

番茄抗病基因 *Sw-5* 和 *Ty-3a* 的多重 PCR 检测体系的建立

金凤媚, 薛俊, 宋建, 王姝, 张越

(天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192)

摘要:以含有斑萎病毒和黄化曲叶病毒抗病基因和感病基因的番茄为试材,采用多重 PCR 方法,建立番茄抗斑萎病毒 *Sw-5* 和抗番茄黄化曲叶病毒的 *Ty-3a* 基因同时扩增的体系,以期番茄分子标记抗病育种提供更省时、省力、经济的方法。结果表明:多重 PCR 扩增的特异性片段与单引物扩增片段完全一致,与 *Sw-5* 基因紧密连锁的 SCAR 标记,在抗病基因型中可扩增出 574 bp 的条带,感病基因型中扩增出 464 bp 的条带;与 *Ty-3a* 基因紧密连锁的 SCAR 标记,在抗病基因型中可扩增出 630 bp 的条带,感病基因型中扩增出 320 bp 的条带,多重 PCR 体系可在同一 PCR 反应体系中对 2 个抗病基因进行筛选鉴定及苗期早期辅助选育。

关键词:番茄斑萎病毒(TSWV);番茄黄化曲叶病毒;*Sw-5*; *Ty-3a*;多重 PCR

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)11-0115-04

番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)自 1919 年在澳大利亚被报道以来^[1],现已遍及世界大部分国家和地区^[2],并已经成为继番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)之后危害番茄生产的主要病害。目前,已发现的抗 TSWV 病的基因主要有 6 个,分别为 *Sxal*、*Subl*、*sx2*、*sx3*、*sx4* 和 *Sw-5*,其中 *Sxal*、*Subl*、*sx2*、*sx3*、*sx4* 均为分离物专化型,抗性很快被克服,而且对其它番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)病毒无抗性^[3],*Sw-5* 基因对 TSWV 不同小种具有很高的广谱抗性,因而在番茄抗病育种中,*Sw-5* 尤其受到重视^[4]。

为了将 *Sw-5* 高效率地应用于番茄育种中,众多研究者开发了该基因的分子标记,其中以 DI-ANESE 等^[5]的工作最为有效,利用 *Sw-5* 序列开发了一个共显性 SCAR 标记 Sw-5-2,利用该标记筛选的结果稳定性好,为番茄斑萎病毒抗病基因 *Sw-5-2* 的分子标记辅助育种奠定基础。

番茄生产上经常发生的另一种病害是由番茄黄化曲叶病毒引起的。从 20 世纪 90 年代至今,人们已经开发了 6 个与抗 TYLCV 基因(*Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-3a*、*Ty-4*、*Ty-5*)紧密连锁的分子标记^[6-7]。目前生产上利用较多的抗性基因是 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-3a*。*Ty-1* 是最早发现的抗性基因,属于不完全显性,通常表现为耐病。*Ty-2* 属于显性基因,但抗性表现出地区差异。*Ty-3* 和 *Ty-3a* 在抗性遗传中呈加性显性效应,对不同的 *Ty* 病毒均具较高的抗性,成为目前抗 *Ty* 品种选育的主要来源。JI 等^[8]建立了 SCAR 标记可以鉴定 *Ty-3* 和 *Ty-3a*。

在育种中,*Sw-5* 和 *Ty-3a* 被广泛认为是主效基因,为了提高番茄对 TSWV 和 TYLCV 2 种病害的抗性,育种工作者可同时将这 2 个基因通过有性杂交的方式导入某个品种。而在杂交后代群体中选择出 2 个基因合一的,符合育种目标的个体是一个耗时、耗力的过程。由于分子标记受时间、环境限制较少,所以应用分子标记对抗病基因进行辅助选择,可以大幅度提高选择的准确性和效率,缩短育种年限。

目前已开发出分别检测这 2 个基因的分子标记,能够区分抗病、感病材料。未见在一个反应体系中对 *Sw-5* 和 *Ty-3a* 标记进行多重 PCR 的报道。该试验探索通过多重 PCR 在同一个反应中完成 2

第一作者简介:金凤媚(1977-),女,天津宝坻人,硕士,副研究员,现主要从事番茄的分子育种等研究工作。E-mail:jinfm414@163.com.

基金项目:天津市种业科技重大专项资助项目(16ZXZYNC00070);国家星火计划资助项目(2015GA610)。

收稿日期:2017-02-09

个标记的扩增,以期为利用分子标记进行番茄抗病育种提供一种更加省时、省力、经济有效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试‘LA3667’番茄品种含有纯合抗斑萎病毒基因 *Sw-5*,购自美国番茄遗传研究中心;‘205-1’、‘205-2’为‘LA3667’×‘中杂 106’的 F_1 代,含有 *Sw-5* 杂合基因;‘206’、‘207’、‘208’为天津市农业生物技术研究中心自育的材料;含有 *Ty-3a* 的材料为“齐达利”(先正达(Syngenta)公司)的 F_2 代单株,代号为

表 1

研究所用番茄材料

Table 1

Materials used in the study

编号 No.	材料 Material	<i>Ty-3a</i>		<i>Sw-5</i>	
		基因型 Genotype	扩增产物 Product length/bp	基因型 Genotype	扩增产物 Product length/bp
1	‘LA3667’	<i>ty-3a/ty-3a</i>	320	<i>Sw-5/Sw-5</i>	574
2	‘301’	<i>Ty-3a/Ty-3a</i>	630	<i>sw-5/sw-5</i>	464
3	‘302’	<i>Ty-3a/ty-3a</i>	630/320	<i>sw-5/sw-5</i>	464
4	‘205-1’×‘205-2’	<i>ty-3a/ty-3a</i>	320	<i>Sw-5/sw-5</i>	574/464
5	‘206’	<i>Ty-3a/Ty-3a</i>	630	<i>sw-5/sw-5</i>	464
6	‘207’	<i>Ty-3a/ty-3a</i>	630/320	<i>sw-5/sw-5</i>	464
7	‘208’	<i>Ty-3a/ty-3a</i>	630/320	<i>Sw-5/sw-5</i>	574/464
8	‘401’	<i>ty-3a/ty-3a</i>	320	<i>sw-5/sw-5</i>	464

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 将供试番茄材料播种于穴盘中,到三叶一心期时,取番茄植株的叶片,按照王关林^[9]的 CTAB 法提取总 DNA。

1.2.2 引物的设计与合成 参考 DIANESE 等^[5]设计的引物 *Sw-5-2 R/F* 检测 *Sw-5* 基因;参考 JI 等^[8]设计的引物 *SCAR3F/R*,用于扩增 *Ty-3a* 分子标记片段。引物相关信息见表 2,引物均由大连宝生物公司合成。

表 2 PCR 所用引物信息

Table 2 Information of primers for PCR

名称 Name	序列 Sequence(5'-3')	大小 Length/bp
Sw-5-2R	AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT	574 (抗)
Sw-5-2F	TTCCGCATCAGCCAATAGTGT	464/510(感)
SCAR3F	GGTAGTGGAAATGATGCTGCTC	630(抗)
SCAR3R	GCTCTGCCATTGTCCCATATATAACC	320(感)

1.2.3 单管 PCR 扩增 PCR 总体积为 25 μL ,其中包括 10×反应缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μL ,dNTP 混合物(2.5 mmol·L⁻¹)0.5 μL ,上游引物(10 μmol ·L⁻¹)2.5 μL ,下游引物(10 μmol ·L⁻¹)2.5 μL ,模板 DNA(50 ng· μL^{-1})1.0 μL ,DNA 聚合酶(5 U· μL^{-1})0.5 μL ,其余用水补足。用于扩增含有 *Sw-5* 基因的 PCR 反应程序:94℃变性 2 min;94℃30 s,50℃

‘301’、‘302’;不含有这 2 个抗性基因的品种为‘中杂 106’(中国农科院蔬菜花卉研究所)代号 401。各材料的基因型及扩增产物大小见表 1,*Ty-3a/Ty-3a* 为抗性纯合基因型,能扩增出 630 bp 的条带;*Ty-3a/ty-3a* 为抗性杂合基因型,能扩增出 630 bp 和 320 bp 的条带;*ty-3a/ty-3a* 为抗感病基因型,能扩增出 320 bp 的条带;*Sw-5/Sw-5* 能扩增出 574 bp 的条带;*Sw-5/sw-5* 为抗性杂合基因型,能扩增出 574 bp 和 464 bp 的条带或 574 bp 和 510 bp 的条带;*sw-5/sw-5* 为感病基因型,能扩增出 464 bp 或 510 bp 的条带。

30 s,72℃1.5 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。用于扩增含有 *Ty-3a* 基因的 PCR 反应程序:94℃变性 2 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃1.5 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳 30 min 后,利用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。

1.2.4 多重 PCR 扩增 影响多重 PCR 扩增效果的最主要的因素就是引物的配比。该试验设计不同的引物配比(表 3),其它反应条件一致。在 25 μL 反应体系中,包含 10×反应缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μL ,dNTP 混合物(2.5 mmol·L⁻¹)0.5 μL ,引物 *Sw-5-2F/R*(10 μmol ·L⁻¹)和 *SCAR3F/R* 引物(10 μmol ·L⁻¹)按照不同配比添加,模板 DNA(50 ng· μL^{-1})1.0 μL ,DNA 聚合酶(5 U· μL^{-1})0.5 μL ,其余用水补足。反应程序:94℃变性 2 min;94℃30 s,53℃30 s,72℃1.5 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳 30 min 后,利用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。

表 3 引物配比

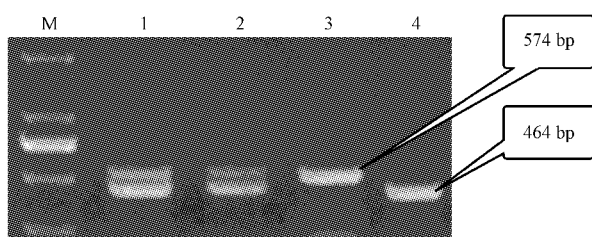
Table 3 Primers ratio

编号 No.	引物 Primer	比例 Ratio/(μL · μL^{-1})
1	Sw-5-2F/R;SCAR3F/R	1:1
2	Sw-5-2F/R;SCAR3F/R	2:1
3	Sw-5-2F/R;SCAR3F/R	3:1
4	Sw-5-2F/R;SCAR3F/R	4:1

2 结果与分析

2.1 *Sw-5* 基因的扩增

对含有 *Sw-5* 基因的材料‘LA3667’和不含有该基因的材料‘401’以及二者杂交的 F_1 代的 2 个单株‘205-1’‘205-2’,利用 Sw-5-2F/R 进行单引物 PCR 扩增。‘LA3667’扩增出 574 bp 的条带,‘205-1’‘205-2’扩增出 574/464 bp 的条带,而‘401’只扩增出一条 464 bp 条带。表明‘LA3667’的基因型为 *Sw-5/Sw-5*,‘205-1’‘205-2’为含有杂合抗性 *Sw-5/sw-5* 基因型的材料,而‘401’无 *Sw-5* 基因(图 1)。



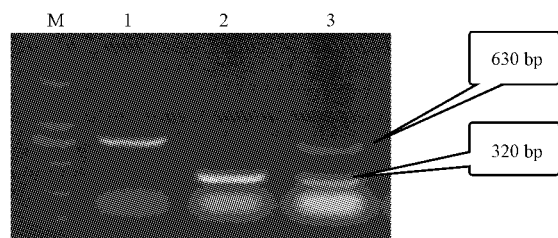
注:M, DL 2 000 Marker;1. ‘205-1’;2. ‘205-2’;3. ‘LA3667’;4. ‘401’。

图 1 Sw-5-2F/R 引物扩增结果

Fig. 1 Products amplified by Sw-5-2F/R

2.2 *Ty-3a* 基因的扩增

利用 SCAR3F/R 引物进行 PCR 扩增,由图 2 可知,‘301’扩增出了 630 bp 的条带,‘401’扩增出了 320 bp 的条带;‘302’扩增出了 630 bp 和 320 bp 2 条带。表明‘301’含有 *Ty-3a* 抗性纯合基因,‘302’含有 *Ty-3a* 抗性杂合基因,‘401’不含抗病基因 *Ty-3a*。



注:M, DL 2 000 Marker;1. ‘301’;2. ‘401’;3. ‘302’。

图 2 SCAR3F/R 引物扩增结果

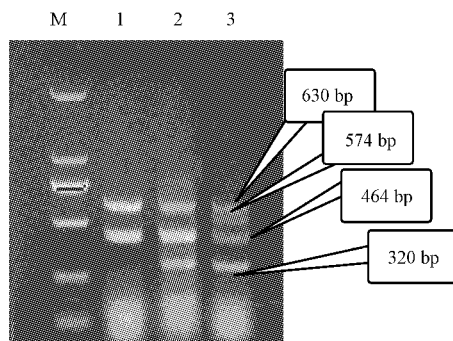
Fig. 2 The products amplified by SCAR3F/R

2.3 多重 PCR 扩增结果

对 SCAR3F/R 和 Sw-5-2F/R 2 对引物进行了引物配比、dNTP 浓度调整,最终确定体系为:10×反应缓冲液(含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTP 混合物(2.5 mmol·L⁻¹) 0.5 μ L, Sw-5-2F/R 引物(10 μ mol·L⁻¹)和 SCAR3F/R 引物(10 μ mol·L⁻¹)

的体积比为 1 : 1,即均为 1 μ L,模板 DNA(50 ng· μ L⁻¹)1.0 μ L, DNA 聚合酶(5 U· μ L⁻¹)0.5 μ L,其余用水补足。反应程序:94℃变性 2 min;94℃30 s,53℃30 s,72℃1.5 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。

以含有双基因的番茄资源‘206’‘207’‘208’为试验材料,进行多重 PCR 扩增,由图 3 可知,‘206’为含有抗性纯合的 *Ty-3a* 且不含有 *Sw-5* 基因,其基因型为 *sw-5/sw-5*, *Ty-3a/Ty-3a*,所以扩增出了 630 bp 和 464 bp 2 个特异片段;‘207’为含有抗性杂合的 *Ty-3a* 且不含有 *Sw-5* 基因,其基因型为 *sw-5/sw-5*, *Ty-3a/ty-3a*,扩增出了 630、320、464 bp 3 个特异性片段;‘208’为含有抗性杂合的 *Ty-3a* 和 *Sw-5* 基因,其基因型为 *Sw-5/sw-5*, *Ty-3a/ty-3a*,扩增出了 630、320、574、464 bp 4 个特异性片段。结果与预期大小一致,证明该体系可同时对这 4 个片段进行扩增。可以看出无论是杂合型还是纯合型的材料,均可以扩增出在单引物扩增时的所有片段,经重复试验,结果稳定。因此,成功地建立了可以同时对抗番茄斑萎病毒基因 *Sw-5* 和抗番茄黄化曲叶病毒基因 *Ty-3a* 稳定的多重 PCR 检测体系。



注:M, DL 2 000 Marker;1. ‘206’;2. ‘207’;3. ‘208’。

图 3 SCAR3F/R 和 Sw-5-2F/R 的多重 PCR 扩增结果

Fig. 3 Products of multiplex PCR by SCAR3F/R and Sw-5-2F/R

3 讨论

分子标记辅助育种技术,给农作物育种特别是蔬菜育种提供了强有力的技术支撑,并极大地加快了育种的进度。多重 PCR 检测技术是分子标记辅助育种技术的其中一种,因其简便易行而受到很多研究者的青睐,已在多种抗性基因的检测中得到了应用^[10-12]。多重 PCR 技术具有单个 PCR 反应无可比拟的优越性,消耗时间少,成本低,一次反应可以检测多个基因型,减少了工作量。

Sw-5 基因为共显性基因,抗病材料能扩增出 574 bp 的特异条带,而不含该基因的感病材料则扩增出 510 bp 或 464 bp 的条带^[5],在该研究所用的材料中,感病材料均扩增出 464 bp 的条带,而无 510 bp 条带被扩增。这可能是由于课题组所保存并转育的材料主要来源于契斯曼尼番茄,契斯曼尼番茄在 2 个特征区域均缺失,所以扩增出的片段更小。

番茄斑萎病毒最早发生在我国云南等地^[13-14],近年来随着气候的异常变化,该病在我国北方亦开始为害且势头迅猛^[15]。番茄黄化曲叶病毒是农民闻之色变的番茄生产上的主要病毒病。这 2 种病害均具有很强的传染性,且存在有复合侵染的现象。所以生产上亟需抗这 2 种病毒的番茄新品种。单一的 PCR 检测技术已满足不了育种者对抗病基因快速、灵敏、经济进行检测的需求。因此,建立同时对 2 种抗病基因进行检测的技术体系尤为重要。该研究利用前人的研究结果将 2 种抗病基因在同一管中进行同时扩增,对该体系的反应条件进行了优化,通过调整退火温度、 Mg^{2+} 浓度和 2 对引物的配比,使多重 PCR 获得了很好检测效果,大大节省了时间和检测成本,为番茄的抗病育种提供了切实可行的分子标记检测方法。

参考文献

- [1] 唐前君,孙书娥,刘勇,等.番茄斑萎病毒核衣壳蛋白基因的克隆和分析[J].植物保护,2010,36(5):65-69.
- [2] SOLER S J, CELBOLLE-CORNEJO J, NUEZ F. Control of disease induced by *Tospoviruses* in tomato; An update of the genetic approach[J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2003, 42(3): 207-219.

- [3] JAHN M, PARAN I, HOFFMANN K, et al. Genetic mapping of the TWV locus for resistance to the *Tospovirus* tomato spotted wilt virus in *Capsicum* spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato[J]. *The American Phytopathological Society*, 2000, 13(6): 673-682.
- [4] 邱树亮,王孝宣,杜永臣,等.番茄斑萎病毒 TSWV 的鉴定及抗病种质的筛选[J].园艺学报,2012,39(6):1107-1114.
- [5] DIANESE E C, de FONSECA M, GOLDBACH R, et al. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions[J]. *Molecular Breeding*, 2010, 25(1): 133-142.
- [6] 杨晓慧,国艳梅,王孝宣,等.番茄抗黄化曲叶病基因与基因工程研究进展[J].园艺学报,2012,39(11):2283-2290.
- [7] 胡霞,王蓉,李菲菲,等.番茄抗 TYLCV 基因新标记的开发及其在多抗聚合选择中的应用[J].中国蔬菜,2014(10):18-23.
- [8] JI Y, SALUS M S, van BETTERAY B, et al. Co-dominant SCAR markers for detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* loci from *Solanum chilense* at 25cM of chromosome 6 of tomato[J]. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 2007, 57: 25-28.
- [9] 王关林.植物基因工程[M].2版.北京:科学出版社,2002.
- [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] 李君明,宋燕,陈丽静,等.利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 *Tm22* 和 *Mi* 基因[J].农业生物技术学报,2005,13(6):698-702.
- [12] 刘超勤,李景富,许向阳,等.多重 PCR 技术鉴定番茄 *Ty-1*、*Ty-2*、*Mi* 和 *Cf-5* 基因研究[J].北方园艺,2013(9):119-23.
- [13] 丁铭,张丽珍,方琦,等.侵染马铃薯的一个 *Tospovirus* 混合分离物的鉴定、纯化及多抗血清制备[J].西南农业学报,2004,17(增刊):160-162.
- [14] 饶雪琴,刘勇,李媛媛,等.广东番茄上检测到 *Tospovirus* 病毒[J].植物病理学报,2010,40(4):430-432.
- [15] 李飞,吴青均,徐宝云,等.北京地区发现番茄斑萎病毒[J].植物保护,2012,38(6):186-188.

Identification of Resistance Gene *Sw-5* and *Ty-3a* by Multiplex PCR in Tomato

JIN Fengmei, XUE Jun, SONG Jian, WANG Shu, ZHANG Yue

(Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300192)

Abstract: Tomatoes with spotted virus resistant and susceptible genotypes and yellow leaf curl virus resistant and susceptible genotypes were used as test materials. The multiplex PCR system was developed to detect the *Sw-5* and *Ty-3a* gene simultaneously in order to provide a more time-saving, labor-saving and cost-effective method for tomato resistance breeding. The results showed that the amplified fragments by multiplex PCR were identical with single-primer PCR. A 574 bp band was amplified in the resistant genotype, and a 464 bp band was amplified in the susceptible genotype by the SCAR marker of *Sw-5* gene. A 630 bp band could be amplified in the resistant genotype and a 320 bp band was amplified in the susceptible genotype by the SCAR marker of *Ty-3a* gene. The multiplex PCR system could amplify two genes in one reaction. It could be useful marker assisted selection during seedling stage in tomato and efficiently speed up breeding procedure.

Keywords: tomato spotted wilt virus (TSWV); tomato yellow leaf curl virus; *Sw-5* gene; *Ty-3a* gene; multiplex PCR