

对马铃薯 $4x-2x$, $2x-4x$ 及 $2x-2x$ 杂种 四倍体进行花药培养获得转育 $2n$ 配子 基因的双单倍体新个体 *

冉毅东

(甘肃农业大学农业生物工程研究所 730070)

摘 要

利用 3 个 $2n$ 配子材料 ($2x$) 在马铃薯 (*S. tuberosum* L.) 中进行 $4x-2x$, $2x-4x$ 和 $2x-2x$ 的杂交, 获得了 4 个四倍体杂种材料; 然后对它们进行花药培养, 共得到 32 个双单倍体植株。检查其中 23 个植株, 有 2 株是具 5% 以上 $2n$ 花粉粒的双单倍体, 1 株是重组了 $2n$ 卵基因的双单倍体。由此证明花药培养的倍性操作技术是转育马铃薯 $2n$ 配子性状给双单倍体的有效方法之一。

1 前 言

利用能产生 $2n$ 配子的二倍体马铃薯野生与栽培二倍体杂种的材料同栽培四倍体马铃薯做杂交获得 $4x-2x$, $2x-4x$ 及 $2x(2n\text{卵})-2x(2n\text{花粉})$ 的杂种 $4x$, 最终实现把大多数野生二倍体及近缘栽培种二倍体所具有的马铃薯资源转移到四倍体栽培种中, 改良品种, 以及实现实生种子 (TPS) 直接生产马铃薯。这项研究自 60 年代 Pcloquin 等人发现二倍体马铃薯能产生 $2n$ 配子以来, 已在世界范围内进行了广泛的研究, 并获得许多 $2n$ 配子材料 (包括 $2n$ 卵与 $2n$ 花粉两种)。

细胞学的观察已经发现了许多有关 $2n$ 配子的形成机制, 有 $2n$ 花粉形成的机制包括平行纺锤体 (PS), 提前成熟胞质分裂 (Pc-1, Pc-2) 和联会突变 (Sy-2, Sy-3, Sy-4 等), 它们都是由隐性基因控制的, 属于简单的遗传, 并且在表型上出现各种变异特征。另外通过细胞学的方法也确定了 $2n$ 卵形成的机制。Wencer 在 1989 年发现马铃薯 $2n$ 卵主要由第二次减数分裂省略而产生的 (相当于 SDR 机制), 而且一般由隐性突变基因 “OS” 决定。综上所述, $2n$ 配子都由隐性单基因控制, 而且是简单的孟德尔遗传。

截止目前, 在得到的许多 $2n$ 卵和 $2n$ 花粉的材料当中, 多数来源于野生种与普通栽培种双单倍体杂种后代, 因此其大部分材料的农艺性状较差, 虽然近年有意选择出一些

*本研究受农业部“八五”生物技术计划和甘肃省青年

基金资助

结薯习性较好的材料,但在其它商品及农艺性状上仍然存在较大的缺陷,用这些材料获得的 $4x-2x$, $2x-4x$ 和 $2x-2x$ 后代农艺性状及商品性状较差,如品质方面。因而目前的研究多数局限在对 $2n$ 配子利用前景的评价及 $2n$ 配子形成机制方面的探讨上,这样就需要研究如何获得农艺性状好的 $2n$ 配子材料,尽早实现杂种优势强的实生种子在生产上的利用。

因为 $2n$ 配子多数受隐性基因支配,因而要想把其基因通过杂交等常规方法转移到农艺性状好的普通栽培种及其它栽培种双单倍体或二倍体中去,不仅费工、费时、工作繁琐,而且可靠性差。因而本试验用花药培养倍性操作的方法,利用基因在形成配子过程中的重组性质,通过把 $2n$ 配子材料先与优良栽培四倍体杂交获得杂种 ($4x$),然后再诱导其产生双单倍体,从而获得具有优良农艺性状的并有 $2n$ 配子特性的双单倍体材料,以实现品种资源和实生种子在生产上的应用。

2 材料和方法

2.1 材料来源

本试验选择具有产生 $2n$ 配子特征的二倍体材料 ($2n=2x=24$) 3 个,均引自美国威斯康星大学,其中 Sy_{12} , M_6 二品系作为父本能经过平行纺锤体或结合联会突变产生 $2n$ 花粉 (FDR),遗传背景为 *Phureja-Tuberosum* 单倍体杂种或 *Tuberosum* 单倍体 - *S. Chacoense* 杂种; T_{710} 品系通过第二次减数分裂省略产生 $2n$ 卵,相当于 SDR,也是来自 *Tuberosum* 单倍体 - 野生种杂种 (*Solanum chacoense* 或 *S. chacoense* × *S. infundibuliform* 杂种)。选用本研究所培育的四倍体 ($2n=4x=48$, *S. tuberosum*) 品种甘农 7 号 (RP),品系

2.2 方法步骤

1990 年用上述材料进行 $4x-2x$, $2x-4x$ 和 $2x-2x$ 等组合类型的杂交,获得以下 4 个组合的四倍体杂种: (1) $T_{710} \times Sy_{12}$; $T_{710} \times RP$; (3) $84-47 \times M_6$; (4) $RP \times Sy_{12}$, 分别得到若干浆果和一定量种子。

1991 年将种子育苗并在田间播种,在开花期鉴定各组合后代的倍性,除去二倍体后代,对剩余的多数四倍体个体,按不同组合取花药 (单核花粉期)。将花药按组合经 10% 次氯酸处理,70% 乙醇冲洗灭菌并经无菌水冲洗后分别接种在两种诱导培养基上 (如下),在室温及 1000Lux 日光灯照射条件下培养 30 天即可出现愈伤组织和胚状体,随之转移到分化培养基上使其成苗。按诱导培养基 (① $MS+1mg/L$ IAA+ $4mg/L$ NAA+ $2mg/L$ 2, 4-D+ $1mg/L$ 6-BA; ② $MS+2mg/L$ NAA+ $1mg/L$ KT (激动素)、分化培养基 ($MS+1mg/L$ IAA+ $2mg/L$ 6-BA+ $2mg/L$ KT+0.5% 活性炭+5% 蔗糖) 组合,将再生植株接种到生根培养基上 ($MS+0.05mg/L$ NAA+3% 蔗糖) 生根,并检查根尖细胞染色体数及气孔保卫细胞叶绿体数,确定倍性。

1992 年将获得的双单倍体材料移植在大田条件,在开花期: ① 对各双单倍体植株花粉母细胞减数分裂进行观察,并对它们产生的花粉粒大小进行测定,计数 $2n$ 花粉百分率,选择产生 $2n$ 花粉的双单倍体; ② 以四倍体材料 *Desiree* × NT_2 为父本对这些双单倍体材料进行控制授粉,据结实性选择 $2n$ 卵的双单倍体。

3 结果

3.1 花药培养诱导双单倍体

3.1.1 诱导成苗

表 1 列出了对 $T_{710} \times Sy_{12}$, $T_{710} \times RP$, $84-47 \times M_6$, $RP \times Sy_{12}$ 的花药诱导胚状体和愈伤

组织百分率以及再生植株百分率。由表中看出, 从4个组合中都诱导产生了胚状体或根及愈伤组织。并且都能分化成苗, 说明用组培法诱导 $2x-4x$, $4x-2x$ 及 $2x-2x$ 的四倍体杂种产生双单倍体的方法是有效的。但不同组合的诱导频率不一样, 特别是诱导成胚状体及根后分化成苗的百分率都较低。

3.1.2 倍性鉴定

表2列出了从3个杂交组合的四倍体个

体的花药培养得到的后代植株的倍性鉴定结果(另一组合 $RP \times Sy_{12}$ 中获得个体鉴定结果未列出, 其全为二倍体)。在从 $T_{710} \times Sy_{12}$ 杂种中诱导产生的22个个体中只有19个为二倍体, 而其余几组的植株全部为二倍体, 说明用花药诱导产生单倍体的方法是有效的。从表中还可看出除个别个体外, 保卫细胞叶绿体数与根尖染色体数在倍性上具有一定的协同数。

表1 几个 $2x-4x$, $2x-2x$ 和 $4x-2x$ 的四倍体杂种中诱导胚状体的效应

材 料	接种花药数	产生胚 状体数	愈 伤 组 织	花药产生胚 状体百分率(%)	生根数	生根百分率 (%)	花药产生 植株数	花药再生植株 百分率(%)
$T_{710} \times Sy_{12}$	480	51	0	10.60	16	3.30	22	4.58
$84-47 \times M_6$	400	12	6	3.00	3	0.75	4	1.00
$T_{710} \times RP$	200	2	0	1.00	0	0	2	1.00
$RP \times Sy_{12}$	100	8	0	8.00	0	0	5	5.00

表2 3个 $2n$ 配子材料杂交组合中诱导花药产生植株的倍性鉴定结果

材料	代号	气孔保卫细胞 叶绿体数目	根尖染色体 数目	倍 性	材料	代号	气孔保卫细胞 叶绿体数目	根尖染色体 数目	倍 性
$T_{710} \times Sy_{12}$	1	25.3 ± 2.83	48	$4x$	$T_{710} \times Sy_{12}$	17	21.35 ± 4.16	24	$2x$
	2	21.1 ± 2.12	24	$2x$		18	21.4 ± 6.1	24	$2x$
	3	19.9 ± 5.63	24	$2x$		19	19.0 ± 7.86	24	$2x$
	4	20.1 ± 4.36	24	$2x$		20	21.5 ± 5.26	24	$2x$
	5	20.1 ± 3.54	24	$2x$		21	20.3 ± 5.18	24	$2x$
	6	20.3 ± 3.54	24	$2x$		22	21.0 ± 1.85	24	$2x$
	7	18.6 ± 5.4	24	$2x$	$T_{710} \times RP$	1	19.2 ± 5.20	24	$2x$
	8	21.3 ± 9.89	24	$2x$		2	20.5 ± 3.1	24	$2x$
	9	22.9 ± 4.65	—	$2x/4x$		1	19.8 ± 6.67	24	$2x$
	10	20.1 ± 4.50	24	$2x$		2	19.6 ± 5.94	24	$2x$
	11	20.5 ± 3.75	24	$2x$	甘农7号	3	20.6 ± 7.32	24	$2x$
	13	25.0 ± 4.13	48	$4x$		4	19.8 ± 1.40	24	$2x$
	14	19.6 ± 5.82	24	$2x$		ck_1^+	26.38 ± 7.78	48	$4x$
	15	18.8 ± 4.26	24	$2x$		ck_2^+	20.62 ± 5.2	24	$2x$
	16	20.2 ± 3.44	24	$2x$					

3.2 双单倍体雄配子及雌配子倍性鉴定

3.2.1 雄配子(花粉粒大小)鉴定结果

在开花期对 $T_{710} \times Sy_{12}$ 组合产生的 19 个双单倍体, $84-47 \times M_6$ 的 4 个双单倍体, $T_{710} \times RP$ 的 2 个双单倍体及 $RP \times Sy_{12}$ 的 5 个双单倍体进行花粉大小的测定, 并对花粉母细胞减数分裂进行观察(确定的花粉产生的前提)。

结果发现具 5% 以上的 $2n$ 花粉植株为 2 个, 其它都小于 5% (表 3)。

3.2.2 雌配子

分别用 $Desiree \times NT_2$ 的四倍体为父本与各组合产生的双单倍体植株为母本杂交, 在 $(DIH T_{710} \times Sy_{12}) - 20$ 上得到四倍体浆果(表 3), 说明双单倍体 $(DIH T_{710} \times Sy_{12}) - 20$ 为产生 $2n$ 卵的品系。

表 3 从 4 个杂交组合中获得的双单倍体中具有 $2n$ 配子性状个体的观察结果

组 合	观察植株数	2n 花粉	2n 卵		
		具 5% 或以上 $2n$ 花粉株数	授粉花数/株	具 $2n$ 卵植株	平均种子数/每果
$DIHT_{710} \times Sy_{12}$	22	1	20	1	18.5
$DIH84-47 \times M_6$	4	0	20	0	0
$DIHT_{710} \times RP$	2	0	20	0	0
$DIHRP \times Sy_{12}$	5	1	20	0	0

注: DIH 代表双单倍体

4 讨 论

由于 $2n$ 配子在二倍体马铃薯野生种及近缘栽培种二倍体杂种中广泛存在, 使得马铃薯育种有了一条理想的桥梁通向野生基因库。通过不同二倍体种(近缘栽培种及野生种)间杂交, 把许多有价值的性状如抗病、抗虫性、对干旱和霜冻的忍耐性等转移到二倍体杂种中, 再以有希望的性状及 $2n$ 配子形成作为选择指标对 $2x$ 单倍体—野生种杂种进行选择, 然后经 $4x-2x$, $2x-4x$ 或 $2x-2x$ 杂交产生具有在各种性状上具高度杂种优势的四倍体, 实现马铃薯种质资源的利用。现已证明, 从双单倍体种间杂种获得 $2n$ 配子不成问题, 因为许多报道这样的杂种中有具 $2n$ 配子的个体。

S. phureja—*Tuberosum* 双单倍体杂种已
中国知网用于马铃薯新的育种方法 $4x-2x$ 和

$2x-2x(2n$ 配子), 然而这些杂种具有不理想的薯形, 因此后代 $4x$ 家系具较差的块茎性状是利用 $4x-2x$ 和 $2x-2x$ 获得四倍体优良组合的主要障碍(Werner 和 Peloquin, 1990)。本研究正是为解决此困难, 利用升倍降倍的倍性操作原理和基因在杂种配子中重组的原理, 把具有 $2n$ 配子($2n$ 卵和 $2n$ 花粉)材料, 首先同栽培四倍体杂交即 $4x-2x$ 或 $2x-4x$ 及 $2x-2x$, 再从此杂种中诱导二倍体, 从中可望得到基因型重组的个体, 它既具有优良的块茎性状和其它农艺性状, 又综合了一定抗性基因及 $2n$ 配子特性。其设想如图 1 所示。

就 $2n$ 配子的基因重组而言, 从遗传上讲, 由于控制 $2n$ 配子的基因是隐性单基因, 那么无论它是 FDR 型或 SDR 型的 $2n$ 配子, 则 $2n$ 配子中控制 $2n$ 配子的基因一定是隐性纯合的, 若为平行纺缍体机制则为 $\frac{PS}{PS}$,

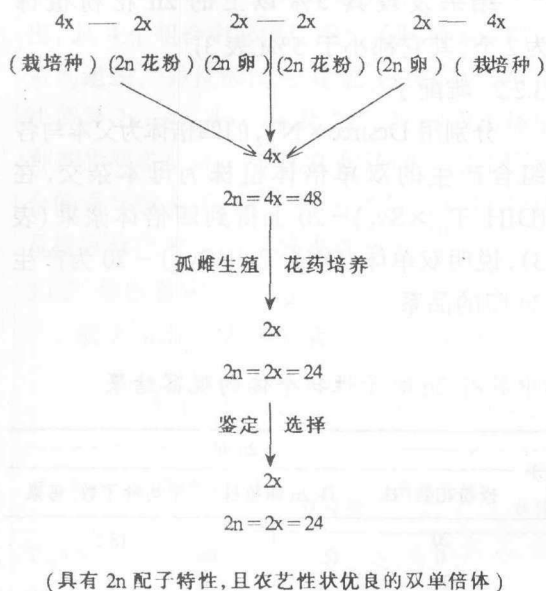


图1 转育 2n 配子性状给农艺性状优良的双单倍体

若为 2n 卵则一般为 $\frac{OS}{OS}$, 这样与栽培种四倍体杂交产生的四倍体后代的 2n 配子基因型可为 PsPspsps 或 OsOsosos 复式基因型, 当形成配子时为染色体随机分离则产生的配子应为 1PsPs:4Psps:1psps (以 Ps 为例), 则 psps 隐性基因配子占总配子数的 1/6, 同样诱导此四倍体产生双单倍体中约有 1/6 个体具有 2n 配子特性。若为染色单体随机分离, 随着丝点与该基因间发生交换, 则 PsPspsps:psps = 3:8:3, psps 的配子占总配子的 3/14。这是在配子成活率相同的条件下的结果。总之, 无论何种可能, 在降倍后的个体中选择 psps 这样具 2n 配子基因型个体的机会在正常条件下约 17%

以上。同时由于 4x-2x 或 2x-4x 杂种中又接合了栽培种 4x 的优良农艺性, 因此在其双单倍体后代中选择既包括 2n 基因又具优良性状特别是块茎优良性状的个体是完全可能的, 这为 2n 配子的利用提供了一条新的途径。

本试验结果已经证明, 从 2n 配子杂种四倍体中诱导出了具 2n 配子的双单倍体 (表 3), 充分说明实现以上所提的设想是完全可能的。

参 考 文 献

- 1 Rodomiro ortiz and S J Ploquin. Breeding for 2n production in haploid X speciese 2X potato hybrid. Am Potato J. 1991, 68:690-703
- 2 Rodomiro Ortiz et al. Use of 2x tuberosum haploid-wild species hybrids to improve yield and quality in 4x cultivated potato. Euphytica, 1988, 53:1-9
- 3 Rodomiro ortiz and S J Peloquin. A new method of producing 4x hybrid true potato seed. Euphytica, 1991, 57:103 ~ 107
- 4 Joanna E W and S J Peloquin. Yield and tuber characteristics of 4x progeny from 2x-2x crosses. Potato Research, 1991, 34:261 ~ 267
- 5 Werner J E and S J Peloquin. Inheritance of two mechanism of 2n egg formation in 2x potatoes. J Hered, 1990, 81:371 ~ 374
- 6 冉毅东, 李景华. 马铃薯近缘栽培种间杂种优势及配合力的研究. 马铃薯杂志, 1988, 1:1 ~ 10
- 7 戴朝曦等. 马铃薯遗传工程的研究. 马铃薯杂志, 1990, 4:23 ~ 28

(其它 12 篇本刊略)

张新荣

DIHAPLOIDS WITH 2N GAMETES WERE OBTAINED BY ANTHER CULTURE OF TETRAPLOIDS FROM 4X-2X, 2X-4X AND 2X-2X HYBRIDS IN POTATOES

Ran Yidong

(Agriculture Biotechnological institute, Gansu Agricultural University)

ABSTRACT

Four hybrids were obtained from $4x \times 2x$, $2x \times 4x$, and $2x \times 2x$ crosses by using two tetraploids (*Solanum tuberosum* L.) and three diploid materials which can produce 2n gametes. Thirty-two dihaploid plantlets were regenerated from embryoids of anthers in the four tetraploid hybrids by anther culture *in vitro*. Two of them could produce more than 5% of 2n pollen and one of them could produce 2n eggs. The results suggest that the ploid manipulation through sexual polyploidization and haploid induction is an effect method to get dihaploids with 2n gametes in potatoes.

