

# 番茄抗黄化曲叶病毒病近等基因系的选育

田红梅, 王艳, 江海坤, 严从生, 王明霞, 张其安, 方凌\* (安徽省农业科学院园艺研究所, 安徽合肥 230031)

**摘要** [目的]选育番茄抗黄化曲叶病毒病近等基因系。[方法]通过引进含黄化曲叶病毒番茄材料与优良自交系多代回交, 培育抗黄化曲叶病毒病的温室专用骨干亲本系。[结果]经分子鉴定, 选育骨干亲本系抗病材料扩增至抗病基因( $Ty_1$ 、 $Ty_2$  和  $Ty_3$ ), 共获得  $Ty_{13}N-3010-2$ 、 $Ty_{13}N-3010-45$ 、 $Ty_{123}N-3022-21$ 、 $Ty_{123}N-3022-45$  4 份材料田间综合性状表现良好抗病亲本材料, 可直接应用于育种。[结论]为培育抗 TY 病毒病的温室专用品种提供了骨干亲本。

**关键词** 番茄; 黄化曲叶病毒病; 近等基因系

**中图分类号** S641.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00125-03

## Breeding of Yellow Leaf Curl Virus Resistance of Tomato Near-isogenic Lines

**TIAN Hong-mei et al** (Institute of Horticulture, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract** [Objective] The aim was to breed the yellow leaf curl virus resistance of tomato near-isogenic lines. [Method] Tomato greenhouse special backbone parent line which were resistant to yellow leaf curl virus disease were obtained after several tomato materials were introduced to excellent chilling resistance inbred lines by backcrossing for multiple generations. [Result] The molecular identification results showed that all of the backbone parent line materials were amplified the gene of  $Ty_1$ ,  $Ty_2$  and  $Ty_3$ , among them  $Ty_{13}N-3010-2$ ,  $Ty_{13}N-3010-45$ ,  $Ty_{123}N-3022-21$  and  $Ty_{123}N-3022-45$  had better field traits and could be applied breeding directly. [Conclusion] The research result provides backbone parents for cultivating special varieties in greenhouse which are resistant to TY virus.

**Key words** Tomato; Yellow leaf curl disease; Near-isogenic lines

番茄黄化曲叶病毒病 (TYLCVD) 是世界范围内流行的一种毁灭性病毒病, 已成为限制番茄生产的重要因素<sup>[1]</sup>。2007 年以来, TYLCVD 在温室栽培发病最严重, 由于防治困难, 造成的危害大, 导致番茄产量和品质均大幅降低, 安徽北方日光温室发病率在 50% 以上, 部分地区发病率达 100%。目前对 TYLCVD 的防控措施有化学防治、加强田间管理及选育抗病品种等。由于番茄黄化曲叶病毒在自然条件下只能由烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 以持久方式传播, 而烟粉虱繁殖力强, 易产生抗药性, 并且寄主广泛, 化学防治和加强田间管理难度较大, 所以培育优良的抗病品种是防治 TYLCVD 最有效的措施<sup>[2]</sup>。但是生产上缺乏抗 TYLCVD 的适合选育温室品种的骨干亲本。

目前, 已发现 TYLCVD 抗原材料含多种抗性基因 ( $Ty_1$ -、 $Ty_2$ -、 $Ty_3$ -、 $Ty_4$ -、 $Ty_5$ - 等)<sup>[3-7]</sup>, 不同抗原在不同地区表现的抗性水平不同; 如果把多种基因聚合到同一个番茄品系中, 该品系可产生更高抗性。为此, 笔者以安徽省农业科学院园艺研究所收集到的骨干亲本为轮回亲本, 引进含抗病基因的番茄材料, 通过与综合性状优良自交系杂交、回交获得了优良抗病近等基因系, 以期培育抗 TY 病毒病的温室专用品种提供骨干亲本。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 自亚蔬中心引进含有黄化曲叶病毒抗性基因  $Ty_1$   $Ty_3$  和  $Ty_1$   $Ty_2$   $Ty_3$  番茄材料以及安徽省农业科学院园艺

研究所蔬菜育种室育成的骨干亲本系 (表 1)。

表 1 材料编号及来源

材料编号	来源	特性
TY13-09-23-3	亚蔬中心	含 $Ty_1$ 和 $Ty_3$ 基因
TY123-09-2-4	亚蔬中心	含 $Ty_1$ 、 $Ty_2$ 和 $Ty_3$ 基因
TN-3010-2	安徽省农业科学院园艺研究所	耐低温
TN-3022-1	安徽省农业科学院园艺研究所	耐低温

## 1.2 方 法

**1.2.1 近等基因系选育过程。** 试验在安徽省农业科学院园艺研究所蔬菜育种田进行, 以高代稳定骨干亲本系 (TN-3010-2 和 TN-3022-1) 为轮回亲本, 以含黄化曲叶病毒抗性基因  $Ty_1$   $Ty_3$  和  $Ty_1$   $Ty_2$   $Ty_3$  的番茄材料为供体亲本, 2009 年春季配制杂交组合, 获得  $F_1$  代,  $F_1$  代再以稳定骨干亲本系为轮回亲本进行回交获得  $BC_1F_1$  代, 继续回交获得  $BC_2F_1$  代, 同时进行分子标记检测及表型农艺性状调查, 筛选具有纯合抗病基因的后代  $BC_3F_1$ , 继续自交, 获得纯合抗黄化曲叶病毒病骨干亲本系  $BC_3F_2$ 。观察骨干亲本系田间植株性状性相关指标检测, 筛选出具有目标性状的优良亲本系。

**1.2.2 骨干亲本系抗黄化曲叶病毒基因的 PCR 鉴定。** 番茄抗黄化曲叶病毒病  $Ty_1$  基因的 SCAR 标记引物参照 Garcia 等<sup>[8]</sup>设计,  $Ty_2$  基因的标记引物参考 Garcia 等设计<sup>[9]</sup>,  $Ty_3$  基因的标记引物参考 Ji 等设计<sup>[5]</sup>。合成引物见表 2。用改良的 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取番茄叶片的总 DNA, 并以其为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系: DNA 模板 1.0  $\mu$ l, dNTPs (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ l, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ l, 10  $\times$  反应缓冲液 2.0  $\mu$ l,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 1.6  $\mu$ l, *Taq* 酶 0.2  $\mu$ l, 加水至总体积 20.0  $\mu$ l。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳

**基金项目** 国家大宗蔬菜产业技术体系项目; 国家科技支撑计划项目 (2012BAD02B02-16); 安徽省蔬菜产业技术体系项目; 安徽省科技攻关重大专项 (1201a0301009); 安徽省国际科技合作项目 (11030603032)。

**作者简介** 田红梅 (1980 -), 女, 山东无棣人, 助理研究员, 博士, 从事蔬菜育种与分子生物学研究, E-mail: bzthm001@163.com。  
\* 通讯作者, 研究员, 从事茄果类蔬菜品种选育及产业化研究, E-mail: fl\_vege@yahoo.com.cn。

**收稿日期** 2012-11-01

泳分析。

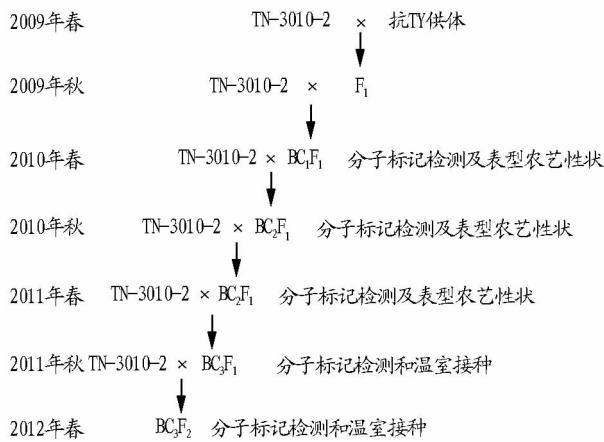
表2  $Ty_1$ 、 $Ty_2$  和  $Ty_3$  基因引物序列

引物	序列	引物	序列
Ty1aF	CAATTATAGGT-GTTTTGGGACATC	Ty2aR	AGTGTACATCCTT-GCCATTGACT
Ty1aR	GTTCAACACTTGGC-CAATGCTTACG	Ty3aF	GGTAGTGGAAAT-GATGCTGCTC
Ty2aF	TGGCTCATCT-GAAGCTGATAGCGC	Ty3aR	GCTCTGCCTATTGTC-CCATATATAACC

**1.2.3 选育抗黄化曲叶病毒病骨干亲本系田间性状调查。**调查果实成熟期番茄植株茎粗、节间长,成熟果实纵径、横径、果肉厚、可溶性糖含量、单果重、始花节位、低温坐果性,统计田间黄化曲叶病毒病发病情况及其他相关性状。以 TN-3010-2 和 TN-3022-1 为对照。

## 2 结果与分析

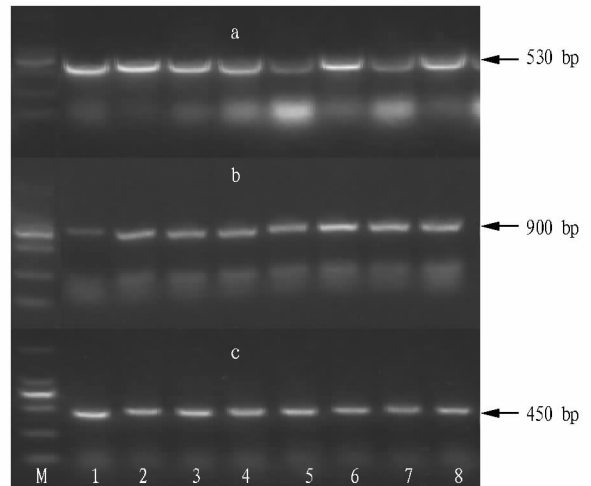
**2.1 近等基因系的构建** 分别以 Ty 13-09-23-3 和 Ty 123-09-2-4 为  $Ty_1$ 、 $Ty_3$  和  $Ty_1$ 、 $Ty_2$ 、 $Ty_3$  来源供体,以 TN-3010-2 和 TN-3022-1 2 个骨干亲本材料为遗传背景供体,自 2009 年开始配制杂交  $F_1$ ,利用连续回交法置换遗传背景,在每个世代的回交过程中,考察茎粗、节间长、果实纵径、果实横径、果肉厚度、可溶性糖含量、低温坐果性、单果重、始花节位等农艺性状与供体表型最相似的单株进行回交,至 2011 年获得 2 个不同遗传背景的  $BC_3F_1$  世代。自  $BC_3F_1$  世代开始,采取回交与自交相结合的方法继续提高背景代换率。2012 年 2 个背景分别获得 8 个候选株系。具体构建过程见图 1。



注:TN-3010-2 为轮回亲本。

图1 番茄抗病 TY 近等基因系的选育流程

**2.2 选育骨干亲本系  $Ty_1$ 、 $Ty_2$  和  $Ty_3$  基因的鉴定**  $BC_1F_1$ 、 $BC_2F_1$ 、 $BC_3F_1$  的单株以 Ty1aF-Ty1aR、Ty2aF-Ty2aR、Ty3aF-Ty3aR 为引物,通过 PCR 筛选含有抗病标记单株,在  $BC_3F_2$  共获得抗病材料 8 份相似性较高的候选株系,图 2 为选育到的 8 份番茄材料中均扩增到  $Ty_1$  基因,该基因片段长 530 bp (图 2a),为纯合基因,说明  $Ty_1$  基因成功转育到优良骨干亲本系中。含  $Ty_2$  基因的材料扩增出 900 bp 目的条带(图 2b),含  $Ty_3$  基因的材料扩增到 450 bp 的目的条带(图 2c),均为纯合基因,表明  $Ty_1$ 、 $Ty_2$  和  $Ty_3$  基因成功转育到优良自交系中,且均为纯合基因。



注:M. DL2000 Marker;1~8. 选育到的番茄抗病材料。

图2  $Ty_1$ 、 $Ty_2$  和  $Ty_3$  基因的 PCR 扩增结果

**2.3 抗黄化曲叶病毒病骨干亲本系的田间性状** 筛选携带抗性基因标记的株系,进行茎粗、节间长、叶色、果实大小、果实颜色、可溶性糖含量、低温坐果情况、田间抗病性等主要农艺性状观察。结果显示,转育后代主要性状差异不显著(表 3),可视为轮回亲本的抗病近等系。其中, $Ty_{13}$ N-3010-2、 $Ty_{13}$ N-3010-45、 $Ty_{123}$ N-3022-21、 $Ty_{123}$ N-3022-45 综合性状较好,可直接作为番茄品种选育的骨干亲本。

## 3 讨论

TYLCVD 属检疫性病害,利用常规方法进行抗病育种有较大困难,但利用分子标记结合常规方法能够高效、准确地进行抗病材料的筛选与鉴定<sup>[1]</sup>。在番茄育种体系中,抗病性鉴定比较常用的有粉虱侵染接种、田间自然接种及分子标

表3 抗病骨干亲本系主要农艺性状田间鉴定

材料编号	茎粗 cm	节间长 cm	始花节位	果实纵径 cm	果实横径 cm	果肉厚 cm	单果重 g	可溶性糖 %	低温坐 果性//%	发病程度	其他性状
TN-3010-2	1.213	8.5	8.2	7.5	8.82	0.90	170	5.2	60	轻度	相似
$Ty_{13}$ N-3010-2	1.221	8.4	8.5	7.3	8.42	0.88	160	5.2	62	无	相似
$Ty_{13}$ N-3010-33	1.211	9.1	8.1	7.4	8.52	0.87	165	5.3	45	无	相似
$Ty_{13}$ N-3010-45	1.222	8.6	8.1	7.5	8.96	0.90	172	5.3	56	无	相似
$Ty_{13}$ N-3010-52	1.223	8.5	8.3	7.5	8.86	0.91	172	5.2	62	无	相似
TN-3022-1	1.212	8.7	8.4	7.6	8.52	0.81	147	5.2	50	轻度	相似
$Ty_{123}$ N-3022-1	1.194	8.6	7.8	6.9	5.34	0.79	145	5.6	58	无	相似
$Ty_{123}$ N-3022-21	1.215	8.6	8.2	6.8	5.32	0.78	140	5.4	47	无	相似
$Ty_{123}$ N-3022-23	1.214	8.5	7.8	7.2	5.46	0.80	148	5.5	56	无	相似
$Ty_{123}$ N-3022-45	1.234	8.7	7.8	7.2	5.67	0.81	142	5.5	55	无	相似

记检测。粉虱侵染接种能够在有限空间内传毒,但是受粉虱喜食性的影响,可能还会遇到不选择的问题,如特化的表皮毛及叶片上的蜡质等都会抑制粉虱的喂养<sup>[12]</sup>。分子标记技术的建立为发展简便、快速、准确的抗病性鉴定提供了有效手段。在番茄抗 TYLCVD 品种培育中,找到与抗 TYLCVD 基因紧密连锁的标记对于抗病植株筛选是必要的。目前 TYLCVD 的抗病基因有  $Ty_1$ 、 $Ty_2$ 、 $Ty_3$ 、 $Ty_4$ 、 $Ty_5$  等,研究较多的是  $Ty_1$ 、 $Ty_2$  和  $Ty_3$  基因,其中 Zamir 等<sup>[7]</sup>认为  $Ty_1$  基因为主效基因。

该试验利用从台湾引进含黄化曲叶病毒抗性基因( $Ty_1$ 、 $Ty_2$ 、 $Ty_3$ )的番茄材料为供体亲本,以安徽省农业科学院园艺研究所选育优良番茄自交系为轮回亲本,利用 PCR 对选育到的骨干亲本系进行分子鉴定,将鉴定出的材料进一步进行田间和接种鉴定。结果表明,杂交后代中均检测到黄化曲叶病毒抗性基因,大田试验结果与分子鉴定结果基本吻合,获得了兼抗 TY 病毒病的优良亲本材料。叶青静等<sup>[2]</sup>研究表明,某些材料含有抗病基因但在田间表现为感病,大田试验结果与分子鉴定结果吻合率为 90%。由此可见,利用分子标记进行抗性材料的筛选,可大大缩短育种进程。

#### 参考文献

- [1] 余文贵,赵统敏,杨玛丽,等. 番茄黄化曲叶病及其抗病育种研究进展[J]. 江苏农业学报,2009,25(4):925-930.
- [2] 叶青静,周国治,王荣青,等. 番茄黄化曲叶病毒并抗性鉴定技术研究[J]. 分子植物育种,2011,9(2):210-217.
- [3] HANSON P, BERNACCHI D, GREEN S, et al. Mapping of a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cul-

tivated tomato line[J]. Journal of the American Society of Horticultural Science, 2000, 125:15-20.

- [4] HANSON P, GREEN S K, KUO G. Ty-2 a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato[J]. Tomato Genetic Cooperative Report, 2006, 56:17-18.
- [5] JI Y, SCHUSTER D J, SCOTT J W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato[J]. Molecular Breeding, 2007, 20:271-284.
- [6] JI Y, 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 of Horticultural Science, 2009, 134(2):281-288.
- [7] ZAMIR D, EKSTEIN-MICHELSON I, ZAKAY Y, et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(2):141-146.
- [8] GARCIA B E, GRAHAM E, JENSEN K S, et al. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance Ty-2 locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm[EB/OL]. www.plantpath.wisc.edu/Geminivirus Resistant Tomatoes/Markers/MAS-Protocols/Ty2-TGC-Garcia.pdf.
- [9] GARCIA B E, MARTIN C T, MAXWELL D P. Detection methods for the Ty-1 gene for resistance to begomoviruses on chromosome 6 of tomato[EB/OL]. http://www.plantpath.wisc.edu/Geminivirus Resistant Tomatoes/Markers/MAS-Protocols/IntroTy1.pdf.
- [10] 周国治,叶青静,杨悦悦,等. 利用 PCR 技术同时检测番茄抗根结线虫基因( $Mi-1$ )和抗叶霉病基因( $Cf-9$ ) [J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2008,34(2):163-168.
- [11] 杜玉丽,张子君,李海涛,等. 番茄黄化曲叶病毒病抗病基因  $Ty_1$  的 PCR 检测[J]. 北方园艺,2012(13):136-139.
- [12] BELLOTTI A C, ARIAS B. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study[J]. Crop Protection, 2001, 20:813-823.
- [13] 金凤媚,薛俊,郝艳红,等. 天津地区番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 的克隆和序列分析[J]. 华北农学报,2011(1):58-62.
- [14] 樊继德,杨峰,陆信娟,等. 抗番茄黄化曲叶病毒病番茄新品种引种试验[J]. 江西农业学报,2011,23(8):113-114.

(上接第 105 页)

真菌型向细菌型方向转化,从而使土壤更健康,对减少病害和提高土壤肥力具有积极的作用。

表 3 树枝发酵腐殖质肥处理和空白对照土壤微生物数量与酶活性的相关系数

指标	脲酶	酸性磷酸酶	过氧化氢酶	细菌	真菌	放线菌
脲酶	1.000	0.999**	1.000**	0.999**	0.994**	0.989**
磷酸酶		1.000	0.999**	0.999**	0.994**	0.990**
过氧化氢酶			1.000	0.999**	0.993**	0.989**
细菌				1.000	0.997**	0.994**
真菌					1.000	0.999**
放线菌						1.000

注: \*\* 表示差异在 0.01 水平显著。

土壤酶主要来自微生物和植物根系的分泌作用<sup>[8-10]</sup>。它是土壤肥力的一个重要标志,也是土壤有机养分转化的一个重要因素。研究表明,土壤微生物数量与各种酶活性间均有较好的相关性。树枝发酵腐殖质肥能明显地提高土壤酶活性。其活性的增强能促进土壤的代谢作用,从而使土壤养分形态发生变化,提高肥力,改善土壤性质<sup>[11]</sup>。树枝发酵腐殖质肥可以明显增加土壤微生物总量,进而促进酶活性的显著提高。这与邱莉萍等研究结果<sup>[12-13]</sup>相类似。该研究的 3 种酶之间的相关分析表明,它们之间存在着显著或极显著的相关关系。这和袁玲等的研究结果<sup>[14]</sup>相一致。由此可知,5

种土壤酶活性在反映土壤性质方面有一定的共性。

#### 参考文献

- [1] 刘更另,金维续. 中国有机肥料[M]. 北京:农业出版社,1991:238-241.
- [2] LUO A C, SUN X. Effect of organic manure on the biological activities associated with insoluble phosphorus release in a blue purple paddy soil[J]. Commun Soil Sci Plant Anal, 1994, 25(13/14):2513-2522.
- [3] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[K]. 北京:农业出版社,1986.
- [4] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社,1986.
- [5] 杨长明,杨林章,颜廷梅,等. 不同养分和水分管理模式对水稻土质量的影响及其综合评价[J]. 生态学报,2004,24(1):63-70.
- [6] 高瑞. 长期不同施肥土壤生物活性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [7] 和文祥,蒋新,余贵芬,等. 生态环境条件对土壤磷酸酶的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(2):81-83.
- [8] BURNS R G. Enzyme activity in soil: Location and possible role in microbial ecology[J]. Soil Biol Biochem, 1982, 12:423-427.
- [9] TADANO T, OZAWA K, SAKAI H, et al. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under P-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin root[J]. Plant and Soil, 1993, 155:95-98.
- [10] 陈恩凤. 土壤酶的生物学意义[C]//中国科学院林业土壤研究所,中国科学院土壤肥料研究所,吉林农业大学. 中国土壤酶学研究文集. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1988:1-4.
- [11] 曾玲玲,张兴梅,洪音,等. 长期施肥与耕作方式对土壤酶活性的影响[J]. 中国土壤与肥料,2008(2):26-30.
- [12] 邱莉萍,刘军,王益权,等. 土壤酶活性与土壤肥力的关系研究[J]. 植物营养与肥料学报,2004,10(3):277-280.
- [13] 徐秋芳,姜培坤. 有机肥对毛竹林间及根区土壤生物化学性质的影响[J]. 浙江林业学报,2000,17(4):364-368.
- [14] 袁玲,邦俊,郑兰君,等. 长期施肥对土壤酶活性和氮磷养分的影响[J]. 植物营养与肥料学报,1997,3(4):300-306.