

美洲黑杨×青杨 F₂ 代抗杨叶枯病 遗传变异研究*

苏晓华 张绮纹 沈瑞祥 杨 旺 归 复 王燕民

摘要 以美洲黑杨与青杨杂交三代谱系为材料,在室内外进行了美洲黑杨与青杨的杂交种对杨叶枯病抗性的研究。结果表明:亲本及 F₁、F₂ 代在室内与室外及人工与自然发病表现较一致,美洲黑杨×青杨 F₂ 代抗性基因型分离比例均符合 1 : 2 : 1,将 F₂ 代分离与感合作为感病,抗病株与感病株分离比例为 1 : 3,说明美洲黑杨对杨叶枯病的抗性是由一对纯合隐性等位基因控制。

关键词 杨叶枯病 抗病遗传变异 美洲黑杨×青杨 F₂ 代

杨叶枯病(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler) 是杨树主要病害之一,在我国黑龙江、吉林、辽宁、新疆、陕西、河南、河北、山东、北京等地均有不同程度的发病。主要危害小叶杨(*Populus simonii* Carr.)、小青杨(*P. p pseudo-simonii* Kitag.)、欧洲黑杨(*P. nigra* L.)、沙兰杨[*P. × euramericana* (Dode) Guineir cv. 'Sacrau 79']、银白杨(*P. alba* L.)、毛白杨(*P. tomentosa* Carr.)、山杨(*P. davidiana* Dode) 等当年生苗木,尤以青杨派(Sect. *Tacamahaca* Spach) 和青杨与黑杨(Sect. *Aigeros* Duby) 两派杂种受害重^[1]。受害植株提早落叶,影响植株生长,严重时可使植株逐渐枯萎以致死亡。培育和利用抗病新品种是最经济的防治方法,然而利用常规杂交方法选择出的抗病新品种的抗性不能保持长久。因此,有必要对林木抗病机制进行深入研究。分子标记为林木抗病选择育种开辟了一条新途径。目前利用分子标记(RFLP, RAPD, AFLP 等)与 BSA(Bulked Segeregent Analysis)分群法或 DNA 分池法相结合,已找到了与某些抗病基因相连锁的分子标记^[3~5],使林木抗病基因定位和分离有了可能,从而将实现借助分子标记进行林木抗病辅助选择育种,提高林木抗病育种效率,将林木抗病育种推向一个新的阶段。

本项研究利用抗杨叶枯病的美洲黑杨(*P. deltoides* Bartr.)与感杨叶枯病的青杨(*P. cathayana* Rehd.)杂交三代谱系为材料,分析 F₂ 代在杨叶枯病发病症状的分离情况,推测抗病基因控制机制,为进一步利用分群法^[6]和分子标记(RAPD, RFLP)结合寻找抗杨叶枯病连锁标记的样本(高感群和高抗群)选择提供依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

中国林业科学研究院林研所曾在 70 年代用美洲黑杨与青杨杂交产生了许多 F₁ 代杂种,

1998—08—21 收稿。

苏晓华副研究员,张绮纹(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091);沈瑞祥,杨旺(北京林业大学);归复,王燕民(北京市林业局)。

* 本项研究属于国家“九五”攻关专项“杨树纸浆材用材林树种良种选育及培育技术研究”的部分内容。

先后选择出几个新品种。1996年春利用 F_1 代中的中黑防3号(ZH₃) (暂定名)与中黑防1号(ZH₁)杂交得到 F_2 代杂种群体,并种植于中国林业科学研究院苗圃内。

1.2 杨叶枯病菌室内外接种和病情分析

用于接种的杨叶枯病菌是由北京林业大学森林资源与环境学院森保系分离培养和保存。接种方式是喷雾接种。接种量为每视野250个孢子(10×10倍镜)。室内人工接种在中国林科院林研所温室进行,1998年2月用1年生枝条切枝水培,整枝喷雾,接种过的枝条先用塑料袋套3d,观察记录发病时间。接种1个月后统一调查病情,每株调查5片叶子。室外人工接种在中国林业科学研究院苗圃进行,1998年5月用当年春季幼苗接种,接种及调查方法均与室内接种相同。

病情分级标准:以病斑所占叶片比例分为: 级0; 级15%以下; 级15%以上。

1.3 杨叶枯病大田观测

1997年和1998年在中国林业科学研究院苗圃内杨叶枯病大发生。1997年8月和1998年6月分别对亲本(美洲黑杨、青杨)、 F_1 和 F_2 (二根一干实生苗)进行抗杨叶枯病大田自然发病调查。每株取10片叶子(从顶梢第6片子开始往下取叶),记载发病情况。

病情分级标准:与室内接种病情分级标准相同: 级0; 级15%以下; 级15%以上。

1.4 统计分析

试验结果采用 χ^2 适合性检验,分析分离比例。

2 结果与分析

2.1 亲本和 F_1 代的抗病性表现

在苗圃进行的两次调查结果表明,母本美洲黑杨均未发(感)病,而父本青杨植株均发病。 F_1 代ZH₃()植株均未发病,而ZH₁(♂)植株均感病(表1)。

1998年对亲本和 F_1 代进行室内和室外人工接种发病情况调查看到,大田中表现抗病的 F_1 代ZH₃()在两次人工接种中均出现不同程度的感病,其它与大田结果一致(表1)。

2.2 F_2 代的抗病性遗传变异

在苗圃中调查得出, F_2 代在天然条件下对杨叶枯病的抗性分离明显,经 χ^2 分析符合单基因控制的1:2:1的基因型分离比例(表2)。在调查中还发现,个体间发病部位有所不同,大多数个体在上、中、下部叶片均发病;少数个体只植株顶梢叶片发病,且发病较早;也有少数个体在基部发病,且发病较晚;还有一些个体在植株中下部发病。

表1 亲本和 F_1 代对杨叶枯病的抗性反应

抗病测定地点 (时间)	亲本 F_1	植株数		
		抗病	感病	总数
室内(温室)接种 (1998年)	美洲黑杨(P ₁)	2		2
	青杨(P ₂)		2	2
	ZH ₃ (F ₁)		2	2
	ZH ₁ (F ₁)		2	2
室外(苗圃)接种 (1998年)	美洲黑杨(P ₁)	2		2
	青杨(P ₂)		2	2
	ZH ₃ (F ₁)		2	2
	ZH ₁ (F ₁)		2	2
大田(苗圃) (1997年)	美洲黑杨(P ₁)	2		2
	青杨(P ₂)		2	2
	ZH ₃ (F ₁)	5		5
	ZH ₁ (F ₁)		4	4
大田(苗圃) (1998年)	美洲黑杨(P ₁)	2		2
	青杨(P ₂)		2	2
	ZH ₃ (F ₁)	3	2	5
	ZH ₁ (F ₁)		4	4

F₂ 代室内和室外人工接种发病情况与大田天然发病情况比较一致。44 号、92 号等在大田发病早的个体在室内和室外接种发病得也早, 大田病情严重的个体(93 号、105 号等)在室内接种病情也非常重, 但也有几个个体例外, 如在大田中调查发现, 轻度感病系号(50、63、85)在室内接种时却表现出高度感病, 这与在大田调查取样时, 发病严重的叶片

已掉有关。另外有 11 株由于枝条弱小在培养中死亡。在自然条件下, F₂ 代对杨叶枯病的抗性分离也很明显, 经 χ^2 分析也符合单个基因 1 : 2 : 1 的基因型分离比例(表 2)。

由上述结果可知, F₂ 代在天然和室内及室外人工接种抗病性遗传变异是一致的。对 F₂ 代在室内、室外人工接种及两次大田自然发病观测结果进行 χ^2 检验, 结果表明均符合 1 : 2 : 1 的基因型分离比例。如将 类与 类合并为感病类型, F₂ 代抗病株与感病株比例符合 1 : 3。

3 讨论与结论

杨叶枯病一直是影响我国杨树生产的主要病害之一。有人曾对该病进行过病理学方面的研究^[2], 但对该病的抗性遗传研究尚未有报道。美洲黑杨在我国杨树遗传改良中起着非常重要的作用, 用其与我国乡土树种青杨杂交获得的一些品种由于生长快较抗病, 已在生产中推广应用。本项研究利用抗病美洲黑杨与感病青杨杂交三代谱系材料分析了其抗病遗传控制的机制, 看到 F₂ 代在天然条件下和人工接种条件下的发病状况一致, 说明本组合的抗病性差异是确实存在的, 并由遗传控制。 χ^2 检验验证 F₂ 代抗病性分离比例符合 1 : 2 : 1, 抗病株与感病株比例为 1 : 3, 说明美洲黑杨对杨叶枯病的抗性是由 1 对纯合隐性等位基因控制, 当把它与感病的青杨杂交时, 各代的基因型如下图:

P	美洲黑杨 rr(抗) × 青杨 RR(感)		
F ₁	Rr(感) × Rr(感)		
F ₂	RR(感) : Rr(感) : rr(抗)		
株数	30	64	36
比例	1	2	1

国外许多学者也开展了该方面研究。比利时的 Cervera 等^[5]利用抗杨锈病(*Melampsora* sp.) 美洲黑杨种内杂交个体为母本与感锈病的欧洲黑杨(*P. nigra*) 杂交 F₁ 代基因型分离比例 1 : 1(133R : 129S; $\chi^2_{1df} = 0.06, 0.75 > P > 0.90, 1df$), 推测抗杨锈病是由单个显性基因控制, 但母本美洲黑杨的抗性基因位点是杂合的。德国 Bauer 等^[3]以大麦 3 个抗病(BaM MV) 品种与 3 个感病品种组成 4 个杂交组合, 结果各组合 F₂ 代均按 1 : 3(抗 : 感) 比率分离, 认为所有亲本均有单一隐性抗性基因。

通过对抗病美洲黑杨与感病青杨杂交 F₂ 代抗性分离分析, 确定了抗病群(类) 和感病群(类), 为进一步鉴别抗杨叶枯病连锁分子标记奠定了基础。

表 2 美洲黑杨 × 青杨 F₂ 代对杨叶枯病的抗性反应

测定地点 (时间)	病情表现(级)(个体)				χ^2		P
	总数				1	2	
室内(温室)接种 (1998 年)	36	64	30	130	0.58		0.7 ~ 0.8
室外(苗圃)接种 (1998 年)	32	70	39	141	0.70		0.7 ~ 0.8
大田(苗圃) (1997 年)	37	67	37	141	0.35		0.8 ~ 0.9
大田(苗圃) (1998 年)	35	68	38	141	0.31		0.8 ~ 0.9

参 考 文 献

- 1 向玉英编著. 杨树病害及其防治. 北京: 中国林业出版社, 1986. 37 ~ 40.
- 2 徐素琴, 原树忠, 陈晓春. 杨叶枯病菌: 细链格孢(*Alternaria tenuis*)的研究. 东北林学院学报, 1984, 12(1): 56 ~ 64.
- 3 Bauer E, Weyen J, Schiemann A, et al. Molecular mapping of novel resistant genes against Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV). Theor. Appl. Genet., 1997, 95: 1263 ~ 1269.
- 4 Benet H, Guries R P, Boury S, et al. Identification of RAPD markers inked to a black leaf spot resistant gene in Chinese elm. Theor. Appl. Genet., 1995, 90: 1068 ~ 1073.
- 5 Cervera M T, Gusmao J, Steenackers M, et al. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. Theor. Appl. Genet., 1996, 93: 733 ~ 737.
- 6 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistant gene by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregation populations. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 88: 9828 ~ 9832.

Research on the Variation of *Populus deltoides* × *P. cathayana* F₂ Generation against *Alternaria alternata*

Su Xiaohua Zhang Qiweng Shen Ruixiang Yang Wang
Gui Fu Wang Yanmin

Abstract The study was carried out using three generations, with the F₁ produced by interspecific hybridizations between a resistant *Populus deltoides* female and a susceptible *P. cathayana* male. F₁ inbreeding made the F₂ generation. The susceptibility of parents, F₁ and F₂ to *Alternaria alternata* was tested both in the nursery and laboratory. The results show that the clones that were scored as being , , and in the nursery were also scored as , , and (: 0, : 15%, : > 15%) in the laboratory. F₂ segregated in a 1 : 2 : 1 ratio for the resistance to *A. alternata* (Fr.) Keissler. The data suggest that the resistance be determined by a single recessive gene for *P. deltoides*. The study is the basis for future identifying molecular markers linking to the locus against *A. alternata* by Bulked Segregant Analysis (BSA) and molecular markers.

Key words *Alternaria alternata* variation of resistance *Populus deltoides* × *P. cathayana*

Su Xiaohua, Associate Professor, Zhang Qiweng (The Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091); Shen Ruixiang, Yang Wang (Beijing Forestry University); Gui Fu, Wang Yanmin (Forestry Bureau of Beijing City).