

# 马铃薯分子育种技术应用研究

尹祥佳

(兰州职业技术学院,甘肃兰州 730070)

**摘要:**马铃薯是我国第四大粮食作物,对保障我国粮食安全、促进农民种植增产增收具有重要的作用。通过阐述马铃薯种质资源的现状和育种目标,提出了在充分挖掘马铃薯种质资源的基础上克隆功能基因,应用基因工程、分子标记技术、转录组学、MicroRNAs 和基因编辑技术培育马铃薯育种新材料。同时与常规育种相结合,为马铃薯新品种选育提供有效途径和技术支撑点。能够有效保障马铃薯增产、稳产、丰产,服务农业现代化和乡村振兴战略。

**关键词:**乡村振兴;马铃薯;分子育种;应用研究

马铃薯栽培始于 1730 年的欧洲和北美洲,由于马铃薯具有营养丰富、粮、菜、饲兼用,抗逆性强,生长周期短,单产高,深加工种类丰富,经济效益好,农民增产增收潜力大等特点,种植马铃薯的国家和地区多达 156 个。我国是最大的马铃薯生产国,栽培面积和总产量均为世界前列,分别占 30% 和 24% 左右<sup>[1]</sup>。2020 年我国马铃薯种植面积稳定在 533.33 万  $\text{hm}^2$  以上,全国马铃薯鲜薯产量达到 1 亿 t,在决胜脱贫攻坚中发挥了重要的作用。马铃薯在甘肃省粮食生产和农村经济发展中具有重要地位,甘肃省定西市已建成为全国最大的脱毒种薯繁育基地、全国重要的商品薯生产基地、全国重要的薯制品加工基地、全国马铃薯产业的重要科技研发推广中心、全国马铃薯产业区域品牌重要命名地。

基金项目:兰州职业技术学院 2020-2021 年校级项目(2020XY-17)

根据我国马铃薯生产的实际需求和不同种植区域面临的主要问题,选育抗逆(旱、盐、冻)、抗病、品质优良、薯形好、商品率高、加工专用型、高产马铃薯品种为基本育种目标。2015 年我国启动了马铃薯主粮化战略,成为继玉米、水稻、小麦的又一主粮作物。因此,通过分子育种技术与常规育种相结合,选育马铃薯优良品种,大力发展马铃薯产业链,有利于粮食生产安全,有利于促进农民种植增产增收,对加快农业农村区域经济发展和农业现代化,实现巩固拓展脱贫攻坚成果同乡村振兴有效衔接,促进乡村振兴具有重要的战略意义。

## 1 马铃薯种质资源与育种目标

作物种质资源是指携带遗传信息的载体,具有实际或潜在育种价值,是支撑农业科技原始创新和作物育种的物质基础<sup>[2]</sup>。我国马铃薯种质资源研究起步较晚,1934 年从英国引入并筛选出卡它丁、七百万、红纹白和 King Edward 4 个品种,有计划地开

台,促进种质资源共享共用。开发具有多层次、多维度数据查询和分析功能的农业种质资源信息共享服务系统,进行信息的快速采集、定位和查询,提高种质资源管理的质量和效率。利用种质资源的 DNA 指纹信息,初步构建具有分子身份证查询、资源间相似率查询和身份证核对等功能的 SSR 指纹数据库。通过种质资源信息共享平台等方式,有针对性地向育种和研究单位提供实物种质和信息,促进种质资源的高效利用。

## 参考文献

- [1] 杨舒. 守护好我们的种质资源. 光明日报, 2019-05-22 (08)
- [2] 梁冰清. 我国面临“保种”困境. 种子科技, 2018, 36 (10): 1-2
- [3] 付深造, 张恩瑜, 陈超. 我国作物种质资源保护利用现状及发展建议. 种子世界, 2013 (10): 1-3
- [4] 黎裕, 王天宇. 美国植物种质资源保护与研究利用. 作物杂志, 2018 (6): 1-9
- [5] 陈超. 丽水市农作物种质资源保护和利用工作探讨. 中国种业, 2020 (7): 30-31

(收稿日期: 2021-07-07)

始了马铃薯引种和资源收集工作。20世纪50年代黑龙江省克山试验站从东德、波兰引入推广了8个品种,其中Mira、Epoka、Aguila和Anemone等品种在生产上发挥了较大作用。20世纪70年代后期,我国开展了大规模的马铃薯品种征集、整理工作,使许多具有优良基因型的地方品种得以保存。此外,还引入外国马铃薯种质资源,不断拓宽国内马铃薯种质资源多样性。1983年完成的《全国马铃薯品种资源编目》收录了马铃薯种质资源832份,国外种质贡献率为89.2%。1984年国际马铃薯中心(CIP)与中国农业科学院签署了科技合作协议,1985年建立了CIP北京联络处,合作开展“马铃薯资源鉴定、筛选、评价和利用项目”,定期从CIP引入各种群体选择材料,筛选具有特殊优良性状的基因型用于国内马铃薯育种。据统计,从1978–1991年,CIP向中国提供马铃薯资源2052份,其中试管苗398份、块茎426份、实生种1228份。20世纪90年代以来,我国引进了一些专用型品种、育种材料和杂交组合,如中国农业科学院蔬菜花卉研究所通过执行国际合作项目,分别从欧美国家和CIP引进各类专用型品种70多个、杂交组合600多个、2n配子材料和野生种材料200多份。目前,我国马铃薯种质资源保存量为5000份<sup>[3]</sup>。利用近缘栽培种和野生种材料,扩大遗传背景,促进了马铃薯新品种的选育,提高了育种效率,但我国马铃薯种质基因库遗传基础仍很狭窄,尤其油炸型马铃薯品种较少,生产上种植品种主要是大西洋和夏波蒂等品种。因此,系统开展马铃薯种质资源的收集、研究、评价工作就显得非常重要。马铃薯种质资源的评价体系分为表型和基因型,表型鉴定主要包括农艺性状、产量性状、品质性状、适应性、稳定性、丰产性以及抗逆性等综合评价<sup>[4]</sup>;基因型鉴定较多使用SSR和SNP标记,近年来,借助二代测序技术进行全基因组水平基因型鉴定,有效促进了马铃薯种质资源评价和基因挖掘工作。马铃薯育种工作的核心是创造、重组遗传变异,选择符合育种目标的个体并繁育成新品种,而育种方法的成效取决于其创造变异的水平。20世纪50年代到70年代末,马铃薯育种经历了从国外引进杂交种鉴定筛选、自主杂交选育鉴定,陆续培育出了一些马铃薯品种,经过3~4次的品种更新换代,逐步减轻了晚疫病、病毒病等的发生,单产也不断提高,但存在育

成品种亲本单一、遗传背景狭窄的问题。到了20世纪80年代,采用马铃薯新型栽培种的轮回选择,筛选了一批综合性状良好的抗病、优质种质材料,丰富了马铃薯育种的基因库,促进了近缘栽培种间的杂交育种。花粉培养或诱导技术使四倍体栽培种产生双单倍体,为利用二倍体野生种和近缘栽培种遗传资源提供了育种方法。后续主要开展了马铃薯引种驯化与系统育种、杂交育种、诱变育种。引进国外优良野生和栽培品种、地方品种群体种进行系统育种,是最为简便的选育方法。

## 2 马铃薯分子育种技术应用

**2.1 马铃薯功能基因克隆** 随着基因组测序技术的迅速发展,主要农作物的基因组测序取得了突破,建立起了基于连锁分析、全基因组关联分析、比较基因组学、基因表达等一系列的克隆基因的新方法,极大促进了控制作物重要农艺性状新基因发掘与功能研究。2011年马铃薯基因组完成测序,推动了马铃薯育种研究进程。目前,已经克隆了一些功能基因,例如:马铃薯块茎形成相关基因*StSP6A*、*StCO*、*StCDF1*<sup>[5]</sup>,抗旱耐盐相关基因*StNAC2*<sup>[6]</sup>、*StCPD*<sup>[7]</sup>、*SnRK2*<sup>[8]</sup>,耐冻相关基因*SAD*、*FAD2*<sup>[9]</sup>、*StvacINV1*<sup>[10]</sup>,品质相关基因*StNCED1*<sup>[11]</sup>和信号传导调控相关基因*StTPS*<sup>[12]</sup>、*StDHN*<sup>[13]</sup>,为开展马铃薯产量性状、块茎发育、抗逆、抗病和品质等相关基因研究,开发基因新标记提供了理论基础。

**2.2 基因工程** 基因工程育种在马铃薯遗传研究、种质资源发掘与创新等领域广泛应用,拓宽了马铃薯的遗传基础。20世纪80年代开始,我国有条件的育种单位先后开展了抗青枯病基因转移、病毒外壳蛋白基因介导、蛋白质基因转化以及某些病原基因文库构建方面的研究。利用基因工程主要培育抗虫、抗病、抗除草剂、品质改良、耐低温糖化等马铃薯育种材料,此外,有研究报道了盐生草耐旱基因的发掘<sup>[14]</sup>以及盐生草*HgNHX1*基因启动子的克隆及功能验证<sup>[15]</sup>,这为利用外源抗逆基因培育马铃薯新材料提供了思路。因此,通过选择特殊逆境胁迫生长的植物,发掘特殊逆境相关基因,转化马铃薯栽培种,为常规育种提供相应的抗性转基因育种材料提供了新途径。

**2.3 分子标记技术** 分子标记技术发展水平在很大程度上决定了生物遗传与育种研究的广度和深

度。分子标记是 DNA 标记,与传统的形态学标记、生化标记和细胞学标记相比,具有位点数量多、多态性高、遗传稳定和不受环境限制等特点<sup>[16]</sup>。DNA 标记一般有 3 类:第 1 类是以 Southern 为核心,代表性技术为限制性片段长度多态性(RFLP);第 2 类是以 PCR 为核心,如随机扩增多态性 DNA(RAPD)、简单重复序列(SSR)、扩增片段长度多态性(AFLP);第 3 类是核苷酸多态性(SNP)。DNA 标记在马铃薯种质资源遗传多样性分析、QTL 定位及遗传图谱构建、亲缘关系鉴定、分子标记辅助选择等方面具有广泛的应用。此外,许多目标性状基因的功能标记与目标性状基因紧密连锁,应用 SNP 分子标记可以对目标性状进行关联分析。因此,通过测序开发高通量的 SNP 标记用于马铃薯基因组选择育种以及预测候选基因和全基因组关联分析将是重要研究方向。

**2.4 转录组学** 转录组是转录后所有 mRNA 的总称。转录组测序可以有效排除看家非编码 RNA 干扰,通过一次测序获得细胞内几乎所有重要基因的表达参数。高通量转录组测序技术能够在单核苷酸水平对任意物种的整体转录活动进行检测,提供最全面的转录组信息,结合生物学信息分析,获得更高效的有用信息。有报道以马铃薯抗旱材料陇薯 3 号为试验材料,提取干旱处理不同时间和对照材料叶片的总 RNA,进行 Solexa 高通量测序分析,获得并验证了 2 个与干旱逆境胁迫的响应候选基因 *ERF1* 和 *ATHB12*<sup>[17]</sup>。因此,转录组学为揭示马铃薯抗逆境机理和发掘抗逆基因提供了新方法。

**2.5 MicroRNAs** MicroRNAs (miRNAs) 是一类在生物体内普遍存在的非编码、长度约 16~29nt 的小分子 RNA。通过对植物 miRNAs 预测和验证表明植物体在逆境胁迫下,上调或下调相关 miRNAs 表达,参与植物逆境生理调节。此外,植物 miRNA 还能够调控植物生长发育及 miRNAs 和 siRNAs 的生物合成和功能,参与植物信号转导、病害和环境胁迫响应。随着植物 miRNAs 研究的不断深入,开发出了许多植物 miRNAs 数据库,包含大量已发表的植物 miRNAs 信息。用生物信息学方法在全基因组预测特定植物物种新 miRNAs,构建小 RNA cDNA 库进行高通量测序以及小分子 RNA 高通量测序来发现新的 miRNAs,并通过 Northern 杂交、miRNA

芯片、miRNAs Real-time RT-PCR 等方法加以验证。采用数据库信息分析和降解组测序来预测 miRNAs 靶基因。目前,关于马铃薯 microRNAs 相关性研究报道有干旱<sup>[18]</sup>、块茎低温糖化<sup>[19]</sup>、次生代谢<sup>[20]</sup>、耐冻抗氧化<sup>[21]</sup>、微型薯<sup>[22]</sup>。因此,马铃薯逆境胁迫相关 miRNAs 的发现,验证其在生长发育过程中的生物学功能、作用机制与调控途径,并预测相关 miRNAs 的靶基因,构建过表达载体加以验证将成为研究热点领域。

**2.6 基因编辑技术** 作物遗传改良上应用的基因组编辑技术主要包括 ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas 系统 3 种类型。其中 CRISPR-Cas 系统包括 CRISPR-Cas9、CRISPR-Cpf1、CRISPR-C2c1 和 CRISPR-C2c2 等亚类型,CRISPR-Cas9 应用较多<sup>[23]</sup>。CRISPR-Cas9 基因编辑技术是基于细菌或古细菌 CRISPR 介导的获得性免疫系统衍生而来,由一段 RNA 通过碱基互补配对识别 DNA,指导 Cas9 核酸酶切割识别的双链 DNA,诱发同源重组或非同源末端链接,进而实现在目的 DNA 上进行编辑,并于 2013 年和 2015 年两次入选美国《科学》评选的十大科学突破。CRISPR-Cas9 基因编辑技术已在人细胞系、酵母、果蝇、线虫等有关基因完成编辑<sup>[24]</sup>,而在作物育种中的作用机制是抗性、基因敲除、激活或者抑制靶基因 3 种方式,在拟南芥、水稻、烟草、苹果、玉米等植物中有效利用<sup>[25]</sup>。CRISPR-Cas9 蛋白和 gRNA 组装成的核糖核蛋白复合体(RNP)被应用于小麦、玉米的 DNA-free 基因编辑<sup>[26]</sup>。有研究报道利用 RNP 实现了马铃薯的 DNA-free 基因编辑,研究人员选取合成直链淀粉的关键酶,颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)作为靶标,通过原生质体分离、转染和分化等步骤将 RNP 导入马铃薯,2%~3% 株系的所有 4 个 GBSS 等位基因全部突变,完全消除了酶活性<sup>[27]</sup>。张筱<sup>[28]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术构建了编辑 *StCRK1* 基因的 2 个载体,*StCRK2* 基因的 1 个载体,为研究马铃薯 *CRK* 基因功能奠定了基础。因此,基因编辑技术为马铃薯中靶基因定向突变提供了新的途径,将成为创新马铃薯育种材料新的研究领域,为马铃薯精准分子育种提供新思路。

### 3 马铃薯分子育种技术展望

马铃薯优良品种培育一直是育种学家努力的方向。目前马铃薯分子育种技术为选育抗病、抗旱、



耐低温糖化、品质改良和专用型品种马铃薯提供了新的思路和方法。在充分挖掘马铃薯种质资源的基础上开展分子育种研究,同时与常规育种相结合,加强科研院所和企业的科研攻关,为马铃薯育种提供理论依据和技术支持。不断选育适合国内不同生态条件的专用型品种和符合市场需求的优良品种,为培育马铃薯新品种提供有效路径和支撑点,能够有效保障马铃薯增产、稳产、丰产,服务农业现代化和乡村振兴战略。

### 参考文献

- [1] 屈冬玉,谢开云. 中国马铃薯产业的可持续发展. 农产品市场周刊, 2015 (29): 26
- [2] 刘旭,李立会,黎裕,方沟. 作物种质资源研究回顾与发展趋势. 农学学报,2018,8 (1): 1-6
- [3] 李彦军,耿伟,史超,许士霖. 马铃薯种质资源现状及发展对策. 中国果菜,2019,39 (8): 61-63,67
- [4] 余斌,杨宏羽,王丽,刘玉汇,白江平,王蒂,张俊莲. 引进马铃薯种质资源在干旱半干旱区的表型性状遗传多样性分析及综合评价. 作物学报,2018,44 (1): 63-74
- [5] 周俊. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 试管块茎形成的 QTL 定位及遗传分析. 武汉:华中农业大学,2014
- [6] Xu Q F, He Q, Li S, Tian Z D. Molecular characterization of *StNAC2* in potato and its overexpression confers drought and salt tolerance. Acta Physiol Plant, 2014, 36: 1841-1851
- [7] 周香艳,杨江伟,唐勋,文义凯,张宁,司怀军. amiRNA 技术沉默 C-3 氧化酶编码基因 *StCPD* 对马铃薯抗旱性的影响. 作物学报, 2018, 44 (4): 512-521
- [8] Bai J P, Mao J, Yang H Y, Khan A, Fan A Q, Liu S Y, Zhang J L, Wang D, Gao H J, Zhang J L. Sucrose non-ferment 1 related protein kinase 2 (*SnRK2*) genes could mediate the stress responses in potato (*Solanum tuberosum* L.). BMC Genetics, 2017, 18: 41
- [9] 李飞. 马铃薯耐冻相关基因克隆与功能分析. 北京:中国农业科学院,2013
- [10] Liu X, Zhang C, Ou Y B, Lin Y, Song B T, Xie C, Liu J, Li X Q. Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, *StvacINV1*, regulates cold-induced sweetening of tubers. Molecular Genetics and Genomics, 2011, 286: 109-118
- [11] 马瑞,张宁,杨江伟,朱熙,姚磊,武亮亮,司怀军. 马铃薯 *SINCE1* 基因过表达载体的构建及其遗传转化. 分子植物育种, 2017, 15 (1): 174-179
- [12] Yang X, Liu F, Zhang Y, Wang L, Cheng Y Y. Cold-responsive miRNAs and their target genes in the wild eggplant species *Solanum aculeatissimum*. BMC Genomics, 2017, 18: 1000
- [13] Charfeddine S, Charfeddine M, Saïdi M N, Jbir R, Bouzid R G. Potato dehydrins present high intrinsic disorder and are differentially expressed under ABA and abiotic stresses. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2017, 128: 423-435
- [14] Wang J, Yao L, Li B, Meng Y, Ma X, Lai Y, Si E, Ren P, Yang K, Shang X, Wang H. Comparative proteomic analysis of cultured suspension cells of the halophyte *Halogeton glomeratus* by iTRAQ provides insights into response mechanisms to salt stress. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 110
- [15] 邹兰,杨轲,徐先良,汪军成,任盼荣,姚立蓉,孟亚雄,李葆春,马小乐,王化俊. 盐生草 *HgNHX1* 基因启动子的克隆及功能验证. 草业学报, 2017, 26 (11): 57-68
- [16] 王舰. 马铃薯种质资源遗传多样性研究及块茎性状的全基因组关联分析. 北京:中国农业大学,2017
- [17] 司怀军,杨江伟,张宁,周香艳,文义凯,唐勋,武亮亮. 马铃薯抗旱相关基因的发掘及功能鉴定 // 全国农业生化与分子生物学第 15 届学术研讨会会议论文集, 2016
- [18] Shin S J, Lee J H, Kwon H B. Genome-wide identification and characterization of drought responsive MicroRNAs in *Solanum tuberosum* L. Genes Genom, 2017, 39: 1193-1203
- [19] Ou Y B, Liu X, Xie C H, Zhang H L, Lin Y, Li M, Song B T, Liu J. Genome-wide identification of microRNAs and their targets in cold-stored potato tubers by deep sequencing and degradome analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33: 584-597
- [20] Qiao Y, Zhang J J, Zhang J W, Wang Z W, Ran A, Guo H X, Wang D, Zhang J L. Integrated RNA-seq and sRNA-seq analysis reveals miRNA effects on secondary metabolism in *Solanum tuberosum* L. Molecular Genetics & Genomics, 2017, 292: 37-52
- [21] Chi M, Bhagwat B, Lane W D, Tang G L, Su Y Q, Sun R C, Oomah B D, Wiersma P A, Xiang Y. Reduced polyphenol oxidase gene expression and enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) with artificial microRNAs. BMC Plant Biology, 2014, 14: 62
- [22] Natarajan B, Bhogale S, Banerjee A K. The essential role of microRNAs in potato tuber development: a mini review. Indian Journal of Plant Physiology, 2017, 22 (4): 401-410
- [23] 王福军,赵开军. 基因组编辑技术应用于作物遗传改良的进展与挑战. 中国农业科学, 2018, 51 (1): 1-16
- [24] 郭晓强. CRISPR-Cas9 技术发展史: 25 年的科学历程. 自然杂志, 2016, 38 (4): 278-286
- [25] Sharma S, Kaur R, Singh A. Recent advances in CRISPR/Cas mediated genome editing for crop improvement. Plant Biotechnology Reports, 2017, 11: 193-207
- [26] Ran Y D, Liang Z, Gao C X. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. Science China (Life Sciences), 2017, 60 (5): 490-505
- [27] Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält A S, Ohlsson P, Matias N G, Samuelsson M, Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. Physiologia Plantarum, 2018, 164 (4): 378-384
- [28] 张筱. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑马铃薯 *StCRK1/2* 基因体系的初步建立. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2020

(收稿日期: 2021-06-20)