

# 马铃薯晚疫病水平抗性的 QTL 标记评价

柳俊<sup>1</sup>, 吴承金<sup>2</sup>, 胡诚<sup>1</sup>, 宋波涛<sup>1</sup>, 田振东<sup>1</sup>, 谢从华<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 国家蔬菜改良中心华中分中心, 武汉 430070; <sup>2</sup> 湖北恩施州农业科学院马铃薯研究所, 湖北恩施 445000)

**摘要:** 以 11 个马铃薯晚疫病水平抗性杂交组合后代的 636 个基因型为材料, 对 4 个与晚疫病 (*Phytophthora infestans*) 水平抗性相关位于不同染色体的 QTL 位点标记 GP179、GP76、p<sub>pp1</sub> 和 GP125 进行了评价。结果显示: 4 个 QTL 位点标记共有 6 个特征带, 在不同遗传背景的组合中带型分布存在差异; 田间抗病性与 4 个标记的总带数呈极显著直线相关; 主要成分分析表明, p<sub>pp1</sub><sub>570</sub> 位点标记解释了供试材料 35% 的抗性表型变异, 为主效 QTL。结合抗性表型分析, 组合群体的抗性与 QTL 位点数有关, 而个体的抗病水平与主效 QTL 有关。

**关键词:** 马铃薯; 晚疫病; 水平抗性; QTL 标记

**中图分类号:** S 532 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0391-06

## Evaluation of QTL Markers Associated with Horizontal Resistance to Late Blight of Potato

LIU Jun<sup>1</sup>, WU Cheng-jin<sup>2</sup>, HU Cheng<sup>1</sup>, SONG Bo-tao<sup>1</sup>, TIAN Zhen-dong<sup>1</sup>, and XIE Cong-hua<sup>1\*</sup>

[<sup>1</sup> Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup> Potato Research Institute, Enshi Academy of Agricultural Sciences, Enshi, Hubei 445000, China]

**Abstract:** To improve the selection efficiency of potato horizontal resistance to late blight caused by *Phytophthora infestans*, molecular markers (GP179, GP76, p<sub>pp1</sub> and GP125) of 4 quantitative trait loci (QTL) linked to potato late blight resistance and located on different chromosomes were evaluated with 636 pedigrees derived from 11 potato crosses with parental materials possessing horizontal resistance to late blight. The results showed that there were 6 bands produced by all the 4 markers and band distribution varied with crosses that have different genetic background. The resistance level of the pedigrees identified in the field was significantly related to the total number of the bands yielded by the 4 markers with a linear function. The dominant component analysis revealed that locus p<sub>pp1</sub><sub>570</sub> explained 35% of the phenotypic variance of the resistance and its linked QTL was hence classified as a dominant locus of late blight resistance. Combining the phenotypic analysis together, the experimental results have reinforced the evidence that late blight resistance is related to the number of QTLs when a whole potato population (i.e. all pedigrees of a cross) is taken into account and the dominant locus determined the resistance level of individuals within this population.

**Key words:** Potato; *Phytophthora infestans*; Horizontal resistance; QTL marker

晚疫病是由卵菌 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起的马铃薯最重要的病害之一 (Anonymous, 2002)。

就遗传基础而言, 马铃薯晚疫病抗性分为单基因 (*R*) 控制的小种特异抗性 (或称垂直抗性) 和

收稿日期: 2006 - 11 - 28; 修回日期: 2007 - 02 - 09

基金项目: 国家 '863' 项目 (2006AA100107); JCGB 项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xiech@mail.hzau.edu.cn)

多基因控制的非小种特异抗性（或称水平抗性）。马铃薯晚疫病主效抗性基因  $R1-R11$  主要来自于野生种 *S. demissum*，现有马铃薯品种的晚疫病抗性也主要由这些  $R$  基因控制。然而，这种小种专化抗病性很容易被病原生理小种的变异所克服。

近 20 年来，由于晚疫病菌 A2 交配型的出现和在全球的迅速传播，加速了晚疫病菌的进化速度，使病原菌生理小种突变更快，变异也更为复杂（Smart & Fry, 2001）。因此，选育抗性持久的马铃薯水平抗性品种已成为目前晚疫病防治的重要策略。

由于受多基因控制，水平抗性的表达受环境因子的影响大，表型选择上还受到垂直抗性基因的干扰，同时，马铃薯四倍体遗传的特性更是加大了一些性状选择的难度。因此，到目前为止，在育种上还没有一种有效方法用于马铃薯微效多基因控制的性状选择，建立快速准确的评价方法已成为马铃薯水平抗性育种的迫切需要。

近年来，针对多基因控制的抗性 QTL（quantitative trait loci）定位和遗传连锁图谱的构建研究已有一些报道，马铃薯晚疫病抗性 QTL 位点可能在全部 12 条染色体上均有分布（Leonards-Schippers et al, 1994; Collins et al, 1999; Ewing et al, 2000; Trögnitz et al, 2002），利用 QTL 标记辅助选择有望提高马铃薯晚疫病水平抗性评价的准确性，提高育种效率。然而，QTL 的实际应用涉及到位点在不同遗传背景中分布的差异、标记数与抗性评价的稳定性等诸多因素，目前关于 QTL 辅助选择应用的报道还十分有限。

本研究选用已经报道的与晚疫病抗性相关的 QTL 标记，对 11 个马铃薯水平抗性组合后代同时进行田间晚疫病抗性评价和 QTL 标记鉴定分析，以期确立利用 QTL 评价马铃薯晚疫病抗性的可能策略，为 QTL 分子标记的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及田间晚疫病鉴定

采用从国际马铃薯中心引进的不带  $R$  基因的 11 个四倍体组合材料，其亲本均具有不同的水平抗性特性。

将实生苗世代在网室中人工接种晚疫病混合小种病菌孢子，接种后 7~10 d 进行发病调查，淘汰完全不感病和极度感病的基因型。11 个组合共选留 636 个基因型进入无性世代作为研究的基本材料（表 1）。

表 1 马铃薯供试材料组合及后代基因型数

Table 1 Potato crosses and number of pedigrees used in the experiment

代码 Code	编号 Number	组合 Parental materials	基因型数 Number of pedigrees
A	395008	392652.8 × 391679.12	67
B	395013	393085.5 × 391679.12	27
C	395019	391002.14 × 391679.12	97
D	395021	391002.15 × 391679.7	79
E	395023	391002.15 × 392639.8	58
F	395024	391002.6 × 391679.7	50
G	395046	393046.7 × 391679.12	63
H	395048	393075.54 × 391679.7	37
I	395049	393075.54 × 391679.12	81
J	395050	393075.54 × 392639.8	37
K	396085	393280.58 × 392639.8	40

2001~2003年,在湖北恩施天池山(海拔 1 150 m)连续 3 年对 636 个无性系进行了晚疫病鉴定。除 2001 年每个基因型取单株外,2002、2003 年均取 5 株,种植成 1 行,对比法排列,每隔 5 行设置 2 行感病对照(品种‘Mira’),并在每行的头尾各种 2 株感病对照,以诱发田间晚疫病。

晚疫病发病期间采用国际马铃薯中心的 9 级分级标准鉴定发病等级,1~9 级分别代表从极端抗病到极端感病。根据 3 年评价资料,最后的统计按记载等级归为 4 大类型,即 1~2 级(抗病)、3~4 级(中抗)、5~6 级(中感)、7~9 级(感病)。

## 1.2 QTL 位点标记分析

根据前期试验结果,从已公布的与马铃薯晚疫病水平抗性相关的 QTLs 标记中,选用位于不同染色体的 4 个 QTLs 标记(Oberhagemann et al, 1999)用于本研究。其标记序列、退火温度以及在染色体上的位置见表 2。

马铃薯叶片 DNA 提取参照 Aljanabi 等(1997)的方法进行。

PCR 扩增采用 25  $\mu$ L 体系(200  $\mu$ mol/L dNTP, 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ mol/L 引物, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 20 ng 基因组 DNA)。PCR 扩增反应程序为: 93 2 min; 93 30 s 退火(GP179, 55 ; ppp1, 55 ; GP125, 57 ; GP76, 52 ) 30 s 72 1 min, 39 个循环; 72 5 min。

扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察并照相。

表 2 马铃薯抗晚疫病的 QTL 标记

Table 2 Markers tagging selected QTLs for resistance to late blight of potato

标记 Markers	引物序列 PCR primer sequences(5' 3')	退火温度 Annealing temperature ( )	连锁图位置 Linkage group
GP179	GGT TTT AGT GAT TGT GCT GC; AAT TTC AGA CGA GTA GGC ACT	55	b
GP76	ATG AAG CAA CAC TGA TGC AA; TTC TCC AAT GAA CGC AAA CT	52	
ppp1	GTG ACA TGA GCA CAT AAG TC; GCA ACT TCA CTT CTG CCA TC	55	
GP125	AGC AGC TCT GAT GGC AAT GC; GAG CCT AGC TGC CCA GCT TC	57	a

将每个标记扩增带的有无分别记为 1 和 0, 根据所有材料的田间病级评价结果和 QTL 标记检测结果,采用 SPSS 系统进行综合分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯组合及后代田间晚疫病抗性分布

经过连续 3 年的田间评价,在 11 个组合 636 个基因型中,共有 491 个基因型表现中抗和中感,占 77.2%,表现抗病和感病的分别为 129 和 16 个基因型,占 20.28%和 2.52%。

模拟分析显示,11 个组合 636 个个体组成的群体,田间抗性趋于正态分布,符合水平抗性的表型特征(图 1)。

由于试验组合的亲本材料为经过几次轮回选择的水平抗性材料,且杂种群体在实生苗世代采用晚疫病菌混合生理小种接种,淘汰了未表现病症(1 级)和严重感病(9 级)的个体,所以,剩余基因型所组成的群体,其抗性分布具有向抗病方向偏移的现象。

进一步进行组合分析显示,由于遗传背景的差异,不同病级在各组合中的分布频率并不完全一致。大多数组合中抗个体比例居多,但组合 395013 (B) 和 395046 (G) 两个组合的抗病个体比例高于中抗个体比例,组合 395013 (B)、395021 (D)、395048 (H)、395049 (I) 没有出现感病达到 8 级的个体(图 2)。

### 2.2 QTL 标记特征及在群体中的分布

PCR 扩增结果显示,标记 GP179 可以扩增出 570 bp 的特征性带,标记 ppp1 可以扩增出 300 bp、

570 bp、800 bp 3个特征性带, 分别记为  $ppl_{300}$ 、 $ppl_{570}$ 、 $ppl_{800}$ , 标记 GP125可以扩增出 1 100 bp 的特征性带, 标记 GP76可以扩增出 800 bp 的特征性带。

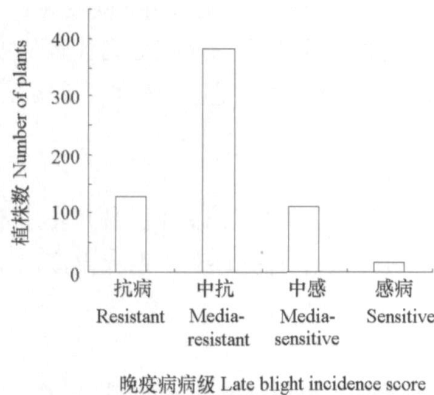


图1 11个组合 636个基因型所组成群体的病级分布

Fig. 1 The distributed trait of late blight incidence score in the population of 636 genotypes with 11 crosses

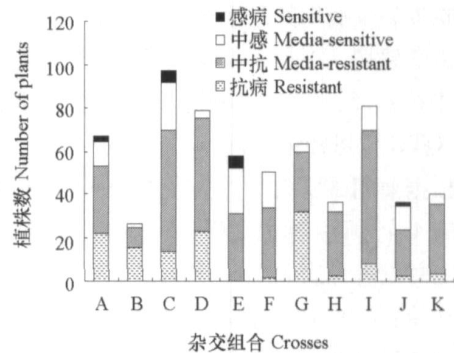


图2 不同组合病级分布

Fig. 2 The distribution of incidence score in different crosses

本研究结果显示, QTLs标记位点在群体中的分布与杂交组合的遗传背景有关。综合 11个组合的数据, 标记 GP179、 $ppl_{300}$ 、 $ppl_{570}$ 、 $ppl_{800}$ 、GP125、GP76的总体出现频率分别为 0.94、0.94、0.84、0.57、0.91、0.92。

但在不同组合中, 各标记的出现频率则不尽一致 (图 3)。有 50%的基因型同时具有 4个标记的 6种特征带 (6个位点), 含有 5个位点和 4个位点的基因型分别占 27.2%和 12.6%, 含 1~3个位点的基因型只占 10.4%。

就组合而言, 395049和 395008所有标记的出现频率均高于总体频率, 而 395023所有标记的出现频率均低于总体频率。

就标记而言, 标记 GP179、 $ppl_{300}$ 和 GP76在所有组合中均具有较高的出现频率, 而其它 3个标记在不同组合中差异较大, 如  $ppl_{800}$ , 在 395023组合中完全没有, 而 395049和 395008两个组合中的出现频率均超过 90%。标记  $ppl_{570}$ 在总体中的出现频率为 84%, 但在组合 395049中的出现频率达到了 98%, 而在组合 395023中的出现频率却只有 41%。

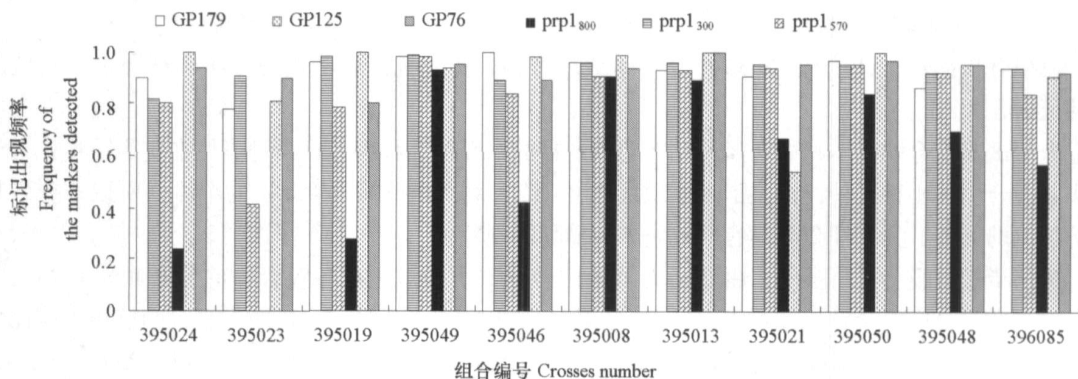


图3 QTL 标记在各组合中出现的频率

Fig. 3 Frequency of QTL markers detected in 11 potato populations

### 2.3 单个 QTL 标记对抗性变异的贡献率

主成分分析显示, 在全部 4 个标记的 6 个位点中, 标记  $pp1_{570}$  解释了 35.8% 的抗病性差异, 贡献率最大; GP125 的贡献率最低, 其单项方差只占总方差的 5.9%; 其余标记位点的贡献率分布在 11% ~ 19% (表 3)。

因此认为, 在本研究涉及的标记中,  $pp1$  为主效 QTL 位点。

### 2.4 抗性 with 单个标记和位点数的相关性

田间病级与单个标记和位点数的相关分析显示, 4 个标记的 6 个位点和位点数与田间病级的相关性从大到小依次为  $pp1_{570}$ 、 $pp1_{800}$ 、位点数、GP179、 $pp1_{300}$ 、GP125、GP76。其中  $pp1_{570}$ 、 $pp1_{800}$ , 位点数与田间病级的相关性极显著, GP179 为显著 (表 4)。

统计显示,  $pp1_{570}$  和  $pp1_{800}$  出现频率高, 则田间病级较低, 在田间表现抗病 (1~2 级) 的基因型中, 出现该 2 个标记的频率分别为 93.8% 和 68.2%, 而在田间表现感病 (7~9 级) 的基因型中, 出现该 2 个标记的频率分别降低至 62.5% 和 31.3%。试验还显示, QTL 位点的多少与田间病级具有相关性, 含多个 QTL 标记位点的基因型具有田间感病程度低的趋势。

## 3 讨论

近年来, 已有很多马铃薯晚疫病水平抗性 QTL 分析的报道, 这些研究显示, 控制小种非特异抗性的遗传成分几乎分布在马铃薯所有 12 个连锁群上 (Bomann et al, 2004), 然而, 在所有遗传背景中均能呈现的 QTL 位点几乎没有。

本研究对 11 个组合中均出现带型的 4 个 QTL 标记进行评价, 结果显示, 不同遗传背景的 QTL 位点的分布具有较大差异。如在总体出现频率达 94% 的 2 个标记中, GP179 在 395023 组合中出现频率只有 78%, 而在 395046 和 396085 两个组合中则完全没有分离, 100% 的基因型均有该标记的特征带。对于标记  $pp1_{300}$  而言, 在 395049 组合中, 99% 的基因型表现特征带, 而在 395024 组合中只有 82% 的基因型具有特征带。进一步分析组合的遗传背景可以看出, QTL 标记出现频率的差异可能与亲本有关。在  $pp1_{800}$  出现频率低于 70% 的组合 395019、395021、395023、395024、395046 中, 前 4 个组合的母本均为 391002, 而出现频率高于 80% 的 395008、395013、395049、395050 这 4 个组合中, 有 3 个组合为同一父本 391679.12。对于大多数组合而言, QTL 出现频率高的, 其群体的田间抗病性亦较强。

许多研究显示, 抗性 QTL 存在有主效位点。Roupe 等 (1998) 曾发现 1 个主效 QTL Gp1, 在不同的研究中分别解释了 45% 和 77% 的抗性变异, Costanzo 等 (2005) 利用 *S. phureja* × *S. stenotomum* 杂交后代群体, 也定位了 3 个主效 QTL, 它们分别解释了 23%、17% 和 10% 的抗性变异。本研究分析显示, 4 个标记 6 个位点对抗性的贡献率从大到小依次为  $pp1_{570}$ 、 $pp1_{800}$ 、 $pp1_{300}$ 、GP179、GP76、

表 3 单个标记在抗病性总变异中的比例

标记 Marker	单个标记占总变异 Percentage in the total variation	累计 Accumulative total
$pp1_{570}$	35.8	35.8
$pp1_{800}$	18.1	53.9
$pp1_{300}$	14.7	68.6
GP179	14.4	83.0
GP76	11.1	94.1
GP125	5.9	100

表 4 马铃薯 11 个组合 636 个基因型 QTL 位点和总位点数与田间病级的相关性

QTL	相关系数 Correlation coefficient
$pp1_{570}$	- 0.187 **
$pp1_{800}$	- 0.165 **
位点数	- 0.159 **
GP179	- 0.079 *
$pp1_{300}$	- 0.065
GP125	0.035
GP76	0.023

\*  $P=0.05$ ; \*\*  $P=0.01$ .

GP125, 分别解释了 35.8% ~ 5.9% 的抗性变异, 因此认为位于第 X 染色体末端的 p<sub>p1</sub> 为主效 QTL 位点。p<sub>p1</sub> 能扩增出 3 个特异带, 表现出复等位特征, 这一现象在其它同类研究中也有报道。Gebhardt (2001) 认为, 复等位位点可能对抗病程度产生影响, 只有那些极端的复等位位点才可能表现出抗病或感病, 这使水平抗性的遗传机制变得更为复杂, 它不仅受不同位点的多基因控制, 同时还受复等位基因影响。

本研究还显示, 在所选 QTL 标记的检测中, 表现出含有多个 QTL 位点的组合, 其群体的抗晚疫病性有增强的趋势。对于单个基因型而言, 含有主效 QTL 位点的个体大多表现抗病。这一现象表明, 如果选择含有较多 QTL 位点的亲本进行杂交, 然后根据主效 QTL 位点在后代中进行辅助选择, 有可能实现 QTL 标记在马铃薯晚疫病水平抗性育种中的应用。

## References

- Anonymous K. 2002. Taking the bite out of potato blight. *Science*, 298: 1702 - 1704.
- Aljanabi SM, Martinez L. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl Acids Res*, 25: 4692 - 4693.
- Bomann C A, Rickert A M, Ruiz R A C, Paal J, Strahwald J, Buhr K, Gebhardt C. 2004. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol-Plant Microbe Interact*, 17: 1126 - 1138.
- Collins A, Milbourne D, Ramsay L, Meyer R, Chatot-Balandras C, Oberhagemann P, De Jong W, Gebhardt C, Bonnel E, Waugh R. 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Mol Breed*, 5: 387 - 398.
- Costanzo S, Simko I, Christ B J, Haynes K G. 2005. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* × *S. stenotamum*. *Theor Appl Genet*, 111: 609 - 617.
- Ewing E E, Simko I, Smart C D, Bonierbale M W, Mizubuti E S G, May G D, Fry W E. 2000. Genetic mapping from field tests of quantitative and qualitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol Breed*, 6: 25 - 36.
- Gebhardt C. 2001. Organization genes controlling disease resistance potato genome. *Annu Rev Phytopathol*, 39: 79 - 102.
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Schäfer-Pregl R, Ritter E, Knapp S J, Salamini F, Gebhardt C. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics*, 137: 67 - 77.
- Oberhagemann P, Chatot-Balandras C, Schäfer-Pregl R, Wegener D, Palomino C, Salamini F, Bonnel E, Gebhardt C. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. *Mol Breed*, 5: 399 - 415.
- Roupe van der Voort J, Lindeman W, Folkertsma R, Hutten R, Overmars H, van der Vossen E, Jacobsen E, Bakker J. 1998. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to resistance gene cluster in potato. *Theor Appl Genet*, 96: 654 - 661.
- Smart C D, Fry W E. 2001. Invasions by the late blight pathogen: renewed sex and enhanced fitness. *Biol Invasions*, 3: 235 - 243.
- Trognitz F, Manosalva P, Gysin R, Niño-Liu D, Simon R, Herrera-Medel R, Trognitz B, Ghislain M, Nelson R. 2002. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × *diploid S. tuberosum* hybrids. *Mol Plant Microbe Interact*, 15: 587 - 597.