保存,组织培养一直被应用于促进马铃薯生产。但是有些技术还在不断地改进和提高。一些中档的技术如试管薯诱导、胚培养和花药培养已经对种质资源的分布和改良产生了直接的作用。最复杂的技术如遗传工程和原生质体融合对于提高马铃薯产量有巨大的潜力,但是必须重视将潜力变为现实。本文将分析有关促进马铃薯生产的各种技术。

4 生物技术在改进种质资源、种质贮藏和种薯生产计划发展中的作用

4.1 种质资源的离体保存

马铃薯种质资源的离体保存有如下几种组织培养的方法: (1) 使用生长抑制剂; (2) 低温培养; (3) 超低温保存。

离体保存比田间保存有诸多优点。材料可以整年提供,不受环境影响和病害侵袭,要在不同地点生产多份复制材料也较容易。

a. 生长抑制剂的应用 用很多化学生长抑制剂在离体繁殖的马铃薯小苗上进行了试验。目的是用这些化学药品降低离体小苗的生长速度, 延长继代培养的周期。

马来酰肼 (MH) 已被证明, 可以促使马铃薯品种 British Queen (*Solanum tuberosum*) 的试管苗茎段结薯。二氨基唑 (B_{905}) 通常被广泛用于象菊花和杜鹃花这样的观赏植物, 进行叶面喷施。但是 Humphries 和 Dyson (1967) 报道, 在品种 Majestic (*S. tuberosum*) 植株上喷施 B_{905} , 不但可抑制植株生长, 还能使结薯提高 10%。酚类化合物如反式肉桂酸 (TCA) 可以促进茎切段离体结薯。脱落酸 (ABA) 存在于马铃薯块茎中, 参与控制休眠, 因而亦被用作天然的生长抑制剂。

通过加入非代谢活性物质甘露糖醇, 提高培养基的渗透压, 也能抑制生长。提高渗透压可有效地减少培养物所需的水分。同样, 限制可获得的碳源, 一般是蔗糖, 可以对生长速度产生明显影响。提高培养基中蔗糖浓度到 8% (W/V), 可以有效地抑制生长, 但是在贮藏 6 个月以后出现死亡率的问题。尽管如此, 这些添加物的应用可有效地调节试管苗的生长。

b. 降低培养温度调节生长 植物的生长过程受很多调节酶的控制。每一种酶都有其生化作用的最适温度, 从而导致植物生长也需要有一最适温度。植物在显著高于或低于此温度条件离体保存时, 其生长就受到限制。但是要注意给予植物的温度条件不能超感太多, 如果温度低于 3℃, 霜害会杀伤植株, 温度高于 28℃, 便会造成热胁迫。在两个温度区间内, 植物就能够生存和生长。温度低于 6℃, 继代培养变化的周期就会明显缩短。迄今看来, 6℃能保持马铃薯试管苗的高活力, 但又是抑制其生长最适温度。

c. 种质资源的超低温保存 虽然进行了在 0℃ ~ -12℃ 保存材料的试验, 但成功率有限。不过在极低温度 (-196℃) 下利用超低温保存技术保存种质取得某些成功。Withers (1980) 的综述讨论了植物细胞、组织和培养物超低温保存的情况。因此, 这里只谈谈超低温保存的基本原理和方法。

要成功地超低温保存某种植物组织, 需要防止该组织各个细胞中冰晶的形成对细胞造成的伤害, 或将其减少到最低程度。可采用 2 种基本冷冻法: 超速冷冻和慢速 (或逐步) 冷冻。快速冷冻时在细胞中形成微小的冰晶, 不破坏内部细胞器和细胞膜。但必须快速解冻以防再结晶。Hensharn (1975) 报道了用此法成功地对马铃薯茎尖进行了冷冻保存。慢速冷冻或逐步冷冻已应用于很多组织培养系统, 但必须进行细胞外冷冻以防破坏细胞。当细胞冷却时, 周围的液体由于形成冰核, 而最终冻结。然而胞内流体此时尚不会结冰, 因此, 由于细胞外结冰造成的水汽压亏缺而引起细胞脱水。这样就促使细胞内溶质浓集, 进一步降低了细胞内容的冰点。这种细胞内水分逐渐损失的过程称为“保护性脱水”, 它可以有效地防止胞质或液泡结冰。这个过程的机理可能与温带多年生植物的耐寒性相似。但是, 至今冷冻保存马铃薯种质资源的成活率一般较低, 而且是否带来遗传上的破坏还不清楚。到目前为止, 还没有哪个研究机构用此法作为保存种质的标准方法。相反, 很多单位目前都采用生长抑制剂和降低培养温度两种方法来保存种质资源。

4.2 脱毒

分生组织培养结合热处理和化学处理, 多年来是马铃薯种薯计划中的一个重要组成部分。利用该技术生产无病原的植株, 提高了商品产量, 脱除了病毒感染, 方便了种质

交换。这种做法也对检疫制度有利。脱毒项目的建立极大地促进了马铃薯种质资源在国际间的分布, 从而也间接地促进了马铃薯生产。Wright (1988) 对热处理和分生组织培养的技术问题进行了十分详尽的综述。有几个研究单位正在进行试验以求简化脱毒(特别是病毒)的程序。在培养基中加入各种抗病毒药物和对试管苗进行热处理应该能更有效地脱除病原。

4.3 离体微繁殖

很多种薯项目用经过离体病原鉴定的小苗作为基础材料。项目的初期阶段根据规模和地点进行不同数量的离体微繁。大多数单位所采用的基本方法类似, 都是在液体或固体培养基上用单节切段或多节茎段进行快繁。现将国际马铃薯中心(CIP)及很多其它单位采取的基本微繁方法叙述于下。

a. 单节切段培养 从试管小苗上切下带叶单节。有些基因型的大叶片, 需要仔细去掉, 以使新生芽生长均匀一致。如果单节切段上保留了大叶片, 逐渐老化的叶片产生的激素据信会抑制新生芽的生长。然后每个节都放到琼脂固体培养基表面进行培养。很快就长出腋芽, 3~4周后每个长出6~7个节的小植株可用于继代培养。

b. 试管结薯 近年来, 很多国家对在离体条件下诱导马铃薯块茎感兴趣。可用几种方法诱导。国际马铃薯中心的方法快速、经济、有效, 即在液体快繁培养基中加入苄胺基嘌呤(BAP), 矮壮素(CCC)和蔗糖。这种方法不但快速有效而且适合于许多基因型。

试管薯一般有2种用途: 一是在国内或国际间分发种质资源, 二是用于快繁。在国际马铃薯中心, 用试管薯便于种质资源分发。由于试管薯是在离体条件下从无病原的试管苗上产生的, 容易符合国际检疫的要

求。与试管苗不同, 如果试管薯包裹, 在运送过程中被耽搁, 材料也不容易受损失。但是, 生产试管薯的费用远高于试管苗。因此, 国际马铃薯中心在某些运输通常会拖延的地方用试管薯分发种质。

在种薯计划中也应进行单位费用分析。试管薯虽有诸多优点, 但要根据费用或效益分析, 谨慎选定使用地点。例如, 在整年都可以进行试管苗移栽的地方, 生产试管薯就没有意义。

5 基因鉴定和基因转移改良马铃薯应用分子生物学方法通过

5.1 遗传工程

CIP与路易斯安那州立大学生化系合作开展用基因工程将合成基因导入马铃薯植株的研究。该项目中所使用的土壤杆菌胞质基因媒体已被世界上很多研究小组使用, 如欧洲、美国、巴西、墨西哥和印度的一些实验室。项目的主要目标是增强马铃薯的抗病性, 更重要的是通过额外生产一种富含主要氨基酸的合成蛋白以提高马铃薯的营养价值, 解决这种蛋白密码的新基因已由路易斯安那州立大学在体外合成。

将合成基因导入马铃薯植株中的合作研究已经取得成功。迄今为止的证据表明, 该基因经转录产生了预想大小的信使RNA(mRNA), 并在体内翻译生成这种合成蛋白。这个合成基因项目及其它的一些研究项目已表明, 从遗传学角度来看, 基因导入马铃薯的技术已经问世。但是, 这些受遗传控制的植株能被用于国家的马铃薯计划还需要更深入的研究, 而且还要有适当的国际性措施。

在合成蛋白基因项目取得成功的基础上, CIP又致力于应用遗传工程使马铃薯产生病虫害抗性的研究。通过这些合作网,

CIP 想通过导入干扰病毒和类病毒复制物的基因序列, 以期从遗传上控制马铃薯植株对病毒和类病毒感染的抗性。这种方法可使种薯在退化前能在大田种植更多的世代。

在遗传上抗细菌病害, 如青枯菌和软腐菌亚种方面也正在开展合作研究, 在这些试验中, 使用的基因为纯化的, 并可用已知的抗细菌活性 (potent antibacterial activity) 为蛋白翻译密码。一种抗细菌病害的基因工程可以使我们得到抗软腐菌和青枯菌的马铃薯无性系, 而无需改变其现有的优良农艺性状。

5.2 基因鉴定

基因型的鉴定一直到最近都是根据形态分析, 结合可溶性蛋白的平板电泳分析和同工酶分析。真正分析的是基因的产品而不是基因本身。分子生物学的最新进展导致一种技术的产生, 即可以在特定位点对 DNA 序列进行切割以便建立遗传图谱。这种技术是在具有这些限制性核酸内切酶切割位点的条件下, 借助多型性鉴定而产生的, 这样每个品种可以得到完全不同的 DNA 片段。这种方法称为限制性切片长度多型性 (RFLP) 分析。RFLP 但不可以用来分析基因型之间的分类关系, 而且可以将性状定位到植物染色体上。这种已被应用到马铃薯上以确定特定抗性基因 (如 PVX 和 PVY 抗性) 的位点。进行远缘杂交即栽培种 × 野生种时, RFLP 不但可以表明野生种传递到后代的染色体的量, 而且可以作为寻找特定抗性的筛选工具。

使用番茄的 DNA 探针进行 RFLP 分析, 已将大约 140 个位点标定在所有的 12 条染色体上。而用传统的遗传技术则很难对马

铃薯的基因组进行遗传图谱分析。以后还需一致努力标定更多的位点, 多方面扩宽对茄属种 (包括栽培种和野生种) 的探测和分析。

6 国际马铃薯中心生物技术研究网络

要启动和维持实验室从事更为高级的生物技术研究, 如基因合成, 遗传转化和 RFLP 分析, 通常超出任何一个国家的马铃薯项目的经济能力。国际研究中心也必须对生物技术远景与其它活动进行权衡。在 CIP 已通过合作研究网络的形式开拓生物技术的更为复杂的领域。很多发达或发展中国家的实验室都在开展某些方面的生物技术专门研究, 所需经费比较少, 可从国际农业研究中心或国家项目得到资助。这样的合作研究, 不仅可以得到一系列的专门知识, 而且其经济效益也高。例如, CIP 通过一个成本仅为 6 万美元的合同就得到 30 个以上的构建基因。

7 技术转化过程

有了“高级”的生物技术, 即 RFLP 基因图谱制作或遗传转化研究, 还必须考虑到技术转化过程。在很多情况下, 技术本身可能不适合于向发展中国家项目转移, 但是技术成果, 如改良种质的分发, 会大大有利于国家计划, 特别是发展中国家的国家项目更能受益。

王春林节译自《The Molecular and Cellular Biology of the Potato》

陈毅行校