

番茄品种 Mi 基因对根结线虫抗性的检测

韩娜¹, 卓侃¹, 王彬², 林柏荣¹, 廖金铃¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 徐州空军学院 航空军需系, 江苏 徐州 221000)

摘要:采用酶切扩增多态性序列(Cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS)方法对国内市场上的26个番茄 *Solanum lycopersicum* 品种进行 Mi 基因检测. 结果表明, 特璐丝、红丽、TRS-401、仙客1号和仙客5号5个品种含有纯合体 Mi 基因, 其余品种均不含 Mi 基因. 进一步用南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 和象耳豆根结线虫 *M. enterolobii* 对这26个品种进行接种试验, 计算根结率和根结指数. 结果发现, 南方根结线虫和象耳豆根结线虫侵染不含 Mi 基因的21个番茄品种的根结率为100%, 根结指数为100; 而含 Mi 基因的5个番茄品种对南方根结线虫的根结率为1%~5%, 根结指数为0~4, 而对象耳豆根结线虫的根结率为26.7%~45.6%, 根结指数为56~64. 表明含 Mi 基因的番茄高抗南方根结线虫, 但对象耳豆根结线虫感病或比较感病.

关键词:番茄; Mi 基因; 酶切扩增多态性序列; 根结线虫

中图分类号: S641.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0019-05

The Detection of Resistance of the Tomato Cultivars with Mi Gene to Root-Knot Nematodes

HAN Na¹, ZHUO Kan¹, WANG Bin², LIN Bo-rong¹, LIAO Jin-ling¹

(1 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Department of Military Supplies, Xuzhou Air Force College, Xuzhou 221000, China)

Abstract: Twenty-six cultivars of tomato in domestic markets were detected for the resistance gene Mi by cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS). The results indicated that 5 cultivars of the tomato, including TRS, Hongli, TRS-401, Xianke NO. 1 and Xianke NO. 5, carried homozygous Mi, and the further study on the resistance of the tomato cultivars to *Meloidogyne incognita* and *M. enterolobii* was conducted separately by artificially inoculating. The results showed that the gall rate and the gall index of other 21 tomato cultivars without Mi gene were 100% and 100, when inoculated with *M. incognita* or *M. enterolobii*; 1% to 5% and 26.7% to 45.6% for the five tomato cultivars with Mi gene, and when inoculated with *M. incognita* and *M. enterolobii*, the gall index were 0 to 4 and 56 to 64 correspondingly. The study also showed that *M. enterolobii* could overcome Mi gene to some extent. The tomato cultivars with Mi gene were high resistant to *M. incognita*, but susceptible or more susceptible to *M. enterolobii*.

Key words: tomato; Mi gene; cleaved amplified polymorphic sequences; *Meloidogyne*

番茄 *Solanum lycopersicum* 是重要的果蔬类作物, 在我国广泛栽培. 近年来, 番茄根结线虫 *Meloidogyne* spp. 的发生越来越普遍, 严重影响到番茄的生产. 番茄被根结线虫侵染后一般减产 10%~20%, 严

收稿日期: 2009-11-22

作者简介: 韩娜(1984—), 女, 硕士; 通信作者: 廖金铃(1962—), 男, 教授, E-mail: jlliao@scau.edu.cn

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD08A08); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-050-4); 广东省科技计划项目(2005B20801013, 2007B020709008); 国家自然科学基金(30671365, 30871628)

重时损失达30%~40%，甚至导致番茄死亡^[1-5]。其中南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 在我国广泛分布，是引起番茄根结线虫危害的主要病原线虫^[6-8]。象耳豆根结线虫 *M. enterolobii* 是在海南省象耳豆树上发现的一种根结线虫，据报道它能在多种经济作物、热带水果和含 Mi 基因的番茄品种 Nemarex 上繁殖^[9]，主要分布在海南和广东，已成为我国热带、亚热带地区作物的一个重要病原物^[10]，并有成为优势种群的趋势。

培育和利用抗虫番茄品种是控制番茄根结线虫危害的理想途径^[11-13]。Mi 基因是目前唯一被商业化应用的番茄抗根结线虫的基因^[14]，该基因由 Watts 在南美洲西部沿海的秘鲁番茄 *S. peruvianum* 上发现的。Mi 基因能有效地抑制南方根结线虫、花生根结线虫 *M. arenaria* 和爪哇根结线虫 *M. javanica* 的繁殖和危害^[9-10, 15-17]，但对象耳豆根结线虫的抑制效果较差^[9-10]。

通过检测番茄是否含有 Mi 基因，有助于我们选择合适的品种进行种植，从而达到抗根结线虫感染的目的。检测 Mi 基因的方法主要有：检测与 Mi 基因紧密连锁的 APS-1 同工酶标记或 REX-1 位点，或采用 RFLP 和 RAPD 的方法进行检测。但由于同工酶标记 APS-1 与番茄的某些不良性状相连锁，而且 APS 等位基因 APS-1⁻ 与 APS-1⁺ 也会发生遗传重组^[18-19]。Williamson 等^[13]的研究显示，APS-1⁻ 和 APS-1⁺ 都能和 Mi 或 mi 基因相连锁，因此不能用作检测 Mi 基因；基于与 Mi 连锁的 RFLP 方法则需要进行复杂的 Southern 杂交，不适宜进行常规的检测；RAPD 由于结果不稳定，也不能作为检测 Mi 基因的手段^[12]。酶切扩增多态性序列 (Cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 标记是特异性引物 PCR 与限制性酶切相结合而产生的一种 DNA 标记。Williamson 等^[13]成功建立 CAPS 方法检测与 Mi 紧密连锁的 REX-1 标记来检测 Mi 基因，能有效避免上述其他方法的缺点，适用于日常的大规模检测。于力等^[1]采用此方法对 Ty-1 和 Mi 基因同时扩增鉴定，但国内目前还没有专门针对番茄 Mi 基因检测的报道。本研究采用 CAPS 方法对国内市场上多个番茄品种的抗南方根结线虫和象耳豆根结线虫特性进行研究，为生产中选择合适的番茄品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试根结线虫 南方根结线虫 *Meloidogyne*

incognita 和象耳豆根结线虫 *M. enterolobii* 均由华南农业大学资源环境学院植物线虫研究室提供，保存和繁殖于马铃薯 *Solanum tuberosum* 根部。

1.1.2 供试番茄材料 26 种番茄都是市场购得，分别为：红丽，TRS-401，特璐丝，仙客 1 号，仙客 5 号，夏钻石，宝石 2 号，红丰，石抗一号，金宝，夏红一号，枝添金六号，红美人，金铁霸王，福克斯，金旺 6 号，金旺 3 号，夏旺 1 号，金旺王 F₁，金旺 9 号 F₁，金鑫，双金头三号，双金头一号，双金头二号，映田红，夏艳。

1.2 方法

1.2.1 番茄 DNA 提取 参照 Williamson 等^[13]的方法，采用 CTAB 法提取。然后贮备在 -20 ℃ 冰箱中备用。用于 PCR 反应的药品均购自 TaKaRa 生物技术工程有限公司。

1.2.2 引物及 PCR 扩增体系 Mi 基因的检测，参照 Williamson 等^[13]的方法，对与 Mi 基因紧密连锁的 REX-1 位点进行 PCR 扩增。引物如下：SCAR R: TCG-GAGCCTTGGTCTGAATT, SCAR F: GCCAGAGAT-GATTCGTGAGA, 均由上海英骏生物工程技术公司合成。PCR 反应总体系为 20 μL，其中包括 Buffer 2 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL, 引物 (10 pmol/μL) 各 1 μL, 5 U/μL rTaq DNA 聚合酶 0.2 μL, 模板 DNA 1 μL, 终体积用水加至 20 μL。扩增程序为 94 ℃ 变性 5 min, 然后 94 ℃ 1 min, 59 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 进行 35 个循环反应。最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物 4 ℃ 保存^[1]。PCR 产物于 10 g/L 琼脂凝胶在电压 5 V/cm 条件下电泳 20 min。利用凝胶成像系统拍照保存。

1.2.3 序列分析 利用 DNASTar 分析软件 (Demonstration system DNASTar, V5.0) 进行序列分析，序列分析的结果通过国际互联网进行核酸序列同源性检索，检索主程序采用 BLAST，即核酸序列对氨基酸序列数据库的检索，序列分析在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>) 进行，对所有获得的 PCR 产物测序进行比对，确定扩增所获得的片段为 REX-1 位点。

1.2.4 根结线虫接种 每种植物材料选择长势相当 (四叶期) 的 30 株，随机排列于温室中，采用灌根法将根结线虫的 2 龄幼虫分别接种到 26 种植物材料根部，其中象耳豆根结线虫、南方根结线虫各接种 15 株。接种密度为 200 条/株。

1.2.5 接种结果统计 接种后第 4 周对植物根组织进行侵染情况测定，参照刘维志等^[2]和冯志新等^[20]介绍的次氯酸钠-酸性品红染色法进行染色计

数. 染色后在体视显微镜下观察线虫侵染情况, 并对线虫侵染后引起的植物根部根结数以及侵入根部的雌虫数进行计数.

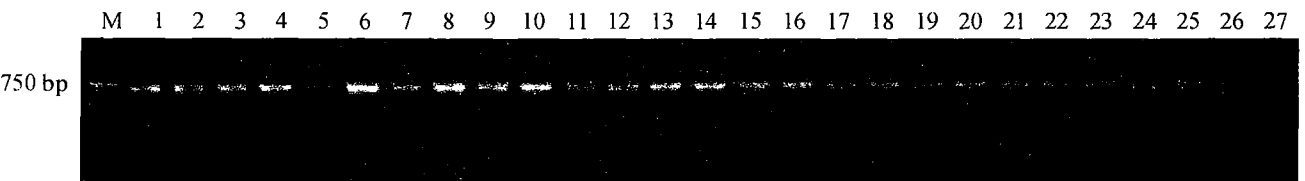
番茄抗根结线虫病评价分级标准参照王新荣等^[21]的方法: 根据番茄形成根结的根数占整个根系的百分数, 将番茄抗根结线虫病等级分成免疫、高度抗病、抗病、感病、比较感病和高度感病等 6 级 (表 1).

表 1 番茄抗根结线虫病评价分级标准

Tab. 1 Grading evaluation criteria of tomato resistance to root-knot nematodes

病级	根结率/%	根结指数 ¹⁾	抗病类型
0	0	0	免疫
1	1~5	1~20	高度抗病
2	6~25	21~40	抗病
3	26~50	41~60	感病
4	51~80	61~80	比较感病
5	>80	81~100	高度感病

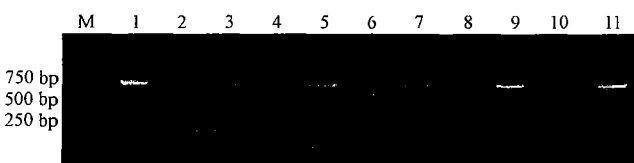
$$1) \text{根结指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总株数}} \times 100.$$



M: DL2000 DNA marker; 1: 红丽; 2: TRS-401; 3: 特璐丝; 4: 仙客 1 号; 5: 仙客 5 号; 6: 夏钻石; 7: 宝石 2 号; 8: 红丰; 9: 石抗一号; 10: 金宝; 11: 夏红一号; 12: 枝添金六号; 13: 红美人; 14: 金铁霸王; 15: 福克斯; 16: 金旺 6 号; 17: 金旺 3 号; 18: 夏旺 1 号; 19: 金旺王 F₁; 20: 金旺 9 号 F₁; 21: 金鑫; 22: 双金头三号; 23: 双金头一号; 24: 双金头二号; 25: 映田红; 26: 夏艳; 27: 空白对照.

图 1 不同番茄品种的 REX-1 位点扩增片段

Fig. 1 PCR amplification on REX-1 in different tomato cultivars



M: DL2000 DNA marker; 1, 2: 红丽; 3, 4: TRS-401; 5, 6: 特璐丝; 7, 8: 仙客 1 号; 9, 10: 仙客 5 号; 11: 枝添金六号; 其中 1, 3, 5, 7, 9 为不加内切酶 Taq I 对照.

图 2 5 个含有 Taq I 位点的番茄品种酶切结果

Fig. 2 RFLP of Taq I to five tomato cultivars

2.2 不同番茄品种对南方根结线虫和象耳豆根结线虫的抗性

表 2 的结果表明, 受试的 26 个番茄品种, 只有特璐丝、红丽、TRS-401、仙客 1 号和仙客 5 号接种南

1.2.6 数据处理 利用 SAS 9.0 数据处理软件对获得的数据进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 不同番茄品种 Mi 基因的检测

本研究采用 PCR 与酶切相结合的方法对 26 个不同品种番茄的 REX-1 位点进行检测, 使用特异引物 SCAR F/SCAR R 进行 PCR. 结果显示, 受试的 26 个番茄品种都能获得一条 750 bp 的特异条带 (图 1). 但带有纯合和杂合 Mi 基因的番茄存在 Taq I 酶切位点, 经酶切后分别产生 570、180 和 750、570 和 180 bp 的特异性片段; 而不含 Mi 基因的番茄没有 Taq I 酶切位点. 测序结果显示, 受试的 26 个番茄品种中只有特璐丝、红丽、TRS-401、仙客 1 号和仙客 5 号的 REX-1 位点有 Taq I 酶切位点. 酶切结果显示, 这 5 个品种均是纯合的 Mi 基因 (图 2), 其余 21 个品种不含 Mi 基因.

方根结线虫后的根结率均小于 5%, 根结指数为 0~4, 对南方根结线虫高度抗病; 但接种象耳豆根结线虫后的根结率为 26.7%~45.6%, 根结指数为 56~64, 对象耳豆根结线虫感病; 其余的 21 个品种无论是接种南方根结线虫或象耳豆根结线虫根结率均为 100%, 根结指数为 100, 对南方根结线虫和象耳豆根结线虫高度感病. DMRT 分析显示, 5 个含 Mi 基因的番茄品种接种南方根结线虫后, 各品种间根结率和根结指数差异均不显著 ($P=0.01$), 且都显著小于其余 21 个受试的番茄品种 ($P=0.01$); 5 个含 Mi 基因的番茄品种接种象耳豆根结线虫后, 各品种间根结率和根结指数差异也不显著, 但显著小于其余的 21 个感病番茄品种.

表2 番茄品种对南方根结线虫和象耳豆根结线虫的抗性评价结果¹⁾

Tab.2 Evaluation of resistance of tomato cultivars to *Meloidogyne incognita* and *M. enterolobii*

品种	基因型	根结率/%		根结指数	
		南方根结线虫	象耳豆根结线虫	南方根结线虫	象耳豆根结线虫
宝石2号	mi	100A	100A	100A	100A
双金头3号	mi	100A	100A	100A	100A
夏红一号	mi	100A	100A	100A	100A
金旺9号	mi	100A	100A	100A	100A
夏旺1号	mi	100A	100A	100A	100A
特璐丝	Mi	2B	46B	4B	64B
金宝	mi	100A	100A	100A	100A
映田红	mi	100A	100A	100A	100A
金旺6号	mi	100A	100A	100A	100A
夏钻石	mi	100A	100A	100A	100A
夏艳	mi	100A	100A	100A	100A
仙客5号	Mi	0B	42B	0B	60B
仙客1号	Mi	0B	43B	0B	60B
红美人	mi	100A	100A	100A	100A
红丽	Mi	0B	42B	0B	56B
红丰	mi	100A	100A	100A	100A
福克斯	mi	100A	100A	100A	100A
金旺王	mi	100A	100A	100A	100A
金鑫	mi	100A	100A	100A	100A
金铁霸王	mi	100A	100A	100A	100A
枝添金6号	mi	100A	100A	100A	100A
石抗一号	mi	100A	100A	100A	100A
TRS-401	Mi	0B	27B	0B	60B
金旺3号	mi	100A	100A	100A	100A
双金头2号	mi	100A	100A	100A	100A
双金头1号	mi	100A	100A	100A	100A

1) 同列数据后凡是有一个相同大写字母表示差异不显著(DMRT法, $P=0.01$); Mi代表该品种是纯合的Mi基因, mi代表该品种不含Mi基因。

3 结论

本文通过CAPS和人工接种的方法对26种番茄品种的抗南方根结线虫和象耳豆根结线虫特性进行了研究。结果表明,受试的26个品种均能扩增出一条750 bp的特异条带,但测序结果显示只有5个品种的序列中含有Taq I的酶切位点,其余的21个品种都不含Taq I酶切位点,对这5个品种进行酶切,结果显示这5个番茄品种均含纯合的Mi基因。

接种南方根结线虫的试验结果表明,这5个番茄品种对南方根结线虫高度抗病,而其余21个番茄品种则高度感病,这证明了REX-1的检测方法与接种结果相吻合。接种结果进一步证明,通过CAPS方法检测与Mi基因连锁的REX-1结果准确、快速、可靠,能有效地避免APS-1、RAPD和RFLP的缺点。

另外,接种南方根结线虫的结果显示,含Mi基因的品种根结率和根结指数的差异均不显著,都表现出高度抗南方根结线虫的特性;接种象耳豆根结线虫后,根结率和根结指数差异亦不显著,表现出感病性。这一结果说明,含Mi基因的番茄品种能有效抵抗南方根结线虫的为害,不能有效地阻止象耳豆根结线虫为害。但接种象耳豆根结线虫后,含有Mi基因的植株与不含Mi基因的植株根结率和根结指数均差异显著;尽管都表现为感病,但含有Mi基因的品种根结指数和根结率都要明显小于不含Mi基因的植株,说明Mi基因能部分地抑制象耳豆根结线虫的侵染。刘昊等^[9]对番茄、茄子、辣椒、烟草等10种经济作物15个品种上象耳豆根结线虫的繁殖指数研究表明,象耳豆根结线虫能在含Mi基因的抗性番茄品种Nemarex上繁殖。本研究用象耳豆根结线虫接种5个含Mi基因的不同番茄品种,进一步证实该种根结线虫能有效克服Mi基因的抗性,而与番茄的其他遗传背景无关。其余不含有Mi基因的21个番茄品种接种南方和象耳豆根结线虫后根结率和根结指数均显著大于前述的5个抗性品种,说明不含有Mi基因的植株不能抗南方根结线虫和象耳豆根结线虫的侵染。

综上所述,目前我国的市场上售卖的番茄栽培品种中仅有少数含有Mi基因,大部分品种都不含Mi基因。受试的番茄品种中含有Mi基因的都高抗南方根结线虫,不含Mi基因的都高感南方根结线虫;受试全部番茄都对象耳豆根结线虫高度感病或感病,但含Mi基因的番茄的根结率和根结指数都显著低于不含Mi基因的番茄。因此,在南方根结线虫为优势种群的地区应尽量选择含Mi基因的品种栽种,在象耳豆根结线虫为害严重的地方,种植抗性品种仅能减少部分为害,应该改种象耳豆根结线虫不侵染的其他作物或采用化学防治以及其他防治措施相结合的方法,减少象耳豆根结线虫的为害。试验结果同时证明,Mi基因的有无决定了番茄是否具有抗南方根结线虫的能力,Mi基因仍是当前最主要和应用最

广的抗根结线虫基因. 由于 Mi 所控制的抗性性状仍存在一些不足, 同时, 象耳豆根结线虫对番茄的危害的问题正日益突出, 因此, 筛选包括抗象耳豆根结线虫的新的抗根结线虫基因和培育抗线虫病的番茄品种应该成为当前番茄抗线虫育种的重要任务.

参考文献:

- [1] 于力, 朱龙英, 万延慧, 等. 多重 PCR 技术鉴定番茄 Ty-1 和 Mi 基因[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 165-169.
- [2] 刘维志, 段玉玺. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 213-281.
- [3] 彭德良. 蔬菜线虫病害的发生和防治[J]. 中国蔬菜, 1998, 4: 57-58.
- [4] 彭德良, 唐文华. 番茄抗根结线虫 Mi 基因研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(3): 220-223.
- [5] 杨宝君. 十五种根结线虫病害的病原鉴定[J]. 植物病理学报, 1984, 14(2): 107-112.
- [6] 陈书龙, 李秀花, 马娟, 等. 河北省根结线虫发生种类与分布[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 91-94.
- [7] 廖金铃, 蒋寒, 孙龙华, 等. 中国南方地区作物根结线虫种和小种的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(6): 544-548.
- [8] 赵洪海, 袁辉, 武侠, 等. 山东省根结线虫的种类与分布[J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(4): 243-247.
- [9] 刘昊, 龙海, 鄢小宁, 等. 海南省番石榴根结线虫病原的种类鉴定及其寄主范围的测试[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 55-59.
- [10] 卓侃, 胡茂秀, 廖金铃, 等. 广东省和海南省象耳豆根结线虫的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2008, 2(27): 193-197.
- [11] SORRIBAS F J, ORNAT C, LUCAS V S, et al. Effectiveness and profitability of the Mi, resistant tomatoes to control root-knot nematodes[J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 111(1): 29-38.
- [12] SORRIBAS F J, ORNAT C, VERDEJO-LUCAS S, et al. Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes[J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 111(1): 29-38.
- [13] WILLIAMSON V M, HO J Y, WU F F, et al. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 87(7): 757-763.
- [14] FULLER V L, LILLEY C J, URWIN P E. Nematode resistance[J]. New Phytologist, 2008, 180(1): 27-44.
- [15] TALAVERA M, VERDEJO-LUCAS S, ORNAT C, et al. Crop rotations with Mi gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses[J]. Crop Protection, 2009, 28(8): 662-667.
- [16] CORTADA L, SORRIBAS F J, ORNAT C, et al. Response of tomato rootstocks carrying the Mi-resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 124(2): 337-343.
- [17] WILLIAMSON V M. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use[J]. Annual Review of Phytopathology, 1998(36): 277-293.
- [18] MESSEGUER R G M, VICENTE M C, YOUNG N D. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (Mi) in tomato[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1991(82): 529-536.
- [19] SEAH J, YAGHOobi J, WILLIAMSON V M. The nematode-resistance gene Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(8): 1635-1642.
- [20] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 180.
- [21] 王新荣, 郑静君, 汪国平, 等. 华南地区主要番茄品种对南方根结线虫的抗性评价[J]. 植物保护, 2009, 35(1): 124-126.

【责任编辑 周志红】