

用胚挽救方法获得马铃薯种间杂种植株

王 蒂 冉毅东 戴朝曦

(甘肃农业大学农学系)

摘 要

用组织培养方法挽救马铃薯种间杂种幼胚, 使得用常规方法难以获得的种间杂交种幼胚长成植株。只有杂交后10天以上的幼胚才能形成完整植株。较高浓度的蔗糖培养及培养早期暗处理有利于幼胚发育。

1 前 言

在栽培马铃薯种质资源之外大约存在有200个左右的野生种及几千个近缘栽培种。如何将此基因库中的优质、抗逆基因引进栽培马铃薯一直是育种工作者多年努力的目标。但是, 种间杂交的一个严重问题是授精后不久杂种胚乳解离, 幼胚死亡, 因而难以获得杂交后代。采用胚挽救技术将有可能获得用常规方法难以获得的杂种后代, 使广泛利用马铃薯远缘种质资源成为可能。

2 材料及方法

2.1 材料

3个 *S. tuberosum* 四倍体材料 F 12, 86024 和 8403-3 作为母体; NW 151 和 AR 174 为新型栽培种四倍体品系, 另有 *S. spengazzinii*, *S. microdontum*, *S. demissum*, *S. infundibulinforme* 和 *S. bulbocastanum* 5个二倍体野生种作为父本, 其倍性见表1。所有植株均为试管苗大田移栽。

表 1 花粉粒的着色、发芽和2n配子百分率

品 系 及 种	倍 性	着 色	发 芽	2n
F 12	4 x	78.2	52.2	52
86024	4 x	94.0	55.4	60
8404 3	4 x	95.4	23.4	36
NW156	4 x	84.2	48.4	49
AR174	4 x	89.7	74.9	64
<i>S. bulbocastanum</i>	2 x	91.4	69.6	5.6
<i>S. demissum</i>	6 x	44.2	7.4	20.2
<i>S. infundibulinforme</i>	2 x	84.6	24.3	13.1
<i>S. microdontum</i>	2 x	88.6	31.2	4.5
<i>S. spengazzinii</i>	2 x	93.2	20.2	26.6

2.2 方法

a. 授粉 (1)大田授粉: 当1花序的第1朵花完全开放时, 将此花序的第2, 3朵花去雄并与当日和次日两次授粉。其余花全部摘除。(2)插瓶授粉: 长30~40cm带有第1朵花完全开放花序的茎从大田植株剪下, 剥蕾授粉与上同。除紧靠花序的两片叶保留外, 下部叶片和腋叶全部摘除。每两茎段插入装有50 ml广口瓶中。在浆果生长过程中, 茎段基部需多次切除以疏通其维管组织, 防止腐烂。每日换水1次。

b. 培养基 MS+IAA2mg/L+0.25 mg GA/L+0.7%琼脂, 蔗糖分别为每升80克、50克和30克3个处理。

c. 胚挽救 将杂交后不同天数脱落的浆果采集后水洗, 70%的酒精浸5秒钟, 10%的次氯酸表面灭菌15分钟, 然后灭菌水冲洗四遍。接种有两处理: (1)浆果一切为四, 连同子房一同接种——授精子房培养; (2)切开浆果, 剥出杂交籽粒; 以籽粒接种——胚培养。在最初培养的25天里有光照24, 12小时和黑暗3个处理, 以后均在温度23~27℃和1000~3000lx连续光照的同一培养室中。各处理均重复2次, 在培养后的1~8周时间里对产生植株数计数, 并进行统计分析。

d. 花粉粒生活力及2n配子百分率 (1)用醋酸地衣红对花粉粒染色, 在显微镜下对着色花粉粒和2n花粉粒计数。(2)花粉粒发芽培养基为100 ml水+20 g蔗糖+5 g硼酸+5 g氢氧化钙。具体方法见Jannaen和Hermisen(1976)^[11]。

3 结果与分析

a. 发育完全的花粉在显微镜下观察饱满, 圆形, 着色完全呈深红色; 而发育不完全的花粉形状不规则, 且不着色。2n花粉与n花粉大小也很容易区别。花粉在人工培养基上产生花粉管数及其长度随时间延长而增加, 因此以5小时后计数为准。从表1结果看出花粉粒三项度量指标的变异范围较大, 相关分析证明它们之间无线性关系。

b. 本实验在大田中只获得F12×AR1713个浆果, 其余杂交均无浆果产生。插瓶授粉结浆果情况相对较好。表2列出获得浆果的各杂交组合。由于浸在水中茎段腐烂严重, 不断有浆果脱落, 虽然每日换水1次, 但杂交后26天之内全部浆果脱落。以*S. microdontum*, *S. bulbocastanum*, *S. demissum*和*S. infundibulinforme*为父本的杂交均无浆果形成。将脱落浆果切开后发现部分浆果内有杂交种子形成, 另一些则只

表2 杂交结果和胚培养产生植株的百分率*

杂交组合	浆果/杂交花朵	芽在插瓶中生长时间			
		6~10天	11~15天	16~20天	21~26天
F12× <i>S. spegazzinii</i>	0.05	0	10.6		
F12×AR174	0.26	0.47	18.2	24.7	30.7
86024× <i>S. spegazzinii</i>	0.04	0.28	4.6	11.8	
86021×AR174	0.37	0.24	19.3	38.8	60.75
84043×NW154	0.17	0	12.4	20.2	52.3
平均	0.178	0.193a	12.02b**	24.85c**	51.58d**

* MS+2mgIAA/L+0.25mgGA/L+0.7%琼脂+0.8%蔗糖, 培养最初25天黑暗处理, 然后转入23~27℃、连续光照培养室

** F>F_{0.01}显著差异

有膨大的胚珠。F12×AR174和86024×AR174两杂交组合获得的浆果以及浆果内种子较多, 因而可以进行光照时间, 蔗糖浓度及子房或胚培养的不同处理(表3、表4)。结果表明培养最初25天暗处理和高蔗糖浓度有助于幼胚产生植株; 幼小杂交籽粒直接培养效果明显超过连同子房一同培养。幼小籽粒在培养基上产生植株数与其成熟度成正比。杂交后10天以内脱落浆果中籽粒产生植株最少, 因其不能直接产生植株, 而要先形成愈伤组织, 然后分化植株。成熟胚对光照和蔗糖浓度选择性降低, 随胚成熟度增加, 各处理间差异减小。

表3 光照及培养材料对F12×AR174的胚培养效果

浆果在植株上 上生长时间 (天)	培养材料	光照时间 (小时)		
		24	12	0
9	籽粒	1.2*	0	0
	子房	0	0	0
11	籽粒	18.6	21.8	36.0
	子房	0	0	0
20	籽粒	30.8	31.4	39.2
	子房	0	0	0
26	籽粒	48.4	42.0	52.4
	子房	0	0	0
平均		21.49a	21.48a	31.9b**

* 均为产生植株百分数。

** 差异显著 (F0.01)。

表1 蔗糖浓度对86024×AR174的胚培养效果

浆果在植株上 上生长时间 (天)	蔗糖浓度 (克/升)		
	80	50	30
10	0.45*	0.20	0
11	25.05	16.0	15.95
20	42.7	35.8	24.75
24	51.3	38.7	28.25
平均	30.64**	27.69	17.25

* 幼芽均当产生植株百分数

** 差异显著 (F0.01)

4 讨论及结论

a. Simon和Peloquin(1976)认为同一品系的FDR 2n花粉在培养基上表现出比n花粉明显的发芽优势, 而SDR 2n花粉则与同一品系的n花粉相同^[2]。本实验中花粉发芽率与2n配子百分率无线性关系, 是否表明这些2n配子为SDR配子, 或是因为2n配子太少。

b. 5个作为父本的野生种的2n配子百分率均超过3%这一最低水平 (Hermundstad和Peloquin, 1987)^[13]。其中以*S. spengazzinii*的2n花粉百分率相对较高。本实验再次证明4x×2x杂交结浆果数与2x亲本的2n配子百分率无正相关性 (Jacobsen, 1980)^[14]。

c. 杂交后10天以内的马铃薯胚还无子叶原基形成 (Clugston, 1985)^[15], 因而很难在培养基上产生植株, 或必须经过愈伤组织阶段。

d. 马铃薯幼胚极小, 难以无损伤地与其胚乳分离, 故可进行杂交籽粒培养, 以代替胚培养; 授精子房培养不适合于马铃薯杂种胚挽救。

e. 马铃薯杂种幼胚培养需要相对较高的蔗糖浓度以及最初25天的暗处理, 这可能与Inviro幼胚所处胚乳环境相近。

参 考 文 献

1 Jannssen A B and J. G. Th. Hermesen Estimating pollen fertility in solanum species and haploids. Euphytica, 1976. 25 : 577~586

2 Simon P W and S J Peloquin. Pollen vigour as a function of mode of 2n gamete formation in potato. J Hered. 1976, 67 : 204~208

3 Hermundstad S A and S J Peloquin. Breeding at the 2x level and sexual polyploidization. In: G J Jellis and D. E. Richardson (Eds). The production of new potato varieties: technological advances. Cambridge Univ. Press. 1987

4 Jacobsen, E., 1980. Diploidoid formation and

its importance for the seed set in 4x-2x crosses in potato Z. Pflanzenschgt. 1987, 84: 240~249
5 Clugston D B. The use of embryo culture in

crosses between potato species. M Sc Thesis. University of Birmingham, 1985

INDUCTION OF POTATO PLANTLETS OF INTERSPECIFIC HYBRIDS BY IN VITRO EMBRYO RESCUE

Wang Di, Ran Yidong and Dai Chaoxi

(Department of Agronomy, Gansu Agricultural University)

ABSTRACT

Plantlets of potato interspecific hybrids were induced by embryo rescue, which other wise were difficult to get by the conventional means. Only embryos of over 10 days after hybridization in vivo grew into properly developed plantlets. The medium with high sucrose content and dark treatment in the first 25 days of incubation facilitated the plantlet development significantly.

(上接91页)

4.3 地区级原种场问题

地区级的马铃薯原种场, 重点是繁育好本地区的主栽品种, 不仅应该抓引种观察试验, 还要进行农田基本建设。应有一定面积的水浇地, 不能靠天制种, 应使本场有能力生产本地区主栽品种的原原种, 以便本场一级原种田使用; 要采取快速繁殖方法生产原原种和一级原种, 不应按普通种植法年年种自产的种子, 严重影响种薯级别、质量和效

益; 地区级原种场和旗县级种薯基地要严格地订立种薯产销合同, 不应该出现种薯当商品薯销售等现象。

4.4 决选意见

根据我场 1 年对荷兰 13 个马铃薯和我盟主栽品种紫花白种植观察记载结果, 目前我盟的主栽品种仍应是紫花白; 8607 可作为我盟后山地区的搭配品种; 8602 可作为我盟前山地区的搭配品种; 其它品种应继续小型试验或作为亲本应用。