

国际热带农业中心的木薯研究

黄毓文 刘殷勤

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属大戟科植物, 其块根富含淀粉, 淀粉含量占干物质重的 75—85%, 是热带地区的第四大农作物, 仅次于水稻、甘蔗和玉米; 在热带非洲则是主要的粮食作物。

木薯原产地在南美洲亚马逊河盆地, 在拉丁美洲已有六千年栽培历史。于十六世纪前由葡萄牙商人传入非洲刚果, 其后传播至非洲东部和亚洲地区。至十九世纪末, 木薯已在全球的热带地区种植。木薯耐旱、耐瘠和耐酸性土壤, 故在非洲干旱和半干旱地区得到较大发展。据联合国粮农组织的统计, 1991年, 全球木薯的种植面积为 1567 万公顷, 其中非洲占 57%、亚洲占 25%、拉丁美洲占 18%。木薯块根的年产量为 1.537 亿吨, 其中 45% 产于非洲, 33% 产于亚洲, 21% 产于拉丁美洲 (表 1)。

长期以来除热带地区外, 木薯鲜为人知, 更少有研究。60 年代受小麦和水稻绿色革命的推动, 国际上成立多个农业研究中心, 致力于热带作物的研究。其中两个中心以木薯为主要研究对象: 一个是国际热带农业研究所 (International Institute of Tropical Agriculture, 简称 IITA), 设于非洲尼日利亚, 属地区性研究机构; 另一个是国际热带农业中心 (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 简称 CIAT), 设在南美的哥伦比亚, 属国际性研究机构。

作者于 1994 年 5 月 30 日至 6 月 20 日访问了国际热带农业中心, 重点了解该中心有关木薯研究的进展, 本文对此作专题报道。

表 1 世界木薯生产情况

Table 1 Cassava production in the world

	种植面积 Planted area		产量 Production		平均产量 Ave. yield
	1000 ha	%	1000 t	%	t/ha
全世界 Whole world	15671		153689		9.8
非洲 Africa	8922		68931		7.7
扎伊尔 Zaire	2388	26.8	18227	26.4	2.1
尼日利亚 Nigeria	1700	19.1	20000	29.0	11.8
莫三鼻给 Mozambique	972	10.9	3690	5.4	3.8
坦桑尼亚 Tanzania	604	6.8	6266	9.1	10.4
加纳 Ghana	535	6.0	3600	5.2	6.7
安哥拉 Angola	500	5.6	1850	2.7	3.7
乌干达 Uganda	380	4.3	3350	4.9	8.8

续表 1

	种植面积 Planted area		产量 Production		平均产量 Ave. yield
	1000 ha	%	1000 t	%	t/ha
亚洲 Asia	3950		51460		13.0
泰国 Thailand	1500	38.0	20300	39.4	13.5
印尼 Indonesia	1318	33.4	16330	31.7	12.4
印度 India	289	7.3	5600	10.9	19.4
越南 Viet Nam	285	7.2	3000	5.8	10.3
中国 China	231	5.8	3320	6.5	14.4
南美洲 South America	2593		32155		12.4
巴西 Brazil	1959	75.5	24632	76.6	12.6
巴拉圭 Paraguay	240	9.3	3900	12.1	16.3
哥伦比亚 Colombia	220	8.5	2081	6.5	9.5
玻利维亚 Bolivia	46	1.8	499	1.6	7.3
委内瑞拉 Venezuela	39	1.5	310	1.0	7.9
中美洲和加勒比海 Middle America & Caribbean Sea	188		951		5.1
大洋洲 Australia	17		191		11

上述资料据世界粮农组织 1991 年统计数字整理。所列国家仅为主要生产国, %指所在国家占洲的百分率

Source: FAO production data (1991, preliminary), only principal cassava planted countries were listed, the percentages were accounted from the continents

1 国际热带农业中心 (CIAT) 简介

CIAT 是国际农业研究顾问小组 (Consultative Group on International Agriculture Research 简称 CGIAR) 倡议建立的 18 个国际农业研究中心之一, 成立于 1973 年, 地址在哥伦比亚的卡里市郊, 占地 570 多 ha。工作人员原有 1200 多人, 后因经费稍减, 现人员减为 900 左右, 年经费约 1700 万美元, 主要由 19 个国家政府、国际地区发展组织和私人基金会资助。1993 年, 提供资助的政府包括澳大利亚、比利时、加拿大、中国、法国、德国、意大利、日本、荷兰、挪威、西班牙、瑞典、瑞士、英国和美国; 组织机构包括欧洲经济共同体、福特基金会、美洲发展银行和世界银行等。

CIAT 致力于把现代科学技术应用于农业, 以提高热带发展中国家的农业产量, 缓解该地人民的贫困与饥饿。研究作物对象包括木薯、豆类、水稻和热带牧草, 其中以木薯和豆类为主。研究机构设置包括种质资源、生物技术、昆虫、病毒、农业生态和数据资料服务等研究室以及木薯生物技术 (CBN) 和豆类生物技术 (BBN) 两个国际性的研究网络。

CIAT 出版有 '木薯生物技术通讯' 和 '豆类生物技术通讯' 两个定期刊物 (季刊) 以及生物技术研究室和木薯研究项目的年报。

2 CIAT 的木薯研究项目

2.1 木薯种质资源收集、管理、保存和交流

2.1.1 种质资源的收集管理

种质资源的收集、保存和开发利用是 CIAT 的重点研究项目之一。自 1973 年以来，该中心已从亚非拉 23 个热带、亚热带国家收集到木薯栽培品系 5500 份，野生种 34 个，其中 80% 来自南美洲的巴西、哥伦比亚、秘鲁和委内瑞拉四国（表 2）。

表 2 木薯种质资源来源

Table 2 Origin of the CIAT cassava germplasm collection

来源 Origin	No. of accession	% with agronomic evaluation	% with isozyme characterization	% with morpholog character.
哥伦比亚 Colombia	2010	90	56	100
巴西 Brazil	1085	73	72	50
秘鲁 Peru	405	95	59	88
委内瑞拉 Venezuela	240	100	98	100
巴拉圭 Paraguay	192	95	68	83
哥斯达尼加 Costa Rico	147	100	93	90
厄瓜多尔 Ecuador	117	100	97	100
墨西哥 Mexico	100	100	81	55
危地马拉 Guatemala	91	100	85	90
古巴 Cuba	74	100	100	100
巴拿马 Panama	42	100	45	95
阿根廷 Argentina	16	100	0	94
波多黎各 Puerto Rico	15	100	100	100
多米尼加 Dominica	5	100	100	100
玻利维亚 Bolivia	3	100	0	67
马来西亚 Malaysia	68	100	97	96
印度尼西亚 Indonesia	51	100	100	88
泰国 Thailand	8	100	100	100
菲律宾 Philippines	6	100	100	0
中国 China	2	100	50	100
斐济 Fiji	6	100	100	100
美国 United States	9	100	89	89
CIAT clones (无性系)	324	100	68	100
IITA clones (无性系)	19	100	84	11

为了防止病虫害的传播，CIAT 收集的木薯资源都经过用组织培养技术进行脱毒处理，然后分发至代表着七个不同农业生态类型的试验站进行农艺性状评估。这七个农业生态型为：(1) 热带半湿润地区、(2) 热带草原酸性土壤、(3) 热带潮润低地、(4) 热带中海拔地区、(5) 热带高海拔地区、(6) 热带半干旱地区和 (7) 亚热带地区。

此外，还对全部收集品系进行同工酶和 DNA 指纹分析，以建立木薯种质资源数据库，进行电脑管理，并从中剔除可能为重复的材料，以减少人力物力的浪费。据同工酶分析结果表明，在 5000 多份材料中，约有 20% 其酯酶同工酶酶谱完全相同。其后经 DNA 指纹分析发现，在同工酶酶谱型相同的材料中，有 85% 其 DNA 指纹亦相同，其余的 15% 则在 DNA 水平上出现差异。通过外部形态、同工酶和 DNA 指纹分析，确定其中的 630 份为核心收集材料 (Core collection)，是重点保存和研究的对象。

2.1.2 木薯种质资源的保存

分短期、中期和长期三种处理。短期保存,以茎切段种植在总部的试验田中,每年9月种植一次,占地约5ha。中期保存用试管苗,培养室面积50m²,温度保持在21—22℃,每4—8个月继代一次。试管苗的全部资料包括继代次数、时间等都输入电脑保存。长期保存,用茎尖分生组织或体细胞胚置液氮罐中低温冷冻保存,2—3年检查再生能力一次。1m²的液氮罐即可保存5000多份材料,可节省大量土地和人力物力。不过,目前只有约50%经液氮保存的材料能再生植株,故此项技术尚有待完善。

2.1.3 种质资源的利用和有性杂交育种

CIAT所收集的木薯种质资源,通过在七个代表着不同农业生态型的试验站试种评估后,从中可直接筛选出适合不同生态条件种植的优良品系进行推广。或者,利用某些具优良农艺性状的种质进行有性杂交育种,其途径有二:一是选择已知母本,在其周围种15个不同品系作父本,任其自由授粉;二是选择具优良性状互补的两个亲本,进行单株套袋授粉。

木薯的有性杂交育种较其他作物简单,因为只需要进行一次有性杂交,即可用无性繁殖方式使优良性状得以保存下来。而常规的有性杂交育种则要通过长期的多代选育才能使优良性状得以稳定遗传。所以,木薯的有性杂交育种,在某种意义上说也可算是杂种优势利用形式之一。它与常规作物杂种优势利用不同之处在于,一般作物的杂种优势利用其双亲均为纯合体,杂交后的F₁代整齐一致,故生产上能利用其F₁代群体的杂种优势。而木薯的栽培品系大多数是杂合体,杂交后F₁代即出现严重分离,故只能用于单株选育。不过,一旦选择到优势的F₁代单株,其优势便可通过无性繁殖保存下来。

通过有性杂交育种使木薯种质资源的遗传多样性更为丰富。因为通常为杂合体的木薯无性系,在有性杂交过程中,供体与受体亲本的性细胞都要先经历一次染色体的遗传重组,产生基因型各异的精/卵细胞,其后二者结合形成新的杂合体。这样每一粒杂交种子都带有各不相同的染色体基因组的组合,使其遗传基础更为复杂,这就更有利于选育出适合各种不同生态环境的木薯优良品系。

2.1.4 木薯种质交流

自80年代以来,CIAT选育的木薯优良品系已被引种至世界35个国家,其中以拉丁美洲和亚洲为主。例如,中国科学院华南植物研究所自1981年以来从CIAT引种了木薯品系80多个,从中选育出南植188,已在广东广西推广种植。

CIAT所保存的木薯资源是向世界各国开放和免费供应的。他们所提供的种质都经过去毒处理。

2.2 木薯生物技术研究

CIAT生物技术室(BRU)技术力量雄厚,仪器设备较先进,在木薯生物技术领域内不少研究项目处于世界领先地位。在此稍为详细地介绍他们的研究项目,主要包括四个方面。

2.2.1 木薯种质遗传多样性的分子基础

2.2.1.1 木薯DNA指纹分析

应用RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)和RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术研究了5000多份木薯种质的DNA指纹,建立了木薯DNA指纹档案库。通过

DNA 指纹分析；对木薯种质资源进行以分子基础的分类，剔除可能为重复收集的材料，为种质保存节约了人力和财力。此研究成果目前正用于对木薯遗传多样性进行分析，并用于研究木薯栽培种的起源和演化。

2.2.1.2 木薯核基因组分子图谱的建立

此项研究是 CIAT 生物技术室与美国佐治亚大学和华盛顿大学以及国际热带农业研究所合作研究的项目，经费由洛克菲勒基金会资助。CIAT 的工作包括：

木薯核基因组 DNA 随机文库的构建 以无性系 M. Col 22 的核 DNA 为材料，通过用 Pst_I 内切酶消化和蔗糖梯度离心，分离出长度为 0.5—3.0 bp 的 DNA 片段，用于构建基因组文库，共获得 1800 个分子克隆，其中约 78% 为低拷贝的克隆。

RFLP 分子标记的筛选 以 1800 个分子克隆的 DNA 插入片段为探针，对木薯地理远缘品系进行 RFLP 分析，结果筛选出约 700 个探针可检测到木薯 DNA 限制性片段长度多态性。这 700 个 RFLP 探针现已作为构建木薯基因组分子图谱的标记。

木薯基因组分子图谱的建立 CIAT 生物技术室选用两个地理远缘的木薯品种进行有性杂交，然后通过对 F₁ 代群体的分离分析，来建立木薯基因组分子遗传连锁群图谱。所选用的两个木薯品种，一个是 Nigeria 2，为非洲的栽培种，对非洲木薯花叶病毒 (ACMV) 具高抗性；另一个是 CM2177-2，为南美的栽培种，高产、农艺性状好，但对 ACMV 敏感。两个品种本身都是杂合体，所以有性杂交 F₁ 代出现明显分离。有的性状其分离比例接近 1:1，类似回交一代的分离情况；而有的性状则呈 1:2:1 的分离，类似 F₂ 代的分离情况。他们从 Nigeria 2 X CM2177-2 的 F₁ 代群体任意选 100 个单株进行 RFLP 和 RAPD 分析。所用的分子标记除上述 700 个 RFLP 探针外，还采用了 120 个 RADP 探针 (Operon 公司产品)。目前已完成了约 400 个 RFLP 分子标记的数据分析。初步结果表明，木薯基因组连锁群的数目是 12，而木薯染色体数目 2n=36，按常理推断其基因组连锁群的数目应为 18。之所以会出现这种差异，初步解释认为木薯染色体组内可能存在重复事件，此项研究尚在继续进行中。此研究结果无疑对木薯染色体基因组结构的确定有着非常重要的意义，同时也为木薯有用基因（例如抗木薯花叶病毒基因）的分离和克隆打下良好的基础。

2.2.2 木薯光合作用与块根淀粉合成的分子生物学研究

2.2.2.1 木薯 CO₂ 同化作用的分子基础

木薯的光合速率介于 C₃ 与 C₄ 植物之间。为了解木薯光合作用的分子机理，CIAT 生物技术室以玉米 (C₄ 植物) 三个与光合作用密切相关的基因，即磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (PEPCase)、苹果酸酶 (ME) 和苹果酸脱氢酶 (MDH) 基因的 DNA_s 为探针，来研究木薯相应基因的 DNA 结构。已进行了 60 个木薯品系严格的 DNA 分子杂交，均未发现木薯的三个基因有限制性片段长度多态性出现，亦未观察到木薯三个基因的拷贝数与玉米的有差异。这表明木薯的 PEPCase、ME 和 MDH 三个基因的结构可能与玉米的相似。

其后，该室又以上述三个玉米基因的 DNA 或反义 RNA 为探针，与木薯 *M. grahamii* 的叶片进行原位杂交。结果发现 PEPCase 基因的转录产物分布在叶片上表皮细胞至栅栏组织顶部之间。此研究结果与前人提出木薯叶片的上部与 C₄ 植物相似，而下部与 C₃ 植物相似的假说相一致。表明木薯可能存在 CO₂ 循环利用的机制。

目前该室正在进行 PEPCase 酶抗血清的提纯工作，准备应用组织化学免疫技术进一步确证

上述研究结果。此项研究对了解木薯耐旱、耐瘠的分子基础有重要意义。

2.2.2.2 木薯淀粉分支酶基因的分离与克隆

木薯淀粉的质量与直链淀粉和支链淀粉的含量密切相关。木薯直链淀粉含量的变幅在 13—25% 之间，远较水稻直链淀粉的变幅 (0—35%) 为小。为满足工业上对木薯淀粉质量的不同需求，CIAT 生物技术室拟通过控制木薯淀粉分支酶 (BE) 基因的表达水平来达到此目的。

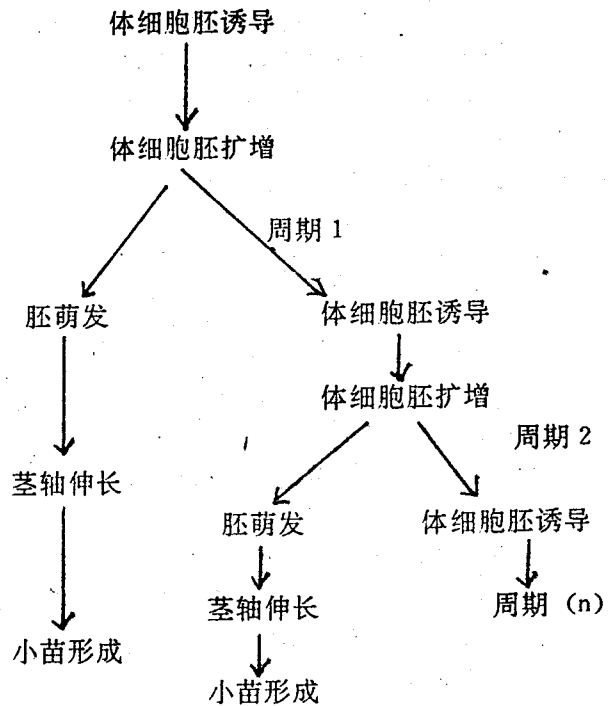
他们分离木薯 BE 基因的工作，是在荷兰 Visser 等人的工作基础上进行的。Visser 等从构建的木薯块根 cDNA 文库中分离得 BE 基因的 cDNA 序列，并已进行 DNA 的顺序分析。CIAT 生物技术室据发表的顺序人工合成两个寡序 DNA 引物，应用 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术从木薯核 DNA 扩增得到一个 500bp 的 DNA 片段。通过顺序分析发现，此 DNA 片段比 Visser 等人发表的 cDNA 序列多一个 250bp 片段，有可能为内含子。他们以此 500bp 的 DNA 片段为探针，从木薯的核基因文库中分离得到 8 个阳性克隆，进一步的研究工作在进行中。

2.2.3 木薯的遗传转化

2.2.3.1 木薯体细胞胚的诱导和植株再生

CIAT 生物技术室通过多年对木薯体细胞胚的诱导和植株再生的研究，已建立一套分段培养技术，依此技术体细胞胚的诱导频率可达到 100%，而植株再生频率为 50%。各阶段所用的培养基均为 MS 基本培养基，只是激素和光照强度不同，现以图解说明如下：

- (1) 8 mg/L 2,4-D
400 Lux
2—3 周
- (2) 4 mg/L 2,4-D
40 Lux
2 周
- (3) 0.01 mg/L 2,4-D+
0.1 mg/L BAP
2000 Lux
3 周
- (4) 0.25mg/L 2,4-D+
0.25 mg/L GA₃
2000 Lux
2—4 周
- (5) 激素 0
2000 Lux



体细胞胚的诱导和植株再生是进行木薯遗传转化研究必须解决的前题。只有建立了有效的离体培养和植株再生技术，才有可能成功地进行木薯的遗传转化研究。

2.2.3.2 农杆菌介导转化体系的研究

CIAT 生物技术室于 1991—1992 年筛选了 20 个农杆菌菌系, 从中发现 CIAT 1182、1183、C58C1 和 B6S3 四个菌系对木薯 M Per 183 和 M. Col 1505 有较强的侵染力。他们于 1991 年以前曾用不致癌 (disarmed) 的农杆菌 EHA101 进行实验, 没有取得结果。

1993—1994 年继续使用农杆菌 CIAT 1182 和木薯 M Per 183 进行转化实验。该菌系带有二元载体质粒 pGV1042, 质粒上的 T-DNA 区含有 Bar^r 和 Kan^r 两个标记基因和 β -葡糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS) 报道基因。外植体采用体细胞胚刚萌发的子叶。进行共培养后以 16 mg/L 的 Phosphinotricin (PPT) 筛选转化体。结果从 120 个经农杆菌感染的外植体中, 观察到 7 个外植体能够在 PPT 选择条件下产生体细胞胚。不过, 每个外植体只有 2—3 个体细胞胚能够分化, 且生长缓慢, 5 个月才长出几片不正常的叶片。他们从这些植株提取 DNA 进行 PCR 分析, 其中出现阳性反应的植株再用于次生胚的诱导。两个月后从次生体细胞胚得到再生植株。目前已对这些再生植株进行 GUS 基因表达产物和 Southern 分子杂交分析。从 5 个假定转化株系共测定了 55 份叶、22 份茎轴样品。结果有 GUS 活性的叶样品只占 28.7%, 而有 GUS 活性的茎轴样品则占 95.5%。Southern 分子杂交分析表明, 有的转化株内存在外源基因的同源 DNA 片段, 但却测不到 GUS 活性。这表明, 外源基因进入受体细胞后其 DNA 片段有可能因不稳定而缺失, 或者在受体细胞内被甲基化而不能表达。进一步的研究尚在进行中。

2.2.3.3 基因枪介导的遗传转化研究

以木薯 M. Col 1505 为材料, 质粒载体仍选用 pGV1040, 基因枪使用 Bio Rad 公司的 Biolistic PDS-He/100, 外植体用离体培养的体细胞胚。为了解外源基因进入木薯细胞后的命运, 他们在转化前期阶段 (弹击 90d 内) 没有采用筛选压力, 90d 后才对其中部份外植体用 16 mg/L 的 PPT 进行筛选, 通过定期测定弹击后外植体 GUS 基因的表达来了解外源基因进入受体细胞后的变化。表 3 和表 4 是他们测定的结果。

表 3 弹击后不同时间木薯体细胞胚的 GUS 基因表达情况

Table 3 GUS activity on cassava somatic embryos after different days from bombardment

项 目 Parameters	弹击后天数 Days after bombardment			
	1	30	60	90
测定外植体总数 Total No. of explants evaluated	140	203	272	94
有蓝点总数 Total No. of blue spots	2180	318	275	15
平均每外植体蓝点数 Average blue spots per explant	15.5	1.5	1.0	0.1
有至少一个蓝点的外植体占总数的 % % of explant with at least one blue spot	98	46	37	10

从 CIAT 上述研究结果可见, 基因枪确能有效地将外源 DNA 输送入受体细胞, 其效率可达到 98%。但是, 进入木薯受体细胞后的质粒, 多数未能稳定地整合进受体的染色体组内。所以, 如何能提高外源基因的整合频率和减少嵌合体的发生是今后应用基因枪法转化木薯首先要解决的难题。

表4 弹击不同时间后次生胚的 GUS 基因表达情况

Table 4 GUS gene expression on secondary embryos after different days from bombardment

项 目 Parameters	弹击后天数		
	Days after bombardment		
	30	60	90
测定体细胞胚团总数 Total No. of embryo clusters evaluated	203	272	94
有蓝点的初生十次生胚总数 Total No. of blue spots detected *	318	275	15
有蓝点的次生胚数 No. of secondary embryos with blue spot	2	1	0

* Primary+secondary somatic embryos.

2.2.4 木薯组织培养

CIAT 的木薯组织培养工作始于 1978 年, 其研究主要为种质资源保存服务。研究课题包括:

- (1) 木薯的快繁脱毒;
- (2) 木薯试管苗的建立和保存;
- (3) 茎尖分生组织和体细胞胚的低温冷冻保存和植株再生。

3 木薯生物技术网络 (CBN)

CIAT 的木薯生物技术网络成立于 1988 年, 其宗旨在于促进发展中国家的木薯研究与发达国家先进的分子生物学实验室的联系; 促进研究人员与最终用户—农民的联系; 确定木薯生物技术的研究方向和重点研究课题; 推动研究成果的推广应用。

网络的经费主要由荷兰的国际合作总部 (DGIS) 资助。主持人为 Ann M. Thro 博士。CBN 于 1992 年组织了第一次国际性的木薯生物技术会议, 地点在哥伦比亚的 Cartagena, 参加人数 128 人, 来自 19 个发展中国家, 9 个发达国家, 出版了约 50 万字的论文集。第二次国际性的木薯生物技术会议于 1994 年 8 月在印度尼西亚的茂物 (Bogor) 举行, 华南植物研究所应邀派了两名专家出席。

参考文献

- 1 Roca W M, Thro A M. (Editors). Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava. Biotechnology Network, Cartagena de Indias, Colombia 25-28 August. 1992
- 2 CIAT. Biotechnology Research Unit Annual Report, 1988-1992
- 3 CIAT. Biotechnology Research Unit Annual Report. 1993
- 4 CIAT. Cassava Program 1987-1991 Annual Report
- 5 CIAT. Report of Informe CIAT 1990
- 6 Raemarkers C J J M, Schavemaker C M, Jacobsen E et al. Improvement of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Cell Report. 1993. 12: 226-229