

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)04-0198-06

## 马铃薯体细胞杂种的青枯病抗性鉴定

李 映, 蔡兴奎, 李林章, 谢从华\*

(国家蔬菜改良中心华中分中心, 湖北省马铃薯工程技术研究中心, 园艺植物生物学教育部重点实验室  
华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 本试验对马铃薯四倍体栽培种 (*Solanum tuberosum*) 的双单倍体系 81-15 与二倍体野生种 *S. chacoense* 的原生质体融合株系进行了青枯病抗性鉴定, 其目的是对利用体细胞融合技术获得抗青枯病种质的有效性及抗性鉴定技术进行评价, 获得抗病育种材料。结果表明: 在鉴定的 18 个体细胞融合株系中, 抗性分离表现为从感病(S)到抗病(R), 多数表现为中感(MS)到中抗(MR)水平。田间病圃鉴定、人工接种鉴定和分子标记鉴定的结果显示: 田间病圃鉴定的病情指数(DI)和人工接种鉴定病级(DS)的相关性达到极显著水平( $DI = -0.39 + 4 DS$ ,  $r^2 = 0.921$ ), 双侧翼 SCAR 标记 SCA07<sub>446</sub> 和 SCA12<sub>980</sub> 鉴定同时具有两个标记特异带的株系均为前两种鉴定表现为中感(MS)以上的材料。综合分析同时利用 3 种方法鉴定的结果: CHT-3、CHT-5、CHT-6、CHT-10、CHT-15 等 5 个株系为抗病材料, 证明体细胞融合是利用野生种质资源抗性的有效途径。

**关键词:** 马铃薯; 体细胞杂种; 青枯病; 抗性鉴定

青枯病是由茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的细菌性病害, 可侵害 50 个科的 200 多种植物<sup>[1]</sup>。近年来, 马铃薯种植面积最大的温带地区青枯病已开始蔓延, 寒带地区也有发生<sup>[2]</sup>。我国马铃薯青枯病主要在长江流域及其以南的西南单、双季混作区和南方二季作马铃薯栽培区流行, 每年因此造成的产量损失大约在 10%~30%, 发病严重的地块产量损失可达到 80%乃至绝收<sup>[3]</sup>。

马铃薯抗青枯病育种半个多世纪以来没有取得显著进展, 原因是马铃薯四倍体栽培种中尚未发现对青枯病免疫或高抗的资源<sup>[4]</sup>。种质资源研究表明, 马铃薯二倍体近缘栽培种 *S. phureja*、*S. stenotomum*、*S. goniocalyx* 和二倍体野生种 *S. jamesii*、*S. pirmsisectum* 具有对青枯病的抗性。近年来又从 *S. sparsipilum*、*S. multidissectum*、*S. chacoense*、*S. microdontum* 和 *S. raphanifolium* 等野生种中鉴定出抗青枯病的类型。然而, 在马铃薯二倍体野生种或

近缘栽培种资源的利用中, 由于有性杂交不亲和、花粉不育及胚乳平衡数 (Endosperm Balance Number, EBN) 等因素的影响, 只有少数可与栽培品种进行有性杂交, 大部分杂交困难, 限制了常规方法对这些二倍体野生种或近缘栽培种抗青枯病基因的有效利用。目前, 体细胞融合是利用马铃薯野生和近缘种质资源的重要技术途径, 并取得了一些重要成果<sup>[5]</sup>。本试验的主要目的是对体细胞融合材料利用人工接种鉴定、田间病圃鉴定和分子标记辅助鉴定筛选等方法, 对其青枯病抗性和抗性鉴定技术进行评价, 为完善抗青枯病的细胞工程育种体系提供依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试验材料

试验以马铃薯栽培种的双单倍体系 81-15 与二倍体野生种 *S. chacoense* 的子叶和下胚轴为原生质体来源, 融合产生的 18 份株系为材料, 即 CHT-1、CHT-2、CHT-3、...、CHT-18, 由甘肃农业大学戴朝曦教授惠赠。另以 *S. chacoense* 为抗病对照, 以主栽品种合作-88 为感病对照。材料的繁殖采用单节段组织培养技术, 以 MS 为基本培养基, 附加

收稿日期: 2005-04-19

基金项目: 国家“863”项目(2003AA207130)、国家自然科学基金(38970516)资助。

作者简介: 李映(1972-), 男, 华中农业大学硕士研究生, 现工作单位为贵州省六盘水市钟山区农办。

\* 通讯作者: E-mail: xiech@mail.hzau.edu.cn

2%蔗糖和 0.7%琼脂, pH5.8。培养条件为每天光照 16 h, 光照强度 3000~4000 lx, 温度(20 ±1)。

## 1.2 病原菌

本研究所用青枯病原菌为混合生理小种, 包括生理小种 1 号(生化变种 3 号)和生理小种 3 号(生化变种 2 号), 从贵州省六盘水市马铃薯发病植株上采用 TCZ 专化培养基分离获得<sup>[6]</sup>。

## 1.3 人工接种鉴定

在贵州省六盘水市中山区的塑料大棚内利用盆栽春季进行, 移栽前用甲醛(0.4%)对培养土进行消毒, 施足底肥。每一材料每盆种植 1 株, 3 次重复, 每重复 10 盆。当马铃薯植株长至现蕾左右时, 离植株一侧 3~4 cm 处垂直切下一刀, 深约 6~7 cm 以伤根, 自切口处灌入 30 mL 菌液(细菌数达到  $10^5$ ~ $10^6$  cfu·mL<sup>-1</sup>)。接种后每天观察 1 次, 连续观察 25 d, 记录发病率和发病程度。单个植株病情严重程度(Severity Level, SL)分级参考国际马铃薯中心的标准进行, 即 0 级为无症状; 1 级为 1 片叶萎蔫; 2 级为 2~3 片叶萎蔫; 3 级为植株的 1/2~3/4 叶片萎蔫; 4 级为植株的 3/4 以上叶片萎蔫; 5 级为全部叶片萎蔫, 植株死亡。鉴定材料的病级(Disease Score, DS)计算公式为  $DS = (\text{每个 SL 的植株数} \times \text{相应的 SL}) / \text{总植株数}$ 。接种鉴定材料的抗性水平依据 DS 进行评价, 分级标准参照何礼远<sup>[7]</sup>、梁远发<sup>[8]</sup>的方法略加修订, 即: 抗病(R): 0~1.9; 中抗(MR): 2.0~2.9; 中感(MS): 3.0~3.9; 感病(S): 4.0。

## 1.4 田间病圃鉴定

在六盘水市中山区荷城地区选择上年马铃薯青枯病发病较为严重、中上等肥力、土壤较疏松的地块, 按 60 cm 行距、30 cm 株距整薯播种。试验采用随机区组设计, 3 次重复, 每重复 20 株。在此期间, 记录马铃薯植株生长情况和青枯病发病情况, 观察和记载方法同人工接种鉴定。田间病圃鉴定因有较大群体, 其抗性水平依据病情指数(Disease Index, DI)分为四级, 抗病(R): 0~7.9; 中抗(MR): 8.0~11.9; 中感(MS): 12.0~15.9; 感病(S): 16。DI = (每个 SL 的植株数 × 相应的 SL) / (总植株数 × 最高 SL) × 100%。

## 1.5 分子标记鉴定

利用华中农业大学马铃薯实验室筛选得到的与青枯病抗性连锁的双侧翼标记 SCA12<sub>900</sub> 和

SCA07<sub>446</sub><sup>[9]</sup>对参试材料进行分子标记辅助鉴定, 按 Aljanabi 和 Martinez<sup>[10]</sup>的方法提取马铃薯总 DNA。PCR 扩增反应体系(25 μL)含 200 μmol·L<sup>-1</sup> dNTP、1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 各引物、1.2U Taq 聚合酶、20 ng 基因组 DNA。PCR 扩增反应程序为: 94 3 min; 92 25 s、62 80 s、72 1 min、30 个循环; 最后 72 5 min 延伸。扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 溴化乙锭)电泳, 经凝胶成像系统检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 青枯病发病趋势分析

在人工接种条件下, 接种 3 d 左右开始发病, 多数材料 15 d 达到发病高峰。抗病对照 S chacoense 没有出现病症, 而感病对照合作-88 的发病株率则在 15 d 左右超过 90%, 18 d 左右达到 100%。体细胞杂种株系的发病率有较大幅度的变化, 轻者近 30%, 严重的为 90%左右(图 1)。

田间病圃种植的材料在播种后 50~68 d 开始发病, 没有明显的发病高峰, 病程发展比较缓慢。抗性对照没有发病, 感病对照的发病率最后达到 28%, 体细胞杂种的发病株率分布在抗感对照之间, 总体趋势与大棚接种鉴定结果相似(图 2)。由于田间病圃属于自然发病, 其发病率和流行速度均低于人工接种鉴定。

### 2.2 青枯病抗性鉴定

人工接种病级、田间病圃病情指数及分子标记鉴定结果列于表 1。抗性对照(CHA)在人工接种和田间病圃条件下均没有发病, 表现出高度抗病。感病品种合作-88 人工接种鉴定病级为 4.2 ±0.15, 田间病圃鉴定的病情指数为 18.67% ±0.58%, 表现为高度感病。体细胞杂种的抗性分离较大, CHT-4 人工接种平均病级达到 4.1, 表现为感病; CHT-3、CHT-5 的接种和病圃鉴定均表现抗病; CHT-11、CHT-12 和 CHT-16 等 3 个杂种表现中抗或抗病水平; 其余参试材料在接种鉴定和病圃鉴定条件下表现为中度感病到中度抗病之间。

比较分析人工接种鉴定的病级(DS)和病圃鉴定的病情指数(DI), 两者鉴定的结果达到极显著直线相关, 其关系可用方程  $DI = -0.39 + 4DS$  ( $r^2 = 0.921^{**}$ ) 表示, 说明在本试验条件下, 接种鉴定的病级每增加 1 级, 田间病圃的病情指数将会提高 4%。

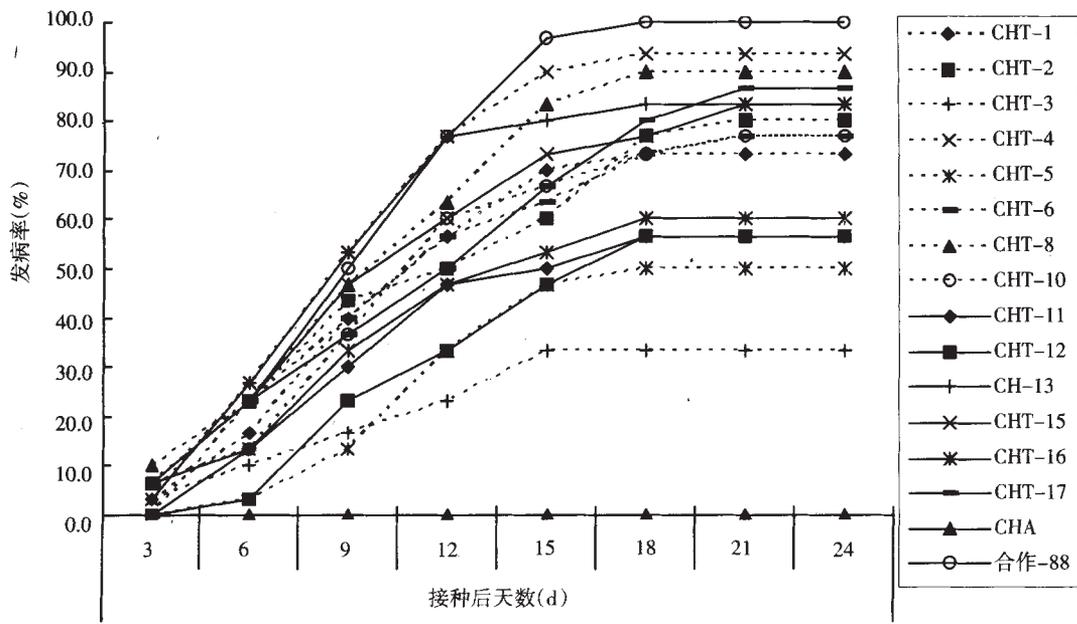


图 1 大棚人工接种发病率

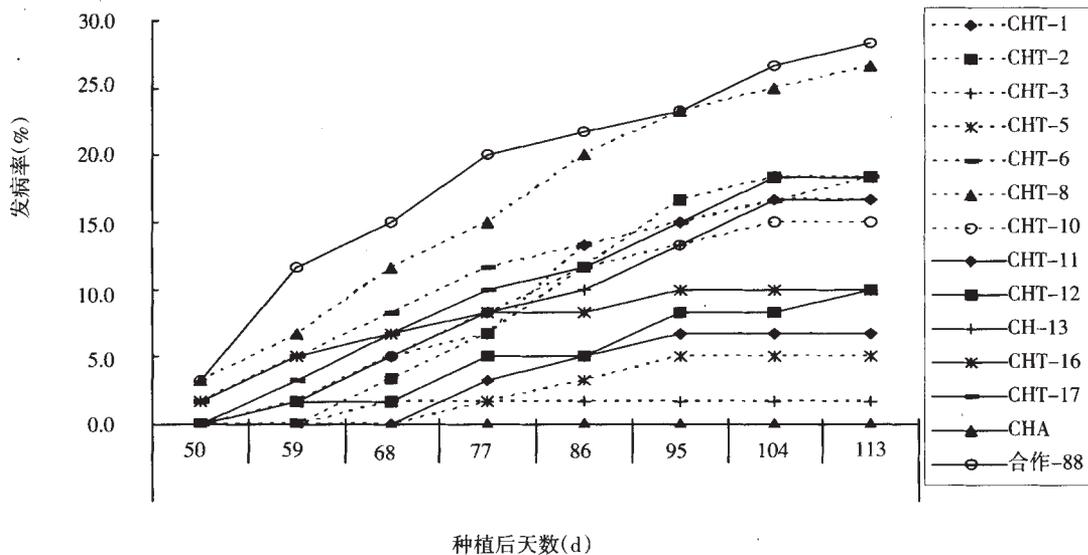


图 2 田间病圃发病率

利用与青枯病抗性连锁的两个 SCAR 双侧翼标记 SCA12<sub>980</sub> 和 SCA07<sub>446</sub> 对体细胞杂种进行分子标记辅助鉴定(图 3), 能同时扩增出两个标记特异带的材料有 CHT-5、CHT-6 和 CHT-15, 还有 3 份材料 CHT-7、CHT-9 和 CHT-18 因材料繁殖的问题未能进行接种和病圃鉴定, 在分子标记鉴定时也扩增出了两个标记的特异带。与田间鉴定和接种鉴定的结果比较, 具有双标记带型的材料均为中感至抗病的

株系, 证明这些株系确实带有抗病基因。因此, 本试验中凡田间病圃和接种鉴定抗病性在中感以上、同时具有两个分子标记特异带, 或田间病圃和接种鉴定达到抗病水平、且具有一个分子标记特异带的材料被认为是抗病材料, 如其它育种性状符合要求, 则可以作为抗青枯病资源利用。根据以上标准, 体细胞融合株系 CHT-3、CHT-5、CHT-6、CHT-10 和 CHT-15 等 5 份材料经综合评价为抗病材料。

表 1 体细胞杂种青枯病抗性鉴定

材料名称	人工接种鉴定病级		田间病圃鉴定病情指数 (%)		分子标记鉴定*			抗性综合评价**
	平均 ±标准差	抗病性**	平均 ±标准差	抗病性**	SCA07 <sub>446</sub>	SCA12 <sub>980</sub>	抗病性**	
CHT-1	3.1 ±0.36	MS	12.44 ±0.77	MS	-	+		MS
CHT-2	3.2 ±0.32	MS	12.83 ±1.04	MS	-	+		MS
CHT-3	0.7 ±0.40	R	1.67 ±2.89	R	+	-		R
CHT-4	4.1 ±0.38	S			+	-		S
CHT-5	1.2 ±0.26	R	5.00 ±0	R	+	+	R	R
CHT-6	3.2 ±0.36	MS	13.25 ±2.46	MS	+	+	R	R
CHT-7					+	+	R	
CHT-8	3.8 ±0.15	MS	14.83 ±2.25	MS	-	+		MS
CHT-9					+	+	R	
CHT-10	3.3 ±0.21	MS	11.08 ±1.01	MR	+	+	R	R
CHT-11	2.2 ±0.10	MR	10.00 ±0	MR	-	+		MR
CHT-12	2.1 ±0.46	MR	8.19 ±0.64	MR	-	+		MR
CHT-13	3.2 ±0.21	MS	12.41 ±1.42	MS	+	-		MS
CHT-14					+	+	R	
CHT-15	3.1	MS			+	+	R	R
CHT-16	2.2 ±0.15	MR	7.50 ±2.50	R	-	+		MR
CHT-17	3.5 ±0.25	MS	9.94 ±2.24	MR	+	-		MS
CHT-18					+	+	R	
CHA	0.0 ±0	R	0.00 ±0	R				R
合作-88	4.2 ±0.15	S	18.67 ±0.58	S				S

注: \* +为有带, -为无带; \*\* R为抗病, MR为中抗, MS为中感, S为感病。

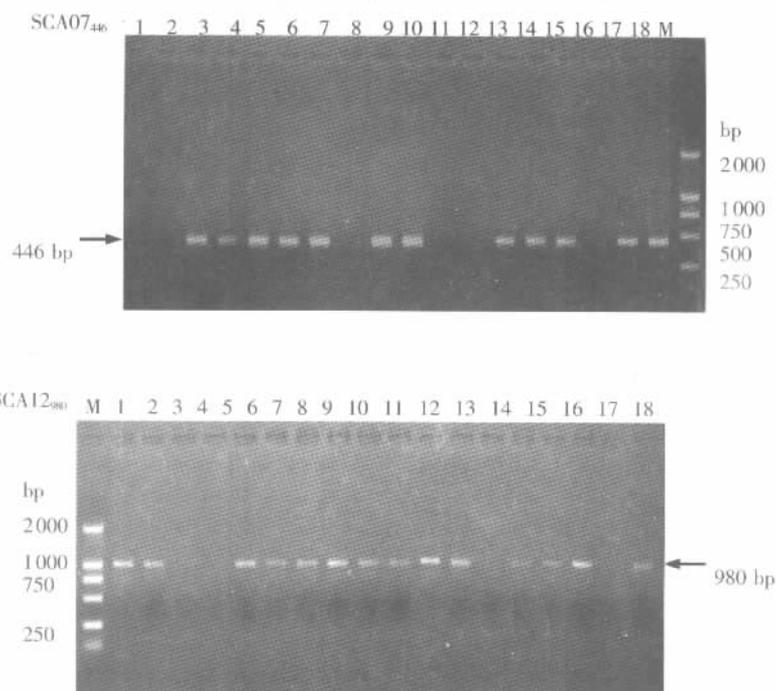


图 3 SCA07<sub>446</sub> 和 SCA12<sub>980</sub> 扩增结果

M: DNA maker DL2000; 1-18: CHT-1、CHT-2、CHT-3、…、CHT-18; 箭头所示为特异片段。

农艺性状观察表明, 表现抗青枯病的体细胞融合株系均能在六盘水的自然条件下开花, 花粉育性为 8%~26%, CHT-3、CHT-5、CHT-6、CHT-10 等 4 份材料能够结薯, 为育种利用提供了条件。具有中等青枯病抗性的材料都能够开花, 花粉育性 17%~45%, 且都能够结薯。观察结果还表明, CHT-11、CHT-12、CHT-16 等 3 个株系在人工接种和田间病圃鉴定时具有一定的青枯病抗性和较好的农艺性状, 具有直接作为栽培品种使用的潜力。

### 3 讨论

细胞工程在创造抗病种质方面具有自身的优势, 它不仅克服有性杂交不亲和、性器官败育等问题, 而且扩大了杂交范围, 还可以将细胞质基因转到全新的核背景中, 使叶绿体基因和线粒体基因重新组合, 创造新的变异来源<sup>[11]</sup>。细胞工程的一个重要内容就是利用体细胞融合技术, 获得抗病的野生种或近缘种与栽培品种的体细胞杂种, 培育新种质。体细胞杂交可将与马铃薯有性杂交难以成功的远缘种所具有的优良抗性基因转移到马铃薯栽培种中, 从而为利用马铃薯家族中野生种含有的丰富抗性基因开辟一条切实可行而且高效的途径<sup>[12]</sup>, 在马铃薯的种间杂交实践中具有重要的应用价值。本试验进一步证明, 二倍体野生种 *S. chacoense* 的青枯病抗性可以通过体细胞融合的途径转移到四倍体栽培种中。体细胞杂种的抗性部分表现在推迟发病, 如 CHT-3 和 CHT-5 发病较感病对照迟 9~18 d, 证明在阻止青枯菌入侵方面有一定作用。有的材料虽发病较早, 病害流行慢, 病害严重度较轻, 如 CHT-6, 说明抗性还表现在抵御病害传播方面; 还有的表现在发病后病害发展基本受到抑制, 如 CHT-5 从第 68 d 观察到感病植株开始, 到第 77 d 病指仍为 1.7%, 最终也仅为 5%。这种病害发展缓慢的原因可能是寄主体内产生了一系列防御反应, 阻止了青枯菌在维管束组织的蔓延与危害。

抗病性鉴定是选育抗病育种材料和抗病品种的关键环节, 常用的接种鉴定和病圃鉴定各有其优缺点, 通常分别用于早代和高代材料的筛选。如果抗性鉴定指标的关联度不大, 则往往带来较大的选择误差, 甚至选择错误。本试验在接种鉴

定时考虑到样本量小而采用病级作为标准, 在病圃鉴定时因设有重复和相对较大的样本量而采用病情指数作为鉴定标准, 同时证明这两者具有极显著的相关性, 为常规的青枯病抗性鉴定提供了依据。但这 2 种方法均依靠表型进行鉴定和选择, 易受环境条件和人为因素的干扰, 且不能满足早期大量材料鉴定的需要。

而分子标记则是在 DNA 水平上对目标性状进行鉴定, 具有不受植株发育时期、季节、环境和经验限制等突出优点。一旦筛选出与目标性状紧密连锁的分子标记, 就可以对预期的基因型进行筛选, 从而在早期判断育种材料的抗性, 这将大大缩短鉴定时间, 加快育种进程。然而, 分子标记辅助选择的有效性取决于标记与基因的连锁程度和标记的稳定性。本试验采用 SCAR 双侧翼标记对体细胞融合材料的抗性进行选择, 其结果在接种和病圃鉴定表现中感至抗病的材料中均检测到了标记的存在, 说明这些材料带有抗性基因, 证明所采用的标记及其技术体系稳定有效。但采用这种标记尚难对抗性程度加以区别, 这可能是由于所采用的两个标记属于同一个抗性位点的侧翼标记, 而马铃薯青枯病抗性可能是由多个独立基因控制的<sup>[13]</sup>, 甚至还有较为复杂的基因互作<sup>[14]</sup>。要准确地利用分子标记进行青枯病抗性鉴定, 还必须筛选更多抗性位点的标记, 并明确每个位点对抗性的贡献。但本试验的结果同时表明, 通过上述标记与接种鉴定或病圃鉴定结合的鉴定策略, 将有助于提高选择的准确性, 建立新的青枯病抗性鉴定技术体系。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 王金生. 农作物青枯病. 病原植物细菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 371-374.
- [2] 孙慧生. 马铃薯育种学 [M]. 中国农业出版社, 2003, 11.
- [3] 卢同. 我国农作物细菌性青枯病的研究进展 [J]. 福建农学报, 1998, 13 (2): 33-40.
- [4] Allen C, J Gay, S B Lauteano. A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions on *Ralstonia solanacearum* [J]. MPMI, 1996, 9: 826-835.
- [5] 谢从华, 柳俊. 中国马铃薯生物技术育种进展 [A]. 第五届世界马铃薯大会组委会. 第五届世界马铃薯大会文集 [C]. 昆明: 云南美术出版社, 2004, 92-97.

- [6] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium [J]. *Phytopathology*, 1954, 64: 693- 695.
- [7] 何礼远, 张长龄, 郑宏启. 国际马铃薯中心种质资源对中国马铃薯青枯病抗性鉴定 [M]. 中国马铃薯和甘薯合作研究进展 (1986-1989), 北京: 中国农业出版社, 1990, 42- 64.
- [8] 梁远发. 马铃薯青枯病田间发病主要因素研究 [A]. 陈伊里. 马铃薯产业与西部开发 [C]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社. 2001, 192- 197.
- [9] 李林章. 二倍体马铃薯青枯病抗性的分离及分子标记鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [10] Aljanabi S M, L Martinez. Universal and salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4692- 4693.
- [11] 颜昌敬, 张玉华. 植物原生质体培养和融合在育种上的应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995, 156- 162.
- [12] 司怀军, 戴朝曦. 马铃薯体细胞融合和杂交技术研究进展 [A]. 陈伊里. 中国马铃薯研究进展 [C]. 1999, 7: 217- 224
- [13] Rowe P R, L Sequeira. Inheritance of resistance to *Pseudomonas Solanacearum* in *Solanum phureja* [J]. *Phytopathology*, 1970(60): 1499- 1501.
- [14] Tung P X, J G T Hermsen, P Vander Zaag. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tetraploid potato [J]. *Breeding*, 1994, 223- 230.

## Evaluation of Resistance to *Rolstonia solanacearum* of Potato Somatic Hybrids

LI Ying, CAI Xing-kui, LI Lin-zhang, XIE Cong-hua

(National Center for Vegetable Improvement Central China Branch; Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education; Potato Engineering and Technology Research Center of Hubei Province, Wuhan 430070, Hubei, China)

**Abstract:** The evaluation of resistance to bacterial wilt of the somatic hybrids, which were derived from the protoplast fusion between dihaploid of *Solanum tuberosum* 81- 15 and wild species *S. chacoense*, was conducted in addition to the investigation of their morphological and biological characteristics. The purposes were to assess the capability of the somatic fusion strategy in transferring bacterial wilt resistance between species, efficiency of the resistance evaluation techniques and potential use of the somatic hybrids in potato breeding programme. The results showed that resistance among 18 somatic hybrids tested varied from susceptible(S) to resistance(R) with majority assigned to mid- susceptible(MS) and mid- resistance(MR). There was a significant linear relationship between the disease score(DS), a criteria used in the artificial inoculation of the pathogen against the hybrids in plastic house, and the disease index(DI), a criteria used in the field trial by growing hybrids in the infected soil, which could be represented as  $DI = -0.39 + 4DS$ , ( $r^2 = 0.921$ ). The flank SCAR markers, SCA07<sub>446</sub> and SCA12<sub>980</sub>, were applied for the resistance evaluation and the specific bands of the two markers present in the hybrids showed resistance levels from MS to R in the inoculation and field trial. By considering together the evaluation results, somatic hybrids CHT- 3, CHT- 5, CHT- 6, CHT- 10 and CHT- 15 performed high resistance to bacterial wilt, indicating that somatic fusion is an efficient way to use the resistance of wild potato germplasm.

**Key Words:** potato; somatic hybrids; bacterial wilt; resistance evaluation