

马铃薯遗传工程技术的研究

戴朝曦 于品华 王 蒂 冉毅东 曲秀兰

(甘肃农业大学农学系)

马铃薯的常规杂交育种目前遇到两大障碍: 一是由于病毒病的浸染通过无性繁殖逐代积累产生的品种迅速退化; 二是由于现有栽培种的基因库狭窄, 特别是缺乏抗病和抗逆性基因, 因此用常规的品种杂交的方法, 通过基因重组很难培育出具有抗病性和抗逆性的新品种。这两大生物学障碍使马铃薯的育种工作面临着巨大困难, 很难再前进一步。本世纪70年代后发展起来的遗传工程技术为解决这些问题提供了新的手段, 如果把这些新技术运用到马铃薯育种上, 必将使马铃薯育种的水平大大提高, 能培育出具有抗病、抗逆、高产、优质的更高水平的新品种。为了研究在马铃薯育种中综合运用遗传工程技术的可能性, 解决在运用这些新技术中的一系列技术问题, 我们从1981年开始, 在国内国外, 在细胞、染色体和基因3个不同水平上, 对马铃薯的遗传工程技术的一些方面进行了研究。本文将简要地报道在这些方面的研究结果。

1 马铃薯双单倍体及一倍体的诱导及其利用

马铃薯的倍性操作属于染色体工程的一部分, 在马铃薯育种中具有十分重要的意义。在倍性操作中, 由四倍体诱导双单倍体以及进一步由双单倍体诱导一倍体又是一个

很重要的方面。这是因为, 马铃薯的双单倍体 ($2n = 2x = 24$) 以及一倍体 ($2n = x = 12$) 是马铃薯“分解—综合育种”的基础^[1,2]。所谓“分解—综合育种”(analytic—Synthetic breeding)就是把四倍体水平先降到二倍体或一倍体的水平去进行选育, 然后再综合起来, 恢复到四倍体水平。把四倍体水平降到二倍体水平有很多好处: 首先, 由于四倍体基因的分离比较复杂, 特别是对于有利隐性基因, 很难在杂种后代纯化化表现出来, 要使它们表现和加以选择, 杂种后代群体的个体数不得不大大增加, 马铃薯又是大株行距作物, 在实际育种工作中种植如此大的杂种实生苗群体几乎是不可能的。由于二倍体的分离比四倍体简单得多, 因此用较小的实生苗群体就能得到许多在四倍体水平上很难得到的变异体, 再经过加倍, 恢复到四倍体水平后, 就能获得具有优良性状的新品种; 其次, 在马铃薯家族中占70%以上的野生种都是二倍体, 它们很难与四倍体栽培种杂交, 过去曾采用把野生二倍体种先加倍变成四倍体后再与四倍体栽培种杂交的方法, 效果也不好, 给外源有利基因导入马铃薯品种的工作增加了困难。把四倍体栽培种变成二倍体(双单倍体)以后, 可以较容易地与许多二倍体野生种杂交, 使引进野生种优良基因的工作变得比较容易进行; 第3, 马铃薯性状遗传规律的研究在四倍体水平上由于分离的复杂性, 很难进行, 但在二倍体水平上则

容易得多;第4,四倍体基因分离复杂,用常规的自交方法很难获得纯系,常常需自交几十代以上才能获得大体上纯的品系。但用脱倍性后再加倍的方法,先把四倍体变成二倍体,再变成一倍体,然后通过两次染色体加倍,就可以在较短的时间内获得高质量的纯系,为进一步培育出不分离的杂种实生籽创造了条件。

由于马铃薯的双单倍体及一倍体在马铃薯育种方法的改良中具有如此重要的意义,因此,在国外,早在60年代就已开始了这方面的研究工作。自从发现用 *Solanum phureja* 中的某些品系能诱导四倍体普通栽培种孤雌生殖产生双单倍体以后,人工诱导双单倍体的工作已逐渐进入实用性阶段,已获得了大量双单倍体品系。目前,在美国、联邦德国及英国、荷兰等许多国家,这种诱导四倍体孤雌生殖的方法仍然是获得双单倍体的主要途径。但是,这一方法也有它的缺点,例如,易受到影响开花结实的一些自然因素以及不同品种可诱导性的差异等因素的限制,影响了它的效率。近年来发展起来的花药培养技术为人工诱导双单倍体找出了一条新的有效途径。

马铃薯的花药培养虽然早在70年代就有获得成功的报道,但诱导双单倍体的频率一直很低,限制了这一技术在马铃薯育种实践中的应用。最近据 Uhrig 等报道,他们在提高诱导频率方面作了一系列的研究,但高频率的诱导效果仅存在于EAPP等少数无性系及其杂交后代,对于其他品种或品系,诱导频率仍很低,绝大多数基因型的诱导频率为0 [3]。为了研究提高马铃薯四倍体栽培种的花药培养诱导双单倍体频率的途径,使花药培养这一技术能在马铃薯育种实践中应用,我们从1981年开始,进行了大量的研究工作,取得了良好的进展,不仅双单倍体的诱导频率大大提高,而且还从10多个品种或品系获得了大量的双单倍体植株。现在,我

们从已获得的双单倍体植株中选出了100多个较好的品系,正在马铃薯新品种选育方案中使用。关于从马铃薯四倍体栽培种的花药诱导双单倍体植株的具体方法,我们已在几篇论文中作过报道 [4,5,6] 本文将不再重复叙述。总结我们多年来从事此项研究的体会,下列几个方面是马铃薯花药培养中需要特别注意的问题:①花药的年龄十分重要,必须采用花粉粒处于单核中、晚期的花药,最好先进行镜检,否则是很难诱导成功的;②由于不同基因型对培养的反应不同,因此不能千篇一律地只采用某一种培养基,在培养基成分方面,调整激素的浓度和蔗糖浓度又是主要的(有的用3%蔗糖浓度较好,有的用6%也比较好);③在培养基中以MS作为基本培养基效果较好,在附加成分中加入适量的马铃薯块茎提取液及活性碳对提高诱导频率有利;④在诱导的初期需要一定的黑暗或弱光,强光对诱导不利;⑤开花后期的花药以及温室栽培植株的花药诱导效果不好;⑥花药培养前将花蕾在4°C下预处理48小时左右,能显著地提高诱导频率。

根据近年来我们对大量双单倍体的观察,双单倍体表现出广泛的分离,不少双单倍体品系表现出抗病、结薯多、薯块较大和品质好等优良性状,充分证明了把四倍体水平降低到二倍体水平进行“分解”育种的优越性。我们用这些优良的双单倍体品系与一些有较高利用价值的野生二倍体种,如 *S. microdontum*, *S. chacoense*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum* 以及 *S. phureja* 等,进行了杂交,得到了不少远缘杂交的后代,现正在对这些杂种后代进行鉴定和筛选。染色体检查表明,这些杂种仍都是二倍体,但杂种优势是十分明显的,若能把这些杂种二倍体的染色体加倍到四倍体水平,一定能选育出一些抗病、高产、优质的马铃薯新品种,将进一步证明综合育种的优越性。

近年来,我们用花药培养的方法又从双单倍体以及一些野生种(如*S. phureja*和*S. stoloniferum*等)中诱导出了具有12条染色体的一倍体。一倍体的植株并不一定表现矮小,块茎产量有的与双单倍体相当,表现不规则的减数分裂,无有效花粉形成。一倍体是获得纯合体的基础,若进行两次染色体加倍,能较快地获得高度纯合化的四倍体马铃薯体系,为生产不分离的杂种实生籽创造条件,为研究马铃薯的性状遗传规律提供基础材料。

2 马铃薯原生质体培养

原生质体是除了细胞壁的球形细胞,它在体细胞融合和杂交以及植物遗传操作中具有十分重要的意义,所以原生质培养是植物细胞工程和基因工程中的一个很重要的方面。马铃薯原生质体培养,虽然早在1977年Shepard等就有过获得成功的报道,以后也陆续有一些报道,但这些方法都比较繁琐,所用的培养基比较复杂,而且效果不好,试验的重复率较低。为了探索马铃薯原生质体培养简单而高效的培养方法,我们对马铃薯的原生质体培养进行了深入的研究,在游离原生质体的方法、原生质体的培养基、培养条件和方法以及工具等方面进行了一系列改良,获得良好的结果。关于这方面的详细情况已作过报道^[7],在此不再详述。现仅将其主要过程和结果简述如下。

2.1 原生质体的游离

将马铃薯组织培养1个月左右的试管苗的顶部幼嫩叶片或消毒后在无菌条件下发芽的实生苗(子叶刚张开1~2天)的子叶和下胚轴切下,剪碎后浸入用过滤法灭菌的含1%纤维素酶(Cellulose R-10)和0.2%离析酶(Macciolyse R-10)和大约0.3M蔗糖的酶解液中,在25~27℃和弱光下,在40转/分的摇床上离解原生质体大约20小时。在开始离解半小时后,在倒置显微镜下注意

观察酶解液的渗透压对细胞的影响,用加蔗糖浓度的方法调整酶解液的渗透压直到细胞表现轻微的质壁分离为止。待大量球形原生质体游离出来后,即进行分离和纯化原生质体的工作。

2.2 原生质体的分离和纯化

将游离出足够原生质体的酶解液用两层尼龙网布(孔径150~200μm)过滤去掉大块叶片残渣后,将滤液倒入特制的经过改良的细颈离心小瓶内,在1000转/分下离心收集漂浮于离心小瓶细颈上部的原生质体,用清洗液在同样离心条件下反复漂浮2~3次后,可获得高度纯化的原生质体。

2.3 原生质体的培养

把纯化的原生质体用原生质体培养基(渗透压应与酶解液相同)稀释到 2×10^4 个/毫升左右,在60毫米×15毫米培养皿中,在弱光照下进行液体浅层静止培养,随着原生质体细胞壁的形成和分裂细胞数的增加,培养基的渗透压需逐渐降低。培养15~20天后,将具有细胞丛的培养物吸出少量(1ml左右)平铺在用0.6%琼脂固化的原生质体培养基表面,继续在连续光照(200~300 lux)和20~25℃下培养。

2.4 小植株的分化

待小愈伤组织形成,长到直径约2~3毫米时,把它们一个个地挑出,放置到分化培养基上,在强光照(2000 lux以上),16小时光期和20~25℃下培养,约1个月左右可见到绿苗分化,最后将幼苗切段,在一般的马铃薯试管繁殖培养基上繁殖。

根据我们的经验,在原生质体游离阶段和培养初期,最重要的是掌握好酶解液和培养液的渗透压,必须接近于原生质体的渗透压,细胞浅层静止培养法比用双层法简单而且减少了原生质体的损失。原生质体培养阶

段不同基因型对培养基的反应不敏感,但在分化幼苗阶段,不同基因型的要求有较大的差异,因此要多采用几种培养基才能得到较好的结果。

我们用改良和简化的原生质体游离和培养方法在四倍体栽培种的6个品种和5个野生二倍体种均游离出了原生质体和观察到了原生质体的分裂。除了野生种因细菌污染未得到愈伤组织和植株分化外,几个栽培品种均分化出了植株。

3 用农杆菌进行马铃薯基因转化的研究

基因工程是遗传工程的一个很重要的方面,因为它是在基因的分子水平上进行操作,能进行基因的直接转移,为人类改造动植物提供了一种新的技术和方法。在进行植物基因转移的过程中,需要有一种载体将目的基因带入宿主细胞中。在植物基因工程中,目前应用得最广泛的载体是一种土壤传播的细菌称为“土壤农杆菌(*Agrobacterium*)””。在土壤农杆菌属中,有2个种已在遗传工程中应用。即:致癌农杆菌(*A. tumefaciens*)和致根农杆菌(*A. rhizogenes*)。这些细菌中含有一种小型环状的DNA,称为质粒(plasmid)。在质粒上有一段DNA,当细菌感染细胞时,可以转移到植物细胞中并整合到染色体上,与染色体DNA同时进行复制、转录和表达,所以这段DNA称为“可转移的DNA(T-DNA)”。农杆菌的T-DNA上有生长素和细胞分裂素基因,它能使植物细胞快速生长和分裂,形成冠瘿瘤(致癌农杆菌)或大量毛根(致根农杆菌)。若用重组DNA分子技术,把需要转移的目的基因接到T-DNA上,则可实现基因的转移。在进行此项工作之前,必须首先建立起高效率的转化系统,找出能使转化细胞分化

植株的方法。为此,我们对马铃薯转化的方法进行了研究。

3.1 用致癌农杆菌的Ti质粒进行单转化的研究

致癌农杆菌能使受体植物产生快速生长和分裂癌细胞,这是因为该质粒的T-DNA中含有合成植物生长素和细胞分裂素基因的原故。马铃薯的单转化近年来虽然已有一些报道,但方法繁琐,获得转化苗的频率不高。为了找到一种比现行叶盘法及针刺茎杆接种法等更有效的接种方法而使诱导转化苗的频率大大提高,我们进行了研究。研究结果已作过报道[8],本文不再重复,仅将主要环节作一简要叙述:

将消毒过的马铃薯实生籽在用0.7%琼脂固化的仅含MS无机盐、无蔗糖的培养基上发芽,在25℃,2000勒克斯连续光照下培养,子叶刚张开时,即可用来接种。所用的农杆菌为*Agrobacterium tumefaciens*菌系T37,它的T-DNA含有一个特殊的基因,在植物细胞中能形成一种特殊的氨基酸衍生物,称为胍脂碱(nopaline),用纸上电泳和非醌染色法能检测出它的存在。可以用来作为转化细胞的标记。接种前一天将此细胞接种在丰富营养的液体培养基中,在28℃下振荡培养10小时左右,在高速离心机中(7700 r/min)离心10分钟以沉淀细菌,然后将细菌悬浮于PBS(一种缓冲液)中,调整浓度到 10^8 个/毫升,将子叶剪下,横切成两半,下胚轴从最上部切下,长约3~5毫米。将它们浸入上述菌液中,经常搅拌,15分钟后取出,在无菌吸水纸上吸干多余水分。将接种过的子叶及下胚轴切段放到用0.8%琼脂固化的仅含MS无机盐、无蔗糖和任何添加物的培养基上,在27℃,2000勒克斯连续光照下预培养48小时,然后将它们转移到含有3%蔗糖和水解酪蛋白(1 g/l)以及加有羧苄

青霉素(1 mg/ml) 无激素的MS培养基上,在上述条件下进行培养。30~40天以后,待瘤组织从切口处长出到直径约3~4毫米时,将它们切下,转移到加有赤霉素(10mg/l)和活性碳(0.4%)的无激素的MS培养基上诱导转化苗,待转化苗长到2~3厘米长时,将其切下转移到不含赤霉素和激素的MS培养基上进行小植株的繁殖。对分化植株的叶片随机取样进行胭脂碱的分析以确定是否是转化植株。结果表明,由于未转化的细胞不能在无激素的培养基上生长,所以由瘤组织分化出的植株都表现有胭脂碱的合成,说明它们都来自转化了的细胞。转化植株表型与正常植株稍有不同,且不易发根,即使在含有IAA或IBA的培养基上,也只能形成少量生长细弱的根,移栽后不易成活,这是由于农杆菌的T-DNA上有生长素和细胞分裂素合成基因,当它们整合到植株染色体上进行表达时,所产生的激素破坏了植物细胞正常激素代谢的原故。为了消除T-DNA上激素基因对植物生长发育带来的影响,近年来,在植物基因工程中已普遍使用去掉激素基因并加有抗某种抗生素的标记基因的改建质粒,能获得生长发育正常的转化植株。本研究的试验结果表明,采用马铃薯子叶及下胚轴作为诱导转化苗的外植体比一般所用茎注射、针刺接种和叶片接种培养等方法效率要高得多。由于子叶及下胚轴是较幼嫩的组织,成胚性较强,所以转化苗的分化比较容易,分化频率较高。这一结果为今后马铃薯的高效基因转移工作提供了一个极好的转化系统。

3.2 用Ti和Ri质粒进行复合转化的研究

已经证明,致根农杆菌所含有的Ri质粒与致癌农杆菌所含有的Ti质粒一样,可以对植物细胞进行转化,使植物产生许多平行或向上生长的毛根。它本来也是植物中的一种病害,但自从发现它也是一种自然界进行的

基因工程后,Ri质粒也开始受到重视,被用来作为基因转移的载体。已有实验表明,Ti和Ri质粒可以同时进入一个植物细胞而不发生排斥作用。这就使人们有可能同时向一个细胞转移两个或多个基因,因为,在一个质粒上连接两个以上基因,由于分子量过大,是无法进入受体细胞进行转化的。为了探索在马铃薯中Ti和Ri质粒进行复合转化的可能性和有效方法,我们用一个在美国大量栽培的马铃薯品种“Red pontiac”进行了研究,获得了良好的结果。有关这方面的详细情况,我们已作过报道^[9,10],在此也仅作简略叙述。

一步浸染法:将消毒过的马铃薯块茎在无茵条件下,用软木塞打孔器切成直径为9毫米厚4毫米左右的圆盘,将块茎圆盘浸入致癌农杆菌(10^8 个/ml)和致根农杆菌(10^8 个/ml)的混合菌液中,经常搅拌,15分钟后取出,吸干水分后,放置于仅含有0.8%琼脂的平面上,在200勒克斯连续光照和27°C下培养,10~15天以后,毛根及瘤组织从块茎盘上长出。待长到一定长度后,把瘤及根等切下,放在含有MS无机盐、无激素但加有羧苄青霉素(1mg/ml)和氨苄青霉素(0.5mg/ml)的培养基上培养,并进行胭脂碱检测。结果表明,有两种根由块茎盘长出。一种是与Ri质粒单转化得到的毛根类似的毛根,直接由块茎盘长出,无胭脂碱合成能力,说明它们系来自Ri质粒单转化的细胞;另一种是由瘤分化出的根,这种根与毛根不同,粗壮,少根毛,在光下易变绿,胭脂碱检测呈正反应。由于仅由T₀的Ti质粒单转化得来的转化细胞只形成瘤,无根分化,而由Ri质粒单转化得来的细胞只形成毛根,无瘤产生,而且在这类毛根中从未发现有胭脂碱合成,所以可以认定,这类由瘤分化的粗壮根是来自复合转化的细胞。遗憾的是,由于农杆菌的最后灭菌问题未能解决,故未得到分化的复合转化植株。

两步浸染法: 此法 是先由块茎盘接种法用致根农杆菌诱导出含Ri质粒T—DNA的毛根, 在无激素的MS培养基上培养1年左右, 再将这有激素自主能力的毛根切段(3~5 mm长), 用致瘤农杆菌T37菌系浸染, 采用与单转化相同的方法, 经过48小时预培养后, 转移到加有抗生素但无激素的MS培养基上, 在与单转化相同的条件下进行培养。20~30天以后, 从根段切口两端产生瘤组织。有两类瘤组织形成: 一种是松软、白色、半透明的组织, 无胭脂碱合成能力, 说明是来自Ri质粒单转化的毛根细胞; 另一种瘤组织坚硬、呈红色或绿色, 有胭脂碱合成能力, 说明系来自复合转化的细胞。把这些有胭脂碱合成能力的瘤组织转移到分化培养基上(MS基本培养基+激素2mg/l+BAP 2mg/l+IAA0.5mg/l+蔗糖3%+活性炭0.5%+琼脂0.7%), 在自然散射光和22~25℃下培养, 6个月以后, 由瘤组织上分化出大量小植株。将这些小植株进行切段繁殖, 6个月以后, 对其叶片进行胭脂碱检测。结果表明, 所有这些小植株都是有胭脂碱合成能力的, 在表现型方面, 表现出叶片皱缩, 植株粗壮, 节间变短, 由茎上长出的根仍然表现向上或平行生长的典型转化毛根的特点, 这些表现从另一个角度证明了这些植株是来自复合转化细胞的。

总之, 本研究还仅仅是对马铃薯遗传工程技术所作的一些初步研究, 要在育种中实际应用还有一段距离。但是, 由于遗传工程技术在改良动植物品种方面有许多独特的优点, 具有强大的生命力, 并且, 随着研究的不断深入, 它将在马铃薯育种中发挥愈来愈

愈大的作用, 使马铃薯生产提高到更高的水平。

参考文献

- 1 Chanse S C. Analytical breeding of *Solanum tuberosum*. Can J Gen Cyt, 1963, 5: 359~363
- 2 Wenzel G et al. Comparison of Single cell culture derived *solanum tuberosum* L plants and model for their application in breeding programs Theor Appl Gen, 1979, 55: 49~55
- 3 Uring H and F Salamini. Dihaploid plant production from 4X—genotypes of potato by the use of efficient anther plants producing tetraploid strains (4XEAPP—Clones) proposal of a breeding methodology. Plant Breeding, 1987, 93: 283~235
- 4 钱朝曦. 用花药培养法诱导马铃薯产生双单倍体植株的研究. 科学通报, 1982, 27(24): 1529~1532
- 5 钱朝曦等. 用花药培养法培育马铃薯单倍体植株的研究 II—几个因素对诱导结果的影响. 马铃薯, 1985, 1: 1~6
- 6 钱朝曦等. 同上, II—花药培养中出现的一些特殊现象及对双单倍体植株的初步观察. 马铃薯, 1985, 2: 3
- 7 Dai Chaoxi et al. Improved procedures for the isolation and culture of potato protoplasts. plant Science, 1987, 50: 79~84
- 8 Dai Chaoxi and S G Pueppke. Induction of shoots by infection of potato hypocotyls and cotyledons with *Agrobacterium tumefaciens*. Genetic Manipulation in Crops Newsletter, 1987, 3(2): 53~63
- 9 Dai chaoxi and Pueppke S G. Multiple transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. Genetic Manipulation in Crops Newsletter, 1986, 2(1): 60~71
- 10 Dai Chaoxi. Induction of multiple transformed plantlets in potato with *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens*. Asian Potatos association Proceeding, 1988, 74~75.