

# 番茄抗黄化曲叶病 *ty-5* 基因的 PCR 快速检测

杨欢欢<sup>1</sup>, 姜景彬<sup>1</sup>, 李景富<sup>1</sup>, 许向阳<sup>1</sup>, 商珺鸣<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 泰山学院 文学与传媒学院, 山东 泰安 271000)

**摘要:**以番茄抗病材料 CLN32120a-23(含 *ty-5* 基因)和感病材料 Moneymaker(不含抗病基因)为试材,通过杂交、自交获得的  $F_1$ 、 $F_2$  代,利用 SSR 分子标记技术筛选出了 1 个与抗病性状共分离的共显性 SSR 标记。结果表明:该标记在 CLN32120a-23 中可以扩增出 550 bp 的条带,在 Moneymaker 中可以扩增出 780 bp 的条带,在  $F_1$  中可以扩增出上述 2 条条带,标记结果与田间鉴定基本一致,证明该标记能够区分抗病材料、感病材料及杂合抗病材料,是与番茄抗黄化曲叶病毒基因 *ty-5* 紧密连锁的共显性标记。对 27 份番茄材料进行检测,鉴定出有 15 份材料基因型为 *ty-5/ty-5*,分子标记检测与田间检测结果吻合率达 80%。该标记可用于番茄抗黄化曲叶病毒 *ty-5* 基因的 PCR 快速检测,同时为 *ty-5* 分子标记辅助选择育种的应用提供一定的参考依据。

**关键词:**番茄黄化曲叶病毒病;*ty-5*;SSR 分子标记;PCR

**中图分类号:**S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0110-05

番茄黄化曲叶病毒病作为一种新型病毒病,具有毁灭性大、病害蔓延迅速等特点,已成为威胁各国番茄生产的主要病害之一。目前,培育抗病品种仍是防治黄化曲叶病毒病的最有效方法。目前现已挖掘的抗性基因包括 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-3a*、*Ty-4*、*ty-5* 等<sup>[1-6]</sup>。最早鉴定出的抗番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)基因 *Ty-1* 源自智利番茄 LA1969<sup>[7-8]</sup>,其中 VERLAAN 等<sup>[9]</sup>研究表明,*Ty-1* 和 *Ty-3* 是 1 对等位基因,它们编码的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RDR)属于 RDR $\gamma$  类型,它有 1 个典型以 DFDGD 为主的催化结构域。*Ty-1/Ty-3* 这对基因完全揭示了一种新类型的抗病基因<sup>[10-12]</sup>。*Ty-2* 来自多毛番茄 *S. habrochaites* B6013,位于第 11 条染色体上的 TG36 和 TG393 标记间;杨晓慧<sup>[13]</sup>构建了 *Ty-2* 基因目的区域染色体片段内高分辨率遗传图谱,将 *Ty-2* 基因定位到分子标记 UP8 和 M1 之间,遗传距离 0.4 cM, *Ty-2* 基因

为完全显性遗传<sup>[14]</sup>。JI 等<sup>[15]</sup>在智利番茄 LA1932 中获得 1 个新的菜豆金黄化叶病毒抗性位点 *Ty-4*,并被定位于 3 号染色体。*Ty-3* 和 *Ty-4* 基因的重组自交系有着较高水平的 TYLCV 抗性。杨晓慧<sup>[16]</sup>的研究表明,只含有 *Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-4* 基因的植株分别表现为抗、中抗和感病;同时含有 *Ty-2* 和 *Ty-3* 或者 *Ty-2* 和 *Ty-4* 基因的植株均表现抗病;同时含有 *Ty-3* 和 *Ty-4* 基因的植株表现中抗;不同基因之间的抗性表现出累加效应,含有这 3 个基因的材料抗病效果最好<sup>[17-18]</sup>。

ANBINDER 等<sup>[19]</sup>最早发现 *ty-5* 基因来源于秘鲁番茄的 TY172 品系,对黄化曲叶病毒有很强的抗性,位于第 4 条染色体。HUTTON 等<sup>[20]</sup>发现 *ty-5* 连锁标记 SINAC1 与第 4 号染色体上的 1 个隐性位点共分离。近年来,国内研究者也通过不同的遗传群体对番茄抗黄化曲叶病毒病 *ty-5* 基因的遗传规律做了一些研究,杨欢欢等<sup>[21]</sup>对番茄 6 个世代进行遗传规律分析,结果表明, *ty-5* 为隐性遗传基因。目前只有 *Ty-1/Ty-3* 被克隆。但不同抗病基因所调控的抗性机制仍然存在差异,这使得番茄黄化曲叶病毒病抗病机制的研究仍较为重要<sup>[22-24]</sup>。目前利用分子标记辅助选择结合常规育种的方法能高效、准确地对抗病材料进行鉴定和选择<sup>[25]</sup>。现利用与番茄抗黄化曲叶病毒病 *ty-5* 连锁较近的 SSR 标记,对抗 TYLCV 番茄材料进行快速准确的 PCR 检测,以期以 *ty-5* 分子标记辅助选择育种的应用提供参考依据。

**第一作者简介:**杨欢欢(1988-),女,博士研究生,研究方向为蔬菜育种。E-mail:huanyaya0126@sina.com.

**责任作者:**李景富(1943-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事番茄种质资源的研究与利用等工作。E-mail:Ljif\_2005@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31272171);黑龙江省杰出青年科学基金资助项目(JC201204);“十二五”国家科技支撑资助项目(2012BAD02B02-7)。

**收稿日期:**2016-04-14

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试番茄抗病亲本 CLN32120a-23(亚洲蔬菜研究与发展中心提供)和感病亲本 Moneymaker(中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供)均为番茄品种稳定自交系。通过有性杂交、自交和回交,获得  $F_1$ 、 $F_2$  代。黄化曲叶病毒由江苏农业科学院蔬菜研究所提供;用于 PCR 反应的试剂均购自北京华大科技生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 田间发病情况统计** 利用网笼接种法进行病毒接种。8月中旬,将长至3~4片真叶的6个世代的幼苗转入饲养烟粉虱的温室中,每天驱赶2次烟粉虱使其与番茄幼苗充分接触,7 d后将幼苗定植于温室内。发病期间不喷施任何药剂,4周后逐株调查发病情况,将病情分为0~4级:0级,无明显症状;1级,叶片只表现有黄色斑点或斑驳症状;2级,叶片黄化,比正常植株略微矮小且轻微变形;3级,植株矮化,叶片变小、卷曲且边缘黄化;4级,植株严重矮化,叶片皱缩、黄化、卷曲并导致叶片面积大大减小。0~1级归为抗病,2~4级归为感病<sup>[26-27]</sup>。

**1.2.2 DNA提取及引物筛选** DNA提取参照蔡凌云等<sup>[28]</sup>的方法,利用CTAB法提取。番茄抗黄化曲叶病毒病 *ty-5* 基因引物序列来源于 <http://solgenomics.net/> 网站已公布的引物序列,并对选取的SSR引物进行筛选。

**1.2.3 SSR标记的PCR扩增** 上下游引物浓度为  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DNA模板  $0.1 \text{ mg}$ , *Taq-Mix* (cwbiotech China)  $8 \mu\text{L}$ , 用无菌水补足体系至  $20 \mu\text{L}$ 。最适反应条件:  $94^\circ\text{C}$  变性  $5 \text{ min}$ ,  $94^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $55^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $50 \text{ s}$ , 扩增35个循环,最后  $72^\circ\text{C}$  终延伸  $10 \text{ min}$ 。PCR产物于  $1.0\%$  琼脂糖凝胶电压  $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$  条件下电泳  $40 \text{ min}$ , 用Goodview染色, Bio-RAD凝胶成像系统拍照<sup>[29]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选

经过筛选得到1个与抗病性状共分离的SSR标记,引物序列见表1。该标记在抗病纯合自交系  $P_1$  (CLN32120a-23)中可以扩增出1条550 bp的条带,在感病纯合自交系  $P_2$  (Moneymaker)中可以扩增出1条780 bp的条带,而在CLN32120a-23×Moneymaker  $F_1$  中则可以同时扩增出550 bp和780 bp左右的条带(图1)。550 bp和780 bp 2个片段能将抗病材料和感病材料加以区分,是与 *ty-5* 抗病基因连锁的标记。

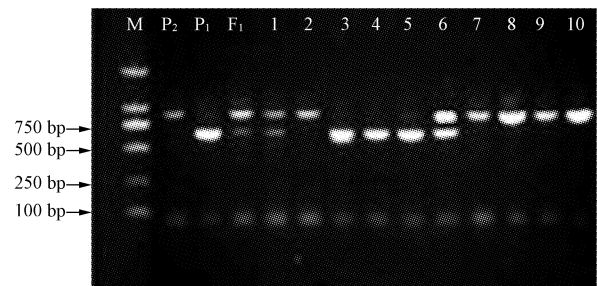
### 2.2 SSR标记在不同世代中的扩增结果

由于 *ty-5* 基因属于隐性基因遗传效应,杂种  $F_1$  代单株都是感病杂合体,田间表现为感病。用SSR引物对CLN32120a-23×Moneymaker 10份  $F_2$  代群体植株进行

抗病基因检测。由图1可知,有2份材料为杂合感病型,产生550 bp和780 bp的扩增条带,5份纯合感病基因型,产生780 bp的条带,为不含有 *ty-5* 基因的感病品种;3份为纯合抗病基因型,产生550 bp的扩增片段,应为含有 *ty-5* 基因的抗病品种。利用SSR标记对5份抗病材料和5份感病材料进行PCR扩增,由图2可知,5份感病材料产生780 bp左右的片段,5份抗病材料产生550 bp左右的片段。

表1 鉴定引物序列

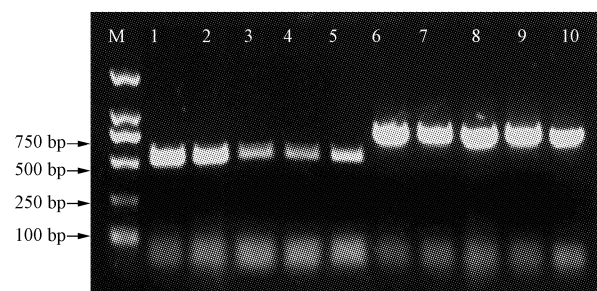
Table 1 Sequence of primers for identification			
引物 Primer	标记类型 Marker style	引物序列 Primer sequence	扩增片段 Amplified fragment/bp
ty-5-F	SSR	5'-GACTGCATTGGATTGGCTT-3'	抗病植株(R):550
ty-5-R		5'-CAATCGATGCACAAAACACC-3'	感病植株(S):780



注:  $P_1$ : CLN32120a-23;  $P_2$ : Moneymaker;  $F_1$ : CLN32120a-23 × Moneymaker; 1~10:  $F_2$ 。

图1 SSR标记在不同世代中的扩增

Fig. 1 SSR marker amplification in different generations



注: 1~5. 抗病材料; 6~10. 感病材料。

Note: 1—5. Resistant materials; 6—10. Susceptible materials.

图2 SSR标记在不同材料中的扩增

Fig. 2 SSR marker amplification in different materials;

### 2.3 $F_2$ 代分子检测与田间鉴定结果比较

由表2可知,从  $F_2$  代群体中随机选出10份材料,除了1份材料(编号1)不含 *ty-5* 抗病基因,但田间表现为抗病外,其它9份材料的分子检测结果和田间检测结果基本吻合,说明编号1的材料可能含有除 *ty-5* 以外的其它抗TYLCV的抗性基因。10份  $F_2$  代番茄材料中,有5份含有纯合 *ty-5* 抗性基因,可以选择其作为抗TYLCV育种的抗性亲本材料。

表 2  $F_2$  代分子检测与田间鉴定结果比较Table 2 Comparison of molecular detection and field identification results of  $F_2$ 

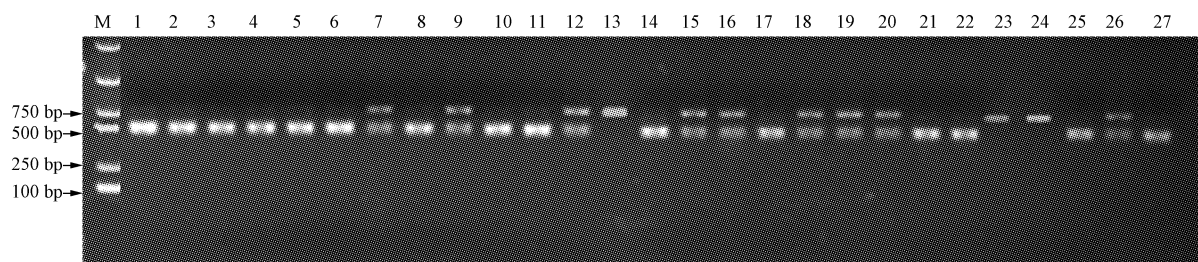
编号 No. of sample	基因型 Genotype	分子检测 Molecular detection	病情分级 Disease classification	田间鉴定 Field identification
1	$Ty-5/t_{y-5}$	R/S	0	R
2	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R
3	$Ty-5/Ty-5$	S	4	S
4	$Ty-5/Ty-5$	S	4	S
5	$Ty-5/Ty-5$	S	3	S
6	$Ty-5/t_{y-5}$	R/S	2	S
7	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R
8	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R
9	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	1	R
10	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	1	S

注:0,1 为抗病,2,3,4 为感病;R 为抗病,S 为感病。下表同。

Note:0 and 1 mean resistant;2,3,4 mean susceptible;R means resistant and S means susceptible. The same below.

## 2.4 利用 SSR 标记对番茄高代自交系进行抗性基因检测

由图 3 可知,被检测的 27 份高代自交系材料中,基因型是  $t_{y-5}/t_{y-5}$  的有 15 份(编号为 1~6、8、10-11、14、17、21~22、25、27),扩增出 550 bp 的条带; $Ty-5/t_{y-5}$  有 9 份(编号为 7、9、12、15、16、18~20、26),扩增出 780、550 bp 的 2 种条带; $Ty-5/Ty-5$  有 3 份(编号为 13、23、24),扩增出 780 bp 的条带。由表 3 可知,编号为 7、9、16、26 的材料分子检测和田间检测结果存在差异,分子检测和田间检测结果吻合率达 80%。分析可知,这 4 份材料分子检测不含  $t_{y-5}$  基因,但田间表现均为抗性,说明这些材料可能含有除  $t_{y-5}$  以外的其它 TYLCV 抗性基因。27 份番茄材料中有 15 份含有纯合  $t_{y-5}/t_{y-5}$  (550 bp) 抗性基因,田间鉴定结果表明,这些纯合抗病材料对番茄黄化曲叶病毒具有抗性,可以选择其作为抗 TYLCV 育种材料。

图 3 利用  $t_{y-5}$  标记对 27 份番茄材料的鉴定Fig. 3 Identification of 27 tomato materials by  $t_{y-5}$  marker表 3 利用  $t_{y-5}$  标记对 27 份番茄材料的分子检测与田间鉴定结果比较Table 3 The comparison of molecular detection and field identification results of 27 tomato materials by  $t_{y-5}$  marker

编号 No. of sample	基因型 Genotype	分子检测 Molecular detection	病情分级 Disease classification	田间鉴定 Field identification	编号 No. of sample	基因型 Genotype	分子检测 Molecular detection	病情分级 Disease classification	田间鉴定 Field identification
1	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R	15	$Ty-5/t_{y-5}$	S	3	S
2	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	1	R	16	$Ty-5/t_{y-5}$	S	4	R
3	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R	17	$Ty-5/t_{y-5}$	R	1	R
4	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R	18	$Ty-5/t_{y-5}$	S	3	S
5	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R	19	$Ty-5/t_{y-5}$	S	2	S
6	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	1	R	20	$Ty-5/t_{y-5}$	S	3	S
7	$Ty-5/t_{y-5}$	S	4	R	21	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R
8	$t_{y-5}/t_{y-5}$	S	0	S	22	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	1	R
9	$Ty-5/t_{y-5}$	S	4	R	23	$Ty-5/Ty-5$	S	4	S
10	$t_{y-5}/t_{y-5}$	S	0	S	24	$Ty-5/Ty-5$	S	4	S
11	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R	25	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R
12	$Ty-5/t_{y-5}$	S	3	S	26	$Ty-5/t_{y-5}$	S	3	R
13	$Ty-5/Ty-5$	S	4	S	27	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R
14	$t_{y-5}/t_{y-5}$	R	0	R					

## 3 结论与讨论

该试验利用大量 SSR 分子标记筛选出 1 个与抗病性状共分离的共显性 SSR 标记。该标记在 CLN32120a-23 中可以扩增出大小为 550 bp 的条带,在 Moneymaker 中可以扩增出 780 bp 的条带,在  $F_1$  中可以扩增出上述

2 条条带,标记结果与田间鉴定基本一致,证明该标记能够区分抗病材料、感病材料及杂合感病材料,是与抗番茄黄化曲叶病毒病基因  $t_{y-5}$  紧密连锁的共显性标记,可以应用于分子标记辅助选择育种。对 27 份未知抗性高代自交系材料进行基因检测,编号为 7、9、16、26 的材料



分子检测和田间检测存在差异,说明这些材料可能含有除 *ty-5* 以外的其它抗 TYLCV 的抗性基因。

该试验建立了利用 SSR 标记辅助选择抗 TYLCV 抗病品种的选育 PCR 方法,为了便于将该标记应用于分子标记辅助育种(MAS)工作中,课题组摸索出了该标记的最佳反应体系和反应条件。并鉴定 15 份含有纯合 *ty-5/ty-5* 抗性基因的纯合自交系,田间鉴定结果表明,这 15 份纯合抗病材料对番茄黄化曲叶病毒具有抗病的特性,可作为抗 TYLCV 的育种材料。

目前培育抗病品种仍是防治黄化曲叶病毒病的最有效方法,利用常规方法进行抗病育种有较大的困难<sup>[30]</sup>,而分子标记辅助选择结合常规育种的方法能高效、准确地对抗病材料进行鉴定和选择,在所有的番茄抗黄化曲叶病毒病抗病基因中只有 *Ty-1/Ty-3* 被克隆,但不同抗病基因所调控的抗性机制仍然存在着差异,这使得番茄黄化曲叶病毒病抗病机制的研究仍较为重要。下一步将对 *Ty-1/Ty-3*、*Ty-2*、*Ty-4*、*ty-5* 之间的联系进行探索,为基因聚合育种、抗番茄黄化曲叶病新品种的选育提供依据<sup>[31-32]</sup>。当前国内对 *ty-5* 分子标记辅助育种的研究较少,该研究将为 *ty-5* 分子标记辅助选择育种的应用提供一定的参考依据<sup>[1-6]</sup>。

#### 参考文献

- [1] MORILLA G, JANSSE N, GARCA-ANDRS S, et al. Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for tomato yellow leaf curl virus [J]. Phytopathology, 2005, 95(9): 1089-1097.
- [2] PICS B, DEZM J, NUEZ F, et al. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus—a review [J]. Scientia Horticulturae, 1996, 67: 151-196.
- [3] 叶青静, 杨悦俭, 王荣青, 等. 番茄抗黄化曲叶病育种研究进展 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1230-1242.
- [4] 李廷刚, 李长松. 番茄黄化曲叶病毒研究进展 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 90-94.
- [5] 龚一帆. 威胁番茄生产的新病害—番茄黄化曲叶病毒 [J]. 中国蔬菜, 2009(21): 1-4.
- [6] 李小靖, 叶志彪. 我国番茄黄化曲叶病发生规律和研究进展 [J]. 长江蔬菜, 2010(2): 1-5.
- [7] ZAMIR D, EKSTEIN M, ICHELSON I, et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curlvirus tolerance gene, *Ty-1* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88: 141-146.
- [8] PEREZ A, CASTRO D E, DIEZ M J F, et al. Inheritance of tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991 [J]. Plant Dis, 2007, 91(7): 879-885.
- [9] VERLAAN M G, HUTTON S F, IBRAHEM R M, et al. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DF2GD-class RNA-dependent RNA polymerases [J]. PLoS Genet, 2013, 9(3): e1003399.
- [10] JI Y, SALUS M S, SMEETS J, et al. Co-dominant SCAR markers for detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* loci from *Solanum chilense* at 25 cM of chromosome 6 of tomato [J]. Report of the Tomato Genetics Cooperative, 2007, 57: 25-28.
- [11] JI Y, SCOTT J W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus linked to *Ty-1* on chromosome 6 of tomato [J]. Tomato Genet Coop Rep, 2006, 56: 22-25.
- [12] JI Y F, SCHUSTER D J, SCOTT J W, et al. *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.
- [13] 杨晓慧. 番茄抗黄化曲叶病基因 *Ty-2* 的精细定位及不同抗性基因效应比较 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [14] GARCIA B E, MARTIN C T, MAXWELL D P, et al. Co-dominant SCAR marker for detection of the *Begomovirus*-resistance *Ty-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm [J]. Rpt Tomato Genet Coop, 2007, 57: 21-24.
- [15] JI Y F, SCOTT J. 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.
- [16] 杨晓慧. 番茄抗黄化曲叶病基因与基因工程研究最新进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2283-2290.
- [17] 杨玛丽, 赵统敏, 余文贵, 等. 抗番茄黄化曲叶病基因 *Ty-2* 的 SSR 标记 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1109-1113.
- [18] GUO Y M, DU Y C, WANG X X, et al. Research progress in tomato yellow leaf curl virus [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(5): 30-35.
- [19] ANBINDER I, REUVENI M, AZARI R, et al. Molecular dissection of tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119: 519-530.
- [20] HUTTON S F, SCOTT J W, SCHUSTER D J, et al. Recessive resistance to tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4 [J]. Hort Science, 2012, 47(3): 324-327.
- [21] 杨欢欢, 李景富, 许向阳, 等. 番茄抗黄化曲叶病基因 *ty-5* 的分子标记及遗传分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42(10): 1965-1973.
- [22] 李景富, 许向阳, 王傲雪, 等. 中国番茄育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011, 275-285.
- [23] 侯富恩. 番茄抗 TYLCV 相关分子标记筛选及其分子标记辅助选择抗性聚合研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [24] 彭祥珍. 番茄抗黄化曲叶病基因 *Ty-1* 的分子标记及种质资源筛选 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [25] 刘晓东. 番茄黄化曲叶病抗病基因 *Ty-3* 的遗传规律研究及分子标记 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [26] GOTTLIEB Y, ZCHORI F E, MOZRS D N, et al. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species [J]. Journal of Virology, 2010, 84 (18): 9310-9317.
- [27] 申书兴. 园艺植物育种学实验指导 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [28] 蔡凌云, 潘一, 杨双春. 聚丙烯酰胺的处理方法研究进展 [J]. 当代化工, 2013(2): 165-167.
- [29] ABOU J Y, MAALOUF R, SHEBARO W, et al. Comparison of the reaction of tomato lines to infection by tomato yellow leaf curl *Begomovirus* in Lebanon [J]. Plant Pathology, 1999, 48: 727-734.
- [30] 王琳珊. 番茄抗病基因 *Ty-2* 的分子标记及其在辅助选择中的应用 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2012.
- [31] 侯富恩, 杨玛丽, 赵统敏, 等. 与抗 TYLCV 基因连锁的 AFLP 标记筛选及 CAPS 标记的转化 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1047-1052.
- [32] 侯富恩. 番茄抗 TYLCV 相关分子标记筛选及其分子标记辅助选择抗性聚合研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.

DOI:10.11937/bfyy.201614028

# 茼蒿提取物对西瓜枯萎病菌抑制效果的初步研究

刘 琼, 张新龙, 范淑英

(江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

**摘 要:**以茼蒿干粉为试材,设置 0、MIC、EC<sub>50</sub> 和 MFC 4 种浓度,通过测定培养液的电导率、菌丝中总糖含量、蛋白质含量、核酸泄露以及菌丝干湿样质量的变化,研究了茼蒿提取液对西瓜枯萎病菌抑制作用的影响。结果表明:加入茼蒿提取物的菌悬液电导率明显增大,其中浓度为 EC<sub>50</sub> 时的液体培养基中相对电导率最大,达到 0.27 mS·cm<sup>-1</sup>;菌丝总糖和可溶性蛋白质含量均下降。此外,菌丝生物量也明显下降,MFC 处理下湿样质量较对照减少 64.34%,干样质量较对照减少 78.63%。

**关键词:**茼蒿;西瓜枯萎病;抑菌机理;电导率

**中图分类号:**S 436.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0114-05

从植物中提取活性物质来抑制有害微生物,已成为开发和研制新型植物源农药的有效途径之一。蒲忠慧<sup>[1]</sup>从青刺果提取的生物碱、黄酮等对金黄色葡萄球菌有抑制作用。张雅静<sup>[2]</sup>从苦瓜中分离纯化出的化合物中抑菌活性物质对大肠杆菌可能有抑菌作用。黄晓敏<sup>[3]</sup>也从马尾松针中提取出抑菌活性物质黄酮类似物,其对常见的腐败菌及致病菌有抑菌作用。张赟彬等<sup>[4]</sup>

提出许多植物提取物对微生物都有较强的抑制作用。从目前绝大多数的研究结果分析,植物中提取的活性物质的抑菌机理大致可以分为降解细胞壁<sup>[5]</sup>、破坏细胞膜<sup>[6]</sup>、胞内成分渗出<sup>[7]</sup>、破坏膜蛋白<sup>[8]</sup>、分子主动运输力损耗<sup>[9]</sup>、胞质凝结<sup>[10]</sup>等。该试验主要研究茼蒿提取物对西瓜枯萎病菌的抑菌效果及抑菌机理,以期茼蒿活性物质的开发与利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试茼蒿采用江西农业大学农学院蔬菜基地种植且经风干后的茼蒿干品,用小型粉碎机粉碎成粉末状样品,过 40 目筛。供试西瓜枯萎病菌由浙江大学农学院提供。PDB 培养液组分、葡萄糖、三水合乙酸铅、考马斯亮蓝、牛血清蛋白、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、草酸、蒽酮、

**第一作者简介:**刘琼(1991-),女,硕士研究生,研究方向为植物保护。E-mail:1174679741@qq.com.

**责任作者:**范淑英(1963-),女,本科,教授,研究方向为蔬菜栽培生态与环境调控。E-mail:fansy12@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31360487);江西省自然科学基金资助项目(20132BAB204016)。

**收稿日期:**2016-03-11

## Rapid Detection of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistant Gene *ty-5* in Tomato by PCR

YANG Huanhuan<sup>1</sup>, JIANG Jingbin<sup>1</sup>, LI Jingfu<sup>1</sup>, XU Xiangyang<sup>1</sup>, SHANG Junming<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. College of Literature and Media, Taishan University, Tai'an, Shandong 271000)

**Abstract:** Taking CLN32120a-23(resistant materials) and Moneymaker(susceptible materials) as experimental materials which is resistant to yellow leaf curl virus in tomato, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> were obtained through hybridization, selfcross, using SSR technology, a molecular marker was obtained. The results showed that SSR marker had a 550 bp amplification fragment in homozygous resistant lines, a 780 bp fragment in susceptible lines and both 780 bp and 550 bp fragments in heterozygous resistant lines. The detection results were consistent with those of field identification. So the SSR marker, tightly linked to *ty-5* gene, could distinguish homozygous and heterozygous resistant lines and susceptible lines. 27 tomato materials individuals were detected. There were 15 homozygous resistant lines, the molecular detection was 80% coincident with the results of field identification. The results showed that *ty-5* SSR marker could be used for rapid identification of *ty-5* resistant gene in tomato.

**Keywords:** tomato yellow leaf curl virus; *ty-5*; SSR; PCR