

番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 TY-1 的 PCR 检测

杜玉丽¹, 张子君², 李海涛², 邹庆道²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁省农业科学院 蔬菜研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:利用特异引物对 3 份抗病纯合材料(基因型 Ty-1/Ty-1)和 4 份感病纯合材料(基因型 ty-1/ty-1)进行 PCR 扩增, 抗、感材料均产生 398 bp 的 PCR 扩增片段, 抗病和杂合抗病材料的酶切产物存在 Taq I 酶切位点, 酶切后分别产生了 303 和 98 bp 以及 398、303 和 98 bp 的片段, 而纯合感病材料的扩增产物无此酶切位点, 酶切后仍为 398 bp 的片段。该标记能够区分抗病材料、感病材料及抗病杂合材料, 是与番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 Ty-1 紧密连锁的共显性标记。利用该标记对 13 份番茄杂交种进行检测, 有 8 份杂交种含有 Ty-1 抗病基因, 3 份材料不含 Ty-1 抗病基因。利用这条标记对国内的 13 份番茄自交系进行检测, 13 份材料均不含 Ty-1 抗病基因。

关键词:番茄黄化曲叶病毒; Ty-1; 分子标记

中图分类号:S 436.412.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)13-0136-04

番茄(*Solanum lycopersicum*)是一种世界性经济作物, 它品种多, 产量高, 营养丰富, 用途广泛。限制番茄生产发展和产量的主要原因在于病害的流行危害和逆境条件的制约^[1]。近年来, 随着番茄保护地面积的不断扩大, 生产中出现的病虫害问题逐年加重, 新的病害不断出现, 每年因病虫害就可使番茄减产 10%~20%, 严重时可能绝收。

病毒病是番茄生产中最常见、发病最普遍的危害之一, 其中番茄黄化曲叶病毒病(Tomato yellow leaf curl virus disease, TYLCVD)是世界范围内流行的一种毁灭性的病毒病, 已成为世界番茄生产的限制性因素^[2], 一

旦发病, 很难控制。该病害于 20 世纪 30 年代末在以色列首次被发现^[3], 是一类由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播的双生病毒(Geminiviruses), 为菜豆金色花叶病毒属(*Begonurvirints*)成员^[4]。近年来, 该病害在世界各地大面积爆发并有逐年加重的趋势。自 2005 年开始, 我国广东、广西、台湾、上海、北京、江苏、浙江、河南、河北、山东等地均有发生的报道^[5-6], 并呈现由南向北迅速蔓延的趋势, 给当地的番茄生产造成极其严重的损失。番茄抗 TYLCV 育种始于 20 世纪 70 年代, 目前已培育出了一些抗病品种, 伴随着检测及鉴定技术及其它相关研究的发展, 近年来番茄抗 TYLCV 育种研究在各个方面都有了新的进展^[7]。

目前番茄黄化曲叶病毒病的抗病基因有 Ty-1, Ty-2, Ty-3, Ty-3a, Ty-4 和 Ty-5 等, 研究较多的是 Ty-1, Ty-2 和 Ty-3 基因, 其中 Zamir 等^[8]认为 Ty-1 基因为主效基因, 该基因为不完全显性单基因, 并将其定位在番

第一作者简介:杜玉丽(1986-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 现主要从事番茄抗黄化曲叶病毒病等研究工作。E-mail: duyuli325@163.com.

责任作者:李海涛(1956-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事蔬菜遗传育种研究工作。E-mail: haitao57@sohu.com.

收稿日期:2012-03-15

Abstract: Genic male sterility is an important way to utilize the heterosis of chili pepper, So, pilot studies were conducted for better understanding the mechanism of the chili pepper GMS, establish chili fertile plants buds and sterility plant buds cDNA library between the homozygous genic male sterility two-type line 'AB23' and by using cDNA-AFLP in chili pepper genic male sterility of sterility genes for preliminary research. The results showed that there were 19 bands expressed in a higher level in fertile plant buds, Among them, 13 bands homologous sequences function known, 2 bands function unknown and 4 bands were maybe some novel genes. The 13 homologous sequences function known participated in the following biological process: metabolism, transcription, cellular transport, signal transduction mechanism etc. Furthermore, RT-PCR demonstrates that it was consistent with the result of cDNA-AFLP. This study result will help us understand that the development of chili pepper male gametes and could give basic information about the genic male sterility in chili pepper.

Key words: chili pepper; genic male sterility; cDNA-AFLP

茄第6号染色体的 RFLP 标记 TG297(4 cM)和 TG97(8.6 cM)之间,图距 6~10 cM。番茄黄化曲叶病毒病属检疫性病害,利用常规方法进行抗病育种有较大困难,利用分子标记结合常规方法才能高效、准确地进行抗病材料的筛选与鉴定。该试验旨在寻找与番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 Ty-1 紧密连锁的分子标记,并利用该标记进行番茄抗病材料的检测与筛选,为分子辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验共用番茄材料 33 份,其中含抗病基因 Ty-1 的纯合材料 3 份,编号为 CK1、CK2、CK3,基因型为 (Ty-1/Ty-1),来自台湾亚蔬中心;不含抗病基因 Ty-1 的感病纯合材料 4 份,编号为 CK4、CK5、CK6、CK7,基因型为 (ty-1/ty-1),CK4 为 L402 母本,CK5 为 L402 父本,CK6 为“金棚一号”母本,CK7 为“金棚一号”父本,来自辽宁省农业科学院蔬菜研究所番茄课题组;未知抗病性的自交系材料 13 份,编号为 1~13,来自辽宁省农业科学院蔬菜研究所番茄课题组;杂交种 13 份,编号为 14~26,来自国外种子公司,属试种品种,名称不详。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 Ty-1 的 CAPS 标记引物参照 Zamir 等^[8]、于力等^[9]、付蓉蓉等^[10]设计。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。材料的特异性引物序列及其扩增片段见表 1。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 The sequences of primer used in this research

引物 Primer	序列 Sequence
CAPS1 R	5'-CGGATGACTTCAATAGCAATGA-3'
CAPS1 F	5'-TAATCCGTCGTTACCTCTCCTT-3'

1.2.2 PCR 扩增及酶切体系 DNA 的提取参照 Williamson 等的方法,由改良 CTAB 法提取。用于 PCR 反应的药品均购自 Tiangen 生物工程公司。PCR 反应总体积为 20 μ L,包括:模板 DNA 20 ng,dNTP 0.4 μ L,引物(10 U)各 2.0 μ L,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)0.5 μ L,buffer 2.0 μ L,Mg²⁺ 2.0 μ L,补充超纯水至 20 μ L。PCR 的反应程序为:94℃预变性 5 min,然后 94℃变性 1 min,64.6℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,进行 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min,扩增产物在 4℃保存。酶切体系为:PCR 扩增产物 7 μ L 加入 10 U 的 TaqI 酶 1 μ L,Buffer 2 μ L,补充超纯水加至 20 μ L。65℃保温 2 h。PCR 产物及酶切产物于 1.0% 琼脂糖胶在电压 5 V/cm 条件下电泳 25 min,电泳结果用 Goodview 染色,Bio-RAD 凝胶成像系统拍照。

1.2.3 CAPS 标记的获得及抗病基因检测 利用设计的引物对 3 份抗病材料 CK1、CK2、CK3 及 4 份感病材料 CK4、CK5、CK6、CK7 进行 PCR 扩增,然后将扩增产物用 Taq I 酶酶切,获得与抗病基因紧密连锁的 CAPS 标记;利用标记分别对杂交种、自交系进行抗病基因的检测。

2 结果与分析

2.1 利用 CAPS 标记对已知抗病性的抗病材料和感病材料的检测

由图 1 可知,利用特异引物对 7 份抗、感材料的 PCR 产物进行 Taq I 酶切,酶切后 3 份抗病材料产生 303 和 98 bp 的片段,而 4 份感病材料不能被 Taq I 酶切,仍呈现原来的 398 bp 的片段(表 2),398 和 303 bp 2 个片段能将抗病材料和感病材料加以区分,是与抗病基因连锁的标记。

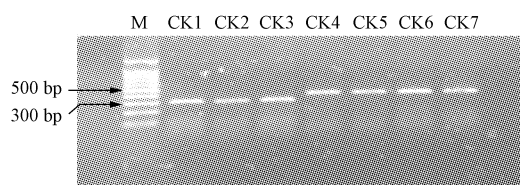


图 1 PCR 扩增产物的 TaqI 酶切结果

注:M:Marker,CK1~CK3:抗病纯合系,CK4~CK7:感病纯合系。

Fig. 1 Enzyme digestion of PCR products

Note:M:Marker,CK1~CK3:resistant inbred lines,CK4~CK7:susceptible inbred lines.

表 2 7 份材料 PCR 扩增产物的酶切结果

Table 2 The enzyme digestion pattern of PCR products of 7 tomato lines

材料 Material	基因型 Genotype	TaqI 酶切结果 Digested product by TaqI/bp
CK1	Ty-1/Ty-1	303,98
CK2	Ty-1/Ty-1	303,98
CK3	Ty-1/Ty-1	303,98
CK4	ty-1/ty-1	398
CK5	ty-1/ty-1	398
CK6	ty-1/ty-1	398
CK7	ty-1/ty-1	398

2.2 利用 CAPS 标记对国内自交系材料进行抗病基因检测

由图 2 可知,13 份材料均不存在 TaqI 酶切位点,酶切后仍产生 398 bp 的片段,与感病对照的扩增片段相同,说明这些国内自交系品种均不含 Ty-1 抗病基因,属感病材料(表 3)。

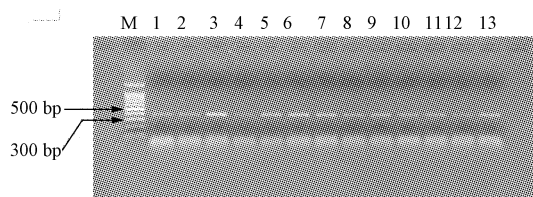


图2 13份未知抗病性国内自交系的 *Taq*I酶切结果

注:M;Marker,1~13;未知抗病性的国内自交系品种。

Fig. 2 The result of 13 unknown resistance of inbred lines products digested by *Taq* I enzyme

Note:M;Marker,1~13;unknown resistant inbred lines.

表3 13份未知抗病性国内自交系的酶切结果及基因型

Table 3 The enzyme digestion and genotype pattern of unknown resistant inbred lines of 13 tomato lines

材料编号 NO. of material	<i>Taq</i> I酶切结果 Digested product by <i>Taq</i> I/bp	基因型 Genotype
1	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
2	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
3	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
4	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
5	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
6	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
7	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
8	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
9	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
10	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
11	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
12	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
13	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1

2.3 利用 CAPS 标记对杂交种进行抗病基因的检测

由图3可知,13份材料经 *Taq*I酶切后,7份材料表现为杂合抗病型,酶切后产生 398、303 和 98 bp 的片段,应是含有 *Ty*-1 基因的抗病品种;3份材料表现为纯合感病基因型,无酶切位点,仍产生 398 bp 的片段,应是不含 *Ty*-1 基因的感病品种;1份材料表现为纯合抗病基因型,酶切后产生 303 和 98 bp 的片段,应是含有 *Ty*-1 基因的抗病品种;2份材料无酶切产物(表4)。

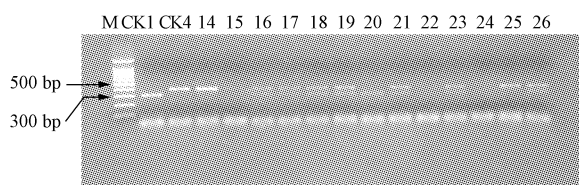


图3 13份杂交种的 *Taq*I酶切结果

注:M;Marker,CK1;抗病对照,CK4;感病对照,14~26;杂交种。

Fig. 3 The result of the hybrid digested by *Taq* I enzyme

Note:M; Marker, CK1; resistant control, CK4; susceptible control, 14~26; hybrid.

表4 13份未知抗病性杂交种的酶切结果及基因型

Table 4 The enzyme digestion and genotype pattern of unknown resistant hybrid of 13 tomato lines

材料编号 NO. of material	<i>Taq</i> I酶切结果 Digested product by <i>Taq</i> I/bp	基因型 Genotype
14	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
15	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
16	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
17	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
18	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
19	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
20	303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>Ty</i> -1
21	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
22	—	—
23	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
24	—	—
25	398	<i>ty</i> -1/ <i>ty</i> -1
26	398,303,98	<i>Ty</i> -1/ <i>ty</i> -1

3 结论与讨论

番茄黄化曲叶病毒病是近年来番茄生产上逐年加重的主要病害之一。目前国内育成的一些抗病品种中很少有抗该病毒的,而国外的一些抗病品种价格又比较高并且栽培特性也不一定适合我国的栽培环境,因此,运用分子标记辅助育种既可提高选择性的效率,同时也加快了育种进程。CAPS 标记作为一类基于 PCR 与限制性酶切技术相结合的 DNA 标记,不仅增加了解释多态性的机会,而且操作简便,结果稳定可靠。该试验找到了一条与抗病基因 *Ty*-1 紧密连锁的 CAPS 标记,利用获得的标记共对 13 份杂交种进行抗病基因的检测,有 8 份杂交种含有 *Ty*-1 抗病基因,3 份材料不含 *Ty*-1 基因。含有 *Ty*-1 基因的抗病品种多来自国外,说明国外抗黄化曲叶病毒病研究处于领先地位。对 13 份国内自交系材料进行检测,均不含 *Ty*-1 抗病基因,说明国内进行番茄抗 TYLCVD 不能直接利用以往的自交系,需要进行改进创新。

TYLCVD 的传毒介体烟粉虱的寄主广泛,毒源植物种类繁多,使得 TYLCV 繁殖速度加快,加速了病害的爆发。许多研究证明,B 型烟粉虱虫口数量增长快、传毒能力强,繁殖世代短,适应能力强,成为近年来烟粉虱爆发、番茄黄化曲叶病毒病流行的主要原因^[11-14]。随着温室效应使气候变暖和烟粉虱适应能力不断增强,番茄黄化曲叶病毒病对作物的为害越来越大。由于发病区保护地蔬菜生产面积大,茬口安排紧凑,为其提供了大量的越冬和繁殖场所。不同地区的番茄黄化曲叶病毒病的变异较大,导致同一个抗性材料在不同地区有不同抗性表现,甚至同一地区不同年份间抗性表现不同。各种实践表明,选育抗病品种是防治 TYLCV 最为有效的方法。

目前,国外在抗番茄黄化曲叶病毒病育种方面取得

了比较显著的成就。但是,所有的抗 TYLCV 的商业杂交种中基本上都是导入了单个抗性基因。这在病害大规模发生时,它们的抗性能力依然有限。因此,培育高抗性品种的策略之一就是多个抗性基因聚合到 1 个品种中,而有关专家已经证明了通过聚合不同抗源的基因可以提高番茄对 TYLCV 的抗性^[15]。现有的研究已表明,同时含有纯合 Ty-1 和 Ty-3 抗性基因的番茄材料有更高更稳定的抗性^[10]。因此,将不同抗源的基因累加到栽培品种中是育种上培育持久抗性品种的有效手段之一^[2]。随着番茄黄化曲叶病的 Ty-1、Ty-2、Ty-3、Ty-4 及 Ty-5 抗性基因的定位及分子标记工作的进行^[8,16-19],育种学家可以利用相关的分子标记更加准确快速地筛选抗原,并结合传统育种将这些抗性基因聚合到一个品种中,从而培育出具有更高、更广、更持久抗性的番茄新品种^[10]。

参考文献

- [1] 叶青静,杨悦俭,王荣青,等. 番茄抗黄化曲叶病育种研究进展[J]. 中国农业科学,2009,42(4):1230-1242.
- [2] 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.
- [3] Pico B, Diezm J, Nuez F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop[J]. The tomato yellow leaf curl virus; a review[J]. Sci Hortic(msterdam), 1996, 67(3-4):151-196.
- [4] 周雪平,崔晓峰,陶小容. 双生病毒——一类值得重视的植物病毒[J]. 植物病理报,2003,33(6):487-492.
- [5] 赵统敏,余文贵,周益军,等. 江苏省番茄黄化曲叶病毒病(TYLCV)的发生与诊断初报[J]. 江苏农业学报,2007,23(6):654-655.
- [6] 何自福,虞皓,毛明杰,等. 中国台湾番茄曲叶病毒侵染引起广东番茄黄化曲叶病[J]. 农业生物技术学报,2007,15(1):119-123.
- [7] 褚云霞,朱为民. 番茄抗黄化曲叶病毒育种研究进展[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(3):563-568.
- [8] Zamir D, Eksteinmicheison I, Zakay Y, et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(2):141-146.
- [9] 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]. 分子植物育种,2008(1):165-169.
- [10] 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 (online), 2011(9):1647-1652.
- [11] 纠敏,周雪平,刘树生. 烟粉虱传播双生病毒研究进展[J]. 昆虫学报, 2006, 49(3):513-520.
- [12] Polston J E, Anderson K. The emergence of whitefly transmitted geminivirus in tomato in the western hemisphere[J]. Plant Dis, 1997, 81(12):1358-1369.
- [13] Rvbiekik P, Pietersen G. Plant virus diseases problems in the developing world[J]. Adv Virus Res, 1999, 53:127-175.
- [14] Saikaia K, Munivappa V. Epidemiology and control of tomato leaf curl virus in south India[J]. Tropical Agr., 1989, 66(4):350-357.
- [15] Vdavski F, Czosnek H, Gazit S, et al. Pyramiding of genes conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus from different wild tomato species[J]. Plant Breeding, 2008, 127:625-631.
- [16] Hanson P M, Green S K, Kuo G. Ty-2 a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato[R]. Tomato Genetic Cooperative Report, 2006, 56:17-18.
- [17] Ji Y F, Schuster D J, Scott J W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curlvirus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato[J]. Mol Breeding, 2007, 20(3):271-284.
- [18] Ji Y F, Scott J W, Schuster D J, et al. Molecular mapping of Ty-4, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2009, 134(2):281-288.
- [19] Anbinder I, Reuveni M, Azari R, et al. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from Solanum peruvianum[J]. Theor Appl Genet, 2009, 119(3):519-530.

CAPS Marker and Detection of Resistant Gene Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease Ty-1 to Tomato

DU Yu-li¹, ZHANG Zi-jun², LI Hai-tao², ZOU Qing-dao²

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2 Institute of Vegetable, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Three resistant homozygous lines (Ty-1/Ty-1) and four homozygous susceptible lines (ty-1/ty-1) were amplified by specific primer, both resistant and susceptible lines produced PCR product about 398 bp, after digestion with enzyme *Taq* I, resistant genotypes and heterozygous resistant genotypes could produce fragment about 303 bp, 98 bp and 398 bp, 303 bp and 98 bp respectively. Susceptible genotypes still presented 398 bp fragment. This marker could distinguish resistant and susceptible lines, was a co-dominant marker tightly linked to Ty-1 gene. 13 hybrids were detected using this marker, and the results showed that 8 hybrids confer Ty-1 resistant gene and 3 hybrids do not confer Ty-1 resistant gene. The marker also were used to detect 13 inbred lines and all of them do not confer Ty-1 gene.

Key words: tomato yellow leaf curl virus disease; Ty-1; molecular marker