

在研究马铃薯对病原菌抗病能级 育种工作中利用双单体和 未减数配子的评价

M. J. De, Mainc

(苏格兰作物研究所, 彭特兰试验站)

摘 要

在马铃薯抗晚疫病 (*Phytophora infestans*) 和抗乳状马铃薯胞囊线虫病 (*Globodera pallida*) 育种程序中, 从双单体 ($2n=24$) 为亲本的杂交后代中获得的四倍体 ($4x$) 植株, 大体上雌蕊是四倍体。在温室和田间对第一年和第二年块茎的测定表明, 大多数高抗疫病的双单倍体的后代也表现高抗马铃薯晚疫病。用双单体 PDH182 和 PDH247 分别与一个四倍体杂交, 选择一般配合力高且高抗马铃薯胞囊线虫病(PCN)的个体, 其后代高抗晚疫病, 且有1/3的植株也高抗PCN。

对双单倍体 $\times 4x$ 的杂交组合后代, 在实生苗世代进行离体片鉴定, 来快速筛选疫病抗性。观察来自不同抗疫病双单倍体后代的平均抗性, 发现四倍体亲本之间是有差异的。

试验同时证明, 不同的双单倍体在疫病的抗性程度上, 对后代的遗传传递力是有差异的。这可归因于未减数配子组成方式的差异, 即减数分裂时第一次分裂的重组或第二次分裂的重组(SDR) 都有差异。如果所有未减数配子都由 SDR 产生, 则这种差异可归因于不同双单倍体之间抗疫病基因纯合程度上的差异。

这种双单体 $\times 4x$ 的杂交组合, 每个授粉株只产生很少的后代。这少量的实生苗可能以比较高的频率产生带有目标性状的后代。由于必须种植这少量的实生苗, 以便找到所要求的重组性状, 所以在种植中寻求补救措施, 而抗性鉴定要比常规育种方便得多。

所得到的这些四倍体杂种可以同时三个方面用于第二轮的育种工作: 即, 与其它的四倍体杂交; 与双单倍体杂交以选择互补性状, 以及产生综合多种抗性的双单倍体。

引 言

双单倍体(dihaploid) 马铃薯是来自马

铃薯普通栽培种 (*Solanum tuberosum*) 的未受精卵细胞发育而成的植株。双倍体可产生较高数量级的抗病性, 有时比其四倍体亲

本还高(De, Maine, 1978a)。这种双单倍体在四倍体马铃薯栽培育种中的利用, 要依赖于受遗传基础支配的抗性表达以及所期望的基因重组传递到四倍体的效率。这种效率受配子组成形式的影响。四倍体从双单倍体 $\times$ 四倍体杂交组合中获得。因为 $2x$ 马铃薯能主要以两种不规则的减数分裂产生未减数配子: 第一次分裂重组(FDR)或第二次分裂重组(SDR)配子。FDR产生与孢子体相似的 $2x$ 配子, 某些变化可归因于染色体间的交换, 而在SDR之后产生的配子也许与孢子体是不一样的, 这是由于不同的同源染色体的分离而造成的。

Peloquin等对 $2x$ 马铃薯通过FDR和SDR产生的配子上做了大量的工作。例如: Kidane-Maine和Peloquin (1971); Mendiburu, peloquin和Mok (1974); Mok和Peloquin (1975); 以及Mendiburu和Peloquin (1977)。由于FDR配子更可能保留那些在 $2x$ 亲本中所表现出来的优良基因组合, 所以在育种过程中它显得更为重要。

本试验结果来自于两年在双单倍体 $\times$ 四倍体杂交组合的四倍体后代中对马铃薯叶片晚疫病(*Phytophthora infestans*)和马铃薯胞囊线虫病(*Potato cyst-nematode* (PCN)) *Globodera Pallida*的抗性测验。这些杂交组合的目的是使有用的数量性状在较高水平上进行表达的育种方案的第一轮工作(De, Maine 1978b)。这就通过双单倍体的方式开拓了未减数雌配子的产生途径。由于双单倍体大多是雄性不育, 所以主要用作授粉者的是四倍体。要评价某一育种程序的效率, 不仅要确定其后代是否是所要求类型的比例, 或是其他比例, 而且必须确定怎样才能较为容易地产生后代。

材 料 和 方 法

下面谈谈这些无性系(Clone)在育种

程度中的应用情况。有些供试的无性系不但有叶片抗晚疫性和PCN抗性, 而且还具有另一些更有用的性状。

PDH40和52是叶片易感晚疫病的Pentland Crown双单倍体。PDH135, 159, 182和247是 $1x$ 无性系8318(4)的双单倍体。依据从0(高感)到9(高抗)的抗性值划分, 其平均抗性值分别为6.3, 6.4, 8.4和8.7。PDH326是 $4x$ 无性系8318(6)的抗晚疫双单倍体(平均值6.7)。C72(1)是PDH182加倍的 $1x$ 体。Pentland Crown具有叶片低抗晚疫病的特性, 8318(4)是抗晚疫病的四倍体(平均抗性值7.7), 用它已产生出许多高抗性的双单倍体。10300(13)和10899(14)也是四倍体种, 且对于PCN(*G. Pallida*)抗性这一性状上均具较高的一般配合力(GCA)。前者的平均抗性值是4, 后者的平均抗性值还没有确定。所有这些双单倍体都用作母本, 有的(如PDH40)也用作父本。

用于授粉的花从采用砖培方法获得, 或者从田间小区中收下并保存于含有水的牛奶瓶中(Melean & Stevensen, 1952)。为了避免双单倍体花粉不必要的损失, 淀粉前不必去雄。由于在细胞学筛选之后, 只保留 $4x$ 后代, 任何自交 $2x$ 都要淘汰。用于授粉的四倍体花粉, 要提前两天去雄。

表1列出获得这些后代和实生苗的数据来源。实生苗的倍性数字来自于1978年杂交组合, 这些杂交组合的后代通过根尖压片观察染色体, 确定均为四倍体。

用病原菌(*P. infestans*)的20号小种进行了叶片抗晚疫测定。该小种可克服R(抗性)基因1~5和7~11。试验使用了三种测验方法。①在傍晚温度 15°C , 相对湿度100%时, 将被测材料转移到荫蔽的温室, 保持温度 17°C , 每个无性系选3株用游动孢子的悬浮液喷洒。接种后保持7天。

表 1. 双单体×四倍体杂交组合的授粉结果

后 代	母 本	父 本	授粉数	浆果数	种子数	实生苗 种植数	倍 性
1978年							
HAT5	PDH40	8318(4)	123	26	80	26	4 x
HAT9	PDH52	8318(4)	125	11	24	8	3 x
HAT10	PDH135	10300(13)	6	3	9	4	4 x
HAT11	PDH182	10300(13)	290	40	278	100	4 x
HAT13	PDH182	Pentland Crown	12	2	21	5	4 x
HAT14	PDH247	10300(13)	67	4	27	16	4 x
HAT15	8318(4)	PDH40	166	2	31	5	4 x
1980年							
HAT24	C72(1)	Pentland Crown	195	7	33	14	4 x
HAT27	C72(1)	10899(14)	93	2	21	11	4 x
HAT41	PDH135	10899(14)	93	24	239	193	4 x
HAT45	PDH135	Pentland Crown	152	23	111	25	4 x
HAT46	PDH159	10300(13)	18	1	6	6	4 x
HAT47	PDH182	Pentland Crown	9	1	13	2	4 x
HAT48	PDH247	10899(14)	34	5	118	62	4 x
HAT49	PDH247	Pentland Crown	21	8	79	47	4 x
HAT50	PDH247	10300(13)	16	1	17	8	4 x
HAT51	PDH326	10899(14)	5	2	61	54	4 x

1980和1981年采用这一方法对1978年收到的种子加倍后的植株进行检测。② 用 Malcolmsom 技术 (1969) 接种并标记离体叶片 (每株实生苗 1 个叶簇上的 3 个叶片)。这一方法用于在实生苗世代中筛选从 1980 年授粉而产生的后代。③ 1981 年 3 个块茎小区与易感病的栽培种 King Edward 种在一起。King Edward 的盆栽植株用方法 1 接种, 并在 7 月 13 日以 1 : 2 的比率移栽到田间的病圃中。让其自然传播, 小区调查到 8 月 11 日为止。这一方法用于已通过方法 1 在 1980 和 1981 年做了测验的无性系。在各种情况下, 抗病性都应记为 0 (高感) 到 9 (高抗) 的分级系列。对于疫病抗性, 只从抗疫双亲

产生的后代中筛选。对于 PCN 的抗性测定, 每个无性系选 2 株种于装有传播病害土壤的塑料容器中 (方法详见 Phillips, Forrest & Wilson, 1980)。胞囊的量由 Pentland Crown 控制的百分数表示 (感病性百分数)。对于抗 PCN 的性状只筛选 PCN 亲本的后代。

结 果 与 讨 论

表 1 说明, 上述类型育种程序中的主要限制因素是实生种子和实生苗的数量少。双单倍体生育能力较低。他们的二倍体配子是通过减数分裂不正常产生的, 而这种不正常发生的频率很低。每授粉 100 株所产生的

这种浆果的数量一般非常少, 并且分布从 HAT27 中的 2 (这是由于育性低, 因两亲本都是 4x) 到 HAT10 中的 50。每个浆果中平均种子数的变化从 HAT9 中的 2.2 到 30.5。每一授粉株所产生的种子平均数是低的, 这主要归因于结成的浆果很少。一旦产生了浆果, 则它们通常都含有种子。双单倍体亲本的花, 表现为不育或育性低的现象, 就是这种情况的最好说明。尽管由实生种子产生的后代其百分数在 30~60% 之间, 但能长成植株的实生种子的百分数的变化范围还是比较宽的, 不能发芽的种子可能产生于没有授精或没有完全授精的胚囊, 但这种胚囊已经历了某些发育过程。考虑到单亲本 (双单倍体) 孤雌生殖的起源, 这似乎是一个可行的解释。

表 2 是在温室中 2 年以上的全部植株叶片感染疫病的测验结果。为了便于对后代进行比较, 将各无性系分为 3 个抗性类别, 即: 最低抗性的无性系记为 0~1, 这一类极易感病, 以至无法用于抗病育种; 中等抗性的无性系记为 5 和 6, 将其与其他在高抗水平上表达的优良性状结合在一起的时候, 是一种可以利用的抗性; 高抗性的无性系记为 6 以上, 具有这类抗性的品种能明显提高自身的价值。

1980 和 1981 年在温室中对标记的无性系测验的结果, 其相关系数是 0.85 ($P < 0.001$)。1981 年进行的抗疫性测验数值, 不仅在田间出现, 而且也与温室中的测验结果相一致, 相关系数是 0.77 ($P < 0.001$)。

表 2. 叶片晚疫病: 抗性双单倍体 × 4x 后代整株测验数据
(各种抗性类别无性系的数量)

后 代	0—4	5—6	>6	实生苗测验总数	后代平均值
HAT3	5	5	1	11	4.6
HAT9	3	2	1	6	4.8
HAT10	1	1	2	4	6.0
HAT11	0	0	49	49	8.4
HAT13	1	0	1	1	4.0
HAT14	0	0	11	11	8.0
HAT15	2	0	0	2	3.0

表 2 中对于后代 HAT11 和 14 出现的数据是很明显的。在这里对所有无性系测验的结果都高于 6。这相同的抗性种类和它们的双单倍体亲本一样。虽然 HAT10 后代的平均值低于 HAT11 和 14, 但也接近于其双单倍体亲本。不管怎么样, 有些栽培种是在高值种类里。如 HAT11 和 14, 以及 HAT10, 表明了相当大的变化。产生于一个普通 4x 亲本与包括不论是来自双单倍体 FDR 还是 SDR 配子的杂交组合的后代, 都会有相近的平均

数。所以, 不能确切地说出是那种系统在起作用。在 HATs11 和 14 中较小的变化 (指平均数) 可能表明 PDHs182 和 247 是 FDR。但是, 如果这些双单倍体是高度纯合的, 则对于抗病基因来说, SDR 也可能同样说明这个结果。

为了获得更多有关抗疫性通过双单倍体传递的资料, 对 1980 年所配组合产生的各种实生苗, 进行了离体叶片测验 (见表 3)。这些结果表明, 在后代范围内比整株测验有

更大的变化。这通过后代HAT48和49(表3)与HAT14(表2)均可说明。它们都以PDH247作为2x亲本。各种对照表明, 叶片病斑整株测验更为严密, 所以后代抗病性和抗病力可能会有某些露出来的变化。这些病在叶片测验中表明叶片抗病性的变化。抗病测验结果总体也给出在抗病性上本能为着差上的某些启示。四倍体19300(13)可产生抗病性很强的后代, 如在温室和田间作整株测验表明的那样。叶片测验表明, 以Pearland Crown 亲本的后代其平均抗性要比从10899(14)选着的双单倍体或加倍后的双单倍体亲本杂交所得到的后代的抗性要低。8318(4)和Pearland Crown 双单倍体PDH40及52之间杂交所产生的后代(HATs5, 9和15)其平均抗性也比较低。

从高抗晚疫病病的8318(4)获得的大量双单倍

体的估计是出人意料的。在这里, 各种四倍体中可能有基因的差异。这就不仅增加了其后代的抗性水平, 从而超过其他亲本的配子所携带的抗性, 而且也许在亲本的作用中阻碍了抗性的表达。这些测验结果表明, 来自亲本高抗性双单倍体染色体加倍着意的配子, 也许不能象来自原亲本那样。(用HATs11和149, 表2和HATs19, 48和49, 表3; 与HATs24和27, 表3相比较), 进行有效的抗病性传递。这种加倍的配子, 很可能表现为非选择的染色体加倍配子, 在遗传学上很类似于原亲本加倍配子SDR所产生的配子, 与正常四倍体的减数分裂和SDR一样, 这两者都包括许多基因的再分配。

表 3. 1980年双单倍体四倍体亲本后代的叶片测验

亲本	后代	抗病性	抗病力	抗病性	抗病力
HAT13	13	4.9			
HAT15	6	3	9	6.4	
HAT41	50	26	47	193	3.6
HAT43	9	12	2	23	4.7
HAT46	0	2	4	6	7.5
HAT47	0	2	0	2	6.0
HAT48	7	11	44	62	7.3
HAT49	3	15	37	43	7.1
HAT50	9	0	2	2	6.0
HAT51	7	40	5	53	6.1

表 4. 在从双单倍体四倍体后代中筛选的各类马铃薯晚疫病病体中实生苗的数量

后代	抗病性	抗病力	抗病性	抗病力
HAT10	6-20	21-30	2	4
HAT11	19	33	14	66
HAT14	8	5	3	11

马铃薯胞囊线虫病抗性筛选结果列于表4。和表2一样, 无性系被指定为抗病类型。最低抗性含有的感病体超过50%, 认为这一类没有利用价值; 中等的含感病体21~50%, 这样无性系的利用途径是有限的; 最高的抗病种类(可感病体少于21%) 在PCN抗病育种工作中将会有很高的利用价值。在HAT11中, 最高抗性种类数为19, 也测定了其叶片晚疫病抗性。发现它们象期望的那样都有高的抗性。在HAT14中测验了6个高抗PCN个体中的4个, 其抗御疫病的能力也是高的。在HAT10中的2个高抗PCN个体中, 一个的晚疫病抗性值是6, 另一个是7。40300(13)后代中的PCN抗性晚接近于在 $4x \times 4x$ 组合中对其本身GCA的期望估计数。因此, 它对于其后代的抗性没有显著影响。这是因为有一个不正常产生(未减数)配子的亲本。

结 论

总之, 本试验结果表明, 通过应用双单倍体, 选择带有某种性状的个体, 并与四倍体杂交, 选择与其他个体具有高GCA(一般配合力)的类型, 可以把高数量级的抗性有效地结合于 $4x$ 杂种中。特别有价值的是对晚疫病的高抗性, 可通过某些双单倍体传递给后代的可靠性。种子生产也许要花费很多

时间, 并且要比传统的杂交育种工作付出更多的努力, 然后与之相反的是, 它又可补偿传统杂交育种的不足, 有较大的可能预知好的结果。这就可以在种植和测定中做到节省费用、材料, 这个也就避免了常规育种的大群体选择。

De, Maine 的育种方案启发我们, 应依靠来自双单倍体的未减数FDR配子。因为双单倍体是雄性不育, 并且这项方案指出, 在马铃薯中, 未减数的雌配子只产生于SDR(Mendiburu等, 1974; Taylor, 1978)。这项方案也承认, 由SDR产生配子要比计划的效率低。然而, 结果还是很令人鼓舞的。在第一轮应用双单倍体和未减数配子的育种工作中, 许多主要目标性状已经得到, 并有效地把对各种病原菌的抗性结合于四倍体马铃薯中。为了进一步开展育种工作, 有三种方法可在这些四倍体中应用。就是: ①在某—常规育种方案中与其他四倍体杂交。②与以选择其他性状为目标产生四倍体后代的双单倍体杂交。③用于产生综合多种抗性的双单倍体。而这些双单倍体将用于含有 $2x$ 配子的双单倍体——四倍体杂交的第二轮育种工作中。

芦永兴 译

王凤义 校

(接126页)

松土、追肥、培土等工作。

分布范围: 目前主要分布在青海省。

集 农 958

品种来源: 河北省围场县从黑龙江省集贤县农场引入。1984年河北省农作物品种审定委员会认定并确定继续推广。该品种一般亩产1500多公斤, 高的达2000公斤以上。

特征特性: 植株开展, 分枝少, 株高

40~60厘米, 茎叶浅绿色, 花冠紫色, 块茎圆形, 薯皮薯肉黄色, 结薯集中, 薯块较整齐, 淀粉含量14~16%, 生育期110天左右, 不抗晚疫病, 环腐病较轻。

栽培要点: 因植株矮小, 分枝少, 一般每亩可种植3500株左右。

分布范围: 目前主要分布在河北省, 广东也有种植, 在广东可冬播春收。该品种出口香港食用, 较受当地欢迎。