

利用体细胞杂交获取马铃薯软腐病的抗性

司怀军¹, 张宁¹, 王蒂², Conner A J³

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070;
3. Lincoln University, Christchurch, New Zealand)

摘要: 对马铃薯四倍体栽培种和二倍体野生种 *Solanum brevidens* 的体细胞杂种通过叶片离体培养获得的四倍体植株, 以及用四倍体栽培种进行回交获得的五倍体植株的块茎对软腐病的抗性进行了测定。结果表明, 由体细胞杂种通过叶片组织离体培养再生植株中, 有一个株系 SC107 对软腐病菌 *Erwinia carotovora* 具有较强的抗性。在用不抗软腐病的马铃薯栽培种对体细胞杂种进行回交获得的杂种后代中, 大部分株系对软腐病菌具有高水平的抗性, 从而说明 *Solanum brevidens* 对软腐病的抗性基因已转移到马铃薯栽培种。

关键词: 马铃薯; 体细胞杂交; 软腐病; *Solanum brevidens*

马铃薯软腐病 (Potato soft rot) 是一种细菌性病害, 其病源主要为 *Erwinia carotovora* Jones^[1]。软腐病常引起马铃薯生育后期和贮藏期的薯块腐烂现象, 造成丰产不能丰收, 严重的影响马铃薯产量和品质。马铃薯的茎、叶和块茎都能受害。植株上的病斑是暗褐色条斑, 严重时茎髓部腐烂, 形成中空而倒伏。块茎发病后, 表皮呈淡褐色, 严重时块茎软化腐烂, 汁液发出特殊的臭味^[2]。马铃薯栽培品种中缺乏对该病害的抗源, 不结块茎的马铃薯二倍体野生种 *Solanum brevidens* 对软腐病等许多病虫害具有高水平的抗性, 但与马铃薯栽培种有性杂交很难成功^[2]。通过体细胞杂交技术可将其抗性基因转移到马铃薯栽培种中^[3-4]。Conner^[5]获得了马铃薯四倍体栽培种和 *S. brevidens* 的体细胞杂种植株, 并对体细胞杂种植株叶片进行组织培养获得了四倍体植株以及用四倍体栽培种进行回交获得了五倍体植株, 本文将报道这些体细胞杂种衍生后代对软腐病的抗性, 从而为马铃薯软腐病的抗性育种提供一条有效途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

马铃薯四倍体栽培种品系 CR4#2 ($2n=4x=48$)

收稿日期: 2005-12-29

作者简介: 司怀军 (1971-), 男, 博士, 副教授, 主要从事马铃薯生物技术育种的研究。

和二倍体野生种 *S. brevidens* ($2n=2x=24$) 的原生质体融合获得了六倍体体细胞杂种 A206 ($2n=6x=72$), 对体细胞杂种 A206 的叶片组织进行离体培养, 获得了四倍体株系 SC93 和 SC107 ($2n=4x=48$)。用马铃薯四倍体栽培种品系 2390 ($2n=4x=48$) 做父本与 A206 进行回交, 获得了五倍体回交后代 A20A、A20B、A20C、A20D、A20G、A20H、A20I、A20J、A20L、A20M 等 (图 1)^[5]。Gladiator 为感病对照四倍体栽培品种。



图 1 马铃薯体细胞杂种及其衍生后代系谱

1.2 田间试验

试验在新西兰皇家作物与食品研究所 (New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited,

Canterbury, New Zealand) 试验地进行。块茎采用随机区组法种植, 3 次重复, 每个株系种 1 行, 每行 10 株, 株距 30 cm, 行距 75 cm。种植后 4~6 周内起垄一次, 田间管理同大田生产。

1.3 软腐病抗性测定

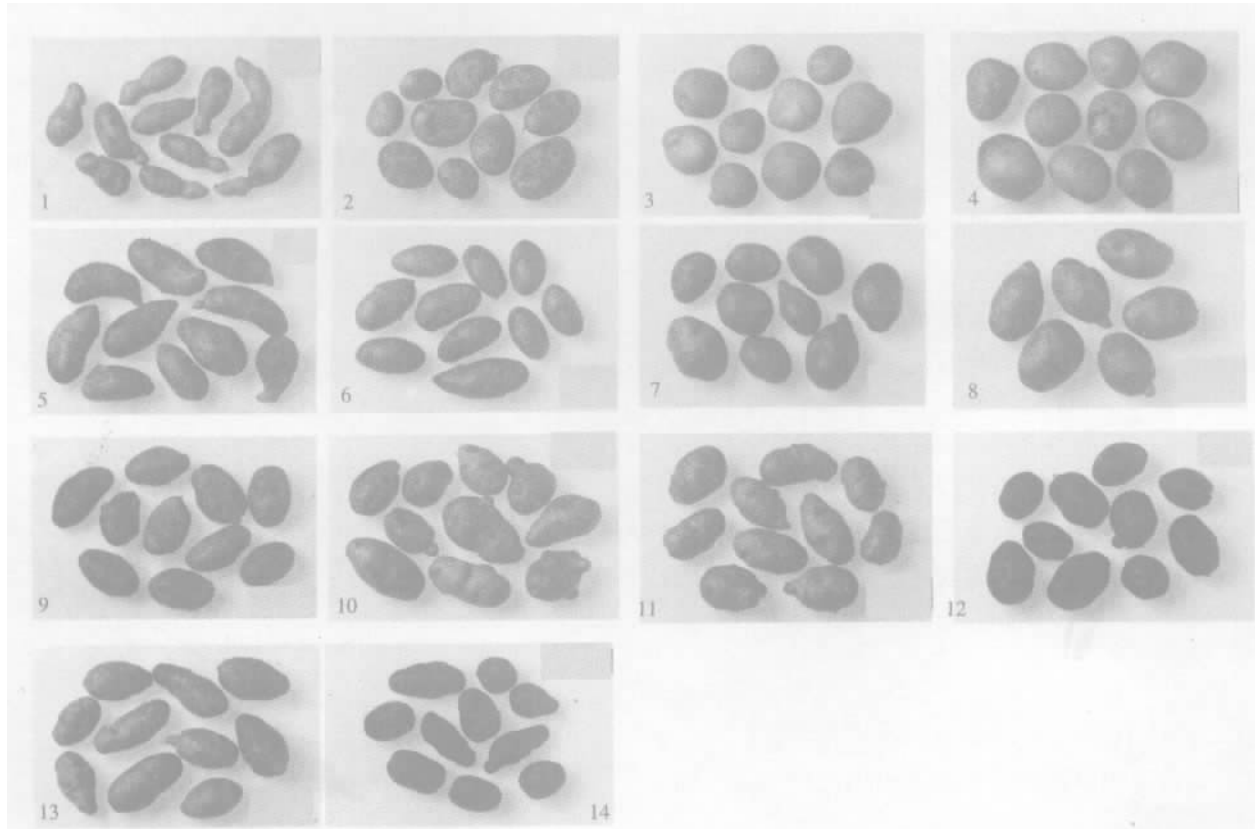
块茎收获后在 10℃ 下贮藏 6 周左右, 块茎软腐病抗性的生物学测定按照 Wright 等方法进行^[6]。将软腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* (ICMP 8975)^[7]接种于 50 mL LB 培养基中, 于 28℃ 下培养过夜, 培养物于 8000 r·min⁻¹ 下离心收集菌体, 弃去上清液, 将菌体重悬浮于 100 mL 蒸馏水中备用。每个株系取 10 个重约 100 g 的块茎进行抗性测定。块茎接种方法为: 用直径 3 mm 的打孔器在块茎中部打 10 mm 深的小孔, 然后用微量进样器加入 50 μL 的上述稀释菌液, 再重新放入用打孔器取出的块茎组织, 用凡士林密封后将块茎置于塑料盒中, 在 22℃ 下放置一周。接种完毕后, 对每一个块茎的重量进行测定。放置一周后, 将腐烂的块茎组织用水洗掉, 然后用吸水纸将水分吸干, 重新进行重量测定。块茎对软腐病的抗性用腐

烂组织除去后块茎重量的损失来评估。用 Microsoft Excel 对数据进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 马铃薯体细胞杂种衍生后代块茎的获得

对获得的马铃薯四倍体栽培种和不结块茎的二倍体野生种 *S. brevidens* 的体细胞杂种植株, 进行叶片组织离体培养获得了四倍体植株以及用四倍体栽培种进行回交获得了五倍体植株, 其中大部分植株能产生块茎^[5], 并且形成的块茎在形态和皮色方面呈现出一定的变异。由体细胞杂种 A206 通过叶片组织离体培养获得的 2 个株系 SC93 和 SC107 的薯形由 A206 的长形变成了圆形, 并且块茎体积增大。在获得的 10 个回交杂种后代中, 块茎皮色呈现出较大的变异, 部分株系如 A20A、A20C 和 A20E 的块茎皮色为紫红色; 部分株系如 A20B、A20D、A20G、A20H 和 A20L 的块茎皮色为淡紫红色; 而株系 A20J 和 A20M 的块茎皮色为紫黑色, 这与对照体细胞杂种 A206 的块茎皮色白色带紫红色斑点相比差异较大(图 2)。



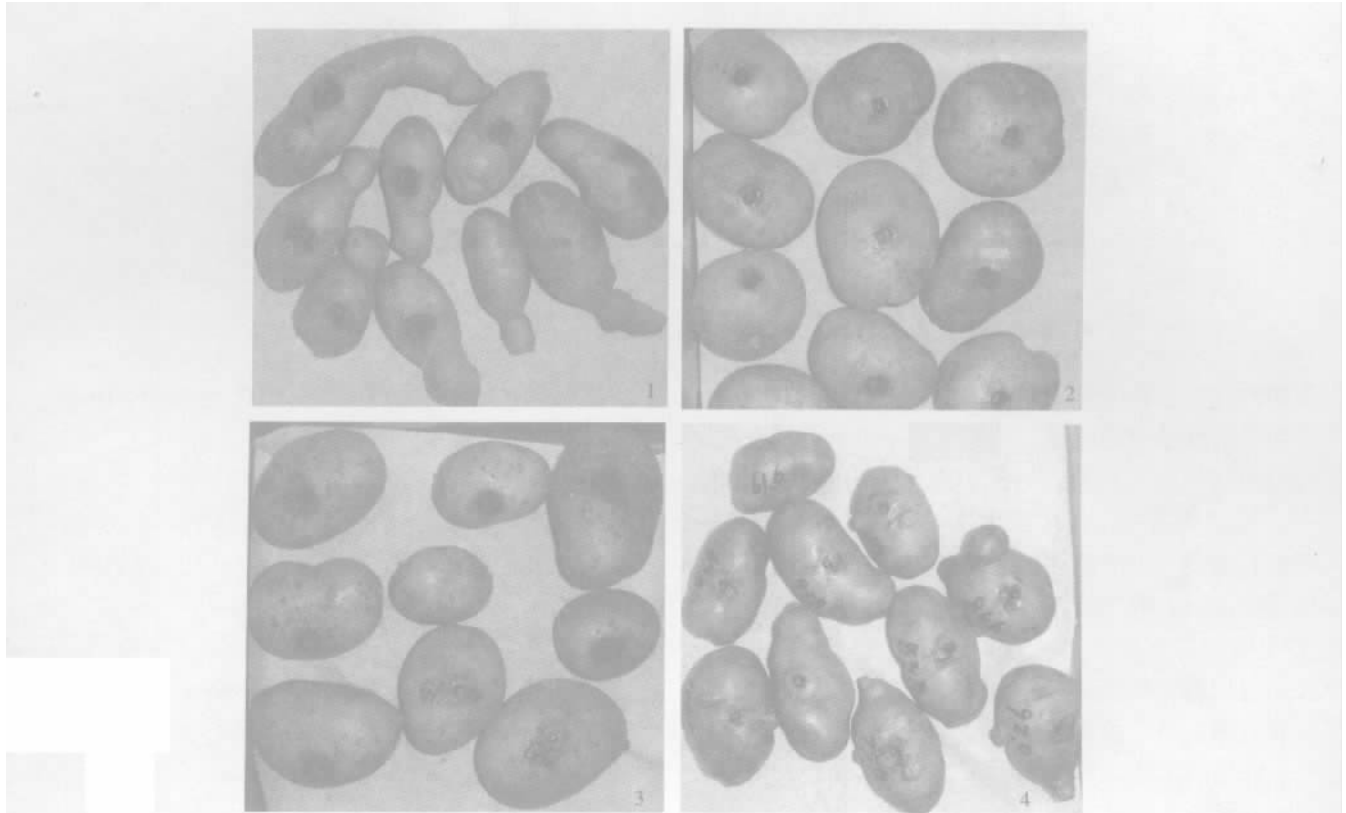
1. 体细胞杂种 A206; 2. 感病对照品种 Gladiator; 3 和 4. A206 叶片组织培养再生株系 SC93 和 SC107; 5~14. 回交后代。

图 2 马铃薯体细胞杂种部分衍生后代产生的块茎

2.2 软腐病菌对马铃薯块茎的侵染

用软腐病原菌 *E. carotovora* subsp. *atroceptica* 接种后一周左右进行观察, 发现抗软腐病株系的块茎接种部位的组织不变软, 只有极少部分组织受到

侵染腐烂, 在病变组织与健康组织间存在明显的界限(图 3-1, 2); 不抗软腐病株系的块茎接种部位周围的组织变软腐烂, 呈浅黄色或褐色(图 3-3, 4)。



1. 体细胞杂种抗病株系 A206; 2. A206 叶片组织培养再生的抗病株系 SC107; 3. 感病对照品种 Gladiator; 4. 回交后代感病株系 A20H。

图 3 软腐病菌对马铃薯块茎的侵染

2.3 块茎软腐病抗性的测定

对马铃薯体细胞杂种 A206 部分衍生后代软腐病的抗性进行了测定(图 4), 结果表明: 由体细胞杂种 A206 通过叶片组织离体培养获得的 2 个株系中, SC93 不抗马铃薯软腐病, 用软腐病菌 *E. carotovora* subsp. *atroceptica* 接种后, 块茎组织的损失重量平均为 3.32 g, 与对照感病品种 Gladiator(块茎损失重量为 3.97 g) 无显著差异; 而 SC107 块茎组织的损失重量平均仅为 1.01 g, 与对照感病品种 Gladiator 差异显著。在用不抗软腐病的马铃薯栽培种 2390 对体细胞杂种 A206 进行回交得到的杂种后代中, 大部分株系如 A20A、A20B、A20C、A20D、A20I、A20J、A20L、A20M 对软腐病菌有较强的抗性, 与对照感病品种 Gladiator 间存在明显差异, 而与 A206 抗性相近, 其中接种后块茎组

织损失重量最少的一个株系 A20B 只有 0.33 g。在杂种后代中有 2 个株系 A20G 和 A20H 对软腐病菌的抗性与对照感病品种 Gladiator 无明显差异, 其块茎组织损失重量分别为 3.84 g 和 4.06 g。

3 讨论

马铃薯软腐病是一种比较严重的细菌性病害, 在马铃薯栽培种中缺乏对软腐病菌 *E. carotovora* 的抗性基因, 但在马铃薯野生种中存在对软腐病菌高水平抗性的基因。Zimoch-Guzowska 等^[8]的研究结果表明, 马铃薯对软腐病的抗性遗传模式比较复杂, 涉及到的许多基因分布于整个马铃薯基因组的 12 条染色体上。在马铃薯资源中, 大多数野生种(约 75%) 为二倍体, 直接与四倍体栽培品种杂交很难成功。因此, 用常规育种方法提高马铃薯对软

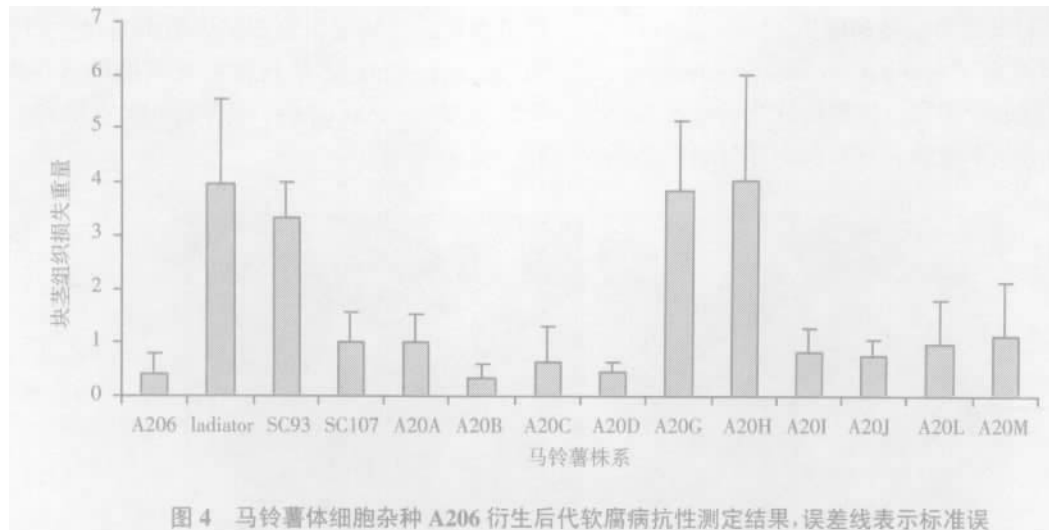


图4 马铃薯体细胞杂种 A206 衍生后代软腐病抗性测定结果, 误差线表示标准误

腐病的抗性非常困难。通过体细胞杂交技术可将与马铃薯有性杂交难以成功的野生种所具有的优良抗性基因转移到马铃薯栽培种中^[9]。在马铃薯野生种中, 不结块茎的二倍体野生种 *S. brevidens* 对软腐病菌具有高水平的抗性, 但与马铃薯有性杂交很难成功。Austin 等^[10] 通过体细胞杂交技术获得了四倍体马铃薯栽培种与 *S. brevidens* 的体细胞杂种, 并通过用栽培种回交的方法获得了对软腐病和早疫病具有高抗的马铃薯新材料。

在植物组织培养过程中, 普遍存在体细胞无性系变异现象, 这是由于染色体数目和结构变化、同源重组、基因重排和基因转座等原因所引起。在本实验中, 由不抗软腐病的四倍体栽培种与 *S. brevidens* 的体细胞杂交获得了抗软腐病的六倍体体细胞杂种 A206, 然后对 A206 进行叶片离体培养, 再生出了四倍体植株, 其染色体数目发生了变化, 并且其中 SC107 株系对软腐病具有较强的抗性, 说明在其基因组中含有 *S. brevidens* 与软腐病抗性相关的染色体或基因。Conner^[5] 用四倍体栽培种与 A206 进行回交, 获得了能产生块茎的五倍体植株, 其中大部分株系对软腐病具有高水平的抗性 (图4), 从而说明在回交后代中保留了 *S. brevidens* 与软腐病抗性相关的基因。这些材料可进一步用于马铃薯软腐病抗性育种的研究。

[参 考 文 献]

[1] Rich A E. Potato diseases [M]. New York: Academic Press, 1983.

- [2] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [3] Helgeson J P, Haberlach G T, Ehlenfeldt M K, et al. Sexual progeny of somatic hybrids between potato and *Solanum brevidens*: potential for use in breeding programs [J]. *Am Potato J*, 1993, 70: 437-452.
- [4] Tek A L, Stevenson W R, Helgeson J P, et al. Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 249-254.
- [5] Conner A J. Somatic hybrids- a GE alternative? An example in potato [J]. *Grower*, 2003(12): 38-40.
- [6] Wright P J, Crowhurst R N, Anderson J A D, et al. Evaluation of potato cultivars and breeding lines for susceptibility to tuber soft rot induced by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* [J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1991, 19: 187-190.
- [7] Young J M, Fletcher M J. International collection of micro-organisms from plants [M]. 3rd ed. Auckland: Landcare Research, 1997.
- [8] Zimnoch-Guzowska E, Marczewski W, Lebecka R, et al. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers [J]. *Crop Sci*, 2000, 40: 1156-1167.
- [9] 司怀军, 王蒂. 马铃薯种间体细胞杂种的育性和遗传改良 [J]. *作物学报*, 2003, 29(2): 280-284.
- [10] Austin S, Lqjkowska E, Ehlenfeldt M K, et al. Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum*: a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot [J]. *Phytopathology*, 1988, 78: 1216-1220.

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)04-0197-03

应用 PCR 技术快速检测马铃薯环腐病菌

胡林双, 何云霞, 郭梅, 王晓丹, 闵凡祥

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 根据马铃薯环腐病菌 16S rDNA 基因片段核苷酸序列设计引物 (引物 1 5'-TGTA CTGGCCAT-GACGTTGG-3 和引物 2 5'-TACTGGGTCATGTTGGT-3), 进行马铃薯环腐病菌 PCR 特异性扩增试验。合成的引物能从马铃薯环腐病菌总基因组 DNA 和细菌纯培养, 以及人工接种和自然发病的马铃薯块茎中特异性扩增环腐病菌 16S rDNA 基因片段 1046 bp。该试验结果为马铃薯环腐病的鉴定、检测及病害流行病学研究提供了新的技术和方法。

关键词: 马铃薯; 环腐病; 检测; PCR

马铃薯环腐病 (Potato ring rot) 是由 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 引起的细菌性病

害, 它是马铃薯生产上危害最大的病害之一, 在全国各地都有分布, 每年都造成重大损失。近几年来, 在全国马铃薯主产区环腐病普遍发生, 危害日趋严重。环腐病主要通过种薯传播蔓延, 而种薯带菌又是马铃薯环腐病历年发病和远距离传播的主要侵染源, 由此可见, 控制种薯病原菌是防治环腐病蔓延的重要措施。马铃薯环腐病菌侵染在马铃薯块

收稿日期: 2006-02-22

基金项目: 国家科技部重点基础研究发展规划 (973) 资助项目 (2001CCC02900)

作者简介: 胡林双 (1977-), 男, 硕士研究生, 助理研究员, 从事马铃薯病害检测技术研究。

Transfer of Tuber Soft Rot Resistance from *Solanum brevidens* into Cultivated Potato by Somatic Hybridization

Si Huaijun¹, Zhang Ning¹, Wang Di², Conner A J³

(1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 3. Lincoln University, Christchurch, New Zealand)

Abstract: Resistance to potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* was tested for tubers of tetraploid potatoes derived from leaf tissue culture of somatic hybrids between tetraploid cultivated potato and diploid wild potato *Solanum brevidens*, and pentaploid potatoes derived from backcross of the somatic hybrids and tetraploid potatoes. The results showed that the plant line SC107 regenerated from leaf tissue culture of somatic hybrids had higher resistance to potato soft rot. Most of the backcrossed progenies developed from cross of somatic hybrids and a susceptible cultivated potato showed high levels of tuber soft rot resistance. The results demonstrated that resistance to potato soft rot was transferred from *Solanum brevidens* to the cultivated potatoes.

Key Words: potato; somatic hybrids; potato soft rot; *Solanum brevidens*