

4x-2x 杂交创制马铃薯新种质

黄超, 李歌歌, 叶龙, 柳俊, 蔡兴奎*

(华中农业大学园艺林学学院/华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室/国家蔬菜改良中心华中分中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 以二倍体马铃薯 USW4 和 *Solanum chacoense* 杂交产生的 F_1 株系 XD-3 为材料, 检测其 $2n$ 花粉产率和花粉活力。研究结果表明, XD-3 能产生 $2n$ 花粉, $2n$ 花粉产率约 7.7%, 且花粉活力较高, 达 74.75%。在此基础上, 开展了 $4x-2x$ 杂交, 进行了 4 个不同的杂交组合, 平均杂交结实率为 36.5%, 但平均种子数/浆果仅 0.67 粒。4 个不同的杂交组合共获得 19 个杂交后代, 2 对父本特异的 SSR 引物检测结果表明, 有 14 个株系可以确认为真杂种; 杂种植株的倍性检测结果表明, 7 个为三倍体, 7 个为四倍体。大量三倍体的产生为 n 花粉的直接利用提供了一条新思路。

关键词: 马铃薯; $2n$ 花粉; $4x-2x$ 杂交; 三倍体

Creation of New Potato Germplasms by $4x-2x$ Cross

HUANG Chao, LI Gege, YE Long, LIU Jun, CAI Xingkui*

(College of Horticulture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (HAU), Ministry of Education/National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Diploid 'XD-3', a F_1 progeny from a cross of *Solanum chacoense* and cultivated diploid 'USW4', was crossed to four tetraploid potato varieties ($2n = 4x$) as male parent. The results showed that diploid 'XD-3' produced 7.7% $2n$ gamete and pollen viability was 74.75%. However, the total pollination efficiency was low and the average successful pollination percentage over four different cross combinations was 36.5%, and the average seed number per berry was 0.67. The identification results of the progenies showed that 14 out of 19 were hybrids which exhibited SSR specific bands of 'XD-3'. The analysis of the ploidy showed that seven hybrids were triploid and seven were tetraploid. The triploid might provide a new approach to make use n pollen of wild species directly.

Key Words: potato; $2n$ pollen; $4x-2x$ cross; triploid

在马铃薯资源中, 74%野生种和近缘栽培种为二倍体^[1]。二倍体野生种具有抗病、抗虫、抗霜冻、抗干旱等突出的目标性状。因此是改良马铃薯普通栽培种极其有用的资源。育种家们尝试将二倍体与四倍体进行杂交, 但是二者的胚乳平衡数(Endosperm balance number, EBN)不同。马铃薯普通栽培种的EBN是4, 而大多数二倍体野生种的EBN是2, 在开展 $4x-2x$ 杂交时, 其胚乳平衡数比

值为4:1, 偏离了2:1, 根据 Johnston 等^[2]提出的假说, 如果胚乳中母本和父本的EBN比值不等于2:1, 就会发生胚乳退化现象, 很难或者不能产生有性后代。因此, 将马铃薯普通四倍体与二倍体野生种直接杂交很难获得成功。

马铃薯 $2n$ 配子的发现为利用二倍体野生资源, 扩大栽培种的遗传基础提供了可能。 $2n$ 配子即不减数的配子, 在植物界广泛存在。Mok 和

收稿日期: 2015-07-11

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目(2015CFA104); 公益性行业专项(201303007); 教育部创新团队项目(IRT13065)。

作者简介: 黄超(1988-), 男, 硕士研究生, 从事马铃薯遗传育种研究。

*通信作者(Corresponding author): 蔡兴奎, 副教授, 博士, 主要从事马铃薯种质资源研究, E-mail: caixingkui@mail.hzau.edu.cn。

Peloquin^[3]根据 2n 配子的遗传效应，将其分为两大类，即FDR(First division restitution，第一次分裂重组)型和SDR(Second division restitution，第二次分裂重组)型。关于马铃薯 4x-2x 杂交，前人已有很多相关的报道^[4,5]。本研究以栽培种双单倍体 USW4 × *Solanum chacoense* 杂交产生的一个 F₁ 株系(命名 XD-3)为试验材料，开展 4x-2x 杂交，旨在探索 4x-2x 杂交的授粉效率，为马铃薯野生资源的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

二倍体材料 XD-3 为二倍体马铃薯 USW4 × *S. chacoense* 杂交产生的 F₁ 植株；马铃薯四倍体栽培种有 冀张薯 8 号 (J8)、 郑薯 5 号 (Z5)、 鄂薯 5 号 (E5)、 会薯 2 号 (H2)、 鄂薯 3 号 (E3) 和 华恩 1 号 (HE1)。

1.2 试验方法

1.2.1 材料种植

2013 年 10 月，将生长 4 周左右的试管苗移栽到 30 cm × 30 cm 的塑料钵中(栽培基质为 1:1 的营养土和泥炭土)，每份材料种植 10 钵，每钵 2 株。试验在华中农业大学蔬菜改良中心华中分中心的玻璃温室内进行，于 2014 年 2~4 月完成杂交。

1.2.2 XD-3 的 2n 花粉和花粉活力检测

从刚开放的花蕾中采集花粉，每个株系随机选取 3 个植株，每株采集 3 个花蕾，将 9 朵花的花粉混匀，用棉棒蘸取少许花粉弹在载玻片上，用 1% 醋酸洋红染色 5 min，轻轻盖上盖玻片，在普通显微镜下统计可育花粉的比率。醋酸洋红染色可育花粉为红色，不育花粉染不上色且形状不规则，以 郑薯 5 号 、 鄂薯 3 号 、 鄂薯 5 号 和 华恩 1 号

的花粉为对照。2n 花粉检测时，按照吕文河等^[6]报道的标准进行，至少观察 200 个花粉粒，测定 2n 花粉粒的数量。

1.2.3 杂交授粉与种子处理

马铃薯杂交授粉在上午 9~11 点完成。将获得的浆果用 0.1% 的升汞消毒 5 min，无菌水漂洗 3 次；在工作台内切开，直接取种子置于 MS 无糖培养基附加 1.5 mg/L GA₃ 上，放置于培养温度(23 ± 1) °C，光周期 16 h/d，光照强度 3 000~4 000 lx 的培养室内培养；待种子发芽后，进行单株扩繁，对应编号。编号方法如冀张薯 8 号 × XD-3 的后代，第一个植株为 J8XD-1，依次类推；鄂薯 5 号 × XD-3 的后代为 E5XD-1 等。

1.2.4 4x-2x 后代的杂种鉴定

利用小量提取法提取植株的基因组 DNA。利用父本特异的 SSR 引物进行扩增，扩增反应程序为 95 °C 预变性 3 min，95 °C 变性 30 s，T_m 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，第二步到第四步循环 35 次，72 °C 5 min。PCR 扩增产物经 9% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。父本 XD-3 的特异 SSR 引物信息见表 1。

1.2.5 4x-2x 后代的倍性鉴定

采用德国 Partec 公司的 Partec Cystain UV Precise P 试剂盒提取核 DNA 并染色，每次测量的细胞数不少于 5 000 个。植物的倍性与其 DNA 含量成正比，以二倍体野生种 *S. chacoense* 为对照，峰值设置于 50。所有待测植株的 DNA 含量分布曲线由流式细胞仪自动生成。数据分析采用 Partec 公司的 DPAC 软件进行。

1.2.6 数据分析

采用 Excel 计算平均值和标准差；花粉活力先进行反正弦处理，采用 SPSS 进行方差分析，邓肯氏新复极差法(SSR)进行多重比较。

表1 父本特异的 SSR 引物信息
Table 1 Information of specific SSR primers on male parent

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	染色体 Chromosome	退火温度(°C) Annealing temperature
STM1104	TGATTCTCTTGCCTACTGTAATCG	8	57
	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA		
STI0043	CAATGCCAATGTTGCTACTGGT	1	60~54
	ATCCACCAAGACCTCCAGAA		

2 结果与分析

2.1 XD-3 的 2n 花粉和花粉活力检测

XD-3 能否产生 2n 花粉是 4x-2x 杂交的关键, 依据花粉粒直径大小判断其是 n 或 2n 花粉。图 1-A 展示的为 2n 花粉粒, 图 1-B 为 n 花粉粒。在观察统计 701 个 XD-3 花粉粒中, 有 54 个为 2n 花粉粒, 占被检测花粉的 7.7%。



A : 2n 花粉; B : n 花粉。
A: 2n pollen; B: n pollen.

图1 XD-3 的 n 和 2n 花粉粒
Figure 1 n pollen and 2n pollen of XD-3

不同材料的花粉活力检测结果见表 2, 从表 2 中可以看出, XD-3 的花粉活力最高, 达 74.75%, 且显著高于对照品种, 表明 XD-3 花粉的孕性最强, 适宜做父本。

2.2 4x-2x 杂交

以 XD-3 为父本, 与 4 个不同的马铃薯栽培种杂交结果见表 3。从表 3 中可以看出, 不同杂交组合的结实率差异较大, 以 冀张薯 8 号 为母本时最高达 51.1%, 而 郑薯 5 号 为母本时最低, 仅 10.4%, 平均的结实率为 36.5%。总的来说, 每浆果的种子数较少, 大部分浆果内部变黑坏死; 以 会薯 2 号 为母本时, 每浆果种子数最高, 达 5.67 个, 而以 冀张薯 8 号 为母本时最低, 仅 0.26 个, 平均每浆果种子数为 0.67 个。不同杂交组合的种子发芽率也不高, 大部分种子发育不正常, 并没有生命力, 发芽率为 5.88%~40.00%, 平均为 25.00%。4 个不同的杂交组合共获得 19 个杂交后代。

2.3 4x-2x 杂交后代的鉴定

本研究条件下所获得 19 个杂交后代, 是否为真杂种? 利用父本特异的 SSR 引物进行扩增,

表2 不同材料的花粉活力的比较

Table 2 Comparison of pollen vigor on different potato materials

材料名称 Genotype	总花粉数 No. of total pollen	有活力花粉数 No. of vital pollen	花粉活力(%) Pollen viability
XD-3	701	524	74.75 ± 11.57 a
郑薯 5 号 Zhengshu 5	1 002	676	67.47 ± 9.86 b
鄂薯 5 号 Eshu 5	691	463	67.00 ± 15.13 b
鄂薯 3 号 Eshu 3	1 733	1 119	64.57 ± 8.08 b
华恩 1 号 Huaen 1	1 169	699	59.79 ± 12.82 c

注: 表中数据为平均数±标准差, n = 3。不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。
Note: Data are the mean ± standard deviation. n = 3. Different small letters indicate significant differences at 0.05 level.

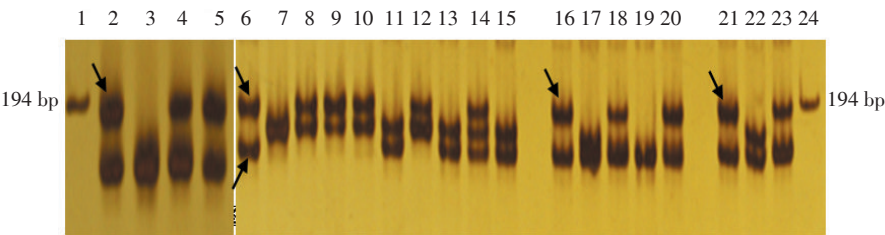
表3 4x-2x 杂交授粉情况

Table 3 Results of 4x-2x cross

母本 Female	父本 Male	授粉花数 Pollination	浆果数 No. of berry	结实率(%) Fruit setting percentage	种子数 No. of seed	种子数/浆果 Seed per berry	植株数 No. of plant	发芽率(%) Germination percentage
冀张薯 8 号 Jizhangshu 8	XD-3	188	96	51.1	25	0.26	10	40.00
鄂薯 5 号 Eshu 5	XD-3	34	7	20.6	20	2.86	5	25.00
郑薯 5 号 Zhengshu 5	XD-3	67	7	10.4	14	2.00	3	21.43
会薯 2 号 Huishu 2	XD-3	21	3	14.3	17	5.67	1	5.88
总计 Total		310	113	—	76	—	19	—
平均 Average		—	—	36.5	—	0.67	—	25.00

STM1104的扩增结果见图2。图2中的箭头所示为父本的特异带型，大小约190 bp；另 冀张薯8号 与 XD-3 杂交组合中，XD-3 还扩增出另一条约170 bp的特征带。只要在后代中检测出父本的特异性条带，即可确认为杂种。

利用2个SSR引物检测的结果列于表4，√表示具有父本的特征带，而×表示不具有父本的特征带；在被检测的19个株系中，有14个株系可以确认为真杂种，另外J8XD-8、J8XD-11、E5XD-2、E5XD-4和E5XD-7尚不能确定其是否为杂种。



1, 24 : MarkerφX174-Hae III; 2, 6, 16, 21 : XD-3; 3 : 鄂薯5号 (Eshu 5); 4 : E5XD-3; 5 : E5XD-5; 7 : 冀张薯8号 (Jizhangshu 8); 8 : J8XD-1; 9 : J8XD-3; 10 : J8XD-4; 11 : J8XD-6; 12 : J8XD-7; 13 : J8XD-9; 14 : J8XD-10; 15 : J8XD-12; 17 : 郑薯5号 (Zhengshu 5); 18 : Z5XD-4; 19 : Z5XD-5; 20 : Z5XD-6; 22 : 会薯2号 (Huishu 2); 23 : H2XD-1。

图2 引物STM1104对4个杂交组合的扩增结果
Figure 2 The amplification results of progeny and their parents with primer STM1104

表4 不同引物对杂交后代的扩增结果
Table 4 Amplification results of hybrids with different primers

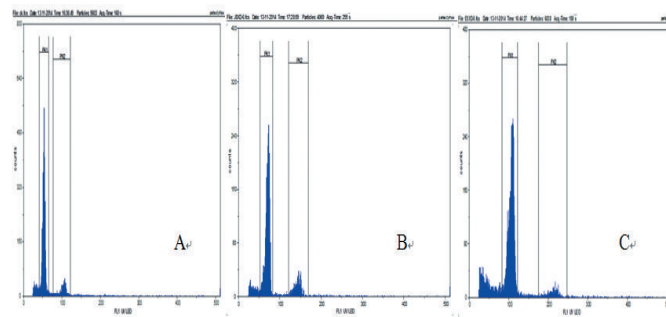
亲本及杂交后代 Parent and offspring	引物 Primer		倍性 Ploidy	是否为杂种 Hybrid (yes/no)	亲本及杂交后代 Parent and offspring	引物 Primer		倍性 Ploidy	是否为杂种 Hybrid (yes/no)
	STM1104	STI0043				STM1104	STI0043		
冀张薯8 Jizhangshu 8	×	×	4x	母本	E5XD-2	×	×	4x	-
J8XD-1	√	√	4x	是	E5XD-3	√	√	3x	是
J8XD-3	√	√	4x	是	E5XD-4	×	×	4x	-
J8XD-4	√	√	3x	是	E5XD-5	√	√	4x	是
J8XD-6	√	×	3x	是	E5XD-7	×	×	4x	-
J8XD-7	√	√	3x	是	郑薯5号 Zhengshu 5	×	×	4x	母本
J8XD-8	×	×	3x	-	Z5XD-4	√	√	4x	是
J8XD-9	√	√	3x	是	Z5XD-5	×	√	4x	是
J8XD-10	√	√	4x	是	Z5XD-6	√	√	3x	是
J8XD-11	×	×	3x	-	会薯2号 Huishu 2	×	×	4x	母本
J8XD-12	√	√	3x	是	H2XD-1	√		4x	是
鄂薯5号 Eshu 5	×	×	4x	母本	XD-3	√	√	2x	父本

注：√表示有父本的特征带，×表示无父本的特征带，-表示为不能确认。
Note: √ means it has specific band of male parent; × means it has not specific band of male parent; - means it is not sure.

2.4 倍性鉴定

采用流式细胞仪对14个体细胞杂种进行了倍性鉴定，将对照二倍体的峰值设置在50(图3-A)，则测定峰值为75表示为三倍体(图3-B)，峰值为

100表示为四倍体(图3-C)。鉴定结果显示，14个被检测植株中，有7个株系为四倍体，7个株系为三倍体。推测产生三倍体的原因是XD-3的n(n=1x)花粉与2x雌配子结合，发育而成的完整植株。



A: XD-3(2x), 峰值 50; B: J8XD-6(3x), 峰值 75; C: E5XD-5(4x), 峰值 100。

A: XD-3(2x), peak at 50; B: J8XD-6(3x), peak at 75; and C: E5XD-5(4x), peak at 100.

图3 流式细胞仪分析倍性

Figure 3 Ploidy analysis by flow-cytometry

3 讨论

2n 配子的产生是减数分裂异常导致的结果,也是植物在长期进化过程中自身对环境的一种适应行为^[7]。研究表明,2n 配子的产率高低受植物年龄、极端温度、日照长度、季节和肥料等多种因素影响^[8-10]。吕文河等^[6]测定了 92 份二倍体马铃薯野生种的 2n 配子产率,并与四倍体栽培种 春薯 5 号或大西洋 (Atlantic) 杂交,统计杂交授粉的浆果数和单果种子数。研究结果表明,选择 2n 配子产率高的二倍体作父本可以提高 4x-2x 杂交的坐果率和种子数/浆果。肖增宽等^[11]开展了 3 个 4x-2x 杂交组合研究,3 个杂交组合的平均种子数/浆果达 29.05 粒,其对应的 3 个二倍体材料平均 2n 花粉产率为 54.27%。本研究中 XD-3 的 2n 配子率仅为 7.7%,远远低于报道的 2n 配子产率^[6,11],产生的种子数/浆果也很低,高的组合 5.67 粒,低的组合 0.26 粒,平均 0.67 粒。推测可能的原因是少数的 2n 花粉与母本的雌配子结合,形成正常的四倍体种子;而大部分的雌配子只能与 n 花粉结合,形成三倍体胚,这些三倍体的胚可能无法正常发育而导致败育,最终未能形成种子。因此提高二倍体 2n 花粉的产率,可以提高雌配子与 2n 花粉相遇结合的概率,从而提高杂交授粉的坐果率和单果种子数,这对于利用 4x-2x 杂交育种转移二倍体的优良性状是十分必要的。

自然界中产生三倍体马铃薯是比较困难的,三倍体来源有两个途径,一是二倍体通过已减数配子与未减数配子融合形成,二是通过四倍体和二倍体杂交而形成^[12]。例如, Hawkes^[13]认为三倍

体 *S. chaucha* 是二倍体 *S. phureja* 或 *S. stenotomum* 和四倍体 *S. tuberosum* 的杂交后代;在南美洲的二倍体马铃薯种中,产生 2n 配子的现象很普遍,这就更容易发生不同倍性水平马铃薯种间的基因流动^[13,14]。然而在 4x-2x 杂交时,后代多为四倍体,这是因为 2x 雌配子在与 x 配子受精过程中产生了五倍体的胚乳,而五倍体胚乳是没有生活力的,所以较难获得三倍体后代^[2]。Vanbreukelen^[15]利用活体荧光技术比较了富利亚种 2n 花粉和 n 花粉在柱头上生长快慢的研究结果表明,2n 花粉都比 n 花粉生长快,使得 2n 花粉受精的胚珠数多,从而可以解释 4x-2x 产生大量四倍体杂种的原因。在本研究中,4 个不同的杂交组合共获得 19 个杂交后代,2 对父本特异的 SSR 引物检测结果表明,有 14 个株系可以确认为真杂种;杂种植株的倍性检测结果表明,7 个为四倍体,7 个为三倍体。三倍体植株在地里种植,生长势良好,部分的三倍体植株能够正常的开花,且花粉具有正常活力。假设这些三倍体种植可以直接和四倍体杂交,将为利用 n 花粉直接和四倍体杂交,转移其优良性状,为马铃薯栽培种的遗传改良提供更多的材料,为不能产生 2n 配子的二倍体野生种利用提供了新途径。

[参 考 文 献]

- [1] International Potato Center. The report of the planning conference of the exploration, taxonomy and maintenance of potato germplasm III [C]. Peru: International Potato Center, 1974: 1-194.
- [2] Johnston S A, den Nijs T P M, Peloquin S J, et al. The significance

- of genic balance to endosperm development in interspecific crosses [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1980, 57: 5-9.
- [3] Mok D W S, Peloquin S J. The inheritance of three mechanisms of diplandroids (2n pollen) formation in diploid potatoes [J]. Heredity, 1975, 35: 295-307.
- [4] Qu D. Use of unreduced gametes of diploid potato (*Solanum tuberosum*) for true potato seed production through 4x-2x crosses [D]. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1996.
- [5] Mok D W S, Peloquin S J. Breeding value of 2n pollen (diplandroids) in tetraploid $\times$ diploid crosses in potato [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1975, 46: 307-314.
- [6] 吕文河, 王亮, 陈伊里, 等. 二倍体马铃薯主要农艺性状及其2n花粉频率的表现 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13(2): 67-70.
- [7] 屈冬玉. 2n配子在马铃薯育种中的应用 [J]. 马铃薯杂志, 1988, 2(2): 102-105.
- [8] Veilleux R. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding [J]. Plant Breeding Review, 1985, 3: 253-288.
- [9] Ramsey J, Schemske D W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants [J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 1998, 29: 467-501.
- [10] Mchale N A. Phenotypic variation for 2n pollen in *S. phureja* [J]. American Potato Journal, 1982, 59: 479-480.
- [11] 肖增宽, 陈伊里, 李景华. 马铃薯倍性鉴定与2n配子材料筛选方法 [J]. 东北农学院学报, 1986, 17(2): 113-120.
- [12] Woodell S R J, Valentine D H. Studies in British Primulas. IX. Seed incompatibility in diploid-autotetraploid crosses [J]. New Phytologist, 1961, 60: 282-294.
- [13] Hawkes J G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources [M]. London: Belhaven Press, 1990.
- [14] Watanabe K, Peloquin S J. The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x, and 6x wild, tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 82: 621-626.
- [15] Vanbreukelen E W M. 快速测定活体马铃薯花柱上2x和x花粉间的竞争 [J]. 董延瑜译. 杂粮作物, 1984(3): 26-27.

2014年优秀论文评选结果

为鼓励大家热爱马铃薯研究, 积极投稿《中国马铃薯》杂志或《中国马铃薯大会》论文集, 《中国马铃薯》杂志编辑部受中国作物学会马铃薯专业委员会的委托, 组织有关专家进行了优秀论文的评选活动。评选对象是年轻人(具有中级职称或以下的科研人员以及研究生)。评选范围是2014年发表在《中国马铃薯》杂志和《马铃薯产业与小康社会建设》一书中的研究性论文。经过认真评选, 共评出优秀论文12篇, 其中一等奖2篇, 二等奖4篇, 三等奖6篇。

一等奖:

- (1) 马铃薯青枯病原的鉴定 郑雪焄等
- (2) 马铃薯粉痂菌诱饵植物筛选及环境对病害发生的影响 刘霞等

二等奖:

- (1) 利用晚疫病无毒基因瞬时表达技术鉴定马铃薯抗病基因 周晶等
- (2) 有机水溶肥料与无机肥料配施对马铃薯产量、养分吸收和品质的影响 李鸣凤等
- (3) 生物黑炭对马铃薯块茎形成期根际物理性状及速效养分的影响 刘志华等
- (4) 原原种的块茎大小对马铃薯的农艺性状、繁殖系数和产量的影响 李勇

三等奖:

- (1) 自主研发强制通风自控仪在新型农户马铃薯贮藏窖中的初步应用效果研究 李守强等
- (2) 不同化学防控策略防治马铃薯晚疫病探索试验 肖春芳等
- (3) 叶柄硝态氮含量与炸条型马铃薯块茎干物质含量的关系 姜丽丽等
- (4) 黑龙江省马铃薯主栽品种遗传多样性的RAPD分析 赵光磊等
- (5) 中国马铃薯主产区植地土壤养分初步评价 陈明玮等
- (6) 马铃薯品种(系)晚疫病抗性鉴定 王鹏等

为表彰他们对中国马铃薯产业发展所做出的突出贡献, 中国作物学会马铃薯专业委员会决定, 对优秀论文获奖者颁发荣誉证书, 并对一、二、三等奖获得者分别奖励人民币3000元、2000元、1000元, 奖金由大庆金辉农业科技开发有限公司赞助。

中国作物学会马铃薯专业委员会