

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)01-0009-010

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.01.002

华薯和鄂薯系列马铃薯品种晚疫病抗病基因及水平抗性相关基因SNP位点检测

聂佳惠¹, 李红军¹, 宋威武², 吴承金², 宋波涛¹, 田振东^{1*}

(1. 农业农村部马铃薯生物学与生物技术重点实验室/湖北马铃薯工程技术研究中心/华中农业大学, 湖北 武汉 430070;

2. 中国南方马铃薯研究中心, 湖北 恩施 430070)

摘要: 鄂薯和华薯系列马铃薯品种是由湖北恩施中国南方马铃薯研究中心和华中农业大学马铃薯团队选育而成的品种。鄂薯系列马铃薯品种大多为中晚熟品种, 适合西南山区种植; 华薯系列马铃薯品种多为早熟品种, 适于华中低山丘陵和平原地区种植。研究对2个系列品种部分晚疫病抗病基因进行了分子标记检测, 同时对几个水平抗性相关基因SNP位点进行了检测。研究表明, 鄂薯、华恩和华薯系列部分马铃薯品种含有 $R3a$ 、 $R3b$ 基因, 鄂薯和华恩系列含有 $R8$ 基因。总体上 $R8$ 标记与抗性存在正向关联。部分马铃薯品种中可以检测到一些已报道与田间抗性有关的SNP位点, 但品种晚疫病抗性表现与SNP位点分布无明显关联。

关键词: 马铃薯; 晚疫病; 抗病基因; 分子标记; SNP位点

Detection of Late Blight Resistance Genes and SNPs of Horizontal Resistance Related Genes in Huashu and Eshu Potato Varieties

NIE Jiahui¹, LI Hongjun¹, SONG Weiwu², WU Chengjin², SONG Botao¹, TIAN Zhendong^{1*}

(1. Key Laboratory of Potato Biology and Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Areas/Hubei Potato

Engineering Technology Research Center/Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China;

2. China Southern Potato Research Center, Enshi, Hubei 430070, China)

Abstract: Eshu and Huashu series potato varieties are bred and developed by China Southern Potato Research Center and Potato Group of Huazhong Agricultural University in Hubei Province. Eshu series potato varieties are mostly mid to late maturing varieties, suitable for planting in southwest mountainous areas. Huashu series potato varieties are early maturing varieties, suitable for planting in low mountains and plains of central China. In this research, molecular markers were used to detect some late blight resistance genes and single nucleotide polymorphism (SNPs) of several horizontal resistance related genes. The results showed that Eshu, Huaen and Huashu series potato varieties contained late blight resistance gene $R3a$ and $R3b$. Eshu and Huaen series potato varieties contained $R8$. Generally, the presence of $R8$ maker has positive relationship with late blight resistance. Some known late blight resistance related SNPs were detected in several varieties, but there is no close relationship between SNPs and blight resistance.

Key Words: potato; late blight; resistance gene; molecular marker; SNP

收稿日期: 2020-12-06

基金项目: 国家自然科学基金国际合作项目(31761143007)。

作者简介: 聂佳惠(1997-), 女, 硕士研究生, 主要从事马铃薯晚疫病分子育种工作。

*通信作者(Corresponding author): 田振东, 博士, 教授, 主要从事马铃薯晚疫病抗病分子生物学, E-mail: tianzhd@mail.hza.edu.cn。

马铃薯作为世界上第三大粮食作物, 在世界粮食安全中起着重要作用^[1]。中国马铃薯的种植面积和总产量均居世界第一, 目前, 中国马铃薯鲜薯年产量达到9 000万至1亿t。然而, 马铃薯生产易受到各种病虫害影响, 其中, 晚疫病对马铃薯产量和品质造成严重危害^[2,3]。

马铃薯晚疫病发病与天气有关, 雨水充沛年份往往发病严重。生育期发病后, 地上部分植株受到侵染, 叶片受损或坏死, 光合作用受到严重影响, 块茎无法膨大生长, 造成较大的产量损失。发病后期孢子随雨水冲刷进入土壤导致块茎感染, 在贮藏期发病造成严重损失。当前, 晚疫病防治主要依靠喷洒化学农药。但频繁喷洒农药不仅对环境安全产生严峻的影响, 而且加大了对病原菌的选择压, 病原菌抗药性增强, 导致化学药剂药效减弱甚至丧失。

选择和培育抗病品种是防治晚疫病最经济有效的方法。自从在野生种 *Solanum demissum* 中发现晚疫病抗病基因, 育种家先后将一些主效 *R* 基因 (*R1~R11*) 转移到马铃薯栽培种中^[3,4], 但不久之后发现大多数主效 *R* 基因并没有持久抗性特点, 大多数已知 *R* 基因已被克服。水平抗性对晚疫病菌的选择压小, 可延缓晚疫病菌的进化, 抗性相对稳定持久^[5]。Mosquera 等^[6]对 184 个四倍体马铃薯品种及材料进行了单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 分析, 通过全基因组分析发现 8 个基因的 SNP 位点与晚疫病水平抗性关联, 特定 SNP 位点对晚疫病田间抗性有贡献。

鄂西山区是马铃薯的传统种植区域, 栽培面积达 40.00 万~40.67 万 hm^2 。由湖北恩施中国南方马铃薯研究中心和华中农业大学马铃薯团队选育的鄂薯和华薯系列品种为湖北马铃薯生产提供了系列化品种。鄂薯系列的部分品种在育成早期抗性表现突出, 例如‘鄂马铃薯 1 号’、‘鄂马铃薯 3 号’和‘鄂马铃薯 5 号’。‘鄂马铃薯 3 号’田间抗性表现很好, 曾经在鄂西和西南山区广泛种植, 但现在抗性完全丧失。本研究根据国内品种已知抗病基因组成情况, 选取了 3 个 (*R3a*, *R3b*, *R8*) 抗病基因分子标记, 以及 6 个水平抗性相关基因 SNP 位点标记对 30 个品种进行了检测, 以期对鄂薯和华薯系列品种晚疫病抗性遗传背

景有一个系统了解, 为生产中品种选择与布局提供指导。

1 材料与方法

1.1 参试材料

本研究所用鄂薯系列马铃薯品种‘鄂马铃薯 1 号’, ‘鄂马铃薯 3 号’~‘鄂马铃薯 16 号’, 共计 15 个, 由湖北恩施中国南方马铃薯研究中心主持选育而成, 以下简称“鄂薯 x 号”; 华薯系列品种‘华薯 1 号’~‘华薯 4 号’、‘华薯 5 号’、‘华薯 6 号’、‘华薯 7 号’~‘华薯 13 号’, 共计 13 个, 由华中农业大学马铃薯团队主持选育而成。‘华恩 1 号’和‘华恩 2 号’由双方联合选育而成。具体信息见表 1。

1.2 马铃薯基因组提取

田间或温室采集马铃薯幼嫩叶片, 利用改良的 CTAB 法^[7]提取植物组织 DNA, 凝胶电泳检测 DNA 完整性。将 DNA 稀释至 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 以 *RNA Polymerase II(RP2)* 基因为内参, PCR 扩增检测质量, 引物信息见表 2。

1.3 抗病基因分子标记检测

R3a、*R3b* 和 *R8* 抗性基因标记引物信息见表 2。采用 2×*Taq* Master Mix 试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 体系为 2×*Taq* Master Mix 5 μL , F-和 R-Primer 各 0.5 μL (5 μM), ddH_2O 3 μL , 模板 1 μL , 总体积 10 μL 。扩增反应: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55~59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。取 8 μL PCR 产物在 1.0% 琼脂糖胶上 10 V/cm 恒压电泳。

1.4 目标区域 SNP 扩增与测序

根据 Mosquera 等^[6]报道一些功能基因可能参与马铃薯田间抗性, 其中一些基因内部 SNP 位点与水平抗性相关。选取 6 个与晚疫病田间抗性关联的目标基因, 在包含 SNP 位点区域两端设计引物, 用于扩增目标区域, 引物序列参考丁德骏^[9], 引物相关信息见表 3。采用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 体系为: 2× Phanta Max Buffer 25 μL , dNTPs Mix 1 μL , Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL , F-和 R-Primer 各 2 μL (5 μM), 模板 1 μL , ddH_2O 18 μL , 总体积 50 μL 。PCR 扩增条件同 1.3,

表1 供试马铃薯品种信息
Table 1 Information of potato varieties tested

编号 Code	品种 Variety	父母本 Female and male parents	熟性 Maturity	区试抗性评价 Registration evaluation	田间评价 Field evaluation
1	鄂薯1号	674-5 × CFK-69.1	中晚熟	高抗	5
2	鄂薯3号	7914-33 × 59-5-86	中晚熟	中抗	5
3	鄂薯4号	克6717-36 × 鄂薯1号	早熟	抗	3
4	鄂薯5号	393143-12 × NS51-5	中晚熟	抗	3
5	鄂薯6号	I-10 × NS51-5	中晚熟	抗	4
6	鄂薯7号	AJU-69.1 × 393140-4	中晚熟	感病	5
7	鄂薯8号	393143-12 × NS51-5	中晚熟	中感	4
8	鄂薯9号	393143-12 × 鄂薯3号	中晚熟	感病	4
9	鄂薯10号	文胜11 × Dorita5186	中晚熟	中感	4
10	鄂薯11号	南中552 × DY4-2-10(2X)	中晚熟	中感	4
11	鄂薯12号	395049.59 × 393160-4	早熟	中感	4
12	鄂薯13号	秦芋30号 × 59-5-86	中晚熟	中抗	3
13	鄂薯14号	T962-25 × IX-38-6	中晚熟	中抗	4
14	鄂薯15号	T962-25 × IX-38-6	中晚熟	中抗	4
15	鄂薯16号	T962-25 × NS51-5	中晚熟	中抗	4
16	华恩1号	393075.54 × 391679.12	中晚熟	中抗	5
17	华恩2号	922-30 × 51-5	中熟	中抗	3
18	华薯1号	Pink Fir Apple的自然变异系	早熟	中感	4
19	华薯2号	LR93.073 × LR93.050	早熟	中感	5
20	华薯3号	Innovator × F98002	早熟	中感	n
21	华薯4号	Barbara × Redsen	早熟	中感	5
22	华渝5号	395024.36 × 393160-4	中早熟	中抗	n
23	华渝6号	鄂薯1号与B3C1群体混合授粉	中晚熟	中感	5
24	华薯7号	N0634-7 × F90024	早熟	中感	n
25	华薯8号	B8943-4 × F65089	早熟	中感	n
26	华薯9号	F88042 × Stirling	早熟	中感	5
27	华薯10号	F66041 × Monalisa	早熟	中感	n
28	华薯11号	03HE52-2 × 393160-4	早熟	中感	n
29	华薯12号	395008.52 × 393160-4	早熟	中感	n
30	华薯13号	T962-25 × 388611.22	早熟	中感	5

注：区试抗性评价- 品种审定或登记时晚疫病抗性评价级别；田间评价- 2020年南方马铃薯中心的田间调查结果，5级分类标准，5代表感病，3代表中抗，n没有评价数据。

Note: Registration evaluation- refers to resistance evaluation at the time of variety registration; field evaluation - refers to field evaluation results at Southern Potato Center, Enshi in 2020, with five classification standards, five stands for susceptibility, three stands for middle resistance, and n means no evaluation data.

表2 *R8*、*R3a*和*R3b*引物序列
Table 2 Primer sequences for detection *R8*, *R3a* and *R3b* genes

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequencing (5'→3')	退火温度(℃) T _m	扩增长度(bp) Amplification length
<i>RP2</i>	<i>RP2</i> -F	TCGTGGATTITTTCCGATCTC	58	862
	<i>RP2</i> -R	ATCTCGCTCCATCTCTCCAA		
<i>R3a</i>	<i>R3a</i> -F	CAAGGGAACACAGAGAATTTATTCT	55	327
	<i>R3a</i> -R	AACAATCTCATAGCATGACAACGAT		
<i>R3b</i> ^[8]	<i>R3b</i> -F	GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA	56	378
	<i>R3b</i> -R	ACCAGTTTCTTGCAATCCAGATTG		
<i>R8</i>	<i>R8</i> -Fd	CTGGCGCTGGTTTTGCTATGC	59	682
	<i>R8</i> -Rd	TCTCTTCGACTTCTTCTTACGAGGTCTA		

表3 目标SNP区域扩增引物序列
Table 3 Primer sequences for amplification of target SNP region

SNP名称 SNP name	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequencing (5'→3')	检测位点 Detection site	退火温度(℃) T _m
<i>StAOS2</i> -SNP692	<i>StAOS2</i> -FO	AAGATTTCCAGTCCTTTTCGAAGT	C	56
	<i>StAOS2</i> -RO	CATCCCGCCGAAGGAATTCAA		
<i>HMCCR</i> -SNP567	<i>HMCCR</i> -FO	GACGAAGACGAAACTCGCATC	G	56
	<i>HMCCR</i> -RO	GTTCTCCAAGAAGAAGAGTAATACC		
<i>CYP71D11</i> -SNP346	<i>CYP71D11</i> -FO	GCAACCTTAGCGTCTCTTTGATGACTGCTT	T	58
	<i>CYP71D11</i> -RO	TTATGCATGAGGACCTTGTTGATGTCCT		
<i>Rpi-vnt1</i> -SNP539	<i>Rpi-vnt1</i> -FO	CCAAGAACTTTATAGGCATGTCCGTCA	G	58
	<i>Rpi-vnt1</i> -RO	TTCTCTGAATCTAAGGTTGCAACTCGT		
<i>StGP28</i> -SNP794	<i>StGP28</i> -FO	GAGACAATTCAAACAAGTGAGGATTGC	A	56
	<i>StGP28</i> -RO	TACCCACCTTTGTTGATTAAATTTGG		
<i>PLOX1</i> -SNP8089	<i>PLOX1</i> -FO	TTTGCGAAAATACAGAGAAAATGAATTG	G	56
	<i>PLOX1</i> -RO	GAAGTCTGACATCTTCAAGTGACCAAAA		

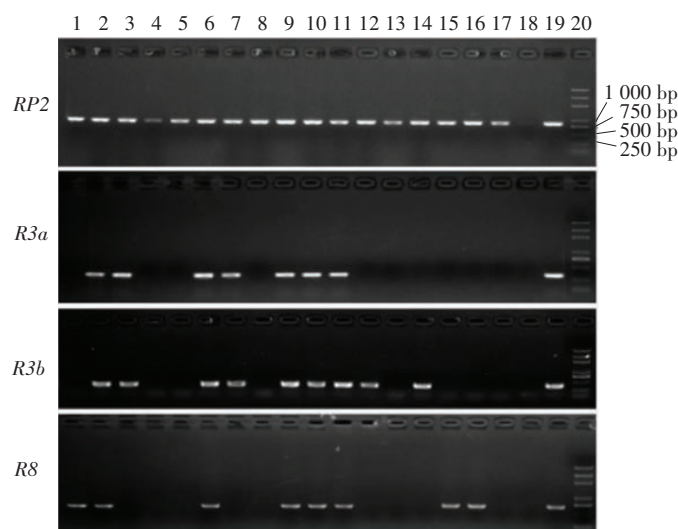
退火温度见表3。凝胶电泳检测 PCR 是否扩增成功, 后将PCR产物送昆泰锐生物技术有限责任公司测序, 利用 Snap gene 软件分析目标区域 SNP 结果。

2 结果与分析

2.1 鄂薯系列*R3a*, *R3b*和*R8*抗病基因分子标记检测

以鄂薯和华恩系列基因组DNA为模板, 以*RP2*基因为内参, 用表2所示*R3a*, *R3b*, *R8*引物分别扩增。如图1所示, 内参基因引物能够扩增约820 bp

片段。*R3a*引物可以在‘华恩2号’、‘鄂薯1号’、‘鄂薯5号’、‘鄂薯6号’、‘鄂薯8号’、‘鄂薯9号’和‘鄂薯10号’扩增出预期大小的片段。*R3b*引物可以在‘华恩2号’、‘鄂薯1号’、‘鄂薯5号’、‘鄂薯6号’、‘鄂薯8号’、‘鄂薯9号’、‘鄂薯10号’、‘鄂薯11号’、‘鄂薯13号’中扩增出预期大小的片段。*R8*引物可以在‘华恩1号’、‘华恩2号’、‘鄂薯5号’、‘鄂薯8号’、‘鄂薯9号’、‘鄂薯10号’、‘鄂薯14号’和‘鄂薯15号’扩增出预期大小的片段。



注: 泳道1~2为‘华恩1号’和‘华恩2号’, 泳道3为‘鄂薯1号’, 泳道4~17分别为‘鄂薯3号’~‘鄂薯16号’, 泳道18为阴性对照, 泳道19为阳性对照, 泳道20为DNA Marker 2 000 plus。

Note: Lane 1-2. 'Huaen 1' and 'Huaen 2', lane 3. 'Eshu 1', lane 4-17. 'Eshu 3'-'Eshu 16', lane 18. negative control, lane 19. positive control, and lane 20. DNA marker 2 000 plus.

图1 鄂薯系列品种 *R3a*, *R3b* 和 *R8* 基因标记扩增电泳图

Figure 1 Electrophoretic images of *R3a*, *R3b* and *R8* marker amplification in Eshu varieties

2.2 华薯系列 *R3a* 和 *R3b* 抗病基因分子标记检测

以华薯系列基因组DNA为模板, 以 *RP2* 基因为内参, 用 *R3a* 和 *R3b* 引物分别扩增。如图2所示, 内参基因引物能够扩增约820 bp 片段。*R3a* 引物可以在‘华渝6号’、‘华薯7号’和‘华薯9号’中扩增出预期大小的片段。*R3b* 引物可以在‘华薯3号’、‘华渝6号’、‘华薯7号’和‘华薯9号’中扩增出预期大小的片段。*R8* 引物在华薯系列中扩增特异性不好, 因此, 后续没有扩增。

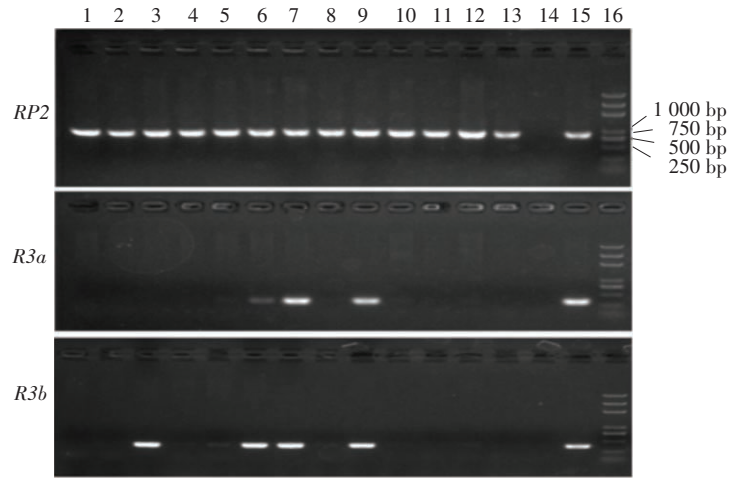
2.3 鄂薯和华薯系列马铃薯品种中SNP位点检测

本研究在部分供试品种中检测了6个基因的SNP位点。从基因组DNA中用高保真Taq酶扩增目标区域片段, 然后对PCR片段进行测序, 利用测序结果判读软件Chromas在目标区域判读SNP位点。由于马铃薯为同源四倍体, 同一位点四个SNP可能处于杂合状态。图3示意‘鄂薯10号’4个基因SNP位点判读结果, 方框所示区域为4个基因中目标SNP位点。图3A代表 *STAOS2*-SNP692 位点为G和C; 图3B代表 *HMGCR*-SNP567 位点为G和C; 图3C代表 *CYP71D11*-SNP346 位点为T, C和A; 图3D代表

Rpivnt1-SNP539 位点为G和A。将19个品种SNP位点判读结果汇总于表4。有些位点显示单一SNP, 表明该位点为纯合类型, 例如‘鄂薯13号’*CYP71D11*-SNP346 位点为T, 表明该位点4个等位位点纯合(TTTT); 有的位点为2个SNP位点, 例如‘鄂薯10号’*HMGCR*-SNP567 位点为G/C, 表明处于杂合状态。有的位点显示存在3个SNP位, 例如‘鄂薯10号’*CYP71D11*-SNP346 位点为T/C/A。表4灰色背景标记SNP位点为有益SNP位点, 即对晚疫病抗性有贡献的位点。总体上看在扩增品种中 *STAOS2*-SNP692, *HMGCR*-SNP567, *CYP71D11*-SNP346 和 *Rpivnt1*-SNP539 的有益SNP位点出现频率高, 有些有益SNP位点处于纯合状态, 有些处于杂合状态。*PLOX1*-SNP8089位点在所测品种中都处于纯合状态。

2.4 鄂薯和华薯系列马铃薯品种抗性与标记和SNP位点关系分析

主效R基因控制的抗性表现往往与晚疫病菌生理小种有关。随着田间生理小种的变化, 含有R基因抗性品种的表现也会发生变化。各品种审定或登记时的抗性表现及标记结果见表5。*R3a* 抗病基因已

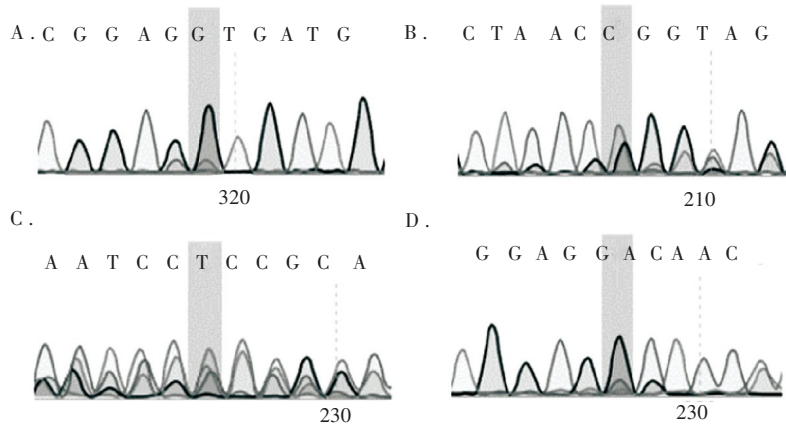


注: 泳道1~4为‘华薯1号’~‘华薯4号’, 泳道5~6为‘华渝5号’~‘华渝6号’, 泳道7~13为‘华薯7号’~‘华薯13号’, 泳道14为阴性对照, 泳道15为阳性对照, 泳道16为DNA Marker 2 000 plus。

Note: Lane 1-4. 'Huashu 1'-'Huashu 4', Lane 5-6. 'Huayu 5'-'Huayu 6', Lane 7-13. 'Huashu 7'-'Huashu 13', lane 14. negative control, lane 15. positive control, and lane 16. DNA marker 2 000 plus.

图2 华薯系列品种 *R3a* 和 *R3b* 基因标记扩增电泳图

Figure 2 Electrophoretic images of *R3a* and *R3b* marker amplification in Huashu varieties



注: A, B, C 和 D 分别代表 *STAOS2*-SNP692、*HMGCR*-SNP567、*CYP71D11*-SNP346 和 *Rpivnt1*-SNP539 4 个基因 SNP 位点 Chroma 图, 方框所示区域为目标 SNP 位点。

Note: A, B, C and D represent Chroma map of SNP loci of *STAOS2*-SNP692, *HMGCR*-SNP567, *CYP71D11*-SNP346 and *Rpivnt1*-SNP539, respectively. The gray box shows target SNP loci.

图3 ‘鄂薯10号’中4个基因SNPs位点检测结果

Figure 3 Detection of SNPs of four genes in 'Eshu 10' variety

被克服。就 *R3b* 和 *R8* 而言, 鄂薯系列中, 品种抗性与抗病基因分子标记有无总体呈正相关, 例如: 检测到 *R3b* 分子标记的‘鄂薯1号’、‘鄂薯6号’和‘鄂薯13号’的区试抗性为中抗以上; 检测到 *R8* 基因分子标记的‘鄂薯14号’、‘鄂薯15号’和‘华恩1号’区

试抗性表现均为中抗; 同时检测到 *R3b*、*R8* 基因分子标记的‘鄂薯5号’和‘华恩2号’区试表现为中抗以上。有些品种中检测到抗病基因分子标记, 但区试抗性表现为感病, 例如: ‘鄂薯8号’~‘鄂薯11号’。另外, ‘鄂薯3号’、‘鄂薯4号’和‘鄂薯16号’未检测

表 4 6 个基因晚疫病抗性 SNP 位点判读结果
Table 4 Interpretation results of SNPs of six late blight resistance related genes

品种 Variety	SNP 位点 SNP loci					
	<i>STAOS2</i> - SNP692	<i>HMGCR</i> - SNP567	<i>CYP71D11</i> - SNP346	<i>Rpivnt1</i> - SNP539	<i>StGP28</i> - SNP794	<i>PLOX1</i> - SNP8089
鄂薯 10 号	G/C	G/C	T/C/A	G/A	N	n
鄂薯 13 号	G/C	C/G	T	G	N	n
鄂薯 14 号	G/C	C/G	T	G/A	N	n
鄂薯 16 号	C	G/C	T	G/A	N	n
华恩 1 号	G/C	G	C/T	G/A	N	n
华恩 2 号	G	C	T	G/A	N	n
华薯 1 号	C/G	G/C	C/T	G	G	A
华薯 2 号	C/G	G	T/G/A	G/A	G/C	A
华薯 3 号	C	G	T	G	G	A
华薯 4 号	G/C	C	T/C	G	G/C	A
华渝 5 号	C/G	G	C/T/A	G	G/C	A
华渝 6 号	G/C	G	C/T/G	G	G	A
华薯 7 号	C	C	T/C	G	G	A
华薯 8 号	C	G	T/A	G	G	A
华薯 9 号	C	C	C/T	G	G/C	A
华薯 10 号	G/C	G	T/A	G	G	A
华薯 11 号	G/C	G	T	G/A	A/T	A
华薯 12 号	C	G	C/T	G/A	G/C	A
华薯 13 号	C	C/G	T/C/A	G	G	A

注：灰色背景标记为对晚疫病抗性有益 SNP 位点。单个碱基表示等位基因该位点处于纯合状态，不同碱基表示等位基因该位点处于杂合状态。

Note: Grey background SNPs are beneficial SNP to late blight resistance. A single base represents homozygous allele, and different bases indicates heterozygous allele.

到 *R3b* 和 *R8* 抗病基因分子标记，但区试抗性表现为中抗以上。华薯系列品种中‘华薯 3 号’、‘华渝 6 号’、‘华薯 7 号’和‘华薯 9 号’检测到 *R3b* 分子标记，但区试评价均为中感。

目前认为 *R8* 基因是一个具有广谱和持久的田间抗性的基因。分析 2020 年恩施田间晚疫病抗性评价结果与 *R8* 基因标记的关系，鄂薯和华恩 8 个品种具有 *R8* 基因标记，晚疫病抗性评级覆盖 3 级(中抗, 2/8), 4 级(中感, 5/8)和 5 级(感病, 1/8)。另外，无 *R8* 基因的品种抗性级别也存在变化，例如‘鄂薯 4 号’表

现为 3 级中抗，‘鄂薯 7 号’则感病。表明 *R8* 基因标记有无与田间抗性表现存在较为复杂的关系。

如表 5 所示，华薯系列中 *STAOS2*-SNP692、*HMGCR*-SNP567、*CYP71D11*-SNP346 和 *Rpivnt1*-SNP539 出现频率较高，位点有杂合有纯合，但整体抗性表现较差。例如：‘华薯 3 号’中检测到 4 个纯合的 SNP 位点，抗性表现仍为感病；‘华薯 11 号’检测到 2 个纯合位点、3 个杂合位点，抗病表现仍为感病。可见供试品种 2020 年恩施抗性评价级别与 SNP 位点关联度较低。

表5 品种抗性、分子标记与SNP位点结果汇总
Table 5 Summary of resistance, molecular markers and SNPs of all the cultivars

编号 Code	品种 Variety	熟性 Maturity	区试评价 Registration evaluation	田间评价 Field evaluation	R 基因扩增 R amplification			SNP 检测结果 Results of SNP test					
					R3a	R3b	R8	STAOS2	HMGCR	CYP71D11	Rpivnt1	StGP28	PLOX1
1	鄂薯1号	中晚熟	高抗	5	+	+	-	n	n	n	n	n	n
2	鄂薯3号	中晚熟	中抗	5	-	-	-	n	n	n	n	n	n
3	鄂薯4号	早熟	抗	3	-	-	-	n	n	n	n	n	n
4	鄂薯5号	中晚熟	抗	3	+	+	+	n	n	n	n	n	n
5	鄂薯6号	中晚熟	抗	4	+	+	-	n	n	n	n	n	n
6	鄂薯7号	中晚熟	感病	5	-	-	-	n	n	n	n	n	n
7	鄂薯8号	中晚熟	中感	4	+	+	+	n	n	n	n	n	n
8	鄂薯9号	中晚熟	感病	4	+	+	+	n	n	n	n	n	n
9	鄂薯10号	中晚熟	中感	4	+	+	+	G/C	G/C	T/C/A	G/A	n	n
10	鄂薯11号	中晚熟	中感	4	-	+	-	n	n	n	n	n	n
11	鄂薯12号	早熟	中感	4	-	-	-	n	n	n	n	n	n
12	鄂薯13号	中晚熟	中抗	3	-	+	-	G/C	C/G	T	G	n	n
13	鄂薯14号	中晚熟	中抗	4	-	-	+	G/C	C/G	T	G/A	n	n
14	鄂薯15号	中晚熟	中抗	4	-	-	+	n	n	n	n	n	n
15	鄂薯16号	中晚熟	中抗	4	-	-	-	C	G/C	T	G/A	n	n
16	华恩1号	中晚熟	中抗	5	-	-	+	G/C	G	C/T	G/A	n	n
17	华恩2号	中熟	中抗	3	+	+	+	G	C	T	G/A	n	n
18	华薯1号	早熟	中感	4	-	-	n	G/G	G/C	C/T	G	G	A
19	华薯2号	早熟	中感	5	-	-	n	G/G	G	T/G/A	G/A	G/C	A
20	华薯3号	早熟	中感	n	-	+	n	C	G	T	G	G	A
21	华薯4号	早熟	中感	5	-	-	n	G/C	C	T/C	G	G/C	A
22	华渝5号	中早熟	中抗	n	-	-	n	G/G	G	C/T/A	G	G/C	A
23	华渝6号	中晚熟	中感	5	+	+	n	G/C	G	C/T/G	G	G	A
24	华薯7号	早熟	中感	n	+	+	n	C	C	T/C	G	G	A
25	华薯8号	早熟	中感	n	-	-	n	C		T/A	G	G	A
26	华薯9号	早熟	中感	5	+	+	n	C	C	C/T	G	G/C	A
27	华薯10号	早熟	中感	n	-	-	n	G/C	G	T/A	G	G	A
28	华薯11号	早熟	中感	n	-	-	n	G/C	G	T	G/A	A/T	A
29	华薯12号	早熟	中感	n	-	-	n	C	G	C/T	G/A	G/C	A
30	华薯13号	早熟	中感	5	-	-	n	C	C/G	T/C/A	G	G	A

注: R 基因扩增有条带用“+”标注, 无条带用“-”标注, 无数据用“n”表示。SNP检测结果灰色背景示意该位点对抗性有益, 无数据用“n”表示。

Note: R gene amplification band presence is marked with "+", no band with "-" and no data with "n". Grey background SNP indicates beneficial SNP, and "n" no data.

3 讨 论

聚合多个抗性基因是培育抗晚疫病品种的重要方法之一。分析已育成品种中抗病基因组成是获得优良抗病品种的重要基础。本研究利用已开发的 *R3a*、*R3b* 和 *R8* 分子标记, 对 3 个系列品种进行了 *R* 基因组成分析, 发现鄂薯和华恩系列品种中 *R* 基因出现频率较高。*R3a* 抗病基因已被克服^[10]; *R3b* 抗病基因对某些病原菌小种仍具有一定的抗病性; *R8* 抗病基因具有广谱和持久的田间抗性^[11], 抗病能力较好。鄂薯和华恩的 17 个品种中, 有 9 份检测出 *R3b* 分子标记, 8 份检测出 *R8* 分子标记, 除‘鄂薯 8 号’、‘鄂薯 9 号’和‘鄂薯 10 号’区试抗性表现为感病外, 其余品种均表现为抗病, 表明该系列品种抗病能力主要由抗病基因提供。除‘华渝 5 号’外, 华薯系列区试评价均为中感, 但检测到 4 个品种含有 *R3b* 分子标记。这种情形可能是部分病原菌小种能克服 *R3b* 基因, 或分子标记不准确造成。刘勋等^[12]通过分子标记检测到‘华薯 2 号’和‘鄂薯 3 号’中含 *R3b* 抗病基因, 但本研究并未检测到, 表明 *R* 基因分子标记的准确性仍需提高。另外, 部分品种中未检测到抗病基因分子标记, 但抗性表现较好, 例如: ‘鄂薯 4 号’, 推测该品种中含有其他抗性基因。

尽管 *R8* 抗病基因具有持久的田间抗性, 但当前中国马铃薯产区存在“超级毒力”小种可以克服 *R8* 基因^[10]。从本研究的结果来看, 具有 *R8* 标记的 8 个鄂薯和华恩品种抗性级别田间存在差异, 但是总体而言, 中抗和中感占比(7/8)更高。由于 2020 年马铃薯生长季节恩施天气多雨潮湿, 晚疫病发病很严重, 绝大部分品种田间抗性表现很差, 也可能导致抗性评价没有分辨度, 抗性与管理之间的关系被掩盖。

水平抗性对多种晚疫病病原小种表现抗性, 抗性较为稳定, 微效多基因对水平抗性具有一定贡献^[13]。本研究挑取了 6 个与水平抗性紧密关联基因的特异 SNP 位点, 探索育成品种中的 SNP 位点分布, 以期了解这些位点是否与水平抗性相关。根据 Mosquera 等^[6]报道, 水平抗性 SNP 位点对晚疫病抗性贡献与该位点剂量有关, 即该位点趋向纯合时贡献

更明显。本研究中, *STAOS2*、*HMGCR*、*CYP71D11* 和 *Rpivnt1* 基因的有益 SNP 位点在品种中出现次数较多, 频率达 79% 以上, 各基因特异位点的纯合比例各不相同, 分别为 38.8%、60.0%、26.3% 和 57.9%。但综合华薯、鄂薯和华恩系列的品种区试抗性表现, 发现相关品种的区试抗性并未提高, 表明抗性表现与 SNP 位点分布无明显关联。然而丁德骏^[9]研究结果表明一些 SNP 位点与其研究群体材料晚疫病抗性存在一定关联。这种差异可能受马铃薯的遗传背景、田间的实际发病情况、晚疫病病原的变化等因素影响。就多年田间种植观察, ‘华恩 1 号’、‘华恩 2 号’、‘华渝 5 号’和‘华渝 6 号’具有较好田间抗性。

研究结果显示鄂薯、华恩和华薯系列部分马铃薯品种含有 *R3a* 和 *R3b* 基因, 鄂薯和华恩系列含有 *R8* 基因。同时, 部分马铃薯品种中检测到一些与田间抗性有关的 SNP 位点。抗病基因标记、田间抗性有关的 SNP 位点存在与否与晚疫病抗性评价结果存在复杂的关系, 有待根据多年的田间抗性评价结果判断。本研究结果可为进一步深入探究标记与抗性之间的关系奠定较好基础。

[参 考 文 献]

- [1] Birch P R J, Bryan G, Fenton B, *et al.* Crops that feed the world 8: potato: are the trends of increased global production sustainable? [J]. Food Security, 2012, 4: 477–508.
- [2] Haas B J, Kamoun S, Zody M C, *et al.* Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* [J]. Nature, 2009, 461(7262): 393–398.
- [3] Nowicki M, Foolad M R, Nowakowska M, *et al.* Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding [J]. Plant Disease, 2012, 96(1): 4–17.
- [4] Bradshaw J E, Ramsay G. Utilization of the commonwealth potato collection in potato breeding [J]. Euphytica, 2005, 146(1–2): 9–19.
- [5] Solomon–Blackburn R M, Stewart H E, Bradshaw J E. Distinguishing major–gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance [J]. Theoretical Applied

- Genetics, 2007, 115(1): 141.
- [6] Mosquera T, Alvarez M F, Jiménez-Gómez J M, *et al.* Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease [J]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0156254.
- [7] 何欢. 马铃薯晚疫病抗性资源筛选及其抗病基因组成鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [8] Kim H J, Lee H R, Jo K R, *et al.* Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes [J]. Theoretical Applied Genetics, 2012, 124(5): 923-935.
- [9] 丁德骏. 马铃薯晚疫病抗性资源筛选、抗病基因组成及水平抗性 SNP 位点分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [10] 徐小虎, 杨志辉, 朱杰华, 等. 致病疫霉超级生理小种遗传多样性分析 [J]. 菌物学报, 2013, 32(5): 791-801.
- [11] Jiang R, Li J, Tian Z, *et al.* Potato late blight field resistance from QTL dPI09c is conferred by the NB-LRR gene *R8* [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(7): 1545-1555.
- [12] 刘勋, 郑克邪, 张娇, 等. 马铃薯晚疫病抗性基因分子标记检测及抗性评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(3): 538-549.
- [13] Clair S, Dina A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding [J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48(1): 247-268.

2017年各地区马铃薯(折粮)播种面积和产量

指标	播种面积(千公顷)	总产量(万吨)	每公顷产量(千克)
全国总计	4 859.9	1 769.6	3 641
北 京			
天 津	1.7	0.6	3 620
河 北	162.8	102.7	6 308
山 西	168.1	40.9	2 431
内 蒙 古	432.1	137.5	3 181
辽 宁	63.5	39.5	6 220
吉 林	60.1	41.7	6 944
黑 龙 江	164.1	80.0	4 877
上 海			
江 苏			
浙 江	45.0	18.7	4 148
安 徽	2.4	1.4	5 846
福 建	45.6	18.8	4 132
江 西	37.0	19.3	5 219
山 东			
河 南			
湖 北	203.8	64.9	3 184
湖 南	75.2	31.3	4 162
广 东	51.1	25.0	4 881
广 西	55.3	13.8	2 486
海 南	0.1	0.0	4 106
重 庆	335.0	117.6	3 510
四 川	684.1	283.8	4 148
贵 州	699.8	231.7	3 311
云 南	471.0	145.4	3 086
西 藏	1.0	0.5	5 585
陕 西	311.0	79.6	2 559
甘 肃	565.3	191.4	3 386
青 海	86.8	34.8	4 009
宁 夏	118.7	35.2	2 966
新 疆	19.3	13.6	7 034

转载自《中国农业年鉴 2018》209 页。