二倍体马铃薯群体青枯病抗性鉴定及遗传分析*

郜 刚 屈冬玉 连 勇 金黎平 纪颖彪

(中国农科院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘 要

将含有青枯病抗性基因的马铃薯二倍体 *solanum phureja* 和 *s. vernei* 的原始材料 E 与另外两种材料 C、D 杂交获得 F_1 和 BC_1 两个群体。对其中 140 个基因型做温室苗期人工接种鉴定，结果表明，马铃薯青枯病的群体抗性分离变异范围较大，抗病性表现复杂，主要表现为阻止病菌入侵，推迟始发病时间，延长潜伏期，减缓发病速度和降低死亡率等 5 个方面。对抗病性相关参数分析表明，马铃薯青枯病抗性是受隐性多基因控制的。

关键词 马铃薯，青枯病，抗性遗传

1 前 言

马铃薯青枯病(Bacterial wilt)是由 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种细菌性土传疾病，一种世界性病害[1,2]，该菌系过去命名为 *Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith，最近被重新分类于 *Burkholderia solanacearum*，命名为 *Ralstonia solanacearum*[3]。现已证明马铃薯二倍体野生种、原始栽培种如 *S. acaule*，*S. chacoense*，*S. phureja* 和四倍体野生种 *S. stnotomum*，*S. sucrense* 等以及四倍体栽培种 AVRDC1289.19，MS42.3 等具有对青枯病不同程度的抗性和耐性[4~9]。对这些基因的发掘利用是抗病育种的重要环节。屈冬玉等(1996)利用 *S. phureja* 等种质筛选出了既能高频率产生 2n 配子，且抗青枯病的育种原始材料并已将该抗性转育到四倍体栽培种中[10]。

* 卞春松、高秀平、龚会枝、杨琳等同志在试验中给予热情帮助，谨致谢意。

收稿日期：1998—09—12

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 供试马铃薯材料

二倍体马铃薯群体材料由屈冬玉博士提供，亲本遗传背景及杂交组合见屈冬玉(1996)[10]，其中 E (77.2102.37) 为抗性亲本，来源于 *S. phureja* 和 *S. vernei*，是感病亲本 C (USW5337.3) 与 VH34211 的杂交后代。CE 群体为 E 对 C 的回交后代，ED 群体为 E 与另外一感病亲本 D(USW5279.14)杂交后代，分别包括 53 和 87 个基因型。上述两个二倍体种为抗性基因来源。抗性鉴定的抗病对照为 MS42.3(CIP800928)，由中国农科院植保所何礼远研究员提供，感病对照为

中国知网 https://www.cnki.net

四倍体栽培种“中薯2号”，由本课题组提供。

2.1.2 供试青枯菌株

用于接种鉴定的马铃薯青枯菌（*Ralstonia solanacearum*）为生理小种3号，由中国农科院蔬菜花卉所植保室冯兰香研究员提供。

2.2 方法

2.2.1 循环掰芽法育苗及扦插扩繁

以灭菌刀沾取少量赤霉素(3ppm)，切入休眠期种薯芽眼一侧适当深度，置黑暗处任其发芽。循环掰取所长出的幼芽，定植于蛭石/草炭〔1∶2（V∶V）〕营养土中使其长到5～6片叶。剪取顶端及近端带有两片叶的茎段，置于生根剂（丁酸∶生长素∶水＝1∶2∶7)中浸泡5min，扦插于蛭石/草炭营养土，覆膜，在室温近饱和湿度条件下培养1周，接膜后两周定植于新鲜营养土中。

2.2.2 温室苗期人工接种鉴定(沾根灌菌法)

选取苗龄相同(幼苗长至15cm左右，6～7片叶子)，健康状况相近的盆栽幼苗作为接种对象。接种及病情调查参照冯兰香等[11]的方法，略作修改：除抗病、感病对照外另设清水对照。做3次重复，各基因型每个重复至少7株。

2.2.3 统计分析

数据利用STASTISTIC 6.0统计软件进行方差及多重比较分析（LSD最小显著差数法）。

3 结果与分析

3.1 抗病性鉴定结果与相关参数分析

3.1.1 接种鉴定结果

分批次对140个基因型进行了室内苗期人工接种鉴定及病情调查，结果见表1(限于篇幅只列出部分基因型)。

表1 各基因型室内苗期人工接种鉴定病情调查及病情严重度的多重比较（LSD最小显著差数法）分析结果

无性系	株数	4DIN①		7DIN		11DIN		15DIN		21DIN			
		PPS②	DI③	PPS	DI	PPS	DI	PPS	DI	PPS	DI	SBWS	RR④
E	27	22.2	12.9	84.4	31.8	100	43.2	100	40.7	100	36.1	1.44	R
D	21	52.0	34.3	90.4	51.4	100	93.3	100	96.1	100	99.0	4.95	S
C	15	80.0	80.0	100	95.0	100	96.0	100	98.5	100	99.5	4.97	S
MS42.3	30	0.00	0.00	10.0	13.3	56.0	27.8	73.3	38.7	76.7	43.5	1.80	R
Zhong2.	30	0.00	0.00	93.3	23.3	100	64.4	100	60.6	100	90.0	4.50	S
ED111	34	0.00	0.00	67.6	31.4	70.5	34.3	85.2	35.2	88.2	37.1	1.85	R***
ED130	29	51.7	27.5	96.5	44.8	96.5	58.6	100	100	100	100	5.00	S
ED25	30	30.0	30.0	83.3	83.3	96.4	40.0	100	90.0	100	76.6	3.07	MR**
ED173	30	53.3	53.3	70.0	70.0	96.7	66.7	10.0	77.5	100	77.3	3.86	MS
ED11	30	16.7	10.0	33.3	20.0	70.0	26.7	96.7	38.7	100	55.3	2.67	MR**
ED154	24	29.2	29.2	33.7	20.8	45.8	26.3	87.5	36.4	91.6	47.9	1.91	R***
ED115	48	39.6	21.8	100	57.6	100	66.7	100	59.8	100	60.8	3.04	MR**
CE60	18	0.00	0.00	33.3	19.4	44.4	27.8	61.1	38.9	100	45.5	2.27	S
CE184	17	86.6	86.6	95.3	73.3	100	84.4	100	78.3	100	81.3	4.06	MS
CE229	26	0.00	0.00	50.0	50.0	100	63.4	100	56.7	100	62.5	3.02	MR**

注：① DIN为接种后天数；② PPS为发病百分率；③ DI为病情指数；④ **差异显著，***差异极显著 $P<0.0001$

中国知网 https://www.cnki.net

3.1.2　发病率

调查结果发现二倍体马铃薯群体的发病率普遍较高。在调查中期即接种后第 11d 时，ED 中半数以上的基因型发病率达到 100%，同期回交群体 CE 群体则为 77.3%，比 ED 群体低了 10 个百分点。在所选出的较抗的基因型中，发病率变化也较大，表现在始发病时间的先后上。说明本试验所用的材料对青枯病不是免疫的，大多数基因型都有一定程度的感病。调查到 21d 时，几乎所有基因型都表现出感病症状，发病率达到 100%的基因型占到全部基因型的 95.4%。

3.1.3　病情指数

调查中期（DIN＝11d）ED 群体的 DI 值平均为 78.2，最高为 100，高于感病对照（64.4）和感病亲本 D（93.3），最低 DI 值为 26.3，略低于抗病对照（27.8）而远低于抗病亲本 E（43.2），表现出一种超亲现象。CE 群体中 DI 最高值与 ED 相同，最低为 27.8，远低于 ED 群的平均值。调查结束时（DIN＝21d），ED 群体的平均 DI 值上升到 88.87，最低值为 37.1，接近于抗病亲本 E 的 DI 值（36.1），而且较抗病对照 MS42.3（43.5）更低一些。CE 群体的 DI 值平均为 83.80，与 ED 群体比较发现，其病情指数总体较低，说明回交群体中抗性基因有一定的累加，而 ED 群体中基因分离比较明显，有望从中选出较抗的基因型。

3.1.4　病情严重度和抗级

根据冯兰香等采用的抗性级别标准并结合方差分析及多重比较，把 140 个基因型分别划分为四个抗级，见表 1。从调查结果来看，这二者结果并非完全吻合，有少数例外如 ED13 和 ED11-2 的病情指数分别为 71.8 和 71.4。根据 LSD 最小显著差数法比较的结果，其相应的病情指数要比实际数值（2.13 和 2.86）高出许多，应归属于 MS 一类。然而其实际病情并非如此严重，事实是这两个基因型用于接种的单株中，大部分发病比较轻，而且只有极少数单株的病级高于整体的病级，从而影响到整个基因型的病情严重度，使 SBWS（青枯病严重度）数值有所下降，表现出相应程度的抗病性。这几例异常例子说明，单依病情指数或病情严重度一个指标来评价马铃薯青枯病抗性似乎不太合适，而应结合多种指标和相关的统计分析如方差显著性分析来进行综合评价，才能较为真实的反映植物本身的抗性。

3.2　马铃薯对 *Ralstonia solanacearum* 的抗性表现

根据接种后第 4、7、11、15、21d 对接种幼苗的病情指数的调查，绘制出各基因型在温室接种后的病情发展趋势曲线（见图 1）。从发病曲线可知，马铃薯对 *Ralstonia solanacearum* 的抗性主要表现在以下几个方

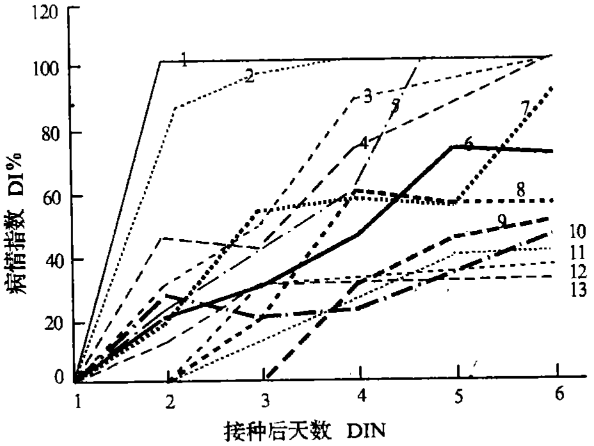

图 1　几种典型的发病曲线

注：纵轴数值分别表示接种后第 1、4、7、11、15、21d。

面：(1) 阻止青枯菌的入侵，推迟始病时间，延长病伏期。接种初 2d，所有基因型对照均无任何病症，处于潜伏期。自第 3d 起，各基因陆续始发病，早者在第 3d，晚者比抗病亲本对照迟发病 4～5d，表现出早期抗病性；(2) 植株发病之后，抗病性表现为减缓发病速度，限制病菌危害程度，抑制病情恶化。在

中国知网　https://www.cnki.net

接种后的7、11d时，大多数基因型的病情指数上升到一定高度之后有下降的趋势，表明可能寄主体内产生一系列防御反应，阻止青枯菌在维管束组织的蔓延与危害，这与Vasse等[12]观察结果相同。但在我们的材料中发现这种下降趋势分为不同的两大类：一是病指继续下降，不再回升，寄主抗病占了优势，最终表现出不同程度的抗性；二是病指下降持续一段时间之后，青枯菌的危害又上升为主导地位，植株病情进一步恶化，甚至导致整株枯萎死亡；(3)降低死亡率。抗性在单基因型中的表现最为明显的是，枯萎死亡株数大大下降，抗病基因型的死亡率较感病为小。这种现象在全部的R、MR基因型中得以表现。从多次重复鉴定的结果来看，如果不考虑植物本身的生理衰退现象（这一现象在调查后期有所表现），这种趋势将会持续下去。

3.3 马铃薯青枯病抗性的遗传分析

3.3.1 F_1、BC_1世代对*Ralstonia solanacearum*反应的群体参数特征

以群体中的单基因型为单位分别计算群体ED和CE病情指数的平均值、方差、变异幅度、变异系数等参数（见表2）。病情指数

表2 CE和ED的群体参数

群 体	基因型数 目	平均病情指数	方差	变异幅度	变异系数(%)
ED	87	88.87	196.28	37.10～100	15.86
CE	53	83.80	208.80	45.5～100	17.42

的群体变异系数较高，ED大部分基因型的病指集中于感病亲本病指附近，变异幅度超出了两个亲本中的高值和低值，表明了其广泛的变异和分离，这为在该分离群体中选择抗性更高的基因型提供了可能。CE群体的变幅较ED小，变异系数较ED大，这可能与CE群体是回交世代及该群体基因型数目不够大有关。

3.3.2 F_1、BC_1群体的抗性分布特点

分析各病级范围内的基因型频数发现，F_1单基因型病级在R和S之间均有分布，主要集中于感病亲本附近，病级多为S。中亲型分布也是偏向于MS的较多。若以五级标准分类则得出分离比例为：ED 2：6：10：69，CE 1：4：17：31；若以病级3.0为划分抗感的临界值，分别得ED和CE的分离比例为1：9.875和1：9.6。可以明显的推论，抗病亲本的抗马铃薯青枯病基因为隐性。同时结合病情指数、病情严重度考虑，可以认为这两个群体的抗性不是由单基因所控制。

4 讨 论

4.1 抗病性鉴定方法和抗性标准

目前国内外对青枯病抗性的判断主要是以观察植株的发病情况为依据，因而选择适合具体接种对象的鉴定方法是客观上反映抗病性的前提。国内研究采用的接种鉴定方法主要有叶腋插管、伤根、沾根、注射、剪叶等法[11]。本研究采用的伤根灌菌法较适合于该群体的室内苗期人工接种鉴定。在控制实际接种菌量和环境条件的前提下，接种体发病均匀，三次重复发病率一致，无发病缓急不均的现象，又同时采用三种对照，极大限度降低了操作上带来的误差，所得结果较真实地反映了植物本身的抗病性。

在抗病性育种研究中，材料的抗性标准较大地受到主观因素的影响，不仅单株的病情严重度级别由人工目测来定，而且基因型抗性级别划分的临界值也是人为规定的。这就给抗性材料的选择带来如抗性临界值附近浮动极小的基因型的归属等的问题。国外对同类植病的划分标准分有分为9级的[13]，虽然也存在临界值的问题，但病级分得更细致一些，有利于选择。笔者认为目前国内采用

中国知网 https://www.cnki.net

的划分法标准似乎有些过宽，尤其是苗期鉴定观察时间对二倍体来说较长了些。因为试验过程中发现，所用材料中有相当一部分基因型在21d时已现蕾、开花，即将转入生理衰退期，此时得出的抗性水平是否受到影响，值得进一步探讨。另外选择合适的遗传参数以进行遗传分析也是亟待解决的一个问题。

4.2 马铃薯青枯病抗性表现及遗传规律

马铃薯青枯病抗性从表型上来看比较简单，主要表现在阻止病菌入侵，推迟始病时间，延长病伏期；抑制病菌在体内扩展和繁殖，减缓危害速度；限制病菌的危害程度，最终表现为降低死亡率。但实际的抗性遗传十分复杂，一方面，抗性亲本的遗传背景比较复杂，抗性亲本E的抗病基因来源于两个不同的二倍体种 *S. phuria* 及 *S. vernei*。这给后代的分析带来了一定的困难；另一方面抗性的最终表现涉及到病菌、寄主、环境等因素之间复杂的相互作用。抗性在遗传上存在很大的分离，单从1：9.875或1：9.60这样的分离比例还难以推断抗性基因的数目。但至少可以推论控制抗性的基因是隐性的，而且可能是多基因控制的，这与前人提出的水平抗性基本相符[13~17]。要较清楚地明确其抗性遗传的规律需要增加 F_1 群体的基因数目和获得 F_2 群体以供进一步深入研究。

参 考 文 献

1 Hayward A C. Biology and epipdemiology of bacterial wilt caused by *pseudomonas solanacearum* Annu Rev Phytopathol, 1991, 29: 65～87

2 何礼远等. 马铃薯细菌性青枯病的发生和危害. 植物保护, 1985, 11 (2): 10～11

3 Yabuuchi E et al. Transfer of two *Bulkhoderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen nov; Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Duodoroff 1973. comb nov and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov.). Microbiol Immunol, 1995, 39: 897～904

4 Thurston H D and Lonzano C J. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombia clones of *Solanum phureja*. Amer Potato J, 1968, 45: 51～55

5 Shekhaeat et al. Resistance to *Pseudomonas solanecearum* in diploid *Solanum microdontum* Butt. J of the Indian Potato Association, 1980, 7: 119～124

6 Jaworski et al. *Solanum sucrense* and *Solanum tuberosum*, bacterial wilt-tolerant potato germplasm. Hortiscience, 1984, 19: 312～313

7 Schmiediche P. Breeding potatoes for resistance to bacterial wilt carsed by *Pseudomonas solanecearum*. In: Persley G J (ed) Bacterial wilt in Asia and the South Pacific. ACIAR Proceedings, 1986, 13: 105～111

8 French E R and Sequeira L. 1998 Additional sources of resistance to bacterial wilt. In: Bacterial disease of the potato. Report of the planning conference on diseases of the potato 1987. 29～34, International Potato Center, Cima, Peru

9 CIP. 1988. Bacterial Diseases of the Potato. Report of the planning conference on bacterial diseases of the potato 1987. 3

10 Qu Dongyu. Use of unreduced games of diploid potato for true potato seed production through 4x-2x crosses. Wageningen, The Netherlands, 1996

11 冯兰香等. 马铃薯抗菌肽基因转化植株的青枯病抗性. 见：贾士荣等编. 马铃薯抗菌肽基因工程. 北京：中国农业科学出版社，1996

12 Vasse J et al. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato rests by *Pseudomonas solanacearum*. MPMI, 1995, 8: 241～251

13 Thoquet P et al. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indias. MIPI, 1996, 9: 837～842

14 He L Y, L Sequeira and A Kelmen. Characterization of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis, 1983, 67: 1357～1361

15 Rowe P R and L Sequera. Inheritance fo resistance to *Psedomonas solanacearum* in *Solanum phureia*. Phytopatholgy, 1970, 60: 1449～1501

16 Schmiediche P. Breeding for resistance to *Psedomonas solanacearum*. In: Report of the Planning Conference on Bacterial Disease of the Potato. International Potato Center, Lima, Peru, 1998, 19～28

17 Tung Pham Xuan. Genetic aspects of resistance to *Psedomonas solanacearum* in potato. Ph. D. thesis of Wageningen Agricultural University, 1992, 7～23

中国知网 https://www.cnki.net

GENETIC ANALYSIS AND EVALUATION OF RESISTANCE TO BACTERIAL WILT IN TWO DIPLOID POTATO POPULATIONS

Gao Gang, Qu Dongyu, Lian Yong, Jin Liping and Ji Yingbiao

(Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing 100081)

ABSTRACT

Evaluation of bacterial wilt symptoms using F_1 and BC_1 clones derived from crosses between the susceptible diploid clone C, D and resistant clone E, in which resistance genes were involved, permitted the analysis of characterization of resistance to *Ralstonia solanacearum* in the level of populations. In our material, resistance expressed in the ways of ① preventing invasion of bacterial; ② delaying the initiation of disease; ③ prolonging the incubation period; ④ decreasing the speed of wilting and ⑤ reducing the death rate. Analysis of the relative genetic parameters showed that resistance to bacterial wilt segregates in a complex way and is controlled by recessive polygenes.

KEY WORDS: potato, bacterial wilt, resistance

编 者 的 话

▲ 1998年本刊收到各地来稿较多，质量也较高，除已刊出外，尚有一大部分来稿虽经编委审阅修改通过，但由于版面所限，也只能待1999年陆续发表，请作者谅解，如有作者特别急需（如评定职称等）请提前来信说明。

▲ 马铃薯专业委员会已发出通知，决定1999年8月份在内蒙古呼和浩特市举行全国马铃薯学术研讨会暨专业委员会年会，为满足广大科技工作者及战斗在生产第一线的马铃薯界同仁们的要求，同时决定正式出版论文集，现已征集稿件。本刊编辑部为配合专业委员会开好这次全国性的大型会议，决定：凡已给本刊来稿1998年没有发表的文章，如需要在论文集上发表，请来函告之，以便统一审阅录用。

▲ 本刊从已收到的稿件来看，大部分作者能够掌握论文的书写格式，按照我刊的征稿原则要求积极撰写稿件，但是，还有一部分作者在来稿中字迹潦草，用字和计量单位不规范。本刊再次重申：来稿最好要打印，如手写稿应每字一格，字迹清晰，特别是人名、地名、数字、外文字母等一定要书写工整，易于辨认，另外，来稿一定要在作者单位后写清单位所在地及邮政编码。来信或来稿请写清电话号码，以便联系。

▲ 第三届马铃薯专业委员会及马铃薯杂志编辑委员会组成名单已经公布。本刊特向委员们表示祝贺。希望今后加强联系，关心、指导编辑部的工作，为办好杂志献计献策。1999年本刊继续承揽广告业务，希望委员们能多发挥自己的优势，为本刊的扩大发行和承揽广告多作努力，本刊将根据有关规定致以酬劳。

中国知网 https://www.cnki.net