

李亚茹, 王银磊, 赵丽萍, 等. 番茄 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因多重 PCR 体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 869-873.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.024

## 番茄 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因多重 PCR 体系的建立

李亚茹<sup>1,2</sup>, 王银磊<sup>2</sup>, 赵丽萍<sup>2</sup>, 杨玛丽<sup>2</sup>, 姜 静<sup>1,2</sup>, 赵统敏<sup>2</sup>, 余文贵<sup>1,2</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了用分子标记辅助选择法进行番茄育种时能快速鉴定抗番茄黄化曲叶病毒病基因 *ty-5* 和抗根结线虫病基因 *Mi-1*, 利用番茄材料 1227(含有 *ty-5* 基因)、VFNT(含有 *Mi-1* 基因)和杂交获得的 F<sub>2</sub> 分离群体, 通过分析扩增片段多态性差异, 重新设计分子标记, 建立了 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因的多重 PCR 反应体系。通过对这 2 个基因的分离群体进行基因型和抗病性鉴定, 证实标记检测结果与田间接种鉴定结果吻合率为 95.0%, 可以将该 PCR 体系用于对这 2 个基因的同时鉴定。

**关键词:** 番茄; 番茄黄化曲叶病毒; 根结线虫; 抗性基因; 多重 PCR

**中图分类号:** S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0869-05

## Identification of *ty-5* gene and *Mi-1* gene by multiplex PCR in tomato

LI Ya-ru<sup>1,2</sup>, WANG Yin-lei<sup>2</sup>, ZHAO Li-ping<sup>2</sup>, YANG Ma-li<sup>2</sup>, JIANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHAO Tong-min<sup>2</sup>,  
YU Wen-gui<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To realize the rapid identification of gene *ty-5* resistant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and gene *Mi-1* resistant to root-knot nematode (RKN) disease for tomato breeding through marker-assisted selection, a multiplex PCR reaction system was developed with tomato lines 1227 (with *ty-5* gene), VFNT (with *Mi-1* gene) and segregation population F<sub>2</sub> by analyzing the polymorphism of amplified fragment with redesigned molecular markers. The identification of the genotype and disease resistance in F<sub>2</sub> population by multiplex PCR detection was 95% similar to that by field inoculation evaluation. The multiplex PCR system developed in this study is capable of simultaneous identification of *ty-5* and *Mi-1* in tomato.

**Key words:** tomato; tomato yellow leaf curl virus; root-knot nematode; resistance gene; multiplex PCR

收稿日期: 2015-11-26

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20140739); 江苏省农业自主创新基金项目[CX(14)5012]; 江苏省农业科学院基本科研业务专项[ZX(15)2003, ZX(15)4022]; 国家自然科学基金青年基金项目(31401884)

作者简介: 李亚茹(1990-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 从事蔬菜遗传育种研究。(E-mail) yrlisecret@163.com

通讯作者: 余文贵, (E-mail) wenguiyu@jass.ac.cn; 赵统敏, (E-mail) tmzhaomail@163.com

番茄(*Solanum lycopersicum*)属于茄科, 番茄属, 由于其营养丰富, 口味独特, 已成为世界性的蔬菜作物之一<sup>[1]</sup>。目前中国的番茄产量仅次于美国和意大利, 成为世界第三大生产国<sup>[2]</sup>。近年来, 随着番茄栽培面积的增加, 诸多病害制约了番茄产业的发展, 其中, 番茄黄化曲叶病毒病<sup>[3-4]</sup>和根结线虫病<sup>[5]</sup>是两种主要的病害。番茄黄化曲叶病毒病是番茄生产中的一种毁灭性病害, 主要通过携带番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)的烟

粉虱进行传播。Cohen 和 Harpaz 于 1964 年在爱尔兰岛首次发现该病,此后该病在摩洛哥、土耳其、日本、约旦、泰国等国家都有大面积的发生,目前已成为热带和亚热带地区番茄的重要病害<sup>[6-10]</sup>。在很多番茄主产区,TYLCV 已经成为制约番茄产量的主要限制因素。TYLCV 在中国发生之初,中国的番茄品种中均无抗源,通过对国外抗源材料的引进、筛选和鉴定,选育获得了适合中国栽培环境的抗 TYLCV 品种。目前栽培品种中的抗源基因主要为 *Ty-1*、*Ty-2* 和 *Ty-3*,但是长期使用这些基因存在抗性被变异病毒突破的风险。*ty-5* 基因发现于番茄材料 TY172 中,位于番茄第 4 号染色体,与 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences) 标记 *SINACI* 连锁<sup>[11]</sup>。Hutton 等利用 *SINACI* 标记从番茄材料 Ty-king 中得到一个在 *Ty-5* 附近隐性遗传的抗性基因 *ty-5*<sup>[12]</sup>。2013 年,江苏省农业科学院蔬菜研究所引进具有该基因的番茄材料,经过抗性接种鉴定,证实 *ty-5* 基因对 TYLCV 抗性较高,具有很高的应用价值<sup>[13]</sup>。

根结线虫病是一种危害严重的病害,主要发生在热带和温带地区。其寄主范围非常广泛,超过 5 500 种作物<sup>[14]</sup>,其中包括单子叶植物、双子叶植物、草本植物和木本植物<sup>[15-16]</sup>。番茄作为一种重要的蔬菜作物,也是根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 的重要寄主之一。番茄对根结线虫病的抗性最早是在秘鲁番茄 (*Solanum peruvianum*) PI128657 中发现的,通过遗传分析,确定 PI128657 中的根结线虫病抗性基因为单基因显性遗传控制,将其命名为 *Mi* 基因,也就是现在所说的 *Mi-1* 基因<sup>[17]</sup>。通过胚挽救的方法,将秘鲁番茄中的根结线虫抗性基因 *Mi-1* 导入到栽培番茄中,极大地改善了番茄对根结线虫的抗性。通过基因定位,将该基因定位于番茄 6 号染色体短臂端,CAPS 标记 *REX-1* 与该基因连锁。*Mi-1* 基因

是目前被鉴定和利用的有效抗性基因,该抗性基因具有广谱性,能有效抵抗除北方根结线虫以外的其他 3 种主要根结线虫<sup>[18]</sup>。

本试验利用分子标记对上述 2 个基因在同一个 PCR 体系中进行筛选,旨在建立同时鉴定抗番茄黄化曲叶病基因和抗根结线虫病基因的多重 PCR 技术,为番茄抗性育种分子标记相关研究提供一种更加省时、省力、经济有效的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1227 是含 *ty-5* 基因的高度纯合自交系,从亚洲蔬菜研究发展中心 (AVRDC) 引进。VFNT 是含 *Mi-1* 基因的高度纯合自交系,从美国番茄遗传资源中心 (TGRC) 引进。VFNT×1227 是杂合含 *ty-5* 基因和 *Mi-1* 基因的  $F_1$  代,V1~V20 是上述  $F_1$  代自交后获得的 20 株  $F_2$  单株,MoneyMaker 是不含 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因的高度纯合自交系,以上材料均由江苏省农业科学院蔬菜研究所番茄课题组提供。

### 1.2 引物合成

番茄抗番茄黄化曲叶病毒病基因 *ty-5* 的 CAPS 标记 *SINACI*<sup>[19]</sup>,因存在多个 *TaqI* 酶切位点,试验结果不理想,我们根据其测序结果重新设计引物,对其进行了优化,将该引物命名为 NACI-new。番茄抗根结线虫病基因 *Mi-1* 的 CAPS 标记引物参照 Williamson 等设计<sup>[20]</sup>。因番茄抗根结线虫病 *Mi-1* 基因的 CAPS 标记 *REX-1* 的酶切片段与 NACI-new 酶切片段重合,根据测序结果我们重新设计引物,将该引物命名为 Rex-1-new。不同基因型材料的特异性引物序列及其扩增片段见表 1,引物均由上海生物工程技术公司合成。

表 1 引物序列和标记扩增的特异性片段

Table 1 Primer sequence and specific fragments amplified with the primer

引物名称	序列 (5'→3')	检测基因	引物类型	限制酶	扩增产物长度 (bp)	
					R-band	S-band
NACI-new	F: TTGGATCTGTTCGCCATG	<i>ty-5</i>	CAPS	<i>Taq I</i>	206	161
	R: TTCCTGCTGCTCGGTTCC					
Rex-1-new	F: TCGGAGCCTTGCTCTGAATT	<i>Mi-1</i>	CAPS	<i>Taq I</i>	260	322
	R: GCCAGAGATGATTCGTGAGA					

### 1.3 试剂

2×*Taq* Master Mix DNA 聚合酶 购于 Vazyme 公司,*Taq* I 购于 Thermo 生物公司,100 bp DNA Ladder (Dye Plus) 购于 TaKaRa 公司。

### 1.4 试验方法

1.4.1 根结线虫接种和 TYLCV 接种 番茄长至 2~3 片真叶时,采用灌根法接种根结线虫到番茄幼苗。长至 4~5 片真叶时,采用烟粉虱田间接种方法接种 TYLCV 到番茄幼苗。

1.4.2 单基因 PCR 扩增及酶切体系 用 CTAB 法提取番茄 DNA。PCR 体系为 20 μl,包括 DNA 模板 2 μl(50 ng),上下游引物各 1 μl,2×*Taq* Master Mix DNA 聚合酶 10 μl, ddH<sub>2</sub>O 6 μl。检测 *ty-5* 基因的 PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,56.5 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,37 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。检测 *Mi-1* 基因的 PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增产物在 -20 ℃ 保存。酶切体系为扩增产物 10.0 μl 加入 10 U 的 *Taq* I 酶 0.5 μl, Buffer 1.5 μl,终体积加超纯水至 15.0 μl,65 ℃ 保温 4 h。PCR 产物及酶切产物于 2.0% 琼脂糖凝胶在电压 80~100 V 条件下电泳 45 min,以 100 bp DNA Marker 为标准分子量,用凝胶成像仪观察。

1.4.3 多基因 PCR 扩增及酶切体系 双重 PCR 体系为 20 μl,包括 DNA 模板各 2.0 μl(50 ng),NA-CI-newR/F 各 0.8 μl,REX-1R/F 各 0.5 μl,2×*Taq* Master Mix DNA 聚合酶 10.0 μl,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20.0 μl。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,54 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,37 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增产物在 -20 ℃ 保存。酶切体系、酶切方法和电泳方法与单基因检测方法相同。

1.4.4 多重 PCR 技术鉴定验证 F<sub>2</sub> 代基因型 利用多重 PCR 技术对已经过田间接种鉴定的 20 份 F<sub>2</sub> 代(V1~V20)番茄材料进行基因型鉴定,比较鉴定结果。

## 2 结果与分析

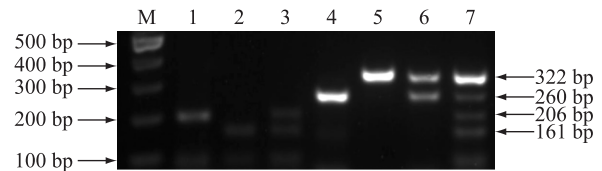
### 2.1 检测引物多态性分析及多重 PCR 体系的建立

经 NACI-new 正、反引物扩增并经 *Taq* I 酶切发现,抗病材料和品种存在多个酶切位点。抗病纯合基因型材料 1227 产生 206 bp 的特异性片段,不含

*ty-5* 基因的感病材料 Moneymaker 扩增出 161 bp 的特异性片段,抗病杂合基因型品种 VFNT×1227 产生 206 bp 和 161 bp 的特异性片段(图 1)。

经 REX-1-new 正、反引物扩增并经 *Taq* I 酶切发现,抗病材料和品种存在多个酶切位点。抗病纯合基因型材料 VFNT 产生 322 bp 的特异性片段,不含 *Mi-1* 基因的感病材料 Moneymaker 扩增出 322 bp 的特异性片段,抗病杂合基因型品种 VFNT×1227 产生 322 bp 和 260 bp 的特异性片段(图 1)。

经 NACI-new 和 REX-1-new 正、反引物扩增并经 *Taq* I 酶切后,VFNT×1227 F<sub>1</sub> 的 DNA 产生 322 bp、260 bp、206 bp 和 161 bp 的特异性片段(图 1)。因此,同时扩增 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因的多重 PCR 体系可行。



M:100 bp DNA Ladder marker;1、2 和 3:引物 NACI-new 分别扩增 1227、Moneymaker 和 VFNT×1227 F<sub>1</sub>;4、5 和 6:引物 REX-1-new 分别扩增 VFNT、Moneymaker 和 VFNT×1227 F<sub>1</sub>;7:引物 NACI-new 和 REX-1-new 同时扩增 VFNT×1227 F<sub>1</sub>。

图 1 *ty-5* 基因和 *Mi-1* 基因的 PCR 扩增产物 *Taq* I 酶切结果

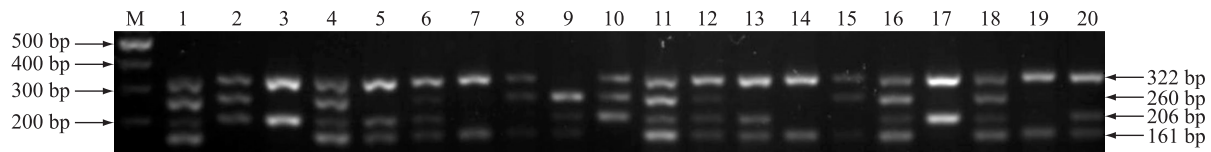
Fig.1 The PCR products of *ty-5* and *Mi-1* genes digested by *Taq* I enzyme

### 2.2 多重 PCR 对 20 份番茄材料的抗性鉴定

利用多重 PCR 技术对 20 份 F<sub>2</sub> 代番茄材料进行 *ty-5* 基因和 *Mi-1* 基因检测。结果显示:1、4、6、11、12、16、18 号 F<sub>2</sub> 单株含有杂合的 *ty-5* 基因和杂合的 *Mi-1* 基因;2 和 10 号含有纯合的 *ty-5* 基因和杂合的 *Mi-1* 基因;3 和 17 号含有纯合的 *ty-5* 基因,不含 *Mi-1* 基因;5、13 和 20 号含有杂合的 *ty-5* 基因,不含 *Mi-1* 基因;7、14 和 19 号两个基因均不含有;8 和 15 号不含 *ty-5* 基因,含有杂合的 *Mi-1* 基因;9 号含有杂合的 *ty-5* 基因和纯合的 *Mi-1* 基因(图 2)。

### 2.3 田间接种抗性鉴定

田间接种鉴定结果(表 2)显示,经多重 PCR 技术鉴定,含有纯合 *ty-5* 基因的材料在田间都表现出对 TYLCV 具有抗性(R),不含 *ty-5* 基因和含有杂合 *ty-5* 基因的材料表现出感病(S),但 V12 含有杂合 *ty-5* 基因,却表现为抗病(R);含有 *Mi-1* 基因的材



M: 100 bp DNA Ladder marker; 1~20: V1~V20。

图2 多重PCR对F<sub>2</sub>材料的扩增结果

Fig.2 Amplification of F<sub>2</sub> by multiplex PCR

料都表现出对根结线虫病具有抗性(R),不含 *Mi-1* 基因的材料表现出感病(S)。

表2 田间接种鉴定结果

Table 2 Identification of resistance in field infection

植株编号	番茄黄化 曲叶病毒 病抗感性	根结线虫 病抗感性	植株 编号	番茄黄化 曲叶病毒 病抗感性	根结线虫 病抗感性
V1	S	R	V11	S	R
V2	R	R	V12	R	R
V3	R	S	V13	S	S
V4	S	R	V14	S	S
V5	S	S	V15	S	R
V6	S	R	V16	S	R
V7	S	S	V17	R	S
V8	S	R	V18	S	R
V9	S	R	V19	S	S
V10	R	R	V20	S	S

R:抗病;S:感病。

### 3 讨论

多重PCR是在一个反应体系中同时扩增多个目的片段的PCR技术,与普通PCR相比具有高特异性、高灵敏度、高效率、低成本的特点,一经提出便得到众多研究者的青睐<sup>[20]</sup>。该技术在植物种质纯度和属性鉴定、转基因植物鉴定、植物病害检测、植物抗病基因检测等方面应用广泛。CAPS是酶切扩增多态性序列标记技术,主要对PCR扩增的DNA片段进行限制性酶切分析<sup>[21]</sup>,具有共显性、位点特异性、操作简单和成本低等优点,广泛应用于植物基因分型、定位、克隆、分子鉴定<sup>[22]</sup>。本试验重新设计了两个抗病和抗虫基因标记引物。用于扩增 *ty-5* 基因的标记 *NACI-new*,与 *SINACI* 相比,酶切位点减少,反应体系稳定性更高;用于扩增 *Mi-1* 基因的标记 *REX-1-new*,与 *REX-1* 相比,在建立多重PCR反

应体系时,不会与 *NACI-new* 扩增标记重叠,可用于建立多重PCR扩增体系。

番茄根结线虫病和番茄黄化曲叶病是2种世界性病害,本试验通过对 *Taq I* 酶含量、上下游引物浓度、退火温度、PCR扩增循环数等条件进行摸索,最终确定了最优体系,建立了同时扩增 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因的多重PCR技术,酶切结果与单引物酶切结果完全一致。用该体系对20份番茄材料进行基因型鉴定,鉴定结果与田间接种鉴定结果吻合率为95.0%。其中根结线虫病的分子鉴定与田间接种鉴定结果能够完全吻合。材料V12多重PCR鉴定结果为含有杂合 *ty-5* 基因,但田间接种鉴定结果为抗黄化曲叶病。原因可能为 *NACI-new* 标记基因虽然与 *ty-5* 基因连锁,但与该基因还有一定的距离,也可能存在抗番茄黄化曲叶病毒病的其他微效基因;此外,烟粉虱对番茄具有选择性,取食习性不同可能导致鉴定结果不完全准确。综上所述,本试验建立了同时检测 *ty-5* 和 *Mi-1* 基因的多重PCR体系,与单个引物PCR扩增相比,检测效率高,检测成本低,可应用于抗番茄黄化曲叶病毒病、抗番茄根结线虫病的聚合育种工作中。

### 参考文献:

- [1] 李敏. 番茄抗花叶病毒(ToMV)的鉴定及其类似序列分离[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [2] 姚金晓. 番茄抗黄化曲叶病毒病基因的分子标记研究[D]. 金华:浙江师范大学,2010.
- [3] 裴华丽,刘永光,乔宁,等. 番茄黄化曲叶病毒 *Rep* 基因植物表达载体的构建及对番茄的遗传转化[J]. 江苏农业科学, 2015,43(2): 41-45.
- [4] 黄狮,刁敏,汪伦记,等. 洛阳地区番茄黄化曲叶病的病原鉴定及防治策略[J]. 江苏农业科学,2014,42(11): 153-155
- [5] 王银磊,赵统敏,杨文才,等. 温度对番茄根结线虫抗性相关基因表达的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(6): 1417-1422.
- [6] TAHIRI A,SEKKAT A,BENNANI A. Distribution of tomato infecting begomoviruses and *Bemisia tabaci* biotypes in Morocco[J].



- Annals of Applied Biology, 2006, 149(2): 175-186.
- [7] KOKLU G, ROJAS A. Molecular identification and the complete nucleotide sequence of a tomato yellow leaf curl virus isolate from Turkey [J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(1): 61-66.
- [8] TSUNAKI A, YAMAGUCHI A, KAWANO S, et al. Ageratum yellow vein virus isolated from tomato plants with leaf curl on Ishigaki Island, Okinawa, Japan [J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(4): 287-291.
- [9] ANFOKA G H, ABHARY M, NAKHLA M K. Molecular identification of species of the tomato yellow leaf curl virus complex in Jordan [J]. Journal of Plant Pathology, 2005, 87(1): 65-70.
- [10] SAWANGJIT S, CHATCHA W, PHANICH O. Molecular characterization of tomato infecting begomoviruses in Thailand [J]. Virus Research, 2005, 109(1): 1-8.
- [11] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119(3): 519-530.
- [12] HUTTON S F, SCOTT J W, SCHUSTER D J. Recessive resistance to tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar Ty-king is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4 [J]. Hort-Science, 2012, 47(3): 324-327.
- [13] SASSER J N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production [J]. Plant Disease, 1980, 64(1): 36-41.
- [14] JAOUANNET M, PERFUS-BARBECH L, DELEURY E, et al. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei [J]. New Phytologist, 2012, 194(4): 924-931.
- [15] EISENBACK J D, TRIANTAPHYLLOU H H. Root-knot nematodes; Meloidogyne species and races [M]. New York: Marcel Dekker, 1991: 191-274.
- [16] SASSER J N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production [J]. Plant Disease, 1980, 64(1): 36-41.
- [17] GILBERT J C, MCGUIRE D C. Inheritance of resistance to severe root knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes [J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1956, 68: 437-442.
- [18] 于力, 朱为民, 薛林宝, 等. 番茄根结线虫病的研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2006(11): 35-38.
- [19] 陈明洁, 方 侗, 柯 涛, 等. 多重 PCR——一种高效快速的分子生物学技术 [J]. 武汉理工大学学报, 2005, 10(27): 37-40.
- [20] 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.
- [21] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 98-103.
- [22] 束永俊, 李 勇, 朱振雷, 等. 大豆 CAPS 标记快速开发方法的建立于优化 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(12): 62-65.

(责任编辑: 张震林)