

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)

马铃薯无论在我国或者是世界上都是一种重要的农作物, 据联合国的统计资料, 全世界1987年的种植面积约1817万公顷, 总产量约28500万吨, 我国的种植面积为258.9万公顷, 占全世界的14.2%, 居第二位, 总产量为2668万吨, 占9.4%, 居第三位。我省马铃薯近年来的种植面积保持在28.67万公顷左右, 居全国第二位, 为仅次于小麦和玉米的第三大作物。马铃薯具有丰富的营养, 又是唯一的粮菜兼用型作物, 再加上它的单位面积的产能量很高, 在轮作倒茬中又是良

好的茬口, 因而它在农业生产和人民生活中均占有极重要地位。今后, 随着马铃薯加工业的发展, 它的种植面积还将逐步扩大。当前影响马铃薯生产发展的主要因素是品种问题, 而影响品种选育和良种推广的因素主要有以下几方面: 一是由于马铃薯普通栽培种基因库贫乏, 现有基因库几乎已经用尽, 特别缺乏抗病和抗逆性基因, 而常规的品种间杂交育种只能产生新的组合而不能创造新的基因, 所以, 目前用常规方法已很难选育出高水平的新品种, 特别是在抗病和抗逆性育

施磷肥对马铃薯生育期可延长2~3天, 对增产很有利。

3 结 语

马铃薯现蕾初期, 每亩追施过磷酸钙

15公斤, 可增产171~251公斤马铃薯, 折合人民币34.2~50.2元, 扣除磷肥及人工工资7.5元, 亩净收入26.7~42.7元, 不仅是马铃薯的一项简而易行的增产措施, 而且能缓解磷肥季节性供求矛盾。

表3 马铃薯不同生育时期追施磷肥对地上和地下部产量的影响

处 理	茎 叶 重 (克/穴)	块 茎 重 (克/穴)	生物学产量 (克/穴)	经济系数
出 苗 期 追 磷 肥	284	400	684	0.585
现蕾初期追磷肥	359	423	782	0.541
现花初期追磷肥	305	405	710	0.57
苗、蕾、花期追磷肥	327	413	740	0.558
不 追 磷 肥 (CK)	230	355	585	0.607

种方面更显得无能力,不能满足生产发展的需要;另一个因素是由于病毒通过无性繁殖逐代积累而产生的品种迅速退化,给良种的普及和推广工作带来很大困难,使马铃薯成为目前品种最混乱,种子最混杂的一种农作物,严重地影响了产量的提高;第三个因素是由于马铃薯是一个同源四倍体,每个位点的基因都有4个成员,遗传分离复杂,隐性基因表现的频率比二倍体低得多,因此,杂种后代需要种植比二倍体植物更大的群体,而马铃薯又是大株行距作物,不可能满足种植大群体的要求,因而马铃薯建立在四倍体水平上的常规育种效率较低。本世纪70年代发展起来的生物工程技术为解决这些问题提供了可能。本文将简要介绍生物工程技术在马铃薯遗传育种研究中应用的国内外现状以及我们自己的一些研究结果,并对这些技术在马铃薯育种中的应用前景进行一定的评述。

1 染色体工程技术(倍性操作)的应用

如上所述,马铃薯建立在四倍体水平上的常规育种方法效率较低,为了解决这一问题,早在1963年,Chase^[1]就曾经提出过将四倍体降为二倍体,先在二倍体水平上进行选育、杂交和选择,然后再经过染色体加倍,使杂种恢复到四倍体水平的所谓“分解育种法”(Analytical breeding),这种方法有两个主要的技术关键:一是从四倍体普通栽培种高频率地诱导出大量的双单倍体(dihaploid, $2n = 2x = 24$);二是高频率地将双单倍体产生的二倍体杂种染色体加倍为四倍体。这两个技术关键在过去是无法解决

的,因此当时只是一种理论分析,不可能在育种实践中应用。随着生物工程技术的发展,为解决这两个技术关键提供了可能。1979年Wenzel等^[2]进一步提出了综合常规育种与生物工程技术的较完善的“分解—综合育种方案”(Analytic—synthetic breeding)。以下将要简要介绍用生物工程技术解决这些技术关键的情况。

1.1 用生物工程技术诱导双单倍体和一单倍体的研究

由四倍体栽培种诱导产生的双单倍体($2n = 2x = 24$)不仅在“分解—综合育种法”中,对于提高育种效率有重要意义,而且在引进野生种质的优良基因方面也具有重要作用。马铃薯家族中有数百个近缘野生种,是一个巨大的基因库,有许多有利用价值的基因(如抗病、抗寒、抗虫、高蛋白、高淀粉等),对于进一步提高马铃薯育种的水平极为有用。但是,马铃薯野生种74%左右都是二倍体,它们很难与四倍体普通栽培种杂交。过去多采用先将二倍体野生种加倍成四倍体然后再与四倍体栽培种杂交的方法,但实践证明效果并不好,即使杂交成功也仍然是建立在四倍体水平上的,选育效率不高。大量试验证明,如果先将四倍体普通栽培种降为二倍体,培育出的双单倍体则很容易与二倍体野生种杂交。在二倍体水平上对杂种先进行选择,然后再加倍成四倍体,效果是比较好的,育种效率可大大提高。近年来,我们的试验也充分地证明了这一点。此外,由双单倍体还可以进一步诱导出一单倍体(monohaploid, $2n = x = 12$),再通过加倍可以获得纯结合的二倍体或四倍体,它们是选育不分离实生籽的基础,也是研究马铃薯遗传良好的材料。不分离实生籽在防止品种退化,解决就地留种问题和利用杂种优势进一步提高马铃薯产量等方面有十分重要的意

此文因篇幅较长,我们分期连续发表,请读者注意收集整理。——编者

义。培育双单倍体和一单倍体有以下两种途径:

a. 孤雌生殖途径 早在1939年 Ivanovskaja^[3] 就曾发现在用一个二倍体种 *Solanum phureja* 与四倍体栽培种授粉时, 杂种后代出现了双单倍体植株, 但是一直未引起人们的重视和应用。直到1958年, 经过 Houghs 和 Poloquin 等人^[4] 的深入研究之后才引起了人们的重视并开始在遗传育种研究中应用。经过多年的选择, 现已选出了一批高频率的诱导品系, 如 IVP35、IVP48 和 PI225628·1.1, PI225628·1.3 和 PI225628·1.22等, 使双倍体的诱导频率大大提高, 最高的可达到每100个浆果产生993个双单倍体植株。近年来又给诱导品系引入了在种子胚的部位的粉红色斑点显性基因, 可以根据授粉后产生的种子是否有此粉红色胚点而区分出其是否是双单倍体(无胚点者为双单倍体)。目前, 国外有许多研究单位主要采用此法诱导双单倍体。1977年 Van Breukelen 等^[5] 又用此法由双单倍体诱导出了一单倍体。但是, 这种方法在实践应用中存在着一些缺点, 如授粉和结实受外界条件的影响较大, 不少品种不易结实或座果, 诱导频率在不同基因型之间差异很大以及父、母本间的花期不遇等。特别是由双单倍体诱导一单倍体, 其诱导频率是比较低的, 难度更大。

近年来, 有人试图用未受粉的子房或胚珠离体培养的方法, 人工诱导孤雌生殖产生双单倍体, 但成功率很低, 目前只有中国科学院遗传研究所祝仲纯所领导的小组报道用花粉处于单核期的未受粉子房进行培养的方法, 由两个品种所产生的愈伤组织中分化出了26株双单倍体植株^[6]。离体培养的方法可以克服在植株上诱导孤雌生殖的一些缺点, 今后值得进行深入的研究, 以提高诱导频率。

b. 孤雄生殖途径 利用花药培养的方法,

人工诱导孤雄生殖现已成为获得单倍体的重要方法, 已在许多种植物中取得成功。马铃薯四倍体栽培种的花药培养虽然1973年 Dunwell^[7] 等就有获得成功的报道, 但只从一个品种中得到了一株双单倍体植株。以后虽然陆续有一些报道, 但大多是用二倍体或野生种作的, 用普通栽培种的诱导频率一直很低。直到目前为止, 由栽培种诱导双单倍体获得成功的仍限于少数基因型(见 Sopory 等和 Uring 等的评述)^[11,12]。自1977年 Foroghi-Wehr 等^[10] 用花药培养法由双单倍体诱导出一倍体以来, 经过一系列研究发现, 不少双单倍体品系能大量地由胚状体直接成苗, 产生出一单倍体, 不经过愈伤组织阶段, 因而目前国外在马铃薯花药培养方面的研究大多集中在由双单倍体诱导一单倍体方面, 用四倍体栽培种作的研究很少。我国马铃薯花药培养起步较晚, 只有少数几个单位在进行, 直到目前为止, 只获得了极少量的双单倍体植株。我们从1980年开始对四倍体栽培种的花药培养进行大量的研究, 在培养基和培养方面进行了许多改进, 取得了较大进展^[11,13]。从许多不同基因型的品种或品系中诱导出了大量的双单倍体植株, 现已从中选育出了百余个具有不同特点的优良品系, 正在育种方案中利用^[14]。此外我们还从一些双单倍体品系中诱导出了一单倍体植株, 特别是从一个雄性不育的双单倍体品系诱导出了一些一单倍体植株, 这在世界上还属首次(待发表)。这些一单倍体品系在植株性状、生育期和生活力等方面差异很大, 大部分生活力较弱, 但也有少数生活力较强, 丰产性及抗病性均较好的一单倍体品系, 现正在对其进行染色体加倍和利用。在四倍体马铃薯的花药培养中, 过去国内外的报道大多是由愈伤组织分化成苗, 分化出的植株染色体数目变化很大, 不能保证倍性的稳定性。我们经过对培养基和培养方法等多

方面的改进, 做到了大部分由胚状体直接成苗, 避免了上述缺点, 使分化出的苗能保证绝大多数成为双单倍体或一单倍体, 这在马铃薯染色体工程的倍性操作中是十分重要的。

在花粉粒分离培养方面, 尽管目前已在烟草、曼陀罗、矮牵牛、甘蓝等植物中获得成功, 但在马铃薯中研究很少, 难度较大, 只发育到多细胞团、球形胚或心脏形胚的阶段^[15, 16]。直到目前为止, 还未见到有成苗的报道。

1.2 染色体加倍技术的研究

染色体加倍是染色体倍性操作和“分解—综合育种法”以及利用双单倍体进行远缘杂交的重要环节。早期的工作都是用秋水仙素处理马铃薯植株的分生组织部位或处理幼苗生长点的常规方法进行的。例如, 早在1939年 Johnstone^[17]就曾用0.15%和0.5%的秋水仙素溶液浸泡种子, 得到了少量加倍植株; Frandsen (1967)^[18]用0.25%秋水仙素处理双单倍体的种子1~2周, 得到了38.7%~39.5%加倍的植株。种子处理方法虽然简单, 且有一定效果, 但大部分双单倍体是自交不亲和的或是雄性不育的, 不能结种子, 不可能采用种子处理的方法进行加倍, 必须采用无性系加倍的方法。但是, 前人的研究以及我们的试验都表明, 用秋水仙素的水溶液或羊毛脂软膏处理芽眼或腋芽, 以及用秋水仙素溶液浸泡试管苗切段都不能得到加倍植株。1967年 Ross等^[18]采用次生腋芽加倍法, 先将温室内嫁接在番茄上的马铃薯植株的腋芽切去, 再用浸有秋水仙素的棉球包裹切口, 当次生腋芽长出后, 得到了一些加倍的植株。以上这些加倍方法不仅费工、费时, 而且效果都很差, 所获得的加倍植株绝大多数还都是倍性嵌合体, 不能在实践中应用。

自从组织培养技术大量被研究以来, 人们发现, 在愈伤组织的培养过程中, 常常会由于有丝分裂反常而发生染色体的核内复制, 产生出加倍的细胞和个体。因此, 这一方法近年来已受到马铃薯研究者的广泛重视。例如, 据 Jacobsen (1978) 报道^[20], 用叶片愈伤组织由5个双单倍体基因型得到了26%~90%加倍的植株, 而且没有一株是嵌合体。Hermesen等 (1981)^[21]也报道, 从 *S. phureja* 和栽培种双单倍体产生的二倍体杂种的叶片愈伤组织中产生出了83.9%完全的四倍体植株。并且认为, 双单倍体或一单倍体愈伤组织有染色体自然加倍成四倍体的趋向。笔者认为, 这种趋向很可能是由于加倍了的四倍体细胞有较强的生活力, 在培养过程中, 在与不同倍性细胞的竞争时, 容易占优势的缘故。此外, 许多研究表明, 由愈伤组织分化形成的不定芽是由单细胞发育而成的, 因此得到的加倍植株与秋水仙素处理的效果不同, 不会产生嵌合体, 这也是用组织培养法加倍的另一大优点。我们的试验也表明, 用试管苗的叶片或茎段诱导不定芽的形成高频率地实现加倍, 育的无性系加倍率高达90%, 而且用茎段诱导不定芽的加倍效果最好, 延长愈伤组织培养的时间对于提高加倍频率是比较有利的 (待发表)。

1.3 减数分裂突变及其在马铃薯育种中的应用

早在1931年 Bleier^[22]就曾发现, 在马铃薯中有未减数的 $2n$ 配子产生。Chanse (1963)^[11]在他的“分解育种方案”中曾指出了 $2n$ 配子在由二倍体产生四倍体杂种中的重要作用。自从60年代初, 美国 Peloquin^[23, 26]领导的研究组对 $2n$ 配子突变及其在杂种后代中表现进行了大量的研究, 并得到了具有较强杂交优势的四倍体后代以来, $2n$ 配子的研究受到了马铃薯育种界的广泛注

意和重视。他们在研究了 $2n$ 配子材料的表现和应用的同时, 对 $2n$ 配子形成的机制也进行了研究。据 Mok 和 Peloquin 等人的研究和见解^[27], $2n$ 配子有三个不同的形式和机制, 产生出两种不同的效果, 即: ①由于中期 II 形成平行纺锤体 (parallax spindle) 代替了成 60° 夹角的正常纺锤体, 平行纺锤体使后期 II 染色体只走向两极而不是四极, 因而形成一个二分子而不是四分子。二分子所产生的两个子细胞分离后的染色单体又进入到同一细胞, 无基因分离, 好像第一次分裂时同源染色体分离后又再次组合在一起一样, 故将此种机制称为第一次分裂再组 (First Division Restitution, 简称 FDR); ②发生在末期 I 的提前成熟胞质分裂 1 (premature cytokinesis 1); ③发生在前期 II 的提前成熟胞质分裂 2。这后两种机制效果相同, 都是由于胞质分裂与染色体分离的不同步, 形成了二分子, 从而使染色体加倍产生 $2n$ 配子的。这后两种机制产生的 $2n$ 配子有基因分离, 都是发生在第二次分裂, 称为“第二次分裂再组” (Second Division Restitution 简称 SDR)。Ramanna (1979)^[23] 对 FDR $2n$ 配子形成的机制提出了不同的看法, 他认为不是由平行纺锤体形成的, 而是由于中期 II 两个纺锤体融合, 然后走向两极形成的。因为他发现, 产生中期 II 融合的细胞频率与 $2n$ 配子频率密切相关, 而平行纺锤体是马铃薯中普遍存在的现象。FDR 所形成的 $2n$ 配子遗传组成与亲本的细胞相同, 无基因分离, 因而在马铃薯育种中具有重要意义。

$2n$ 配子不仅可以在雄配子中发生, 在雌配子也可发生, 现在国外已选出一些能产生 $2n$ 花粉和 $2n$ 卵的品系。 $2n$ 配子的重要意义在于能实现有性多倍化, 在“分解—综合育种”方案中占有重要地位。此外, $2n$ 配子在实生薯的利用和防止品种退化方面也有重要

意义。马铃薯品种的迅速退化是由于病毒感染并通过无性繁殖逐代积累病毒而引起的。现在, 国外有些国家以及我国一些省(市、区)试图用茎尖分生组织培养脱毒以生产无毒种薯的办法解决大面积生产用种和防退化的问题。但是, 实践证明, 此法成本高, 种薯的大调大运需要消耗大量的能源和动用大量的运输工具, 再加上隔离区的建立十分困难, 种薯在调运中因机械损伤而引起的大量窖藏腐烂, 因而很难在大面积上推广应用, 特别是在我国和发展中国家更难推广应用。大量研究表明, 绝大部分的病毒都不能通过有性繁殖产生, 马铃薯实生籽传播, 由实生苗产生的实生薯也基本上是无毒的。此外, 实生薯是有性繁殖的后代, 生活力一般均较强, 可以维持几个无性世代的优势。所以在生产上采用实生薯留种的方法能有效地防止品种退化和大大降低生产成本。但是, 由于现有的马铃薯品种都是杂种的无性系, 所以无论是由杂交或自交得来的实生籽都会发生遗传上的分离, 使实生薯的产量和品质得不到保证。遗传学理论指出, 要使有性繁殖的种后代不发生分离一般有两途径: 一是用纯种, 一是用由纯种亲本产生的 F_1 。但实践证明, 马铃薯的纯合四倍体产量很低, 不能在生产中应用, 只能用 F_1 代杂种。获得不分离的 F_1 代的前提是必须选有纯合的四倍体亲本。马铃薯是同源四倍体, 遗传分离复杂, 用常规自交的方法生产自交系不仅需要很长的时间, 而且常常由于自交退化不能开花使自交无法进行。有不少品种还存在自交不亲和性的问题。所以, 用常规方法培育马铃薯自交系是不可能的。生物工程技术使培育马铃薯纯系成为可能, 这可以通过一倍体的两次染色加倍来实现, 只需几代就能培育出来。利用 F_1 代的杂种优势, 虽然可以获得较高的产量, 但基因杂合性的程度还不算高, 在同一位点内只能作到 $A_1A_1A_2A_2$ 这

样的杂合性。利用 FDR 的 $2n$ 配子可以产生等位基因 4 个成员高度杂合而又不分离的后代, 使产量更进一步提高。这可以通过无配子分离的 FDR 的 $2n$ 卵品系 (A_1A_2) 与 FDR 的 $2n$ 花粉品系 (A_3A_4) 杂交来实现。所产生的 $A_1A_2A_3A_4$ 四倍体杂种后代具有更复杂的位点内和位点间的相互作用, 使杂种后代的生活力更强, 产量更进一步提高。此外用 $2n$ 配子勿需种植纯种, 这不仅可以避免纯种生活力弱和不开花结实等缺点, 还有利于引进外源种质。由此可见, 利用无分离的 FDR 的 $2n$ 配子在进一步提高马铃薯育

种水平和产量方面具有极重要的意义^[22]。 $2n$ 配子过去大多在一些野生种中发现, 这一性状受一单隐性基因控制, 可以通过连续回交选择的方法将它转到普通栽培种的双单倍体中去。现在, 国外有的单位已开始在育种方案中应用 $2n$ 配子来选育品种, 但还未将它用来生产不分离杂种实生籽。我国在这方面的研究才刚起步, 现在只有极少数单位在进行, 我们也已开始了这方面的研究工作, 已获得了一些 $4x \cdot 2x$ 和 $2x \cdot 2x$ 的四倍体杂种。将这些性状向栽培种双单倍体转移的工作也正在进行中。 (待续)



(上接 192 页)

假设控制环境条件的话, 此环境条件就能用来改变种薯的潜势。我们的结果还表明, 虽然总的来说, 发芽能力不受这种处理的影响, 但 1985/1986 年由于存在某种未查清的原因使发芽能力减弱。

温育期的测量表明, 块茎的生理成熟仅在 1985/86 年受影响, 当时, 生理成熟被提前了, 受此影响的种薯产量最低, 大概是一个偶然的结果, 原因可能是在 1986 年 12 月和 1987 年 1 月间结薯时的环境条件(图 1)。然而, 在比较试验中, 生理成熟与总块茎产量显著相关 (相关系数 = 0.735, 图 3)。

我们的结论是, 品种 Ballenera MAA 提早杀死薯块既不改变其绝对休眠或生理成熟, 又不降低后代种薯的产量。这些种薯的后代产量受种薯在生长和贮藏期间由环境条

件引起的生理成熟变化情况的影响。

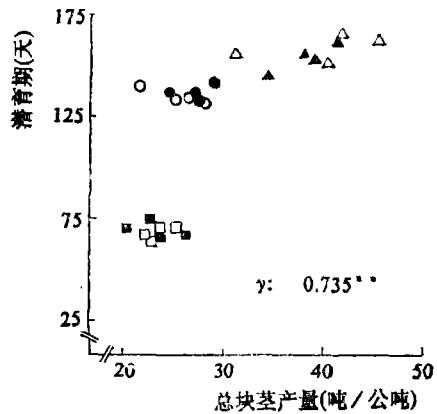


图 3 温育期 (以天计算) 与产量比较
试验的总块茎产量间的相关
(○/●)1984/1985; (△/▲)1985/1986 和 (□/■)
1986/1987。(○/△/□)提早杀死薯秧的数据,
(●/▲/■)薯叶自然死亡的资料。

译自《Potato Research》32 (1989)

王 萍 译 陈毅行 校