

中图分类号: S435.32; S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2024)04-0289-11

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2024.04.001

遗传育种

马铃薯抗晚疫病及病毒病种质资源分子标记辅助筛选

卢瑶¹, 金鑫², 沈日敏¹, 范向斌¹, 毛向红¹, 白小东^{1*}

(1. 山西农业大学高寒区作物研究所/马铃薯遗传改良与种质创新山西省重点实验室, 山西 大同 037008;

2. 宁夏回族自治区原种场, 宁夏 银川 750200)

摘要: 为筛选具有多个晚疫病、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)和马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)抗性基因的马铃薯种质资源, 利用4个与晚疫病抗性相关分子标记R2-800、R3a、R3b、R2F, 3个与抗PVY的基因 Ry_{sto} 、 Ry_{chc} 紧密连锁的分子标记YES3-3B、GP122-564、Ry364和抗PLRV的基因 $PLRV.1$ 紧密连锁的分子标记N127₁₁₆₄, 对174份山西省保存的马铃薯种质资源进行检测。174份种质资源均含有1个或1个以上的抗性分子标记, 单个标记中含有R3b和GP122-564抗性分子标记的有173份; 多个标记中只含有7个标记R3a、R3b、R2F、N127₁₁₆₄、YES3-3B、Ry364、GP122-564的马铃薯种质资源有84份。聚类分析结果将174份种质资源分为5类, 其中第III类25份均含有8个分子标记, 其中仅有6份为国内育成品种, 分别为‘早大白’‘内薯7号’‘希森4号’‘天薯9号’‘中薯19号’‘京张薯1号’, 其余均为国际马铃薯中心提供的资源, 因此这一类可作为山西省马铃薯抗病育种材料。筛选出的晚疫病和PVY、PLRV抗性资源, 将为相关病害抗性资源、分子标记的进一步利用以及抗病基因的聚合育种奠定基础。

关键词: 马铃薯; 分子标记; 晚疫病; 马铃薯Y病毒(PVY); 马铃薯卷叶病毒(PLRV)

Molecular Marker-assisted Screening of Potato Germplasm Resources for Resistance to Late Blight and Virus

LU Yao¹, JIN Xin², SHEN Riming¹, FAN Xiangbin¹, MAO Xianghong¹, BAI Xiaodong^{1*}

(1. High Latitude Crops Institute, Shanxi Agricultural University/Shanxi Provincial Key Laboratory of Potato Genetic Improvement and Germplasm Innovation, Datong, Shanxi 037008, China; 2. Ningxia Foundation Seed Farm, Yinchuan, Ningxia 750200, China)

Abstract: This study utilized four molecular markers R2-800, R3a, R3b, and R2F associated with late blight resistance, three molecular markers YES3-3B, GP122-564, and Ry364 closely linked to the Ry_{sto} and Ry_{chc} genes for potato virus Y (PVY) resistance, and molecular marker N127₁₁₆₄ closely linked to potato leafroll virus (PLRV) resistance to test 174 potato germplasm resources conserved in Shanxi Province, in order to screen potato germplasm resources with multiple late blight, PVY and PLRV resistant genes. All of 174 germplasm resources contained one or more resistant molecular markers, and 173 contained the R3b and GP122-564 resistant markers in a individual markers. Furthermore, 84 potato germplasm resources contained seven markers, R3a, R3b, R2F, N127₁₁₆₄, YES3-3B, Ry364, and GP122-564. Cluster analysis classified the 174 germplasm resources into five distinct classes. Notably, 25 entries in Class III contained eight molecular markers, of which only six were domestic varieties, namely 'Zaodabai', 'Neishu 7', 'Xisen 4', 'Tianshu 9', 'Zhongshu 19', and 'Jingzhangshu 1', and the remaining germplasm resources were provided by the International Potato

收稿日期: 2024-06-20

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系(CARS-09-ES02); 山西省高等学校科技创新项目(2023L038); 山西农业大学生物育种工程(YZGC082); 山西省马铃薯产业技术体系种质资源创制岗位(CYJSTX06-04)。

作者简介: 卢瑶(1993-), 女, 助理研究员, 研究方向为马铃薯遗传育种与种质资源评价。

*通信作者(Corresponding author): 白小东, 研究员, 研究方向为马铃薯育种与栽培技术, E-mail: bxd5561@126.com。

Center. Therefore, this category could be used as a valuable source for breeding disease-resistant potatoes in Shanxi Province. The screening of a number of late blight and PVY and PLRV resistant resources would lay the foundation for the further utilization of related disease resistant resources and molecular markers as well as the polymerization of disease resistant genes for breeding.

Key Words: potato; molecular marker; late blight; potato virus Y (PVY); potato leafroll virus (PLRV)

马铃薯是全球粮食安全的重要组成部分, 含有淀粉、蛋白质、维生素和矿物质等多种养分^[1]。然而, 在生长过程中, 马铃薯容易受到晚疫病、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)和马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)等多种生物胁迫的影响, 导致产量下降。马铃薯晚疫病由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起^[2], 该病原菌可侵染马铃薯植株的茎、叶片、果实和块茎, 造成植株整体性死亡^[3]。全球每年由马铃薯晚疫病造成马铃薯10%~15%减产^[4]。PVY和PLRV是全球马铃薯重要的两种病毒病原体。PVY可通过50多种蚜虫传播, 也可通过机械、工具以及种植者田间行走时接触植物进行传播^[5], 而PLRV主要通过蚜虫传播^[6]。马铃薯在当季感染PVY最多可减产33%^[7], 而感染PVY的种薯可导致高达80%的产量损失^[8]。PLRV可造成马铃薯90%的减产^[9]。当前, 防治马铃薯晚疫病的主要方法是化学防治, 但由于晚疫病生理小种的快速进化, 部分化学药剂的药效正逐渐降低。同时, 对马铃薯病毒病的防治主要依靠脱毒种薯, 但中国脱毒种薯的推广率有待提高。培育抗病品种仍是控制马铃薯晚疫病和病毒病的最佳途径^[10]。

挖掘抗病基因可对育种工作起到重要作用。在马铃薯野生种中发现了61个抗病R(Resistance)基因^[11]。已将墨西哥野生种*Solanum dimissum*中的11个晚疫病主效抗病基因(*R1*~*R11*)通过杂交转移到马铃薯栽培种中^[12]。其中基因*R1*^[13]、*R2*^[14]和*R4*^[15]分别位于5号、4号和12号染色体, 基因*R5*、*R6*、*R7*、*R9*、*R10*、*R11*位于11号染色体^[16], 位于9号染色体的基因*R8*是一种具有广谱抗性的基因^[17], 位于11号染色体的基因*R3a*与*R3b*是一对等位抗性基因^[18], 这些抗性基因被克隆并构建了相应的抗性位点(QTL)分子标记^[19,20]。另外, 来源于*S. bulbocastanum* Dunal具有晚疫病广谱抗性基因*RB*也被克隆和开发了相应的分子标记用于分子标记辅助选择^[21]。这些

标记的使用有效提高了晚疫病抗性育种效率^[22]。

在PVY和PLRV的研究中, 已确定3个PVY极端抗性基因, 分别是*Ry_{adg}*、*Ry_{sto}*和*Ry_{chc}*^[23], 其中*Ry_{adg}*和*Ry_{sto}*可对PVY所有生理小种产生极端抗性^[5]。*Ry_{adg}*来源于安第斯亚种(*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*), 定位于11号染色体^[24], 开发的分子标记RYSC3、RYSC4、ADG2已在国外马铃薯育种中得到广泛应用^[25]。*Ry_{sto}*又被命名*Ry-fsto*, 来源于*S. stoloniferum*, 位于12号染色体, 开发的分子标记YES3-3B^[26]、GP122-564^[27]、SSR标记STM0003均被用于检测*Ry_{sto}*基因。*Ry_{chc}*来源于*S. chacoense*, 定位于9号染色体, 开发的分子标记有Ry186和Ry364^[28]。PLRV的抗性基因主要来源于*S. chacoense*, 其中*PLRV.1*和*PLRV.4*定位于9号染色体, *PLRV.2*和*PLRV.3*则位于6号和5号染色体^[29,30]。

常规抗病育种主要通过种间杂交和回交等传统育种方法将R基因导入栽培马铃薯品种, 选育过程周期长且效率低^[22]。而分子标记辅助选择可在育种早期进行快速筛选, 且不受环境条件限制, 从而加速育种进程, 提高育种选择效率^[31]。本研究利用4个与晚疫病抗性相关的分子标记(R2-800、R3a、R3b、R2F), 以及3个与抗PVY基因(*Ry_{sto}*、*Ry_{chc}*)紧密连锁的分子标记(YES3-3B、GP122-564、Ry364), 和1个与抗PLRV基因*PLRV.1*紧密连锁的分子标记N127₁₁₆₄, 对山西省保存的174份马铃薯种质资源进行检测。筛选出具有多个晚疫病和病毒抗性基因的马铃薯材料, 为抗病育种提供宝贵资源, 同时为分子标记聚合育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

174份供试材料来源于山西农业大学高寒区作物研究所毛皂马铃薯育种基地, 于2023年5月7日播种, 采集苗期生长健康的叶片于-80℃环境保存。

供试马铃薯材料 174 份(表 1), 其中编号 1~20 80 为国内其他地区种植品种, 81~169 为份国外引
为山西农业大学高寒区作物研究所育成品种, 21~ 进种质资源, 170~174 为亲本材料。

表 1 174 份马铃薯材料信息
Table 1 174 potato material information

序号 No.	资源名称 Germplasm name	序号 No.	资源名称 Germplasm name	序号 No.	资源名称 Germplasm name	序号 No.	资源名称 Germplasm name	序号 No.	资源名称 Germplasm name
1	晋薯 2 号	36	中薯 27 号	71	华颂 7 号	106	CIP 388611.22	141	CIP 703579
2	晋薯 7 号	37	中薯 28 号	72	内薯 7 号	107	CIP 377744.1	142	CIP 392797.22
3	晋薯 8 号	38	中薯 49	73	蒙薯 18 号	108	CIP 399049.22	143	CIP 703580
4	晋薯 11 号	39	陇薯 7 号	74	秦芋 30 号	109	CIP 394613.139	144	CIP 397067.2
5	晋薯 13 号	40	陇薯 8 号	75	雪川红	110	CIP 392781.1	145	CIP 801092
6	晋薯 14 号	41	陇薯 9 号	76	麦肯 1 号	111	CIP 396240.2	146	Daisy
7	晋薯 15 号	42	陇薯 10 号	77	斯凡特	112	CIP 396037.215	147	Anuschka
8	晋薯 18 号	43	陇薯 11 号	78	早大白	113	CIP 392745.7	148	Vitesse
9	晋薯 22 号	44	陇薯 12 号	79	维拉斯	114	CIP 381403.16	149	Arietis
10	晋薯 23 号	45	陇薯 14 号	80	新大坪	115	CIP 380496.6	150	Axelle & Allians
11	晋薯 24 号	46	陇薯 15 号	81	CIP 47	116	CIP 397078.12	151	Naga
12	晋薯 27 号	47	陇薯 16 号	82	CIP 31	117	CIP 393077.54	152	Topas
13	晋薯 28 号	48	天薯 1 号	83	CIP 30	118	CIP 384866.5	153	Oriana
14	同薯 22 号	49	天薯 9 号	84	CIP 302298.16	119	CIP 390478.9	154	Goramnalise
15	同薯 23 号	50	天薯 11 号	85	CIP 302290.13	120	RH	155	Cneice
16	同薯 31 号	51	天薯 12 号	86	CIP 302305.41	121	CIP 302306.36	156	Ramos
17	同薯 32 号	52	天薯 17 号	87	CIP 302302.25	122	CIP 302304.15	157	Tobique
18	同薯红	53	天薯 19 号	88	CIP 302298.44	123	CIP 302301.19	158	Tawa
19	大同里外黄	54	克新 5 号	89	CIP 302305.46	124	CIP 300054.29	159	Flava
20	系薯 1 号	55	克新 6 号	90	CIP 302299.16	125	CIP 393242.50	160	Concorde
21	丽薯 6 号	56	克新 23	91	CIP 302306.33	126	CIP 398193.553	161	Eden
22	丽薯 7 号	57	东农 310	92	CIP 302306.19	127	CIP 391002.6	162	Voyager
23	青薯 2 号	58	东农 311	93	CIP 302290.23	128	CIP 302476.108	163	Anemone
24	青薯 9 号	59	东农 322	94	CIP 302298.23	129	CIP 393536.13	164	Katahdin
25	冀张薯 8 号	60	定薯 4 号	95	CIP 302300.25	130	CIP 301029.18	165	Estiwa
26	冀张薯 12 号	61	定薯 6 号	96	CIP 302302.11	131	CIP 398098.65	166	Epoka
27	冀张薯 24 号	62	希森 4 号	97	CIP 302293.22	132	CIP 396008.104	167	Ceneice
28	北方 013	63	希森 6 号	98	CIP 384321.3	133	CIP 303381.30	168	Premiere
29	京张薯 1 号	64	鄂马铃薯 5 号	99	CIP 397197.9	134	CIP 396272.37	169	Arielle
30	京张薯 2 号	65	鄂马铃薯 10 号	100	CIP 800048	135	CIP 397067.2	170	G 13
31	京张薯 3 号	66	闽薯 1 号	101	CIP 396033.102	136	Desiree	171	QCE 64-6-10
32	中薯 4 号	67	凯薯 1 号	102	CIP 304383.41	137	CIP 301040.63	172	I-1085
33	中薯 17 号	68	坝薯 2 号	103	CIP 397060.19	138	CIP 596131.4	173	CFQ-69.1
34	中薯 18 号	69	萱薯 4 号	104	CIP 395195.7	139	CIP 703034	174	EI-79
35	中薯 19 号	70	延薯 6 号	105	CIP 393615.6	140	CIP 393385.39		

1.2 马铃薯基因组 DNA 提取及晚疫病、PVY、PLRV 抗性基因检测

每个样本采 0.5 g 叶片，置于-20 ℃环境保存。采取改良的 CTAB 法^[20]提取 DNA。

试验用 4 个晚疫病抗性基因标记、3 个 PVY 病毒抗性基因标记和 1 个 PLRV 病毒抗性基因标记（表 2），引物序列由北京博友顺生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL：Taq PCR Mastermix 10 μL，模板 DNA 25 ng，F/R 引物（10 μmol）各

0.5 μL，加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增程序：95 ℃预变性 10 min；94 ℃变性 30 s，63 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 2 min，35 个循环，72 ℃ 10 min，12 ℃终止反应。取 PCR 产物 5 μL 浓度为 2% 的琼脂糖凝胶（含 1 μg/mL 核酸染料）电泳，观察结果并拍照记录。

1.3 数据处理和分析方法

使用 Excel 2016 软件对数据进行处理和分析，使用 MeV 软件进行聚类热图分析。

表 2 马铃薯晚疫病及 PVY、PLRV 病毒抗性基因及用于辅助选择的分子标记
Table 2 Potato late blight, PVY and PLRV resistant genes and molecular markers for assisted selection

R 基因 R gene	标记 Genetic marker	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度(℃) Annealing temperature	扩增产物长度(bp) Length of amplification products	参考文献 Reference
R2	R2-800	TACTAACCTTTTCCTAGATG AGAACTTTCTCACAGCTTTT	55	800	[28]
R3a	R3a	ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT	65	982	[18]
R3b	R3b	GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA ACCAGTTTCTTGCAATTCCAGATTG	55	378	[25]
R2-Family	R2F	ATGGCTGATGCCTTTTCTATCATTTTGC TCACAACATATAATTCCGCTTC	65	2 500	[26]
PLRV.I	N127 ₁₁₆₄	TAGAGAGCATTAAGAAGCTGC TTTTGCCTACTCCCGGCATG	65	1 164	[32]
Ry _{sto}	YES3-3B	TAACTCAAGCGGAATAACCC CATGAGATTGCCTTTGGTTA	55	284	[26]
Ry _{che}	Ry364	CTATTATAAGTCTGTTACTAGGACG GGCTATATGTTCAATGAATTCATGCTAA	55	298	[28]
Ry-f _{sto}	GP122-564	TATTTTAGGGGTACTTCTTTCTTATGTT CTGTCAAAAAATTCATTGCATAACTAC	55	614	[27]

2 结果与分析

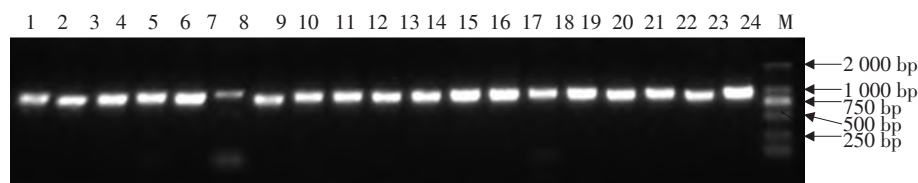
2.1 管家基因鉴定

本试验提取的基因组 DNA 采用粗提取方法，未进行电泳检测及浓度测定。为确定提取的基因组 DNA 能否正常进行 PCR，用管家基因 *GBSS*（F: ATCGCAAGCATCACAG，R: CAAAACCTTAGG TGCCTC）进行 PCR 扩增，电泳结果显示，在 981 bp 左右可见一清晰条带（图 1），表明马铃薯基因组 DNA 可用于进行后续试验。

2.2 晚疫病抗性基因分子标记 R2-800、R3a、R3b 和 R2F 的检测

通过对马铃薯晚疫病抗性基因连锁标记 R2-800、

R3a、R3b 和 R2F 进行 PCR 扩增。根据与马铃薯晚疫病抗性基因 R2 连锁的标记 R2-800 的扩增结果显示（图 2），含 R2-800 标记的材料可扩增出约 800 bp 的特异性片段，174 份材料中有 51 份材料含有该标记，占供试材料的 29.31%。含有标记 R3a 的材料可扩增出约 982 bp 的特异性片段（图 3），174 份材料中有 163 份材料含有 R3a 标记，占供试材料的 93.68%。含有标记 R3b 的材料可扩增出约 378 bp 的特异性片段（图 4），174 份材料中有 173 份材料含有 R3b 标记，占比达到 99.43%。含有标记 R2F 的材料可扩增出约 2 500 bp 的特异性片段（图 5），174 份材料中有 131 份材料含有该标记，占比为 75.29%。

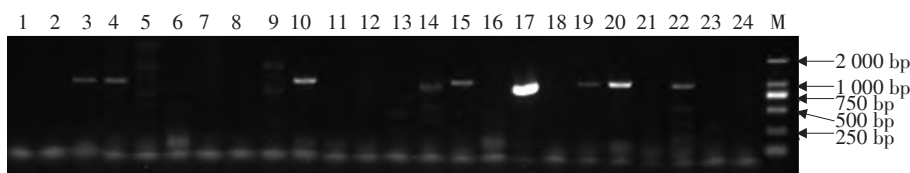


M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Ramos, 2. Tobique, 3. Tawa, 4. Flava, 5. Concorde, 6. Eden, 7. Voyager, 8. Anemone, 9. Katahdin, 10. Estiwa, 11. Epoka, 12. 希森4号, 13. 系薯1号, 14. 内薯7号, 15. 中薯4号, 16. 天薯1号, 17. 丽薯6号, 18. 丽薯7号, 19. 闽薯1号, 20. 陇薯8号, 21. 天薯9号, 22. 青薯2号, 23. 青薯9号, 24. 雪川红。

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Ramos, 2. Tobique, 3. Tawa, 4. Flava, 5. Concorde, 6. Eden, 7. Voyager, 8. Anemone, 9. Katahdin, 10. Estiwa, 11. Epoka, 12. Xisen 4, 13. Xishu 1, 14. Neishu 7, 15. Zhongshu 4, 16. Tianshu 1, 17. Lishu 6, 18. Lishu 7, 19. Minshu 1, 20. Longshu 8, 21. Tianshu 9, 22. Qingshu 2, 23. Qingshu 9, and 24. Xuechuanhong.

图1 部分供试材料管家基因 *GBSS* 的扩增

Figure 1 PCR amplification of housekeeper gene *GBSS* of some materials

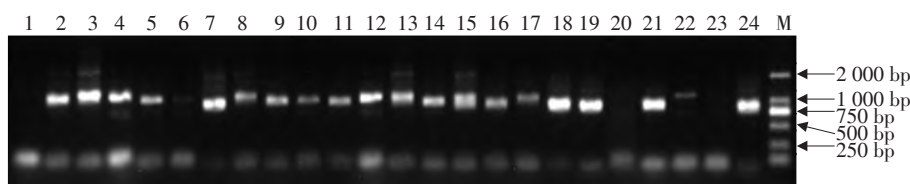


M. DL 2 000 DNA Marker, 1. 陇薯8号, 2. 天薯9号, 3. 青薯2号, 4. 青薯9号, 5. 雪川红, 6. 希森6号, 7. 延薯6号, 8. 萱薯4号, 9. 鄂马铃薯5号, 10. 坝薯2号, 11. 克新5号, 12. 克新6号, 13. 冀张薯24号, 14. 蒙薯18号, 15. 冀张薯12号, 16. 秦芋30号, 17. 鄂马铃薯10号, 18. QCE64-6-10, 19. 新大坪, 20. I-1085, 21. CFQ-69.1, 22. 冀张薯8号, 23. 同薯23号, 24. Ceneice。

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Longshu 8, 2. Tianshu 9, 3. Qingshu 2, 4. Qingshu 9, 5. Xuechuanhong, 6. Xisen 6, 7. Yanshu 6, 8. Xuanshu 4, 9. Emalingshu 5, 10. Bashu 2, 11. Kexin 5, 12. Kexin 6, 13. Jizhangshu 24, 14. Mengshu 18, 15. Jizhangshu 12, 16. Qinyu 30, 17. Emalingshu 10, 18. QCE 64-6-10, 19. Xindaping, 20. I-1085, 21. CFQ-69.1, 22. Jizhangshu 8, 23. Tongshu 23, and 24. Ceneice.

图2 部分供试材料 R2-800 的扩增

Figure 2 PCR amplification of some materials using R2-800 marker

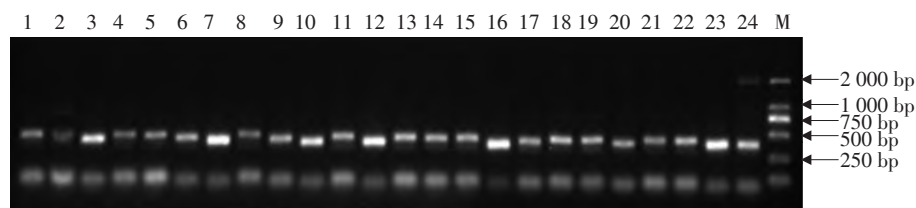


M. DL 2 000 DNA Marker, 1. CIP 302298.23, 2. CIP 302300.25, 3. CIP 302306.36, 4. CIP 302304.15, 5. CIP 302301.19, 6. CIP 302302.11, 7. CIP 302293.22, 8. CIP 384321.3, 9. CIP 397197.9, 10. CIP 800048, 11. CIP 396033.102, 12. CIP 304383.41, 13. CIP 397060.19, 14. CIP 395195.7, 15. CIP 393615.6, 16. CIP 377744.1, 17. CIP 399049.22, 18. CIP 394613.139, 19. CIP 392781.1, 20. CIP 396240.2, 21. CIP 396037.215, 22. CIP 392745.7, 23. CIP 381403.16, 24. CIP 380496.6。

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. CIP 302298.23, 2. CIP 302300.25, 3. CIP 302306.36, 4. CIP 302304.15, 5. CIP 302301.19, 6. CIP 302302.11, 7. CIP 302293.22, 8. CIP 384321.3, 9. CIP 397197.9, 10. CIP 800048, 11. CIP 396033.102, 12. CIP 304383.41, 13. CIP 397060.19, 14. CIP 395195.7, 15. CIP 393615.6, 16. CIP 377744.1, 17. CIP 399049.22, 18. CIP 394613.139, 19. CIP 392781.1, 20. CIP 396240.2, 21. CIP 396037.215, 22. CIP 392745.7, 23. CIP 381403.16, and 24. CIP 380496.6.

图3 部分供试材料 R3a 的扩增

Figure 3 PCR amplification of some materials using R3a marker

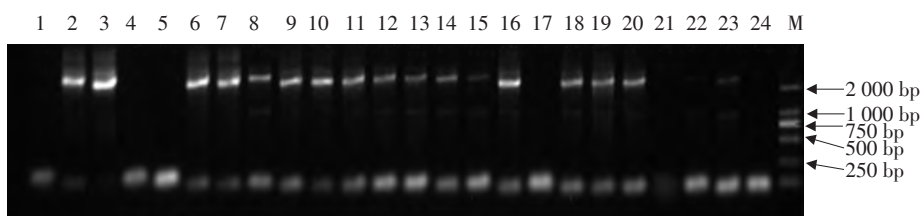


M. DL 2 000 DNA Marker, 1. 天薯 11 号, 2. 天薯 12 号, 3. 中薯 17 号, 4. 华颂 7 号, 5. 陇薯 16 号, 6. 东农 310, 7. 陇薯 9 号, 8. 东农 322, 9. 同薯 32 号, 10. 定薯 6 号, 11. 陇薯 7 号, 12. 陇薯 12 号, 13. 维拉斯, 14. 陇薯 15 号, 15. 天薯 19 号, 16. 中薯 27, 17. 天薯 17 号, 18. 中薯 49, 19. 陇薯 14 号, 20. 定薯 4 号, 21. Desiree, 22. CIP 301040.63, 23. CIP 388611.22, 24. CIP 596131.4.

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Tianshu 11, 2. Tianshu 12, 3. Zhongshu 17, 4. Huasong 7, 5. Longshu 16, 6. Dongnong 310, 7. Longshu 9, 8. Dongnong 322, 9. Tongshu 32, 10. Dingshu 6, 11. Longshu 7, 12. Longshu 12, 13. Vilas, 14. Longshu 15, 15. Tianshu 19, 16. Zhongshu 27, 17. Tianshu 17, 18. Zhongshu 49, 19. Longshu 14, 20. Dingshu 4, 21. Desiree, 22. CIP 301040.63, 23. CIP 388611.22, and 24. CIP 596131.4.

图4 部分供试材料R3b的扩增

Figure 4 PCR amplification of some materials using R3b marker



M. DL 2 000 DNA Marker, 1. CIP 397078.12, 2. CIP 300054.29, 3. CIP 393242.50, 4. CIP 398193.553, 5. CIP 391002.6, 6. CIP 302476.108, 7. CIP 393536.13, 8. CIP 301029.18, 9. CIP 398098.65, 10. CIP 396008.104, 11. CIP 303381.30, 12. CIP 396272.37, 13. CIP 397067.2, 14. Daisy, 15. Anuschka, 16. Vitesse, 17. Arietis, 18. Axelle & Allians, 19. Naga, 20. Topas, 21. Oriana, 22. Goramnalise, 23. Ceneice, 24. 北方 013.

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. CIP 397078.12, 2. CIP 300054.29, 3. CIP 393242.50, 4. CIP 398193.553, 5. CIP 391002.6, 6. CIP 302476.108, 7. CIP 393536.13, 8. CIP 301029.18, 9. CIP 398098.65, 10. CIP 396008.104, 11. CIP 303381.30, 12. CIP 396272.37, 13. CIP 397067.2, 14. Daisy, 15. Anuschka, 16. Vitesse, 17. Arietis, 18. Axelle & Allians, 19. Naga, 20. Topas, 21. Oriana, 22. Goramnalise, 23. Ceneice, and 24. North 013.

图5 部分供试材料R2F的扩增

Figure 5 PCR amplification of some materials using R2F marker

2.3 病毒病抗性基因分子标记N127₁₁₆₄、YES3-3B、Ry364和GP122-564的检测

通过对马铃薯病毒抗性基因连锁标记N127₁₁₆₄、YES3-3B、Ry364和GP122-564进行PCR扩增。含有马铃薯PLRV抗性基因*PLRV.I*连锁的标记N127₁₁₆₄的材料可扩增出约1 164 bp的特异性片段(图6), 174份材料中有137份材料含有N127₁₁₆₄标记, 占比为78.74%。含有马铃薯PVY抗性基因 Ry_{sto} 连锁的标记YES3-3B的材料可扩增出约284 bp的特异性片段(图7), 174份材料中有171份材料含有YES3-3B标记, 占比为98.28%。含有马铃薯

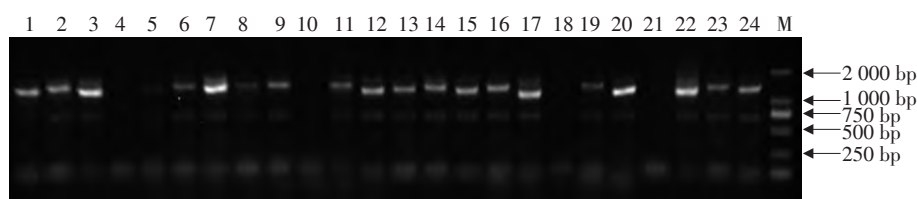
PVY抗性基因 Ry_{che} 连锁的标记Ry364的材料可扩增出约298 bp的特异性片段(图8), 174份材料中有168份材料含有Ry364标记, 占比为96.55%。含有马铃薯PVY抗性基因 Ry_{fsto} 连锁的标记GP122-564的材料可扩增出约614 bp的特异性片段(图9), 174份材料中有173份材料含有GP122-564标记, 占比为99.43%。

2.4 不同马铃薯材料的晚疫病抗性及病毒病抗性标记聚类分析

晚疫病抗性及病毒抗性基因标记组成分析结果显示(图10), 含有抗性基因标记的主要分为5类。

第Ⅰ类1个,只含有YES3-3B标记(Naga)。第Ⅱ类主要含有R2-800、R3a、R3b、GP122-564共4个标记类型,有25份材料,国内品种比例达到64%,山西省品种‘晋薯24号’‘晋薯15号’和‘大同里外黄’均属于此类型。第Ⅲ类主要含有R2-800、R3a、R3b、R2F、N127₁₁₆₄、YES3-3B、Ry364、GP122-564共8个标记类型,有25份,以国际马铃薯中心(CIP)资源为主(56%),国内品种6份(‘早大白’‘内薯7号’‘希森4号’‘天薯9号’‘中薯19号’和‘京张薯1号’),无山西省品种。第Ⅳ类主要含

有R3b、R2F、GP122-564、YES3-3B共4个标记类型,有94份,其中国际马铃薯研究中心提供资源有34份,国内品种43份,山西省品种‘晋薯2号’‘晋薯7号’‘晋薯14号’‘晋薯18号’‘晋薯22号’‘晋薯23号’‘晋薯27号’‘晋薯28号’‘同薯22号’‘同薯23号’‘同薯红’均属于这一类型。第Ⅴ类主要是含有R3b、GP122-564、N127₁₁₆₄、YES3-3B共4个标记类型,有29份,国内品种比例达到62.07%,山西省品种‘晋薯8号’‘晋薯11号’‘晋薯13号’‘同薯31号’和‘同薯32号’属于这一类型。

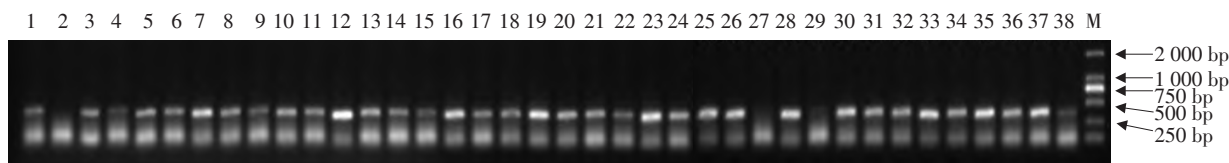


M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Ramos, 2. Tobique, 3. Tawa, 4. Flava, 5. Concorde, 6. Eden, 7. Voyager, 8. Anemone, 9. Katahdin, 10. Estiwa, 11. Epoka, 12. 希森4号, 13. 系薯1号, 14. 内薯7号, 15. 中薯4号, 16. 天薯1号, 17. 丽薯6号, 18. 丽薯7号, 19. 闽薯1号, 20. 陇薯8号, 21. 天薯9号, 22. 青薯2号, 23. 青薯9号, 24. 雪川红。

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Ramos, 2. Tobique, 3. Tawa, 4. Flava, 5. Concorde, 6. Eden, 7. Voyager, 8. Anemone, 9. Katahdin, 10. Estiwa, 11. Epoka, 12. Xisen 4, 13. Xishu 1, 14. Neishu 7, 15. Zhongshu 4, 16. Tianshu 1, 17. Lishu 6, 18. Lishu 7, 19. Minshu 1, 20. Longshu 8, 21. Tianshu 9, 22. Qingshu 2, 23. Qingshu 9, and 24. Xuechuanhong.

图6 部分供试材料N127₁₁₆₄的扩增

Figure 6 PCR amplification of some materials using N127₁₁₆₄ marker



M. DL 2 000 DNA Marker, 1. 天薯11号, 2. 天薯12号, 3. 中薯17号, 4. 华颂7号, 5. 陇薯16号, 6. 东农310, 7. 陇薯9号, 8. 东农322, 9. 同薯32号, 10. 定薯6号, 11. 陇薯7号, 12. 陇薯12号, 13. 维拉斯, 14. 陇薯15号, 15. 天薯19号, 16. 中薯27, 17. 天薯17号, 18. 中薯49, 19. 陇薯14号, 20. 定薯4号, 21. Desiree, 22. CIP 301040.63, 23. CIP 388611.22, 24. CIP 596131.4, 25. CIP 703034, 26. CIP 393385.39, 27. CIP 393077.54, 28. CIP 384866.5, 29. CIP 390478.9, 30. RH, 31. CIP 703579, 32. CIP 392797.22, 33. CIP 703580, 34. CIP 397067.2, 35. CIP 801092, 36. CIP 47, 37. CIP 31, 38. CIP 30。

M. DL 2 000 DNA Marker, 1. Tianshu 11, 2. Tianshu 12, 3. Zhongshu 17, 4. Huasong 7, 5. Longshu 16, 6. Dongnong 310, 7. Longshu 9, 8. Dongnong 322, 9. Tongshu 32, 10. Dingshu 6, 11. Longshu 7, 12. Longshu 12, 13. Vilas, 14. Longshu 15, 15. Tianshu 19, 16. Zhongshu 27, 17. Tianshu 17, 18. Zhongshu 49, 19. Longshu 14, 20. Dingshu 4, 21. Desiree, 22. CIP 301040.63, 23. CIP 388611.22, 24. CIP 596131.4, 25. CIP 703034, 26. CIP 393385.39, 27. CIP 393077.54, 28. CIP 384866.5, 29. CIP 390478.9, 30. RH, 31. CIP 703579, 32. CIP 392797.22, 33. CIP 703580, 34. CIP 397067.2, 35. CIP 801092, 36. CIP 47, 37. CIP 31, and 38. CIP 30.

图7 部分供试材料YES3-3B的扩增

Figure 7 PCR amplification of some materials using YES3-3B marker

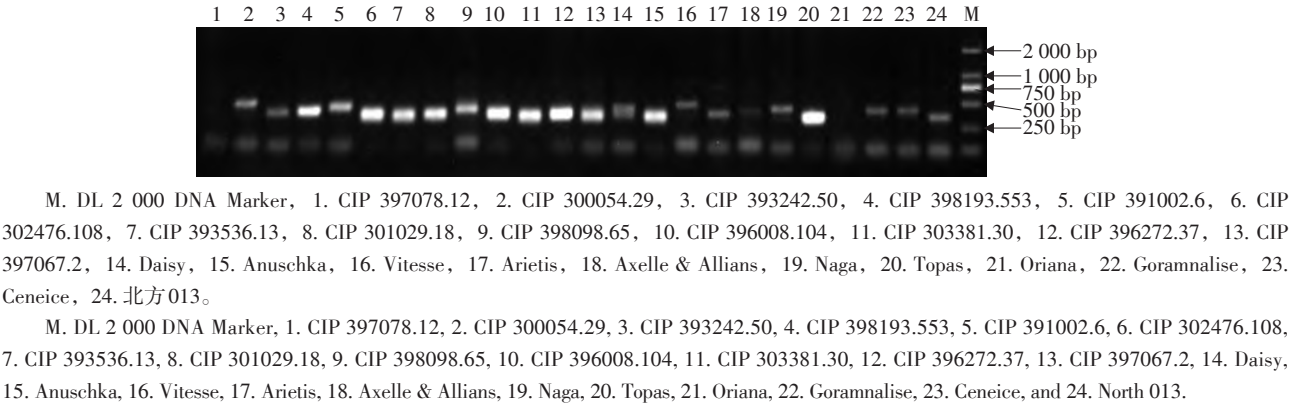


图8 部分供试材料Ry364的扩增

Figure 8 PCR amplification of some materials using Ry364 marker

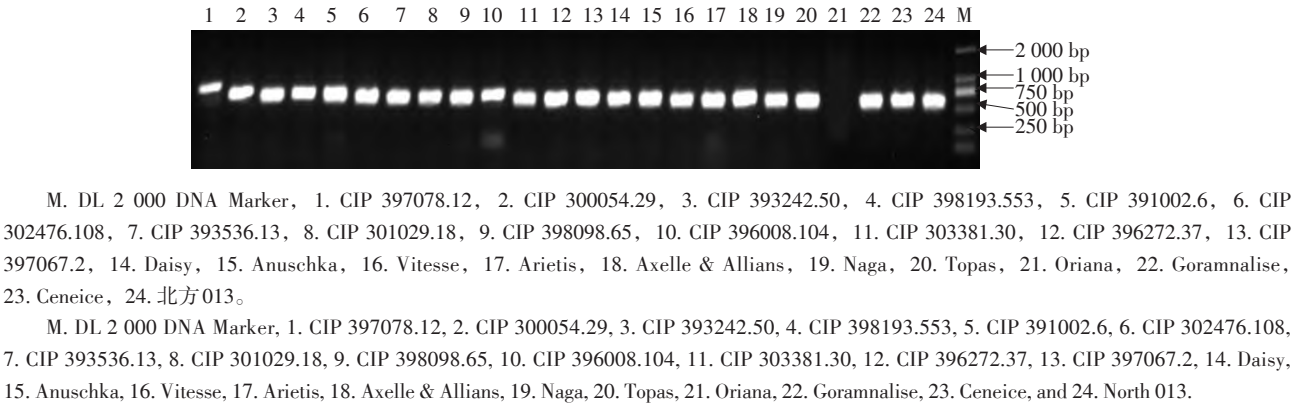


图9 部分供试材料GP122-564的扩增

Figure 9 PCR amplification of some materials using GP122-564 marker

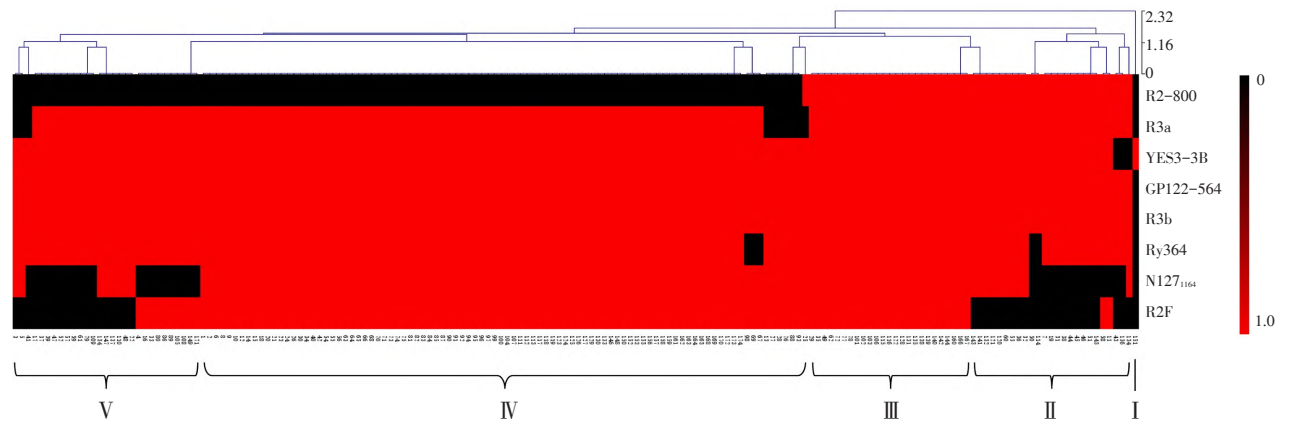


图10 晚疫病与PVY抗性分子标记组成聚类热图

Figure 10 Cluster heat map of late blight and PVY resistant molecular markers

3 讨 论

马铃薯在生长过程中容易遭受晚疫病、病毒病、马铃薯胞囊线虫和青枯病等多种生物胁迫^[33]。其中, 马铃薯晚疫病和PVY是影响中国马铃薯产量和品质的主要生物胁迫。培育抗病品种是目前最有效的应对方法, 而抗病基因的挖掘和多抗病基因聚合则是实现抗病育种的重要手段。培育抗病品种的基础在于获得优良的抗病种质资源^[19]。传统抗病种质资源筛选方法主要为表型鉴定, 然而此方法耗时长、成本高, 且容易受到气候等自然条件影响。随着分子生物学技术的进步, 特别是各种DNA标记的引入, 对植物育种方法产生了重大影响。基于DNA的分子标记优势在于成本低, 可同时对接数百个样本进行高通量分析, 还能鉴定抗性来源不明的栽培品种基因组中的基因, 并及早选择抗性基因型^[22,33]。与传统表型筛选相比, 利用抗病基因分子标记来评价和提高作物的抗病性是经济高效的途径, 目前在不同作物中得到广泛应用^[34,35]。

抗晚疫病是马铃薯育种的重要目标^[36], 杨天丽等^[12]利用25个*R*基因分子标记评价了118份国内外马铃薯种质资源并结合室内抗性鉴定筛选了一批抗性材料, 筛选出高抗材料29份; 刘勋等^[19]利用6个*R*基因分子标记并结合室内室外抗性对218份国内外品种进行了评价, 表明缺失*R2 family*基因标记的材料可能不利于晚疫病抗性; Dalamu等^[33]使用3个*R*基因对印度的94份马铃薯品种进行鉴定, 其中*R1*基因特异性标记CosA210在11个品种中发现了抗晚疫病基因。为了确定山西省保存的马铃薯资源含有抗晚疫病基因, 本研究中共174份马铃薯材料含单个抗性基因连锁标记数最多的是R3b及R2-800, 分别为173份(99.43%)和51份(29.31%), R3b的检测结果与杨天丽等^[12]的结果基本一致。同时含有4个晚疫病抗性基因分子标记的材料有27份, 主要以国外资源为主, 国内品种有8份, 表明国内育成品种所含的晚疫病抗性基因不够丰富, 这与白磊和郭华春^[35]的研究结果基本一致。

PVY和PLRV引起的马铃薯病害危害程度仅次于马铃薯晚疫病, 因此马铃薯的抗病性是目前马

铃薯新品种选育的主要目标之一^[37]。于韶玮等^[38]利用3个PVY抗性分子标记对56份马铃薯近缘野生种进行了筛选, 同时含有RYSC3、YES3-3A和Ry364标记的材料仅有1份; 谢芳茹等^[39]通过接种PVY和分子标记检测对张家口15份马铃薯品种和高代品系进行了评价, 结果表明‘冀张薯8号’‘京张薯1号’‘京张薯2号’具有PVY抗性基因*Ry_{adg}*; Novy等^[40]对一个回交群体的PVY和PLRV抗性进行了室内接种和ELISA检测, 阐明了这两种病毒的遗传特征。本研究中含有单个抗性基因连锁标记最多的是GP122-564和N127₁₁₆₄, 分别为173份(99.43%)和137份(78.74%), 同时含有4个抗性分子标记的共131份, 国内品种56份, 这与黄鑫华等^[10]的研究结果基本一致, 其中对‘冀张薯8号’‘京张薯1号’‘京张薯2号’的检测结果与谢芳茹等^[39]的结果一致。这131份种质资源可用于马铃薯抗PVY、PLRV育种及抗性基因的挖掘。

综上所述, 本研究中174份材料均含有1个或1个以上的抗性分子标记, 表明山西省保存的马铃薯种质资源抗性来源较丰富; 173份材料含有R3b和GP122-564抗性分子标记, 表明晚疫病抗性基因、PVY抗性基因占比最大; 84份材料只含有7个标记R3a、R3b、R2F、N127₁₁₆₄、YES3-3B、Ry364、GP122-564, 表明晚疫病抗性基因、PVY抗性基因、PLRV抗性基因在这些材料中分布丰富。聚类分析结果表明第Ⅲ类含有8个分子标记, 可作为山西省马铃薯育种材料。在检测了山西省保存的国内育成品种后发现, 含有4个晚疫病抗性基因分子标记的品种较少, 仅有1份, 推测原因是研究使用的晚疫病抗性分子标记少, 后期需结合室内室外鉴定并扩大抗性分子标记数量进行评价。84份国内供试材料中含有PVY和PLRV的抗性基因分子标记材料有56份, 表明中国育成品种在抗病毒方面有一定成果。本研究通过分子标记检测, 筛选出一批具有马铃薯晚疫病、PVY和PLRV抗性的马铃薯资源, 并明确了部分材料的抗性来源。下一步计划对这些筛选出的材料进行室内接种, 以确认有价值的抗性种质资源, 这将为进一步利用抗病资源和实现聚合育种奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Devaux A, Kromann P, Ortiz O. Potatoes for sustainable global food security [J]. *Potato Research*, 2014, 57(3-4): 185-199.
- [2] 娄树宝, 李风云, 田国奎, 等. 马铃薯种质资源晚疫病抗性评价及分子标记辅助筛选 [J]. *作物杂志*, 2021(4): 196-201.
- [3] Paluchowska P, Śliwka J, Yin Z. Late blight resistance genes in potato breeding [J]. *Planta*, 2022, 255(6): 127.
- [4] Angmo D, Sharma S P, Kalia A. Breeding strategies for late blight resistance in potato crop: Recent developments [J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50: 7879-7891.
- [5] Slater A T, Schultz L, Lombardi M, *et al.* Screening for resistance to PVY in Australian potato germplasm [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(4): 429.
- [6] Herrbach E. Virus-vector interactions [M]//Smith H G, Barker H. *The Luteoviridae*. UK: CAB International Wallingford, 1999: 85-146.
- [7] Nolte P, Miller J S, Geary B D, *et al.* Disease management [M]//Stark J C, Love S L. *Potato production systems*. USA: University of Idaho Extension, 2003: 153-183.
- [8] Ahmadvand R, Takacs A, Taller J, *et al.* Potato viruses and resistance genes in potato [J]. *Acta Agronomica Hungarica*, 2012, 60: 283-298.
- [9] Kumari P, Kumar J, Kumar R R, *et al.* Inhibition of potato leafroll virus multiplication and systemic translocation by siRNA constructs against putative ATPase fold of movement protein [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 22016.
- [10] 黄鑫华, 韩蕾勤, 晋艺丹, 等. 马铃薯病毒病抗性基因分子标记检测 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(17): 5782-5789.
- [11] Blossei J, Gäbelein R, Hammann T, *et al.* Late blight resistance in wild potato species—Resources for future potato (*Solanum tuberosum*) breeding [J]. *Plant Breeding*, 2022, 141(3): 314-331.
- [12] 杨天丽, 高永嘉, 邵世豪, 等. 马铃薯晚疫病抗性材料的评价筛选与抗性基因分子标记检测 [J/OL]. *分子植物育种*, 1-26 [2024-05-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240514.1058.002.html>.
- [13] Bormann C A, Rickert A M, Castillo Ruiz R A, *et al.* Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2004, 17: 1126-1138.
- [14] Champouret N. Functional genomics of *Phytophthora infestans* effectors and *Solanum* resistance genes [D]. Wageningen: Wageningen University, 2010.
- [15] van Poppel P M J A. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *PiaAvr4* and its potato counterpart R4 [D]. Wageningen: Wageningen University, 2009.
- [16] Huang S. Discovery and characterization of the major late blight resistance complex in potato [D]. Wageningen: Wageningen University, 2005.
- [17] Jo K R, Arens M, Kim T J, *et al.* Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene *R8* to a new locus on chromosome IX [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123: 1331-1340.
- [18] Huang S, van der Vossen E A G, Kuang H, *et al.* Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato [J]. *Plant Journal*, 2005, 42: 251-261.
- [19] 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.
- [20] 孙悦, 宁琳懿睿, 张娅芳, 等. 马铃薯晚疫病抗性基因分子标记检测 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(17): 5685-5691.
- [21] Song J, Bradeen J M, Naess S K, *et al.* Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(16): 9128-9133.
- [22] Tiwari J K, Siddappa S, Singh B P, *et al.* Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: An update [J]. *Plant Breeding*, 2013, 132: 237-245.
- [23] Gebhardt C, Valkonen J P T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39: 79-102.
- [24] Hämäläinen J H, Watanabe K N, Valkonen J P, *et al.* Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94: 192-197.
- [25] Whitworth J, Novy R, Hall D, *et al.* Characterization of broad spectrum potato virus Y resistance in a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*-derived population and select breeding clones using molecular markers, grafting, and field inoculations [J]. *American Journal of Potato Research*, 2009, 86: 286-296.

- [26] Fulladolsa A C, Navarro F M, Kota R, *et al.* Application of marker assisted selection for potato virus Y resistance in the University of Wisconsin Potato Breeding Program [J]. American Journal of Potato Research, 2015, 92(3): 444–450.
- [27] Witek K, Strzelczyk-Żyta D, Hennig J, *et al.* A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles Ry-fsto and Ns [J]. Molecular Breeding, 2006, 18: 273–275.
- [28] Mori K, Sakamoto Y, Mukojima N, *et al.* Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato [J]. Euphytica, 2011, 180(3): 347–355.
- [29] Marczewski W, Flis B, Syller J, *et al.* A major quantitative trait locus for resistance to potato leafroll virus is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to N-gene-like markers [J]. Molecular Plant Microbe Interact, 2001, 14(12): 1420–1425.
- [30] Marczewski W, Flis B, Syller J, *et al.* Two allelic or tightly linked genetic factors at the PLRV.4 locus on potato chromosome XI control resistance to potato leafroll virus accumulation [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 1604–1609.
- [31] 娄树宝, 杨梦平, 邢金月, 等. 马铃薯种质资源抗病毒分子标记辅助筛选 [J]. 作物杂志, 2023(4): 65–70.
- [32] Cockerham G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y [J]. Heredity, 1970, 25: 309–348.
- [33] Dalamu, Tiwari J K, Bairwa A, *et al.* Resistance evaluation for native potato accessions against late blight disease and potato cyst nematodes by molecular markers and phenotypic screening in India [J]. Life, 2023, 13: 33.
- [34] 王金萍, 刘永伟, 孙果忠, 等. 抗茎腐病分子标记在 159 份玉米自交系中的验证及实用性评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 754–762.
- [35] 白磊, 郭华春. 马铃薯多抗亲本的分子标记辅助筛选 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(1): 200–212.
- [36] Bradshaw J E, Bryan G J, Ramsay G. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding [J]. Potato Research, 2006, 49: 49–65.
- [37] 罗杰, 唐唯, 王培, 等. 四倍体马铃薯“合作 88”PVY、PLRV 抗性基因的基因型分析 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(17): 98–101, 128.
- [38] 于韶玮, 张剑峰, 杨元军, 等. 马铃薯野生近缘种抗 PVY 种质资源分子标记辅助筛选 [J]. 山东农业科学, 2024, 56(2): 23–29.
- [39] 谢芳茹, 毕恒翊, 傅欣雨, 等. 北方晚熟马铃薯病毒抗性鉴定及分子标记检测 [J]. 中国马铃薯, 2023, 37(1): 26–35.
- [40] Novy R G, Gillen A M, Whitworth J L. Characterization of the expression and inheritance of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) resistance in three generations of germplasm derived from *Solanum tuberosum* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(7): 1161–1172.