

麝香百合×亚洲百合(LA, Longiflorum×Asiatic) 百合杂种 F₁ 代镰刀菌抗性的快速鉴定

罗建让¹, 谢松林²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 欧中现代农业技术研发中心, 福建 漳州 363123)

摘要:以 99 个百合远缘杂种 F₁ 代-麝香百合×亚洲百合(LA)杂种为试材, 采用栽培基质接种病原菌的方法对杂种后代的镰刀菌抗性进行了鉴定。结果表明:百合无性系温室人工接种技术成功应用于该远缘杂种, 其母本麝香百合‘White Fox’对镰刀菌表现出高感, 而父本亚洲百合‘Connecticut King’具有较强抗性, 并成功遗传给杂种后代, 在后代基因型中实现一系列分离; 在后代杂种群中, 大部分基因型对镰刀菌表现出不同程度的抗性, F₁ 代镰刀菌抗性基因表达率为 70.1%。表明镰刀菌抗性由数量基因控制, 通过杂种系间杂交实现百合镰刀菌抗性的渐渗育种切实可行。

关键词:百合杂种; 镰刀菌; 无性系; 抗性

中图分类号:S 682.2⁺65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0090-05

百合为百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物的统称, 是重要的球根类花卉, 在世界花卉贸易, 尤其在鲜切花贸易中占据着十分重要的地位^[1]。尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是半知菌纲镰刀菌属的一种土传病原真菌, 其百合专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*)是百合种球及其切花生产中危害最大的一种病害, 主要引起茎盘腐烂及植株枯萎, 故在百合上称为枯萎病^[2]。由于化学消毒效果并不理想, 并且污染环境, 因此, 一个可持续性的替代方法便是培育抗性品种。

远缘杂交渐渗育种已经成为百合(*Lilium*, 2n=2x=24)新品种培育的一个主要手段。Straathof 等^[3]调查发现不同的百合杂种系间的镰刀菌抗性以东方百合最差, 麝香百合次之, 亚洲百合最强。虽然还未发现对镰刀菌完全免疫的野生种或栽培品种, 但通过系间杂交提高麝香百合镰刀菌抗性已经能够满足生产中的需要^[4]。而传统的抗性育种工作都集中于杂种系内部, 如亚洲百合品种之间的抗镰刀菌及病毒病育种^[4-5]。鉴于遗传差异、倍性和杂种不育是渐渗育种的主要障碍^[6], 近些年来的杂种系间抗性渐渗育种工作成效不大, 如 Löffler

等^[7]在试验中发现毛百合与麝香百合杂交产生的部分子代个体具有与毛百合相同的抗性, 证明毛百合可作为抗镰刀菌育种亲本, 但杂种的高度不育性使得杂种一代的进一步应用受到限制。相比从野生种渐渗抗性到栽培品种, 选取抗性强的栽培品种进行抗性育种具有独特的育种价值, 首先是所选亲本本身具有商业价值, 其次是其双亲的杂合性特征必将导致杂种 F₁ 代呈现较大的分离, 有些后代可以直接作为商业品种进行推广。因此选取栽培品种进行抗性育种能大大缩短育种周期, 但目前类似研究尚鲜见报道。

该试验选取不同杂种系来源的栽培品种进行杂交, 进行镰刀菌抗性育种, 通过对杂种 F₁ 代的镰刀菌抗性鉴定探索亲本抗性在杂种后代的分离规律, 以期为新品种或进一步应用选育优良的抗性材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取镰刀菌高抗亚洲百合品种‘Connecticut King’及麝香百合高感品种‘White Fox’为材料进行杂交, 切割柱头进行授粉并利用离体培养技术对杂种胚进行抢救^[8], 所得杂种植株种植于温室内保存。从 2 年生的健壮鳞茎上剥取鳞片进行鳞片扦插, 小籽球打破休眠后备用^[2]。

1.2 试验方法

1.2.1 镰刀菌的准备 选取侵染能力最强的尖孢镰刀菌百合专化型 2 个生理小种 Fol. 4 和 Fol. 11, 培养于

第一作者简介:罗建让(1978-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事花卉资源评价与育种等研究工作。E-mail:luojianrang@nwsuaf.edu.cn.

责任作者:谢松林(1982-), 男, 博士, 副研究员, 现主要从事球根类花卉资源及育种等研究工作。E-mail:songlin.xie@seadc.com.

基金项目:公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903020)。

收稿日期:2014-11-13

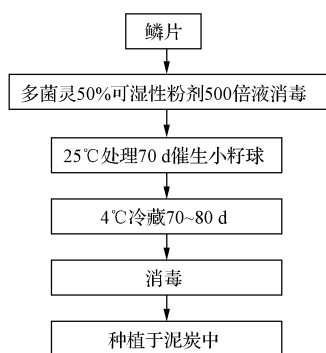


图1 鳞片扦插繁殖流程

Fig. 1 Scaling procedure

土豆右旋糖琼脂培养基上培养。培养3个月后与燕麦片:泥炭(1:4)混合,120℃灭菌2 h,然后将长势旺盛的镰刀菌混入,23℃培养14 d。病原物浓度确定方法为:取侵染后的混合基质5 g,加入50 mL水100 r/min震荡1 h,滤去土壤颗粒,过滤物分别稀释10、100倍。各取100 mL放入Komada培养基^[9],120℃灭菌20 min,然后冷却至60℃加入1 g无氯硝基苯,硼酸钠1 g,硫酸链霉素0.3 g,H₃PO₄调节pH值至3.8,然后23℃培养10 d,数取菌落克隆数。

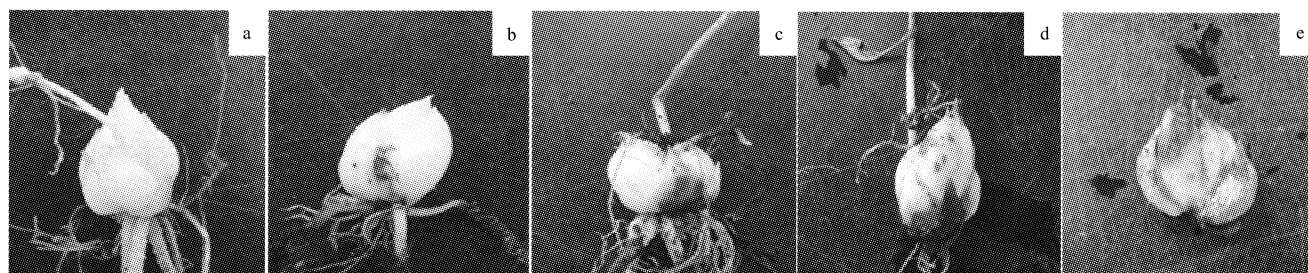
1.2.2 病原真菌-植株互作试验 试验选取亚洲百合品种‘Orlito’、‘Amaronne’和父本材料‘Connecticut King’为阳性对照,感病东方百合品种‘Gelria’和母本材料‘White Fox’为阴性对照。试验分成8个独立区组,其中6个区组人工接种病原,侵染后的土壤和栽培基质混合,种植小籽球时基质中病原物浓度约100 000个/mL为合

格。2个区组为对照,基质未混入病原。每个区组设104个小区,分别栽培104个基因型(99个杂种后代和5个对照品种),随机排列于区组内。每个小区内设有5个重复,即在同一小区种植5个大小一致的小籽球。

1.2.3 结果观察 百合出苗后综合观察其形态学变化,当出现植株上部枯萎时对其种球进行观察是否为由镰刀菌感染引起的症状,当目测所有基因型差异呈现最大化时,开始进行发病情况统计。方法为挖出种球,剪去地上部分,自来水冲去种球及根上所带基质以露出茎盘。根据种球茎盘的发病情况将之分为6个不同等级:等级1为无症状,百合种球茎盘无任何镰刀菌感染症状;等级2为症状轻微,即茎盘处稍有镰刀菌感染症状;等级3为症状中等,茎盘已经有很明显腐烂,外部鳞片易脱落;等级4为症状严重,种球茎盘严重腐烂,外部鳞片脱落;等级5为极严重,种球茎盘完全腐烂,鳞片触手即散;等级6为种球完全腐烂,无法找到。其1~5级等级评判标准见图2。

1.3 数据分析

根据以上分级标准对每个区组内每个小区内的各个重复进行统计,并计算其平均病情指数,对侵染病原的区组 and 对照区组平均病级数进行显著性分析并计算F₁代抗性基因表达率。最后,根据父母本平均病级数计算各杂种后代的病情指数,将杂种后代分为高抗(病情指数<0.25)、中抗(0.25≤病情指数<0.5)、中感(0.5≤病情指数<0.75)和高感(0.75≤病情指数<1)4个等级。各基因型平均病级数、各基因型病情指数及F₁代镰刀菌抗性基因表达率计算公式如下。



注:(a) 1级;(b) 2级;(c) 3级;(d) 4级;(e) 5级。

Note:(a) class 1;(b) class 2;(c) class 3;(d) class 4;(e) class 5.

图2 镰刀菌侵染症状等级划分

Fig. 2 Symptoms classification of lily bulbs infected by *Fusarium*

各基因型平均病级数=接种区组各基因型平均病级数-对照区组各基因型平均病级数;

$$\text{各基因型病情指数} = \frac{\text{各基因型平均病级数}}{\text{最高级代表值}} \times 100\%;$$

$$\text{F}_1 \text{ 代 镰 刀 菌 抗 基 因 表 达 率 } = \frac{\sum (\text{母本平均病级数} - \text{各基因型平均病级数})}{(\text{母本平均病级数} - \text{父本平均病级数}) \times \text{基因型总数}} \times 100\%.$$

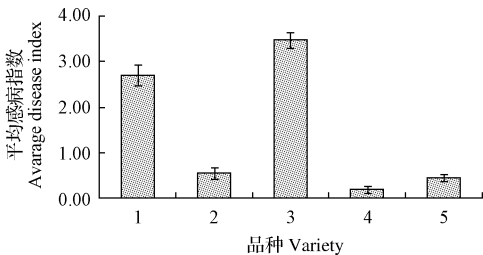
2 结果与分析

接种病原后的小籽球1周后陆续萌发,4周内地上及地下部分无明显的症状,第5周后阴性对照地下部分鳞茎茎盘开始腐烂,第7周地上部分开始出现明显症状,叶片呈现褐色,第12周各对照品种出现最大差异,故开始挖取种球进行观察。对照区组植株在整个阶段生长健壮,无明显的地上或地下部分镰刀菌症状。对不同

区组平均病级数的分析结果显示,接种病原后的区组和对照区组差异显著($P<0.05$)。

2.1 5个对照品种的抗病性

阳性对照和阴性对照分离良好,证明该抗病性试验结果真实可靠。对照品种的平均感病指数见图3,在这5个品种中,阳性对照‘Orlito’、‘Amaronne’和父本材料‘Connecticut King’都对镰刀菌表现出较强的抗性,其平均病情指数分别为0.55、0.18和0.45,阴性对照‘Gelria’和母本材料‘White Fox’对镰刀菌表现出感病性,平均病情指数分别为2.70和3.45。



注:1. ‘White fox’; 2. ‘Orlito’; 3. ‘Gelria’; 4. ‘Connecticut king’; 5. ‘Amaronne’。
Note: 1. ‘White fox’; 2. ‘Orlito’; 3. ‘Gelria’; 4. ‘Connecticut king’; 5. ‘Amaronne’。

图3 5个百合对照品种的抗病性鉴定结果
Fig. 3 Disease test result of 5 lily cultivars

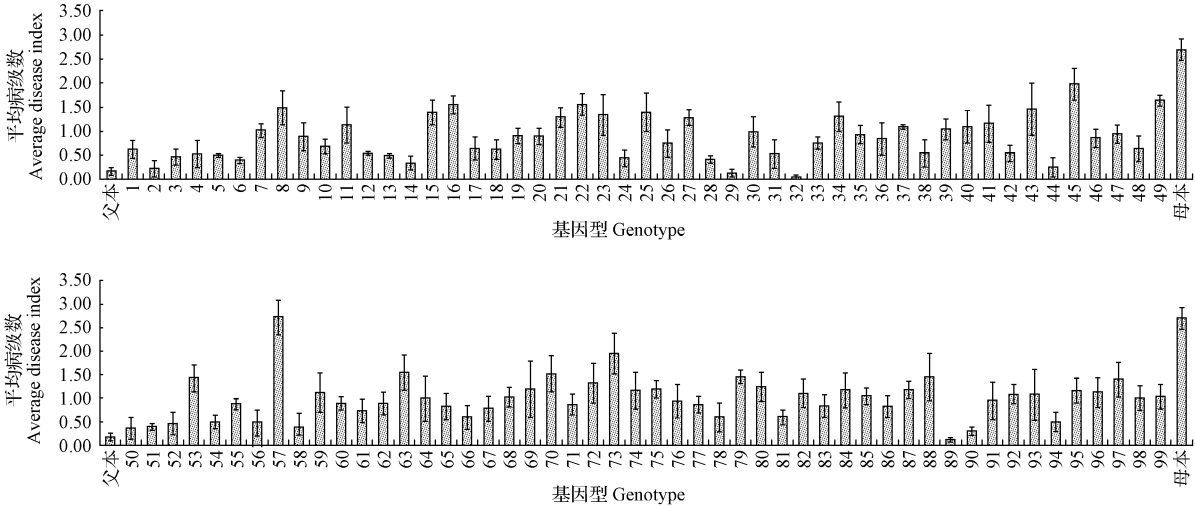


图5 99个百合杂种F₁代的平均感病指数分布
Fig. 5 Distribution of average disease index of 99 interspecific hybrids of lily

表1 LA百合杂种F₁代镰刀菌侵染后的平均病级数

Table 1 Average disease index of interspecific hybrids of *Longiflorum* and Asiatic hybrids inoculated by *Fusarium*

基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error	基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error	基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error	基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error
1	0.63	0.37	26	0.75	0.57	51	0.40	0.14	76	0.94	0.72
2	0.23	0.33	27	1.29	0.32	52	0.47	0.49	77	0.87	0.36
3	0.47	0.34	28	0.43	0.15	53	1.43	0.58	78	0.60	0.62
4	0.53	0.55	29	0.14	0.15	54	0.50	0.30	79	1.46	0.29
5	0.50	0.08	30	1.00	0.62	55	0.88	0.24	80	1.24	0.63

2.2 杂种后代的抗性分离

在99个杂交后代中,平均病级数呈现一系列分离,其绝大部分数值分布在父母本病级数之间(图4、5,表1)。其中一些基因型平均病级数小于父本,如基因型89(0.12),基因型29(0.14)及基因型32(0.05);而一些基因型平均病级数和其父本接近,如基因型2(0.23)、基因型44(0.27)及基因型90(0.30);同时有些基因型和其母本类似,都有着较高的病级数,如基因型57(2.73);杂种后代病级数的分离说明其绝大部分杂交后代都有着比其父本低,比母本高的镰刀菌抗性。除去环境因素的影响,其杂种F₁代抗性基因表达率为70.1%。

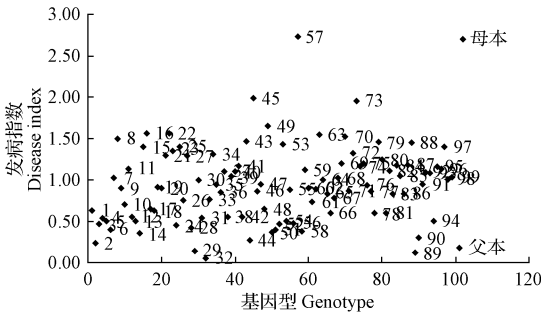


图4 99个百合杂种F₁代的平均感病指数分布
Fig. 4 Distribution of average disease index of 99 interspecific hybrids of lily

续表 1

Table 1 continued

基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error	基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error	基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error	基因型 Genotype	平均病级数 Average disease index	标准差 Standard error
6	0.40	0.14	31	0.54	0.59	56	0.48	0.57	81	0.60	0.33
7	1.03	0.29	32	0.05	0.09	57	2.73	0.74	82	1.11	0.60
8	1.50	0.71	33	0.77	0.27	58	0.38	0.31	83	0.83	0.48
9	0.90	0.57	34	1.31	0.60	59	1.13	0.82	84	1.18	0.73
10	0.70	0.30	35	0.94	0.38	60	0.90	0.30	85	1.05	0.36
11	1.14	0.76	36	0.85	0.67	61	0.73	0.51	86	0.83	0.47
12	0.55	0.09	37	1.10	0.10	62	0.89	0.50	87	1.18	0.37
13	0.50	0.10	38	0.55	0.55	63	1.55	0.74	88	1.45	1.01
14	0.35	0.30	39	1.04	0.43	64	1.00	0.97	89	0.12	0.09
15	1.40	0.51	40	1.10	0.68	65	0.83	0.56	90	0.30	0.17
16	1.56	0.37	41	1.17	0.75	66	0.60	0.50	91	0.95	0.79
17	0.65	0.48	42	0.55	0.33	67	0.78	0.53	92	1.09	0.42
18	0.63	0.41	43	1.47	1.09	68	1.03	0.42	93	1.08	1.09
19	0.92	0.32	44	0.27	0.39	69	1.20	1.20	94	0.50	0.41
20	0.90	0.33	45	1.99	0.65	70	1.53	0.76	95	1.16	0.53
21	1.30	0.41	46	0.87	0.38	71	0.87	0.44	96	1.13	0.64
22	1.56	0.45	47	0.95	0.38	72	1.33	0.85	97	1.40	0.73
23	1.35	0.85	48	0.65	0.52	73	1.96	0.87	98	1.01	0.53
24	0.45	0.36	49	1.65	0.22	74	1.17	0.79	99	1.03	0.53
25	1.40	0.80	50	0.37	0.45	75	1.20	0.37			

表 2 LA 百合杂种 F₁ 代镰刀菌侵染后的病情指数

Table 2 Disease index of interspecific hybrids of
Langiflorum×Asiatic hybrids

基因型 Genotype	病情指数 Disease index	基因型 Genotype	病情指数 Disease index	基因型 Genotype	病情指数 Disease index
1	0.23	34	0.49	67	0.29
2	0.09	35	0.35	68	0.38
3	0.17	36	0.31	69	0.44
4	0.20	37	0.41	70	0.56
5	0.19	38	0.20	71	0.32
6	0.15	39	0.39	72	0.49
7	0.38	40	0.41	73	0.73
8	0.56	41	0.43	74	0.43
9	0.33	42	0.20	75	0.44
10	0.26	43	0.54	76	0.35
11	0.42	44	0.10	77	0.32
12	0.20	45	0.74	78	0.22
13	0.19	46	0.32	79	0.54
14	0.13	47	0.35	80	0.46
15	0.52	48	0.24	81	0.22
16	0.58	49	0.61	82	0.41
17	0.24	50	0.14	83	0.31
18	0.23	51	0.15	84	0.44
19	0.34	52	0.17	85	0.39
20	0.33	53	0.53	86	0.31
21	0.48	54	0.19	87	0.44
22	0.58	55	0.33	88	0.54
23	0.50	56	0.18	89	0.04
24	0.17	57	1.01	90	0.11
25	0.52	58	0.14	91	0.35
26	0.28	59	0.42	92	0.40
27	0.48	60	0.33	93	0.40
28	0.16	61	0.27	94	0.19
29	0.05	62	0.33	95	0.43
30	0.37	63	0.57	96	0.42
31	0.20	64	0.37	97	0.52
32	0.02	65	0.31	98	0.37
33	0.28	66	0.22	99	0.38

2.3 杂种后代抗性分布

对杂种的病情指数进行分析发现,大部分基因型病情指数小于 0.5,说明其父本是一个优良的抗性育种材料,其镰刀菌抗性能成功转移到下一代并使其对镰刀菌表现出不同程度的抗性。在 99 个杂种后代中,16 个基因型表现为高抗,38 个基因型为中抗,36 个基因型为中感,8 个基因型为易感,1 个基因型表现为高感(表 2,表 3)。杂种 F₁ 代抗性基因表达率为 70.1%。

表 3 LA 杂种的抗病性评价

Table 3 Resistance valuation of interspecific LA hybrids

抗病性评价等级 Evaluation of resistance	感病指数区间 Interval of average disease rating	杂种后代数目 Number of hybrids
高抗 High resistance	感病指数<0.25	32
中抗 Medium resistance	0.25≤感病指数<0.5	50
中感 Medium susceptible	0.5≤感病指数<0.75	16
高感 High susceptible	0.75≤感病指数	1

3 讨论

镰刀菌抗性育种已经成为百合育种的一个重要方向,由于没有合适的分子标记供后代选择^[10-12],镰刀菌抗性表型鉴定依然是抗性育种工作中的一个必不可少的环节。一个理想的抗性鉴定试验要同时具备重复性、精确性、可行性及可靠性。但与其它物种相比,百合抗性育种尤为困难,首先是其漫长的生长周期,其次则是不同发育时期百合的抗性不一^[13],最后是抗病性鉴定条件无法精确控制^[14]。该试验结合百合的鳞片扦插繁殖技术,通过选取大小及发育时期一致的小籽球在标准种植条件下进行抗病性鉴定,与传统方法相比有着显著的优点:一是周期短且精确性高,相比商品种球,鳞片扦插

能快速繁殖大量植物材料,从而使短时间内进行抗病性鉴定成为可能。另外,随着植株的生长,百合对镰刀菌的敏感性逐渐降低,因此幼苗水平上进行测试有着较高的效率;二是条件严格控制,重复性高。研究证明,接种浓度,栽培环境对抗病性鉴定试验有着显著影响^[15],该试验采用一定浓度的病原,在标准条件下进行调控,尽量缩小环境因素带来的误差,使得试验重复性进一步增强。

参考文献

- [1] McRae E A. Lilies: a guide for growers and collectors[M]. Timber press, Portland, Oregon, 1998.
- [2] Straathof T H P. Study on the *Fusarium*-lily interaction; a breeding approach [D]. Wageningen University, 1994.
- [3] Straathof T H P, van Tuyl J M. Genetic variation in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* in the genus *Lilium* [J]. Annals of Applied Biology, 1994, 125(1): 61-72.
- [4] Straathof T H P, Loffler H J M. Screening for *Fusarium* resistance in seedling populations of Asiatic hybrid lily[J]. Euphytica, 1994, 78: 43-51.
- [5] Balode A. Breeding for resistance against *Botrytis* in lily[J]. Acta Horticulturae, 2009, 836: 143-148.
- [6] Rieseberg L H, Wendel J. Introgression and its consequences in plants [M]. New York: Oxford University Press, 1993.
- [7] Loffler H J M, Meijer H, Straathof T H P, et al. Segregation of *Fusarium* resistance in an interspecific cross between *Lilium longiflorum* and *Lilium dauricum*[J]. Acta Horticulturae, 1996, 414: 203-208.
- [8] van Tuyl J M, van DIËN M P, van Creijl M G M, et al. Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses[J]. Plant Science, 1991, 74: 115-126.
- [9] Loffler H J M, Rumine P. Virulence and vegetative compatibility of Dutch and Italian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*[J]. Journal of Phytopathology, 1991, 132: 12-20.
- [10] van Heusden A W, Jongerius M C, van Tuyl J M, et al. Molecular assisted breeding for disease resistance in lily[J]. Acta Horticulturae, 2002, 572: 131-138.
- [11] Shahin A P, Arens S, van Heusden, et al. Conversion of Molecular Markers Linked to *Fusarium* and Virus Resistance in Asiatic Lily Hybrids [J]. Acta Horticulturae, 2009, 836: 131-136.
- [12] Shaina A, van Gorp T, Peters S A, et al. SNP markers retrieval for a non-model species; a practical approach[J]. BMC Research Notes, 2012, 5: 79.
- [13] Straathof T H P, Loffler H J M. Resistance to *Fusarium oxysporum* at different development stages of Asiatic hybrids lilies[J]. Journal of American Society of Horticulture Science, 1994, 119(5): 1068-1072.
- [14] Straathof T H P, Loffler H J M, Linfield C A. Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* in flower bulbs[J]. Acta Horticulturae, 1997, 430: 447-486.
- [15] Straathof T H P, Inggamer H. Influence of temperature, inoculum concentration and time course in a scale test for *Fusarium* resistance in *Lilium* [J]. Acta Horticulturae, 1992, 325: 695-701.

Fast Evaluation of *Fusarium* Resistance in Interspecific Longiflorum×Asiatic (LA) Hybrids of Lily

LUO Jian-rang¹, XIE Song-lin²

(1. Forestry College, Northwest Science University of Horticulture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Sino-Europe Agricultural Development Centre, Zhangzhou, Fujian 363123)

Abstract: In the current paper, 99 interspecific F₁ hybrids between Longiflorum and Asiatic hybrids were first evaluated for the *Fusarium* resistance, by means of testing the hybrid lily in inoculated substrate. The results showed that the artificial infection of *Fusarium* in greenhouse with controlled condition was successfully applied, the maternal Longiflorum cultivar 'White Fox' performed high susceptible to *Fusarium*, while the paternal Asiatic cultivar 'Connecticut King' was high resistant, the resistance was successfully inherited to the offspring and segregated in different genotypes. Among the segregated population, majority of the individuals performed different level of resistance to *Fusarium*, the transmission of resistance in the hybrid population reached 70.1%. It could be concluded that the resistance was controlled by quantitative genes, and it was feasible to undertake introgression breeding of resistance via distant interspecific hybridization.

Keywords: *Lilium* hybrids; *Fusarium*; clonal level; resistance