

马铃薯晚疫病抗性基因分子标记检测及抗性评价

刘 勋¹, 郑克邪¹, 张 娇¹, 徐 茜², 张蜀敏³, 赵 勇¹, 沈昱辰¹, 谢德斌¹,
唐道彬¹, 吕长文¹, 张 凯¹, 任茂智³, 王季春¹

(¹西南大学农学与生物科技学院 / 薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室, 重庆 400715;

²重庆三峡农业科学院, 重庆 404155; ³重庆大学生命科学学院, 重庆 405200)

摘要: 马铃薯是重庆优势特色作物之一, 但其安全生产受到晚疫病的严重威胁。马铃薯生产中种植抗病品种是防控马铃薯晚疫病最为经济有效和环境友好的途径。为了了解来自国内外不同种质的晚疫病抗性基因组成以及确定在重庆市具有晚疫病抗性的马铃薯品种(系), 本研究以 218 份来自国内外的品种(系)为材料, 进行了 6 个晚疫病抗性(*R*)基因分子标记检测, 同时进行了田间晚疫病抗性评价及室内接种鉴定和筛选。研究结果显示, 6 个 *R* 基因的分子标记在供试材料中均有分布, 但分子标记的组成不尽相同, 主要分为 4 大类。第 I 类含有具有广谱抗性基因的 *RB*, 晚疫病抗性评价表现为中抗以上; 第 III 类缺失 *R2 family* 基因标记, 绝大部分表现为晚疫病敏感型; 第 II 类和第 IV 类中分别主要含有 3 个 *R* 基因 (*R2 Family + R3a+R3b*) 标记类型和 4 个 *R* 基因 (*R1+ R2 Family+R3a+R3b*) 标记类型, 这两类材料中表现出一定比例的晚疫病抗性水平, 但第 IV 类中出现抗性表现的比例高于第 II 类。结果说明含有 *RB* 基因标记贡献了较高的晚疫病抗性, 缺失 *R2 family* 基因标记的材料可能不利于晚疫病抗性, 利用这些基因标记辅助筛选有助于提高重庆地区晚疫病抗性育种效率。本研究评价了 218 份马铃薯材料 6 个重要 *R* 基因组成, 并筛选出重庆地区表现抗性的多个材料, 为新品种(系)的推广应用以及抗病育种选育提供了科学依据, 同时为发掘新的抗病基因提供了遗传资源。

关键词: 马铃薯; 晚疫病抗性; 分子标记; 评价

Molecular Marker Screening of Resistant Genes and Evaluation of Resistance to Late Blight from 218 Potato Genotypes

LIU Xun¹, ZHENG Ke-xie¹, ZHANG Jiao¹, XU Qian², ZHANG Shu-ming³, ZHAO Yong¹, SHEN Yu-chen¹,
XIE De-bin¹, TANG Dao-bin¹, LV Chang-wen¹, ZHANG Kai¹, REN Mao-zhi³, WANG Ji-chun¹

(¹College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University/Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding for Tuber and Root Crops in Chongqing, Chongqing 400715; ²Chongqing Three Gorges Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 404155; ³School of life sciences, Chongqing University, Chongqing 405200)

Abstract: Potato is an important crop in mountainous areas of China, such as Chongqing. Late blight (LB) caused by *Phytophthora infestans* has been a major threat to sustainable potato production in China. Growing disease-resistant varieties is the most economical, effective and environmentally friendly way to control LB in potato production. In order to understand the composition of resistance (*R*) genes to late blight from different germplasms and to obtain potato varieties (lines) with resistance to LB in Chongqing, screening of *R* genes using molecular marker linked to LB and evaluation of LB resistance upon natural and artificial inoculations

收稿日期: 2018-08-26 修回日期: 2018-09-05 网络出版日期: 2018-11-15

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181114.1344.002.html>

第一作者研究方向为马铃薯遗传育种与生物技术, E-mail: liuxun828@swu.edu.cn

通信作者: 刘勋, 研究方向为 马铃薯遗传育种与生物技术, E-mail: liuxun828@swu.edu.cn

王季春, 研究方向为薯类作物遗传育种和栽培推广, E-mail: wjchun@swu.edu.cn

基金项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2015shms-ztx80003, cstc2015shms-ztx80004); 国家自然科学基金 (31571728); 中央高校基本科研业务费 (XDJK2017B023, 2362015XK05)

Fundation project: The Technology Innovation Fund of Chongqing (cstc2015shms-ztx80003, cstc2015shms-ztx80004), the National Natural Science Foundation of China (31571728), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2017B023, 2362015XK05)

were carried out in 218 potato varieties (lines) from different regions. The results showed that six *R* genes were detected in the tested genotypes and the composition of the molecular markers could mainly be divided into four types, including Type I , which was characterized by the presence of a broad-spectrum resistance gene *RB*; Type III , which was characterized by the absence of *R2* family markers, most of which were susceptible to late blight; Type II and IV , which were characterized by three *R* genes (*R2 Family+R3a+R3b*) and four *R* genes (*R1+R2 Family+R3a+R3b*) marker types, respectively, which showed a certain proportion of LB resistance in these two types. The proportion of resistance in type IV was higher than that in type II . These results suggested that genotypes containing *RB* gene markers positively contributed to LB resistance. Screening of these gene markers will help to improve the breeding efficiency of LB resistance in Chongqing. By analyzing *R* genes compositions of and LB resistance tests in 218 potato genotypes, this study provided scientific basis for the future popularization and application of new varieties (lines) and resistance breeding in Chongqing , and also provided genetic resources for the discovery of new *R* genes.

Key words: potato; resistant gene; molecular marker; evaluation

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是世界第三大粮食作物和最重要的非禾本科食品作物。根据联合国粮食及农业组织 (FAO, 2018 年) 的数据, 截止到 2016 年, 全球有 160 多个国家和地区种植马铃薯, 中国的马铃薯种植面积和总产分别占世界种植面积和总产的 30%、26%, 在人们的日常生活和国民经济中占据了重要的地位。然而, 马铃薯生产一直受到病虫害和不利环境的威胁。其中最具危害性的是由致病疫霉引起晚疫病, 严重威胁着全球马铃薯的安全^[1]。

目前防控晚疫病以化学药剂为主, 但由于化学药剂的成本以及抗药性和环境安全等问题, 使用受到限制。马铃薯生产中种植抗病品种仍是防控马铃薯晚疫病最经济有效和环境友好的途径。然而, 目前生产上的主栽品种主要来源于国外有限数个品种和品系选育而成, 导致遗传背景相对狭窄, 抗病基因的数目和类型有限, 抗性频繁丧失, 限制了应用推广^[2]。由于不同地区晚疫病菌群结构差异以及菌群结构不断变化, 近年来高毒力甚至全毒力晚疫病菌株在多个地方发现, 并且其比例有逐年增加的趋势^[3-4], 导致选育的晚疫病抗性新品种的推广范围受到限制以及推广应用时间减少, 使我国马铃薯抗晚疫病育种任务越来越艰巨。

马铃薯作为重庆市优势特色作物之一, 常年种植面积达 36.67 万 hm^2 , 约占旱粮种植面积的 20%, 面积和产量都居全国第 6 位。马铃薯是重庆山区和库区区域不可替代的口粮, 俗有“半年粮”之称, 也是区域经济的支柱^[5]。重庆市马铃薯自主育种相对薄弱, 近年的主栽品种主要来源于早期国外引进的米拉和费乌瑞它及国内引进的鄂薯 5 号和青薯 9 号。然而这些品种抗性逐渐丧失, 晚疫病常年爆发,

严重影响重庆市山区和库区的粮食安全和经济发展, 制约了脱贫致富和乡村振兴的进程。引进的晚疫病抗性品种在重庆的适应性等问题还不明确, 筛选和选育具有适应重庆当地抗病的马铃薯新品种迫在眉睫。因此, 筛选高抗马铃薯晚疫病抗原, 发掘其抗病基因, 并应用于马铃薯晚疫病防控具有重要意义。

为了提高马铃薯栽培种的晚疫病抗性, 育种者最初采用传统育种途径把一些马铃薯野生种中含有小种特异抗病基因广泛地整合到马铃薯栽培种的基因池中。尤其是在 20 世纪 50-60 年代发现抗晚疫病的六倍体 *S. demissum* 中的 11 个主效 *R* 基因 (*R1~R11*) 通过杂交转移到马铃薯栽培种中, 育种者随后通过传统杂交育种途径把这 11 个 *R* 基因整合到栽培种中选育抗病的品种^[6]。因此, 现在大多数栽培品种中含有来自 *S. demissum* Lindl. 的抗病基因。尤其是 *R1*^[7]、*R2*^[8]、*R3a*^[9]、*R3b*^[10] 和 *R8*^[11-13] 相继被克隆, 并开发了相应的分子标记。另外, 来源于 *S. bulbocastanum* Dunal 具有晚疫病广谱抗性 *RB* 基因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^[14-15]。这些标记的使用有效地提高了晚疫病抗性育种效率^[16-18]。随着国内国际合作的不断加深, 我们引进了来源国内不同育种单位以及国际马铃薯中心 (CIP, International Potato Centre)、北美洲和欧洲等国外的资源材料。有效评价资源材料抗病性和分析其可能的抗病基因组成, 有益于指导抗病品种的使用和提高抗病育种效率。本研究对国内外引进和自育的 218 份马铃薯材料进行 6 个晚疫病抗性基因 (*R1*、*R2* family、*R3a*、*R3b*、*R8*、*RB*) 标记的分析, 同时进行田间自然发病评价和室内抗

病性鉴定,筛选高抗的材料,为新品种(系)的推广应用以及抗病育种提供科学依据,同时为发掘了新抗病基因提供遗传资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

供试材料为薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室(西南大学)和重庆三峡农业科学院近年来从国内外收集引进的218份马铃薯材料(表1)。每份材料分别播种于重庆三峡农业科学院梁平试验基

地(30° 40' 34" N, 107° 47' 52" E, 海拔750 m)和重庆市北碚区槽上试验基地(29° 40' 18" N, 106° 20' 30" E, 海拔575 m)进行田间晚疫病抗性评价。田间种植采用随机区组设计,3个重复,每个重复20株(大垄双行,垄距80 cm,株距40 cm),费乌瑞它作为晚疫病敏感对照,每5个品种(系)中增加1个费乌瑞它对照。同时,田间周围也种植费乌瑞它作为侵染源。另外,每份材料5个健康块茎分别盆栽于西南大学网室,用于DNA提取及叶片室内接种鉴定。

表1 218份供试马铃薯材料

Table 1 218 potato materials used in the study

序号 No.	材料名 Accession	来源 Origin	序号 No.	材料名 Accession	来源 Origin
1	中薯2号	中国农业科学院(中国北京)	27	下寨65	青海省互助县农业科学研究所 (中国青海)
2	中薯3号	中国农业科学院(中国北京)	28	青薯2号	青海省农林科学院(中国青海)
3	中薯5号	中国农业科学院(中国北京)	29	青薯9号	青海省农林科学院(中国青海)
4	中薯6号	中国农业科学院(中国北京)	30	陇薯2号	甘肃省农业科学院(中国甘肃)
5	中薯7号	中国农业科学院(中国北京)	31	陇薯6号	甘肃省农业科学院(中国甘肃)
6	中薯8号	中国农业科学院(中国北京)	32	陇薯7号	甘肃省农业科学院(中国甘肃)
7	中薯9号	中国农业科学院(中国北京)	33	黑美人	甘肃省农业科学院(中国甘肃)
8	中薯10号	中国农业科学院(中国北京)	34	黑金刚	甘肃省农业科学院(中国甘肃)
9	中薯16号	中国农业科学院(中国北京)	35	康932-1	安康市农业科学研究所(中国陕西)
10	中薯18号	中国农业科学院(中国北京)	36	康0102-5	安康市农业科学研究所(中国陕西)
11	中薯19号	中国农业科学院(中国北京)	37	康971-12	安康市农业科学研究所(中国陕西)
12	中薯20号	中国农业科学院(中国北京)	38	康932-2	安康市农业科学研究所(中国陕西)
13	中薯21号	中国农业科学院(中国北京)	39	宣薯2号	宣威市农业技术推广中心(中国云南)
14	中薯901	中国农业科学院(中国北京)	40	宣薯3号	宣威市农业技术推广中心(中国云南)
15	尤金	本溪市农业科学研究所(中国辽宁)	41	宣薯4号	宣威市农业技术推广中心(中国云南)
16	早大白	本溪市农业科学研究所(中国辽宁)	42	宣薯5号	宣威市农业技术推广中心(中国云南)
17	兴佳2号	大兴安岭地区农业林业科学研究院 (中国黑龙江)	43	云薯201	云南省农业科学院(中国云南)
18	克新6号	黑龙江省农业科学院(中国黑龙江)	44	云薯301	云南省农业科学院(中国云南)
19	克新23号	黑龙江省农业科学院(中国黑龙江)	45	云薯801	云南省农业科学院(中国云南)
20	铃田红英	内蒙古铃田生物技术有限公司 (中国内蒙古)	46	丽江彩虹	丽江市农业科学研究所(中国云南)
21	坝薯10号	张家口市农业科学院(中国河北)	47	丽薯6号	丽江市农业科学研究所(云南)
22	冀张薯5号	张家口市农业科学院(中国河北)	48	丽薯7号	丽江市农业科学研究所(中国云南)
23	冀张薯8号	张家口市农业科学院(中国河北)	49	德薯3号	德宏州农业科学研究所(云南)
24	冀张薯12号	张家口市农业科学院(中国河北)	50	滇薯6号	云南农业大学(中国云南)
25	冀张薯14号	张家口市农业科学院(中国河北)	51	粉深洋芋	地方种(中国云南)
26	定薯1号	定西市旱作农业科研推广中心 (中国甘肃)	52	会-2	会泽县农技中心(中国云南)
			53	紫云1号	云南省农业科学院(中国云南)
			54	S02-106	云南省农业科学院(中国云南)

表 1(续)

序号 No.	材料名 Accession	来源 Origin	序号 No.	材料名 Accession	来源 Origin
55	S01-4	云南省农业科学院(中国云南)	97	B20-4	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
56	S03-2744	云南省农业科学院(中国云南)	98	B9	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
57	S03-0452	云南省农业科学院(中国云南)	99	B8943-4	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
58	S04-122	云南省农业科学院(中国云南)	100	C19	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
59	S03-3349	云南省农业科学院(中国云南)	101	C13	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
60	S04-2278	云南省农业科学院(中国云南)	102	DE03-79-1	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
61	S04-1424	云南省农业科学院(中国云南)	103	D7838-01	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
62	S04-5156	云南省农业科学院(中国云南)	104	HB0426-16	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
63	S04-4036	云南省农业科学院(中国云南)	105	DT13281-02	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
64	S04-6099	云南省农业科学院(中国云南)	106	HN21-2	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
65	S04-5917	云南省农业科学院(中国云南)	107	HC71533	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
66	S05-197	云南省农业科学院(中国云南)	108	NO12-3	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
67	S05-1669	云南省农业科学院(中国云南)	109	N025-4	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
68	S07-15	云南省农业科学院(中国云南)	110	NO27-10	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
69	S06-1693	云南省农业科学院(中国云南)	111	NO16-7	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
70	YS03-268	云南省农业科学院(中国云南)	112	S3	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
71	黔芋 6 号	贵州省农业科学院(中国贵州)	113	OP-2-5	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
72	安龙 5 号	安龙县农技站(中国贵州)	114	S6	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
73	毕薯 8 号	毕节地区农业科学研究所(中国贵州)	115	S5	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
74	凉薯 2 号	凉山州西昌农业科学研究所(中国四川)	116	S21	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
75	凉薯 6 号	凉山州西昌农业科学研究所(中国四川)	117	S11	重庆三峡农业科学院(中国重庆)
76	凉薯 7 号	凉山州西昌农业科学研究所(中国四川)	118	K105	西南大学(中国重庆)
77	川芋 117	四川省农业科学院(中国四川)	119	K103	西南大学(中国重庆)
78	0205-48	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	120	K117	西南大学(中国重庆)
79	0201-38	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	121	K107	西南大学(中国重庆)
80	046016	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	122	P167	西南大学(中国重庆)
81	0435-4	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	123	K120	西南大学(中国重庆)
82	047195	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	124	P177	西南大学(中国重庆)
83	047135	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	125	P174	西南大学(重庆)
84	049565	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	126	P182	西南大学(中国重庆)
85	047520	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	127	P180	西南大学(中国重庆)
86	YA03-7	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	128	AC	西南大学(中国重庆)
87	05167-1	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	129	P71-12	西南大学(中国重庆)
88	093102	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	130	S14A53-18	西南大学(中国重庆)
89	09307-830	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	131	S14A53-13	西南大学(中国重庆)
90	B0562-5	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	132	SWU-2	西南大学(中国重庆)
91	N014-9	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	133	SWU-1	西南大学(中国重庆)
92	B18-7	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	134	XN080903	西南大学(中国重庆)
93	B18-11	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	135	XN103417	西南大学(中国重庆)
94	B20-2	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	136	XN101618	西南大学(中国重庆)
95	B2	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	137	W2007-6	巫溪县农技推广站(中国重庆)
96	B20-7	重庆三峡农业科学院(中国重庆)	138	合 23M-2	重庆市农业科学院(中国重庆)

表 1(续)

序号 No.	材料名 Accession	来源 Origin	序号 No.	材料名 Accession	来源 Origin
139	08X-30	重庆市农业科学院(中国重庆)	177	郑薯 5 号	郑州市蔬菜研究所(中国河南)
140	恩 S78-11	中国南方马铃薯研究中心(中国湖北)	178	郑薯 6 号	郑州市蔬菜研究所(中国河南)
141	鄂 P98P21-3	中国南方马铃薯研究中心(中国湖北)	179	晋薯 2 号	山西省农业科学院(中国山西)
142	鄂薯 3 号	中国南方马铃薯研究中心(中国湖北)	180	桂农薯 1	广西农业科学院(中国广西)
143	鄂薯 5 号	中国南方马铃薯研究中心(中国湖北)	181	龙育 201259-10	福建农业科学院(中国福建)
144	鄂薯 7 号	中国南方马铃薯研究中心(中国湖北)	182	脱毒 175	未知
145	鄂薯 10 号	中国南方马铃薯研究中心(中国湖北)	183	王薯 2 号	未知
146	华恩 4 号	华中农业大学(中国湖北)	184	Atlantic	美国(北美洲)
147	华彩 1 号	华中农业大学(中国湖北)	185	Innovator	美国(北美洲)
148	华薯 1 号	华中农业大学(中国湖北)	186	Russet Burbank	美国(北美洲)
149	华薯 2 号	华中农业大学(中国湖北)	187	ND2008-02	美国(北美洲)
150	华薯 3 号	华中农业大学(中国湖北)	188	Kenebeca	美国(北美洲)
151	04P48-3	华中农业大学(中国湖北)	189	USDAX96-56	美国(北美洲)
152	04HE19-84	华中农业大学(中国湖北)	190	F01002	加拿大(北美洲)
153	07HE032-4	华中农业大学(中国湖北)	191	F02041	加拿大(北美洲)
154	05HE5-43	华中农业大学(中国湖北)	192	F04063	加拿大(北美洲)
155	08CA0710	华中农业大学(中国湖北)	193	F04068	加拿大(北美洲)
156	08CA0623	华中农业大学(中国湖北)	194	MacIntosh Black	加拿大(北美洲)
157	08HE143-2	华中农业大学(中国湖北)	195	Domino	加拿大(北美洲)
158	08HE042-2	华中农业大学(中国湖北)	196	CS74109	加拿大(北美洲)
159	15113-06	华中农业大学(中国湖北)	197	Green Mounion	加拿大(北美洲)
160	08HE147-4	华中农业大学(中国湖北)	198	Shepody	加拿大(北美洲)
161	AC338	华中农业大学(中国湖北)	199	Monalisa	加拿大(北美洲)
162	AC0778	华中农业大学(中国湖北)	200	Monona	加拿大(北美洲)
163	A13	华中农业大学(中国湖北)	201	Redsen	加拿大(北美洲)
164	AT13918-02	华中农业大学(中国湖北)	202	Edwards 53	加拿大(北美洲)
165	AT14089-02	华中农业大学(中国湖北)	203	Purple Viking	加拿大(北美洲)
166	AT14917-04	华中农业大学(中国湖北)	204	Red Scalett	加拿大(北美洲)
167	CA0801	华中农业大学(中国湖北)	205	Bintje	欧洲
168	CA0752	华中农业大学(中国湖北)	206	Jrezy Early	欧洲
169	A458	华中农业大学(中国湖北)	207	Mynulin Early	欧洲
170	LBR 03HE95-5	华中农业大学(中国湖北)	208	Turbo	欧洲
171	A668	华中农业大学(中国湖北)	209	Mira	欧洲
172	希森 3 号	乐陵希森马铃薯产业集团有限公司 (中国山东)	210	Favorite	欧洲
173	希森 6 号	乐陵希森马铃薯产业集团有限公司 (中国山东)	211	378711.7	国际马铃薯中心(秘鲁)
174	红玫瑰 2 号	乐陵希森马铃薯产业集团有限公司 (中国山东)	212	393160.1	国际马铃薯中心(秘鲁)
175	黑玫瑰 1 号	乐陵希森马铃薯产业集团有限公司 (中国山东)	213	393170.3	国际马铃薯中心(秘鲁)
176	乐薯 19 号	未知(中国山东)	214	393170.5	国际马铃薯中心(秘鲁)
			215	393178.3	国际马铃薯中心(秘鲁)
			216	393190.2	国际马铃薯中心(秘鲁)
			217	393194.2	国际马铃薯中心(秘鲁)
			218	393465.8	国际马铃薯中心(秘鲁)

编号 1~38 为北方一作区选育,编号 39~145 为西南混作区选育,编号 146~183 为国内其他(中原和南方)区选育,编号 184~210 为欧洲和北美洲选育,编号 211~218 为国际马铃薯中心(秘鲁)选育

No. 1-38 from north area, No.39-145 from southwest area, No. 146-183 from other area(central plains and south), No. 184-210 from Europe and North America, No. 211-218 from Peru(CIP, International Potato Centre)

1.2 马铃薯 DNA 提取以及晚疫病抗性基因标记检测

在马铃薯幼苗期取各材料的幼嫩叶片, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 提取得到的 DNA 原液稀释至 50 ng/μL 保存在 -20 °C 待用。

6 个晚疫病抗性基因标记信息见表 2, 引物序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。PCR 反

应体系 20 μL: 2 μL 10 × Buffer with Mg²⁺, 0.4 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.4 μL 10 μmol/L Primers, 1 μL 50 ng/μL DNA 模板, 0.2 μL EasyTaq DNA 聚合酶 (全式金, 北京), ddH₂O 补足 20 μL。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察。

表 2 晚疫病抗性基因分子标记

Table 2 Molecular markers of late blight resistance (R) genes

基因 Gene	标记名称 Marker	引物序列 Primer sequence (5'-3')	大小 (bp) Size	退火温度 (°C) Tm	标记类型 Marker type	参考文献 References
R1	76-2SF2	CACTCGTGACATATCCTCACTA	1400	65	SCAR	[7]
	76-2SR	CAACCCTGGCATGCCACG				
R2 family	R2-F	ATGGCTGATGCCTTTCTATCATTTGC	2500	55	SCAR	[19]
	R2-R	TCACAACATATAATTCCGCTTC				
R3a	SHa-F	ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT	982	60	STS	[8]
	SHa-R	CTTCAAGGTAGTGGCAGTATGCTT				
R3b	R3bF4	GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA	378	55	AS	[10]
	R3bR5	ACCAGTTTCTTGCAATCCAGATTG				
R8	CDP3	RRAGATTCAGCCATKGARATTAAGAAA	500	55	CDP	[11]
	Adaptor pr.	ACTCGATTCTCAACCCGAAAG				
RB	RB-F	CACGAGTGCCCTTTTCTGAC	213	50	SCAR	[15]
	RB-R	ACAATTGAATTTTTAGACTT				

1.3 晚疫病田间调查

所有马铃薯植株完全展开后, 每周观察植株发病情况, 采用病情指数法计算所有马铃薯基因型晚疫病病情指数^[20]。病情指数 = \sum (各级病叶数 × 相对病级数值) / (调查总叶数 × 9) × 100。病级标准如下: 0 级, 无病斑; 1 级, 病斑面积占整个叶面积 5% 以下; 3 级, 病斑面积占整个叶面积 6%~10%; 5 级, 病斑面积占整个叶面积 11%~20%; 7 级, 病斑面积占整个叶面积 21%~50%; 9 级, 病斑面积占整个叶面积 50% 以上。梁平种植点在 2016 年和 2017 年连续 2 年进行调查, 北碚槽上在 2016 年进行调查, 费乌瑞它 100% 被晚疫病侵染且病级为 9 级时, 统计各马铃薯品种 (系) 的病级, 病情指数以 3 次调查的平均值计算。抗病性级别标准为病情指数低于 30 为高抗 (HR), 病情指数 31~50 为中抗 (MR), 病情指数 51~70 为中感 (MS), 病情指数 70 以上为高感 (HS)。

1.4 晚疫病菌接种实验

采用晚疫病菌株 T30-4 (生理小种 1.3.4.5.6.7) 和田间分离的菌株 CQPI05 (生理小种 1.3.4.7.8.9.11) 混

合接种。晚疫病室内接种方法参考 Du 等^[21] 的方法, 即接种前用无菌水将块茎薄片上的孢子囊洗入 10 mL 离心管中, 单层纱布过滤。取 1 μL 镜检, 通过稀释将滤液孢子囊浓度调制约 70~80 个/μL, 将菌液放于 4 °C 展柜放置 4 h, 使其充分释放游动孢子, 等量混合晚疫病菌株。取长势一致、健康的自顶端向下 3~5 个充分展开的复叶进行接种, 每个株系取 15 片叶, 3 次重复。按设计顺序将叶片依次摆入铺有湿滤纸的接种框内, 叶背朝上, 用加样枪取 10 μL 晚疫病菌悬浮液接种到叶片背面主脉一侧。接种后用喷壶轻轻喷湿叶面, 喷水以叶片表面形成细密的雾珠为宜, 不能有明显水滴。然后将接种框用透明的塑料薄膜密封保湿, 温度控制为 20 °C 左右, 光照 16 h/8 h (光/暗)。接种第 4 天开始统计病斑面积, 游标卡尺记载病斑的长 (L) 和宽 (w) (两者垂直), 连续统计 3 d。根据病斑长 (L) 和宽 (W) 计算病斑面积 (Ellipse area) $A=1/4 \times \pi \times L \times W$ 。病情指数法鉴定马铃薯晚疫病病情指数。

1.5 数据处理和分析

利用 Excel 2007 软件对数据进行处理和分析。

利用 Mev 软件进行聚类热图分析。

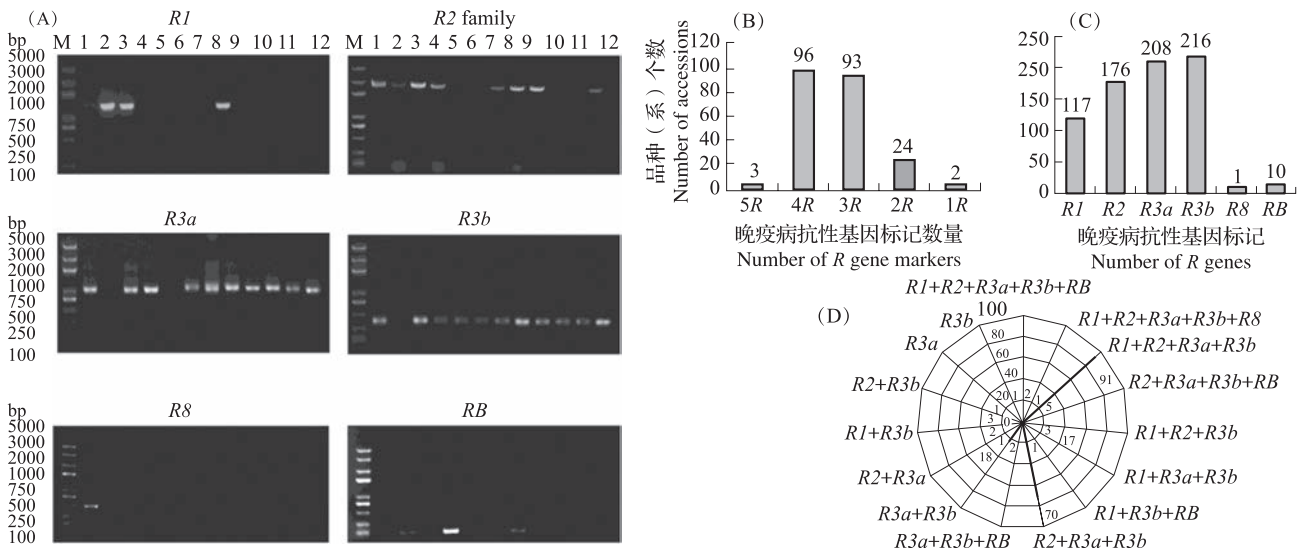
2 结果与分析

2.1 晚疫病抗性基因 *R1*、*R2* family、*R3a*、*R3b*、*R8*、*RB* 的分子标记检测

以表 2 中的引物分别检测 *R1*、*R2* family、*R3a*、*R3b*、*R8* 和 *RB* 基因标记,结果如图 1A 所示,含 *R1* 基因的材料可以扩增出 1400 bp 的特异性片段,含 *R2* family 基因的材料可以扩增出 2500 bp 左右的特异性片段,含 *R3a* 基因的材料可以扩增出 982 bp 的特异性片段,含 *R3b* 基因的材料可以扩增出 378 bp 的特异性片段,含 *R8* 基因的材料可以扩增出 500 bp 的特异性片段,含 *RB* 基因的材料可以扩增出 213 bp 的特异性片段。

按检测单个 *R* 标记统计结果显示,供试材料中含有 *R3b* 和 *R3a* 的品种(系)最多,分别为 216 个和 208 个;其次是 *R2* family 和 *R1* 基因,分别

为 176 和 117 份;含有 *RB* 和 *R8* 的品种(系)最少,分别为 10 和 1 个(图 1C)。按含有 *R* 基因的数量统计结果显示,含有 4 个和 3 个 *R* 基因为主,分别有 96 个和 93 个材料,占总数的 44.0% 和 42.7%;其次是含有 2 个 *R* 基因,有 24 个材料,占供试材料的 11.0%;含有 5 个和 1 个 *R* 基因标记的材料最少,分别为 3 个和 2 个,总共占供试材料的 2.3% (图 1B)。进一步分析马铃薯含有所检测的 *R* 基因组成,供试材料含有 11 种的 *R* 基因组合,主要为 *R1*+*R2* Family +*R3a*+*R3b* 和 *R2* Family +*R3a*+*R3b*, 分别有 91 份和 70 份,占供试材料的 41.7% 和 22.1%;其次是 *R1*+*R3a*+*R3b* 和 *R3a*+*R3b*, 分别有 17 份和 18 份,占供试材料的 8.3% 和 7.8%,其他 7 种类型较少,每种类型在 1~5 个之间,总计 22 个,占供试材料的 10.1% (图 1D)。



A: 6 个 *R* 基因标记检测电泳图; B: 马铃薯含有 *R* 基因标记个数类型分布; C: 单个 *R* 基因在马铃薯中分布;

D: *R* 基因标记组成分布。M: DNA Marker; 1~12: 代表性的供试材料

A: The PCR results of *R* gene makers in parts of genotypes, B: Distribution of *R* gene marker numbers,

C: Distribution of each *R* gene marker, D: Distribution of *R* gene marker composition, M: DNA Marker, 1-12: parts of genotypes

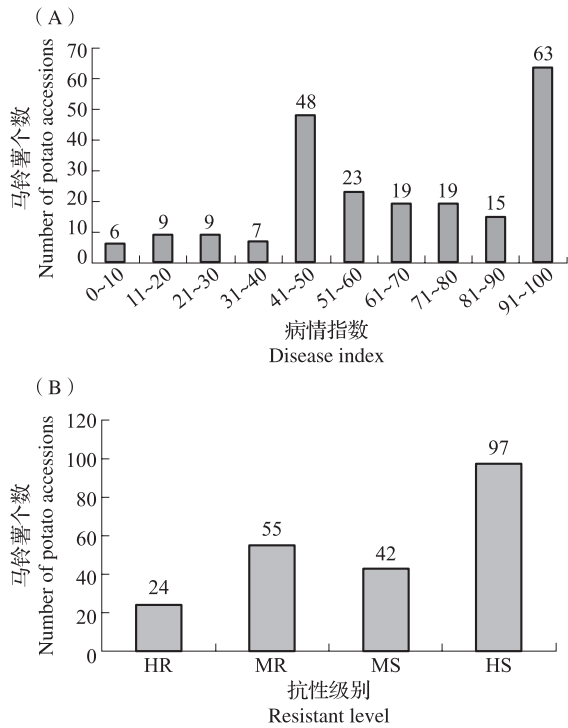
图 1 马铃薯中 *R* 基因分子标记检测

Fig.1 Molecular screening of *R* genes in potatoes

2.2 田间晚疫病抗性鉴定

通过 3 次的田间晚疫病自然发病病情调查发现,218 个马铃薯品种(系)病情指数表现差异明显。病情指数分布范围显示,病情指数 0~10 之间的有 6 个,11~20 之间的有 9 个,21~30 之间的 9 个,31~40 之间的 7 个,41~50 之间的 48 个,51~60 之间的 23 个,61~70 之间的 19 个,71~80 之间的

19 个,81~90 之间的 15 个,91~100 之间的 63 个(图 2A)。在本研究中我们定义病级指数在 0~30 为高抗(HR),31~50 为中抗(MR),51~70 为中感(MS),71~100 为高感(HS),结果显示,高抗、中抗、中感和高感分别为 24、55、42 和 97 份,占供试材料的 11.0%、30.2%、19.3% 和 44.5% (图 2B)。



A: 马铃薯晚疫病田间抗性病情指数分布;
 B: 马铃薯晚疫病田间抗性分级
 A: Distribution of disease indexes to LB in field,
 B: Distribution of resistance level

图 2 马铃薯晚疫病田间抗性评价

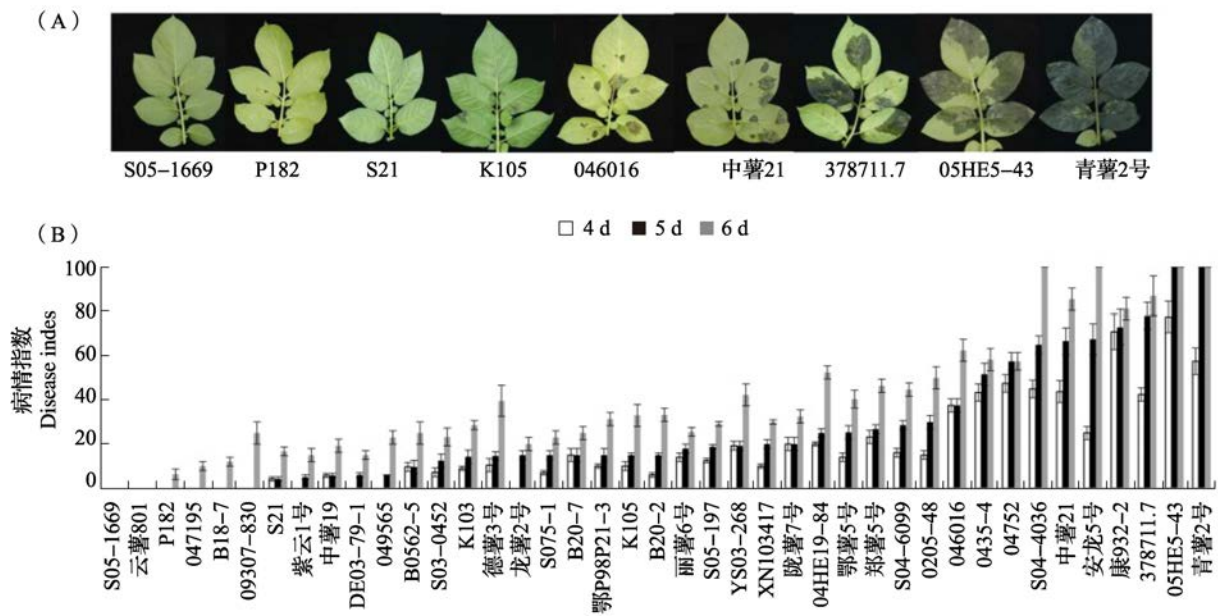
Fig.2 Evaluation of LB resistance in field

2.3 晚疫病离体接种鉴定

为了进一步明确田间晚疫病抗性的可靠性,本研究选取田间表现高抗的材料以及部分其他类型材料进行室内接种鉴定,鉴定结果显示,不同材料间接种晚疫病菌后的发病情况差异明显,田间晚疫病表现高抗性的材料接种后未发现发病症状,或发病症状轻且病情发展缓慢,田间晚疫病表现感病的材料接种后发病症状明显且病情发展快,少量晚疫病抗性中间类型的材料稍有差别(图 3)。这些结果与田间表现基本一致,说明本研究对晚疫病抗性评价结果可靠。

2.4 晚疫病抗性与材料来源及抗病基因组成的关系分析

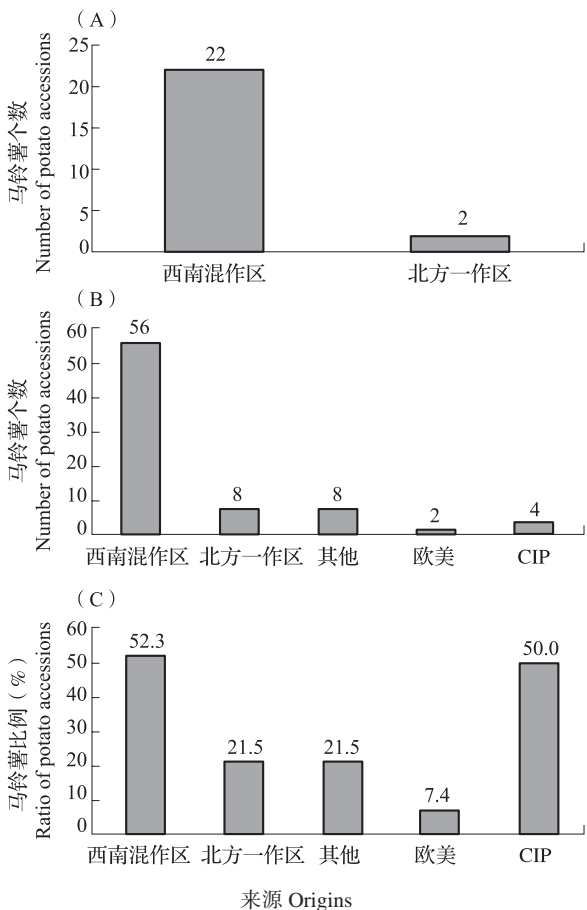
依据材料来源,24 个高抗材料中来自于西南混作区的占 22 个,来源北方一作区的占 2 个(图 4A)。本研究又分析了 97 个田间表现中抗以上的材料来源,结果显示,来源中国西南混作区的 56 个,北方一作区的 8 个,其他地区 8 个,国外欧美地区的 2 个,CIP 的 4 个材料(图 4B),这些分别占供试材料来源地的 52.3%、21.5%、21.5%、7.4% 和 50.0%(图 4C),表明来源西南混作区和 CIP 的材料在重庆地区具有较高的抗性频率,来自中国北方一作区和其他区以及欧美地区的材料绝大部分都表现为感病。



A: 马铃薯叶片室内接种结果;
 B: 马铃薯室内接种病情指数变化
 A: Performance of LB resistance from different potato genotypes,
 B: Disease indexes of LB in potatoes

图 3 部分马铃薯晚疫病室内接种鉴定

Fig.3 Evaluation of LB resistance by inoculation *in vitro*



A: 马铃薯高抗材料来源地分布; B: 马铃薯中抗以上材料来源地分布; C: 马铃薯中抗以上材料占来源地的比例

A: Origin of genotypes with HR to LB, B: Origin of genotypes with both HR and MR to LB, C: Percent of origin of genotypes with both HR and MR to LB

图 4 马铃薯晚疫病抗性资源来源地分布

Fig.4 Distribution of geographic origin in LB resistant genotypes

晚疫病抗性基因标记组成分析结果显示(图5),含有R基因组成主要分为4大类型,第I类型9个,主要含有RB基因,第I类材料中除了中薯18外,均表现出高抗或中抗水平,说明含有RB基因标记的材料能较好地贡献晚疫病抗性。第III类主要是缺R2 family基因标记,除了含有1个RB基因标记以及少数材料表现抗性外,其余均表现为敏感型,暗示缺失R2 family基因可能贡献晚疫病敏感性。第II和IV两类中表现多种抗性水平,第II类中主要含有R2 Family、R3a、R3b共3个R基因标记类型,中抗以上比率为18.6%,第IV类中主要含R1、R2 Family、R3a、R3b等4个R基因标记类型,中抗比率44.4%,第IV类有中抗比例要高于第II类,暗示含有较多R基因可能有利于提高马铃薯抗性水平。部分含有R1、R2、R3a和R3b基因标记的材料表现为感病,说明这些R基因可能已经被重庆市晚疫病菌所克服,

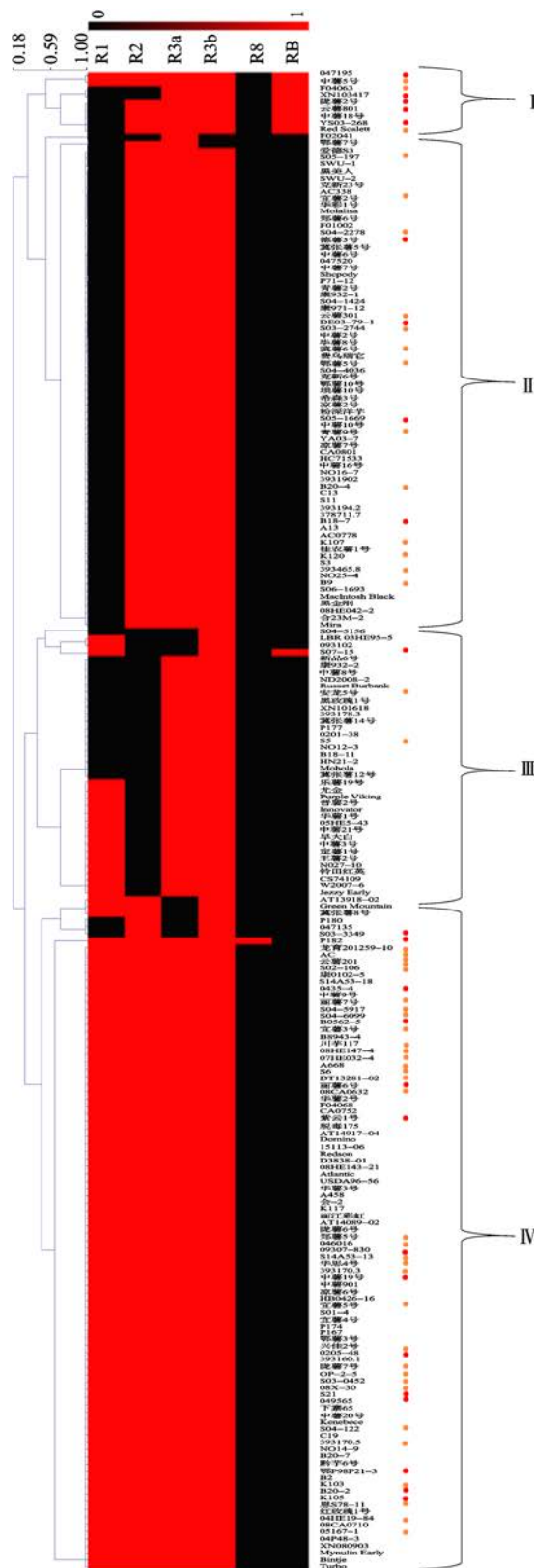


图 5 R 基因分子标记组成聚类与晚疫病抗性

Fig.5 Cluster analyses of the marker components R genes of and LB resistance

使这些材料失去抗性;同时也发现部分材料表现中抗以上,暗示这些材料可能含有其他的 *R* 基因。

3 讨论

抗病基因的发掘和聚合多个抗病基因是抗病育种的重要手段,获得优异抗病种质资源是培育抗病品种的基础。利用抗病基因分子标记评价和改良作物抗病性是一种经济有效的方法,在不同作物中广泛应用^[22-23]。马铃薯已相继克隆了晚疫病小种特异抗性基因 *R1*、*R2*、*R3a* 和 *R3b*,以及具有广谱抗性基因 *RB* 和 *R8*,并开发了实用的分子标记。本研究选取了这 6 个晚疫病抗性基因标记对从国内外收集的 218 份马铃薯材料进行 *R* 基因组成分析,发现具有持久抗性基因 *R8* 和 *RB* 标记的材料分别有 1 个和 10 个,含有 5 个基因标记的材料有 3 个,说明供试材料中含有持久抗性基因且多 *R* 基因聚合的材料较少。由于仅用了 6 个 *R* 基因标记进行检测,其他报道的 *R* 基因并没有进行检测,后续可通过农杆菌介导的瞬时表达技术,在马铃薯叶片瞬时表达致病疫霉无毒基因等明确供试材料中抗病基因的组成情况。

为了进一步筛选供试材料在重庆市晚疫病抗性育种中潜在的利用价值,本研究通过田间自然发病对供试材料进行了抗病性初步评价,并结合室内接种进行鉴定,筛选出了 24 个高抗性材料。另外还有 55 个材料在田间表现为中抗水平,这些材料可为重庆市马铃薯抗病品种筛选、推广布局作贮备以及作抗病育种亲本加以利用。在这些抗性材料中分析发现,含有广谱抗性基因 *RB* 标记的 10 个材料中 9 个在田间表现中抗以上,挑选的 5 个材料在室内接种鉴定也表现一致,说明 *RB* 标记在晚疫病抗性辅助选择中具有高效性,在育种程序中可以结合该分子标记辅助选择含有该基因的新品种(系),进一步提高育种效率和加强品种的抗病性。另外 1 份含有广谱抗性基因 *R8* 标记的材料中也具有高抗性,后续需要进一步加大资源的评价范围,筛选含有 *R8* 的新资源并加以利用。所有检测的材料中没有同时含有 *RB* 和 *R8* 基因的资源材料,后续育种中可以以这些材料进行杂交或借助分子手段将其转入到马铃薯品种中去,达到基因聚合的目的,让马铃薯获得持久抗性。为了培育具有持久抗性的马铃薯品种,有必要将多种 *R* 基因聚合起来。单一的 *R* 基因容易被快速进化的病原体所克服,而多种 *R* 基因的存在则会延长晚疫病抗性。将多个不同来源的抗病基因同时导入

马铃薯品种中,获得持久抗性的马铃薯材料^[24-25]。另外,我们也筛选到了一些其他高抗的材料,这些材料中可能存在新 *R* 基因,为新 *R* 基因的发掘及其抗性机制研究提供材料基础,在育种上同样具有潜在应用价值。随着效应子组(Effectorome)^[26]、抗性基因富集测序(RenSeq)^[27-28]、基因捕获(DNA capture)^[29-30]等 *R* 基因鉴定技术的快速发展,相信新 *R* 基因会被不断的分离和鉴定,这些新 *R* 基因将对晚疫病抗性育种效率的提高起到积极推动作用。

另外,了解重庆市晚疫病菌群的遗传结构以及晚疫病菌生理小种毒力发展,能为抗病品种的合理布局和使用提供科学依据。毕朝位^[31]发现重庆地区的 186 个菌株均为 A1 交配型。通过 RAPD 和 SSR 标记对重庆主产区的晚疫病菌进行了遗传结构分析,发现重庆地区的晚疫病菌株遗传结构较单一,可能与重庆大面积推广应用的品种单一有关^[32-33]。赵青^[34]分析了川渝地区马铃薯晚疫病菌群体表型和遗传变异,研究发现重庆的万州区和忠县分布有 A2 和 SF 两种交配型,石柱县仅有 A2 交配型。忠县和石柱县检测出全毒力小种和高毒力小种类型,而在万州区未发现全毒力小种。这些研究结果说明重庆地区晚疫病菌群体有变复杂的趋势,各区的优势生理小种存在差异。本研究主要在重庆的梁平县和北碚区进行了田间抗性鉴定,而且在室内接种采用的菌株为 T30-4 和当地采集的混合菌株,由于缺乏对重庆不同地区晚疫病菌生理小种类型进行测试和生理小种毒力的持续监测,导致不能明确不同地区田间优势小种。后续仍需持续分离不同地区的晚疫病菌株,通过含有 *R1*~*R11* 抗性鉴别寄主明确这些菌株的毒性类型以及优势小种,进一步明确这些材料对重庆优势晚疫病生理小种的抗性,同时将这些抗性材料在重庆其他地区进一步进行田间抗性鉴定,评价其抗性水平,为其布局和使用提供科学依据。

致谢:感谢华中农业大学宋波涛教授和云南省农业科学院姚春光副研究员对部分资源材料的提供。

参考文献

- [1] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展. 华中农业大学学报: 社会科学版, 2012, 97(1): 1-4
Xie C H. The present situation and development of potato industry. Journal of Huazhong Agricultural University: Social Sciences Edition, 2012, 97(1): 1-4
- [2] 金黎平, 屈冬玉, 谢开云, 卞春松, 段绍光. 我国马铃薯种质资源和育种技术研究进展. 种子, 2003(5): 98-100
Jin L P, Qu D Y, Xie K Y, Bian C S, Duan S G. Advances of

- potato germplasm and breeding technology in China. Seed, 2003 (5): 98-100
- [3] Tian Y E, Yin J L, Sun J P, Li H P, Ma Y F, Wang Q H, Quan J L, Shan W X. Population genetic analysis of *Phytophthora infestans* in northwestern China. Plant Pathology, 2016, 65: 17-25
- [4] Li Y, van der Lee T, Zhu J H, Jin G H, Lan C Z, Zhu S X, Zhang R F, Liu B W, Zhao Z J, Kessel G, Huang S W, Jacobsen E. Population structure of *Phytophthora infestans* in China - geographic clusters and presence of the EU genotype Blue 13. Plant Pathology, 2013, 62 (4): 932-942
- [5] 黄振霖, 欧建龙. 重庆市马铃薯产业发展与主食化建议. 南方农业, 2017, 11 (28): 94-95
Huang Z L, Ou J L. Potato industry development and suggestions on staple food in Chongqing. South China Agriculture, 2017, 11 (28): 94-95
- [6] Bradshaw J E, Ramsay G. Utilization of the commonwealth potato collection in potato breeding. Euphytica, 2005, 146: 9-19
- [7] Ballvora A, Ercolano M R, Weiss J, Meksem K, Bormann C A, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. The Plant Journal, 2002, 30: 361-371
- [8] Huang S, van der Vossen E A G, Kuang H, Vleeshouwers V G A, Zhang N, Borm T J A, van Eck H J, Baker B, Jacobsen E, Visser R G F. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. Plant Journal, 2005, 42: 251-261
- [9] Lokossou A A, Park T, van Arkel G, Arens M, Ruyter-Spira C, Morales J, Whisson S C, Birch P R J, Visser R G F, Jacobsen E, van der Vossen E A G. Exploiting knowledge of *R/Avr* genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22: 630-641
- [10] Li G, Huang S, Guo X, Li Y, Yang Y, Guo Z, Kuang H, Rietman H, Bergervoet M, Vleeshouwers V G A A, van der Vossen E, Qu D, Visser R G F, Jacobsen E, Vossen J H. Cloning and characterization of *R3b*; members of the *R3* superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24 (10): 1132-1142
- [11] Jo K R, Arens M, Kim T Y, Jongsma M A, Visser R G F, Jacobsen E, Vossen J H. Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene *R8* to a new locus on chromosome IX. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123 (8): 1331-1340
- [12] Li J, Lindqvist-Kreuzer H, Tian Z, Liu J, Song B, Landeo J, Portal L, Gastelo M, Frisancho J, Sanchez L, Meijer D, Xie C, Bonierbale M. Conditional QTL underlying resistance to late blight in a diploid potato population. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124: 1339-1350
- [13] Jiang R, Li J, Tian Z, Du J, Armstrong M, Baker K, Lim T Y, Vossen J, He H, Portal L, Zhou J, Bonierbale M, Hein I, Lindqvist-Kreuzer H, Xie C. Potato late blight field resistance from QTL *dP109c* is conferred by the NB-LRR gene *R8*. Journal of Experimental Botany, 2018, 69 (7): 1545-1555
- [14] Song J, Bradeen J M, Naess S K, Raasch J A, Wielgus S M, Haberlach G T, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell C R, Helgeson J P, Jiang J. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2003, 100: 9128-9133
- [15] Colton L M, Groza H I, Wielgus S M, Jiang J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene *RB* derived from a wild potato species. Crop Science, 2006, 46 (2): 589-594
- [16] Tiwari J K, Siddappa S, Singh B P, Kaushik S K, Chakrabarti S K, Bhardwaj V, Chandel P. Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. Plant Breeding, 2013, 132 (3): 237-245
- [17] 白磊, 郭华春. 马铃薯多抗亲本的分子标记辅助筛选. 分子植物育种, 2017, 14 (1): 200-212
Bai L, Guo H C. The molecular markers assisted screening of multiple resistance potato parents. Molecular Plant Breeding, 2017, 14 (1): 200-212
- [18] 徐建飞, 金黎平. 马铃薯遗传育种研究: 现状与展望. 中国农业科学, 2017, 50 (6): 990-1015
Xu J F, Jin L P. Advances and perspectives in research of potato genetics and breeding. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50 (6): 990-1015
- [19] Kim H J, Lee H R, Jo K R, Mortazavian S M M, Huigen D J, Evenhuis B, Kessel G, Visser R G F, Jacobsen E, Vossen J H. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants *MaR8* and *MaR9* is conferred by multiple stacked *R* genes. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124: 923-935
- [20] 李文娟, FORBES Gregory A, 谢开云. 马铃薯晚疫病发病程度田间观察记录标准的探讨. 中国马铃薯, 2012 (4): 238-246
Li W J, Forbes G A, Xie K Y. Observations on the standardization of field assessment of potato late blight severity. China Potato Journal, 2012 (4): 238-246
- [21] Du J, Verzaux E, Chaparro-Garcia A, Bijsterbosch G, Keizer L C P, Zhou J, Liebrand T W H, Xie C, Govers F, Robatzek S, van der Vossen E A G, Jacobsen E, Visser R G F, Kamoun S, Vleeshouwers V G. Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. Nature Plants, 2015, 1 (4): 15034
- [22] 王金萍, 刘永伟, 孙果忠, 王海波. 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. 植物遗传资源学报, 2017, 18 (4): 754-762
Wang J P, Liu Y W, Sun G Z, Wang H B. Evaluation and validation of molecular markers associated with stalk rot resistance in 159 maize inbred lines. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18 (4): 754-762
- [23] 向小姣, 张建, 郑天清, 徐建龙. 应用分子标记技术改良京作 1 号的稻瘟病抗性. 植物遗传资源学报, 2016, 17 (4): 773-780
Xiang X J, Zhang J, Zheng T Q, Xu J L. Improving blast resistance of Jinggeng1 using molecular marker technique. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17 (4): 773-780
- [24] Zhu S, Li Y, Vossen J H, Visser R G, Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. Transgenic Research, 2012, 21: 89-99
- [25] Haesaert G, Vossen J H, Custers R, De Loose M, Haverkort A, Heremans B, Hutten R, Kessel G, Landschoot S,

- Droogenbroeck B, Visser R G F, Gheysen G. Transformation of the potato variety Desiree with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions. *Crop Protection*, 2015, 77: 163-175
- [26] Vleeshouwers V G, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh S K, Wang M, Bouwmeester K, Vosman B, Visser R G F, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, van der Vossen E. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One*, 2008, 3 (8): e2875
- [27] Jupe F, Witek K, Verweij W, Sliwka J, Pritchard L, Etherington G J, Maclean D, Cock P J, Leggett R M, Bryan G J, Cardle L, Hein I, Jones J D. Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. *The Plant Journal*, 2013, 76: 530-544
- [28] Witek K, Jupe F, Witek A I, Baker D, Clark M D, Jones J D. Accelerated cloning of a potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing. *Nature Biotechnology*, 2016, 34 (6): 656-660
- [29] Steuernagel B, Periyannan S K, Hernández-Pinzón I, Witek K, Rouse M N, Yu G, Hatta A, Ayliffe M, Bariana H, Jones J D G, Lagudah E S, Wulff B B H. Rapid cloning of disease-resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. *Nature Biotechnology*, 2016, 34: 652-655
- [30] Chen X, Lewandowska D, Armstrong M R, Baker K, Lim T Y, Bayer M, Harrower B, McLean K, Jupe F, Witek K, Lees A K, Jones J D, Bryan G J, Hein I. Identification and rapid mapping of a gene conferring broad-spectrum late blight resistance in the diploid potato species *solanum verrucosum* through DNA capture technologies. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 10: 1-11
- [31] 毕朝位. 重庆地区致病疫霉 *phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 生物学特性研究. 重庆: 西南农业大学, 2002
- Bi C W. Biological Characteristics of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chongqing. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2002
- [32] 黄振霖, 张国臣, 杨水英, 李建华, 青玲, 欧建龙, 赵雨佳, 孙现超, 严秋艳. 重庆马铃薯晚疫病菌群体遗传结构研究. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32 (6): 17-22
- Huang Z L, Zhang G C, Yang S Y, Li J H, Qing L, Ou J L, Zhao Y J, Sun X C, Yan Q Y. Population genetic structure of late blight (*Phytophthora infestans*) of potato in Chongqing. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2010, 32 (6): 17-22
- [33] 石纹豪, 黄振霖, 杨水英, 洪枫, 李振轮, 欧建龙, 赵雨佳. 重庆马铃薯致病疫霉 (*phytophthora infestans*) 的 SSR 基因型分析. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 36 (12): 36-41
- Shi W H, Huang Z L, Yang S Y, Hong F, Li Z L, Ou J L, Zhao Y J. SSR genotypic analysis of *Phytophthora infestans* on potato plants in Chongqing. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2014, 36 (12): 36-41
- [34] 赵青. 川渝地区马铃薯晚疫病菌群体表型和遗传变异的分析. 兰州: 甘肃农业大学, 2015
- Zhao Q. Analysis on phenotypic and genotypic variations of *Phytophthora infestans* in Sichuan-Chongqing region. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015