

# 马铃薯种质资源晚疫病抗性鉴定与评价

娄树宝, 李庆全, 田国奎, 徐洪岩, 王海燕, 王立春, 盛万民

(黑龙江省农业科学院 克山分院/农业部马铃薯生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 克山 161606)

**摘要:**采用离体叶片法,利用马铃薯晚疫病菌混合菌株对 49 个马铃薯品种和 13 份马铃薯野生种质资源及其后代进行晚疫病抗性鉴定。结果表明:49 个马铃薯品种中,7 个品种表现抗病反应,11 个品种表现中抗;13 份野生资源材料中,2 份材料表现抗病,1 份材料表现中抗。说明马铃薯栽培品种中抗病品种极少,而野生资源中具有抗性的也很少。

**关键词:**马铃薯;晚疫病;抗性;鉴定;评价

**中图分类号:**S532.034

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)12-0011-03

马铃薯是世界第四大粮食作物,是粮菜兼用经济效益较高的作物,我国是世界上马铃薯种植面积最大的国家。由致病疫霉(*Phytophthora infestans* de Bary)引起的马铃薯晚疫病是所有引起粮食作物产量损失的病害中最严重的一种真菌病害<sup>[1-2]</sup>,被视为世界第一大作物病害。马铃薯晚疫病可以通过有性生殖进行基因重组产生新的致病类型,新的致病类型可以通过无性生殖蔓延扩大;并且晚疫病菌的孢子和孢子囊可以通过水流和气流传播,使晚疫病菌的基因型越来越多,所以经常导致生产上本来抗晚疫病的品种抗性下降或丧失。因此,晚疫病菌被认为是进化潜力最高、风险最大、最易克服单个或少数几个抗病基因的病原菌之一<sup>[3]</sup>。因此,如何鉴定并引进抗晚疫病的马铃薯种质资源就成为育种工作者急需解决的问题。

现采用离体叶片法<sup>[4]</sup>对部分马铃薯栽培品种和马铃薯野生种进行室内晚疫病菌混合生理小种接种鉴定,评价这批材料对混合生理小种接种后的抗性表现,以期从中筛选出抗晚疫病的优良亲本,为马铃薯抗晚疫病育种工作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试马铃薯材料及来源 供试马铃薯品

种:克新 1 号、克新 2 号、克新 4 号、克新 6 号、克新 13、克新 14、克新 16、克新 18、克新 19、克新 20、克新 21、克新 22、中薯 1 号、中薯 4 号、中薯 5 号、中薯 6 号、陇薯 6 号、郑薯 5 号、青薯 9 号、坝薯 7 号、延薯 3 号、早大白、新大坪、波 S、波 C、波 BR、七百万、米拉、川疫、肯德、男爵、波友二号、大西洋、维道克、扎列娃、292-20、Ресурсы、Aquila、Sebago、Kennebec、Pepo416、Norland、Superior、Bintje、Anemone、Shepody、Katahdin、гибрид MB-168、DY4-5-10 共 49 个品种。13 份马铃薯野生资源及其后代:*Solanum microdontum*-12-3(*S. microdontum*)、*Solanum etuberosum*-12-5(*S. etuberosum*)、*Solanum stenotomum*-12-1(*S. stenotomum*)、*Solanum demissum*-12-2(*S. demissum*)、*Solanum jamesii*-12-10(*S. jamesii*)、*Solanum chacoense*-12-8(*S. chacoense*)、*Solanum stoloniferum*-12-14(*S. stoloniferum*)、*Solanum microdontum*×*Solanum chacoense*-12-5(*S. microdontum*×*S. chacoense*)、*Solanum stoloniferum*×*Solanum jamesii*-12-3(*S. stoloniferum*×*S. jamesii*)、*Solanum stoloniferum*×*Solanum chacoense*-12-7(*S. stoloniferum*×*S. chacoense*)、*Solanum acaule*×*Solanum stenotomum*-12-8(*S. acaule*×*S. stenotomum*)、*Solanum acaule*×*Solanum chacoense*-12-11(*S. acaule*×*S. chacoense*)、*Solanum stoloniferum*×*Solanum stenotomum*-12-6(*S. stoloniferum*×*S. stenotomum*)。这些资源来源于黑龙江省农业科学院克山分院。

1.1.2 供试菌株 供试菌株共 13 个马铃薯晚疫病菌株,分别为 KS11-5、KS11-12、KS11-21、

收稿日期:2012-10-16

基金项目:国家农业部马铃薯产业技术体系资助项目(nycyb-x-15);黑龙江省农业科学院青年基金资助项目

第一作者简介:娄树宝(1980-),男,黑龙江省伊春市人,在读博士,助理研究员,从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:loushubao@163.com。

通讯作者:盛万民(1967-),男,黑龙江省巴彦县人,博士,研究员,从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:shengwanmin@163.com。

KS11-22、KS11-23、KS11-26、KS11-32、KS11-34、KS11-36、KS11-41、KS11-49、KS11-52、KS11-54,均采自黑龙江省各马铃薯主产区,13 个菌株分属于 4 个生理小种:1. 2. 3. 4. 6. 7. 8. 11、1. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 11、3. 4. 5. 6. 7. 8. 11 和 3. 4. 6. 7. 8. 11。

## 1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备 将晚疫病菌在 18℃ 黑暗培养 10~15 d,用无菌水冲洗,过滤除去菌丝,将收集到的孢子囊置于 4℃ 的冰箱内 2~3 h,以刺激游动孢子的释放,将浓度调为  $1 \times 10^5$  个 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,待用。

1.2.2 接种方法 取生长 56 d 左右同一叶位的马铃薯叶片,背面朝上放在铺有无菌湿润滤纸的培养皿中,用 1.2.1 配制好的游动孢子悬浮液接种,每个叶片背面接种 20  $\mu$ L 孢子悬浮液,每个马铃薯品种接种 4 片叶,重复 3 次,置于 18~20℃ 保湿培养(每天 16 h 光照,8 h 黑暗)。接种 6 d 后调查,观察叶片背面有无病斑、有无孢子囊以及有无霉层,计算病斑面积占叶片总面积的百分比,根据马铃薯离体叶片的晚疫病抗性鉴定标准<sup>[5]</sup>(见表 1)对鉴定的材料进行分级和统计分析。

表 1 马铃薯离体叶片的晚疫病抗性鉴定标准

Table 1 Appraisal criteria for resistance to *Phytophthora infestans* in potato leaves *in vitro*

抗性类型 Resistant type	病级 Grade of disease	发病程度 Disease degree
高抗 HR	1	病斑面积小于 3% 或无症状
抗病 R	2	病斑面积在 3%~10%,形成过敏性枯死斑,周围无褪绿晕圈
中抗 MR	3	病斑面积在 10%~30%,病斑水浸状且周围有褪绿晕圈,病斑表面可见到白色菌丝体。
感病 S	4	病斑面积在 30%~60%,病斑周围有明显的褪绿圈,并有明显的白色霉层。
高感 HS	5	病斑面积大于 60%,病斑表面有大量的白色霉状物出现。

## 2 结果与分析

通过室内离体叶片法对 49 个马铃薯品种和 13 份野生资源进行抗病性鉴定(见表 2),结果表

明,49 个马铃薯品种中没有发现高抗品种,7 个品种表现抗病,仅出现过敏性坏死病斑;11 个品种表现中抗,病斑较小并可见白色菌丝体;18 个品种表现感病,叶片病斑面积较大并有明显白色霉层;13 个品种表现高感,病斑表面有大量的白色霉状物出现,表现抗病、中抗、感病和高感的品种分别占 14.3%、22.4%、36.7%、26.6%;13 份野生资源中有 2 份表现抗病,1 份表现中抗,1 份表现感病,9 份材料表现高感,其中抗病材料仅占 15.4%。说明目前生产上应用的马铃薯品种中大多数都是感病品种,抗病品种较少,进一步说明现有抗病品种抗性结构基因单一,容易被新的致病力更强的生理小种所克服,造成抗病品种抗性下降或丧失。

## 3 结论与讨论

马铃薯不同品种的抗性鉴定工作已有很多报道,但报道的结果却不尽相同。该试验抗性鉴定结果表明,早大白、大西洋和克新 1 号均为高感品种,与姚裕琪等人<sup>[6]</sup>的结果一致,它们的病斑面积大于 60%。与娜仁<sup>[5]</sup>等的抗性鉴定结果不一致,原因可能是离体叶片接种所使用的菌株致病力不同所导致。试验中使用包含了能克服 9 个抗晚疫病主效基因的混合生理小种接种,并且菌株采自黑龙江省各马铃薯主产区,能充分反映出该品种在该地区的抗性表现。

马铃薯晚疫病是马铃薯生产中最严重的病害,由于晚疫病菌具有很强的变异能力,品种的抗性容易被田间不断出现的新的生理小种所克服,使晚疫病的抗性育种工作一直没有大的突破<sup>[7]</sup>。防治马铃薯晚疫病最经济有效的方法就是采用抗病品种,但是现有品种中抗性资源较少,培育抗病品种需要优良的抗病亲本,而现有的品种资源的遗传背景非常狭窄,亲缘关系近,作为亲本利用时,后代变异幅度小,处于近交水平状态,难以育成有突破性的抗晚疫病品种。而在许多马铃薯野生种中拥有丰富的抗晚疫病资源,所以对野生种的抗源筛选就成为马铃薯抗性育种工作的重中之重。该研究鉴定出 2 份抗病野生种资源,为晚疫病抗性育种打下基础,这些马铃薯晚疫病抗病资源的发现对于新的晚疫病抗性基因的发掘和培育具有广谱抗性的马铃薯品种具有重要的意义。

表 2 马铃薯种质资源抗性鉴定结果

Table 2 Resistant results of potato germplasm resources

序号 No.	名称 Name	病斑面积 Disease spots area	抗性类型 Resistant type	病级 Grade of disease	序号 No.	名称 Name	病斑面积 Disease spots area	抗性类型 Resistant type	病级 Grade of disease
1	扎列娃	3.0	R	2	32	<i>S. stoloniferum</i>	49.1	S	4
2	延薯 3 号	3.2	R	2	33	波 BR	54.4	S	4
3	克新 20	3.4	R	2	34	坝薯 7 号	56.5	S	4
4	<i>S. etuberosum</i>	4.0	R	2	35	郑薯 5 号	57.1	S	4
5	维道克	4.1	R	2	36	Superior	57.1	S	4
6	<i>S. stenotusum</i>	5.6	R	2	37	克新 6 号	57.3	S	4
7	克新 21	7.1	R	2	38	Norland	58.6	S	4
8	克新 16	8.5	R	2	39	Kennebec	58.9	S	4
9	克新 19	9.1	R	2	40	Anemone	60.0	S	4
10	<i>S. demissum</i>	11.3	MR	3	41	292-20	62.3	HS	5
11	克新 14	13.3	MR	3	42	克新 1 号	64.1	HS	5
12	波 S	13.4	MR	3	43	男爵	66.1	HS	5
13	肯德	14.6	MR	3	44	中薯 1 号	67.0	HS	5
14	中薯 6 号	17.5	MR	3	45	DY4-5-10	67.2	HS	5
15	新大坪	18.7	MR	3	46	<i>S. stoloniferum</i> × <i>S. jamesii</i>	68.8	HS	5
16	陇薯 6 号	20.9	MR	3	47	中薯 4 号	71.8	HS	5
17	波 C	23.5	MR	3	48	早大白	72.8	HS	5
18	克新 18	24.5	MR	3	49	Bintje	73.3	HS	5
19	川疫	25.2	MR	3	50	大西洋	75.3	HS	5
20	中薯 5 号	27.1	MR	3	51	<i>S. stoloniferum</i> × <i>S. chacoense</i>	75.7	HS	5
21	克新 13	28.1	MR	3	52	<i>S. stoloniferum</i> × <i>S. stenotusum</i>	76.9	HS	5
22	Pecypc	31.3	S	4	53	克新 4 号	79.4	HS	5
23	青薯 9 号	32.1	S	4	54	гибрид MB-168	80.3	HS	5
24	Sebago	36.1	S	4	55	Shepody	83.1	HS	5
25	克新 22	36.4	S	4	56	<i>S. acaule</i> × <i>S. chacoense</i>	84.6	HS	5
26	Aquila	42.6	S	4	57	<i>S. acaule</i> × <i>S. stenotusum</i>	85.0	HS	5
27	波友二号	44.9	S	4	58	<i>S. microdontum</i> × <i>S. chacoense</i>	86.6	HS	5
28	Pepo 416	46.1	S	4	59	克新 2 号	87.7	HS	5
29	七百万	46.1	S	4	60	<i>S. microdontum</i>	88.2	HS	5
30	Katahdin	46.3	S	4	61	<i>S. chacoense</i>	90.7	HS	5
31	米拉	46.7	S	4	62	<i>S. jamesii</i>	92.9	HS	5

参考文献:

[1] 王军,宋伯符.晚疫病研究的最新进展和策略[C]//中国马铃薯学术研讨论文集.哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1996:210-215.

[2] Hooker W. Compendium of potato diseases[M]. Minnesota: American Phytopathology Society,1981:40-41.

[3] Mc Donald B A,Linde C. Pathogen population genetics,evo-lutionary potential and durable resistance[J]. Annu Rev Phytopathol,2002,40:349-379.

[4] Swiezynski K M,Sieczka M T,Sujkowski L S,et al. Resist-ance to *Phytophthora infestans* in potato genotypes origina-ting from wild species[J]. Plant Breeding,1991,107:28-38.

## *TvNHX1* 基因对矮牵牛的遗传转化

崔继哲, 乔 磊, 弭晓菊, 付寅生, 李 想, 杨 慧

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘要:**为获得耐盐碱特性的矮牵牛新种质,提高其在广大盐碱地区的适应性,以矮牵牛品种梦幻兰和利宝紫为试材,简要介绍了 *TvNHX1* 基因的植物表达载体构建及用农杆菌介导法将 *TvNHX1* 基因转化矮牵牛的初步结果,并分析了 6-BA 和 NAA 组合对矮牵牛叶片分化的影响。结果表明:对 PCR 筛选得到的阳性菌落摇菌、提取质粒后进行 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切鉴定,在 1 640 bp 左右得到了单一条带,与预期一致。证明 pBI121-*TvNHX1* 构建成功;在不同浓度激素组合的培养基中,梦幻兰的分化率都高于利宝紫,梦幻兰品种在 6-BA 为 2.0 mg·L<sup>-1</sup>、NAA 为 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 时分化率达 90.69%;以梦幻兰品种的叶片为外植体诱导生根,得到 12 株在筛选培养基上正常生根的矮牵牛苗,以 *TvNHX1* 基因特异引物 WFF 和 JWR1 对获得的 Kan 抗性植株和非转基因对照进行 PCR 检测,12 个抗性植株中 7 株扩增出特异的条带,说明 *TvNHX1* 基因已转入矮牵牛。

**关键词:**矮牵牛; *TvNHX1* 基因;遗传转化

**中图分类号:**S681.6

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)12-0014-05

土壤盐碱化是园林绿化中极为严重的问题之一,培育耐盐碱性强的园林植物新品种,对生态脆弱、园林绿化基础薄弱地区的生态环境建设具有

重要的意义。已有的研究表明,Na<sup>+</sup>通过 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运在液泡中积累是植物耐盐性的一种重要机制,转 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因能够显著提高植物的耐盐性<sup>[1]</sup>,从盐生植物碱菀中克隆得到的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因 *TvNHX1* 在拟南芥中的表达显示了该基因对盐碱的耐性<sup>[2]</sup>,许多相关研究表明,Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因在植物耐盐碱基因工程中具有良好的应用前景<sup>[3-5]</sup>。

收稿日期:2012-11-07

基金项目:黑龙江省教育厅科技研究资助项目(11551144)

第一作者简介:崔继哲(1962-),女,黑龙江省饶河县人,博士,教授,从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail:shiccl@sina.com。

[5] 娜仁,张笑宇,张之为,等. 马铃薯不同品种(系)对晚疫病抗性鉴定[J]. 作物杂志,2010(4):59-62.

[6] 姚裕琪,巩秀峰,高奇华,等. 马铃薯晚疫病抗性鉴定及评

价[J]. 内蒙古农业科技,2001(2):8-9.

[7] 韩彦卿. 马铃薯种质资源对晚疫病菌的抗性评价及致病疫霉 SSR 引物的开发[D]. 保定:河北农业大学,2010:40.

## Identification and Evaluation of Germplasm for Resistance to Potato Late Blight

LOU Shu-bao, LI Qing-quan, TIAN Guo-kui, XU Hong-yan, WANG Hai-yan, WANG Li-chun, SHENG Wan-min

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Potato, Ministry of Agriculture, Keshan, Heilongjiang 161606)

**Abstract:**Forty nine cultivars of potato and thirteen wild germplasm and their progeny were evaluated the resistance to potato late blight by detached leaf assay with physiological race mixed. The results showed that in fortynine potato cultivars, seven cultivars showed resistance and eleven showed moderate resistance to *Phytophthora infestans*; in thirteen wild germplasm resource, two indicated resistance and one indicated moderate resistance to *Phytophthora infestans*. The results indicated that there were a few moderate resistant potato cultivars, and a few resistant materials in wild resource.

**Key words:** potato; late blight; resistance; identification; evaluation

(该文作者还有牛志敏和李凤云,单位同第一作者)