



娄树宝,李风云,田国奎,等.马铃薯杂种后代性状评价及 SSR 指纹分析[J].黑龙江农业科学,2021(2):13-16,22.

# 马铃薯杂种后代性状评价及 SSR 指纹分析

娄树宝<sup>1,2</sup>,李风云<sup>1,2</sup>,田国奎<sup>1,2</sup>,王海艳<sup>1,2</sup>,王立春<sup>1,2</sup>,王 辉<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 克山分院,黑龙江 齐齐哈尔 161005;2. 农业农村部马铃薯生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 齐齐哈尔 161005)

**摘要:**为了选育抗晚疫病、高产、优质的马铃薯新品种,本试验以 CIP 引进晚疫病抗性强的材料 388676.1 为母本,以克新 23 为父本进行杂交,获得杂种 F<sub>1</sub> 群体,并利用 SSR 分子标记技术对优良株系进行 DNA 鉴定。结果表明:结合植株形态、单株产量、淀粉含量等农艺性状进行评价,选育出综合性状优异的品系 7 和品系 8。利用筛选出的 2 对 SSR 特异性引物,对 9 个品系及其亲本的基因组 DNA 进行扩增,建立了新品系的 SSR 指纹图谱,可进一步促进马铃薯品种快速鉴定。

**关键词:**马铃薯;杂种后代;SSR 指纹

马铃薯已超过玉米成为继水稻、小麦之后的世界第三大粮食作物,中国马铃薯的总产量和种植面积均居世界第一位<sup>[1-2]</sup>。黑龙江省是我国重要的种薯和商品薯生产基地之一,但近年来由于马铃薯连作和气候影响,马铃薯晚疫病和疮痂病较重,导致产量和品质低下,亟需培育抗病性强、适应性广的马铃薯优良品种。

以往马铃薯杂交后代真实性鉴定多采用田间植物学形态观察和农艺性状测定相结合的方法,其不足之处是鉴定周期长、工作量大、易受环境条件影响<sup>[3]</sup>。SSR 分子标记具有重复性好、多态性丰富、稳定性高等优点,已广泛应用于植物的基因定位、分子遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析、品种鉴定及分子标记辅助育种等方面<sup>[4-7]</sup>。

为了选育高产、优质、抗病性强的马铃薯新品种,根据亲本互补和遗传背景差异大的选配原则,本试验用引自国际马铃薯中心的广谱抗病性强的四倍体材料 CIP388676.1 为母本,国内育成的产量高、品质好、薯形好的马铃薯品种克新 23 为父本,配制杂交组合,获得 F<sub>1</sub> 群体,利用 SSR 分子标记技术对优良株系进行 DNA 指纹鉴定,为下一步马铃薯新品种的育成及其鉴定提供分子依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为 CIP388676.1 × 克新 23 杂交组

合中选育出的 9 个优异品系及其双亲,由黑龙江省农业科学院克山分院马铃薯育种所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 试验设计** 试验采用随机区组设计,3 次重复,于 2019 年 5 月 4 日播种在黑龙江省农业科学院克山分院试验地进行,双行区,行长 6 m,株距 0.3 m,垄距 0.8 m,每个品系种植 40 株。试验区选择地势平坦,土质疏松,排水良好的地块,施肥及田间管理采用当地大田管理方式。

**1.2.2 调查项目及方法** 调查记录各品系的全生育期天数。在盛花期,每小区随机取 10 株,调查各品系的株高、主茎数、晚疫病抗性性状指标。生育期:马铃薯从出苗到成熟的天数。株高:生长期马铃薯从土壤表面到主茎顶端的高度。主茎数:种薯芽眼或直接从地下长出形成茎的数量。

收获时调查记录各品系薯块的表型特征,包括薯块皮色、薯块肉色、薯形、芽眼深浅、淀粉含量。收获时每小区随机取 10 株进行单株测产。统计各单株的结薯数,并记录大中薯、小薯的重量及数量,其判定标准<sup>[8]</sup>为:大中薯 > 150 g、75 g ≤ 中薯 ≤ 150 g 小薯 < 75 g,商品薯率为单株大中薯数量占单株结薯总数的百分率,商品薯率(%) = (单株大中薯数/单株结薯数) × 100。测定时除去小区内腐烂的马铃薯块茎。块茎淀粉含量采用水比重法测定。

**1.2.3 基因组 DNA 提取与检测** 在苗期,随机取 9 个马铃薯品系及其亲本的幼嫩叶片约 1 g,采用 CTAB 法提取基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶

收稿日期:2020-11-21

基金项目:黑龙江省农业科学院青年基金(2019YYF017)。

第一作者:娄树宝(1981—),男,硕士,助理研究员,从事马铃薯遗传育种研究。E-mail: loushubao@163.com。

电泳检测 DNA 纯度,保存于-20 ℃冰箱中备用。

1.2.4 SSR 分析 SSR 反应体系和程序参照李建武的方法<sup>[9]</sup>。PCR 反应程序为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min,随后冷却到 4 ℃。PCR 扩增产物用 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,对各引物扩增出的 SSR 等位基因多态性条带和总条带数进行统计。PCR 引物来源是从 NCBI 网站上公布的马铃薯 SSR 特异性引物中选取的,引物来源详见参考文献[9-10],委托上海生工生物工程有限公司合成。

2 结果与分析

2.1 植株田间性状与块茎性状

由表 1 可知,9 个品系植株株高为 60.1~70.9 cm,介于父本和母本之间,株高最高的是品系 1,为 70.9 cm,株高最矮的是品系 6,为 60.1 cm。植株主茎数为 5.2~7.8 个,介于父本和母本之间,主茎数最多的是品系 8,为 7.8 个,主茎数最少的是品系 3,为 5.2 个。抗病性方面,表现抗病的有 6 个品系,表现感病的有 3 个品系。9 个品系生育期在 76~89 d,4 个品系生育期接近父本克新 23,5 个品系生育期接近母本 CIP388676.1。

表 1 田间性状调查

品种(系)名称	株高/cm	主茎数/个	晚疫病抗性	生育期/d
品系 1	70.9	5.6	感病	78
品系 2	68.7	6.0	高抗	87
品系 3	60.5	5.2	感病	77
品系 4	66.6	5.3	抗病	79
品系 5	65.1	5.3	感病	76
品系 6	60.1	6.8	抗病	82
品系 7	62.5	7.0	高抗	85
品系 8	65.2	7.8	高抗	85
品系 9	63.3	7.0	高抗	89
CIP388676.1	73.4	7.2	高抗	86
克新 23	57.6	4.1	感病	77

在块茎性状方面,品系 8 为长椭圆形,品系 4 和品系 7 为圆形,其余 6 个为椭圆形;品系 1 的薯皮颜色为浅红皮,品系 9 为黄皮,品系 3 和品系 8 为紫皮,其余 5 个为浅黄皮;薯肉颜色有 3 个品系是黄肉,6 个品系是浅黄肉。品系 3 和品系 8 与母本薯皮类型一致均为光滑,其余品系与父本一致,薯皮类型均为略麻。品系 2、品系 6 和品系 9 芽眼深度居中,其余品系芽眼浅。各品系结薯集中、块茎整齐。

表 2 块茎性状调查

品种(系)名称	薯形	皮色	肉色	薯皮类型	芽眼深浅	结薯集中性	块茎整齐度
品系 1	椭圆	浅红	黄	略麻	浅	集中	整齐
品系 2	椭圆	浅黄	浅黄	略麻	中	集中	整齐
品系 3	椭圆	紫	浅黄	光滑	浅	集中	整齐
品系 4	圆	浅黄	黄	略麻	浅	集中	整齐
品系 5	椭圆	浅黄	浅黄	略麻	浅	集中	整齐
品系 6	椭圆	浅黄	浅黄	略麻	中	集中	整齐
品系 7	圆	浅黄	浅黄	略麻	浅	集中	整齐
品系 8	长椭圆	紫	浅黄	光滑	浅	集中	整齐
品系 9	椭圆	黄	黄	略麻	中	集中	整齐
CIP388676.1	椭圆	紫	黄	光滑	中	集中	中等
克新 23	椭圆	浅红	黄	略麻	浅	集中	整齐

2.2 产量性状及淀粉含量

参试 9 个品系的产量性状详见表 3,单株结薯数为 6.5~8.5 个,品系 8 最多,为 8.5 个,品系 7 次之,为 7.8 个,均高于母本 CIP388676.1 单株结薯数;单株薯重为 0.93~1.34 kg,品系 8 最高,

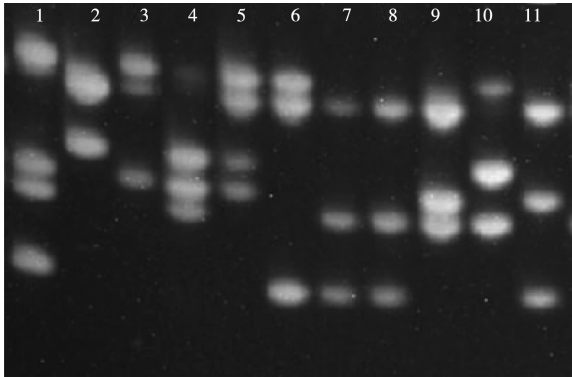
为 1.34 kg,品系 7 略低,为 1.32 kg;单薯重是品系 7 最高,为 169.23 g,接近父本克新 23 的 180.65 g;品系 7 的商品薯率最高,为 86.2%,淀粉含量也是最高,为 14.49%,均高于父母本。综合来看,品系 7 表现最好,品系 8 次之。

表 3 产量及品质性状调查

品种(系)名称	单株结薯数/个	单株薯重/kg	单薯重/g	商品薯率/%	淀粉含量/%	产量/(kg·667 m <sup>2</sup> )
品系 1	6.9	0.97	140.58	79.1	10.09	2695.6 bcd
品系 2	7.3	1.05	143.84	80.7	13.6	2918.0 abc
品系 3	6.7	0.93	138.81	78.1	11.99	2584.5 cd
品系 4	6.5	0.97	149.23	82.2	12.61	2695.6 bcd
品系 5	6.8	0.94	138.24	77.7	12.12	2612.3 bcd
品系 6	8.4	1.30	154.76	82.3	13.02	3612.7 a
品系 7	7.8	1.32	169.23	86.2	14.49	3668.3 a
品系 8	8.5	1.34	157.65	80.3	12.06	3723.9 a
品系 9	7.2	1.10	152.78	84.1	13.13	3056.9 abc
CIP388676.1	7.6	0.88	115.79	76.3	11.27	2445.5 cd
克新 23	6.2	1.12	180.65	85.6	13.54	3112.5 ab

2.3 SSR 指纹分析

2.3.1 供试材料 DNA 质量检测 如图 1 所示, 9 个品系及其亲本的基因组 DNA 纯度检测结果的电泳条带清晰, 无拖尾、降解现象, 说明 DNA 质量好, 能够满足 SSR 标记对 DNA 纯度的要求。



M:DL2000;泳道 1:CIP388676.1;泳道 2:克新 23;泳道3~11: 品系 1~9

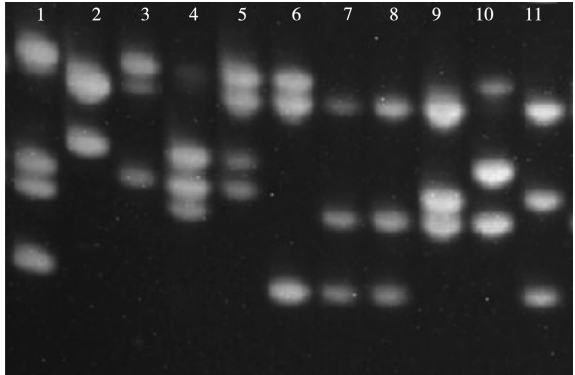
图 1 各品系及亲本基因组 DNA 纯度检测

2.3.2 各品系及亲本 SSR 扩增结果 利用 20 对 SSR 引物中筛选出的 2 对引物 STG0020 和 STM1105,对 9 个品系及其亲本的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果显示,2 对引物共扩增出 12 个清晰的 SSR 条带,其中多态性条带 11 个,多态性比率为 91.7%(表 4),说明 9 个品系和亲本间的遗传多态性比较丰富。

表 4 9 个品系及亲本的 SSR 扩增结果

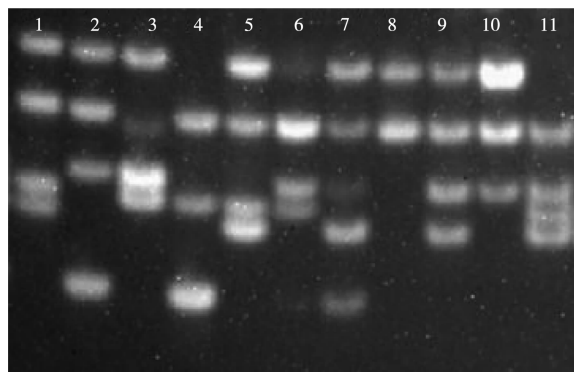
引物名称	扩增总条带数	多态性条带数	多态性比率/%
STG0020	6	6	100.0
STM1105	6	5	83.3

由图 2 的 SSR 指纹图谱可知,引物 STG0020 可以鉴定出 8 个品系及其亲本,品系 5 和品系 6 不能区分出来,再结合引物 STM1105 的指纹图谱就可以鉴定出 9 个品系及其亲本;图 3 中引物 STM1105 可以鉴定出 8 个品系及其亲本,品系 1 和品系 4 不能区分出来,再结合引物 STG0020 的指纹图谱就可以鉴定出 9 个品系及其亲本,表明 2 对引物可以从 DNA 水平揭示出各品系的遗传差异。



泳道 1: CIP388676.1; 泳道 2: 克新 23; 泳道 3~11: 品系 1~9

图 2 引物 STG0020 扩增的 SSR 指纹图谱



泳道 1: CIP388676.1; 泳道 2: 克新 23; 泳道 3~11: 品系 1~9

图 3 引物 STM1105 扩增的 SSR 指纹图谱

### 3 结论与讨论

目前,马铃薯育种还是以品种间杂交为主,所以亲本的选择至关重要,既要求亲本具有优异的目标性状,又要求亲本间遗传基础差异大<sup>[11]</sup>。CIP388676.1 是从国际马铃薯中心引入的抗晚疫病材料,田间具有广谱抗性,与克新 23 遗传差异较大,配制杂交组合,希望提高杂交后代的晚疫病抗性,但是 CIP388676.1 也存在晚熟,主茎数多,单株结薯数多等特点需要改良。王丹等<sup>[12]</sup>研究发现单株结薯数和单株薯重直接影响块茎产量,而株高、主茎数对块茎产量也有间接影响。所以应该继续筛选单株产量高而块茎数相对少的材料,以打破块茎数与产量性状间的不利连锁,获得产量高、块茎数少的无性系材料。

SSR 分子标记技术可以在 DNA 水平鉴定作物品种<sup>[13]</sup>,具有检测方便快捷等优点,已获得广泛应用<sup>[5,14]</sup>。本研究筛选出 2 对 SSR 特异引物 STG0020 和 STM1105,PCR 扩增建立了 9 个品系及其亲本的 SSR 指纹图谱,可以完全将杂种后代与亲本区分开来。因此认为 SSR 技术鉴定马铃薯品种(系)是可靠的,对于杂交育种中优良亲本组合的选配及品种登记具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 刘杰. 马铃薯种质资源的晚疫病抗性评价及转录组分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [2] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展[J]. 华中农业大学学报(社会科学版), 2012, 97(1): 1-4.
- [3] 张自强, 于肖夏, 鞠天华, 等. 2 个马铃薯杂交组合 F<sub>1</sub> 的 SSR 鉴定[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(11): 1411-1415.
- [4] Ahmad R, Potter D, Southwick S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(2): 204-210.
- [5] Rocha E A, Paiva L V, Carvalho H H, et al. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers[J]. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2010, 10(3): 204-210.
- [6] 赵鹏, Wosete K E, 程飞, 等. 美国黑核桃 SSR 反应体系优化[J]. 植物研究, 2012, 32(2): 213-221.
- [7] 于卓, 谢锐, 于肖夏, 等. 低氢氰酸含量高丹草新品系及其亲本的 SSR 分析[J]. 草业学报, 2014, 23(1): 223-228.
- [8] 张永成, 田丰. 马铃薯试验研究方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007.
- [9] 马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) 块茎淀粉含量及植株熟性性状的 QTL 定位与遗传分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [10] 张自强, 于肖夏, 鞠天华, 等. 3 个马铃薯杂种优良株系的核型及 SSR 分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 318-324.
- [11] 叶中悦. 基于 SSR 标记的马铃薯种质资源遗传评价体系的建立及遗传多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [12] 王丹. 专用型马铃薯优良新品系选育研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [13] 颜谦, 滕安平, 李恩宏, 等. 贵州马铃薯推广品种 SSR 分子标记及遗传多样性分析[J]. 西南农业学报, 2016, 29(10): 2294-2299.
- [14] 刘文林, 张举梅, 盛万民, 等. 52 份俄罗斯引进马铃薯种质资源的遗传多样性与分子身份证构建[J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 251-258.

## Evaluations on Traits and SSR Fingerprint Analysis of Potato Hybrid Progenies

LOU Shu-bao<sup>1,2</sup>, LI Feng-yun<sup>1,2</sup>, TIAN Guo-kui<sup>1,2</sup>, WANG Hai-yan<sup>1,2</sup>, WANG Li-chun<sup>1,2</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>

(1. Keshan Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005, China; 2. Key Laboratory of Potato Biology and Genetics, Ministry of Agriculture, Qiqihar 161005, China)

(下转第 22 页)

- 28-32.
- [12] 解晓冬,耿雅萍,张鹏飞,等. 8 种易裂果实中果胶酶生物信息学分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2020,40(2):42-53.
- [13] Kubicek C P,Starr T L,Glass N L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi[J]. Annual Review of Phytopathology, 2014, 52: 427-451.
- [14] Markovic O,Janecek S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities, and evolution [J]. Protein Engineering, 2001, 14: 615-31.
- [15] Evangelista D E,Evandro A de Araújo, Neto M O, et al. Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of an exo-polygalacturonase from *Bacillus licheniformis*[J]. New Biotechnology,2017,40:268-274. .
- [16] Markovic O,Janecek S. Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships[J]. Carbohydrate Research,2004,339: 2281-2295.
- [17] Jolie R P,Duvetter T,Loey A M V, et al. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review[J]. Carbohydrate Research,2010,345(18): 2583-2595.
- [18] Vitali J,Schick B,Kester H C M, et al. The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution[J]. Plant Physiology,1998,116(1): 69-80.
- [19] Ke X,Wang H,Li Y, et al. Genome-wide identification and analysis of polygalacturonase genes in *Solanum lycopersicum* [J]. International Journal of Molecular Sciences,2018,19(8):2290.

## Bioinformatics Analysis of Pectinase in *Botrytis cinerea* Genome

LI Pei-qian, YANG Jin, FENG Bao-zhen

(Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China)

**Abstract:** In order to control the gray mold effectively, the distribution, physical and chemical properties, and tertiary structure of pectinase in *Botrytis cinerea* genome were analyzed by bioinformatics in this study. The results showed that there were 6 PG, 4 PME and 4 PEL in *B. cinerea* genome. PG sequences were 370-514 aa in length with 16-21 aa signal peptides and abundant phosphorylation sites. PME sequences were 327-348 aa in length with 18-23 aa signal peptides and many phosphorylation sites, but no N-glycation sites. While PEL protein sequences were 236-353 aa in length, with 17-20 aa signal peptides, and abundant in O-glycations sites and phosphorylation sites. Conservative regions existed three kinds of pectinase amino acid sequence respectively. Tertiary structure prediction results showed that similar domain structure presented in the same family. Evolutionary analysis indicated that pectinases were conserved in *B. cinerea* genome.

**Keywords:** grey mold; polygalacturonase; pectin methylesterase; pectin lyase; genome

(上接第 16 页)

**Abstract:** In order to breed new potato varieties with high resistance to late blight, high yield and high quality, the potato material CIP388676.1 with strong late blight resistance was used as female parent, and the variety Kexin 23 was used as male parent, we obtained hybrids  $F_1$  by crossing, and the SSR molecular marker technology was used to identify the  $F_1$  superior individuals. The results showed that combined with evaluation of agronomic traits including plant morphology, tuber yield and starch content, we finally selected two strains with excellent comprehensive traits. The SSR fingerprint of nine potato strains and their parents was established by using two SSR special primers to amplify genome DNA. The research results could promote rapid identification of potato.

**Keywords:** potato; hybrid progeny; SSR fingerprint