

生物技术在马铃薯抗病育种中的应用进展 (综述)

何亚文 李耿光 张兰英

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

A REVIEW OF BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS IN DISEASE RESISTANCE BREEDING OF POTATO

He Yawen Li Gengguang Zhang Lanying

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

摘要 马铃薯是世界上最重要的粮食作物之一,但其生产却受到病害的严重限制。本文简介了马铃薯抗病育种新途径—生物技术的应用及其研究进展,主要包括:茎尖脱毒,离体试管薯诱导,花药和花粉培养,胚挽救,抗病突变体离体筛选,原生质体融合技术和农杆菌介导的外源基因转化。这些技术与常规育种手段相结合已取得具有应用价值的结果。

关键词 生物技术; 马铃薯; 抗病育种

马铃薯无论在我国还是在世界其它各国都是一种重要的农作物,其生产规模仅次于水稻、小麦和玉米,居第四位。它产量高、营养丰富、适应能力强,又是唯一粮菜兼用型作物,因此在农业生产和人民生活中占有极重要的地位。然而,马铃薯栽培过程中的病害却严重限制了它的生产和改良,病毒病常使马铃薯减产50%甚至更高,并导致品种严重退化。在发展中国家,马铃薯细菌性病害每年引起数亿美元损失,在温带和热带更高。十九世纪中叶爱尔兰马铃薯遭受真菌性晚疫病洗劫之后,100多万人饿死,150多万人逃往北美^[1]。对这些病害目前尚无有效的防治办法,生产实践证明抗病育种是减少损失的根本途径。长期以来,人们普遍采用常规有性杂交方法获得抗病品种,这种方法在应用上存在许多缺陷:(1)现有普通栽培种经历了多次淘汰选择造成基因库贫乏,特别缺乏抗病、抗逆性基因,栽培种内的常规有性杂交只能产生新的组合,而不能创造新的基因,所以很难选择出高水平的抗病品种。(2)马铃薯栽培种是同源四倍体,每个位点的基因都有4个成员,遗传分离复杂,后代筛选繁琐。(3)马铃薯主要靠营养繁殖,普通栽培种中三成以上不育,许多野生种与栽培种之间存在有性杂交不亲和现象^[2]。近二十年来,生物技术已广泛应用于马铃薯抗病育种,并取得十分显著的进展,许多研究已进入实用阶段,生物技术已成为马铃薯抗病育种最有希望的途径之一。本文系统介绍生物技术在马铃薯抗病育种中的应用概况。

1 组织培养技术应用于马铃薯抗病育种

脱毒苗和脱毒种薯的生产 生长快的茎尖无维管组织,病毒的移动受到限制,因而不被病毒侵染,无菌条件下剥离仅带1-2个叶原基的茎尖于特定培养基上培养,即可再生成完整无病毒植株,这些无病苗在含BAP、CCC和蔗糖的液体培养基上全黑暗条件下培养四星期即可结出

“试管薯”，这些无病毒薯不仅能防止真菌、细菌和病毒侵染，而且能加速种薯繁殖，其体积小、重量轻，更利于种薯的保存、运输和推广。目前这种脱毒苗和试管薯的生产在世界上已取得了相当的经济效益。

远缘杂交和胚挽救 马铃薯抗病育种的一个很重要途径便是种间或属间远缘有性杂交，然而这种远缘杂交常常面临一个很重要的障碍便是授粉后不久杂种胚乳解体导致幼胚死亡，因而难以获得杂种后代。采用胚挽救方法，即将适当时期的幼胚取出置于体外人工培养基上，由幼胚直接再生成杂种植株，Chavez等^[3]将不结薯野生种 *Solanum etuberosum* 的 PLRV 抗性转入结薯种 *S. acaule* 和 *S. verrucosum*。Singsit等^[4]通过胚挽救也得到了 *S. tuberosum* 与 *S. stoloniferum*、*S. chancayense* 与 *S. chacoense* 种间杂种植株，抗病鉴定工作正在进行中。胚挽救技术简便易行，应用潜力很大。

双单倍体和一单倍体诱导 如前所述，马铃薯建立在四倍体水平上的常规育种方法效率低，为此，Chase等^[5]提出了分解育种法：先从普通栽培种诱导出双单倍，再与野生种杂交，在二倍体水平上选育优良杂种，最后加倍成四倍体。在此基础上Wenzel^[6]进一步提出了单倍体育种与体细胞杂交结合的新式分解合成育种法。Dunwell等^[7]首次通过花药培养得到双单倍体植株，今天在栽培种不同品种和许多马铃薯野生种中都已诱导出双单倍体。此外，Human等^[8]通过花粉培养获得双单倍体植株，并从中选择出抗镰刀菌株系。祝仲纯通过未授粉子房也得到了双单倍体植株。这些双单倍体已广泛应用于马铃薯有性杂交和体细胞杂交育种之中。甘肃农大戴朝羲等在双单倍体基础上进一步诱导出一单倍体植株，从中选择出了少数生活力强、丰产性和抗病性均较好的品系。

2 细胞工程技术应用于马铃薯抗病育种

2.1 抗病突变体的筛选

自从Carlson(1973)首次分离到烟草抗野火病突变植株以来，在马铃薯中已得到了许多抗病变异株系：

2.1.1 抗病毒突变体 Thomson等^[9]利用原生质体培养再生过程中产生的无性系变异，在其再生植株中筛选到PVX和PVY田间抗性增强植株。Cassells等(1986, 1987)先后在马铃薯外植体培养和愈伤组织培养再生后代中得到了PVX和PVY田间抗性植株，该抗性能通过无性繁殖传给后代。

2.1.2 抗细菌病突变体 Rassadina^[10]通过细胞连续培养在其再生后代中筛选到马铃薯环腐病抗性植株，张永祥^[11]在马铃薯叶盘愈伤组织培养再生后代中苗期接种筛选到两株青枯病抗性比母本显著提高的突变植株。

2.1.3 抗真菌病突变体 Heinz等(1977)在800棵马铃薯原生质体再生植株中筛选到20株抗疫霉菌0号小种植株，Shepard等(1980)，Meulemans等(1986)通过原生质体培养得到晚疫病抗性增强植株，这种抗性能通过无性繁殖或微繁殖传递给后代。Behnk^[12]用晚疫病原菌滤液筛选到抗性愈伤组织，其再生植株接种疫霉菌时病斑明显缩小。Matern等(1978)通过原生质体培养获得了病斑比母株小的早疫病抗性植株，这种抗性能通过薯块无性繁殖传递给下一代。Lynch^[13]用早疫病病原菌产生的毒性代谢物筛选到抗早疫病植株。Evans等^[14]、Thomson等(1986)分别

通过外植体、原生质体培养获得了抗疮痂病植株, 该抗性能通过无性繁殖而传递。

虽然目前已有许多有应用价值的马铃薯抗病突变体产生, 但总的说来, 大多仍停留在试验阶段, 这是因为: ① 很多突变抗病性状不能稳定遗传; ② 伴随抗病性状的出现, 许多人们不期望的性状也随之出现, 或者许多优良性状随之消失; ③ 突变频率太低。抗病机理、体细胞无性系变异机理的阐明和突变体筛选方法的改进将会大大加速突变技术在马铃薯抗病育种中的应用。

2.2 原生质体融合

在马铃薯栽培种之外有着十分丰富的野生资源, 它们含有许多栽培种所不具有的抗病性状。近十年来, 应用体细胞杂交技术已得到一大批种内、种间和属间杂种, 许多抗病性状已被转入栽培种(详见表1)。

表1 马铃薯种内种间体细胞杂种
Table 1 Potato intra- and interspecific somatic hybrids

融合组合 Fusion combinations	杂种抗性 Hybrid resistance	文献 Reference
<i>Solanum tuberosum</i> (+) <i>S. tuberosum</i> (BF15, 2x) (Aminca or Cardinal)	抗 PVA, PVX和线虫 R01小种 Resistant to PVA, PVX and to nematodes R01	[15]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. tuberosum</i> (2x, 含 Rx) (2x, 含 Ry)	抗 PVX, PVY Resistant to PVX, PVY	待发表
<i>S. brevidens</i> (+) <i>S. tuberosum</i> (4x)	抗 PLRV Resistant to PLRV	[16]
<i>S. brevidens</i> (+) <i>S. tuberosum</i> (2x, PI218228) (4x, PI203900)	兼抗晚疫病和马铃薯叶卷病毒 Resistant to late blight and PLRV	[17]
<i>S. brevidens</i> (+) <i>S. tuberosum</i> (2x)	兼抗 PLRV, PVY Resistant to PLRV and PVY	[18]
<i>S. brevidens</i> (+) <i>S. tuberosum</i>	抗 PVX, PVY和 PLRV Resistant to PVX, PVY, PLRV	[19]
<i>S. etuberosum</i> (+) <i>S. tuberosum</i>	中抗 PVY Moderately resistant to PVY	[23]
<i>S. brevidens</i> (irr.) (+) <i>S. tuberosum</i>	抗 PVX Resistant to PVX	[20]
<i>S. torvum</i> S. W. (+) <i>S. tuberosum</i> L.	抗 <i>Verticillium dahliae</i> Kleb. Resistant to <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	[21]
<i>S. circaefolium</i> (+) <i>S. tuberosum</i> L.	抗晚疫或抗 <i>Globodera pallida</i> 或兼抗 Resistant to late blight or <i>Globodera pallida</i> or to both	[22]
<i>S. bulbocastanum</i> (+) <i>S. tuberosum</i>	晚疫病抗性增强 Increased resistance to late blight	[23]
<i>S. bulbocastanum</i> (+) <i>S. tuberosum</i>	抗线虫病 Resistant to nematodes	待发表
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (+) <i>S. tuberosum</i>	抗青枯, 软腐病 Resistant to bacterial wilt and soft rot	[2]

除上表所列, 马铃薯栽培种还与 *S. phureja*、*S. stoloniferum*、*S. commersonii*、*S. photeinocarpum* 等之间得到了种间杂种, 但未见其正式抗病性鉴定结果。不仅如此, 这些所得到的抗病杂种已被许多育种学家们利用, Helgeson 等将马铃薯栽培种与 *S. brevidens* 杂交所得抗晚疫病和抗细菌性软腐病体细胞杂种与栽培种 Katahlin 和 Norland 回交, 三代回交结果显示部分有性后代保持了与体细胞杂种同等水平的抗性, 许多农艺性状如产量、成熟期和薯块形状明显优于体细胞杂种, 有些甚至超过原栽培种。这一结果充分显示了原生质体融合技术在马铃薯抗病育种中的巨大潜力。为避免对称融合带入过多不利性状进入杂合体, Pehu 等, Xu 等引入“供体-受体”不对称融合方法, 用 γ 射线(300-500GY)照射供体 *S. brevidens* 后再与 *S. tuberosum*

融合得到不对称杂种,有7-22条供体染色体进入杂合体,不对称杂种表现出PVX抗性。

体细胞杂交技术应用于马铃薯抗病育种有两大优点:①它可以克服栽培种与许多野生种之间有性杂交不亲和性障碍,②马铃薯许多抗病性状是由多个微效基因控制的,但人们对这些基因的结构、定位等了解非常有限,基因工程技术难以施展,因此只有通过体细胞杂交技术才能实现抗病基因的转移。

3 基因工程技术应用于马铃薯抗病育种

80年代以来,由于整合型质粒转化系统的成功建立,植物基因工程技术应用取得了飞速进展,以抗病育种为目的的马铃薯转基因植株应运而生,主要有:

3.1 抗病毒基因工程植株

目前应用最广的是利用病毒外壳蛋白基因抑制病毒脱壳,从而阻断了病毒的侵染。Kaniewski等^[24]、Fehér等^[25]先后分别将马铃薯×病毒外壳蛋白基因克隆并转入马铃薯,获得了抗PVX马铃薯植株。Lawson等^[26]将PVY外壳蛋白基因转入栽培种*Russet burbank*,得到PVY抗性植株。此外,Braun等^[27]将PVX复制酶基因转入马铃薯也得到了抗PVX植株,Kawchuk等^[28]利用反义RNA转化获得了抗PLRV植株。Truve等^[29]将哺乳动物2'-5'-寡腺苷酸合成酶(2'-5'-Oligoadenylate Synthetase)转入马铃薯,大田抗性测试表明叶和薯块中病毒颗粒浓度比相同条件下PVX外壳蛋白基因介导的抗性马铃薯中病毒颗粒浓度低。崔晓江等^[30]克隆了PVX、PVY和PLRV外壳蛋白基因,利用它们构建了同时含有两种或三种外壳蛋白基因的双价、三价表达载体,转化工作正在进行中。在国外,外壳蛋白基因介导的抗性植株已进入大田观察阶段。

3.2 抗细菌病和真菌病转基因植株

这方面比较引人注目的是利用昆虫体内产生的抗菌肽,已知天蚕在受到细菌侵染时可诱导体液内产生天然防御体系,具有杀菌作用的短肽,目前已有Cecropin、Attactin和Lysozyme三种短肽被鉴定,其基因已被克隆。贾士荣等^[31]报道将Cecropin B基因用农杆菌转化法转入马铃薯栽培种“mira”,转基因植株对青枯菌3号小种表现出中等强度抗性,PCR-斑点杂交分析证实了该基因的稳定整合。Montanelli等^[32]将Cecropin基因转入栽培种*Desirée*,转基因植株抽提物能够抑制青枯菌生长。Düring等^[33]利用 α -淀粉酶信号肽,在35S启动子控制下将噬菌体T₄溶菌酶基因转入马铃薯获得软腐病抗性植株。近年来,利用病原相关蛋白基因获得抗病植株也有人尝试,李耿光(未发表)把烟草中分离到的病原相关蛋白Osmotin基因转入马铃薯,得到晚疫病抗性植株。然而Constabel等^[34]将另一种从马铃薯中克隆到的病原相关蛋白基因STH-2转入马铃薯,虽然检测到了该基因的表达产物,但并未得到预期的晚疫病和PVX抗性植株。此外,病原菌裂解酶如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶基因也引起许多人的兴趣,只不过在马铃薯中尚未见成功的报道。

尽管有许多抗病基因工程植株产生,但大田推广应用的仍然很少,主要的问题是:①转基因植株的遗传稳定性,目前虽有稳定遗传近10代的报道,但现在下结论为时尚早。②转基因植株的田间抗性表现,这种针对某一病原菌或某一株系(或生理小种)的转基因植株在田间多病原复合感染条件下是否仍表现抗性尚须实践证明。③高等植物抗病基因的应用问题,目前很少利用高等植物抗病基因进行马铃薯抗病基因工程的成功先例,主要是难以分离克隆高等植物抗病基因。

综上所述, 生物技术在马铃薯抗病育种中已取得很大进展, 特别是无毒种薯和抗病毒植株已进入实用阶段, 但仍然存在上述一系列问题, 而且马铃薯抗病机制和病原菌致病机制了解不够, 这一切都大大削弱了生物技术的应用, 除抓紧对这些问题的研究外, 传统育种手段同现代技术结合, 多种抗病性状的结合育种必将使马铃薯生产提高到一个新水平。

参考文献

- 1 莽克强. 植物生物技术和作物改良(孙敬三等主编). 中国科学技术出版社, 1990, 5
- 2 戴朝羲. 生物工程技术在马铃薯遗传育种研究中的应用. 马铃薯杂志, 1991, 5(3):161-166
- 3 Chavez R et al. Transfer of resistance to PLRV titer buildup from *S. etuberosum* to a tuber-bearing *Solanum* gene Pool. Theor Appl Genet, 1988, 76:129-135
- 4 Singsit C, Hanneman R E. Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. Plant Cell Reports, 1991, 9:475-478
- 5 Chase S C. Analytical breeding of *Solanum tuberosum*. Can J Gen Cyt, 1963, 5:359-363
- 6 Wenzel G O et al. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* plant and model for their application in breeding programs. Theor Appl Genet, 1979, 55:49-55
- 7 Dunwell J M, Sunderland U. Anther Culture of *Solanum tuberosum*. Euphytica, 1973, 22:317-320
- 8 Human Z et al. Screening for resistance to *Fusarium dry rot* in progenies of cultivars of *S. tuberosum* ssp. *andigena* with resistance to *Erwinia chrysanthemi*. American Potato J, 1989, 66(6):357-364
- 9 Thomson A J et al. The evaluation of potato somaclones, In: Semal J ed. Somaclonal Variations and Crop Improvement. 1986, 236-243, Martnus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- 10 Rassadina G V et al. Cell selection for resistance to ring rot of potato: Optimizing the evaluation of resistance to ring rot in somaclonal lines of potato. Potato Research, 1992, 46:295
- 11 张永祥, 华静月, 何礼远等. 马铃薯叶盘愈伤组织再生苗抗青枯病变异株的筛选. 马铃薯杂志, 1993, 7(1):22-26
- 12 Behnke M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant Plants. Theor Appl Genet, 1979, 55:69-71
- 13 Lynch D R. Screening for resistance to early blight in potato using toxic metabolites produced by the fungus. Potato Research, 1991, 34(4):297-304
- 14 Evans N E et al. Somaclonal variation in explant-derived potato clones over three tuber generations. Euphytica, 1986, 35:353-361
- 15 Sihachkr D et al. Transfer of disease and insect resistance to inter- and intraspecific somatic hybrids of potato by protoplast electrofusion. Physiol Plant, 1991, 82:A23
- 16 Austin S, Baer M, Helgeson J P. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *S. brevidens* to *S. tuberosum* by somatic fusion. Plant Sci Lett, 1985, 39:75-82
- 17 Helgeson J P et al. Somatic hybrids between *S. brevidens* and *S. tuberosum*: expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll biology. Kluwer Academic Pulb., Dordrecht Boston London, 1990, 286-292
- 18 Gibson R W et al. Resistance to PLRV and PVY in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Theor Appl Genet, 1988, 76:113-117

- 19 Jones M G K et al. Transfer of resistance to PLRV, PVX and PVY from *S. brevidens* to potato by somatic hybridization: Characterization and field evaluation, 1990, In: Nijkamp H J J et al. eds. Progress in Plant Cellular and Molecular
- 20 Xu Y S et al. Production of asymmetric hybrids between *Solanum tuberosum* and irradiated *S. brevidens*. Theor Appl Genet, 1993, 85:729-734
- 21 Jadari R et al. Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *S. torvum* SW. into potato by protoplast electrofusion. Euphytica, 1992, 64(1-2):39-47
- 22 Mattheij W M et al. Transfer of resistance to *Phytophthora infestans* and *Globodera pallida* to the potato gene pool by interspecific hybridization. Physiol Plant, 1991, 82:A23
- 23 Schumann U et al. Somatic hybridization of *Solanum tuberosum* L. with phytophthora-resistant wild potato species. Physiol Plant, 1991, 82(1):A23
- 24 Kaniewski W et al. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by PVX and PVY. Bio/Technology, 1990, 8:750-754
- 25 Fehér A et al. Expression of PVX coat protein gene under the control of extension-gene promotor confers virus resistance on transgenic potato plants. Plant Cell Reports, 1992, 11(1):48-52
- 26 Lawson C et al. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to PVX and PVY in transgenic Russet Burbank. Bio/Technology, 1990, 8(2):127-134
- 27 Braun C J, Hemenway C L. Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to PVX infection. Plant Cell, 1992, 4:735-744
- 28 Kawchuk L M, Martin R R, Mcpherson J. Sense and antisense RNA-mediated resistance to PLRV in Russet Burbank potato plants. Mol Plant-Microbe Interact, 1991, 4:247-253
- 29 Truve E et al. Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5'-Oligoadenylate synthetase are protected from PVX infection under field conditions. Bio/Technology, 1993, 11(9):1048-1052
- 30 崔晓江, 彭学贤, 沈禹飞等. 马铃薯单双三价抗病毒基因表达载体的构建. 生物工程学报, 1994, 10(2):185-189
- 31 Jia S R et al. Genetic engineering of Chinese potato cultivars by introducing antibacterial polypeptide gene. In: Biotechnology in agriculture, Proceedings of the First Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Beijing, China, 1992, 20-24, August
- 32 Montanelli C, Nascari G. Introduction of an antibacterial gene in potato using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. J Genet & Breed, 1991, 45:307-316
- 33 Düring K et al. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. Plant J, 1993, 3(4):587-598
- 34 Constabel C P et al. Transgenic potato plants over-expressing the Pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and PVX. Plant Molecular Biology, 1993, 22(5):775-782