

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00926

由基因序列开发番茄枯萎病抗性基因 *I-2* 的共显性分子标记

于拴仓¹, 邹艳敏^{1,2}

1. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097;
2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037

摘要: 根据 *I-2* 的基因序列设计特异扩增引物对 *I-2/5F* 和 *I-2/5R*, 扩增 *I-2* 基因 3 132 ~ 3 765 bp 之间片段, 基因型为 *I-2/I-2* 的材料 03F-7 可扩增出 633 bp 的条带, 而基因型为 *i-2/i-2* 的材料 Moneymaker 可扩增出 693 bp 的条带, 杂合型材料可扩增出以上 2 个条带。通过这两个特异扩增片段的克隆和测序证明, 抗病材料扩增的 633 bp 片段为 *I-2* 基因的 3 132 ~ 3 765 bp 之间的序列, 而感病等位基因中出现大量的碱基突变和 60 bp 片段插入。利用引物对 *I-2/5F* 和 *I-2/5R*, 可区分纯合抗病材料、杂合抗病材料和纯合感病材料, 从而建立了 *I-2* 基因的共显性分子标记。在此基础上, 利用该标记对 16 个主要番茄品种进行基因型鉴定, 8 个品种含有 *I-2* 基因, 其中 1 个品种基因型为 *I-2/I-2*, 其他品种为 *I-2/i-2*。通过一次 PCR 和一次 *Hind* III 酶切建立了 *I-2* 和 *Tm-2²* 双基因检测体系, 为多基因鉴定及标记辅助选择提供了有力工具。

关键词: 番茄; 枯萎病; *I-2* 基因; *Tm-2²* 基因; 分子标记

A co-dominant molecular marker of fusarium wilt resistance gene *I-2* derived from gene sequence in tomato

YU Shuan-Cang¹, ZOU Yan-Min^{1,2}

1. National Engineering Research Center for Vegetable, Beijing 100097, China;
2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Abstract: Sequence-specific PCR primers, *I-2/5F* and *I-2/5R* were designed according to the sequence from 3 132 bp to 3 765 bp in *I-2* gene. With them a 633 bp fragment was amplified from 03F-7 with a genotype of *I-2/I-2*, 693 bp fragment from Moneymaker with a genotype of *i-2/i-2*, and both fragments from Tebao with heterozygous genotype *I-2/i-2*. These two specific fragments were cloned and sequenced. The results from multiple sequence alignment showed that the 633bp fragment from 03F-7 was identical with the sequence from 3 132 bp to 3 765 bp in *I-2* gene. Compared with the sequence of *I-2* gene, there were a large number of mutations and a 60 bp fragment inserted in susceptible alleles. The PCR primer combination, *I-2/5F* and *I-2/5R* can be used to distinguish homozygous resistant, heterozygous and homozygous susceptible materials, and it is a functional co-dominant marker in *I-2* gene selection. Moreover, this marker was employed on 16 major tomato varieties for *I-2* locus genotyping, in which half of the varieties contain *I-2* gene, and only one variety is homozygous resistant. In addition, simultaneous detection system for *I-2* and *Tm-2²* was established by a single PCR and a *Hind* III digestion. It provides a powerful tool for multiple genes selection in tomato breeding program.

Keywords: tomato; fusarium wilt; *I-2*; *Tm-2²*; molecular marker

收稿日期: 2007-12-15; 修回日期: 2008-01-16

基金项目: 北京市科技计划项目 [Supported by the Beijing Municipal Science and Technology Project]

作者简介: 于拴仓(1971-)男, 陕西商州人, 博士, 副研究员, 研究方向: 蔬菜遗传育种。E-mail: yushuancang@nercv.com

番茄是世界上重要的蔬菜作物, 自上个世纪 50 年代番茄枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 被首次报道以来, 现已遍及世界各地, 并已经成为危害番茄生产的主要病害之一^[1]。番茄枯萎病的生理小种已报道发现有 3 个: 生理小种 1、2 和 3^[2]。目前, 国外推出的不少品种含 *I-2* 基因, 或同时含 *I-1* 基因和 *I-2* 基因, 即抗枯萎病生理小种 1, 或同时抗小种 1 和 2; 抗枯萎病生理小种 3 的 *I-3* 基因已被转入普通番茄中, 并育成了稳定的品系^[3]。国内对番茄枯萎病的研究较为落后, 研究报道国内大部分地区以枯萎病菌生理小种 1 为主^[1,3,4], 抗病品种所含的抗病基因主要从国外品种中自交选择获得, 所含基因不甚明确。在番茄抗病育种中, 由于 *I-2* 基因同时抗小种 1 和 2, 因而尤其受到重视。

早在上个世纪 90 年代, 国外就相继报道 *I-1* 基因和 *I-2* 基因的 RFLP 分子标记^[5,6]。 *I-2* 基因是来源于醋栗番茄(*Lycopersicon pimpinellifolium*) 的显性基因^[7], 被定位于番茄的 11 号染色体^[8]。 Sarfatti 等^[6]对 *I-2* 基因进行了分析, 发现 RFLP 标记 TG105 与该基因紧密连锁(0.4 cM)。由于 RFLP 标记操作复杂, 成本高, 且一般存在放射性污染。因而, 该标记不适合用于标记辅助育种。目前, 尚无 *I-2* 基因 PCR 分子标记的报道。随着分子生物学技术的发展, 目前已分离的

番茄抗病基因达 9 个, 其中包括了抗枯萎病的 *I-2* 基因和 *I-2 C* 基因^[9], 这一研究为抗枯萎病功能标记的开发奠定了良好基础。 本文将根据番茄枯萎病抗病基因 *I-2* 的碱基序列, 设计特异扩增引物, 发展基于基因序列标签的功能标记, 为番茄枯萎病抗病基因 *I-2* 的分子标记辅助育种奠定基础。

此外, 番茄烟草花叶病毒(Tomato mosaic virus, TMV)是一种世界性的蔬菜病毒病害, 此病分布广泛, 危害严重。目前, 抗烟草花叶病毒和枯萎病已成为番茄抗病育种的主要目标, 建立高效的分子标记辅助育种体系显得尤为迫切。早在 1998 年 Dax 等^[10]就报道了番茄抗烟草花叶病毒 *Tm-2²* 基因的 SCAR 分子标记。在此基础上, 本研究将建立一套对 *I-2* 和 *Tm-2²* 基因同时鉴定筛选的多重 PCR 技术, 以期番茄兼抗枯萎病和烟草花叶病毒新品种选育提供一项快速、可靠的新技术。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究中所用的番茄材料见表 1。其中 Moneymaker 不含抗病基因 *I-2* 和 *Tm-2²*; 2~4 为自交系; 4~21 均为番茄品种。这些材料均来自国家蔬菜工程技术研究中心。

表 1 番茄 *I-2* 和 *Tm-2²* 基因分子标记研究材料
Table 1 Tomato materials used in molecular marker analysis for genes *I-2* and *Tm-2²*

序号 Code	材料 Materials	基因型 Genotypes	序号 Code	材料 Materials	基因型 Genotypes
1	Moneymaker	<i>i-2/ i-2; tm-2²/ tm-2²</i>	12	以色列 189	未知
2	03F-7	<i>I-2/ I-2; Tm-2²/ Tm-2²</i>		Yiselie No.189	Unknow
3	03F-4	<i>i-2/ i-2; Tm-2²/ Tm-2²</i>	13	合作 906	未知
4	03F-14	<i>i-2/ i-2; tm-2²/ tm-2²</i>		Hezuo No.906	Unknow
5	特宝	<i>I-2/ -; Tm-2²/ -</i>	14	以色列 115	未知
	Tebao			Yiselie No.115	Unknow
6	东农 708	未知	16	佳粉 15	未知
	Dongnong No.708	Unknow		Jiafen No.15	Unknow
7	东农 709	未知	15	宝冠 1 号	未知
	Dongnong No.709	Unknow		Baoguan No.1	Unknow
8	东农 710	未知	17	中杂 9 号	未知
	Dongnong No.710	Unknow		Zhongza No.9	Unknow
9	千僮	未知	18	国萃 3 号	未知
	Qianxi	Unknow		Guocui No.3	Unknow
10	圣女	未知	19	佳粉 17	未知
	Shengnv	Unknow		Jiafen No.17	Unknow
11	亚蔬 6 号	未知	20	浙粉 202	未知
	Yashu No.6	Unknow		Zhefen No.202	Unknow
			21	毛粉 802	未知
				Maofen No.802	Unknow

1.2 方法

1.2 引物设计

番茄 *I-2* 基因的碱基序列来自 GenBank, 序列登录号为 AF118127, 该基因全长 3 801 bp。利用 BLAST 等工具进行同源性搜索及序列比对等分析, 综合考虑基因功能域、位点多态性频率等因素, 利用 Gene Tool Lite 1.0 软件设计特异扩增的 PCR 引物, 共设计了 8 对引物, 筛选获得了引物对 I-2/5F 和 I-2/5R, 该引物对扩增番茄 *I-2* 基因 3 132 ~ 3 765 bp 之间的片段。上游引物 I-2/5F 的碱基序列为 5'-CAAGGAACTGCGTCTGTCTG-3', 下游引物 I-2/5R 碱基序列为 5'-ATGAGCAATTTGTGGCCAGT-3'。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取及 PCR 扩增

所有实验材料播种于温室, 待幼苗长出 2 ~ 3 片真叶时取叶片提取 DNA。采用 CTAB 法进行 DNA 提取, 样品的浓度用 Pharmacia Biotech (Biochrom) 公司的 Spectrophotometer Ultrospec 2000 进行测定, 用 ddH₂O 稀释后贮存于 -80℃ 的冰箱中备用。

PCR 扩增体系包含: 50 ng DNA, 1 × *Taq* buffer, 引物 I-2/5F 和 I-2/5R 各 0.3 μmol/L, 1.2 U *Taq* 聚合酶(天根生化科技(北京)有限公司), 用 ddH₂O 补足 25 μL。用 MJ Research PTC-200 扩增仪扩增, 热循环程序为: 94 变性 3 min; 94 变性 1 min, 55 复性 1 min, 72 延伸 1 min, 35 个循环; 72 延伸 8 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖电泳检测, Gold-View 染色, 用 Alpha Innotech 公司的 Chemilmager™ 5500 紫外照相系统进行凝胶照相。

1.2.3 差异条带的克隆、测序和比对分析

PCR 产物用天根生化科技(北京)有限公司普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化, 然后与该公司的 PGEM-T vector 连接, 转化 TOP10 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后摇菌, 提取质粒, *EcoR* 酶切电泳鉴定为阳性克隆后进行测序。序列分析用 DNAMAN version 4.0 进行。BLAST 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 上进行。

1.2.4 *I-2* 基因和 *Tm-2²* 基因同时鉴定体系

番茄抗番茄花叶病毒病 *Tm-2²* 基因的 SCAR 标记引物参照 Dax 等 [10] 合成, 上游引物为 TM2/F: 5'-CACCTTTCCTCTCCAA-3'; 下游引物为 TM2/R: 5'-CACCTTTCCTTAAAGC-3'。引物由北京赛百盛

基因技术有限公司合成。

I-2 基因和 *Tm-2²* 基因分子标记的双引物反应体系: 100 ng DNA, 1 × *Taq* buffer, 引物 I-2/5F、I-2/5R、TM2/F 和 TM2/R 各 0.25 μmol/L, 1.5 U *Taq* 聚合酶(天根生化科技(北京)有限公司), 用 ddH₂O 补足 25 μL。PCR 扩增采用 Touchdown 程序, 热循环程序为: 94 变性 3 min; 94 变性 1 min, 62 复性 1 min(每个循环降低 0.8 °C), 72 延伸 1 min, 共 12 个循环; 94 变性 1 min, 50 复性 1 min, 72 延伸 1 min, 23 个循环; 72 延伸 8 min。取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖电泳检测。

番茄抗番茄花叶病毒病 *Tm-2²* 基因的 SCAR 标记为共显性, 其 PCR 产物需要酶切。酶切体系为: PCR 产物 10 μL, 加入 4 U 的 *Hind* (NEB), 1 × NEB buffer 2, ddH₂O 补足 15 μL。反应体系在 37 °C 保温 4 h。酶切产物用 1.4% 琼脂糖在电压 5 V/cm 条件下电泳 1 h, GoldView 染色, 用 Alpha Innotech 公司的 Chemilmager™ 5500 照相系统进行凝胶照相。

2 结果与分析

2.1 *I-2* 基因共显性标记的获得

以 3 个不同基因型的番茄材料 Moneymaker、特宝和 03F-7 的总基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物对 I-2/5F 和 I-2/5R 在抗病材料和感病材料中显示了扩增片段长度的多态性。电泳检测结果见图 1。3 个材料均扩增出一条约为 760 bp 的条带, 该条带不能区分番茄枯萎病抗病基因型。值得关注的是基因型为 *I-2* / *I-2* 的材料 03F-7 可特异地扩增出约 630 bp 的条带, 而基因型为 *i-2* / *i-2* 的材料 Moneymaker 可扩增出约 690 bp 的条带, 杂合性材料特宝可扩增出以上 2 个条带。为了证明所获得的 PCR 产物是 *I-2* 基因的对应该片段, 将 03F-7 和 Moneymaker 所扩增的

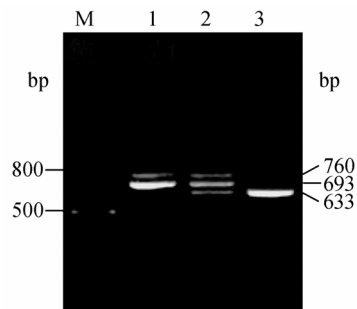


图 1 PCR 特异扩增的电泳检测图

M: Marker I; 1: Moneymaker; 2: 特宝; 3: 03F-7。

Fig. 1 PCR amplification of specific fragment in *I-2*

M: Marker I; 1: Moneymaker; 2: Tebao; 3: 03F-7.

多态性特异条带进行克隆和测序, 证实来自 03F-7 的特异条带为 633 bp, 而来自 MoneyMaker 的特异条带为 693 bp。序列比对结果表明(图 2), 抗病材料 03F-7 所扩增的特异 PCR 片段与 *I-2* 基因序列几乎完全相同, 仅在 407 位有一处碱基突变, 由 T 变为 C。推测该特异 PCR 片段即为 *I-2* 基因的片段。感病材料 MoneyMaker 所扩增的 693 bp 片段中有 57 个碱基突变, 其中大多数为有义突变; 另外, 369 位处有 1 个 60 bp 碱基片段的插入。BLASTN 分析表明, 该 60 bp 碱基片段与番茄枯萎病抗性基因家族 *I2C-4*、*I2C-3* 和 *I2C-5* 的部分序列的一致性分别达到 96%、93% 和 91%, 该片段编码 1 个富亮氨酸重复序列(Leucine-rich repeat, LRR)单元。

由此可以推测本研究中引物设计及扩增程序是可行的, 所扩增的应该是 *I-2* 及其等位基因片段。含 *I-2* 基因的纯合材料具有 633 bp 扩增片段, 不含 *I-2* 基因的感病材料具有 693 bp 扩增片段, 杂合材料同时具有 633 bp 和 693 bp 扩增片段, 可区分纯合抗病材料、杂合抗病材料和纯合感病材料, 从而建立了

I-2 基因的共显性分子标记。

2.2 主要番茄品种 *I-2* 基因位点的识别

利用引物对 *I-2/5F+I-2/5R* 对包括特宝在内的 17 个主要番茄品种进行扩增, 电泳检测结果见图 3。对照品种特宝扩增出 633 bp 和 693 bp 的特异带; 在所检测的 16 个品种中, 宝冠 1 号扩增出 633 bp 特异带, 以色列 189、合作 906、中杂 9 号、国萃 3 号、浙粉 202、东农 709 和东农 710 扩增出 633 bp 和 693 bp 的特异带; 由此可以判断, 这 8 个品种均为抗病品种, 宝冠 1 号为纯合抗病品种, 基因型为 *I-2/I-2*; 以色列 189 等 7 个品种为杂合抗病品种, 基因型应为 *I-2/i-2*。而千禧、圣女、亚蔬 6 号、以色列 115、佳粉 15、佳粉 17、毛粉 802 和东农 708 扩增出 693 bp 的特异带, 无 633 bp 带, 这 8 个品种不含 *I-2* 基因, 基因型应为 *i-2/i-2*。

2.3 *I-2* 和 *Tm-2²* 双基因检测体系

为了获得可以同时检测 *I-2* 和 *Tm-2²* 基因筛选的 PCR 扩增反应体系, 本研究在原各自单独引物稳定的 PCR 扩增体系的基础上, 将引物对 *I-2/5F+I-2/5R*

I-2 seg	CAAGGAAGTGCCTGCTGCTGATTGTCCAGAAATAGAAGGAGAATTGCCCTTCAATTTAGAAATACCTCGTATCATATATTGCAAGAACT	90
03F-07	CAAGGAAGTGCCTGCTGCTGATTGTCCAGAAATAGAAGGAGAATTGCCCTTCAATTTAGAAATACCTCGTATCATATATTGCAAGAACT	90
MoneyMaker	CAAGGAAGTGCCTGCTGCTGATTGTCCAGAAATAGAAGGAGAATTGCCCTTCAATTTAGAAATACCTCGTATCATATATTGCAAGAACT	90
Consensus	caaggaactgcctgctgctgattgtccagaaatagaaggagaaattgcccttcaattta aa actc tatca attgcaagaaa t	
I-2 seg	GGTGAATGGCCGAAAGGAGTGGCATTACAGAGACTCACAGAGTTATGGATCCATCATGATGGGAGTGACGAAGATATTGAACATTGGGA	180
03F-07	GGTGAATGGCCGAAAGGAGTGGCATTACAGAGACTCACAGAGTTATGGATCCATCATGATGGGAGTGACGAAGATATTGAACATTGGGA	180
MoneyMaker	GGTGAATGGCCGAAAGGAGTGGCATTACAGAGACTCACAGAGTTATGGATCCATCATGATGGGAGTGACGAAGATATTGAACATTGGGA	180
Consensus	ggtgaatggccgaaaggagtgccatttacagagactcacagagttatggatc atcatgatgggagtgacgaagatattgaacattggga	
I-2 seg	GGTGCCCTTGTCTATTACAGAGACTTACCATAAAGATCTTAAACATTAAAGCAGCCAAACATCTCAAAAGCCTCACCTCTCTTCAATATCT	270
03F-07	GGTGCCCTTGTCTATTACAGAGACTTACCATAAAGATCTTAAACATTAAAGCAGCCAAACATCTCAAAAGCCTCACCTCTCTTCAATATCT	270
MoneyMaker	GGTGCCCTTGTCTATTACAGAGACTTACCATAAAGATCTTAAACATTAAAGCAGCCAAACATCTCAAAAGCCTCACCTCTCTTCAATATCT	270
Consensus	ggtgccctt tctatttcagag cttaccata aatct a aacattaagcagccaaacatctcaaaagcctcacctctcttcaatattct	
I-2 seg	ATGTATTGAGGGTATTTATCTCAGATTCACTCAGTCAAGGCCAGCTTTCCTCCTTTCTCACCTCACTTCGCTTCAAACTCTACAAATCTG	360
03F-07	ATGTATTGAGGGTATTTATCTCAGATTCACTCAGTCAAGGCCAGCTTTCCTCCTTTCTCACCTCACTTCGCTTCAAACTCTACAAATCTG	360
MoneyMaker	ATGTATTGAGGGTATTTATCTCAGATTCACTCAGTCAAGGCCAGCTTTCCTCCTTTCTCACCTCACTTCGCTTCAAACTCTACAAATCTG	360
Consensus	atgt ttga ggt atttatctcagattcagtcacaaggccagctttctcctctttctcacctcacttcgcttcaa ctctcaaaatc g	
I-2 seg	CAATTTCCCT.....	390
03F-07	CAATTTCCCT.....	390
MoneyMaker	TAATCTCCAACTCACTTGCTGA	450
Consensus	aat tcc	
I-2 seg	ATCAGCCTGCGCCTCCTCCCTCTCTCACCTGAGATAGATGATTGCGCTTAATCTCCAAATCACTCTTCGAATCAGCACTGCCCTCCTCCT	480
03F-07	ATCAGCCTGCGCCTCCTCCCTCTCTCACCTGAGATAGATGATTGCGCTTAATCTCCAAATCACTCTTCGAATCAGCACTGCCCTCCTCCT	480
MoneyMaker	ATCAGCCTGCGCCTCCTCCCTCTCTCACCTGAGATAGATGATTGCGCTTAATCTCCAAATCACTCTTCGAATCAGCACTGCCCTCCTCCT	540
Consensus	atcagc ctgcccctcctccctctctcacctgag at gattgc ctaatctccaaatcact gaatcagcactgccc tctcctcct	
I-2 seg	CTCTCAGCTGTTTATCCAGGATTGCCCTTAATCTCCAAATCCCTTCCATTTAAAGGGATGCCCTCTTCCCTCTCTTAACATATCTATTTCGA	570
03F-07	CTCTCAGCTGTTTATCCAGGATTGCCCTTAATCTCCAAATCCCTTCCATTTAAAGGGATGCCCTCTTCCCTCTCTTAACATATCTATTTCGA	570
MoneyMaker	CTCTCAGCTGTTTATCCAGGATTGCCCTTAATCTCCAAATCCCTTCCATTTAAAGGGATGCCCTCTTCCCTCTCTTAACATATCTATTTCGA	630
Consensus	ctctca ctg catc gattgcctaatctccaaatcccttccat aaagggatgccctcttccctctct aactatc attt c a	
I-2 seg	TTGCCATTGCTCAACCACTACTAGAATTTGAAGGGGGAATCTGGCCACAAATTGCTCA	633
03F-07	TTGCCATTGCTCAACCACTACTAGAATTTGAAGGGGGAATCTGGCCACAAATTGCTCA	633
MoneyMaker	ATGTCCATTGCTCAACCACTACTAGAATTTGAAGGGGGAATCTGGCCACAAATTGCTCA	693
Consensus	tg ccattgtctca accactactagaatttga aaggggga tactggccacaaattgtctca	

图 2 PCR 特异扩增片段和 *I-2* 基因的部分片段序列比对结果

I-2 seg: *I-2* 基因 3 132 ~ 3 765 bp 之间序列; 03F-7: 03F-7 扩增出的 633 bp 片段; MoneyMaker: MoneyMaker 所扩增的 693 bp 片段; “-”: 为感病等位基因 60 bp 碱基片段的插入。

Fig. 2 Multiple sequence alignment among PCR fragments and segment of *I-2*

I-2 seg: Sequence from 3 132 bp to 3 765 bp in *I-2* gene; 03F-7: Sequence of 633 bp fragment from 03F-7; MoneyMaker: Sequence of 693 bp fragment from MoneyMaker; “-”: A 60 bp fragment insertion in susceptible allele.

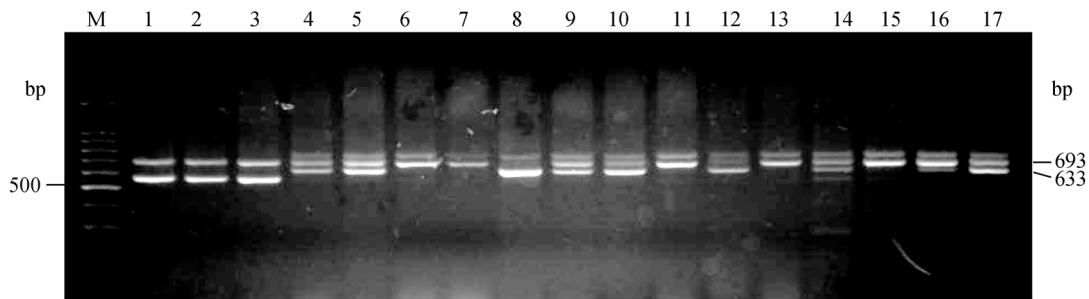


图 3 主要番茄品种 *I-2* 基因位点特异扩增的电泳检测图

M: Marker I; 1: 千禧; 2: 圣女; 3: 亚蔬 6 号; 4: 以色列 189; 5: 合作 906; 6: 以色列 115; 7: 佳粉 15; 8: 宝冠 1 号; 9: 中杂 9 号; 10: 国萃 3 号; 11: 佳粉 17; 12: 浙粉 202; 13: 毛粉 802; 14: 特宝; 15: 东农 708; 16: 东农 709; 17: 东农 710。

Fig. 3 Products of specific amplification for *I-2* in major tomato varieties

M: Marker I; 1: Qianxi; 2: Shengnv; 3: Yashu No.6; 4: Yiselie No.189; 5: Hezuo No.906; 6: Yiselie No.115; 7: Jiafen No.15; 8: Baoguan No.1; 9: Zhongza No.9; 10: Guocui No.3; 11: Jiafen No.17; 12: Zhefen No.202; 13: Maofen No.802; 14: Tebao; 15: Dongnong No.708; 16: Dongnong No.709; 17: Dongnong No.710.

和 TM2/F+TM2/R 混合在同一反应体系中进行扩增; 对扩增体系进行了优化, 同单基因扩增体系相比较, 增加了模板量和 *Taq* 酶的用量, 无论基因型如何, 均可扩增出原单引物所有片段, 经重复实验, 结果稳定。

如图 4A 所示, 对于 *Tm-2²* 基因, 任何基因型均可扩增出约为 850 bp 片段; 而经过 *Hind* 酶切后 (图 4B), 纯合感病材料 Moneymaker 和 03F-14 的 850 bp 片段被消化, 出现了约 470 bp 和 280 bp 的特异带; 纯合抗病材料 03F-4 和 03F-7 的 850 bp 片段未被 *Hind* 消化; 杂合抗病材料特宝和东农 708 出现了

850 bp、470 bp 和 280 bp 的特异带。而对于 *I-2* 基因, 基因型为 *I-2/I-2* 的材料 03F-7 可特异地扩增出 633 bp 的条带, 而基因型为 *i-2/i-2* 的材料 Moneymaker、东农 708、03F-4 和 03F-14 可扩增出 693 bp 的条带, 杂合性材料特宝可扩增出 633 bp 和 693 bp 2 个条带, 这些特异扩增带不能被 *Hind* 消化 (图 4, A 和 B)。

由此可见, 通过一次 PCR 扩增和一次 *Hind* 酶切, 可以同时识别 *I-2* 和 *Tm-2²* 基因, 从而获得了较为稳定的双基因检测体系。

3 讨论

目前, 分子标记辅助选择已成为蔬菜分子育种的关键技术。Sarfatti 等^[6]获得了番茄 *I-2* 基因的 RFLP 标记 TG105, 该标记与 *I-2* 基因紧密连锁 (0.4 cM)。RFLP 标记技术借助于 Southern 杂交, 分析费用高、操作复杂、试验周期长, 探针不易获得, 在辅助选择中存在一定的局限性。本研究由基因序列成功地开发了 *I-2* 基因的共显性分子标记, 引物对 *I-2*/5F+*I-2*/5R 进行 PCR 扩增后, 纯合抗病材料特异地扩增出 633 bp 的条带, 而纯合感病材料可扩增出 693 bp 的条带, 杂合抗病材料可扩增出 633 bp 和 693 bp 2 个条带。与 RFLP 标记相比, 此类标记从基因的序列开发获得, 扩增的是基因本身的部分片段, 与基因共分离, 不存在遗传重组, 判别的准确性高, 稳定性好; 另外该标记分析费用较低, 对操作者的要求较低, 成本较低, 所需仪器较少, 一般的育种单位均可实施, 并可实现高通量筛选, 是标记辅助选择的理想标记。这一研究为育种材料的基因型鉴别及分子标记辅助育种提供了高效选择手段。

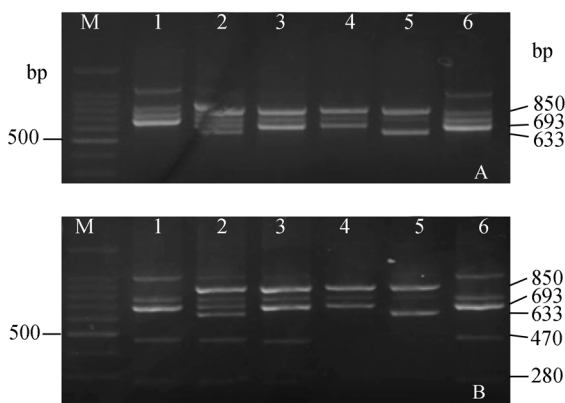


图 4 *I-2* 和 *Tm-2²* 双基因扩增和酶切检测结果

A: PCR 扩增结果; B: *Hind* 酶切结果。M: 100 bp DNA Ladder; 1: Moneymaker; 2: 特宝; 3: 东农 708; 4: 03F-4; 5: 03F-7; 6: 03F-14。

Fig. 4 Products of specific amplification and restriction by *Hind* for *I-2* and *Tm-2²*

A: PCR products; B: Products digested by *Hind*. M: 100 bp DNA ladder; 1: Moneymaker; 2: Tebao; 3: Dongnong No.708; 4: 03F-4; 5: 03F-7; 6: 03F-14.

为了证明所获得的 PCR 片段是 *I-2* 基因的对应片段, 本研究对扩增片段进行了克隆和测序。序列比对结果表明, 抗病材料 03F-7 所扩增的特异 PCR 片段与 *I-2* 基因序列相比, 仅在 407 位有一处碱基突变, 说明该特异 PCR 片段为 *I-2* 基因的片段。这一突变可能是基因进化或世代交配过程中产生的, 也可能是 PCR 扩增中未使用高保真酶造成的碱基错配。感病材料 MoneyMaker 的 693 bp 片段中存在大量碱基突变, 其中大多数为有义突变; 另外, 值得关注的是 369 位(对应于 *I-2* 基因的 3 499 位)有一个 60 bp 碱基片段的插入, BLASTn 分析表明, 该 60 bp 碱基片段与番茄枯萎病抗性基因家族 *I2C-4*、*I2C-3* 和 *I2C-5* 的部分序列的一致性分别达到 96%、93% 和 91%, 该片段编码了 1 个 LRR 单元。Simons 等^[9]研究表明, 番茄 *I-2* 基因家族存在 6 个同系物 (Homologs), 它们的主要区别在于 LRR 单元的插入或重复次数不同, 而只有 *I-2* 基因对番茄枯萎病菌 2 号生理小种具有抗性。另外, 本研究针对 *I-2* 基因序列设计了 8 对引物, 扩增片段几乎覆盖了该基因的大部分片段, 而只有引物对 I-2/5F 和 I-2/5R 获得了扩增片段长度的多态性。可见, 抗感等位基因同源性较高, LRR 单元的插入或重复次数不同在一定程度上影响了抗病基因的功能, *I-2* 基因家族在长期的进化过程中发生的内部重组、插入或缺失造成了抗性的多态。

国外已有许多关于多重 PCR 的研究报道^[11, 12]。近年来, 在番茄的多基因鉴定研究中, 李君明等^[13]和陈丽静等^[14]相继建立了 2 个抗病基因同时鉴别的多重 PCR 技术体系。对于 *Tm-2²* 基因的 SCAR 分子标记, 在 Dax 等^[10]、李君明等^[13]和陈丽静等^[14]的报道中, SCAR 引物扩增后出现了两条带, 其中下面一条为特异带 950 bp; *tm-2²/tm-2²* 基因型的材料经过 *Hind* 酶切后出现 2 条较为明显的特异带, Dax 等^[10]指出其中上面一条为 500 bp, 而李君明等^[13]和陈丽静等^[14]的研究中认为是 490 bp。尽管本研究与前者报道有所出入, 相应的扩增片段和酶切片段长度分别为 850 bp 和 470 bp, 但从电泳图片上看带型是完全一致的, 可能是由于所用 DNA marker 不同, 而造成分子量大小判断误差, 由此也说明该标记是一个较为稳定的共显性分子标记。本文在获得 *I-2* 基因显性分子标记的基础上, 通过引物浓度、模板量及 *Taq* 酶用量的调整优化, 建立了较为稳定的 *I-2* 和 *Tm-2²* 双基因检测体系: 将引物对 I-2/5F+I-2/5R 和

TM2/F+TM2/R 混合在同一反应体系中进行扩增, 然后进行 *Hind* 酶切, 通过酶切产物的琼脂糖电泳判断样品基因型。对于 *Tm-2²* 基因, 纯合感病材料仅出现约 470 bp 和 280 bp 的特异带; 纯合抗病材料仅出现 850 bp 特异带; 杂合抗病材料出现 850 bp、470 bp 和 280 bp 的特异带。而对于 *I-2* 基因, 其所有特异扩增带均不能被 *Hind* 消化。该体系较单基因检测体系能节省大量的人力、物力和时间, 可用于多基因分子标记辅助选择、品种纯度及相关资源材料鉴定, 为番茄种质创新和多基因聚合育种提供了一项有力工具。

参考文献(References):

- [1] WANG Quan-Hua, LI Jing-Fu, LI Yong-Hao, WANG Fu. The identification of physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* snyd and hans in heilongjiang province. *Journal of Northeast Agricultural University*, 1996, 27(4): 354–357.
王全华, 李景富, 李永镐, 王富. 黑龙江省番茄枯萎病菌生理小种鉴定. 东北农业大学学报, 1996, 27(4): 354–357.
- [2] Stevens MA, Rick CM. Genetics and Breeding. In: Ather-ton JG, Rudich J, eds. The Tomato Crop. London: Chapman and Hall Ltd, 1986, 35–109.
- [3] YU Ren-Zhu, WANG Gui-Hong. Advances in tomato breeding for diseases resistance. *Chang-Jiang Vegetable*, 2002, 7: 33–34.
于仁竹, 王桂红. 番茄抗病育种研究进展. 长江蔬菜, 2002, 7: 33–34.
- [4] LI Shu-De. Advances in Main Vegetable Crops Breeding for Diseases Resistance in China. Beijing: Science Press, 1995, 267–271.
李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995, 267–271.
- [5] Sarfatti M, Abu Abied M, Katan J, Zamir D. RFLP mapping of *Il*, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race1. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 22–26. [\[DOI\]](#)
- [6] Sarfatti M, Katan J, Fluhr R, Zamir D. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistance gene *I2*. *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 755–759. [\[DOI\]](#)
- [7] Stall RE, Walter JM. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology*, 1965, 55: 1213–1215.
- [8] Laterrot H. Localisation chromosomique de *I-2* chez la

- tomato controlant la resistance au pathotype 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ann Amelior Plant*, 1976, 26: 485–491.
- [9] Simons G, Groenendijk J, Wijbrandi J, Reijans M, Groenen J, Diergaarde P, van der Lee T, Bleeker M, Onstenk J, Both M, Haring M, Mes J, Cornelissen B, Zabeau M, Vos P. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell*, 1998, 10: 1055–1068. [\[DOI\]](#)
- [10] Dax E, Livneh O, Alishevskiy E, Edelbaum O, Kekar N, Gavish N, Milo J, Geffen F, Blumenthal A, Rabinowitch HD, Sela I. A SCAR marker linked to the *ToMV* resistance gene *Tm2²* in tomato. *Euphytica*, 1998, 101(1): 73–77. [\[DOI\]](#)
- [11] Pooler MR, Ritchie DF, Hartung JS. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 32(9): 3121–3127.
- [12] Dong X, Cheng G, Jian W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primer. *System App Microbiol*, 2000, 23: 386–390.
- [13] LI Jun-Ming, SONG Yan, XU He-Jin, ZHOU Yong-Jian, Caranta C, FENG Lan-Xiang. Simultaneous identification of Multi-genes with resistance respectively to root-knot nematode and *TSWV* by PCR markers in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(6): 678–682.
李君明, 宋燕, 徐和金, 周永健, Caranta C, 冯兰香. 利用 PCR 技术同时鉴定番茄抗根结线虫和抗斑萎病毒基因. *园艺学报*, 2003, 30(6): 678–682.
- [14] CHEN Li-Jing, LI Jun-Ming, SONG Yan, LI Tian-Lai, XU He-Jin, ZHOU Yong-Jian. Simultaneous identification of multi-Genes with resistance to *tomato mosaic virus* and *tomato spotted wilt virus* by PCR markers in tomato. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(7): 982–986.
陈丽静, 李君明, 宋燕, 李天来, 徐和金, 周永健. 番茄抗番茄花叶病毒和斑点萎凋病毒病基因 PCR 标记的同时鉴定. *中国农业科学*, 2004, 37(7): 982–986.

《遗传》杂志征稿简则

《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办、科学出版社出版的学术刊物, 中文核心期刊, 已被美国生物学文摘、化学文摘、医学索引、俄罗斯文摘杂志和《中国学术期刊文摘》、《中国生物学文摘》等 20 余种国内外重要检索系统与数据库收录。据中国科学技术信息研究所统计, 2006 年度《遗传》总被引频次 1212 次, 在生物学类核心期刊中排名第 11 位; 影响因子 0.717, 在生物学类核心期刊中排名第 16 位。在您向本刊投稿之前, 请了解下列事项:

1. 征稿范围: 遗传学、发育生物学、基因组学等领域有创新性的研究论文; 遗传学研究的新技术与新方法; 学术争鸣与讨论; 遗传学热点问题的综述; 遗传学教学经验; 国内外著名遗传学家介绍(封面人物)以及遗传学热点问题的科普文章等。

2. 稿件要求: 只接收中文稿件, 请附详细的中英文摘要。题目应简洁明快; 名词术语使用规范; 使用法定的计量单位; 基因符号为斜体; 插图清晰, 表格为三线表, 图表中英文对照, 随文排版; 按顺序编码制正确引用参考文献, 保留全部引文作者姓名, 中文文献之前列出英文对照。

3. 投稿方式: 实行网上投稿和网上审稿。请登录我刊网站 <http://www.chinagene.cn/yc/index.asp>, 在《遗传》的“作者区”注册后, 按提示步骤完成投稿流程。如 3 日后未收到投稿回执的, 请及时发邮件查询(E-mail: ycz@genetics.ac.cn), 以免遗漏。请勿一稿两投, 学生投稿须经导师同意。如有署名争议及保密问题, 请勿投稿。

4. 审稿流程: 收到稿件后由编辑部严格初审。对于学术水平和写作格式未达到我刊要求的及时退稿。经责任编辑、外审专家、主编终审录用的稿件, 需编辑加工和英文编辑润色后再退给作者修改定稿。开辟绿色通道, 重大成果的研究论文予以优先发表, 或推荐到《遗传学报》发表。修订稿排版打印后给作者看清样, 请全部作者在《版权转让协议》上签名。

5. 稿件费用: 本刊投稿时不收取审稿费。录用的稿件寄清样时通知交纳版面费, 每印刷页码 200 元, 彩版费每页 800 元。发表后寄给作者样刊 5 本, 精美抽印本 30 份, 稿酬每版面 70 元。

以上措施自 2008 年 1 月 1 日起实行, 未尽事宜将在我刊网站另行通知。

《遗传》编辑部
2008 年 1 月 1 日