

姜 静, 王银磊, 赵丽萍, 等. 抗番茄黄化曲叶病基因 *ty-5* 序列变异及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1105-1110.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.022

抗番茄黄化曲叶病基因 *ty-5* 序列变异及表达分析

姜 静^{1,2}, 王银磊¹, 赵丽萍¹, 周 蓉¹, 李亚茹^{1,2}, 余文贵¹, 赵统敏¹

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

摘要: 番茄黄化曲叶病是番茄的主要病害之一, 选育抗病品种是抵御该病害的重要途径。本研究对目前应用较少的抗番茄黄化曲叶病基因(*ty-5*)进行研究, 对克隆片段进行序列分析, 确定该基因在启动子区域和转录区域均存在碱基突变, 并利用含有该基因的抗病材料 AVTO1227 对 *ty-5* 的表达进行分析, 不同材料中 *ty-5* 及其等位基因 *Ty-5* 的表达量在接种番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)前后均没有显著变化。本研究为下一步针对 *ty-5* 翻译区域内单核苷酸变异导致其功能变化的研究提供了依据, 同时也为抗番茄黄化曲叶病育种提供了有效的连锁标记。

关键词: 番茄黄化曲叶病毒; 抗番茄黄化曲叶病基因(*ty-5*); 碱基突变; 表达分析; 基因型鉴定

中图分类号: S641.203.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1105-06

Sequence variation and expression analysis of tomato yellow leaf curl virus resistance gene *ty-5*

JIANG Jing^{1,2}, WANG Yin-lei¹, ZHAO Li-ping¹, ZHOU Rong¹, LI Ya-ru¹, YU Wen-gui¹, ZHAO Tong-min¹

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

Abstract: Tomato yellow leaf curl virus(TYLCV) disease is one of the important diseases of tomato. Breeding of resistant varieties was an important way to defense TYLCV disease. In this study, *ty-5* gene which rarely reported was cloned and its fragment sequence was analyzed. Sequence mutation happened in the promoter region and the transcribed region of *ty-5*. Resistant material AVTO1227, which containing the *ty-5* gene, was used for expression analyzing of *ty-5*. The results showed that the expression level of *ty-5* and *Ty-5* did not have significant change before and after TYLCV inoculation in different tomato materials. This study provided theoretical basis for the next step research of the single nucleotide in the transcription region of *ty-5*. In the meantime, linkage marker of *ty-5* also provided an effective method for breeding.

Key words: tomato yellow leaf curl virus; *ty-5*; gene mutation; expression analysis; genotype identification

收稿日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31401884); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20140739); 江苏省农业科学院基本科研业务专项[ZX(15)4022]

作者简介: 姜 静(1989-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事番茄遗传育种研究。(Tel) 15895996723; (E-mail) 496399220@qq.com。王银磊为共同第一作者。

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

番茄(*Solanum lycopersicum*)属于茄科番茄属, 原产于南美洲, 其适应性强, 易于栽培, 产量高, 是世界上最重要的蔬菜作物之一。番茄营养丰富, 番茄红素有很强的抗氧化功能, 具有较高的营养价值, 深受人们喜爱^[1]。番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)所引起的病害是造成番茄减产的重要病害之一^[2-3], 被其危害的番茄通常表现为叶片黄化、卷曲, 生长缓慢甚至停滞, 危害在苗期发

生时,会造成很大程度的减产,甚至绝收。TYLCV 所引起的病害是由携带 TYLCV 病毒的烟粉虱进行传毒的,对该病的防治,也主要是针对传毒寄主烟粉虱开展的。通过物理防治、化学防治、生物防治的方法虽然可以在一定程度上减少病害的发生,但是其防治不彻底、易反复,甚至还会对环境造成危害,而选育抗病品种可以从根本上解决 TYLCV 的危害^[4-7]。目前已知的抗性基因有 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-3a*、*Ty-4*、*ty-5* 和 *Ty-6*,这些基因主要来自番茄抗 TYLCV 的近缘野生种,如醋栗番茄、秘鲁番茄、多毛番茄、智利番茄和契斯曼尼番茄^[8-9],利用这些抗病基因紧密连锁的分子标记有助于提高抗 TYLCV 番茄的选育效率。国内外选育的抗 TYLCV 番茄品种主要以含有抗性基因 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3* 和 *Ty-3a* 为主^[10]。*Ty-1* 及其等位基因 *Ty-3* 和 *Ty-3a* 是编码 DFDGD 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶^[11]。单显性抗 TYLCV 基因 *Ty-2* 被定位在番茄 11 号染色体的 2 个分子标记之间 0.4 cM 的遗传间隔内^[12]。*Ty-4* 对 TYLCV 的抗性较弱,所以目前在生产中应用较少^[13]。*ty-5* 基因为单隐性基因^[14],该基因被定位在番茄 4 号染色体上^[15-16]。*ty-5* 对 TYLCV 具有很高的抗性,对于抗 TYLCV 的番茄育种具有重要意义^[17]。

本研究采用重测序方法,完成对 *ty-5* 的精细定位,确定 *ty-5* 的准确位点,在此研究的基础上,对 *ty-5* 及其等位基因 *Ty-5* 进行分离和测序分析,比较它们之间的碱基差异,发现变异位点。对 *ty-5* 和 *Ty-5* 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。qRT-PCR 具有定量、准确、灵敏度高、重复性好和高通量等特点,已成为分子生物学研究中分析基因表达的重要工具^[18-20]。通过此前对内参基因的筛选,利用 geNorm 软件和 NormFinder 软件进行分析,发现番茄在 TYLCV 烟粉虱接种处理条件下最稳定的内参基因为 *GAPDH*,将其作为本试验的内参基因。

本研究拟以含有 *ty-5* 的番茄材料 AVTO1227 和含有 *Ty-2* 的番茄材料 CLN2777A 以及感病番茄材料 MoneyMaker 为试验材料,分析带毒烟粉虱接种处理前后 TYLCV 抗病基因 *ty-5* 的表达变化,以期以 *ty-5* 抗病机理的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验植株及其处理方法

本试验以含有 *ty-5* 的番茄材料 AVTO1227 和含有 *Ty-2* 的材料 CLN2777A 以及感病材料 MoneyMaker 为供试材料。将番茄种子播种在 50 孔的穴盘中,温室培养,3 个材料各 2 盘,控制生长条件一致。待番茄幼苗长到 3 叶 1 心时,3 个材料各取 1 盘,利用携带 TYLCV 病毒的烟粉虱对其进行接种处理,接种的穴盘置于接种笼中,防止烟粉虱取食空白对照的植株,平均每个接种植株分布 50 头带毒烟粉虱。接种时生长环境的温度昼夜均为 27 ℃,光照 16 h,空白对照植株的生长环境与接种植株的生长环境一致。7 d 后随机取样,每 3 株混合为 1 个样品,设 3 个生物学重复,分别用锡箔纸包好,做好标记,立即放于液氮中速冻,然后置于 -80 ℃ 超低温冰箱中贮藏备用或直接提取 RNA。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 使用天根公司的 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,并用 eppendorf BioSpectrometer[®] 紫外/可见光分光光度计测定 $OD_{260/280}$ 的值,检测总 RNA 的纯度和浓度。

根据检测的总 RNA 浓度,调整 RNA 浓度一致后,按照 PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司产品) 的说明书要求,取 1 μg RNA 进行反转录反应。将获得的 cDNA 产物稀释 5 倍后直接用于 qRT-PCR 或 -20 ℃ 贮藏备用。

1.2.2 引物反应及扩增程序 所用引物包括基因鉴定标记引物和荧光定量 PCR 引物(表 1),引物设计采用 Primer 5.0 软件,引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。基因鉴定引物的 PCR 反应体系为 20.0 μl:10.0 μl 的 *mix* 酶,2.0 μl cDNA 模板,上下游引物(10 mol/L)各 0.2 μl,7.6 μl 的无菌水补足。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 45 s,48 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 38 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。用 8% 的聚丙烯酰胺胶对 PCR 反应后的样本进行电泳分析检测。qRT-PCR 的反应体系:以稀释 5 倍后的 cDNA 产物为实时定量 PCR 模板,SYBR[®] Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×) 10.0 μl,PCR 正反向引物(10 mol/L)各 0.4 μl,ROX Reference Dye II 0.4 μl,cDNA 模板 2.0 μl,

ddH₂O 6.8 μl。qRT-PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 34 s,共 40 个循环。扩增结束后对熔解曲线进行分析,检测扩增产物的特异性,温度为 65~95 ℃,连续测定样品的荧光强

度,根据熔解曲线判断引物是否为特异性扩增。反应仪器为 ABI QuantStudio 6 Real-Time PCR System,荧光定量 PCR 仪自动读取数据。

表 1 qRT-PCR 检测 *Ty-2* 基因和 *ty-5* 基因的引物序列
Table 1 Primer sequences detection of *Ty-2* and *ty-5* gene by qRT-PCR

引物用途	基因名称	引物序列(5'→3')	参考文献
鉴定 <i>Ty-2</i> 基因	<i>T0302R</i>	AGTGTACATCCTTGCCATTGACT	[21]
	<i>T0302F</i>	TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC	
鉴定 <i>ty-5</i> 基因	<i>ty-5-17R</i>	TAACAAAGCCCTCAAAGC	本试验设计
	<i>ty-5-17F</i>	GTCTCCGAAACGTAATCC	
内参	<i>NADPH-R</i>	ACCACAAATTGCCTTGCTCCCTTG	[22]
	<i>NADPH-F</i>	ATCAACGGTCTTCTGAGTGGCTGT	
鉴定 <i>ty-5</i> 表达	<i>ty-5R</i>	GTGCCAGTGAGTCCCAGACCAC	本试验设计
	<i>ty-5F</i>	CAAAGAAGGTTCTGCCTTGCGTAT	

1.2.3 qRT-PCR 数据处理和分析 利用 ABI QuantStudio 6 Real-Time PCR System 定量 PCR 仪自动读取循环阈值(*Ct* 值),根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的表达值,比较各基因在烟粉虱接种处理前后的表达值。利用 SPSS 20 软件进行统计分析。

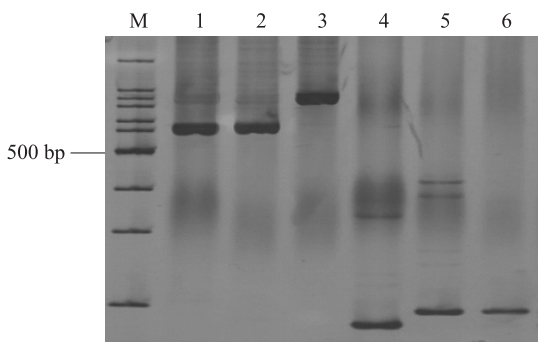
2 结果与分析

2.1 连锁标记对供试材料所含基因的鉴定

在对基因表达进行分析之前,利用抗病基因的连锁标记,可以对供试材料中所含有的基因进行验证。本研究选用含有 *ty-5* 的番茄材料 AVTO1227,含有 *Ty-2* 的番茄材料 CLN2777A,以及感病番茄材料 Moneymaker。利用 *Ty-2* 的连锁标记和 *ty-5* 的连锁标记对供试材料进行基因型分析。利用 *Ty-2* 的连锁标记 *T0302R/F* 进行扩增,含有纯合 *Ty-2* 的材料可以扩增得到 950 bp 的特征条带,不含有 *Ty-2* 的材料,其扩增条带为 850 bp。利用 *ty-5* 的连锁标记 *Ty-5-17R/F* 进行扩增,含有纯合 *ty-5* 的材料可以扩增得到 172 bp 的特征条带,不含有 *ty-5* 材料的扩增条带为 187 bp。结果(图 1)表明,AVTO1227 中只含有纯合的 *ty-5*,不含有 *Ty-2*,CLN2777A 中只含有纯合的 *Ty-2*,不含有 *ty-5*,感病材料 Moneymaker 中不含有抗 TYLCV 的抗病基因。

2.2 *ty-5* 基因序列比较分析

利用集群分离分析测序法(BSA-seq)对 F₂ 代植



M:100 bp marker;1、2、3 泳道是用 *Ty-2* 连锁标记分别对 AVTO1227、Moneymaker 和 CLN2777A 进行扩增的检测结果;4、5、6 泳道是用 *ty-5* 连锁标记分别对 AVTO1227、Moneymaker 和 CLN2777A 进行扩增的检测结果。

图 1 各番茄材料所含抗病基因分子标记鉴定
Fig.1 Molecular markers identification of resistance gene in tomato materials

株进行分析,将 27 株抗 TYLCV 番茄植株的幼叶和 27 株感病番茄植株的幼叶等量混合,分别构建抗病池和感病池,然后进行全基因组重测序数据分析。选取候选基因,再对抗病基因进行精细定位,确定该基因序列,并对其进行分离和序列比对。通过对基因的定位,将 *ty-5* 定位于番茄 4 号染色体 3125501 位置,抗病材料 AVTO1227 中的抗病基因为 *ty-5*,感病材料及其他不含有 *ty-5* 的材料中该位点的基因为 *Ty-5*。在该基因位点处的重测序结果如表 2 显示。

表 2 *ty*-5 基因位点处单核苷酸多态性及其测序深度

Table 2 Single nucleotide polymorphism and sequencing depth analysis at *ty*-5 gene locus

4 号染色 体位置	抗池非参考 基因组深度	抗池参考 基因组深度	感池非参考 基因组深度	感池参考 基因组深度	Delta 指数	欧氏距离
3125501	37-C	0-A	6-C	21-A	0.777 8	1.100 0
3125924	0-T	27-T	13-A	6-T	-0.684 2	0.967 6
3125925	26-T	0-A	6-T	13-A	0.684 2	0.967 6

对番茄材料 AVTO1227 中含有的 *ty*-5 基因和感病番茄材料 Moneymaker 中 *ty*-5 基因的等位基因 *Ty*-5 进行分离,测序结果与重测序结果吻合,在启动子区域存在 2 个相邻碱基的替换,在基因的编码区域

存在 1 个碱基的替换(图 2)。AVTO1227 的第 47 位点处的碱基 T 被替换为 G,从而导致翻译的蛋白质由缬氨酸转变为甘氨酸。

AVTO1227	CTTTTCTTTTAAAAAATCCATAAATATAAATTGTTAAAAAGAAAAGGTAAAGAA
Moneymaker	CTTTTCTTTTAAAAAATCCATAAATATAAATTGTTAAAAAGAAAAGGTAAAGAA
Ref	CTTTTCTTTTAAAAAATCCATAAATATAAATTGTTAAAAAGAAAAGGTAAAGAA
AVTO1227	ACATCATATATAACACAACAAATATATAAAAAATATTTTAAAAATAAAATATACTAAT
Moneymaker	ACATCATATATAACACAACAAATATATAAAAAATATTTTAAAAATAAAATATACTAAT
Ref	ACATCATATATAACACAACAAATATATAAAAAATATTTTAAAAATAAAATATACTAAT
AVTO1227	TTTAAATTGCAAAATTGAGGGTATATTGGTCATTTTCTCCCAAAAAATAAAATTCAG
Moneymaker	TTTAAATTGCAAAATTGAGGGTATATTGGTCATTTTCTCCCAAAAAATAAAATTCAG
Ref	TTTAAATTGCAAAATTGAGGGTATATTGGTCATTTTCTCCCAAAAAATAAAATTCAG
AVTO1227	TCCTTCTTCAACAAGGTTAGGAAAAACCTAAAAATTAAAGGACACAAACCGTTAAAC
Moneymaker	TCCTTCTTCAACAAGGTTAGGAAAAACCTAAAAATTAAAGGACACAAACCGTTAAAC
Ref	TCCTTCTTCAACAAGGTTAGGAAAAACCTAAAAATTAAAGGACACAAACCGTTAAAC
AVTO1227	CTATAAAAGTCTTTTCTCCATTGAAGTGAAGCAAATCTCATACGAAAAAATCTATAA
Moneymaker	CTATAAAAGTCTTTTCTCCATTGAAGTGAAGCAAATCTCATACGAAAAAATCTATAA
Ref	CTATAAAAGTCTTTTCTCCATTGAAGTGAAGCAAATCTCATACGAAAAAATCTATAA
AVTO1227	AAAGTTGTTTAAATTCATCTTTTCTGCTATTTACATGCAAAATTATTGAATTTTCA
Moneymaker	AAAGTTGTTTAAATTCATCTTTTCTGCTATTTACATGCAAAATTATTGAATTTTCA
Ref	AAAGTTGTTTAAATTCATCTTTTCTGCTATTTACATGCAAAATTATTGAATTTTCA
AVTO1227	TTAAGTTGATAAATTTGTTTCATTCAATATGAAGATTGTTGTTAGAGACTTTGTTCTGA
Moneymaker	TTAAGTTGATAAATTTGTTTCATTCAATATGAAGATTGTTGTTAGAGACTTTGTTCTGA
Ref	TTAAGTTGATAAATTTGTTTCATTCAATATGAAGATTGTTGTTAGAGACTTTGTTCTGA
	M K I V R R D F V P D
AVTO1227	TGGTCTGGTAGTGAAAGATAATTCCAGAAGAAGCTGATGATCTATGGGTTGCTTATAA
Moneymaker	TGGTCTGGTAGTGAAAGATAATTCCAGAAGAAGCTGATGATCTATGGGTTGCTTATAA
Ref	TGGTCTGGTAGTGAAAGATAATTCCAGAAGAAGCTGATGATCTATGGGTTGCTTATAA
	G S G S G K I I P E E A D D L W V A Y N

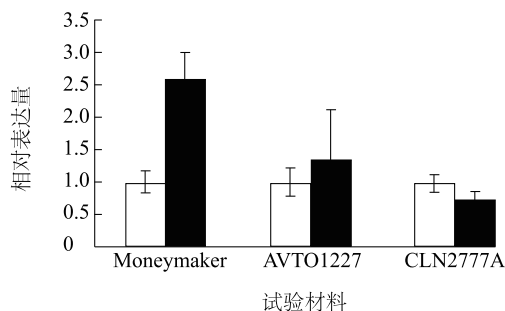
Ref:已公布的 Heinz 1706 参考基因组序列;AVTO1227:含有 *ty*-5 的番茄材料;Moneymaker:感番茄黄化曲叶病番茄材料。

图 2 *ty*-5 基因序列变异分析

Fig.2 Sequence variation analysis of *ty*-5 gene

2.3 *ty-5* 基因表达变化分析

含有 *ty-5* 的番茄材料 AVTO1227 对 TYLCV 有抗性,为了进一步确定该抗病性是由于翻译蛋白差异导致的,还是由于启动子序列变异引起 *ty-5* 表达水平变化而导致的,又或者是因为感病材料中 *ty-5* 的等位基因 *Ty-5* 表达变化所引起的,对 *ty-5* 及其等位基因 *Ty-5* 的基因表达变化进行研究。由于 *ty-5* 和 *Ty-5* 转录区域只有单核苷酸存在差异,设计表达量检测引物 *ty-5*R/F,对这 2 个基因在试验材料中的表达变化进行分析。对各材料接种 TYLCV 前及接种 7 d 后的样品 *ty-5* 或 *Ty-5* 的基因表达量变化进行分析。结果(图 3)表明,在接种 TYLCV 前后,AVTO1227 中 *ty-5* 的相对表达量没有显著变化,Money-maker 和 CLN2777A 中 *Ty-5* 的相对表达量同样没有显著变化。可见,*ty-5* 和 *Ty-5* 启动子区域 2 个碱基的差异并未导致基因表达量的变化,初步判断,*ty-5* 对 TYLCV 的抗性是由序列转录区域的核苷酸差异引起的。



□ 接种番茄黄化曲叶病毒0 d; ■ 接种番茄黄化曲叶病毒7 d

AVTO1227、Money-maker 见图 2 注。CLN2777A: 含有 *Ty-2* 基因的番茄材料。

图 3 接种番茄黄化曲叶病毒前后 *Ty-5* 基因和 *ty-5* 基因表达量的变化

Fig.3 Expression changes of *Ty-5* gene in Money-maker and CLN2777A materials and *ty-5* gene in AVTO1227 before and after TYLCV inoculation

3 讨论

目前,通过育种工作者的共同努力,培育出一批对 TYLCV 具有抗性且品质优良的番茄材料。中国番茄品种中含有的抗 TYLCV 基因主要有 *Ty-2*、*Ty-1* 及其等位基因 *Ty-3*。这些基因在保证番茄生产顺利开展的过程中发挥重要作用,但是长期使用这些

基因会使病毒变异,从而突破植株对 TYLCV 的抗性^[23]。为了对现有的抗性基因进行补充,本研究从亚洲蔬菜发展中心引进了含有新抗病基因 *ty-5* 的番茄材料 AVTO1227,接种 TYLCV,并对其抗性进行鉴定,证明该基因对 TYLCV 具有很高的抗性。将 *ty-5* 应用到番茄中,可以对现有的抗 TYLCV 基因进行补充,加强对 TYLCV 的防治,对抗 TYLCV 番茄的培育和生产具有重要意义。

对抗病材料中的 *ty-5* 及其感病材料中的等位基因 *Ty-5* 进行基因分离和测序分析,测序结果与重测序结果都证实,与 *Ty-5* 相比,*ty-5* 在其启动子区域和转录区域都存在碱基替换,但 *ty-5* 的抗性是由于哪个区域变异而导致的尚未清楚。本研究通过对接种 TYLCV 前后 *ty-5* 和 *Ty-5* 的表达变化进行 qPCR 分析,发现在接种前后,各材料中 *ty-5* 及其等位基因 *Ty-5* 的表达量均未发生显著变化。由此推测,*ty-5* 对 TYLCV 的抗性并非是由于基因表达水平的变化所致,而是由于转录区域的 1 个单核苷酸突变,使编码的氨基酸由缬氨酸转变为甘氨酸,从而赋予含 *ty-5* 番茄植株对 TYLCV 的抗性。目前,对 Money-maker 中的 *Ty-5* 正在开展 Crispr/cas9 基因编辑试验,以期获得 *Ty-5* 蛋白变异的抗 TYLCV 植株,对上述结论进行进一步的验证。

根据本研究的结果,在对 *ty-5* 基因的功能进行深入研究时,可以主要针对转录区域的核苷酸变异,明确单核苷酸多态性差异的作用,为抗病机理的进一步探索奠定基础。

参考文献:

- [1] NAIKA S, DE JEUDÉ J, DE GOFFAU M, et al. Cultivation of tomato: production, processing and marketing [M]. Netherlands: Agromisa Foundation and CTA, 2005: 6-17.
- [2] ZHANG H, GONG H, ZHOU X. Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China[J]. Virus Genes, 2009, 39(2): 249-255.
- [3] 王银磊,赵统敏,余文贵,等.抗番茄黄化曲叶病新品种苏粉 15 号选育及早春栽培技术[J].江苏农业科学,2016,44(12):184-185.
- [4] PALUMBO J C, HOROWITZ A R, PRABHAKER N. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*[J]. Crop Protection, 2001, 20(9): 739-765.
- [5] LAPIDOT M, FRIEDMANN M. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses [J]. Annals of Applied Biology, 2002, 140(2): 109-127.

- [6] POLSTON J E, LAPIDOT M. Management of tomato yellow leaf curl virus: US and Israel perspectives [M]. Netherlands: Springer, 2007: 251-262.
- [7] POLSTON J E. Management of whitefly-transmitted viruses in open-field production systems[M]. Burlington: Academic, 2014: 147-206.
- [8] JI Y, SCHUSTER D J, SCOTT J W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato[J]. Molecular Breeding, 2007, 20(3): 271-284.
- [9] HUTTON S F, SCOTT J W. Ty-6, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10[J]. Rept Tomato Genet Coop, 2014, 64: 14-18.
- [10] 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最新进展[J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2283-2290.
- [11] VERLAAN M G, HUTTON S F, IBRAHEM R M, et al. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases [J]. PLoS Genetics, 2013, 9(3): e1003399.
- [12] 杨晓慧. 番茄抗黄化曲叶病基因 *Ty-2* 的精细定位及不同抗性基因效应比较[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [13] JI Y, 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.
- [14] LAPIDOT M, KARNIEL U, GELBART D, et al. A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor pelota [J]. PLoS Genetics, 2015, 11(10): e1005538.
- [15] 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.
- [16] HUTTON S F, SCOTT J W, SCHUSTER D J. Recessive resistance to tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4[J]. HortScience, 2012, 47(3): 324-327.
- [17] 王银磊, 杨玛丽, 赵丽萍, 等. 含 *ty-5* 基因番茄材料的引进、评价及利用[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 2090-2094.
- [18] HALLER F, KULLE B, SCHWAGER S, et al. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization[J]. Analytical Biochemistry, 2004, 335(1): 1-9.
- [19] RANSBOTYN V, REUSCH T B H. Housekeeping gene selection for quantitative real-time PCR assays in the seagrass *Zostera marina* subjected to heat stress [J]. Limnology and Oceanography: methods, 2006, 4(10): 367-373.
- [20] YOO W G, IM KIM T, LI S, et al. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR[J]. Parasitology Research, 2009, 104(2): 321-328.
- [21] GARCIA B E, GRAHAM E, JENSEN K S, et al. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance *Ty-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm[J]. Rep Tomato Genet Coop, 2007, 57: 21-24.
- [22] MASCIA T, SANTOVITO E, GALLITELLI D, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(6): 805-816.
- [23] ACOSTA-LEAL R, FAWLEY M W, RUSH C M. Changes in the intrasolate genetic structure of Beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown[J]. Virology, 2008, 376(1): 60-68.

(责任编辑: 王 妮)