

# 番茄成熟突变体 *rin* SCAR 标记的开发及验证

李 翔, 刘 蕾, 王 富, 王 辉

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

**摘 要:**以“瑞星五号”番茄为试材,采用分子标记的方法,开发了番茄成熟突变体 *rin* SCAR 标记。结果表明:该标记可在正常成熟番茄材料中扩增出 580 bp 的目的条带,而在成熟突变体 *rin* 基因组中无法扩增出该目标条带。在已知表型的“瑞星五号”番茄后代中进行验证,Prin 能高效鉴定出成熟突变体 *rin* 植株。

**关键词:**番茄(*Solanum esculentum* Mill.);成熟突变体;分子标记

**中图分类号:**S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0104-04

番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.)是世界上产量最高的蔬菜之一,凭其在农业生产上的重要经济价值以及栽培面积不断的扩大,已逐渐成为我国主要栽培蔬菜之一。但番茄在果实品质、保鲜性和耐贮耐运性上还有重大缺陷<sup>[1]</sup>,因此,提高番茄产品质量和果实贮运性也是番茄育种目标之一。

近些年来,蔬菜育种家们先后发现了多种番茄成熟突变体,如 *Nr*(*never-ripe*)、*nor*(*nonripening*)、*rin*(*ripening inhibitor*)、*alc*(*alcobaça*)和 *gf*(*green-flesh*)等。番茄成熟突变体 *rin*(*ripening-inhibitor*)是由 MUNGER 首先发现,并由 ROBINSON 等<sup>[2]</sup>描述。番茄成熟突变体 *rin* 特点为果实硬度高,果型端正,抗病虫性和环境适应性较强,果皮为黄绿色<sup>[3-4]</sup>,成熟时起初为绿色,后逐渐呈橙黄色,室温可贮藏 150 d,不软不腐等。

番茄成熟突变体 *rin*(*ripening inhibitor*)的萼片增大且花序决定性丧失,这主要与 *rin* 位点上的 2 个 *MADS-box* 基因间的基因突变有关。*rin* 是位于番茄的第 5 染色体上的单一隐性基因<sup>[5]</sup>,*rin* 位点上含有 2 个 *MADS-box* 基因,1 个为 *LeMADS-RIN*,主要调控果实成熟过程;另 1 个基因 *LeMADS-MC* 则影响萼片发育和花序决定性<sup>[6]</sup>。在某些野生番茄种中,*LeMADS-RIN* 和

*LeMADS-MC* 串联并列,并分别编码 242 和 244 个氨基酸,且分别在果实和心皮、花瓣及萼片中表达,2 个编码区之间相隔 2.6 kb<sup>[7]</sup>。在番茄成熟突变体 *rin*(*ripening inhibitor*)中,2 个 *MADS-box* 基因之间发生了缺失性基因突变,造成约 3 000 bp 的碱基缺失,从而使 2 个基因融合而形成新的嵌合基因,并编码出含 *LeMADS-RIN* 前 215 个氨基酸和 *LeMADS-MC* 后 182 个氨基酸的嵌合蛋白质<sup>[8]</sup>。致使番茄成熟突变体 *rin* 呈现出果实为无呼吸跃变型、不变软、不腐烂、口感微酸涩、风味较差<sup>[9]</sup>、鲜食价值低等种种不良特性。因为我国消费者对食品安全、外观和风味等标准要求极高,所以利用番茄成熟突变体 *rin* 培育出新品种存在一定的局限性<sup>[10]</sup>。

现以“瑞星五号”分离后代(后代中含有具有番茄成熟突变体 *rin* 特征及普通番茄品种的植株)为试验材料,根据 *rin* 位点上 *LeMADS-RIN* 和 *LeMADS-MC* 间的片段缺失,设计分子标记,旨在探索番茄成熟突变体 *rin* 的遗传特性,以期番茄成熟突变体 *rin* 耐贮性的应用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植株材料 20 份供试番茄均来源于青岛农业大学园艺学院的“瑞星五号”番茄品种的分离后代,编号为 RX5-1~RX5-20,其中 RX5-1、RX5-3 和 RX5-5 成熟果实表现为橙黄色、萼片大等特点,具有明显的成熟突变体 *rin* 的特征。采集番茄中上部叶片样品,新鲜叶片可尽快提取 DNA,剩余叶片经液氮处理后储存于 -70 ℃ 超低温冰箱中备用。

1.1.2 核酸序列 *RIN*(GenBank accession number: af448522)、*MC*(GenBank accession number: nm\_001247736)及 *rin*(GenBank accession number: af448523)

**第一作者简介:**李翔(1991-),男,山东潍坊人,硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种及生物技术。E-mail:2839860338@qq.com.

**责任作者:**王辉(1981-),男,山东郓城人,博士,讲师,研究方向为番茄遗传育种及生物技术。E-mail:fromstick@163.com.

**基金项目:**山东省良种工程农业生物资源创新利用研究资助项目(PTBR2013);青岛市民生计划资助项目(13-1-3-3-nsh);青岛农业大学高层次人才科研基金资助项目(663-1115041);山东省自然科学基金资助项目(ZR2010CM047,ZR2014CQ034);国家级大学生创新创业计划资助项目(201410435036)。

**收稿日期:**2015-12-23

CDS 序列均来源于 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)。*RIN* (*Solyc05g012020*)和 *MC* (*Solyc05g056620*)的序列,番茄基因组 ITAG 2.3 均来源于 solgenomics.net。

1.1.3 常用试剂 所用试剂 CTAB、EDTA、Tris-HCl、Ethidium Bromide(EB)、琼脂糖等购于上海生工生物技术有限公司。植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN Plant Genomic DNA Kit)购于北京天根生化科技有限公司。PCR 扩增试验所用试剂 10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus)、dNTP Mixture(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)、*Taq* (5 U·μL<sup>-1</sup>) DNA Polymerase、DL 2 000 DNA Marker 等购于宝生物工程(大连)有限公司(TAKARA)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 基因结构示意图及引物设计 基因结构示意图采用 Perl 程序进行画图,图中黑色方块表示外显子,黑线为内含子;引物利用 primer3 软件在线设计(http://solgenomics.net/primer3/)。

1.2.2 番茄样品 DNA 的提取纯化及检测 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN Plant Genomic DNA Kit)提取样品 DNA,提取纯化及检测参照张楠等<sup>[11]</sup>的方法。取番茄新鲜叶片组织 100~200 mg,放入 2 mL 离心管中,加入液氮后用研棒迅速研成粉末。参照试剂盒说明,依次进行抽提、漂洗、晾干,最后用 50 μL TE 缓冲液溶解。

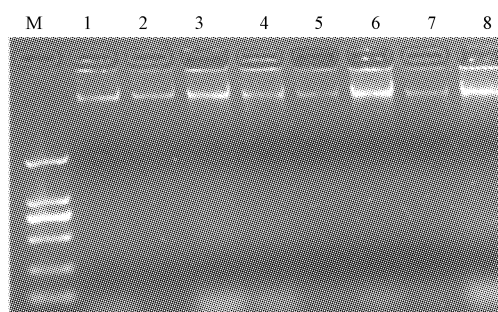
1.2.3 PCR 扩增反应及检测 PCR 扩增采用 20 μL 反应体系,其中模板 DNA (20~100 ng·μL<sup>-1</sup>) 5.0 μL,10×PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, High Pure dNTPs (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2.0 μL,上下游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 1.0 μL,Easy *Taq* DNA Polymerase (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.3 μL,灭菌超纯水补充至 20 μL。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。反应完毕后,取 PCR 扩增产物约 10 μL,在电压 5 V·cm<sup>-1</sup> 条件下用 1.0% 琼脂糖凝胶,电泳分离 PCR 产物 30 min,在 Bio-RAD 自动凝胶成像

系统上,根据 DNA Marker 对样品进行观察、照相、检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品 DNA 的质量与浓度检测

试验采用 CTAB 法所提取的样品 DNA 经紫外分光光度计检测浓度,样品 DNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值在 1.8~2.0 范围内,说明样品 DNA 质量良好。同时利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测了前 8 份样品,电泳条带明亮整齐(图 1),均可用于进行 PCR 扩增。DNA 经检测后取 DNA 母液稀释至约 20~100 ng·μL<sup>-1</sup> 后备用。



注:M,DL 2 000 Marker;1~8,部分番茄材料。

Note:M,DL 2 000 Marker;1-8,Partial tomato samples.

图 1 番茄基因组 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 The gel-electrophoresis profiles of the tomato genomic DNA

### 2.2 番茄成熟突变体基因 *rin* 分子标记的开发

正常成熟番茄和成熟突变体 *rin* 基因结构如图 2 所示,成熟突变体 *rin* 与正常成熟番茄相比,在基因组水平上存在 2.6 kb 的缺失,其中包含 *Solyc05g012020*(*RIN*)的 exon8(85 bp)、*Solyc05g056620*(*MC*)的 exon1(185 bp)及 2 个基因间区,从而使得原来 2 个基因 *Solyc05g012020*(*RIN*)和 *Solyc05g056620*(*MC*)融合成 1 个基因 *rin*。基于此,该研究将成熟突变体番茄 *rin* 所缺失的 2.6 kb 核酸序列取出,并针对该序列开发 1 个用于鉴别成熟突变体 *rin* 的基因特异标记。

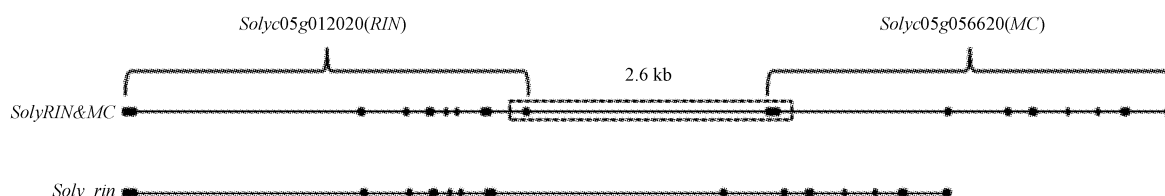


图 2 正常成熟番茄(*SolyRIN&MC*)与成熟突变体 *rin* (*Soly\_rin*)基因结构差异

Fig. 2 The difference of gene structure between normal tomato (*SolyRIN&MC*) and ripening mutant *rin* (*Soly\_rin*)

首先将番茄基因组 ITAG 2.3 的第 5 号染色体 *RIN* 和 *MC* 基因间区的核酸片段(5223435~5225251) 1 817 bp 提出,发现参考基因组该片段中存在一个 231 bp 的 gap。以该核酸片段为参照序列,利用 primer 3 进行 PCR 引物设计。

利用 Primer3 对参考序列进行搜索,并从中筛选出 1 对扩增效率较高的引物,并命名为 Prin。上游引物序列:5'-AGTTTGTGATTGTTGAAAGGAC-3';下游引物序列:5'-AATATTGCCGTGTTGTGCT-3'。该标记在正常成熟番茄中理论上可扩增出 580 bp 的 DNA 特异片

段,在成熟突变体 *rin* 中无法扩增出 580 bp 的目标片段。同时该标记的 *T<sub>m</sub>* 理论值为 58 ℃。

### 2.3 番茄成熟突变体基因 *rin* 分子标记的验证

利用 *rin* 基因特异引物对采集的 20 个样本进行了 PCR 扩增,由图 3 可知,样品 RX5-1、RX5-3 和 RX5-6 均无法扩增出 580 bp 的目标条带;样品 RX5-2、RX5-4、

RX5-5、RX5-8~RX5-20 均能扩增出 580 bp 的目标条带。

RX5-1、RX5-3 和 RX5-6 均表现出明显的成熟突变体特征,而其它材料均表现为正常成熟,这与分子标记检测结果完全一致。也证实了该标记可以用以检测成熟突变体纯合植株。

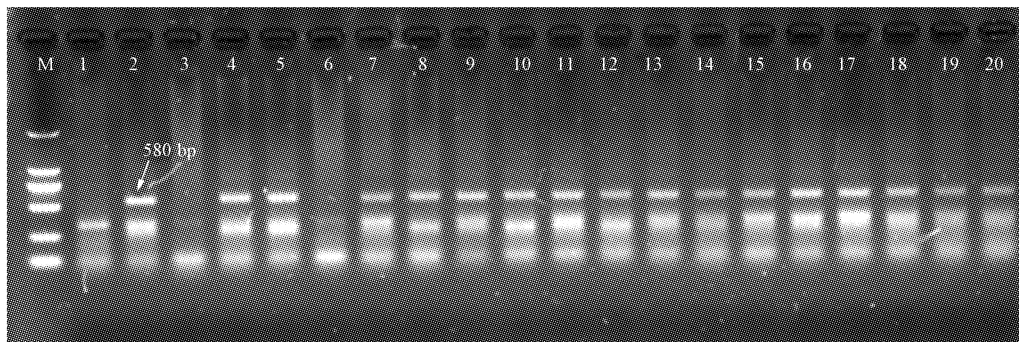


图 3 *rin* 基因特异标记在正常成熟番茄及成熟突变体中的验证

Fig. 3 Verification of the *rin* gene specific marker in the normal tomato and ripening mutant

### 3 结论与讨论

该研究利用番茄成熟突变体 *rin* 与正常成熟材料相比,在突变位点存在 2.6 kb 的 DNA 序列缺失,开发了 *rin* 基因特异的 Scar 标记 Prin,该标记可在正常成熟番茄材料中扩增出 580 bp 的目的条带,而在成熟突变体 *rin* 基因组中无法扩增出该目标条带。经过在已知表型的“瑞星五号”番茄品种后代分离材料中进行验证,结果表明 Prin 能高效鉴定出成熟突变体 *rin* 植株。

张晓黎<sup>[12]</sup> 利用已公布的迟熟基因 *rin* (ripening inhibitor) 设计了引物,并进行了验证,在成熟突变体中可扩增出 850 bp 左右的 DNA 片段,而在正常成熟番茄中则无扩增,证明了该引物作为基因标记用于筛选和鉴定番茄材料中是否含有 *rin* 基因,但该标记无法区分 *rin* 纯合植株和杂合植株。该研究针对成熟突变体基因所缺失的 DNA 片段,设计了 1 个新的 Scar 标记 Prin,可以用以鉴定 *rin* 突变体纯合植株。

Prin 可以在苗期鉴定出成熟突变体 *rin* 植株,可大大提高番茄成熟突变体材料的筛选效率。该标记在该试验中还是能在所有材料中扩增出 300 bp 的非目的条带。研究表明,番茄基因组在进化过程中存在 3 倍化事件<sup>[13]</sup>,植物基因组的多倍化不可避免存在大量的同源序列<sup>[14]</sup>。因此,针对番茄基因组中某一序列设计引物进行 PCR 扩增时难免会导致非特异性扩增的产生。但该非特异性扩增并不影响对成熟突变体材料的高效筛选。

由于番茄成熟突变体 *rin* 基因突变的根源是 2 个 *MADS-box* 基因之间发生了大约 2.6 kb 的缺失性基因突变,这一区域包含 *RIN* 基因的 Exon8、*MC* 基因的 Exon1 及 *RIN* 基因和 *MC* 基因区,针对这一特殊突变

很难直接开发出一个理想的共显性标记。利用该研究开发的 Scar 标记,同时结合张晓黎<sup>[12]</sup> 的标记,可以高效筛选出突变体、正常成熟及杂合植株。

### 参考文献

- [1] 姚建刚,张贺,许向阳,等. 番茄果实成熟过程中色泽变化的研究进展[J]. 中国蔬菜,2010,6(8):1-6.
- [2] ROBINSON R W, TOMES M L. Ripening inhibitor: a gene with multiple effects on ripening[J]. Rep Tomato Genet Coop, 1968(18):36-37.
- [3] 张朝辉,刘伟. 番茄具有非后熟性突变基因材料的筛选与利用[J]. 中国蔬菜,1995(1):9-11.
- [4] 唐树发,高振华,崔立群,等. 具有迟熟基因 *rin* 的纯合粉红色和纯合红色番茄自交系创造及利用[J]. 辽宁农业科学,2012(4):35-37.
- [5] TIGCHELAAR E C, TOMES M L, KERR E A, et al. A new fruit ripening mutant non-ripening(*nor*) [J]. Rpt Tom Genet Coop, 1973(23):33-34.
- [6] 张波,徐昌杰,陈昆松. 番茄番茄成熟突变体 *rin* 位点上的一个 *MADS* 盒基因调控果实成熟[J]. 植物学通报,2002,19(3):382-383.
- [7] 胡丽芳,金志强,徐碧玉. *MADS-box* 基因在果实发育成熟过程中的作用[J]. 分子植物育种,2005,6(3):415-420.
- [8] VREBALOV J, RUEZINSKY D, PADMANABHAN V, et al. A *MADS-box* gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus[J]. Science, 2002, 296(5566):343-346.
- [9] 王辉,李文丽,王富,等. 番茄成熟突变体 *rin* 的生长特性和果实耐贮性的初步研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2008,25(1):21-23.
- [10] 宰文珊,陶月良,陈勇兵,等. 不同番茄成熟过程中贮藏性能差异研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(27):17024-17025.
- [11] 张楠,谢放. 高质量加工番茄基因组 DNA 提取方法的改进[J]. 湖南农业科学,2011(15):16-17,20.
- [12] 张晓黎. 番茄耐贮藏基因标记开发及辅助自交系选育[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [13] CONSORTIUM T T G, SATO S, TABATA S, et al. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution[J]. Nature, 2012, 485(7400):635-641.
- [14] WANG X, CHENG F, LI Y, et al. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. Nature Genetics, 2011, 43(10):1035-1039.



## 普通菜豆种传病毒的分子鉴定

李 畅<sup>1</sup>, 付雅莉<sup>1</sup>, 谭 颖<sup>1</sup>, 卢 宏<sup>1</sup>, 冯国军<sup>2</sup>, 徐启江<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江大学 农作物研究院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘 要:**菜豆普通花叶病毒(BCMV)、菜豆黄花叶病毒(BYMV)和南方菜豆花叶病毒(SBMV)是黑龙江省菜豆主要的种子传播病毒。为分析菜豆种质资源携带病毒的状况,以 6 份普通菜豆种子的胚根、胚芽和子叶为试材,采用 CTAB 法提取总 RNA 和基因组 DNA,根据 BCMV、BYMV 和 SBMV 的衣壳蛋白基因序列设计特异引物,通过 PCR 和 RT-PCR 对 180 份菜豆资源进行病毒检测。结果表明:RT-PCR 对 BCMV、BYMV 和 SBMV 的检出率分别为 12.78%、9.44%和 1.67%;PCR 的检出率分别为 12.78%、8.33%和 1.67%。所收集的 6 种菜豆种质资源均检出 1~3 种病毒,其中 BCMV 和 BYMV 是主要的病毒种类。

**关键词:**菜豆;菜豆普通花叶病毒;菜豆黄花叶病毒;南方菜豆花叶病毒;PCR;RT-PCR

**中图分类号:**S 632 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0107-05

普通菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是一种重要的植物性营养源,在亚洲、欧洲和美洲广泛种植<sup>[1]</sup>,含有丰富的蛋白质、碳水化合物、纤维素、矿物质及维生素<sup>[2-3]</sup>以及大量的生物活性成分,例如黄酮醇、异黄酮、酚酸和鞣酸等<sup>[4]</sup>。因此,普通菜豆及其产品被归类为功能性食品,食疗价值很高,具有免疫调节、抗增殖、抗肿瘤、杀真菌、抗 HIV-1 逆转录酶活性等功效<sup>[5-10]</sup>。

菜豆病毒病作为一种系统性病害在我国各地普遍发生,是影响产量的重要因素<sup>[11]</sup>。迄今,已知自然感染菜豆属植物的病毒达 34 种<sup>[12]</sup>,包括菜豆普通花叶病毒

(bean common mosaic virus, BCMV)、菜豆黄花叶病毒(bean yellow mosaic virus, BYMV)、南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus, SBMV)。其中, BCMV 的发生最为广泛,且具有极强的破坏性<sup>[12]</sup>。这些病毒可以在菜豆种子中长期存活、传播而造成危害, BCMV 可在宿存 30 年后仍具有侵染力<sup>[13]</sup>。开展生产用种的带毒检测,保障无病毒携带的种子是菜豆生产的基础。该研究以 6 份菜豆品种种子的胚根、胚芽、子叶为试材,采用 PCR/RT-PCR 方法对菜豆的主要种传病毒 BCMV、BYMV 和 SBMV 进行检测,以期建立一套快速、特异的病毒分子检测技术。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

6 份普通菜豆种子“太空将军”、“哈优一号”、“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”、“哈菜豆 15 号”和“哈菜豆 16 号”

**第一作者简介:**李畅(1990-),女,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:344264993@qq.com.

**责任作者:**徐启江(1969-),男,博士,教授,现主要从事植物发育分子生物学等研究工作。E-mail:qijiangxu@126.com.

**收稿日期:**2016-02-26

## Development and Verification of Molecular Markers for the Gene *rin* of Tomato Mature Mutant

LI Xiang, LIU Lei, WANG Fu, WANG Hui

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** Taking ‘Ruixing No. 5’ tomato as test materials, using molecular marker method, a gene-specific scar molecular mark Prin for *rin* was developed. The results showed that this mark could amplify 580 bp of DNA sequence in normal mature tomato materials, but not in genome of mature mutant *rin*. Then, the marker was used in known phenotypic offsprings of ‘Ruixing No. 5’, and the result suggested Prin could effectively identify ripening mutant.

**Keywords:** tomato (*Solanum esculentum* Mill.); ripening mutant; molecular marker