

番茄抗黄化曲叶病毒病杂交后代比较

张杰,王先裕*,荆子桓,孙岚明 (广西大学农学院,广西南宁 530000)

摘要 [目的]筛选黄化曲叶病毒病抗性高的番茄杂交子1代。[方法]通过番茄杂种子1代的栽培,观测各组合的田间生长情况,对各组合果实营养品质指标进行测定和分析,采用分子标记等方法对其黄化曲叶病毒病抗性进行鉴定。[结果]杂交子1代 TW002 和 TW008 果实品质较优,在加工、运输、贮藏方面具有优势;与 TW002 相比,TW008 的果实商品率更高、营养品质更好。黄化曲叶病毒病抗性基因检测结果表明,Ty-1 中 TW001、TW004、TW008 和 TW010 为抗病材料,而 TW003、TW005、TW006、TW009 为杂合材料,TW002、TW007 为感病材料;Ty-2 中均为感病材料;Ty-3 中 TW001、TW002、TW004、TW007、TW009 为抗病杂合材料,TW003、TW005、TW006、TW008 和 TW010 为感病纯合材料。[结论]该研究可为抗黄化曲叶病毒番茄材料的选育提供理论依据。

关键词 番茄黄化曲叶病毒;分子标记;杂交子1代;选择;营养品质

中图分类号 S641.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)29-0014-03

Comparison on Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Disease of Hybrid Offspring
ZHANG Jie, WANG Xian-yu*, JING Zi-huan et al (College of Agronomy, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530000)
Abstract [Objective] To screen the tomato hybrid F₁ with high resistance to tomato yellow leaf curl disease. [Method] Through the cultivation of tomato hybrid F₁, field growth situation of each combination was observed. The fruit nutritional quality index of each combination was detected and analyzed. Molecular marker and other methods were used to identify the resistance to yellow leaf curl disease. [Result] Fruit qualities of F₁ TW002 and TW008 were relatively better. Genetic testing results of yellow leaf curl disease showed that TW001, TW004, TW008 and TW010 in Ty-1 were all resistant materials; TW001, TW002, TW004, TW007 and TW009 in Ty-3 were disease-resistant hybrid materials; TW003, TW005, TW006, TW008 and TW010 were infected homozygous materials. [Conclusion] This research provides theoretical foundation for the resistance breeding of tomato yellow leaf curl disease.
Key words Tomato yellow leaf curl virus; Molecular marker; Hybrid F₁; Selection; Nutritional quality

番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller.)为双子叶植物纲茄科(Solanaeae)番茄属(*Lycopersion*)植物。番茄营养丰富,富含人们正常生活所需的各种物质,如蛋白质、碳水化合物、维生素C、胡萝卜素和番茄红素等^[1]。番茄黄化曲叶病是由番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)引起的,该病毒主要通过烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传染给番茄^[2]。该病传播迅速、范围广、危害程度严重、持续久,严重影响番茄的品质和产量。目前番茄黄化曲叶病毒病的防治措施主要是使用抗性品种和农药。长期使用农药易出现农药残留、土壤板结、环境污染、毒素积累等问题,不利于生态农业的发展以及环境的保护,因此现在多采用综合生物防治的方法来防治番茄黄化曲叶病毒病^[3]。1994年,国外学者研究发现智利番茄是最好的番茄抗黄化曲叶病毒病资源^[4]。Vidavsky等^[5]从番茄中发现抗黄化曲叶病毒基因。Zamir等^[6]利用RFLP标记,首次将番茄抗黄化曲叶病的基因定位在6号染色体上(位于着丝粒端),并将其命名为Ty-1,且RFLP标记方法也被应用于Ty-1的抗病辅助育种中。Hanson等^[7]以野生多毛番茄为材料,利用RFLP标记将番茄抗黄化曲叶病的基因定位在了11号染色体的长臂终端上,并将其命名为Ty-2,该方法也被应用于Ty-2的抗病辅助育种中。Ji等^[8]以智利番茄为材料,利用RAPD标记确定了抗

性位点在第6号染色体上,并将抗性基因命名为Ty-3和Ty-3a。目前,我国番茄黄化曲叶病毒病的危害日趋严重,且番茄抗黄化曲叶病毒病的材料品种较少。基于此,笔者以番茄杂交子1代为研究对象展开试验,观测不同组合材料的田间生长情况、农艺性状表现,利用分子标记等方法对其黄化曲叶病毒病抗性进行鉴定,以期筛选出黄化曲叶病毒病抗性高的番茄杂交子1代,为抗黄化曲叶病毒番茄材料的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验所用的杂交子1代按TW001~TW010进行编号。这10份材料均由广西大学农学院园艺系番茄课题组提供;对照组(CK)为当前市场上种植面积较为广泛的“艾比利”品种。

1.2 果实营养品质测定项目和方法 每个小区随机抽取3个第2穗外观较好的番茄果实,重复3次,取平均值。果实可溶性固形物含量采用手持折光仪测定^[9];可滴定酸含量采用酸碱滴定法(GB10474-89)测定^[10];抗坏血酸含量采用2,6-二氯酚靛酚滴定法测定^[11];可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定^[12];番茄红素含量采用萃取比色法测定;计算糖酸比(可溶性糖与可滴定酸的比值);利用隶属函数^[13]判定果实综合品质,其基本原理是根据评价的标准来构造多个隶属函数,然而每一个评价指标在各个隶属函数的对应程度不同,通过模糊计算,可以得到综合指标对各个隶属函数的数值得分影响。

1.3 番茄抗性基因的检测

1.3.1 试剂和仪器。试剂:2×CTAB(pH 8.0)、NaCl、ED-AB、Tris-d(pH 8.0)、氯仿、异丙醇、醋酸钠、琼脂粉、液氮、无水乙醇、TE缓冲液、dNTP、TEA溶液、Taq DNA聚合酶、

基金项目 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻14121006-5-2,桂科合14123001-3,桂科攻13254002-2);国家大宗蔬菜产业技术体系桂林综合试验站项目(CARS-25-G-37);百色国家农业科技园区建设示范项目(桂科能1598022-1-1);番茄新品种选育及示范(BB160112)。

作者简介 张杰(1994-),男,广西玉林人,本科生,专业:园艺。*通讯作者,研究员,从事番茄抗病育种与新品种选育。

收稿日期 2016-08-17

MgCl₂、BUFFER、6 × Loading Buffer、染色碱、2 000 DNA Marker、MIX 酶、nuclear free water。仪器:研钵、水浴锅、振荡机、移液枪、点样板、冰箱、磨样机、Sigma1 冷冻离心机、ABI 2720 PCR 仪、Q5000 型核酸蛋白仪、君意 JY600C 型电泳仪、微波炉、ChemiDoc MP 型凝胶成像系统。

1.3.2 DNA 的提取。采用改良的 CTAB 法对番茄材料基因组的 DNA 进行提取。

1.3.3 PCR 反应体系。①黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty* - 1 参照华中农业大学番茄课题组开发的双重 SNP 标记^[14];反应体系 20 μL: 2.0 μL 的 10 × Buffer with Mg²⁺, 0.4 μL 的 dNTPs(2.5 mM), 正向引物和反向引物(100 μmol/L)各 0.2 μL, 1.0 μL 的 DNA 模板(200 ng/μL), 0.2 U 的 *Taq* DNA 聚合酶, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性, 1 min, 58 ℃ 复性, 1 min, 72 ℃ 延伸, 1 min, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保持。②黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty* - 2、*Ty* - 3 参照中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供引物程序进行检测。反应体系 10 μL: 5 μL 的 2 × Go *Taq* Green Master Mix, 正向引物和反向引物各 0.25 μL, 3.50 μL 的灭菌 ddH₂O, 1.00 μL 的 DNA 模板(1 000 ng/μL)。PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性, 40 s, 55 ℃ 复性, 40 s, 72 ℃ 延伸, 1 min 30 s, 32 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 8 min, 16 ℃ 保存。

1.3.4 PCR 及酶切产物检测。PCR 产物及酶切产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上 220 V 恒压电泳 15 min, 结果采用 2 000 DNA Marker 染色, ChemiDoc MP 型凝胶成像系统拍照。

1.4 数据处理 采用 Excel 2007 以及 SPSS 20.0 软件对数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 番茄果实品质比较 由表 1 可知, TW001 ~ TW010 番茄果实中的可溶性固形物含量在 6.05% ~ 7.64%, 其中 TW008 果实中可溶性固形物含量最高, 为 7.64%, TW003 果实中可溶性固形物含量最低, 为 6.05%, TW001 与 TW007 之间差异不显著, 其余杂交子 1 代之间差异显著; 番茄果实中的可滴定酸含量在 327.89 ~ 657.55 mg/100 g, 其中 TW004 果实中可滴定酸含量最高, 为 657.55 mg/100 g, TW001 果实中可滴定酸含量最低, 为 327.89 mg/100 g, TW001 与 TW004、TW007 之间均差异显著, 其他材料间均差异不显著; 番茄果实中番茄红素含量在 24.72 ~ 46.79 mg/100 g, 其中 TW008 果实中番茄红素含量最高(为 46.79 mg/100 g), TW003 果实中番茄红素含量最低(为 24.72 mg/100 g), TW001、TW003、TW005、TW007、TW008、TW010、CK 之间均差异显著, TW002 与 TW006 之间差异不显著; 番茄果实中抗坏血酸含量在 13.35 ~ 31.72 mg/100 g, 其中 TW008 果实中抗坏血酸含量最高, TW003 果实中抗坏血酸含量最低, 10 个杂交子 1 代材料中除 TW010 外, 其余材料之间均差异显著; 番茄果实中可溶性糖含量在 297.66 ~ 526.80 mg/100 g, 其中 TW002 果实中可溶性糖含量最高, TW006 果实中可溶性糖含量最低, 这 10 个杂交子 1 代材料之间均差异显著; 番茄果实中糖酸比在 0.49 ~ 1.22, 其中 TW001 果实中糖酸比最高, TW007 果实中糖酸比最低, 这 10 个杂交子 1 代材料之间均差异显著。根据隶属函数值可知, TW008 得分最高, 说明其番茄果实品质最好, TW001、TW002、TW004、TW005、TW007、TW008、TW009 和 TW010 的数值均高于 CK, 因此, 这 8 个材料均可在广西地区进行推广种植。

表 1 大果番茄营养品质对比
Table 1 Comparison of the nutritional quality of tomato

组合材料 Combination of materials	可溶性固 形物含量 Soluble solids content // %	可滴定酸含量 Titratable acid content mg/100 g	番茄红素含量 Lycopene content mg/100 g	抗坏血酸含量 Ascorbic acid content mg/100 g	可溶性糖 Soluble sugar mg/100 g	糖酸比 Sugar-acid ratio	隶属函数值 Membership function
TW001	6.46 ± 0.13 f	327.89 ± 6.50 c	38.19 ± 1.77 c	25.00 ± 0.17 c	400.60 ± 7.74 f	1.22 ± 0.04 a	3.20
TW002	7.20 ± 0.12 b	467.32 ± 6.01 abc	31.50 ± 1.21 ef	24.31 ± 0.55 d	526.80 ± 4.61 a	1.13 ± 0.02 b	4.02
TW003	6.05 ± 0.12 i	529.19 ± 9.64 ab	24.72 ± 0.79 i	13.35 ± 0.33 i	392.15 ± 6.95 f	0.74 ± 0.01 f	1.70
TW004	6.83 ± 0.09 d	657.55 ± 5.90 a	30.25 ± 1.02 fgh	18.27 ± 1.01 f	355.69 ± 6.78 h	0.54 ± 0.01 g	2.50
TW005	6.69 ± 0.16 e	577.71 ± 0.59 bc	44.04 ± 2.04b	16.34 ± 0.99 h	486.15 ± 7.27 c	0.84 ± 0.01 e	3.70
TW006	6.15 ± 0.11 h	539.28 ± 5.12 ab	30.88 ± 1.27 efg	20.52 ± 1.30 e	297.66 ± 4.08 j	0.55 ± 0.01 g	1.77
TW007	6.50 ± 0.19 f	617.42 ± 5.12 a	36.59 ± 1.50 d	18.25 ± 0.62 f	304.52 ± 4.26 i	0.49 ± 0.01 h	2.24
TW008	7.64 ± 0.13 a	387.31 ± 5.30 bc	46.79 ± 2.72 a	31.72 ± 0.95 a	382.13 ± 8.19 g	0.99 ± 0.03 d	4.23
TW009	6.26 ± 0.05 g	543.38 ± 5.38 ab	29.79 ± 0.97 gh	27.21 ± 0.46 b	461.79 ± 3.82 d	0.85 ± 0.01 e	3.27
TW010	6.98 ± 0.07 c	496.85 ± 5.86 abc	29.11 ± 0.55 h	24.86 ± 0.67 cd	514.28 ± 8.16 b	1.04 ± 0.01 c	3.75
CK	5.23 ± 0.10 j	379.22 ± 10.07 bc	32.06 ± 2.10 e	16.99 ± 0.33g	425.46 ± 2.02 e	1.12 ± 0.03 b	2.11

注: 同列不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。
Note: Different lowercases in the same column indicated significant differences at 0.05 level between treatments.

2.2 抗性鉴定分析

2.2.1 黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty* - 1 检测结果。 *Ty* - 1 基因的双重 SNP 标记可检测出抗病纯合、抗病杂合、感病纯合材料, 当纯合抗病材料经过 PCR 电泳过后, 会出现 1 条

965 bp 的条带, 杂合抗性材料会出现 965 bp 和 1 343 bp 2 条 DNA 带, 而纯合感病材料会出现 1 条 1 434 bp 的条带。由图 1 可知, TW001、TW004、TW008 和 TW010 为抗病材料, 而 TW003、TW005、TW006、TW009 为杂合材料, TW002、TW007

为感病材料。

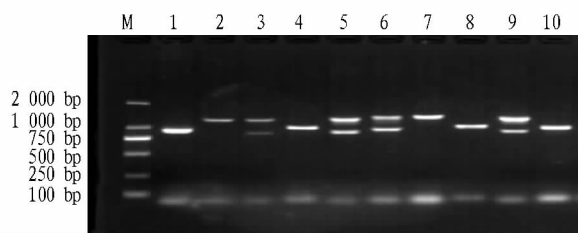


图1 黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-1* 检测结果

Fig. 1 Detection results of resistance gene *Ty-1* of yellow leaf curl virus

2.2.2 黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-2* 检测结果。含有黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-2* 的材料可扩增出 300 bp 的条带,不含黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-2* 的感病材料则扩增出 600 bp 的条带。由图 2 可知,所有的材料均为感病材料。

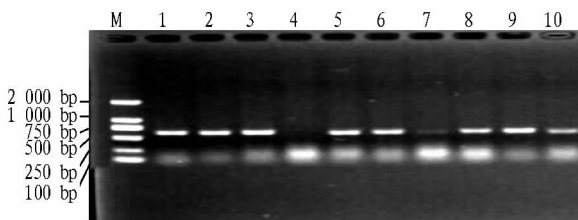


图2 黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-2* 检测结果

Fig. 2 Detection results of resistance gene *Ty-2* of yellow leaf curl virus

2.2.3 黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-3* 检测结果。含有黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-3* 的材料可扩增出 500 bp 的条带,不含黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-3* 的材料可扩增出 320 bp 的条带。由图 3 可知,TW001、TW002、TW004、TW007、TW009 为抗病杂合材料,TW003、TW005、TW006、TW008 和 TW010 为感病纯合材料。

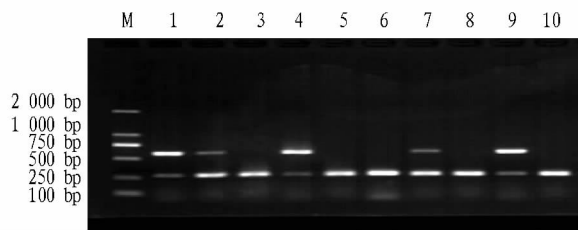


图3 黄化曲叶病毒病抗性基因 *Ty-3* 检测

Fig. 3 Detection results of resistance gene *Ty-3* of yellow leaf curl virus

3 结论与讨论

(1) 该试验结果表明,杂交子 1 代 TW002 和 TW008 的可

滴定酸、可溶性糖、抗坏血酸含量均较高,其口味、风味、甜酸比、酸碱度等较优,更有益于贮藏,在加工、运输方面均有优势,与 TW002 相比,TW008 的果实商品率更高、营养品质更好。与对照品种“艾比利”相比,10 个杂交子 1 代中有 8 个得分高于“艾比利”,尤其是 TW008,适合大面积推广。

(2) 黄化曲叶病毒病抗性基因检测结果表明,*Ty-1* 中 TW001、TW004、TW008 和 TW010 为抗病材料,而 TW003、TW005、TW006、TW009 为杂合材料,TW002、TW007 为感病材料;*Ty-2* 中均为感病材料;*Ty-3* 中 TW001、TW002、TW004、TW007、TW009 为抗病杂合材料,TW003、TW005、TW006、TW008 和 TW010 为感病纯合材料。TW001、TW004 为纯合体且抗 *Ty-1* 和 *Ty-3*,可作为亲本材料;TW003、TW005、TW006、TW009 均为杂合材料,需继续纯化;TW002、TW007 材料经济性一般,但感 *Ty-1*、抗 *Ty-3*。TW008 感病但经济性好,可作母本,TW010 感病又无性状,应该淘汰。

参考文献

- [1] 程智慧. 园艺学概论[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2010:183-188.
- [2] PENG J Y, ZHAN L B, DONG F Q, et al. A comparative study of chromatographic methods for separating chemical compounds from *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl roots[J]. Separation and purification technology, 2008, 59(3): 262-269.
- [3] 丁雪玲. 番茄黄化曲叶病毒病的生物防治研究[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [4] MICHELSON I, ZAMIR D, CZOSNEK H. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*[J]. Phytopathology, 1994, 84(9): 928-933.
- [5] VIDAUSKY F, CZOSNEK H. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*[J]. Phytopathology, 1998, 88(9): 910-914.
- [6] ZAMIR D, EKSTEIN-MICHELSON I, ZAKAY Y, et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*[J]. Theoretical and applied genetics, 1994, 88(2): 141-146.
- [7] HANSON P M, BERNACCHI D, GREEN S, et al. Mapping of a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line[J]. Journal of the American society of horticultural science, 2000, 125(1): 15-20.
- [8] JI Y F, SCOTT J W, SCHUSTER D J, et al. Molecular mapping of *Ty-4*, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato[J]. Journal of the American society for horticultural science, 2009, 134(2): 281-288.
- [9] 罗颖. 番茄可溶性固形物含量与相关生理生化指标关系研究[D]. 石河子:石河子大学,2010.
- [10] 李玲, 李娘辉, 蒋素梅, 等. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京:科学出版社,2009:48-59.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验手册[M]. 北京:高等教育出版,2001:130, 134-138.
- [12] 毕颖, 刘燕, 张平, 等. 萘酚比色法测定大豆乳清废水中总糖含量[J]. 大豆通报, 2006(3): 24-25.
- [13] 韩瑞宏, 卢欣石, 高桂娟, 等. 紫花苜蓿抗旱性主成分及隶属函数分析[J]. 草地学报, 2006, 14(2): 142-146.
- [14] 葛乃蓬, 崔龙, 李汉霞, 等. 番茄抗黄化曲叶病毒基因 *Ty-1* 的双重 SNP 标记的开发[J]. 园艺学报, 2014, 41(8): 1583-1590.

科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。