

马铃薯双单倍体诱导研究

庞万福¹ 屈冬玉² 纪颖彪² 姜淑荣¹

(1 廊坊市农林科学院, 廊坊 065000; 2 中国农科院蔬菜花卉研究所, 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 个浆果, 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, 100 个果中可产生 34 株双单倍体, 母本基因型对双单倍体的产生有很大的影响。

关键词 马铃薯 双单倍体 孤雌生殖 标记基因

中图分类号 S532.035.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7091(1999)增刊-0035-05

马铃薯普通栽培种(*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*)因是四倍体及其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 74% 的野生种是二倍体, 限制了野生种基因的利用, 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, 起到桥梁的作用, 提高育种效果。Hougas^[1]发现, 通过种间杂交, 以 *Solanum phureja* (2n-2x-24) 为授粉者, 诱导四倍体栽培马铃薯孤雌生殖, 产生出双单倍体, 目前通常采用 *Solanum phureja* PI 225682 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样。本研究旨在从 *Solanum phureja* 后代中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。

1 材料和方法

1.1 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、93003-3-9、93002-4-7、93002-7-7、93002-7-1、93002-4-1、93002-2-4 共 9 份以及 IVP35、IVP48(对照)。

1.2 方法

1.2.1 4x-2x 种间杂交 以四倍体马铃薯品种为母本, 授粉者为父本, 配制 3×11(共 33)个组合。杂交授粉于 1996 年 7~9 月在河北省坝上农科所网室内进行, 花粉育性用 0.2% 卡宝红溶液染色, 计算百分率。授粉时用少量的 0.2% 萘乙酸涂抹母本花柄节处, 座果后用纱布袋

及时套果。

1.2.2 双单倍体识别 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。1997 年春播种于温室育苗箱中,在苗期观测上胚轴、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 杂种呈现绿色的植株为双单倍体。收获时观测块茎皮的颜色,紫皮色块茎者为杂种,白、黄色块茎者为双单倍体。

细胞学鉴定:采用根尖染色体计数,参照 Chien-An Liu 的方法^[4],首先在室温下用 0.02 mol/L 羟喹啉(hydroxyquinoline)溶液处理根尖 3 h,然后在 Farmer's 溶液(乙醇:冰醋酸=3:1)固定至少 24 h。固定后 60 ℃下用 1N HCl 溶液水解根尖 10 min 后,用 2% 醋酸-地衣红(accto-orccin)溶液进行根尖染色 24 h。在 400 倍光学显微镜下进行染色体计数,识别双单倍体和四倍体、三倍体的杂种。

诱导频率计算:以 100 个浆果中产生的双单倍体数目表示诱导频率。

2 结果与分析

2.1 不同的授粉者诱导频率的比较

Solanum phureta 后代中不同的基因型诱导频率差异显著(表 1),93002-1-4 的双单倍体诱导频率为 81.8 株/100 个浆果,93002-4-4 的诱导频率为 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 浆果,而对照 IVP35、IVP48 的诱导率仅为 4 株双单倍体/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,从而降低了诱导率。如阴雨天气温降低,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,影响诱导率。

授粉者均产生 n 和 2n 花粉,产生 2n 花粉的频率从 20% 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($r = 0.129$)。

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。

2.2 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,2797

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	21.1
93003-7-7	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(对照)	85.0	5.0	130	3.8
IVP48(对照)	82.5	4.2	145	4.0

粒种子,鉴定出双单倍体 63 个(表 2)。平均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为 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,母性效应起有十分重要的作用。这可能是由于不同的四倍体母本开花结实性能不同所致,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造成的,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、座果能力也应是重要的因素。

表 2 四倍体母本产生双单倍体频率(双单倍体株数/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

3 讨论

3.1 马铃薯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^[6]也报道了同样的结果,他认为,这一现象是由于遗传背景不同和剂量效应导致的胚斑标记不易识别。但毕竟有 54.1%的杂种可被剔除,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色素存在,可剔除 70%以上的杂种植株。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。

3.2 影响马铃薯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(温度、湿度)的作用也不容忽视。授粉时环境温度夜间 13~16℃,白天温度 21~24℃,湿度 40%~60% 时发生双单倍体的频率最高。

参 考 文 献

- 1 Hougas R W, Peloquin S J, Ross R W. Haploids of the common potato. *J Hered*, 1958, 49: 103~107
- 2 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
- 3 Hermesen J G, Verdenius J. Selection from *solanum tuberosum* group *phureja* of genotypes combining high-frequency haploids induction with homozygosity for embryo spot. *Euphytica*, 1973, 22: 244~259
- 4 Chien-An Liu, Douches D S. Production of haploids of potato (*Solanum tuberosum* Subsp. *tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. *Euphytica*, 1993, 70: 113~126
- 5 Hougas R W, Peloquin S J, Gabert A C. Effect of seed parent and pollinator on frequency of haploids in *solanum tuberosum*. *Crop Sci*, 1964, 4: 593~595
- 6 Caligari P D, Powell S W, Kliddell, *et al*. Methods and strategies for detecting *Solanum tuberosum* dihaploids in interspecific crosses with *S. phureja*. *Ann Appl Biol*, 1988, 112: 323~328
- 7 Dodds K S, 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
- 8 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
- 9 Johnston S A, *et al*. The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet*, 1980, 57: 5~9
- 10 Peloquin S J, Hougas R W. Decaptation and genetic markers as related to haploid in *solanum tuberosum*. *Europ Potato J*. 1959, 2: 176~183

A Study on Dihaploid Induction of Potato

Pang Wanfu¹ Qu Dongyu² Ji Yingbiao² Jiang Shurong¹

(1 Langfang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Langfang 065000)

(2 Institute of Vegetable and Floriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract Through 4x-2x cross, 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 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 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: Potato; Dihaploid; Parthenogenesis; Marker gene