

DB 13

河北省地方标准

DB 13/T 6010—2024

番茄抗病种质资源一年多代快速培育
技术规程

地方标准信息服务平台

2024 - 10 - 28 发布

2024 - 11 - 28 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由河北省农业农村厅提出。

本文件起草单位：河北省农林科学院经济作物研究所、河北省农业项目规划中心。

本文件主要起草人：李亚栋、吴志明、杨靖、田哲娟、康忱、高亢、高慧敏。

地方标准信息服务平台

番茄抗病种质资源一年多代快速培育技术规程

1 范围

本文件规定了番茄抗病种质资源一年多代快速培育的前期准备、幼胚成苗、分子标记辅助选择、种植期温光调控等技术要求。

本文件适用于番茄抗病种质资源一年多代的快速培育。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

KASP：竞争性等位基因特异性PCR（Kompetitive Allele Specific PCR）

SDS：十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate）

TYLCVD：黄化曲叶病毒病（Tomato yellow leaf curl virus disease）

ToMVD：番茄花叶病毒病（Tomato mosaic virus disease）

TSWVD：番茄斑萎病毒病（Tomato spotted wilt virus disease）

FCRR：镰刀菌颈腐根腐病（*Fusarium* crown and root rot disease）

RKN：根结线虫（Root-knot nematode）

5 前期准备

5.1 仪器、药品

超净工作台、荧光定量PCR仪、荧光定量PCR试剂盒等，其他常用实验仪器、药品见附录A。

5.2 番茄种植所需设施、生产资料

5.2.1 主要设施

光照培养室、人工气候室或日光温室。

5.2.2 生产资料

育苗基质、穴盘、穴盘托等，有机肥、复合肥、磷酸二氢钾等常用肥料，百菌清、吡虫啉、菊酯类等常用抑菌防虫药物。

6 幼胚成苗

6.1 果实采集

从番茄植株上采集授粉后25 d的果实备用。

6.2 幼胚采集

6.2.1 果实表面消毒

在超净工作台内，将采集的果实浸泡在75%的酒精中10 min进行表面消毒。

6.2.2 取幼胚

用消毒后的手术刀切开果皮，从果肉中将未成熟种子自胎座上剥离。

6.2.3 清洗

用灭菌的蒸馏水洗去未成熟种子表面的果肉残渣。

6.3 幼胚培养

将清洗过的未成熟种子平铺在 1/2MS 培养基上，放置于温度 28℃、光照/黑暗=16h/8 h 的条件下培养约 5d。

6.4 移栽炼苗

将发芽种子移栽到穴盘内，加透明罩子保湿。7 d后打开罩子炼苗，幼苗生长至三叶一心期，备用。

7 分子标记辅助选择

7.1 DNA 提取

采集番茄幼苗叶片，采用常规的SDS方法或商业试剂盒提取DNA。

7.2 分子标记检测

7.2.1 主要抗病基因的分子标记引物

针对番茄TYLCVD、ToMVD、TSWVD、FCRR和RKN等病害，应用表1给出的KASP引物，对番茄种质资源的抗病基因进行分子标记检测。

表1 KASP 引物及基因分型判断标准

抗病基因	引物名称	引物序列（5′ - 3′ ）	等位基因	抗病类型
<i>Ty-1</i>	Ty-1-Allele-F1	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAATATGGTAAAGGTGCATCCAGA</u>	A : A	抗病
	Ty-1-Allele-F2	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATATGGTAAAGGTGCATCCAGT</u>	T : T	感病
	Ty-1-R	CCGTTGATTGAAGAAATTGATG		
<i>Mi-1</i>	Mi-1-Allele-R1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATGTTACAAGTATTTGTGGCG</u>	G : G	抗病
	Mi-1-Allele-R2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATGTTACAAGTATTTGTGGCA</u>	A : A	感病
	Mi-1-F	TTCAGACGAAGTTAGACATAAAGGA		
<i>Tm-2^e</i>	Tm-2-Allele-F1	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAATATGCTACAAGCCAAATTACTC</u>	C : C	感病
	Tm-2-Allele-F2	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAATATGCTACAAGCCAAATTACTT</u>	T : T	抗病
	Tm-2-R	GAAACAACCTCCATAATGCAAATC		
<i>Frl</i>	Frl-Allele-F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAAAGGACCATTTTCGTAGACCATT</u>	T : T	感病
	Frl-Allele-F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTAAAGGACCATTTTCGTAGACCATA</u>	A : A	抗病
	Frl-R	ATTTCTTACCATATGTGAAGAGAA		
<i>Sw-5</i>	FP1SNP724	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATT</u> CATGGACACAACCTGGAGTTATTA	A : A	感病
	FP2SNP724	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCT</u> CATGGACACAACCTGGAGTTATTG	G : G	抗病
	RPSNP724	CAGTCATTCTCAAATTTTACTTGT		
注：下划线部分为FAM荧光标签序列；双下划线部分为HEX荧光标签序列。				

7.2.2 KASP 检测技术

7.2.2.1 反应体系

总体积为5 μL : PCR Mix (2 $\times$) 2.5 μL , DNA溶液 (40 ng~50 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 正向引物1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.075 μL , 正向引物2 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.075 μL , 反向引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 加ddH₂O补至5 μL 。

7.2.2.2 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (10个循环, 每循环下降0.8 $^{\circ}\text{C}$); 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共24个循环; 57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。终点法采集荧光信号。

7.2.2.3 检测结果

依据表 1 的判断标准, 将基因型分为纯合抗病、纯合感病和杂合型, 选择符合育种目标的番茄幼苗。以 *Ty-1* 为例, 基因分型结果见图 1。

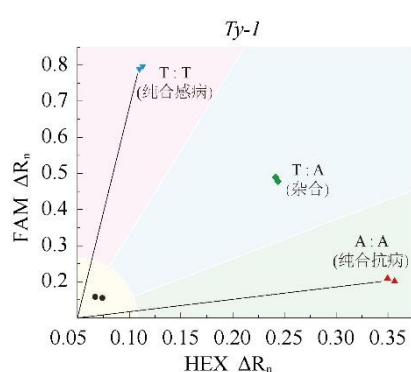


图1 *Ty-1* 抗病基因检测结果分型

8 种植期温光调控

8.1 定植后管理

于三叶一心期进行幼苗移栽, 白天温度22 $^{\circ}\text{C}$ ~24 $^{\circ}\text{C}$, 夜间14 $^{\circ}\text{C}$ ~16 $^{\circ}\text{C}$; 光照时间为 12 h~14 h, 配置LED植物生长灯红蓝光(1R1B): 远红光=3: 1, 光通量密度100 $\pm$ 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。保持14 d~18 d, 至第一穗花现蕾。

8.2 现蕾后管理

白天温度24 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$, 夜间18 $^{\circ}\text{C}$ ~20 $^{\circ}\text{C}$ 。光照时间为 13 h~15 h, 配置LED植物生长灯白光: 远红光=3: 1, 光通量密度120 $\pm$ 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。保持8 d~10 d, 至第一穗花可人工授粉。

8.3 开花后管理

人工授粉后, 白天温度28 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$, 夜间18 $^{\circ}\text{C}$ ~20 $^{\circ}\text{C}$ 。光照时间为 14h~16 h, 配置LED植物生长灯白光或继续保持白光: 远红光=3: 1, 光通量密度100 $\pm$ 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。25天后, 取果实进行下一世代幼胚培养。

附录 A
(资料性)
实验室常用仪器、器具及药品

A.1 实验室常用仪器、器具及药品

高温高压灭菌锅、移液器、称量天平、冰箱(4℃, -20℃, -80℃)、pH测量仪、镊子、组培瓶、酒精灯, 以及MS培养基、蒸馏水、琼脂粉等。

1/2MS培养基的配置: 称取4.43 g MS粉、30 g蔗糖和7.5 g琼脂粉, 加水800 mL充分溶解后, 定容至2L, 调节pH至5.8, 分装在500 mL锥形瓶中, 高温高压灭菌20 min备用。

地方标准信息服务平台