

番茄抗黄化曲叶病毒基因 Ty-3 的 SCAR 标记及应用

董盼盼¹, 赵美爱^{2,3,4}, 管 聪², 王 富¹, 王 辉¹

(1. 青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛农业大学 生命科学学院, 山东 青岛 266109; 3. 青岛市主要农作物创新与应用重点实验室, 山东 青岛 266109; 4. 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要:以 49 份番茄材料为试材, 利用特异引物对 5 份抗病纯合番茄材料(基因型 Ty-3/Ty-3)和 5 份感病纯合番茄材料(基因型 ty-3/ty-3)进行 PCR 扩增, 同时对 25 份番茄高代自交系和 14 份番茄杂交一代材料进行检测, 并用田间自然发病的方法对这些材料的抗性进行验证。结果表明:经 PCR 扩增, 抗病纯合番茄产生了 630 bp 的片段, 而感病纯合材料扩增出 320 bp 的片段;该标记能够区分抗病材料、感病材料及杂合抗病材料, 是与番茄黄化曲叶病毒病(TYLCV)抗病基因 Ty-3 紧密连锁的共显性标记;25 份番茄高代自交系中, 有 4 份材料基因型是 Ty-3/Ty-3, 有 7 份材料基因型是 Ty-3/ty-3, 14 份材料不含抗病基因 Ty-3;14 份番茄杂交一代材料中, 有 4 份材料基因型是 Ty-3/Ty-3, 5 份材料基因型是 Ty-3/ty-3, 5 份材料不含抗病基因 Ty-3;田间试验表明, 分子鉴定与田间发病鉴定的吻合度达 78.6% 以上;在抗番茄黄化曲叶病毒病育种中, 可用 PCR 方法快速筛选亲本抗性材料, 提高育种效率。

关键词:番茄黄化曲叶病毒; SCAR; Ty-3; 苗期鉴定; 田间鉴定

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0119-04

番茄黄化曲叶病毒病(TYLCV, 简称 Ty)是一种双生病毒, 是具有毁灭性的一种蔬菜病害, 该病害发病非常凶猛、危害极大, 给番茄生产造成重大损失, 严重时甚至绝产。2007 年山东省济宁首先发现黄化曲叶病毒病, 随后在山东淄博、菏泽、聊城、青岛、枣庄等地相续发生。2009 年山东全省番茄大棚黄化曲叶病毒病普遍发生, 蔓延迅速, 损失严重, 发生面积达 1.3 万 hm² 以上, 病株率一般 20%~30%, 重的达 60%~80%, 重病地块产量损失在五成以上^[1]。因此, 番茄抗黄化曲叶病毒病育种研究刻不容缓。

近年来番茄黄化曲叶病毒病抗病鉴定技术的相关研究已取得较大进展, 其中 PCR 检测方法发展较为迅速。目前, 已经陆续建立了运用与 Ty 基因连锁的 SCAR 标记及 CAPS 标记进行快速鉴定的方法和手段^[2-5], 从而为番茄黄化曲叶病抗性育种提供了一种快速、省力、经济有效的方法。

该研究结合最新公开发表的与 Ty-3 抗性基因紧密连锁的分子标记, 采用 PCR 检测方法对课题组重要的番茄育种材料及组合进行了分子检测, 并通过田间自然发病的方法进行验证, 以确定番茄所含的番茄黄化曲叶病抗性基因的抗性。该研究能够帮助育种工作者准确快速的检测出抗病基因, 进而在短期内筛选出 Ty 抗性材料, 加快抗病育种进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄育种材料由青岛农业大学园艺学院番茄课题组提供, 共 49 份。包括高世代已知抗性材料 10 份, 其中纯合抗病材料 5 份, 编号为 P1~P5, 纯合感病材料 5 份, 编号为 P6~P10; 未知抗性高代自交系材料 25 份, 编号为 1~25; 未知抗性杂种一代材料 14 份, 编号为 N1~N14。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 鉴定番茄黄化曲叶病 Ty-3 抗性基因所使用的 SCAR 标记引物参照 Ji 等^[6]的设计(<http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/MAS-Protocols/P6-25-locus.pdf>)。引物序列及其扩增产物的长度见表 1, 所用引物由上海生物工程技术公司合成。

1.2.2 PCR 扩增和电泳检测 用 CTAB 法提取番茄样品的叶片总 DNA, 作为 PCR 的模板。反应体系: 模板

第一作者简介:董盼盼(1989-), 女, 山东惠民人, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜生化与分子生物学。

责任作者:王富(1966-), 男, 黑龙江明水人, 博士, 教授, 研究方向为蔬菜遗传育种及生物技术。E-mail: wangfuabcd@163.com。

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2010CM047); 山东省现代农业产业技术体系资助项目; 山东省良种工程资助项目(621294); 青岛市民生计划资助项目(13-1-3-3-nsh)。

收稿日期:2013-09-13

表 1 鉴定所用的特异性引物及所扩增产物的长度

Table 1 The sequences of primers and the amplified fragments length used in the identification

引物 Primer	标记类型 Marker style	序列 Sequence	扩增产物 Amplified product/bp
Ty-3-F	SCAR	5'-GGTAGTGGAATGATGCTGCTC-3'	R,630
Ty-3-R		5'-GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC-3'	S,320

DNA 100 ng, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 引物 (10 U) 各 1 μ L (5 pmol/ μ L), *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 补充 ddH₂O 至 20 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 扩增反应产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.3 SCAR 标记的验证及抗性基因检测 利用设计的引物对 5 份抗病纯合材料 P1、P2、P3、P4、P5 及 5 份感病纯合材料 P6、P7、P8、P9、P10 进行 PCR 扩增, 获得与 Ty-3 抗病基因紧密连锁的 SCAR 标记; 利用该标记分别对其它番茄材料进行抗性基因的检测。

2 结果与分析

2.1 与 Ty-3 基因紧密连锁 SCAR 标记的获得

利用特异引物对 5 份抗病材料和 5 份感病材料进行 PCR 扩增, 由图 1 可知, 5 份抗病材料产生 630 bp 左右的片段, 5 份抗病材料产生 320 bp 左右的片段。630 bp 和 320 bp 2 个片段能将抗病材料和感病材料加以区分, 是与 Ty-3 抗病基因连锁的标记。

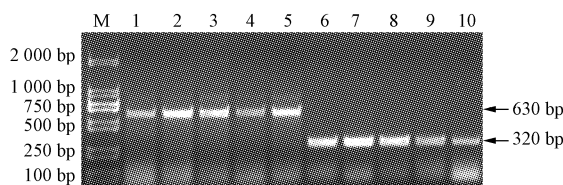


图 1 Ty-3 的扩增产物

注: M; 2 000 bp DNA Ladder; 1~10; P1~P10。

Fig. 1 The products amplified by Ty-3 primer

Note: M; 2 000 bp DNA Ladder; 1~10; P1~P10。

2.2 利用 SCAR 标记对未知抗性高代自交系进行抗性基因检测

由图 2~3 可知, 在 25 份材料中, 基因型是 Ty-3/Ty-3 的有 4 份; Ty-3/ty-3 有 7 份; ty-3/ty-3 有 14 份。由表 2 可知, 自然发病情况下, 1、9、21、22、23、25 材料的分子检测和田间检测存在差异, 二者结果的吻合度达 80%。9 份材料分子检测不含 Ty-3 基因, 但田间表现均为抗性, 说明这些材料可能含有除 Ty-3 以外的其它 Ty 抗性基因。25 份番茄材料中有 4 份含有纯合 Ty-3 抗性基因, 可以选择其作为抗 Ty 育种的抗性亲本。

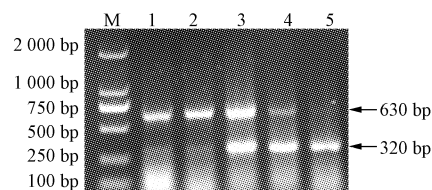


图 2 Ty-3 扩增产物

注: M; 2 000 bp DNA Ladder; 1~5; 1~5。

Fig. 2 The products amplified by Ty-3 primer

Note: M; 2 000 bp DNA Ladder; 1~5; 1~5。



图 3 Ty-3 扩增产物

注: M; 2 000 bp DNA Ladder; 6~25; 6~25。

Fig. 3 The products amplified by Ty-3 primer

Note: M; 2 000 bp DNA Ladder; 6~25; 6~25。

表 2 1~25 号分子检测与田间鉴定结果比较

Table 2 Comparison of molecular detection and field identification results of No. 1~25

样品序号 No. of sample	分子检测 Molecular detection	田间鉴定 Field identification	样品序号 No. of sample	分子检测 Molecular detection	田间鉴定 Field identification
1	R	S	14	S	S
2	R	R	15	S	S
3	R/S	S	16	S	S
4	S	S	17	S	S
5	S	S	18	S	S
6	S	S	19	R/S	R
7	S	S	20	R/S	R
8	S	S	21	R/S	S
9	S	R	22	R/S	S
10	S	S	23	R/S	S
11	R/S	R	24	R	R
12	S	S	25	R	S
13	S	S			

注: R; 抗病; S; 感病。下同。

Note: R; Resistance; S; Susceptibility. The same below.

2.3 利用 SCAR 标记对未知抗性的番茄杂交一代材料的抗性基因检测

从图 4 可以看出, 在 14 份材料中, 基因型是 Ty-3/Ty-3 有 2 份; Ty-3/ty-3 有 7 份; ty-3/ty-3 有 6 份。对其进行抗性基因检测后, 在自然发病的情况下, 并对其田间性状表现进行统计, 由表 3 可知, 只有 N2、N8、N10 的分子检测和田间检测存在差异, 二者结果的吻合度达 78.6%。分析可知, N8、N10 材料分子检测不含 Ty-3 基因, 但田间表现均为抗性, 说明这些材料可能含有除 Ty-3 以外的其它 Ty 抗性基因。N3、N5 同时含有纯合 Ty-3 基因, 如果该植株在其它性状良好, 可以选择其作为抗 Ty 育种的抗性亲本。

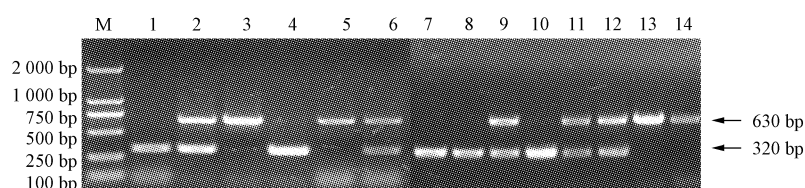


图4 Ty-3 的扩增产物

注:M:2 000 bp DNA Ladder;1~14:N1~N14。

Fig.4 The products amplified by Ty-3 primer

Note:M:2 000 bp DNA Ladder;1~14:N1~N14.

表3 N1~N14 分子检测与田间鉴定结果比较

Table 3 Comparison of molecular detection and field identification results of N1~N14

样品序号 No. of sample	分子检测 Molecular detection	田间鉴定 Field identification	样品序号 No. of sample	分子检测 Molecular detection	田间鉴定 Field identification
N1	S	S	N8	S	R
N2	R/S	S	N9	R/S	R
N3	R	R	N10	S	R
N4	S	S	N11	R/S	R
N5	R	R	N12	R/S	R
N6	R/S	R	N13	R	R
N7	S	S	N14	R	R

3 讨论

番茄抗 Ty 材料的筛选与鉴定是番茄抗 Ty 育种过程中最重要的环节之一^[5]。用番茄作为分子标记技术在育种中应用的模式植物,国内外相关专家学者已取得重要成就^[7]。与 Ty 基因紧密连锁的 SCAR 标记为共显性标记,抗病材料与感病材料产生不同的特异片段,DNA 间的差异可通过有无扩增产物来显示^[8]。许爽等^[2]研究表明,同时含有纯合 Ty-1 和 Ty-3 抗性基因的番茄有更高更稳定的抗性。抗性基因的累加是分子标记辅助选择的最大优势,在番茄遗传育种时将抗性基因累加可以培育出持久抗性品种^[9]。

该研究结果表明,杂交一代材料分子鉴定和田间试验分析得其吻合度达 78.6%。而高代自交系 25 份材料的分子鉴定和田间试验分析得其吻合度达 80%,与其它试验结果相比有些偏低^[2]。吻合度低的原因可能是该 SCAR 标记与 Ty-3 抗病基因还有一定的连锁距离。Ji 等^[10]已研究确定 Ty-3 抗性基因位点位于番茄 6 号染色体长臂上,约 15 cM 的范围内。该试验 Ty-3 引物与 Ty-3 抗性基因具有一定的遗传距离。因此,设计出能够精确扩增出目的基因条带的引物序列对于分子鉴定至关重要。另外在该研究中有些目标片段的扩增结果并不清晰明显,这可能与试验试剂和 PCR 仪器性能等

相关。

试验中由 Ty-3 引物扩增产物条带是 630、320 bp,有研究中利用相同引物的扩增产物条带是 450、320 bp,有研究利用多重 PCR 鉴定时,特异性扩增的 SCAR 片段长度中包含此 630、450、320 bp 条带^[2,5]。此现象是由于 PCR 扩增程序不同导致还是由于其它原因引起还有待于进一步的试验研究。

该实验室已建立了利用分子标记辅助 Ty 抗病品种选育的体系,并鉴定出 6 份高抗 Ty 病毒的优良自交系,为抗病新品种选育提供了重要亲本材料,同时也为聚合育种提供了重要的研究方法。

参考文献

- [1] 孙作文,杨进绪,张美珍,等. 山东省番茄黄化曲叶病毒病的发生及其防治[J]. 中国蔬菜,2009(21):5-6.
- [2] 许爽,褚云霞,张辉,等. 多重 PCR 技术鉴定番茄 Ty-2 和 Ty-3 基因及田间验证[J]. 分子植物育种,2009,7(5):954-958.
- [3] 付蓉蓉,刘杨,陈火英. 番茄黄化曲叶病的 Ty-1 和 Ty-3 抗性基因的 PCR 鉴定[J]. 分子植物育种,2011(9):1647-1652.
- [4] 韩瑞璇,宋建军,王琳珊,等. 番茄黄化卷叶病毒病抗病基因 Ty-1 的 CAPS 标记建立[J]. 中国农学通报,2012,28(1):195-200.
- [5] 付琬,辛学锐,金郁,等. 番茄 Ty-1、Ty-2 和 Ty-3 基因的多重 PCR 技术鉴定[J]. 中国园艺文摘,2013(4):7-9.
- [6] Ji Y, Betteray B, Smeets J, et al. Co-dominant SCAR Marker, P6-25, for Detection of Ty-3, Ty-3a, and Ty-3b introgressions from three *Solanum chilense* accessions at 25 cM of Chromosome 6 of Begomovirus-Resistant Tomatoes [EB/OL]. Proc Tomato Breeders Table, Tampa, FL, USA. roundtable08. ifas. ufl. edu/Schedule. html.
- [7] Rick C M. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum* [M]. In: Hawkes J G, Lester R N, Skelding A D. The Biology and Taxonomy of the Solanaceae, 1979:667-668.
- [8] 尹贤贵,王小佳,张赞,等. DNA 分子标记及其在番茄遗传育种中的应用[J]. 西南农业大学学报,2004,26(6):663-668.
- [9] 余文贵,赵统敏,杨玛丽,等. 番茄黄化曲叶病及其抗病育种研究进展[J]. 江苏农业学报,2009,25(4):925-930.
- [10] Ji Y, Schuster D J, Scott J W. 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.

辣椒带柄子叶由叶状体实现离体再生

臧 顺, 蔡 霞

(西南大学 园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘 要:以“黔椒四号”辣椒带柄子叶为外植体, 采用正交实验设计研究了辣椒离体培养中带柄子叶外植体叶状体的发生以及进一步获得伸长芽进而获得再生植株的方法。结果表明:BA、IAA 和 AgNO_3 均显著影响带柄子叶的分化, 其影响作用大小依次为:BA> AgNO_3 >IAA, 最佳分化培养基为 MS+BA 6.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L+ AgNO_3 6.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, 分化率为 82%; 而叶状体在 MS/MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA₃ (0、1、2、3 mg/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 培养基培养 4 周可得到伸长的芽;GA₃ 是获得伸长芽不可缺少的添加物质, 其浓度(1、2、3 mg/L)显著影响平均伸长芽数, 对伸长率的影响达到了极显著水平;MB 和 MS 基础培养基对平均伸长芽数和伸长率无显著影响, 但 MB 基础培养基有利于获得更多健壮的伸长芽。MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA₃ 2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 最适宜获得伸长芽, 伸长率为 36%, 获得的伸长芽容易生根形成再生植株。

关键词:辣椒;带柄子叶;叶状体;伸长芽;正交实验

中图分类号:S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0122-05

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*)植物, 起源于南美北部热带地区, 广泛种植于亚热带和温带地区, 是一种重要的蔬菜作物。辣

椒果实富含维生素, 营养价值高, 果实中的辣椒素则具有很高的药用价值。辣椒在中国的种植面积居蔬菜作物第 2 位, 有着重要的社会和经济意义。

第一作者简介:臧顺(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜学。
E-mail:317067358@qq.com.
收稿日期:2013-09-06

辣椒的产量和品质受环境胁迫、病虫害等威胁严重。仅仅依靠传统的方法, 育种周期较长, 而且辣椒的遗传背景相对狭窄, 难以获得具有较强适应性和抗性的

SCAR Marker and Application of Resistant Gene Ty-3 of Tomato Yellowing Leaf Virus

DONG Pan-pan¹, ZHAO Mei-ai^{2,3,4}, GUAN Cong², WANG Fu¹, WANG Hui¹

(1. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 2. College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 3. Qingdao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, Qingdao, Shandong 266109; 4. Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Taking 49 tomatoes as materials, 5 resistant homozygous lines (Ty-3/Ty-3) and 5 homozygous susceptible lines (ty-3/ty-3) were amplified by specific primers. 25 generations self-lines and 14 F₁ hybrids were amplified using this marker, at the same time these lines were well validated in the field by nature infection. The results showed that the resistant homozygous lines produced about 630 bp PCR fragment, the susceptible genotypes could produce fragment about 320 bp. This marker could distinguish resistant and susceptible lines, and it was a co-dominant marker tightly linked to Ty-3 gene. Among 25 generations self-lines, the genotype of 4 generations self-lines were Ty-3/Ty-3, 7 were Ty-3/ty-3 and 14 were ty-3/ty-3. 14 F₁ hybrids were amplified by Ty-3 primer, the genotype of 4 F₁ hybrids were Ty-3/Ty-3, 5 were Ty-3/ty-3 and 5 F₁ hybrids didn't contain Ty-3 gene. These lines were well validated in the field by nature infection and the disease incidence was 78.6% coincident with the result of PCR method. In the TYLCV resistance breeding, PCR was a rapid screening method to improve breeding efficiency.

Key words: TYLCV; SCAR; Ty-3; seedling identification; field identification