

番茄抗番茄花叶病毒和斑点萎凋病毒病基因 PCR 标记的同时鉴定

陈丽静^{1,2}, 李君明¹, 宋燕¹, 李天来³, 徐和金¹, 周永健¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²沈阳农业大学生物技术中心, 沈阳 110161; ³沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘要: 利用同一 PCR 反应体系, 对分别与番茄的抗番茄花叶病毒病的 *Tm2²* 基因和抗斑点萎凋病毒病的 *Sw-5* 基因紧密连锁的 SCAR 标记进行了同时扩增筛选, 扩增的特异性片段与单引物扩增片段完全吻合, 其中与 *Tm2²* 基因紧密连锁的 SCAR1 标记为共显性标记, 抗感试材均产生 800 bp 的特异片段, 杂合抗病基因型和感病基因型有 HindIII 酶切位点, 酶切结果为: 纯合抗病 RR: 950 bp; 杂合抗病 Rr: 950 bp+500 bp+300 bp+150 bp; 感病的 rr: 500 bp+300 bp+150 bp, 纯合抗病基因型无 HindIII 酶切位点。与 *Sw-5* 基因紧密连锁的 SCAR2 标记为显性标记, 只有抗病试材扩增出 400 bp 的特异性片段。经反复验证, 结果稳定、准确可靠, 可用于在同一 PCR 反应体系中对 2 个抗病基因进行同时筛选鉴定。该体系的建立不仅省时、省工、节省费用, 而且可用于苗期早期辅助选育, 加快番茄育种进程。

关键词: 番茄; PCR; *Tm2²* 基因; *Sw-5* 基因

Simultaneous Identification of Multi-Genes with Resistance to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus by PCR Markers in Tomato

CHEN Li-jing^{1,2}, LI Jun-ming¹, SONG Yan¹, LI Tian-lai³, XU He-jin¹, ZHOU Yong-jian¹

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²Bio-tech institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; ³College of horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: Single PCR reaction with two SCAR markers, respectively, tightly linked with *Tm2²* and *Sw-5* genes in tomato, which resistant to tomato mosaic virus and tomato spotted wilt virus, has been used to screen the multiplex bands. The PCR products were completely correspond to the amplified bands produced by single SCAR primer. Among them, codominant SCAR1 marker tightly linked with *Tm2²* gene produced 950 bp fragment in both resistant and susceptible tomato lines. The amplified bands from susceptible and heterozygous were distinguishable after cleavage with the restriction enzyme Hind III. Genotype susceptible and heterozygous with *Tm2²* gene could produce respectively 500,300,150 and 950, 500,300, 150bp bands. homozygous genotypes still present 950 bp fragment. The dominant SCAR2 marker tightly linked with *Sw-5* gene would produce only 400 bp PCR product in resistant genotype. The replicated stable results proved that two resistant genes could be identified simultaneously by using corresponding SCAR primer under adaptable condition. Compared with single primer PCR this system is time-saving, labor-saving and low cost. It could be very useful for marker-assisted selection during early stage in tomato and efficiently speed up breeding procedure.

Key words: Tomato; PCR; *Tm2²* gene; *Sw-5* gene

收稿日期: 2003-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100124)

作者简介: 陈丽静 (1971-), 女, 山东海阳人, 博士研究生, 主要从事植物细胞工程与基因工程研究。E-mail: chenlijing1971@sohu.com。李君明为通讯作者, Tel: 010-68919530; Fax: 010-62174123; E-mail: junmingli@mail.caas.net.cn

番茄烟草花叶病毒(tomato mosaic virus)是一种世界性的病害,此病分布广泛,危害严重,对世界番茄生产产生巨大的负向效应,严重危害我国保护地番茄生产,而番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus)通常在我国南方地区发生,尤其是台湾地区更为严重,可系统侵染花生、绿豆、大豆、豌豆、田菁、番茄、辣椒、普通烟草、芝麻等,引致花叶、环斑、坏死等症状。要防治这2种病害还需培育抗病品种,因而选育番茄多抗性品种一直是番茄育种的重要目标,始终被我国列为“六五”到“十五”国家重点科技攻关研究的内容^[1]。传统的人工接种抗病性鉴定,不仅需要较长的时间和花费较多的人力物力,直接影响多抗性新品种的选育进程,而且由于受环境条件、接种技术等影响,常导致鉴定结果不稳定。分子标记技术为早期抗病基因快速筛选鉴定提供一项有力手段。笔者利用PCR技术对2个抗病基因进行鉴定筛选,以期对番茄多抗性新品种选育提供一项快速、可靠的新技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄 Moneymaker、Motelle、Movione、Mobaci、Moperou、Mospomor、Mogeor 等试材由法国农科院(INRA)蔬菜果树遗传研究所提供,它们均是以Moneymaker为遗传背景含有不同抗病基因的近等基因系,其中对番茄花叶病毒病和斑萎病毒病的抗性基因型列于表1。2000年秋,利用上

述材料配制了 Motellex×Movione、Mogeor×Movione 和 Mogeor×Motelle 等杂交组合。番茄 Wva700、CLN2037E 等试材是从亚洲蔬菜研究发展中心(AVRDC)引入的分别含有抗晚疫病 *Ph-2*、*Ph-3* 基因的新材料,Ailsa Craig 是从美国番茄遗传中心(TGRC)引入的番茄试材,92155 为本组选育出的优良加工类型新品系,0038392155 为从保加利亚遗传研究所引入的含有雄性不育 *ps-2* 基因的新材料与本组 92155 杂交的杂种一代。

1.2 引物

番茄抗番茄花叶病毒病 *Tm2²* 基因的 SCAR 标记引物参照 Dax 等^[2] 设计,抗番茄斑萎病毒病 *Sw-5* 基因的 SCAR 标记引物参照 Chague 等^[3] 设计。引物序列及不同基因型材料的特异性扩增片段详见表1和2。引物均由上海生物工程技术公司合成。

1.3 DNA 提取及单基因 PCR 扩增体系

DNA 提取参照 Williamson 等^[4] 方法。用于 PCR 反应的全部药品购自上海普洛麦格生物技术工程有限公司。PCR 反应总体积为 25 μ l, 包括 Buffer 2.5 μ l、dNTPs 各 0.1 mmol·L⁻¹、Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol·L⁻¹、引物 0.2 μ mol·L⁻¹、Taq 酶 1.0 U、模板 DNA 为 20 ng, 终体积用水加至 25 μ l。其中用于扩增含有 *Tm2²* 基因的 PCR 反应程序为: 94℃ 变性 10 min, 55℃ 2 min, 72℃ 2 min 然后 92℃ 30 s、55℃ 30 s, 72℃ 30 s 进行 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min, 扩增产物贮藏在 4℃ 保存。用于扩增含有 *Sw-5* 基因的 PCR 反应程序为: 94℃ 变性

表1 不同抗病材料基因型及其 SCAR 特异标记扩增特异性片段¹⁾

Table 1 Genotypes of different tomato lines resistant to tomato mosaic virus and tomato spotted wilt virus and SCAR products

序号 No.	材料 Material	来源 Source	<i>Sw-5</i> 基因(<i>Sw-5</i> gene)			<i>Tm2²</i> 基因(<i>Tm2²</i> gene)		
			基因型 Genotypes	扩增产物 Amplified products (bp)	Hind III 酶切结 Band size expected (bp)	基因型 Genotypes	扩增产物 Amplified products (bp)	Hind III 酶切结果 Band size expected (bp)
1	Moneymaker	INRA	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
2	Motelle	INRA	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
3	Movione	INRA	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
4	Mobaci	INRA	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
5	Moperou	INRA	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
6	Mospomor	INRA	<i>Sw-5/Sw-5</i>	400	400	<i>Tm2²/Tm2²</i>	950	950
7	Mogeor	INRA	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>Tm2²/Tm2²</i>	950	950
8	Motelle×Movione	IVFCAAS	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
9	Mogeor×Movione	IVFCAAS	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>Tm2²/tm2²</i>	950	950, 500, 300, 150
10	Mogeor×Motelle	IVFCAAS	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>Tm2²/tm2²</i>	950	950, 500, 300, 150
11	Wva700	AVRDC	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
12	CLN2037E	AVRDC	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
13	Ailsa Craig	TGRC	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
14	92155	IVFCAAS	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150
15	383×92155	IVFCAAS	<i>sw-5/sw-5</i>	-	-	<i>tm2²/tm2²</i>	950	500, 300, 150

¹⁾ “-”表示无扩增片段 Without amplified fragment

表2 引物及序列

Table 2 Primer and sequence

引物 Primer	序列 Sequence
SCAR1 F	5'-CACCTTCCCTCTCCAA-3'
SCAR1 R	5'-CACCTTCCCTCTCCAA-3'
SCAR2 F	5'-CTGGGTGAGTCTTGACATTT-3'
SCAR2 R	5'-CTGGGTGAGTACATCAGATT-3'

3 min, 30 个循环为 94℃ 1 min、55℃ 2 min、72℃ 2 min, 最后 72℃ 延伸 2 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶在 5V·cm⁻¹ 电压条件下电泳 2 h, 终结果用 EB 染色, Bio-RAD 凝胶成像系统显示。

1.4 双引物 PCR 扩增体系

双引物反应体系仍然为 25 μl, 包括 2.5 μl 的 Buffer、100 μmol·L⁻¹ dNTPs、2.5 mmol·L⁻¹ Mg²⁺、各 0.6 μmol·L⁻¹ 引物 1 和引物 2、1.5 U 的 Taq 酶、50 ng 的 DNA 模板、终体积用水加至 25 μl。PCR 反应程序是在 94℃ 下变性 30 s, 然后 94℃ 20 s、50℃ 2 s、72℃ 2 min 进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。结果用 1.5% 琼脂糖在电压 5V·cm⁻¹ 条件下电泳 2 h, 终结果用 EB 染色, Bio-RAD 凝胶成像系统显示。

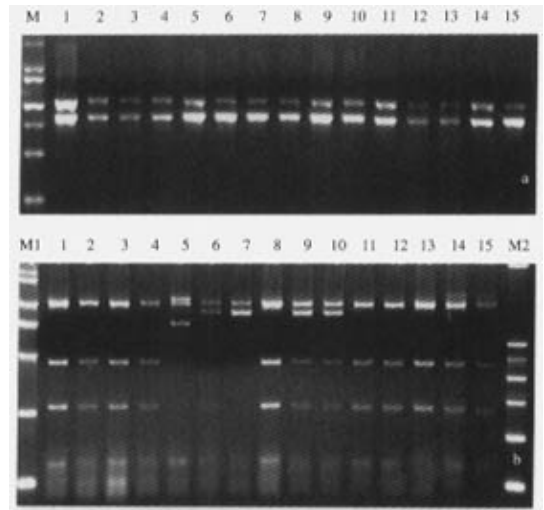
1.5 酶切

番茄抗番茄花叶病毒病 *Tm2²* 基因的 SCAR 标记为共显性, 其 PCR 产物需要酶切^[2], 酶切体系为扩增产物 7 μl, 加入 5U 的 Hind III 酶, 用 Buffer 加到终体积 10 μl。反应体系在 37℃ 保温 4 h。结果用 1.5% 琼脂糖在电压 5V·cm⁻¹ 条件下电泳 2 h, 终结果用 EB 染色, Bio-RAD 凝胶成像系统显示。番茄抗斑萎凋病毒病 *Sw-5* 基因 SCAR 标记为显性标记, 不需要酶切, 抗病和感病品种仅表现为扩增产物的有无。

2 结果与分析

2.1 *Tm2²* 基因特异片段的检测

利用 SCAR1 正反引物对全部试材扩增结果表明(图 1a), 无论是抗病材料还是感病材料均都扩增出 950 bp 的特异性片段, 经 Hind III 酶切后(图 1b), 纯合感病基因型及杂合抗病基因型材料均存在酶切位点, 其中纯合感病基因型 Moneymaker、Motelle、Movione、Mobaci、Moperou、Motelle×Movione、Wva700、CLN2037E、Ailsa Craig 等 11 份材料分别产生了 500、300 和 150 bp 的特异性片段, 杂合抗病基因型 Mogeor×Movione、Mogeor×Motelle 材料分别产生了 950、500、300 和 150bp 的 4 种片段,



1. Moneymaker; 2. Motelle; 3. Movione; 4. Mobaci; 5. Moperou; 6. Mospomor; 7. Mogeor; 8. Motelle×Movione; 9. Mogeor×Movione; 10. Mogeor×Motelle; 11. Wva700; 12. CLN2037E; 13. Ailsa Craig; 14. 92155; 15. 383×92155; 下同 The same as below

图1 SCAR1 引物扩增产物(a)及酶切结果(b)

Fig.1 SCAR1 amplification (a) and caps products (b)

而纯合抗病基因型 Mospomor 和 Mogeor 2 份材料不可以被 Hind III 酶切开, 仍然呈现原来的 950 bp 的片段。即与抗病 *Tm2²* 基因紧密连锁的 SCAR 标记表现为共显性标记。经多次重复试验, 结果稳定可靠, 可用于番茄 *Tm2²* 抗病基因辅助选育。

2.2 *Sw-5* 基因特异片段的检测

利用 SCAR2 正反引物对全部试材扩增结果表明(图 2), 只有含有抗病基因的 Mospomor 品系扩增出了产物为 400 bp 的特异性片段, 而其它所有感病材料均无 PCR 产物, 不存在酶切位点, 这与 Chague 等^[7] 研究结果完全吻合, 即与抗病 *Sw-5* 基因紧密连锁的 SCAR 标记表现为显性标记。

2.3 *Tm2²* 和 *Sw-5* 双基因同时扩增

为了获得可以同时 *Tm2²* 和 *Sw-5* 基因筛选的 PCR 扩增反应体系, 本文在原各自单独引物稳定的 PCR 扩增体系的基础上, 将 SCAR1 和 SCAR2 混合引物在同一体系进行扩增; 通过对不同引物、Mg²⁺、模板、Taq 酶的浓度进行了反复筛选, 同单基因扩增体系相比较, 增加了 *Tm2²* 基因引物的浓度, 降低了 *Sw-5* 基因的引物浓度, 降低了 Mg²⁺ 的浓度, 增加了模板及 Taq 酶的量, 获得了可以同时鉴定上

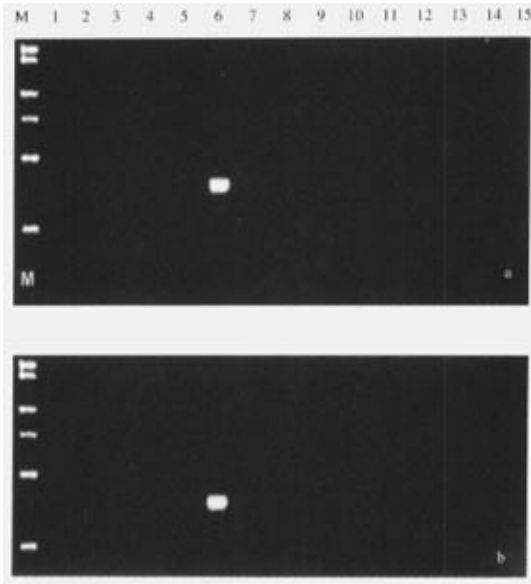


图2 SCAR2 引物扩增产物及酶切结果

Fig.2 SCAR2 amplification and caps products

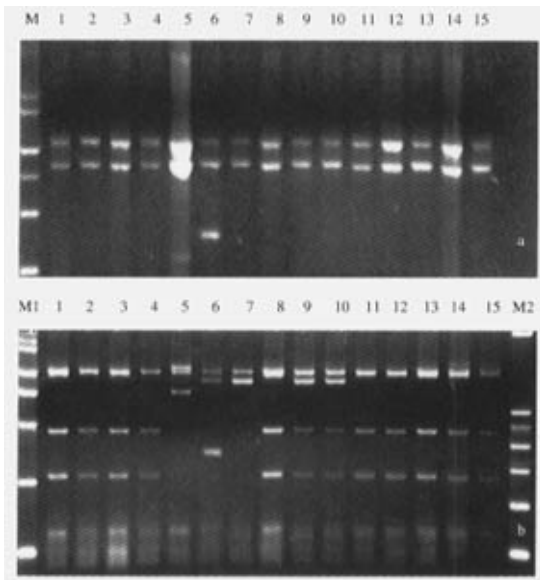


图3 SCAR1 和 SCAR2 双引物扩增产物及酶切结果

Fig.3 SCAR1 and SCAR2 amplification and caps products

述 2 个基因的稳定扩增体系。如图 3a 所示, SCAR1 引物扩增出了原 950 bp 的特异性片段, SCAR2 引物扩增出了 400 bp 的特异性片段, 图 3 b 为对应材料特异扩增产物经 Hind III 酶切后所获结果。可以看

出无论是杂合还是纯合基因型抗病、感病材料, 均可扩增出原单引物所有片段, 经重复试验, 结果稳定。因此, 成功地建立了可以同时检测 Tm^2 和 $Sw-5$ 基因稳定筛选的双基因 PCR 标记识别体系。

3 讨论

近几年随着分子技术的快速发展, 利用分子标记辅助选育已极大地加快了育种速度。番茄作为模式植物研究极其深入广泛, 国内外已获得了与抗多种病害基因紧密连锁的不同类型的分子标记, 这些标记为辅助选育提供了有力工具。SCAR 标记作为一种特异 PCR 标记, 不仅较 RFLP、AFLP 等标记快速、简便, 不用使用放射性同位素, 而且较 RAPD 等 PCR 标记更稳定、特异性也强。共显性的 SCAR 标记由于可以区分杂合体, 获得较多的信息量, 不仅可用于作图, 而且可有利于位点排列, 而显性 SCAR 标记由于只有单个扩增片段产物, 已被各种作物广泛应用于辅助育种。

国外已有多引物 PCR 标记研究相关报道^[4~7], 最近 Nebenfuhr 等已成功利用多基因 RT-PCR 体系对 IAA 基因家族的不同成员的表达进行了研究^[6], 但尚未见利用多引物扩增进行番茄多个抗病基因标记辅助选育的研究报道。本文建立的双引物扩增体系不仅具有快速筛选、鉴定多基因的优点, 可用于标记辅助选育、品种纯度及相关资源材料鉴定, 而且多引物扩增反应体系较单引物体系还可节省大量的人力、物力, 大大降低成本, 为早期多基因鉴定及辅助选育提供了一项有力工具。

References

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995: 236-246.
Li S D. *The Advance on Main Vegetables Breeding of Disease Resistance in China*. Beijing: Science Press, 1995: 236-246. (in Chinese)
- [2] Dax E, Livneh O, Aliskevicius E, Edelbaum O, Kedor N, Gavish N, Karchi H, Milo J, Sela I, Rabinov H D. A scar marker linked to the tomv resistance gene, Tm^2 in tomato. *Euphytica*, 1998, 101(1): 73-77.
- [3] Chague V, Mercier J C, Guenard M, de Courcel A, Vedel F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to $Sw-5$ in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 1 045-1 051.
- [4] Dirk L, Susan K, Gundula T, Verena U, Jie K. Optimization of multiplex PCR. *Qiagen News*, 1999, 2: 5-8.
- [5] Dong X, Cheng G, Jian W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primer. *Systematic and Applied*

- Microbiology*, 2000, 23:386-390.
- [6] Nebenfuhr A, Lomax T. Multiplex titration RT-PCR: rapid determination of gene expression patterns for a large number of genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16:323-339.
- [7] Pooler M R, Ritchie D F, Hartung S. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consense PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 9:3 121-3 127.

(责任编辑 王红艳)

欢迎订阅

《农业生物技术学报》是中国农业生物技术学会、中国农业大学和农业部科教司联合主办的学术刊物。主要反映我国农业生物技术领域中最新的科研成果，促进国内外学术交流。刊登动物、植物、微生物及林业、海洋等学科在细胞、染色体、酶、基因工程以及发酵工程等方面的研究论文。可供高等院校师生、农业科技工作者、农业领导干部等参阅。

本刊为双月刊，大16开本，每期正文136页，定价18元。2005年出版6期，全年共108元。国内统一刊号：CN11-3342/S，国际刊号ISSN1006-1304。邮发代号：2-367，国外发行代号：BM：1673。欲订者（单位或个人）可通过邮局订购，也可直接向编辑部订购。

向编辑部订购的具体办法是：

邮局汇款地址：北京市海淀区圆明园西路2号中国农业大学（西校区）《农业生物技术学报》编辑部，邮编：100094；电话（传真）：010-62893684。

为保证准确投递，请将单位名称、邮政编码、收件人姓名、详细地址和订阅份数填写清楚。

《植物营养与肥料学报》为中国植物营养与肥料学会主办，国内外公开发行的专业性学术刊物。属中国科技核心期刊和中文核心期刊。本刊为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”以及《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》来源期刊。主要报道本学科具有创见性的学术论文，新技术和新方法研究报告、简报、文献评述和问题讨论等。其主要包括土壤、肥料和作物间的关系，养分变化和平衡；各种肥料在土壤中的变化规律和配施原理；农作物遗传种质特性对养分反应；作物根际营养；施肥与环境；施肥与农产品品质；农业生物学和生物化学应用；肥料的新剂型新品种的研制、应用及作用机理；本学科领域中新手段、新方法的研究以及与本学科相关联的边缘学科等。

双月刊，大16开本144页，单月25日出版，每期定价15.00元，全年90.00元。国内刊号：CN11-3996/S，国际刊号：ISSN 1008-505X。邮发代号：82-169。全国各地的邮电局（所）可办理订阅。

本刊现有2003年合订本，每套60.00元（含邮资）；2004年本刊的合订本，每套90.00元（含邮资），需要者请与编辑部联系。电话：010-68918653；地址：北京中关村南大街12号中国农科院土肥所；邮编：100081。