

# 野生花生抗青枯病种质的发掘及分子鉴定

陈本银,姜慧芳,任小平,廖伯寿,黄家权

(中国农业科学院 油料作物研究所,湖北 武汉 430062)

**摘要:**以花生属 5 个区组的 79 份野生花生种质为材料,系统鉴定了野生花生对青枯病的抗性反应,从中发掘高抗青枯病的种质 15 份,含匍匐区组种质 3 份、直立区组 1 份、异形花区组 1 份、花生区组 8 份、未命名种质 2 份,抗病材料频率达到 19%,高于栽培种花生资源的抗性频率。通过 SSR 分析表明,在所获得的抗青枯病野生花生材料中,四倍体野生种 *A. monticola* 与栽培种花生的亲缘关系最近,其次为花生区组的二倍体野生种 *A. duranensis* 和 *A. chacoense*。根据 DNA 扩增结果,绘制了抗青枯病种质的指纹图谱,明确了其 SSR 分子特性。

**关键词:**花生属;野生种;花生青枯病;抗病种质;SSR 分子特性

**中图分类号:**S565.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)03-0170-06

## Identification and Molecular Traits of *Arachis* Species with Resistance to Bacterial Wilt

CHEN Ben-yin, JIANG Hui-fang, REN Xiao-ping, LIAO Bo-shou, HUANG Jia-quan

(Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** The reaction to bacterial wilt disease of 79 accessions of 18 *Arachis* species belonging to 5 sections was evaluated in the years from 2004 to 2006. 15 genotypes with high resistance were identified including 3 accession of section *Procumbentes*, 1 of section *Erectoides*, 1 of section *Heteranthae*, 8 of section *Arachis* and 2 of *A. sp.* The percentage of accessions with resistance was 19% which was much higher than that of cultivated peanut. The relationship and genetic diversity of 15 *Arachis* accessions with bacterial wilt resistance were investigated based on SSR markers. The tetraploid species *A. monticola* was most closely related to the cultivated peanut *A. hypogaea* among the materials involved in the present study. The diploid species *A. duranensis* and *A. chacoense* of section *Arachis* were also closely related to the cultivated peanut. The DNA molecular characters and fingerprints of the 15 accessions were detected based on SSR products.

**Key words:** *Arachis* species; Wild species; Peanut bacterial wilt; Resistance; SSR

花生青枯病是由青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum* E F Smith) 引起的危害花生生产的重要病害之一,我国是发病面积最大和受危害最严重的国家<sup>[1-5]</sup>。作为一种土传细菌性病害,花生青枯病难于以化学方法防治,其他防治方法(如栽培轮作、生物防治等)效果也很有限,应用品种的抗性是最为经济可行的防治途径。

我国在花生青枯病抗性遗传改良及应用方面取得了很大进展,但是现有抗病品种荚果小,产量普遍低于具有相同生态适应性的非抗病品种,而且品质较差,尤其是含油量和油酸含量偏低,育成品种的遗

传基础较为狭窄。到目前为止,只有少数几个疏枝亚种的抗源被成功应用到育种中,这些抗源种质的抗性与产量、品质呈负相关,而大量的密枝亚种抗源的利用效果不理想。因此,进一步发掘青枯病抗性新的基因源是深化抗病育种的关键。

花生属野生种具有许多重要的优良性状<sup>[6]</sup>,国际半干旱热带地区作物研究所(ICRISAT)、美国、中国等的研究均表明,野生花生中存在丰富的抗叶斑病、锈病、线虫病、病毒等病害的抗源,而且对叶斑病和锈病的抗性与栽培种花生有所不同,并已在育种中有效利用<sup>[7-15]</sup>。然而,到目前,世界范围内还没

收稿日期:2007-12-28

基金项目:国家自然科学基金项目(30270840;30571132);国家科技基础条件平台项目(2005DKA21002-13)

作者简介:陈本银(1981-),女,湖北京山人,硕士,主要从事作物遗传育种研究工作。

通讯作者:姜慧芳(1963-),女,湖北新洲人,副研究员,博士,主要从事花生品种资源研究工作。

有对野生花生进行青枯病抗性的系统鉴定。因此，从野生花生中发掘并利用青枯病抗性对于改良栽培种花生具有潜在的利用价值。

我国自 20 世纪 70 年代以来从美国和 ICRISAT 引进了一批花生野生材料并保存于武昌国家种质野生花生圃中。本试验以这些资源为材料,系统鉴定了其对抗枯病的抗性差异,同时利用 SSR 技术分析了抗病种质间的关系和分子特点,绘制了指纹图谱,旨在为利用野生近缘种改良栽培种花生以及花生资源的安全保存和保护提供理论和物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以花生属 5 个区组的 79 份野生花生种质为材

料(表 1),包括匍匐区组种质 8 份,直立区组种质 5 份,围脉区组种质 1 份,异形花区组种质 4 份,花生区组种质 38 份,未命名种质 23 份。

1.2 抗性鉴定及调查方法

连续 3 年(2004 - 2006 年)在湖北红安病圃鉴定,该病圃的土壤质地、肥力和发病程度均匀一致,感病品种的发病率历年都在 70 % 以上。每份材料播种 1 行,每行约 20 株,每隔 10 行种植 1 行感病对照和 1 行抗病对照,重复 3 次。鉴定方法和调查标准按“七五”至“十五”国家科技攻关标准进行。

1.3 SSR 分析

选取花生健康幼叶,用 CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[16]</sup>。以国际半干旱研究所(ICRISAT)生物技术实验室提供 SSR 引物序列(上海生工公司或北京奥

表 1 花生属 79 份种质的青枯病抗性反应

Tab.1 Reaction to bacterial wilt of 79 accessions in Arachis species									
序号 Series	种 名 Species	PI 编号 PI code	区组 Section	抗性 % Resistance	序号 Series	种 名 Species	PI 编号 PI code	区组 Section	抗性 % Resistance
R1	<i>A. rigonii</i>	331190	匍匐区组	61.9	R41	<i>A. monticola</i>	468199	花生区组	20.0
R2	<i>A. rigonii</i>	262142	匍匐区组	92.3	R42	<i>A. monticola</i>	468199	花生区组	57.1
R3	<i>A. rigonii</i>	262142	匍匐区组	100.0	R43	<i>A. monticola</i>	468196	花生区组	41.7
R4	<i>A. appressipila</i>	261878	匍匐区组	10.0	R44	<i>A. monticola</i>	468196	花生区组	94.0
R5	<i>A. appressipila</i>	261878	匍匐区组	13.0	R45	<i>A. monticola</i>	219824	花生区组	33.3
R6	<i>A. appressipila</i>	262140	匍匐区组	35.3	R46	<i>A. monticola</i>	219824	花生区组	90.0
R7	<i>A. appressipila</i>	261877	匍匐区组	21.4	R47	<i>A. monticola</i>	210555	花生区组	61.5
R8	<i>A. appressipila</i>	261877	匍匐区组	100.0	R48	<i>A. villosa</i>	210555	花生区组	57.1
R9	<i>A. paraguariensis</i>	468357	直立区组	4.3	R49	<i>A. villosa</i>	210555	花生区组	80.0
R10	<i>A. paraguariensis</i>	331187	直立区组	22.2	R50	<i>A. villosa</i>	298636	花生区组	0.0
R11	<i>A. paraguariensis</i>	468365	直立区组	100.0	R51	<i>A. villosa</i>	298639	花生区组	33.3
R12	<i>A. oteroi</i>	468152	直立区组	25.0	R52	<i>A. batizocoi</i>		花生区组	76.9
R13	<i>A. oteroi</i>		直立区组	42.8	R53	<i>A. batizocoi</i>		花生区组	85.0
R14	<i>A. macedoi</i>		围脉区组	33.3	R54	<i>A. batizocoi</i>		花生区组	0.0
R15	<i>A. pusilla</i>	331189	异形花区组	9.0	R55	<i>A. sp</i>	298639		18.0
R16	<i>A. pusilla</i>	289628	异形花区组	30.0	R56	<i>A. duranensis</i>	263133	花生区组	33.3
R17	<i>A. pusilla</i>	338449	异形花区组	9.0	R57	<i>A. duranensis</i>	263133	花生区组	42.9
R18	<i>A. dardani</i>	338543	异形花区组	92.3	R58	<i>A. sp</i>			50.0
R19	<i>A. duranensis</i>	468197	花生区组	100.0	R59	<i>A. sp</i>	388298		33.3
R20	<i>A. duranensis</i>	262794	花生区组	81.8	R60	<i>A. sp</i>			56.0
R21	<i>A. duranensis</i>	219823	花生区组	43.7	R61	<i>A. sp</i>	338453		50.0
R22	<i>A. duranensis</i>	468201	花生区组	38.5	R62	<i>A. sp</i>	468168		31.0
R23	<i>A. duranensis</i>	475845	花生区组	18.9	R63	<i>A. sp</i>	468178		71.4
R24	<i>A. duranensis</i>	468319	花生区组	18.8	R64	<i>A. sp</i>	338297		25.0
R25	<i>A. duranensis</i>	468198	花生区组	18.0	R65	<i>A. sp</i>	338297		81.8
R26	<i>A. duranensis</i>		花生区组	85.7	R66	<i>A. sp</i>			50.0
R27	<i>A. helodes</i>	468150	花生区组	12.5	R67	<i>A. sp</i>	468358		72.7
R28	<i>A. hoehnei</i>	276235	花生区组	44.4	R68	<i>A. sp</i>	468165		38.9
R29	<i>A. chacoense</i>		花生区组	100.0	R69	<i>A. sp</i>			100.0
R30	<i>A. chacoense</i>		花生区组	25.0	R70	<i>A. sp</i>			42.9
R31	<i>A. cardenasii</i>	262141	花生区组	7.0	R71	<i>A. sp</i>	289637		53.3
R32	<i>A. cardenasii</i>		花生区组	39.0	R72	<i>A. sp</i>	289637		50.0
R33	<i>A. cardenasii</i>		花生区组	93.7	R73	<i>A. sp</i>	292275		37.5
R34	<i>A. cardenasii</i>	338279	花生区组	66.7	R74	<i>A. sp</i>			56.2
R35	<i>A. stenosperma</i>	338280	花生区组	44.4	R75	<i>A. sp</i>			33.3
R36	<i>A. stenosperma</i>	337308	花生区组	100.0	R76	<i>A. sp</i>			40.0
R37	<i>A. stenosperma</i>	261871	花生区组	40.0	R77	<i>A. sp</i>			31.3
R38	<i>A. correntina</i>	262808	花生区组	54.5	R78	<i>A. sp</i>			68.8
R39	<i>A. correntina</i>	262134	花生区组	30.7	R79	<i>A. sp</i>			88.8
R40	<i>A. correntina</i>	219824	花生区组	50.0					

科公司合成)进行 PCR 扩增,PCR 反应按本实验室建立的优化体系进行<sup>[17]</sup>;用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,银染显色,电脑扫描。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生花生抗青枯病种质的发掘

以连续 3 年、每年 3 次重复调查的结果为基础进行统计分析,结果表明,抗病对照中花 6 号的抗病率为 85.5%~98.6%,感病对照鄂花 4 号的抗病率为 15.6%~36.7%,79 份野生花生种质抗性鉴定结果的平均值列于表 1。从表 1 看,15 份种质表现高抗青枯病(抗病率高于 85%),包括匍匐区组种质 3 份(R2,R3,R4),直立区组种质 1 份(R11),异形花区组种质 1 份(R18),花生区组种质 8 份(R19,R20,R26,R29,R33,R36,R46,R53),未命名种质 2 份(R69,R79)。

### 2.2 抗青枯病种质间的遗传多样性与亲缘关系

用 140 对 SSR 引物对高抗青枯病的 15 份野生花生和 6 份栽培种花生基因组 DNA 进行扩增,获得 37 对扩增效果较好的引物。所用的 37 对 SSR 引物能在花生属基因组 DNA 中扩增出 1~5 个 DNA 片段,其中引物 PM346 扩增获得的条带数最多(5 条),大部分引物在大多数种质基因组 DNA 中只扩增出 1~2 条带。这 37 对 SSR 引物在每份种质中扩增出的总条带数为 42~67 条,平均为 58.30 条;37 对 SSR 引物在 21 份种质中的等位基因变异总共有 212 个,每个引物的等位变异数为 3~7 个,平均有 5.73 个,多态性总位点数为 212 个。其中 3A01 在供试材料中检测到 7 个等位基因变异(最多),其片段大小在 580~680 bp 之间。

通过 SSR 分析,在所涉及的 15 份抗青枯病野生花生和 6 份栽培种资源中,两两资源间的平均遗传距离为 0.63。6 份栽培种资源间的遗传距离为 0.11~0.48,平均为 0.31。15 份抗野生花生种质之间的遗传距离为 0.21~0.91,平均为 0.67。从这些遗传距离可见,抗青枯病的野生花生种质遗传多样性比栽培种之间的遗传多样性丰富得多。在 15 份野生资源间进行比较时,亲缘关系较近,遗传距离小于 0.40 的有 G3,A. rigonii 与 G7,G7,A. sp (0.21),G2,A. rigonii 与 G7,A. sp (0.24),G2,A. rigonii 与 G3,A. rigonii (0.25),G9,A. duranensis 与 G10,A. monticola (0.27),G8,A. duranensis 与 G11,A. monticola (0.31),G10,A. monticola 与 G11,A. monticola (0.35),G2,A. rigonii 与 G5,A. dardani (0.36),G8,A. duranensis 与 G10,A. monticola (0.36),G5,A. dardani 与 G7,A. sp (0.38),G8,A. duranensis 与 G13,

A. chacoense (0.38)。与栽培种花生亲缘关系较近遗传距离在 0.51 以下的野生花生有 G10,A. monticola (0.42),G9,A. duranensis (0.43),G8,A. duranensis (0.47),G11,A. monticola (0.50),G13,A. chacoense (0.51),其他 10 份资源与栽培种的关系较远,遗传距离均在 0.77 以上。

根据遗传距离,利用最长距离法对 21 份种质进行聚类分析,所得结果如图 1 所示。

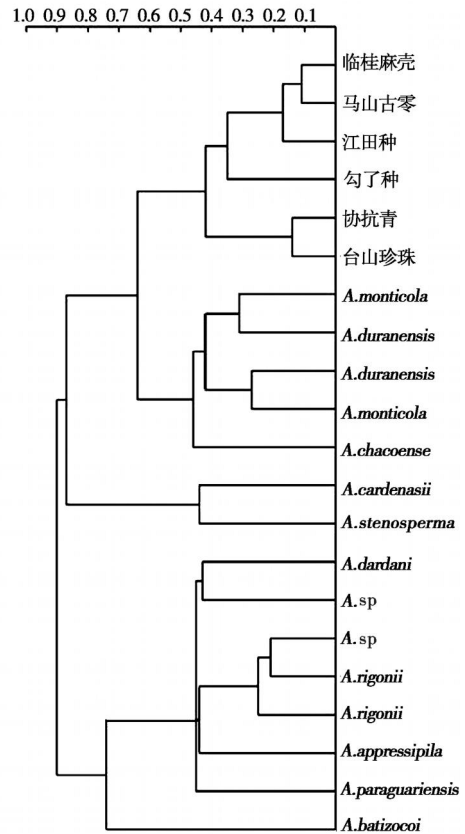


图 1 抗青枯病花生资源的 SSR 聚类图

Fig.1 Dendrogram of Arachis accessions with bacterial resistance based on SSR

从图 1 看,15 份抗青枯病的野生花生和 6 份栽培种花生被聚为 2 组(A 组和 B 组)。A 组包括栽培种花生和花生区组的除 A. batizocoi 以外的全部材料,B 组包括其他区组的材料和花生区组的 A. batizocoi。A 组可进一步聚为 3 小组(A1,A2 和 A3),A1 小组由 6 份栽培种资源组成,其中密枝亚种的 4 份材料和疏枝亚种的 2 份材料分别聚在一起。A2 组由花生区组的四倍体 A. monticola,二倍体 A. duranensis 和 A. chacoense 等 3 个物种的 5 份资源组成,这一组材料与栽培种的关系相对较近。A3 组由花生区组的二倍体物种 A. cardenasii 和 A. stenosperma 等 2 份资源组成。B 组可以进一步分为 2 个小组(B1 和 B2),在 B1 组中,异形花区组的 A. dardani 与一个未定名物种聚在一起,匍匐区组的 A. rigonii 的 2 份种质与另一个未定名物种聚在一起,这 3 份材

料与匍匐区组的另一个物种 *A. appressipila* 的关系 大,单独聚为一小组(B2)。  
较近。花生区组的 *A. batizocoi* 与这些资源的差异较

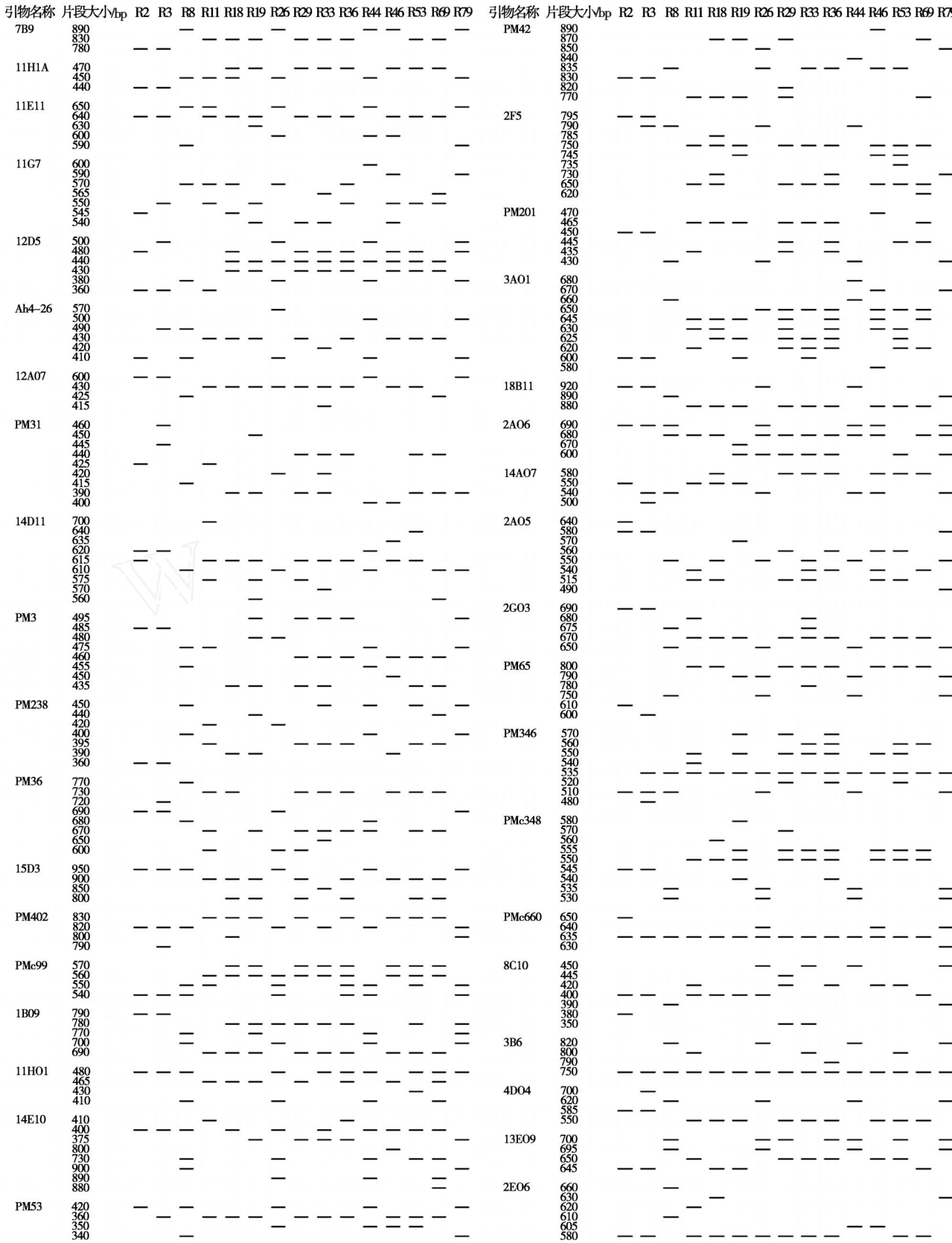


图 2 15 份抗青枯病野生花生的指纹图谱  
Fig. 2 Finger print of 15 wild peanut accessions resistant to BW

### 2.3 抗青枯病种质的 SSR 分子特性

以 37 对 SSR 引物扩增获得的条带数和片段大小为基础,15 份抗病材料的分子特性描述如下:

R2, *A. rigonii*: 引物 11G7, Ah4-26, 2F5, PM53, PM65, PM346 和 4D04 扩增分别获得 545, 410, 795, 420, 610, 510, 585 bp 条带。

R3, *A. rigonii*: 大多数引物扩增结果与 R2 相同, 引物 12D5 获得 500, 360 bp 2 条带, Ah4-26 获得 490 bp 条带, 14D11 获得 620 bp 条带。

R8, *A. appressipila*: 引物 Ah4-26, PM36, 2G03 和 2E06 扩增分别获得 490 和 410, 770 和 680, 675 和 650, 660 和 610 bp 的 2 条带。

R11, *A. paraguariensis*: 引物 12D5, 14E10, PM42, PMc348 扩增分别获得 360, 410, 770, 550 bp 的条带, 11E11 获得 650 和 630 bp 2 条带。

R18, *A. dardani*: 3A01 获得扩增 645, 630, 625 bp 3 条带, 2F5 获得 785, 750, 730, 650 bp 4 条带。

R19, *A. duranensis*: 引物 PM3 获得 495, 480, 435 bp 3 条带, PM346 获得 570, 550, 535 bp 3 条带, PMc348 获得 580, 555, 550, 540 bp 4 条带。

R26, *A. duranensis*: 引物 PM31, PM3, PM238 和 3A01 扩增分别获得 420, 480, 420, 650 bp 的条带, PMc99 获得 560, 550, 540 bp 3 条带。

R29, *A. chacoense*: 引物 11G7 扩增获得 540 bp 条带, 8C10 获得 445, 420, 350 bp 3 条带, PM346 获得 570, 550, 535, 520 bp 4 条带。

R33, *A. cardenasii*: 引物 14E10 扩增获得 400 和 375 bp 2 条带, PM36 获得 730, 670 和 650 bp 3 条带, 3A01 获得 650, 625, 620, 600 bp 4 条带。

R36, *A. stenospema*: 2F5 获得 750, 730, 650 bp 3 条带, PMc99 获得 570, 560, 550 和 540 bp 4 条带, PM346 获得 570, 560, 550, 535, 520 bp 5 条带。

⑪R44, *A. monticola*: 引物 11G7, PM42 和 8C10 扩增分别获得 600, 840, 450 bp 的条带, 14D11 获得 620 和 610 bp 2 条带, PM36 获得 680 和 670 bp 2 条带。

⑫R46, *A. monticola*: 引物 2F5 扩增获得 750, 745, 650 bp 3 条带, 2A05 获得 560, 540, 515 bp 3 条带, 3A01 获得 670, 650, 645, 630, 580 bp 5 条带。

⑬R53, *A. batizocoi*: 引物 PM201 和 2A06 扩增分别获得 445 和 600 bp 条带, 14D11 获得 640 和 615 bp 2 条带, PM346 获得 560, 550, 535, 520 bp 4 条带。

⑭R69, *A. sp.*: PM238 获得 440 和 395 bp 2 条带, 11H01 获得 480, 465, 410 bp 3 条带, 2F5 扩增出 750, 650, 620 bp 3 条带, 3A01 获得 650, 645, 620 bp 3 条

带。

⑮R79, *A. sp.*: 引物 11G7, 2F5, PM42 和 2E06 能分别扩增出 590, 730, 850 630 bp 的条带, 12D5 获得 500, 480, 380 bp 3 条带, 1B09 获得 780, 770, 700 bp 3 条带。

15 份抗病种质依据 SSR 绘制的指纹图谱见图 2 所示。

利用 SSR 标记建立的指纹图谱, 将为抗青枯病野生花生资源的有效保存与利用提供基础, 为利用花生野生种改良栽培种提供分子方面信息。

### 3 讨论

本研究首次以大量的野生花生为材料, 全面系统地鉴定了其对青枯病的抗性反应, 发掘出抗病资源 15 份, 涉及到 4 个区组 10 个种, 抗病资源频率显著高于栽培种, 丰富了抗病遗传基础。而且同一物种不同资源对青枯病的反应差异极大, 如 *A. chacoense* 的 R29 高抗青枯病, 而 R30 高感青枯病, 这些二倍体物种的高抗、高感材料为抗病基因的克隆提供了很好的材料基础。

所涉及的 15 份野生花生和 6 份栽培种花生的 SSR 聚类结果显示, 所选用栽培种花生材料均被聚在花生区组类别中, 而且相同植物学类型(相当于变种)的材料均被聚在一起, 表明 SSR 标记在揭示花生系统进化差异上是有效的。通过遗传距离分析, 在所涉及的野生资源中, 花生区组的四倍体野生种 *A. monticola* 与栽培种花生距离最小, 表明它与栽培种的关系很近, 与以前的研究结果一致。花生区组的二倍体物种 *A. duranensis*, *A. chacoense* 也与栽培种花生的关系较近, 遗传距离较小。可见, *A. monticola*, *A. duranensis* 和 *A. chacoense* 可以直接与栽培种花生杂交转移其优异基因, 还可以作为桥梁物种来转移其他野生花生的优异基因到栽培种花生中。

通过对抗青枯病野生花生种质的特征分子带型的建立, 将为野生花生的利用提供基本信息, 从而提高野生资源在花生遗传改良中的利用效率。

### 参考文献:

- [1] 孙大容. 花生育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2] Mehan V K, Liao B S, Tan Y J. Bacterial Hilt of Groundnut [M]. ICRISAT Information Bulletin, 1994 :35
- [3] Liao B S, Dan N X, Wang Y Y, et al. Host-plant resistance to groundnut bacterial wilt: genetic diversity and enhancement [C]// Groundnut Bacterial wilt in Wisa, Proceedings of the Third Working Group Meeting, OCRI, Wuhan, China. India: ICRISAT, 1994:91 - 96.

- [4] Mehan V K,Liao B S. Groundnut Bacterial wilt :past ,present and future [C]// Groundnut Bacterial Wilt in Asia ,Proceedings of the Third Working Group Meeting ,OCRI ,Wuhan ,China. India :ICRISAT,1994 :67 - 88.
- [5] 廖伯寿,许泽永,姜慧芳. 植物细菌性青枯病抗性的分子标记研究与育种潜力[J]. 中国油料作物学报,2001,23(3):65 - 68.
- [6] 李丽容,林少璇,廖小妹,等. 花生野生资源品质分析及杂交试验[J]. 中国油料作物学报,1994,16(2):22 - 26.
- [7] 苗华荣,李正超,吴兰荣. 我国野生花生的研究利用概况[J]. 花生科技,1994(4):16 - 21.
- [8] 陈坤荣,张宗义,许泽永. 野生花生对花生矮化病毒抗性鉴定[J]. 中国油料,1992,14(4):12 - 15.
- [9] 许泽永,陈坤荣,张宗义. 野生花生对花生轻斑驳病毒抗性鉴定[J]. 中国油料,1987(4):91 - 93.
- [10] Hebert T T,Stalker H T. Resistance to peanut stunt virus in cultivated and wild *Arachis* species [J]. Peanut Science, 1981:45 - 47.
- [11] Johnson D R,Wynne J C,Campbell W V. Resistance of wild species of *Arachis* to the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* [J]. Peanut Science,1977,4:9 - 11.
- [12] Leuck D B,Hommons R O. Resistance of wild peanut plants to the *Tetranychus tumidellus*[J]. Journal of Economic Entomology,1968,61:687 - 688.
- [13] Moss J P,Rao V R,Gibbons R W. Evaluating the germplasm of groundnut (*Arachis hypogaea*) and wild species at ICRISAT[C]// Brown A H D, Frankel O H,Marshall D R, et al. The Use of Plant Genetic Resources. Cambridge: Cambridge University Press,1989:212 - 234.
- [14] Subrahmanyam P,Mehan V K,Nevilol D J, et al. Research on fungal diseases of groundnut at ICRISAT[C]// ICRISAT: Proceedings of the International Workshop on Groundnut, 1980:193 - 198.
- [15] Subrahmanyam P,Ghanekar A M,Nolt B L, et al. Resistance to groundnut disease in wild *Arachis* species[C]// ICRISAT, Patancheru: Proceedings of an International Workshop on Cytogenetics of *Arachis*. 1985:49 - 55.
- [16] 殷冬梅,张新友,汤丰收,等. 花生属野生种质的 RAPD 鉴定[J]. 河南农业科学,2003(11):15 - 17.
- [17] 姜慧芳,廖伯寿,任小平,等. 抗青枯病花生种质的遗传多样性[J]. 作物学报,2006,28(8):24 - 27.