

番茄抗青枯病材料及抗病基因 SSR 标记的初步筛选

林明宝¹, 汪国平^{1*}, 卢婷¹, 梁树南¹, 乐素菊²

(1. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642; 2. 仲恺农业技术学院生命科学学院, 广东广州 510225)

摘要 [目的] 快速筛选出番茄青枯病抗性基因的 SSR 标记。[方法] 对来自 4 个国家 27 份番茄材料青枯病的抗性进行鉴定, 并用一套 SSR 标记对材料进行分析, 寻找与青枯病抗性基因连锁的标记。[结果] 来自国内的 3 份材料表现出理想的抗病性, “湘引 79-1” 表现高抗, “860” 及 “039-3” 表现抗病。标记 TOM176-177 在 3 份抗病材料上能扩增出相同带型, 而在其他材料上扩增出的带型不同。TOM176-177 在 27 份材料上存在 4 个等位基因, 在 3 份抗病材料上是同一个等位基因, 其扩增产物比其他等位基因小。[结论] 该研究初步推断标记 TOM176-177 与青枯病抗性基因连锁。

关键词 番茄; 青枯病; SSR 标记

中图分类号 S641.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03538-02

Preliminary Screening for Bacterial Wilt-resistant Tomato and SSR Marker Linked with Resistance

LIN Ming-bao et al (College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract Twenty-seven tomato materials collected from four countries were evaluated in bacterial wilt resistance with artificial inoculation and PCR analysis were performed with SSR markers to identify the potential marker linked to bacterial wilt resistance. The results showed that “Xiangyin79-1” was highly resistant, “860” and “039-3” were resistant to this disease. An SSR marker Tom176-177 had a band pattern different from all other materials with less resistance. It was inferred that this marker was linked with bacterial wilt resistance.

Key words Tomato; Bacterial wilt; SSR marker

番茄青枯病(病原菌为 *Ralstonia solanacearum*) 是我国长江以南尤其是华南地区番茄生产上的严重病害, 该病为土传病害, 寄主范围广、病原变异大, 给防治造成严重困难, 抗病育种是防病的最有效途径^[1]。

一般认为, 番茄对青枯病的抗性育种由隐性基因控制, 因而年限较长; 此外, 环境因素及鉴定方法也影响植株的抗

性表现, 利用分子标记技术对青枯病抗性进行辅助选择能弥补这两方面的不足。SSR 标记是众多分子标记技术中一种较好的方法, 它具有共显性、操作简便、重复性好等优点, 但发展 SSR 标记成本较大, 需要特定物种的已知序列^[2]。为快速筛选得到番茄青枯病抗性基因的 SSR 标记, 笔者利用前期工作发展的 SSR 标记对不同抗性的番茄材料进行了分析。

表 1 试验使用的 27 份番茄材料及其抗性结果

Table 1 The situation of 27 tomato materials used in test

材料名 Material name	来源 Origin	发病率//% Disease incidence	抗性 Resistance	带型 Band pattern	材料名 Material name	来源 Origin	发病率//% Disease incidence	抗性 Resistance	带型 Band pattern
Bangalore	美国 U.S.	45	MR	II	Mortgoje lifter	澳大利亚 Australia	100	S	II
Goldset	美国 U.S.	95	S	II	Sweet Bite	澳大利亚 Australia	100	S	III
L04012	美国 U.S.	90	S	I	Grose lisse	澳大利亚 Australia	85	S	II
Tropic	美国 U.S.	70	MS	II	Golden sunrise	澳大利亚 Australia	90	S	I
Nagcarlong	美国 U.S.	70	MS	I	Microfoma	澳大利亚 Australia	100	S	III
Hotset	美国 U.S.	60	MS	II	Micro-Tom	澳大利亚 Australia	100	S	III
Malinkal01	美国 U.S.	75	MS	I	湘引 79-1 Xiangyin79-1	中国 China	10	HR	IV
Flonade	美国 U.S.	100	S	I	红宝石-1 Hongbaoshi-1	中国 China	95	S	I
Saladette	美国 U.S.	80	S	I	红宝石-2 Hongbaoshi-2	中国 China	100	S	I
Money maker	美国 U.S.	100	S	I	粤农 2 号 Yunong 2	中国 China	95	S	II
Roma VF	美国 U.S.	70	MS	II	红樱桃 Red cherry	中国 China	90	S	I
Tigerlla	澳大利亚 Australia	95	S	II	860	中国 China	20	R	IV
Tiistar	澳大利亚 Australia	55	MR	I	039-3	中国 China	35	R	IV
MicroZero	英国 U.K.	100	S	III					

注: S, 感病(80%~100%); MS, 中感(60%~79%); MR, 中抗(耐病)(40%~59%); R, 抗病(20%~39%); HR, 高抗(0~19%)。

Note: S, susceptibility (80%~100%); MS, medium susceptibility (60%~79%); MR, medium resistance(40%~59%); R, resistance (20%~39%); HR, High resistance (0~19%).

1 材料与方 法

1.1 材料 供试番茄材料来自 4 个国家共 27 份(表 1); 病原

基金项目 广东省科技计划项目(2004A20103002); 广东省农业攻关计划项目(2007A020300009-6); 农业部 948 项目(2007-Z5)。

作者简介 林明宝(1957-), 男, 海南文昌人, 副研究员, 从事蔬菜遗传育种的 教学及研究。*通讯作者, 副教授, E-mail: gpwang@scau.edu.cn

收稿日期 2007-12-03

菌为从华南农业大学园艺学院蔬菜试验场番茄病株上分离并纯化的毒性菌株。

1.2 青枯病抗性鉴定 于 2006 年 4 月 5 日播种进行营养杯育苗, 每份材料 20 株。苗龄 35 d 时用该实验室的方法进行伤根接种^[3], 接种后 15 d 时进行植株调查并计算发病率。

1.3 SSR 标记分析 根据文献报道的标记序列合成了 166 对 SSR 引物, 这些标记部分已被定位。按 Hemming 等^[4]的方法提取番茄叶片的基因组 DNA。20 μl PCR 反应体系中包括

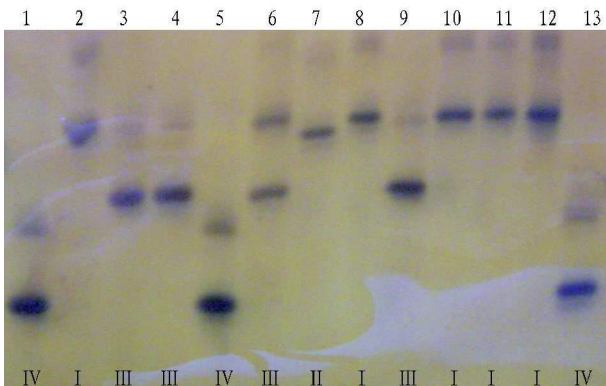
0.15 $\mu\text{mol/L}$ 的引物、200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、1 \times PCR 反应缓冲液 (50 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3、1.5 mmol/L MgCl_2 、0.01% 明胶)、50~100 ng 的 DNA 模板、1 U Taq 酶。反应在 PE9700 型热循环仪中进行。所用的反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物用 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 250 V 条件下稳压电泳约 3 h; 普通银染显带, 数码相机照相。

2 结果与分析

2.1 番茄材料青枯病抗性鉴定结果 番茄接种病原菌后 7 d 开始发病, 21 d 时统计发病率, 结果见表 1。由表 1 可知, 国外来的材料大多数都不抗病, 只有从国内收集的 3 份材料表现出理想的抗病性, 其中“湘引 79-1”表现为高抗, “860”及“039-3”表现为抗病。

2.2 抗病基因 SSR 标记的筛选 利用 166 个标记对 27 份材料进行分析, 134 个标记的扩增产物主带明显, 其他标记没有扩增产物或扩增出多条弱带, 134 个标记中 65 个标记在 27 份材料上能检测出多态性, 来自基因组序列的 SSR 标记多态性指数高, 而来自 EST 序列的标记多态性低, 很多标记没有多态。



注: 1, 湘引 79-1; 2, Nqcarlong; 3, Micro-Tom; 4, MicroZen; 5, 860; 6, Sweet Bite; 7, Grosse lisse; 8, Golden sunrise; 9, Microfoma; 10, L04012; 11, 红宝石-1; 12, 红宝石-2; 13, 039-3。

图 1 TOM176-177 在番茄材料上的四种带型

Fig 1 Four types of band pattern amplified by TOM176-177 on tomato
65 个标记中, 标记 TOM176-177 在“湘引 79-1”、“860”及

“039-3”3 份抗病材料上能扩增出相同带型, 而在其他材料上扩增出的带型不同。TOM176-177 根据基因组序列发展而来, 其多态性较好, 在 27 份材料上存在 4 个等位基因, 在 3 份抗病材料上是同一个等位基因, 其扩增产物比其他等位基因小 (图 1)。

3 讨论

一般认为, 应从病害发生严重的地区收集抗病资源, 该文研究结果支持了这一观点。该研究中鉴定为抗病的材料都来自中国, 而我国长江以南特别是华南地区是番茄青枯病发生比较严重的地区; 而在美国、澳大利亚及英国青枯病不是番茄的主要病害, 因而来源于这些国家的材料大多不抗病。

该研究通过对一组抗、感材料进行 SSR 标记分析, 找到一个多态性好的标记 TOM176-177, 并检测出在 3 份抗病材料中存在特异的等位基因, 初步说明该标记与抗病基因连锁, 且很有可能这些材料中含有的抗病基因来源相同。标记 TOM176-177 位于番茄染色体 12 中部着丝粒附近^[5], 而有研究表明, 该区段存在一个对台湾青枯菌株系具特异抗性的主效 QTL^[6], 这从另一方面为 TOM176-177 与青枯病抗病基因连锁的结论提供了证据。

通过对抗、感材料构建的 F_2 群体分析, 可进一步验证 TOM176-177 是否与青枯病抗病基因连锁, 并计算出连锁距离, 这方面的工作正在进行中。

参考文献

- [1] 汪国平, 林明宝, 吴定华. 番茄青枯病抗性遗传研究进展[J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 403-407.
- [2] 汪国平, 胡开林, 梁树南, 等. 番茄微卫星标记研究进展[C]// 雷建军. 园艺学进展(第五辑). 广州: 广州出版社, 2002: 379-383.
- [3] 汪国平, 熊正葵, 林明宝. 印迹法用于鉴定番茄青枯病抗性的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2003(5): 780-782.
- [4] HEMMING M N, BASUKI S, MCGRAIH D J et al. Fine mapping of the tomato *I-3* gene for fusarium wilt resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for *I-3*[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 409-418.
- [5] ASHKENAZI V, CHANI E, LAVI U, et al. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses[J]. Genome, 2001, 44: 50-62.
- [6] WANG J F, OLIVIER J, THOQUET P, et al. Resistance of tomato line Hawaii-7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(1): 6-13.

(上接第 3537 页)

- [2] ANDRES A G, VANDER VALK M A, SCHONENBERGER C A, et al. Hras and c-myc oncogene expression interferes with morphological and functional differentiation of mammary epithelial cells in single and double transgenic mice

[J]. Genes and Dev, 1988, 2: 1486-1495.

- [22] GORDON K, LEE E, VIALE J A, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk[J]. Bio Technology, 1987, 5: 1183-1186.