

番茄分子抗病育种研究进展

朱明涛

(玉林师范学院 广西 玉林 537000)

摘要: 番茄生产中发生的严重病害多达 40 种, 现从青枯病、烟草花叶病毒病、叶霉病、枯萎病、黄化曲叶病、番茄根结线虫病等主要病害上综述了番茄抗病分子育种的研究进展, 并探讨了今后番茄分子抗病育种需要解决的问题和发展方向。

关键词: 番茄; 分子育种; 病害; 进展

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0200-04

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 既可以作为水果又可以作为蔬菜, 因其产量高、营养丰富, 深受人们的喜爱, 由于连年种植造成的连作障碍严重, 病害达 40 多种^[1], 对番茄危害较为严重的病害有黄化曲叶病、青枯病、枯萎病、烟草花叶病毒病、叶霉病、番茄根结线虫病、晚疫病等, 化学药剂防治虽然有一定功效, 但增加生产成本、污染环境、带来食品安全问题。因而, 培育抗病新品种成为解决问题的根本途径之一。现将番茄分子抗病育种研究进展进行概述, 并提出存在的问题与今后研究的重点, 为番茄的抗病育种工作提供参考。

1 番茄分子抗病育种进展

1.1 抗青枯病研究进展

番茄青枯病 (*Ralstonia solanacearum* nov. comb) 是在热带、亚热带、温带地区广泛发生的一种细菌性土传病害^[2], 番茄发病时, 尚无有效的药物进行防治, 能够造成大面积减产甚至绝收。由于番茄对青枯病的抗性遗传机制比较复杂, 目前人们对青枯病的抗性遗传机理的认

识不尽相同, 大致有以下观点: 番茄抗青枯病抗性遗传受核基因控制, 细胞质基因对其影响不大; 番茄对青枯病的抗性由多个基因控制, 抗病对感病为不完全显性^[3]。Thoquet 等^[4] 利用 Hawaii7996 和 WVa700 这 2 个番茄群体进行杂交, 得到 F₃ 群体 3 500 株, 利用已有的 RFLP 标记和不同的 QTL 模型, 发现了 2 个 QRL 主要分布在第 6 条染色体上。Yui 等^[5] 利用 TPL-5 和 Hawaii 7998 的杂交群体, 找到了与抗性基因连锁的 4 个 RAPD 个标记。Wang 等^[6] 利用不同的番茄青枯病生理小种和已有的几个 QTL 进行分析发现, 第 6 条染色体上的位点抗性程度最强, 但与其余的 QRL 联系较弱。寿森炎等^[7] 利用 AFLP 技术对 2 个番茄亲本及其 F₂ 代抗病和感病基因池进行分析, 发现了与抗病基因紧密连锁的特异条带 AAG/CAT, 并测量出二者之间的遗传距离为 6.7 cM。新抗性位点的发现对番茄青枯病育种和抗病基因的最后克隆具有重要意义。美国最早育成抗青枯病的品种是“金星”(Venus)和“土星”, 并在 1996 中选育出耐热、耐青枯病的有限生长型的鲜食番茄品种“Neptune”(海王星)。但由于人们对于抗青枯病的遗传机理并不完全确定, 目前为止还没有开发出可靠的分子标记进行辅助育种。

作者简介: 朱明涛(1983-), 男, 硕士, 助教, 研究方向为园艺植物遗传育种。E-mail: zhumingtao888@163.com。

收稿日期: 2010-09-13

Literature Review of Researches on *Davidia involucrate* Baill. Breeding

CHEN Rui-kun, XU Ying

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract: The literatures of researches on natural reproduction, artificial sexual reproduction, vegetative propagation and tissue culture for *Davidia involucrate* Baill., the first grade national key protected wild plants in China, were reviewed. And research aspects on *Davidia involucrate* Baill. which should be continued in future were put forward.

Key words: *Davidia involucrate* Baill.; literature review; breeding; tissue culture

1.2 抗烟草花叶病毒病研究进展

烟草花叶病毒病(*Tobacco mosaic virus*, TMV)是番茄生产中最常见的病害之一,植株得病后叶片失绿,严重者叶片呈条状,可以造成大面积减产。近年来,人们对番茄抗烟草花叶病毒病基因进行克隆定位,发现可供番茄抗病育种使用的基因有3个,*Tm-1*、*Tm-2*、*Tm-2a* (*Tm-22*),同时发现与这些基因紧密连锁的标记对于番茄抗烟草花叶病毒病育种具有重要的意义^[8]。Motoyoshi等^[9]利用近等基因系,以RAPD标记分析*Tm-2*座位,在220个随机引物中得到13个标记,这些标记位于*Tm-2*及其紧密连锁的*nv*座位两侧的2.7 cM左右的范围内。田苗英^[10]等采用RAPD技术得到1个与*Tm-2* (*nv*)遗传距离为7.06 cM的分子标记OPD201700,这个标记与*Tm-2*(*nv*)连锁。宋燕等^[11]利用同一PCR反应体系,对分别与番茄抗叶霉病的*Cf-9*基因和抗烟草花叶病毒病的*Tm-1*基因紧密连锁的PCR标记进行了同时扩增筛选,并得到了相吻合的扩增特异性片段和单引物扩增片段。2008年孙亚林^[12]开发出检测抗烟草花叶病毒病基因*Tm-2a*的SNP标记,该标记方便快捷,操作简单,在含有*Tm-2a*基因的材料里能扩增出472 bp的片段,而不含*Tm-2a*基因的材料里则无扩增带。随着新的、便于操作的分子标记的开发,越来越多的分子标记将用于辅助抗烟草花叶病毒病育种。

1.3 抗叶霉病研究进展

番茄叶霉病(*Cladosporium fulvum*)是番茄生产中普遍发生的病害,在保护地番茄生产中的发病尤其突出,由于保护地种植面积的扩大和土地连作,该病给番茄生产带来的危害也日趋加重^[14]。早在20世纪30年代人们就开始了对于番茄叶霉病的研究,然而利用常规育种方法得到的抗病品种抗性容易丧失。番茄叶霉菌生理小种多、生理分化快,已知的被利用的抗病基因数最多,抗叶霉病基因为单显性基因,目前已经发现24个抗病基因,在育种上被广泛利用的基因在9个以上^[15]。叶霉菌遗传背景复杂,变异较快,抗病品种的抗病性容易丧失,因此番茄抗叶霉病及其机制研究成为番茄抗叶霉病育种的重中之重。近年来,人们应用遗传图谱和分子标记技术对番茄抗叶霉病基因进行定位和克隆,逐步明确了一些基因的结构、功能和抗病机制,这些研究有利于进行分子育种,从而为生产上有效控制叶霉病害提供一条新的途径^[16]。番茄抗叶霉病基因主要有*Cf-1*、*Cf-2*、*Cf-4*、*Cf-5*、*Cf-6*、*Cf-9*等,Thomas^[17]等将栽培种番茄与野生种*Lycopersicon pennellii*种间杂交,对得到的F₂群体利用AFLP技术的BAS法进行分析,发现4200条AFLP带与番茄抗叶霉病基因*cf-9*紧密连锁,其中3个标记与基因*cf-9*表现共分离。于栓仓等^[18]根据*Cf-5*

基因的序列设计特异引物,对7个含有不同抗叶霉病基因的品种为材料进行扩增,得到大约0.96 kb的特异扩增片段后,利用限制性内切酶*TaqI*进行酶切,得到了*Cf-5*基因的共显性CAPS标记,通过此标记可以发现,在含有*Cf-5*基因的材料里能扩增出1条256 bp的特异片段,而不含*Cf-5*基因的材料里扩增出1条225 bp大小的特异片段。

1.4 抗枯萎病研究进展

自20世纪50年代发现枯萎病(*Fusarium. oxysporum* sp. *Lycopersici*)以来,世界各地均有发生,成为番茄生产上的重要病害,目前共发现3个番茄枯萎病的生理小种:生理小种1、2、3^[19],3个不同的抗病基因*I-1*、*I-2*、*I-3*,在国外,不少*I-1*、*I-2*、*I-3*基因已被转入普通番茄中。早在20世纪90年代人们就找出*I-1*基因和*I-2*基因的RFLP标记,Sarfatti等^[20]通过建立番茄回交群体,利用番茄第7条染色体上的154个RFLP标记对*I-1*基因进行了区域分析,为该基因的克隆奠定了技术基础。Segal等^[21]利用RFLP标记TG26和TG36这2个标记把*I-2*定位在4.1 cM的范围之间,并且根据这些与抗番茄枯萎病基因紧密连锁的分子标记已经把把这些基因克隆。Fukuta^[22]等根据*I-2*基因序列设计特异扩增引物,开发出可以区分含有*I-2*基因和不含*I-2*基因的材料。于栓仓和邹艳敏^[19]根据*I-2*的基因序列设计特异扩增引物,以不同抗病基因型的番茄为材料,对*I-2*基因3123~3640 bp之间的单拷贝片段进行扩增,在含有*I-2*基因的材料里能扩增出1条509 bp的片段,而不含*I-2*基因的材料里则无扩增带。孙亚林^[22]开发出检测抗枯萎病基因*I-2*的SNP标记,含*I-2*基因的材料里能扩增出大约500 bp的片段,不含*I-2*基因的材料里能扩增出大约700 bp的片段,该标记无需酶切、操作简单,能够实际应用辅助育种,李汉霞等^[23]利用该标记选育出番茄抗枯萎病新品种华番2号和华番3号。

1.5 抗黄化曲叶病研究进展

番茄黄化曲叶病(Tomato yellow leaf curl virus)是世界范围内流行的一种毁灭性的病毒病,植株感病后表现明显矮化,叶缘黄化,叶片变小卷曲,不利于番茄生长、开花和结果。近年来由于气候变暖和烟粉虱的大量繁殖,番茄黄化曲叶病逐年加重,对世界番茄生产造成极其严重的损失^[24]。由于番茄黄化曲叶病毒容易变异,番茄抗黄化曲叶病育种比较困难,采用现代生物技术手段辅助育种,可以加快育种进程。随着新技术的应用,有关抗番茄黄化曲叶病基因的研究取得了很大的进展,目前已确定4个抗病基因*Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-3a*,Zamir等^[25]利用RFLP技术对来源于*L. esculentum* × *L. chilense*的BC₂S₁和BC₂S₂群体进行分析,将*Ty-1*基因

定位在番茄第 6 号染色体上, 该基因与 RFLP 标记 TG97 紧密连锁, 目前已经开发出可以用于辅助育种的 TG97 标记。Hanson^[26] 等利用 RFLP 标记作为探针将野生番茄的抗黄化曲叶病基因进行定位在 11 号染色体臂上, 2006 年此抗病基因被命名为 *Ty-2*。前人根据与抗性基因 *Ty-2* 紧密连锁的 SCAR 标记 T0302 设计引物, 通过 PCR 扩增, 可以发现在含有 *Ty-2* 基因的材料中能扩增出 950 bp 大小的片段, 而不含 *Ty-2* 基因的材料中能扩增出 850 bp 大小的片段^[24]。

1.6 抗根结线虫病研究进展

根结线虫 (*Meloidogyne* spp) 是危害番茄的主要病害之一, 每年使全世界番茄生产的损失达 20% 左右, 植株感病后, 根结容易连在一起, 形成肿瘤, 晚期腐烂, 造成植株矮小、瘦弱, 甚至早衰死亡^[27]。根结线虫分为南方根结线虫、北方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫, 其中又以南方根结线虫危害最为严重, 传统的根结线虫防治方法效果不佳, 利用转基因技术和分子标记辅助技术是进行抗根结线虫育种的主要策略^[28]。最早发现的抗根结线虫基因是 *Mi* 基因, 目前在番茄近缘野生种中新发现 8 个抗根结线虫基因, 原来的 *Mi* 抗性位点表示为 *Mi-1*, 新发现的抗性基因分别称作 *Mi-2*、*Mi-3*、*Mi-4*、*Mi-5*、*Mi-6*、*Mi-7*、*Mi-8*、*Mi-9*^[29], 这些新发现的抗根结线虫基因为番茄抗根结线虫育种提供了丰富的遗传资源。Klein-Lankhorst 等^[30] 利用 83M7133 和 83M7138 这 2 个近等基因系, 找到了 2 个 RFLP 标记 (GP79 和 H6A202) 和 3 个 RAPD 标记 均与番茄根结线虫基因紧密连锁, 并且利用 GP79 标记能鉴定具有抗根结线虫性状的番茄植株的杂合性和纯合性。李君命^[31] 等利用前人发现的与 *Mi* 基因紧密连锁的 2 个 SCAR 标记, 建立了利用多重 PCR 技术同时鉴定番茄抗根结线虫病和抗斑萎病基因的反应体系。李红双^[32] 等利用 RAPD 技术, 采用 BAS 法获得了 1 个与抗根结线虫基因紧密连锁的 RAPD 标记, 并将其转化为 SCAR 标记。

1.7 抗晚疫病研究进展

番茄晚疫病 (*Phytophthora infestans*) 是世界范围内的一种毁灭性真菌病害, 在世界各地番茄主产区普遍发生, 并造成严重的经济损失, 成为番茄生产的主要病害之一^[33,34]。番茄抗晚疫病基因分为 2 类, 一类是受单基因控制的质量性状, 如 *Ph-1*、*Ph-2* 和 *Ph-3* 基因; 另一类是受多基因控制的数量性状, 其抗病性与环境、植株长势等多种因素有关^[33]。Moreau 等利用 AFLP 技术把抗晚疫病基因 *Ph-2* 定位在标记 CP105 和 TG233 之间, 并且找到了与 *Ph-2* 紧密连锁的 AFLP 标记^[35]。Chunwongse 等^[36] 利用 AFLP 和 RFLP 技术对 *Ph-3* 基因进行标记, 并将其定位在第 9 染色体上, 同时找到与 *Ph-3* 基因紧

密连锁的 1 个 AFLP 标记和 2 个 RFLP 标记。Anne 等^[37] 从醋栗番茄材料 L3708 中发现了分别位于第 6 和第 8 染色体上的 3 个抗晚疫病的 QTL。

2 传统育种与分子育种的比较

传统抗病育种是通过表现型从而对基因型进行选择, 受环境条件影响较大, 在病害未发生的情况下, 抗与不抗表现型难以区别, 只有采取病毒接种方法才能进行鉴定, 这不仅费时、费力, 而且还存在发病条件、基因的上位性和表达时间等许多限制因素, 影响育种效率。分子标记辅助选择是利用与目的基因紧密连锁的分子标记来选择基因型, 可以直接对基因型进行选择, 不受环境条件的影响, 缩短育种年限, 提高育种效率。利用分子标记技术聚合多个抗性基因, 是培育具有持久抗性和综合抗性品种的有效策略。

3 问题与展望

近年来, 由于分子生物技术的发展, 人们在抗病基因研究上取得重大突破, 为分子标记辅助抗病育种和基因工程抗病育种提供了重要的技术支持, 许多利用基因工程和分子标记辅助手段培育的番茄抗病新品种不断出现, 分子育种技术成为当今培育番茄抗病新品种的主要趋势。然而采用分子育种也存在一些需要解决的问题: 首先是安全问题, 利用基因工程技术手段培育的番茄新品种一般为转基因品种, 这些新品种在抗病性状方面固然优良, 但由于人们对转基因食品安全问题的担忧, 转基因育种的发展遇到了瓶颈; 其次在利用分子标记技术完善问题, 一是现在开发的分子标记技术成本高、操作复杂, 不适合于大规模的辅助育种; 二是分子标记技术对于多基因控制的性状的选择还有待进一步完善。

在今后的发展过程中, 要加强对病原菌生理小种的分化以及病原菌抗性的研究, 利用分子技术与传统育种技术相结合, 充分利用番茄丰富的野生资源, 将多个抗病基因聚合到栽培番茄品种中, 培育持久并且兼抗多种病害的番茄新品种; 开发与抗病基因更加紧密连锁、操作简便、成本低廉, 能够被育种家广泛接受的分子标记。随着分子生物技术的不断进步, 分子育种必将成为今后番茄抗病育种的主要手段。

参考文献

- [1] 杜永臣, 严准, 王孝宣, 等. 番茄育种研究主要进展[J]. 园艺学报, 1999, 26(3): 161-169.
- [2] 李海涛, 邹庆道, 吕文书, 等. 番茄青枯病的研究进展[J]. 园艺学报, 2001, 28: 649-654.
- [3] 尹贤贵, 王小佳, 张燮, 等. 我国番茄青枯病及抗病育种研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(2): 163-167.
- [4] Thoquet P, Olivier J, Rogowsky P, et al. Quantitative trait loci determining resistance to wilt in tomato cultivar Hawaii [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1996, 9: 826-836.

- [5] Yui M, Momma S, Hirai M, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the selection of tomatoes resistant to bacterial wilt [J]. National Research Institute of Vegetable, Ornamental plants and Tea Bulletin (Series A) 1999, 14: 189-198.
- [6] Wang J F, Olivier J, Thoquet P, et al. Resistance of tomato line Hawaï 7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus [J]. Mol Plant Microbe Interact. 2000, 13: 6-13.
- [7] 寿森炎, 冯壮志, 苗立祥, 等. 番茄抗青枯病基因的 AFLP 分子标记 [J]. 遗传, 2006, 28(2): 195-199.
- [8] 吴媛媛, 李海涛, 张子君, 等. 番茄抗病基因分子标记研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(2): 27-31.
- [9] Motoyoshi F, Ohmori T, Murata M. Molecular characterization of heterochromatic region around the *Tm-2a* locus in chromosome 9 of tomato [J]. Symp Soc Exp Biol, 1996, 50: 65-70.
- [10] 田苗英, 冯兰香, 杨翠荣. 应用 RAPD 方法获得与番茄 ToMV 抗性基因 *Tm-2(nv)* 连锁的分子标记 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(2): 158-161.
- [11] 宋燕, 陈丽静, 李君明, 等. 利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 *Cf-9* 和 *Tm-1* 基因 [J]. 植物遗传资源学报, 2006(7): 165-169.
- [12] 孙亚林. 番茄四个抗病基因的基因标记的创建与辅助选择 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [13] 刘忠祥. 串番茄自交系的筛选与新品种选育 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [14] 吕晓梅, 许向阳, 李景富. 番茄叶霉病及其抗病育种的研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2002, 33(4): 396-406.
- [15] 张英杰, 张举梅, 张赧红. 国外番茄抗病育种研究概述 [J]. 北方园艺, 1998, 4(3): 41-43.
- [16] 叶青静, 杨悦俭, 王荣青, 等. 番茄抗叶霉病基因及分子育种的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2004, 3(2): 313-320.
- [17] Thomas C M, Vos P, Jones D A, et al. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* [J]. Plant J, 1995, 8: 785-794.
- [18] 于栓仓, 柴敏, 郑晓鹰, 等. 番茄叶霉病抗性基因 *Cf-5* 的 CAPS 标记建立 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 57-60.
- [19] 于栓仓, 邹艳敏. 番茄枯萎病抗性基因 *F-2* 的显性分子标记及其应用 [J]. 分子植物育种, 2008(5): 806-810.
- [20] Sarfatti M, Abu Abied M, Katan J, et al. RFLP mapping of *F-1* a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 [J]. Theor Appl Genet, 1991, 82: 22-26.
- [21] Segal G, Sarfatti M, Schaffer M A, et al. Correlation of genetic and physical structure in the region surrounding the *l2* fusarium oxysporum resistance locus in tomato [J]. Molecular and General Genetics, 1992, 231: 179-185.
- [22] Fukuta S, Kuroyanagi S, Oyabu T, et al. Development of DNA marker linked to *F-2* gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 2 [J]. Research Bulletin of the Aichi Agricultural Research Center, 2009, 40: 41-46.
- [23] 李汉露, 叶志彪, 张俊红, 等. 无限生长型番茄新品种华番 2 号、华番 3 号 [J]. 长江蔬菜, 2008(8): 4-5.
- [24] 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.
- [25] Zamir D, Ekestein-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: 141-146.
- [26] 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: 15-20.
- [27] 王全华, 葛晨辉, 尹国香, 等. 番茄根结线虫病抗病育种研究进展 [J]. 莱阳农学院学报, 2001, 18(3): 216-220.
- [28] 魏振林, 董玲, 芮玉奎. 植物抗根结线虫转基因育种研究进展 [J]. 北方园艺, 2007(4): 70-72.
- [29] 于力, 朱为民, 薛林宝, 等. 番茄根结线虫病的研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2006(11): 35-38.
- [30] Klön-Lankhorst R M, Vermunt A, Weide R, et al. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. Theor Appl Genet, 1991, 83: 108-114.
- [31] 李君明, 宋燕, 陈丽静, 等. 利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 *Tm-22* 和 *Mt* 基因 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 698-702.
- [32] 李红双, 李景富, 许向阳. 番茄抗根结线虫病基因的 RAPD 和 SCAR 标记 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 155-158.
- [33] 赵统敏, 邹茶英, 余文贵, 等. 番茄晚疫病及其抗病育种研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 175-180.
- [34] 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.
- [35] Moreau P, Thoquet P, Olivier J, et al. Genetic mapping of *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato [J]. Mol plant Microb N tract, 1998, 11(4): 259-269.
- [36] Chunwongse B J, Chunwongse C, Black L, et al. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for the late blight in tomato [J]. Journal of Horticultural & Biotechnology, 2002, 77(3): 281-286.
- [37] Anne F, Elizabeth G, Joseph J, et al. Identification of late blight resistance from *L. pimpinellifolium* L3708 [J]. Plant Disease, 1999, 83(2): 173-176.

Research Progress on Molecular Breeding for Disease Resistance of Tomato.

ZHU Ming-tao

(Yulin Normal College, Yulin, Guangxi 537000)

Abstract: The up to 40 species serious diseases in tomato production, the research progress on molecular breeding for disease resistance of tomato from *Pseudomonas solanacearum* Smith, tobacco mosaic virus, *Cladosporium fulvum*, Fusarium wilt, yellow leaf curl virus, *Meloidogyne* spp were summarized, and the future issues and development direction of molecular breeding for disease resistance of tomato were discussed.

Key words: tomato; molecular breeding; disease; progress