

高频率诱导马铃薯双单倍体的研究*

庞万福¹ 屈冬玉² 高占旺¹ 纪颖彪² 张希近¹

(¹河北省张家口市坝上农科所, 张北县 076450; ²中国农科院蔬菜花卉所, 北京 100081)

摘 要

通过 $4x-2x$ 杂交测验, 从 *Solanum phureja* 后代中筛选出 9 份诱导双单倍体频率和花粉育性高的授粉者。它们的平均诱导率为 33 株双单倍体 / 100 个果, 并具有显性纯合的胚斑标记基因(BB)和紫色胚轴标记基因(PP), 可用来有效地识别双单倍体。不同的四倍体母本产生双单倍体的频率不同, 中薯 2 号产生频率最高, 达 34 株双单倍体 / 100 个果, 母本基因型对双单倍体的产生有很大的影响。

关键词 *Solanum phureja*, 授粉者, 双单倍体, 孤雌生殖, 标记基因

1 前 言

普通栽培马铃薯(*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*)复杂的四体遗传方式, 使得人们对它的许多性状遗传机制不清楚, 另外由于大部分野生种是二倍体, 限制了这些资源的利用, 造成马铃薯育种研究进展缓慢。利用双单倍体可在二倍体水平上进行各种遗传操作, 包括把野生种的有利基因转移到栽培种中去, 进行资源创新。Hougas(1958)发现通过种间杂交, 以 *Solanum phureja* ($2n-2x-24$)为授粉者, 可诱导四倍体栽培马铃薯孤雌生殖产生双单倍体^[1], 目前通常采用 *Solanum phureja* PI225682 的三个系(1,13 和 22)^[2] 以及 IVP35、IVP48、IVP101 作为授粉者^[3]。但这些授粉者存在诱导率低、生长势弱、休眠期太短、不易保存等缺点。另外不同的四倍体栽培品

种产生双单倍体的能力也不一。本研究的目的是从 *Solanum phureja* 后代筛选诱导频率高的基因型和产生双单倍体能力强的四倍体栽培品种, 并探讨鉴定双单倍体的方法。

2 材料与方法

2.1 材 料

四倍体栽培品种(系): 中薯 2 号、800935、79-6-19。二倍体授粉者材料为 *Solanum phureja* 的杂交后代 93002-8-2、93002-1-4、93002-4-4、93003-1-9、93002-4-7、93002-7-7、93002-7-1、93002-4-1、93002-2-4 共 9 份以及 IVP35、IVP48 (对照)。

2.2 $4x-2x$ 种间杂交

以四倍体品种为母本, 授粉者为父本, 配制 3×11 共 33 个组合。杂交授粉于 1994 年 7~9 月份在河北省坝上农科所网室内进行, 花粉育性用 0.2% 卡宝品红溶液染色, 计算百分率。授粉时用少量的 0.2% 萘乙酸

* 河北省自然科学基金资助项目

涂抹母本花柄节处, 座果后用纱布袋及时套果。

2.3 双单倍体识别

2.3.1 利用标记基因识别

首先用显微镜检查种子胚斑标记, 保留无胚斑标记的种子。1995 年春催芽后播于温室中, 在苗期观测植株上胚轴、茎和叶柄是否有紫色素存在, 在这些部位呈现紫色素的植株为 4x 或 3x 杂种, 绿色植株为双单倍体。收获时观测块茎皮色, 紫皮色块茎为杂种, 呈白、黄色块茎为双单倍体。

2.3.2 细胞学鉴定

采用根尖染色体计数。参考 Chien-An Liu 的方法⁽⁴⁾, 首先在室温下用 0.02M 羟喹啉 (hydroxyquinoline) 溶液处理根尖 3 小时, 然后在 Farmer's 溶液 (乙醇: 冰乙酸 = 3:1) 固定至少 24 小时。固定后 60℃ 下用 1N HCl 溶液水解根尖 10 分钟后, 用 2% 醋酸-地衣红 (aceto-orcin) 溶液进行根尖染色 24 小时。在 400 倍光学显微镜进行染色体计数, 识别双单倍体和四倍体、三倍体杂种。

2.4 诱导频率的计算

以每 100 个浆果中产生的双单倍体数目表示诱导频率。

3 结果与讨论

3.1 不同的授粉者诱导频率的比较

Solanum phureja 后代中不同的基因型诱导频率差异显著 (表 1), 93002-1-4 的诱导频率为 81.8 株双单倍体 / 100 个浆果, 93002-4-4 的诱导频率是 14.6 株双单倍体 / 100 个浆果。筛选出的 9 个授粉者平均诱导率达到 33 株双单倍体 / 100 个浆果, 而对照 IVP35、IVP48 的诱导率仅为 4 株左右双单倍体 / 100 个浆果。所选用的 9

个授粉者在北方干旱地区生长势旺, 开花性状好, 花粉育性高, 有利于杂交授粉。但环境因素影响授粉者产生花粉的能力, 从而降低诱导率。如在阴天气温降低, 产生花粉量少, 影响杂交。需用贮存的花粉 (-20℃) 进行杂交, 贮存后的花粉活力下降, 影响诱导频率。

授粉者均产生 n 和 2n 花粉, 产生 2n 花粉的频率从 20% 左右到 4% 不等 (见表 1)。一方面 2n 花粉与母本的卵细胞结合形成四倍体杂种是 4x-2x 杂交产生杂种的主要原因; 另一方面授粉者产生一定频率的 2n 花粉有利于提高座果率, 防止有孤雌生殖种子的浆果脱落⁽⁵⁾。但本研究表明产生 2n 花粉的频率大小与双单倍体诱导率无显著相关, 相关系数 $r = 0.129$ 。

表 1 不同的授粉者诱导率(双单倍体株数 / 100 个浆果) 等性状的比较

授粉者	花粉育性 (%)	2n 花粉频率 (%)	薯块重 (g / 单株)	诱导率
93002-1-4	81.0	14.7	230	81.8
93002-8-2	78.9	15.0	189	45.0
93003-1-9	85.0	18.4	555	35.3
93002-2-4	84.5	11.0	329	22.0
93002-7-1	91.0	14.3	130	21.4
93002-4-1	86.5	10.5	50.0	21.1
93002-7-7	83.0	17.8	143	20.0
93002-4-7	79.8	20.4	256	18.1
93002-4-4	87.3	21.7	220	14.6
IVP35 CK	85.0	5.0	130	3.8
IVP48 CK	82.5	4.2	145	4.0

另外授粉者结薯能力也较强, 有利于材料繁殖保存和在育种上的应用。

3.2 不同四倍体母本产生双单倍体频率的比较

3 个四倍体品种与 11 个授粉者分别杂交, 杂交花 2340 朵, 产生 348 个浆果,

表 2 四倍体母本产生双单倍体频率(双单倍体数/100 个浆果) 的比较

母 本	杂交 花数	浆果 数	种子 粒数	无胚斑 种子数	无胚斑种 子比率(%)	种子数/单 果	双单倍 体数	双单倍体 /100 个果
中薯 2 号	757	137	1854	1138	61.4	13.5	36	34.0
79-6-19	708	147	575	192	33.4	3.91	20	13.6
800935	875	64	368	136	36.9	5.75	7	10.9
合 计	2340	348	2797	1466	—	—	63	—
平 均	—	—	—	—	43.9	7.72	—	19.5

2797 粒种子, 鉴定出双单倍体 63 个 (表 2)。平均来看, 产生一株双单倍体需杂交 37 朵花, 结 5.5 个浆果, 产生 44 粒种子。不同的四倍体品种间产生双单倍体的频率有很大的差别, 中薯 2 号产生双单倍体的频率是 34.0 (双单倍体/100 个浆果), 79-6-19 产生双单倍体的频率为 13.6, 800935 产生双单倍体的频率是 10.9。中薯 2 号产生双单倍体的能力明显高于其他两个品种, 说明除授粉者影响产生双单倍体的能力外, 母性效应起十分重要的作用。这可能是由于不同的四倍体母本开花结实性能不同而致, 如本研究中中薯 2 号具有很强的天然结实能力, 孤雌生殖后每个浆果中产生的种粒数较多 (13.5 粒/浆果), 高于 800935 和 79-6-19。但也可能是其他原因, 包括不同母本隐性致死基因频率不同、双单倍体发育能力不同以及胚乳对发育的种子的影响^[6]。有一点可确定的是在选择产生双单倍体的母本时除考虑所需的农艺性状外, 开花、座果能力应是一个重要的因素。

4 讨 论

4.1 双单倍体的鉴定方法

来自于 *Solanum phureja* 的授粉者具有显性纯合的胚斑点标记基因 (BB), 胚斑位于种子胚基部呈深紫色, 在显微镜或放大镜下在种子两边清晰可见, 4x-2x 杂交后代中具有胚斑的种子为杂种四倍体或三倍体, 无

胚斑的种子是双单倍体。本研究中所产生的 2797 粒种子, 经镜检无胚斑种子为 1468 粒, 占 43.9%, 但最后根据其他形态标记和染色体计数确定的双单倍体数只有 63 个, 仅占全部无胚斑种子的 4.3%, 排除种子发芽率、出苗率和成活率等因素, 无胚斑的种子有相当一大部分并不是双单倍体。Caligari (1988) 也报道了同样的结果, 他把这一现象解释为是由于遗传背景不同和剂量效应而造成有的胚斑标记不易识别^[7]。虽然以胚斑为标记导致错误识别, 但毕竟可剔除 54.1% 的杂种, 极大地减少了以后的工作量。

除胚斑标记基因 (BB) 外, 授粉者还具有紫色胚轴标记基因 (PP), 它表现在杂种后代植株的上胚轴、茎和叶柄具有紫色色素积累。一般认为 BB 和 PP 基因实际上受一组互补基因控制, 具上位性, 在种子子叶基部表现为胚斑, 成苗后在植株器官的基部表现为花色素苷积累^[8]。本研究选用的 3 个四倍体母本茎叶均无紫色色素存在, 因此在苗期观察上胚轴、成苗后观察植株茎和叶柄基部是否有紫色素存在, 可剔除 70% 以上的杂种植株。块茎皮色和芽眼也是一个有效的识别标记, 中薯 2 号、79-6-19 和 800935 其块茎皮色和芽眼均为黄或白色, 授粉者皮色为紫色, 紫色为显性^[9], 因此杂种皮色或芽眼为紫色。另外双单倍体生长势较弱, 通过生长势评价 (茎粗、株高) 可把母本自交形成的四倍体植株同双单倍体区

别出来。

利用 BB 和 PP 标记基因确定的双单倍体数为 76 个, 染色体计数确定的双单倍体数为 63 个, 标记基因的识别效率为 83%, 可见本研究筛选出来的诱导者的标记基因可用来有效地识别双单倍体。

4.2 影响双单倍体产生的环境因素

除了诱导者和母本基因型影响产生双单倍体的能力外, 环境因素(如气候、杂交时的温度)的作用也不容忽视。Chien-An Liu (1993) 报道大西洋等 6 个四倍体品种 1990 年秋季比 1989 年秋季产生更多的花、浆果和种子, 最后得到的双单倍体也多⁽⁴⁾。授粉时环境温度和湿度也影响诱导频率, 据报道夜间温度在 13~16℃, 白天温度在 21~24℃, 湿度在 20% 时, 发生双单倍体的频率最高⁽¹⁰⁾。另外采用生育期间截取匍匐茎和部分块茎或离体花序培养, 也可以提高双单倍体发生频率⁽¹¹⁾。

参 考 文 献

- Hougas R W, S J Peloquin and R W Ross. Haploids of the common potato. *J Hered*, 1958, 49: 103~107
- Gabert A C. Factors affecting the frequency of haploids in the common potato (*Solanum tuberosum* L.). Ph. D Thesis, University of Wisconsin, Madison. Diss Abstr. 1964, 24: 475
- Hermesen, J G & J Verdenius. Selection from *Solanum tuberosum* group *Phureja* of genotypes combining high-frequency haploids induction with homozygosity for embryo spot. *Euphytica*, 1973, 22: 244~259
- Chien-An Liu & David S Douches. Production of haploids of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. *Euphytica*, 1993, 70: 113~126
- 吕文河、李景华. 自马铃薯二倍体栽培种 (*Solanum phureja*) 自交后代中选育诱发高频率双单倍体授粉者的研究. 马铃薯杂志, 1987, 1 (1): 2~7
- Hougas R W, S J Peloquin & A C Gabert. Effect of seed parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Crop Sci*, 1964, 4: 593~595
- Caligari P D S, W Powell, K Liddell, M J DE Maine and E L Swan. Methods and strategies for detecting *Solanum tuberosum* dihaploids in interspecific crosses with *S. phureja*. *Ann Appl Biol*, 1988, 112: 323~328
- Dodds K S and Long D H. The inheritance of colour in diploid potatoes I. type of anthocyanidins and their genetic loci. *Journal of Genetics*, 1956, 53: 136~149
- Verma S M. Note on the genetics of skin color of tuber in the first inbred population of "Plulwa" potato. *Indian Journal of Agr Sci*, 1972, 42: 114
- Johnston S A *et al.* The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet*, 1980, 57: 5~9
- Peloquin S J and Hougas R W. Decaptation and genetic markers as related to haploid in *Solanum tuberosum*. *Europ Potato J*. 1959, 2: 176~183

HIGH FREQUENCY OF DIHAPLOID INDUCTION FROM THE CULTIVATED TETRAPLOID POTATO

Pang Wanfu¹, Qu Dongyu², Gao Zhan wang¹, Ji Yingbiao² and Zhang Xijin¹

(¹ Bashang Institute of Agricultural Science, Zhang Bei County, He Bei Province, 076450;

² Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing, 100081)

ABSTRACT

Through 4x-2x crosses, 9 lines from *Solanum phureja* were selected as pollinators. These pollinators had several advantages over the controls (IVP35 and IVP48), including high frequency of dihaploid induction and pollen fertility. Their average frequency of induction was

提高马铃薯双单倍体花药培养产生胚状体及再生植株频率的研究

冉毅东 王 蒂 戴朝曦

(甘肃农业大学农业生物工程研究所 兰州 730070)

摘 要

用三种不同温度前处理和三种培养基相配合对 7 个从双单倍体马铃薯 (*S. tuberosum* L, $2n=2x=24$) 中随机抽取的品系进行了花药培养, 选择出了较好的培养基和前处理的适宜温度及方法。从双单倍体花药中诱导产生胚状体及再生植株频率有所提高达 27.5% 和 8.8%。倍性鉴定表明, 从双单倍体诱导的胚状体分化的植株绝大多数为二倍体, 而且多数为纯合体, 说明这些胚状体来自减数的配子, 可能是由在胚状体发育过程中的体细胞染色体加倍形成的。

关键词 马铃薯, 花药培养, 双单倍体, 一单倍体

1 前 言

为了用实生种籽进行生产以便克服马铃薯的退化, 长期以来人们试图用连续自交的方式获得基因纯合的四倍体, 由于多倍体本身基因型杂合程度高, 连续十几代自交仍不能纯合, 而且伴随隐性基因表现使后代往往不开花或虽能开而不育, 因而世界各国育种工作者通过自交法至今未能获得基因型纯合

的四倍体, 这样就给不分离实生种子的生产带来了困难。近年由于花药培养和孤雌生殖等新技术和方法的应用, 为培育纯合四倍体提供了可能, 即通过先将四倍体连续降倍, 培育成单一基因组的一单倍体⁽¹⁾, 经选择后再连续两次加倍即可获得纯合四倍体, 为生产不分离的四倍体杂交实生种子打下了基础。因此, 从四倍体最后产生一倍体的诱导成为此设想的关键。

利用花药培养从四倍体马铃薯中诱导双

~~~~~  
33.0 dihaploids / 100 fruits. They also possessed a dominant embryo spot marker (BB) and a dominant seedling marker (PP) for purple hypocotyl. Both markers are homozygous and can be effectively used to identify dihaploids. There were differences in the dihaploid frequency between the maternal parents. Zhongshu No.2 had the highest frequency (34.0 dihaploid / 100 fruits) among three varieties. But the effects of environments on pseudogamous dihaploid production can never be neglected.

**KEY WORDS:** *Solanum phureja*, pollinator, dihaploid, parthenogenesis, genetic markers