

doi:10.11937/bfyy.20181951

广西樱桃番茄抗晚疫病材料的筛选

刘梦姣¹, 黄庆岛², 龙彪³, 王先裕¹, 欧青青¹, 黄鑫琪¹

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530001; 2. 太平镇农业和农机化技术推广站, 广西 南宁 530001;

3. 六盘水市果树蔬菜工作站, 贵州 六盘水 553004)

摘要:以 26 份樱桃番茄为试材, 采用田间抗性鉴定与分子标记技术, 对樱桃番茄抗晚疫病材料进行检测, 研究了不同材料对晚疫病的抗性, 以期抗晚疫病新品种的选育提供参考依据。结果表明: 26 份田间抗晚疫病材料中, 8 份含抗晚疫病 *Ph-3* 纯合基因, 6 份含抗晚疫病 *Ph-3* 杂合基因, 其中 TL32、TL101 不仅对晚疫病有良好抗性, 还含有抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 基因。

关键词: 广西; 樱桃番茄; 晚疫病; 抗性鉴定

中图分类号: S 641.203.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2019)02-0020-05

番茄晚疫病(tomato late blight)是由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)侵染引起的一种真菌性病害, 在世界范围内已成为番茄主要的、毁灭性的病害^[1-2]。番茄晚疫病在广西时有发生, 常导致番茄减产甚至绝收, 该病害对露地和保护地番茄均能造成严重危害^[3]。目前, 防治晚疫病的主要方法包括栽培制度的调整, 化学农药的喷施以及抗性品种的使用, 然而, 在终年种植番茄的地区, 改变栽培制度防御晚疫病并不实用, 而化学农药的使用又会造成环境污染、农残超标及病原菌抗药性增强等一系列问题^[4]。因此, 选育出经济性状优良的抗性品种并加以应用成为预防番茄晚

疫病有效方法之一。

晚疫病抗病育种始于 1946 年^[5]。之后, 国内外研究者运用多种分子标记的方法鉴别出一系列抗番茄晚疫病不同生理小种的抗性基因, 其中抗性较突出、研究较普遍的为 *ph-1*、*ph-2* 和 *ph-3* 基因^[6]。由于生理小种的不断进化, *ph-1*、*ph-2* 基因的抗性很快被克服, 随后亚洲蔬菜研究与发展中心鉴定出第 3 个抗晚疫病基因 *Ph-3*。*Ph-3* 是一个部分显性基因, 多个生理小种能克服 *Ph-1* 和 *Ph-2*, 但 *Ph-3* 对其具有抗性。目前关于 *Ph-4*、*Ph-5* 基因的报道比较少, 且 *Ph-4*、*Ph-5* 等新基因尚未在生产中得以检验^[7]。

该试验主要运用田间抗性鉴定与分子标记辅助选择相结合的方法, 高效筛选出田间表现为抗病且含抗晚疫病 *Ph-3* 纯合基因樱桃番茄材料, 以期抗晚疫病樱桃番茄优良新品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为课题组经 12 年由国内外收集、多代自交纯化且在常年发生晚疫病的田间长势良好的 26 份樱桃番茄材料。其特性来源见表 1。

第一作者简介: 刘梦姣(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: 183023804@qq.com.

责任作者: 王先裕(1962-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: wang12261962@163.com.

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系试验站资助项目(CARS-25-G-37); 国家重点研发计划资助项目(2017YFD0101902-5); 广西壮族自治区大学生创新创业训练计划资助项目(201810593284); 广西重点研发计划资助项目(2017AB50047)。

收稿日期: 2018-08-08

表 1 供试樱桃番茄材料及来源
Table 1 Cherry tomato material and source

序号 No.	材料 Material	特性 Characteristic	来源 Source
1	TL30	野生番茄	广西资源
2	TL11	栽培番茄	广西百色
3	TL12	栽培番茄	广西百色
4	TL14	栽培番茄	广西百色
5	TL20	野生番茄	广西永福
6	TL101	栽培番茄	日本
7	TL3	栽培番茄	广西田阳
8	TL28-2	栽培番茄	广西永福
9	TL41	栽培番茄	广西资源
10	TL66	野生番茄	广西武鸣
11	TL32	栽培番茄	荷兰
12	TL63	栽培番茄	日本
13	TL5	野生番茄	广西那坡
14	TL25	栽培番茄	日本
15	TL76	栽培番茄	日本
16	TL4	栽培番茄	广西百色
17	TL8-4	野生番茄	广西那坡
18	TL55-2	栽培番茄	福建
19	TL8	野生番茄	广西那坡
20	TL28-3	栽培番茄	广西永福
21	TL102	栽培番茄	日本
22	TL28	栽培番茄	广西永福
23	TL10	栽培番茄	广西平乐
24	TL16	野生番茄	广西资源
25	TL35	栽培番茄	日本
26	TL14	栽培番茄	广西百色

1. 2 试验方法

大田试验于 2017 年 4 月在广西壮族自治区武鸣里建的番茄试验基地进行,分子标记于 2017 年 6 月在广西大学农学院园艺植物分子生物实验室进行。

1. 2. 1 育苗

供试材料均于 2017 年 1 月 25 日播种,72 孔穴盘育苗,播种前使用 100 倍福尔马林浸泡穴盘 10 min 消毒,对种子采取热水-福美双复合消毒方法^[8],基质按草炭:蛭石:珍珠岩=2:1:1 的质量比混合,50%多菌灵可湿性粉剂 3 000 倍液消毒。严格按照穴盘育苗步骤,每穴 1 粒,每份番茄材料播种 150 粒。3 月 2 日定植于武鸣番茄试验大田,随机区组排列,3 次重复,按株距 0. 4 m,行距 0. 5 m 双排种植,单干整枝。

1. 2. 2 抗性鉴定

2017 年 3 月底广西爆发了大面积晚疫病,种植于武鸣实验基地的 100 多份樱桃番茄材料

70%以上受害严重,有 26 份材料长势良好。2017 年 4 月依据晚疫病抗病分级标准^[9]对 26 份材料进行田间抗性调查,番茄晚疫病发病程度分级标准见表 2。2017 年 5 月取番茄幼嫩叶片,采用中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供的植物 DNA 快速提取法提取基因组 DNA。参考 MERK 等^[4]和 MATTHEW 等^[10]设计的 CAPS 引物(表 3)进行抗晚疫病 *Ph-3* 基因分子标记检测;采用中国科学院蔬菜花卉研究所提供的方法对供试材料进行抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 基因分子标记检测,PCR 反应体系、反应程序参照陈宝玲^[7]的方法,所用引物均由华大基因股份有限公司合成。田间调查得到病情指数(DSR)数据后,可根据 DRS 来评价樱桃番茄不同材料的抗感情况。病情指数(DSR)= $\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对级数})/(\text{调查总株数} \times \text{最高级数}) \times 100$ 。免疫(I):DSR=0;高抗(HR):DSR=0~2.5;中抗(MR):DSR=2.6~4.5;感病(S):DSR=4.6~6.0。

表 2 番茄晚疫病分级标准
Table 2 Tomato late blight grading standard

级别 Level	叶子危害程度(叶面积比率) Leaf damage degree/%	茎上的危害(病斑) Hazard on the stem
0	0	无
1	≤5	无
2	6~15	无
3	16~30	无大病斑
4	31~60	茎上有大病斑
5	61~90	茎上病斑蔓延
6	91~100	茎全面被破坏或植株死亡

表 3 番茄 *Ph-3* 与 *Ty-2* 基因分子标记检测引物序列
Table 3 Primers sequence for molecular detection of *Ph-3* and *Ty-2* gene in tomato

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增产物长度 Product length /bp
<i>Ph-3</i>	F:CCAGCTAACCAAACTAAACTATATGTAT	150
	R:GGCTTGCACTTTCTCCCTTAAATACCAAA	300
<i>Ty-2</i>	F:CACACATGTCCTCTATCCTATTAGCTG	300
	R:CGGAGCTGAATTGTATAAACACG	600

1. 3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2013 对试验数据进行汇总并完成图表制作,使用 SPSS 20. 0 软件进行

单因素方差分析,并通过邓肯新复极差法分析各材料间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 供试材料的田间抗性鉴定结果

由表4可知,26份樱桃番茄材料在田间均表现出对晚疫病不同程度的抗性,其中表现免疫的有TL20、TL101等7份,表现高抗的有TL30、TL28等15份,表现中抗的有TL12、TL14等4份。

2.2 供试材料的抗性基因分子标记鉴定结果

如图1所示,TL20、TL101等8份材料在150 bp左右有条带,表示其含抗晚疫病 *Ph-3* 纯合基因;TL30、TL5等6份材料在150 bp及300 bp处均有条带,表示其含抗晚疫病 *Ph-3* 杂合基因;其它材料只在300 bp处有条带,说明其不含抗晚疫病 *Ph-3* 基因。

如图2所示,TL101、TL32、TL35这3份材料在300 bp处有条带,表明其含抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 纯合基因;TL12、TL102在300 bp与600 bp处均有条带,说明其含抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 杂合基因;其它材料只在600 bp处有条带,表明其不含抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 基因。

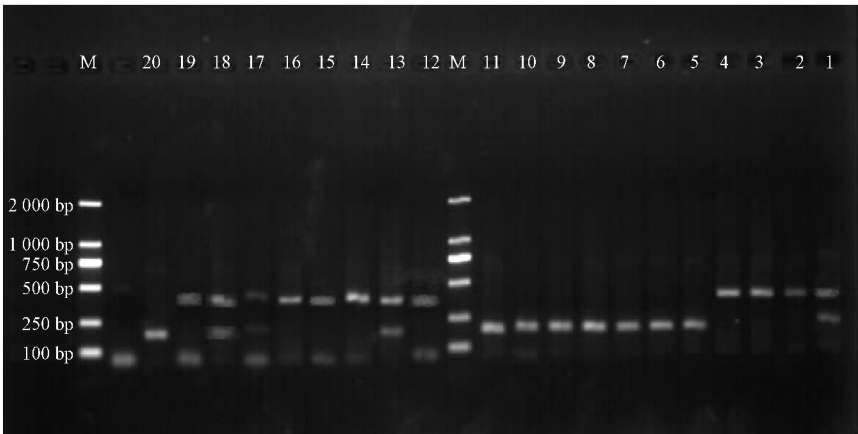
表4 供试材料田间抗性与分子标记鉴定结果

Table 4 Field resistance and molecular marker identification results

序号	材料	病情指数(DSR)	分子鉴定	Molecular identification
No.	Material	Condition index	<i>Ph-3</i>	<i>Ty-2</i>
1	TL30	0.53HR	+	—
2	TL11	2.13HR	—	—
3	TL12	3.53MR	—	+
4	TL14	3.00MR	—	—
5	TL20	0.00I	+	—
6	TL101	0.00I	+	+
7	TL3	0.46HR	+	—
8	TL28-2	1.20HR	+	—
9	TL41	0.00I	+	—
10	TL66	0.00I	+	—
11	TL32	0.00I	+	+
12	TL63	4.40MR	—	—
13	TL5	0.73HR	+	—
14	TL25	3.87MR	—	—
15	TL76	0.20HR	—	—
16	TL4	2.20HR	—	—
17	TL8-4	2.33HR	+	—
18	TL55-2	0.40HR	+	—
19	TL8	1.80HR	—	—
20	TL28-3	0.13HR	+	—
21	TL102	1.73HR	—	+
22	TL28	0.60HR	+	—
23	TL10	0.00I	—	—
24	TL16	0.00I	+	—
25	TL35	1.73HR	—	+
26	TL14	1.13HR	—	—

注:“+”表示抗性基因纯合;“+ —”表示抗性基因杂合;“—”表示不含抗病基因。

Note: ‘+’ indicates that the resistance gene is homozygous; ‘+ —’ indicates that the resistance gene is heterozygous; ‘—’ indicates that the resistance gene is not contained.



注:编号对应材料名称见表4;M, Marker 2 000。下同。

Note: The number corresponding to the material name is shown in Table 4; M, Marker 2 000. The same below.

图1 供试材料抗晚疫病基因 *Ph-3* 的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR detection results of late blight resistance gene *Ph-3*

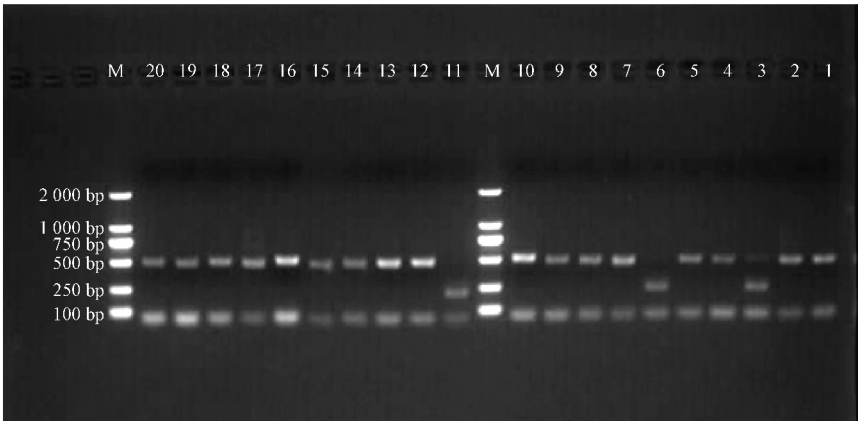


图 2 供试材料抗黄化曲叶病毒病基因 *Ty-2* 的 PCR 检测结果
Fig. 2 PCR detection results of anti-yellowing leaf curl virus disease gene *Ty-2*

2.3 含抗晚疫病 *Ph-3* 基因纯合材料的主要性状调查

从表 5 可以看出,8 份田间表现为抗且含抗晚疫病 *Ph-3* 基因纯合材料中,TL41、TL32 表现为有限生长型,其它均为无限生长型;单果质量 TL3 最大达 30.5 g,TL20 最轻为 10.8 g;TL41

硬度最高为 0.80 kg·cm⁻²;除 TL32 表现为中度裂果,其余均为不易裂果或无裂果现象;果形指数 TL66 最大为 1.95,与其它组合差异显著;在果色上 TL3 为橙色,TL32 为粉果,其它均为红果。在风味上 TL101、TL28-2、TL28-3 为甜酸外,其余均为酸甜。

表 5 抗晚疫病基因纯合材料的主要性状
Table 5 Main traits of homozygous materials resistant to late blight

材料 Material	生长类型 Growth type	单果质量 Single fruit weight/g	硬度 Firmness/(kg·cm ⁻²)	裂果性 Fruit cracking	果形指数 Index of fruit shape	果色 Fruit color	风味 Taste
TL20	无限	10.8g	0.55c	无	1.05d	红	酸甜
TL101	无限	29.0b	0.72b	无	0.98ef	红	甜酸
TL3	无限	30.5a	0.53c	无	1.00e	橙	酸甜
TL28-2	无限	16.1de	0.74ab	无	0.96f	红	甜酸
TL41	有限	24.6c	0.80a	无	1.17b	红	酸甜
TL66	无限	12.3f	0.58c	不易裂	1.95a	红	酸甜
TL32	有限	17.0d	0.45d	中	0.83g	粉	酸甜
TL28-3	无限	15.4e	0.70b	无	1.13c	红	甜酸

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

3 结论与讨论

目前来看,番茄晚疫病的抗病资源并不丰富,且多属于野生番茄,经济性状不够优良,抗病基因的转育需要较长的周期。另外,国内用来转育的番茄抗源材料的抗性多属质量性状,易受生理小种的变化而迅速丧失。因此,进一步深入挖掘抗病资源,丰富抗源材料的种类和类型,仍是今后番

茄晚疫病抗病育种研究的重点^[11]。
抗病育种工作的前提是掌握抗性资源,采用常规育种与生物技术相结合的多种育种方法对国内现存番茄品种资源进行抗性鉴定,高度重视抗源材料的丰产性及品质表现,同时注意兼抗或多抗材料的鉴定筛选,是番茄抗病育种今后的研究方向^[12]。赵娜^[13]对国内近年选育的 18 个樱桃番茄品种进行田间观测,得出 Y-13 的可溶性固形物含量及产量相对较高、抗病性较好(高抗番茄黄

化曲叶病同时抗叶霉病与晚疫病),但其对番茄晚疫病的研究只限于田间观测,没有通过分子标记检验。此外,王国华等^[14]早年选育出的樱桃番茄新品种“红宝石”抗病毒病和晚疫病,但其对番茄晚疫病的抗性研究也只依据田间病情指数,缺乏分子标记辅助。

与前人研究相比,该研究通过田间鉴定与分子标记辅助育种技术相结合,对国内外收集的抗病资源进行了挖掘,得到8份田间表现抗病且含抗晚疫病基因 *Ph-3* 纯合材料,此8份材料经课题组收集以来均通过6代以上自交纯化,性状稳定,其中 TL101、TL32 不仅对晚疫病表现出高抗,还含有抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 基因,可作为优良育种材料。但该研究缺少进一步接种试验验证。接下来,可对抗病基因纯合的材料进行室内接种试验,进一步确认其抗性,再与课题组多年选育的优良自交系进行杂交配组,以期能选育出抗晚疫病的樱桃番茄优良新品种。

参考文献

- [1] ELSAYED A Y, DA S H D, MIZUBUTI E S G, et al. Combining the monogenic and polygenic resistant genes to late blight in tomato[J]. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2011, 3(10): 251-259.
- [2] ZHANG C Z, LIU L, ZHENG Z, et al. Fine mapping of the *Ph-3* gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(10): 2643-2653.
- [3] 李君明, 宋燕, 杨宇宏, 等. 番茄苗龄对晚疫病生理小种 T1 的抗性表现差异研究[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 231-233.
- [4] MERK H I, ASHRAFI H, FOOLAD M R. Selective genotyping to identify late blight resistance genes in an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium* [J]. Euphytica, 2012, 187(1): 63-75.
- [5] RICHARDS M C, RAYMOND W, BARRATT A. Partial survey of the genus *Lycopersicon* for resistance to *Phytophthora infestans* [J]. Plant Disease Reporter, 1946, 30(1): 16-20.
- [6] CHUNWONGSE J, CHUNWONGSE C, BLACK I, et al. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight in tomato [J]. Journal of Horticultural & Biotechnology, 2002, 77(3): 281-286.
- [7] 陈宝玲. 多抗番茄自交系抗性基因检测与杂交组合试验[D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- [8] 祁云, 梁安兰, 王平. 番茄穴盘育苗技术[J]. 安徽农学通报, 2015(13): 61-67, 69.
- [9] 康立功. 番茄晚疫病病原菌鉴定及抗病种质资源筛选[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- [10] MATTHEW D R, MOHAMMED A T, DILIP R P, et al. Marker-assisted selection for coupling phase resistance to tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato [J]. Hort Science, 2010, 45(10): 1424-1428.
- [11] 邱夷鹏, 张子君, 李海涛, 等. 番茄晚疫病抗病育种及分子生物学研究进展[J]. 中国蔬菜, 2009(10): 1-6.
- [12] 赵统敏, 邹茶英, 余文贵, 等. 番茄晚疫病及其抗病育种研究[J]. 江苏农业科学, 2006, 22(2): 175-180.
- [13] 赵娜. 普通粉果番茄和樱桃番茄品种的综合评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [14] 王国华, 尹庆珍, 吕清燕, 等. 樱桃番茄新品种红宝石的选育[J]. 河北农业科学, 2007(4): 94-95.

Screening of Cherry Tomatoes With Late Blight Resistance in Guangxi

LIU Mengjiao¹, HUANG Qingdao², LONG Biao³, WANG Xianyu¹, OU Qingqing¹, HUANG Xinqi¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530001; 2. Taiping Town Agricultural and Agricultural Mechanization Technology Extension Station, Nanning, Guangxi 530001; 3. Liupanshui Fruit Tree Vegetable Workstation, Liupanshui, Guizhou 553004)

Abstract: The 26 cherry tomato resources were used as materials, the resistance of different materials to late blight was studied by identification in the field combined with molecular marker method in order to provide reference for the breeding of new varieties resistant to late blight. The results showed that 26 tomato materials had the resistance to late blight in the field, 8 of 26 materials with *Ph-3* homozygote gene and 6 of 26 with *Ph-3* heterozygote gene, of which TL32 and TL101 had not only the good resistance to late blight, but also the yellow leaf curl virus disease-resistance with *Ty-2* gene.

Keywords: Guangxi; cherry tomato; late blight; resistance identification