

四重 PCR 技术鉴定番茄 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 基因研究

刘超勤, 李景富, 许向阳, 姜景彬

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:以番茄为试材,只利用 1 次 PCR 反应体系,同时对与番茄黄化曲叶病毒病(Tomato yellow leaf curl virus)的 *Ty-1*、*Ty-2* 基因、番茄根结线虫病(Root-knot nematode)的 *Mi* 基因和番茄叶霉病(Leaf mold)的 *Cf-5* 基因紧密连锁的 SCAR 标记进行了筛选。结果表明:扩增的特异性片段和单引物扩增的片段吻合,即对与 *Ty-1* 基因、*Ty-2* 基因、*Mi* 基因和 *Cf-5* 基因紧密连锁的片段特异性扩增,所获得的片段大小分别是 395、900、750 和 960 bp。经 *TaqI* 酶切后所获得的特异性片段大小与前人试验所得大小基本相同,初步证明了四重 PCR 检测的准确性。该体系可对 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 4 个抗病基因进行同时筛选,在苗期辅助选择。降低了生产成本,节约时间、人力、物力,为分子标记辅助选择育种奠定了基础。

关键词:番茄;多重 PCR; *Ty-1*; *Ty-2*; *Mi*; *Cf-5*

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0119-05

番茄(*Lycopersicon esculentum*)病害一直是影响番茄产业的一个重大因素,随着番茄栽培面积的扩大,番茄病害日趋严重。据统计,每年因病虫害造成的番茄减产大约为 10%~20%,严重的甚至是绝收^[1]。其中番茄根结线虫病(Root-knot nematode)、番茄叶霉病(Leaf mold)是普发病害。近几年在我国大面积爆发的番茄黄化曲叶病毒病(Tomato yellow leaf curl virus)更是对我国番茄生产造成了巨大的损失。在抗番茄根结线虫病育种中,*Mi* 基因抗性是很早就被鉴定和利用的抗性之一,其具有广谱性,能够有效的抵抗除北方根结线虫以外的其它 3 种主要根结线虫^[2]。番茄叶霉病是温室番茄普遍发生、危害严重的一种病害。迄今为止,世界上报道的叶霉病菌生理小种有 24 个,发现至少有 24 个基因对其有抗性。番茄抗叶霉病 *Cf-5* 基因是抗病育种中开发和利用的主要抗性基因^[3],2005 年于拴仓等^[4]建立了检测 *Cf-5* 基因的 CAPS 标记。番茄黄化曲叶病毒病自 1964 年发现以来,给美国、以色列、埃及和澳大利亚、中国等国家的番茄生产造成了严重的损失,其危害在我国有继续向全国蔓延的趋势。目前对黄化曲叶病毒病抗性研究最多的是 *Ty-1*、*Ty-2* 和 *Ty-3* 基因。其中 *Ty-1* 基因定位于 6 号染色体上^[5],与 *Mi* 基因有一定的重组

率;*Ty-2* 基因定位于 11 号染色体长臂上,并将其限定在标记 TG393(103 cM)和 TG36(84 cM)之间^[6]。该试验利用分子标记对 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi*、*Cf-5* 4 个基因在同一个 PCR 反应体系中同时进行筛选,旨在建立一个快速、灵敏、廉价的检测方法,为分子标记辅助选择抗性基因聚合育种提供一种有效方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 19 份番茄材料均由东北农业大学园艺学院番茄课题组提供。其中 11001、11002、11003 是不含 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 基因的高度纯和自交系。11134、11135 是含有杂合的 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 基因的 F_1 代品种。12001~12014 是自交系 F_2 代。

2×*Taq* Master Mix DNA 聚合酶、*TaqI* 酶,上海莱枫生物科技有限公司。参考有关文献^[7-10],筛选出特异性较强、符合该试验要求的特异性引物(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this research

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence
<i>Ty-1</i>	CAPS1 F	5'-TAATCCGTCGTTACCTCTCCTT-3'
	CAPS1 R	5'-CGGATGACTTCAATAGCAATGA-3'
<i>Ty-2</i>	CAPS2 F	5'-TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC-3'
	CAPS2 R	5'-AGTGTACATCCTTGCCATTGACT-3'
<i>Mi</i>	CAPS3 F	5'-TCGGAGCCTTGGTCTGAATT-3'
	CAPS3 R	5'-GCCAGAGATGATTCTGTGAGA-3'
<i>Cf-5</i>	CAPS4 F	5'-AGCAGATGAAATCCTCGGTC-3'
	CAPS4 R	5'-CCTCGCTGCTTCTTCTCCTT-3'

PCR 仪(乐胜创新);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像系统(BIO-RAD 公司)。

第一作者简介:刘超勤(1987-),男,硕士,研究方向为番茄种质资源的研究和利用。E-mail:chaoqin0110@163.com.

责任作者:李景富(1943-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为番茄种质资源的研究与利用。E-mail:Lijf_2005@126.com.

基金项目:国家科技部“863”计划资助项目(2007AA10Z-178)。

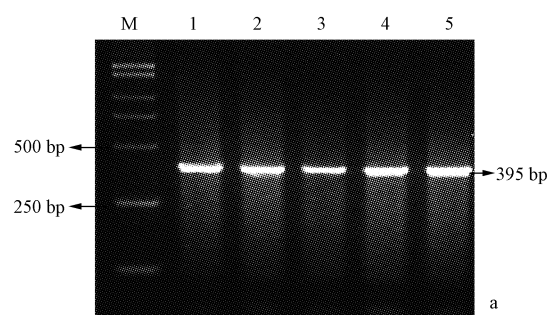
收稿日期:2013-01-05

1.2 试验方法

1.2.1 单基因 PCR 扩增及酶切体系 参照 Williamson 等^[11]的方法,用 CTAB 法提取 DNA。PCR 反应总体系为 25 μ L,包括模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,2 \times Taq Master Mix DNA 聚合酶 11 μ L,超纯水 11 μ L。PCR 反应程序如表 2。酶切体系为扩增产物 9 μ L,加入 10 U 的 TaqI 酶 1 μ L,Buffer 2 μ L,加超纯水加至 25 μ L,65 $^{\circ}$ C 保温 1.5 h。取 5 μ L PCR 产物及酶切产物,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 PCR 反应程序

基因	预变性	变性	退火	延伸	保存	循环数
Ty-1	94 $^{\circ}$ C 5 min	94 $^{\circ}$ C 30 s	53.5 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 1 min	4 $^{\circ}$ C	35
Ty-2	94 $^{\circ}$ C 5 min	94 $^{\circ}$ C 30 s	59.5 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 1 min	4 $^{\circ}$ C	35
Mi	94 $^{\circ}$ C 5 min	94 $^{\circ}$ C 30 s	56 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 1 min	4 $^{\circ}$ C	35
Cf-5	94 $^{\circ}$ C 5 min	94 $^{\circ}$ C 30 s	55 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 1 min	4 $^{\circ}$ C	35



1.2.2 多引物 PCR 扩增及酶切体系 多引物 PCR 总体系为 25 μ L,包括模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,2 \times Taq Master Mix DNA 聚合酶 11 μ L,超纯水 11 μ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55.8 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。酶切体系为扩增产物 9 μ L 加入 10 U 的 TaqI 酶 1 μ L,Buffer 2 μ L,加超纯水加至 25 μ L,65 $^{\circ}$ C 保温 1.5 h。取 PCR 产物及酶切产物,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 与 Ty-1 基因紧密连锁特异性片段的获得

如图 1a 显示,经 Ty-1 引物扩增,抗病材料和感病材料均只能扩增出 395 bp 的特异片段,经 Taq I 酶切后(图 1b),抗病材料 11134、11135 产生了 395、300 和 98 bp 的特异片段。感病材料 11001、11002 和 11003 不被 Taq I 酶切,呈现 395 bp 的片段。

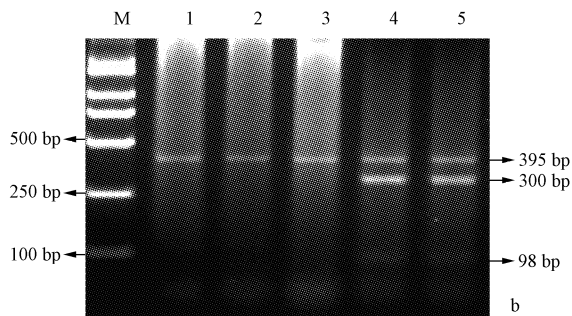


图 1 Ty-1 基因的扩增产物及 Taq I 酶切结果

注:M;DGL 2000 DNA Marker;1~5:11001,11002,11003,11134,11135。

Fig. 1 The products amplified by Ty-1 primer and digested by Taq I enzyme

Note:M;DGL 2000 DNA Marker;1~5:11001,11002,11003,11134,11135。

2.2 与 Ty-2 基因紧密连锁特异性片段的获得

如图 2 显示,经 Ty-2 引物扩增,含抗病基因的植株 11134、11135 扩增出 900 和 820 bp 的特异性片段,不含抗病基因的植株 11001、11002、11003 扩增出 820 bp 的特异性片段。

2.3 与 Mi 基因紧密连锁特异性片段的获得

如图 3a 显示,经 Mi 引物扩增,全部材料均只扩增出 750 bp 的特异性片段,经 Taq I 酶切后(图 3b),抗病材料 11134、11135 产生了 750、570 和 180 bp 的特异性片段。感病材料 11001、11002 和 11003 不被 Taq I 酶切,呈现 750 bp 的片段。

2.4 与 Cf-5 基因紧密连锁特异性片段的获得

如图 4a 显示,经 Cf-5 引物扩增,全部材料均只扩增出 960 bp 的特异性片段,经 Taq I 酶切后(图 4b),其中含 Cf-5 基因的材料 11134、11135 产生了 490 bp 和 256 bp 的特异性片段,不含 Cf-5 基因的材料 11001、

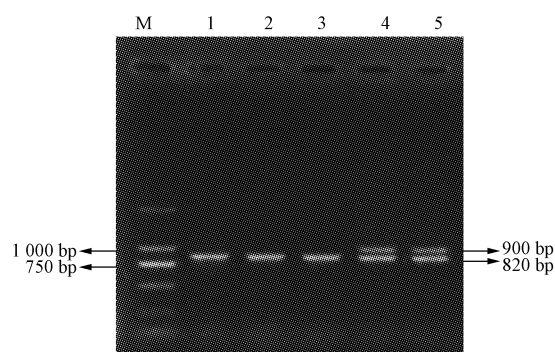
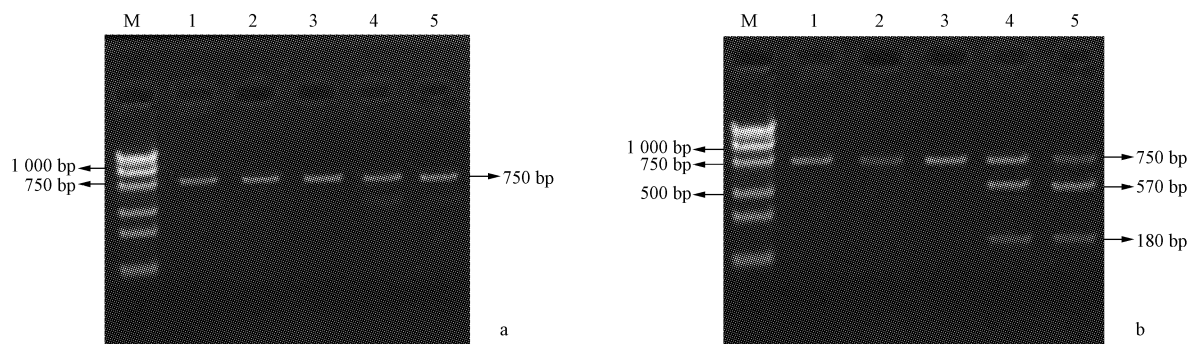


图 2 Ty-2 基因的扩增产物

注:M;DM 2000 DNA Marker;1~5:11001,11002,11003,11134,11135。

Fig. 2 The products amplified by Ty-2 primer

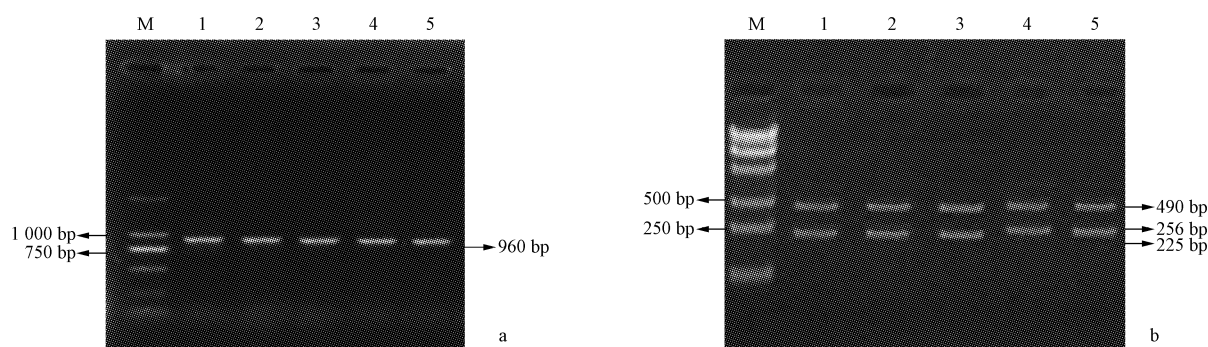
Note:M;DM 2000 DNA Marker;1~5:11001,11002,11003,11134,11135。

图3 *Mi* 基因扩增产物及酶切结果

注:M;DM 2000 DNA Marker;1~5;11001,11002,11003,11134,11135。

Fig. 3 The products amplified by *Mi* primer and digested by *Taq* I enzyme

Note:M;DM 2000 DNA Marker;1~5;11001,11002,11003,11134,11135.

图4 *Cf-5* 基因扩增产物及酶切结果

注:M;DM 2000 DNA Marker;1~5;11001,11002,11003,11134,11135。

Fig. 4 The products amplified by *Cf-5* primer and digested by *Taq* I enzyme

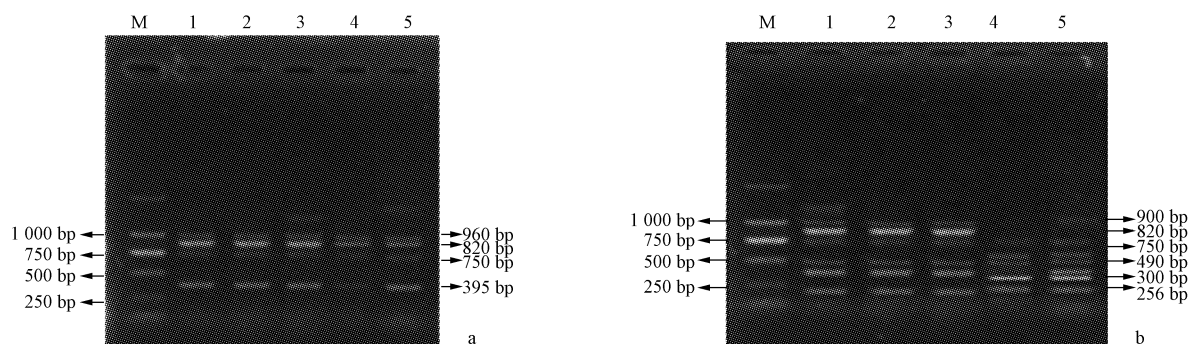
Note:M;DM 2000 DNA Marker;1~5;11001,11002,11003,11134,11135.

11002、11003 产生 490 bp 和 225 bp 的特异性片段。

2.5 同时检测 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 基因四重 PCR 体系的建立

如图 5a 显示,经 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 引物扩增(图 5a),与 *Ty-1* 基因紧密连锁的标记扩增出 395 bp 的特异性片段。与 *Ty-2* 基因紧密连锁的标记扩增出 900 bp 和 820 bp 的特异性片段。与 *Mi* 基因紧密连锁的标记

扩增出 750 bp 的特异性片段。与 *Cf-5* 基因紧密连锁的标记扩增出 960 bp 的特异性片段。经酶切后(图 5b),与 *Ty-1* 基因紧密连锁的标记产生了 395、300 和 98 bp 的特异性片段。与 *Ty-2* 基因紧密连锁的标记产生 1 条 480 bp 的特异性片段。与 *Mi* 基因紧密连锁的标记产生了 750、570 和 180 bp 的特异性片段。与 *Cf-5* 基因紧密连锁的标记产生了 490 和 256 bp 的特异性片断。该结

图5 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 基因扩增产物及酶切结果

注:M;DM 2000 DNA Marker;1~5;11001,11002,11003,11134,11135。

Fig. 5 The products amplified by *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* primer and digested by *Taq* I enzyme

Note:M;DM 2000 DNA Marker;1~5;11001,11002,11003,11134,11135.

果表明,利用多重 PCR 可以同时扩增出各个引物的特异性片段,扩增和酶切后与单引物扩增及酶切的结果相同。因此建立的同时扩增 *Ty*-1、*Ty*-2、*Mi* 和 *Cf*-5 基因的多重 PCR 方法可行。

2.6 利用四重 PCR 方法对 14 份番茄材料进行抗性鉴定

图 6 为利用多重 PCR 技术对自交系的 F_2 代是否

含有 *Ty*-1、*Ty*-2、*Mi* 和 *Cf*-5 基因的鉴定结果。其中 1201、1204、1213、1214 含有纯合的 *Ty*-1 和 *Cf*-5 基因, 1203、1205、1210 含杂合的 *Ty*-1 和 *Cf*-5 基因, 1209、1212 含有纯合的 *Ty*-1 和 *Mi* 基因、杂合的 *Cf*-5 基因, 1202、1206、1207 含有纯合的 *Ty*-2 和 *Cf*-5 基因, 1208 含有纯合 *Ty*-1 基因。

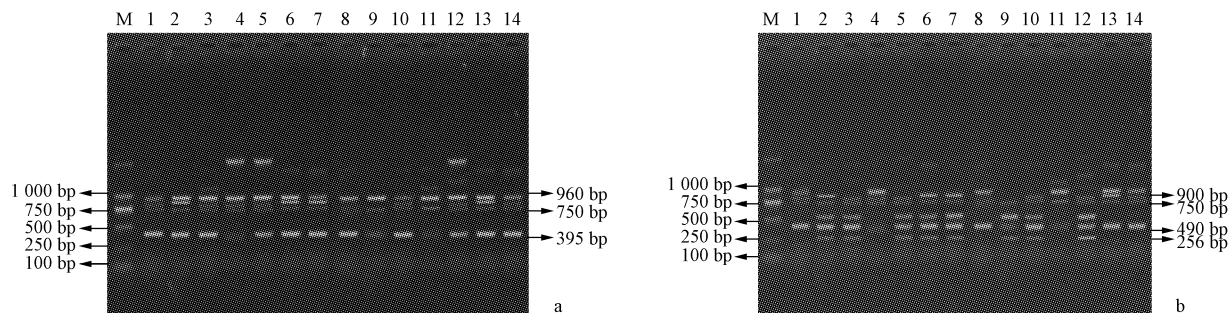


图 6 四重 PCR 对 F_2 材料扩增的产物和酶切结果

注: M; DM 2000 DNA Marker; 1~14; 1201~1214。

Fig. 6 The products amplified the quadruple PCR result of the F_2 seedling and digested by *Taq* I enzyme

Note: M; DM 2000 DNA Marker; 1~14; 1201~1214.

3 讨论

近年来,分子标记技术日趋成熟,利用分子标记辅助选择多抗番茄品种加快了育种进程。多重 PCR 是将多对特异性引物加入一个 PCR 反应体系中,对同一 DNA 模板的不同区域或多条模板扩增多个目的片段的 PCR 技术。该概念是 1988 年由 Chamberian 等^[12] 提出的。与普通 PCR 相比,多重 PCR 具有高效快捷、高产率、高度特异敏感、高覆盖率、低试验成本等诸多优点^[13-14]。该技术在作物病虫害检测、种质纯度鉴定、植物分子育种、植物基因表达研究等方面应用广泛,成为了重要的研究方法。

该试验建立的同时扩增 *Ty*-1、*Ty*-2、*Mi* 和 *Cf*-5 基因的四重 PCR 技术,扩增及酶切结果与单引物扩增及酶切结果完全一致,并经过不同材料和多次重复 PCR 验证,稳定性可靠,可对以上 4 个基因同时检测。因为同时进行 4 对引物的扩增及酶切,在显影时小片段出现条带难以区分现象,比如经 *Taq* I 酶切后,95 bp 和 180 bp 的片段难以观察,造成的原因可能是 PCR 扩增产物少,酶切反应片段过小且浓度低等^[15],但是不影响对植株抗病性鉴定。降低电泳电压、延长电泳时间,可以减轻这种现象。

综上所述,利用四重 PCR 反应对番茄 *Ty*-1、*Ty*-2、*Mi* 和 *Cf*-5 基因鉴定比单引物 PCR 覆盖率高、特异性强、操作简便、速度快,且节省大量的人力、物力,降低试验成本。为番茄抗黄化曲叶病毒病 *Ty*-1、*Ty*-2 基因、抗根结线虫病 *Mi* 基因和抗叶霉病 *Cf*-5 基因的聚合育种提供了有利工具。

参考文献

[1] 李景富. 中国番茄育种学[M]. 1 版. 北京: 中国农业出版社,

2011; 264-265.

[2] 彭德良. 蔬菜线虫病害的发生和防治[J]. 中国蔬菜, 1998(4): 57-58.

[3] 韩文华, 许文奎, 刘石磊, 等. 番茄叶霉病生理小种分化及抗病育种研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2005(5): 34-37.

[4] 于拴仓, 柴敏, 郑晓鹰. 番茄叶霉病抗性基因 *Cf*-5 的 CAPS 标记建立[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 57-60.

[5] Zamir D, Elkstein-Michelson I, Zakay Y, et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curlvirus tolerance gene, *Ty*-1[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88: 141-146.

[6] Hanson P M, Green S K, Kuo G. *Ty*-2, a gene on chromosome 11 conditioning Gemini virus resistance in tomato[J]. Rep Tomato Genet Coop, 2006, 56: 17-18.

[7] 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]. 上海农业学报, 2009, 25(2): 6-9.

[8] 宋燕, 陈丽静, 李君明, 等. 利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 *Tm*-2² 和 *Mi* 基因[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 165-16.

[9] 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.

[10] 于力, 朱龙英, 万延慧, 等. 利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 *Ty*-1 和 *Cf*-5 基因[J]. 上海农业学报, 2009, 25(2): 6-9.

[11] 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]. Theor Appl Genet, 1994, 87: 757-763.

[12] Chamberian J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Detection screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nuel Acids Res, 1988, 16: 1141-1156.

[13] 崔玉娟, 胡丹东. 多重 PCR 技术在植物学研究中的应用[J]. 天水师范学院学报, 2008, 28(5): 43-45.

[14] Kirschberg O, Schuttler C, Repp R, et al. A Multiplex-PCR to Identify Hepatitis B Virus-genotypes A-F[J]. J Clin Virol, 2004, 29(1): 39-43.

[15] 李君明, 陈丽静, 宋燕. 利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 *Tm*-2² 和 *Mi* 基因[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 698-702.

改良 CTAB 法提取番石榴总 DNA 的初步研究

赵志常, 陈业渊, 高爱平, 罗石荣, 黄建峰

(中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室, 海南 儋州 571737)

摘 要:以番石榴为试材, 采用 CTAB、SDS 和改良的 CTAB 法分别从新鲜的番石榴叶片中提取 DNA, 并对其进行琼脂糖凝胶电泳检测和 SCoT-PCR 分析。结果表明: 3 种方法均可以从番石榴的叶片中提取 DNA, 但改良的 CTAB 方法通过加入漂洗液 2 次洗涤, 能够较好的去除样品中的多酚、多糖和蛋白质等物质, 可以较好的从新鲜的叶片中提取较高质量的 DNA, 并可以用于 SCoT-PCR 标记分析。

关键词:改良 CTAB; 番石榴; DNA 提取

中图分类号:S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0123-03

番石榴(*Psidium guajava* L.) 属桃金娘科(Myrtaceae) 番石榴属(*Psidium*) 植物, 俗称鸡屎果、芭乐、翻桃子、番桃、拔子、鸡屎拔, 又名秋果(《南越笔记》)、鸡矢果、林拔、拔仔、椰拔、木八子、喇叭番石榴、番鬼子、百子树、罗拔、花稔、饭桃、番桃树、郊桃、番稔等。番石榴是一种适应性很强的热带果树, 原产美洲热带地区, 16~17 世纪传播至热带及亚热带地区, 如北美洲、大洋洲、新西兰、太平洋诸岛、印度尼西亚、印度、马来西亚、北非、越南等, 大约 17 世纪末传入中国。现台湾、海南、广东、广西、福

建、云南、江西等省均有栽培。番石榴果形有球形、椭圆形、卵圆形及洋梨形, 果皮普通为绿色、红色、黄色, 果肉有白色、红色、黄色等, 其肉质非常柔软, 肉汁丰富, 味道甜美, 可溶性固形物在为 8%~11%, 富含大量的钾、铁、胡萝卜素等物质, 营养极其丰富, 是养颜美容、减肥的最佳水果; 同时叶片和幼果切片晒干泡茶喝, 可辅助治疗糖尿病。其果实不但可以鲜食, 还可以加工为果汁、果酱、果脯, 同时还可制作成盆景, 具有广阔的市场前景, 是目前港澳台和东南亚地区最畅销的水果之一。目标起始密码子多态性(Start codon targeted polymorphism, SCoT) 分子标记技术是 Collard 和 Mackill 开发的一种基于单引物扩增反应(Single primer amplification reaction, SPAR) 的新型目标分子标记技术^[1], 其原理是

第一作者简介:赵志常(1977-), 男, 山东烟台人, 博士, 副研究员, 现主要从事热带果树的遗传育种等研究工作。

收稿日期:2013-01-16

Study on Identification of *Ty*-1 Gene, *Ty*-2 Gene, *Mi* Gene and *Cf*-5 Gene by Quadruple PCR in Tomato

LIU Chao-qin, LI Jing-fu, XU Xiang-yang, JIANG Jing-bin

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Taking *Lycopersicon esculentum* as material, *Ty*-1, *Ty*-2, *Mi* and *Cf*-5 in tomato tightly linked with four SCAR markers respectively resistant to Tomato Yellow Leaf Curl virus, root-knot nematode and tomato leaf mold were amplified and screened by using a single PCR reaction. The results showed that the PCR products were identical with one amplified by a single SCAR primer. Among them, four SCAR markers tightly linked with *Ty*-1, *Ty*-2, *Mi* and *Cf*-5 genes produced 395, 900, 750 and 960 bp bands. Cleaved with the restriction enzyme *Taq* I, these specific fragments produced almost unanimously the same size with the others. Preliminary proved the veracity of quadruple PCR. The accurate results proved that *Ty*-1, *Ty*-2, *Mi* and *Cf*-5 resistant genes could be identified simultaneously by using under adaptable condition. Quadruple PCR could be very important for marker-assisted selection during early stage in tomato. Also could reduce production costs, time saving and less labor. If could reasonable used, it will become an important method of breeding work.

Key words: tomato; multi-PCR; *Ty*-1; *Ty*-2; *Mi*; *Cf*-5