

番茄抗性基因 *Ty-2* 和 *Ph-3* 多重 PCR 的检测应用

林涛, 蔡锦玲, 郑凯玲, 黄青峰, 施爱玲 (泉州市农业科学研究所, 福建晋江 362212)

摘要 创建可以同时检测番茄抗黄化曲叶病毒病 *Ty-2* 基因和抗晚疫病 *Ph-3* 基因分子标记的多重 PCR 体系, 以快速准确地鉴定筛选到目标基因型。采用多重 PCR 结合 CAPS 技术, 同时加入 2 对引物 T0302 和 TG328, 进行扩增及酶切反应, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得不同基因型相应的带型, 从而建立多重 PCR 及产物酶切体系, 优化此体系后再进行验证与应用。该多重 PCR 体系可靠高效, 显示共有 9 种带型对应 *Ty-2* 和 *Ph-3* 基因相应的基因型, 与采用单引物普通 PCR 技术分别鉴定的基因型结果一致, 可以用于番茄分子标记辅助育种。

关键词 番茄; 多重 PCR; CAPS; 分子标记

中图分类号 S641.2 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)03-0101-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.03.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Application of Multiple PCR for *Ty-2* and *Ph-3* Genes in Tomato

LIN Tao, CAI Jin-ling, ZHENG Kai-ling et al (Quanzhou Institute of Agricultural Science, Jinjiang, Fujian 362212)

Abstract We established a multiplex PCR system to identify *Ty-2* and *Ph-3* resistance genes of tomato simultaneously, for rapid and accurate identification and screening of target genotype. Multiplex PCR-CAPS technology was used to amplify and react with two pairs of primers T0302 and TG328. 2% agarose gel electrophoresis was used to detect the corresponding bands to differentiate the genotype of the identified materials, and to establish multiplex PCR system. The results showed that there were 9 kinds of bands corresponding to the genotypes, which were consistent with the genotype identified by single primer PCR. The multiplex-PCR systems are reliable and efficient, it could be very useful for marker-assisted selection during early stage in tomato and speed up breeding procedure.

Key words Tomato; Multiple PCR; CAPS; Molecular marker

近年来,番茄黄化曲叶病毒病在我国广西到山东沿海省份,以及云南、山西、新疆、河南、安徽、河北等番茄主产区均有暴发^[1]。番茄晚疫病是致病疫霉菌感染所致,一旦暴发常导致减产,甚至绝产,是一种番茄的毁灭性病害^[2]。番茄黄化曲叶病毒病和晚疫病已成为高温多湿番茄产区抗病育种的主攻方向之一。抗病性的鉴定受到发病条件、植株生理状况、评价标准等影响,提高选择效率是创制和筛选鉴定番茄育种新材料的关键。借助分子标记技术可以对育种材料进行早期、高效的选择,加速品种选育与改良的进程^[3]。

目前已经在番茄中发现的抗 TYLCV 的基因有 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-4* 和 *Ty-5*, 其中抗性基因 *Ty-1* 和 *Ty-3* 为等位基因^[4]。*Ty-2* 基因是源于多毛番茄的单个显性基因, Garcia 等^[5] 开发了与 *Ty-2* 紧密连锁的共显性 SCAR 标记 T0302。番茄晚疫病抗性受两类不同的基因控制,一类是单基因控制的质量性状,包括完全显性基因 *Ph-1*, 不安全显性基因 *Ph-2* 和 *Ph-3*, 它们均来自醋栗番茄;另一类是多基因控制的数量性状,其抗病性与环境、植株长势等多种因素有关^[6]。*Ph-3* 基因是番茄抗晚疫病育种中分子标记辅助选择常用的一个基因^[7-10]。孔凡慧^[11] 的研究表明,标记 TG328 特异性引物可以很好地区分含番茄晚疫病抗性基因 *Ph-3* 的纯合抗性材料、杂合抗病材料和不含 *Ph-3* 的感病材料,可以应用于番茄抗晚疫病种质资源的辅助选择。然而在大中果型番茄种质中,抗黄化曲叶病毒病的材料基本上为含 *Ty-1* 基因,而含纯合 *Ty-2* 或 *Ph-3* 抗性基因的材料很少。陈宝

玲等^[12] 研究选用的 56 份大、中果型番茄材料,含杂合抗性基因 *Ty-2* 的材料仅 1 份;含纯合晚疫病抗性基因 *Ph-3* 的材料只有 1 份,杂合 6 份。多重 PCR 是在一个反应体系中同时扩增多个目的片段,与普通 PCR 相比有高效和低成本的优势^[13]。国内利用多重 PCR 技术对番茄抗性基因进行鉴定已有一定的研究,但能同时鉴定 *Ty-2* 和 *Ph-3* 基因的多重 PCR 体系尚未见报道^[14-16]。

该研究利用共显性分子标记 *Ty-2* 基因的 SCAR 的引物 T0302 和 *Ph-3* 基因的 CAPS 标记的引物 TG328, 结合多重 PCR 和 CAPS 技术的优点,从已知基因型的番茄材料中,获得不同基因型相应的带型,建立和优化可以同时检测这 2 个抗病基因分子标记的多重 PCR 体系,采用此技术通过酶切产物的带型来区别筛选目标材料的基因型。该研究增加了番茄黄化曲叶病毒病和晚疫病快速分子标记的鉴定手段,可促进抗性基因 *Ty-2* 和 *Ph-3* 的转育聚合,尤其在创制大果型番茄育种新材料及复合多抗品种分子标记辅助选育中具有一定的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 多重 PCR 技术建立与优化试验所用番茄材料(编号 1~9, A 为 CK1 和 B 为 CK2)来自泉州市农业科学研究所,已经田间病害鉴定过,单引物普通 PCR 已分别鉴定了 *Ty-2* 和 *Ph-3* 抗性基因的基因型。由表 1 可知,材料 1~3 号感番茄 *TY2*(*ty-2/ty-2* 基因型);4~6 号材料为纯合 *Ty-2* 基因型,表现为抗番茄 *TY2*;7~9 号为杂合 *Ty-2* 基因型;其中 2、5 和 8 号含杂合 *Ph-3* 抗性基因,3、6 和 9 号含纯合 *Ph-3* 基因型,而 1、4、7 号不含抗性基因 *Ph-3*。CK1 基因型为 *Ty-2/Ty-2* 和 *Ph-3/Ph-3*, 作双抗对照,CK2 则为双感对照。

基金项目 福建省科技项目(2017N0039)。

作者简介 林涛(1973—),男,福建泉州人,副研究员,从事蔬菜遗传育种研究。

收稿日期 2019-08-30;修回日期 2019-09-18

表1 试验所用材料及基因型

Table 1 The materials and their genotypes

编号 Code	材料 Material	基因型 Genotype	
		<i>Ty-2</i>	<i>Ph-3</i>
A	CK1	<i>Ty-2/Ty-2</i>	<i>Ph-3/Ph-3</i>
B	CK2	<i>ty-2/ty-2</i>	<i>ph-3/ph-3</i>
1	T 楠 7R6	<i>ty-2/ty-2</i>	<i>ph-3/ph-3</i>
2	CHT1848	<i>ty-2/ty-2</i>	<i>Ph-3/ph-3</i>
3	BT1644	<i>ty-2/ty-2</i>	<i>Ph-3/Ph-3</i>
4	CHT012	<i>Ty-2/Ty-2</i>	<i>ph-3/ph-3</i>
5	CHT426	<i>Ty-2/Ty-2</i>	<i>Ph-3/ph-3</i>
6	T35L5	<i>Ty-2/Ty-2</i>	<i>Ph-3/Ph-3</i>
7	TP1807	<i>Ty-2/ty-2</i>	<i>ph-3/ph-3</i>
8	1601F1	<i>Ty-2/ty-2</i>	<i>Ph-3/ph-3</i>
9	BT046	<i>Ty-2/ty-2</i>	<i>Ph-3/Ph-3</i>

1.2 DNA的提取与引物设计

采用改良的CTAB法^[17],提

取试验DNA后贮存在-20℃的冰箱中备用。参照Garcia等^[5]开发的共显性SCAR标记T0302设计*Ty-2*基因标记的引物序列,*Ph-3*基因的共显性CAPS标记TG328参照文献[7]的设计,所用标记的引物序列见表2,引物由北京天一辉远生物科技公司合成。

1.3 多重PCR体系的建立与优化

采用多重PCR结合CAPS技术,同时加入2对引物进行扩增后,再进行扩增产物CAPS的酶切反应,获得表1中番茄材料已知抗性基因*Ty-2*和*Ph-3*基因型组合所对应的带型,然后进一步优化该多重PCR及产物酶切体系。

PCR反应体系20 μL:2×EasyTaq PCR SuperMix(+dye) 10 μL,2对引物的正反引物(10 μmol/μL)各0.4 μL,DNA模板1.0 μL,ddH₂O补足至20 μL。

表2 标记的引物序列和信息

Table 2 The information and primer list of markers

标记名称 Marker name	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')	退火温度 T _m /℃	基因型 Genotype	产物大小 Product size/bp
SCAR T0302	F:TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC	55	<i>Ty-2/Ty-2</i>	900
	R:AGTGTACATCCTTGCCATTGACT		<i>Ty-2/ty-2</i>	900/800
			<i>ty-2/ty-2</i>	800
CAPS TG328	F:GCTGATCTGCTTATAGACTTGGG	58	<i>Ph-3/Ph-3</i>	260
	R:AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC		<i>Ph-3/ph-3</i>	500/260
			<i>ph-3/ph-3</i>	500

PCR反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸55 s,35个循环;72℃延伸10 min,4℃保存10 min。

酶切体系25 μL:2.2 μL ddH₂O,10×FastDigest Buffer 2.5 μL,快速限制性内切酶FastDigest *Mva*I(10 U/μL) 0.3 μL,混合后加到20 μL PCR产物中,在37℃的水浴条件下酶切15 min。

凝胶电泳检测:PCR产物或酶切产物用加有Gold View的2%琼脂糖凝胶在110 V电压条件下电泳30 min,在伯乐凝胶成像分析系统上显示结果。

1.4 多重PCR体系的验证与应用

采用经优化过的多重PCR体系对泉州市农业科学研究所的24份番茄材料(编号801~824)进行基因型鉴定应用,即通过多重PCR酶切产物带型区别判断其相应的基因型,再与使用单引物普通PCR扩增的特异性标记片段分别进行分析比对,以验证该多重PCR技术。

*Ty-2*基因单引物扩增的PCR反应体系为20 μL:10×PCR Buffer 2.0 μL(含Mg²⁺),dNTP(各2.5 mmol/μL) 0.4 μL,正反引物(10 μmol/μL)各0.4 μL,DNA模板1.0 μL,easyTaq酶(5 U/μL) 0.1 μL,ddH₂O补足至20 μL。PCR扩增程序为94℃预变性4 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸55 s,35个循环;72℃延伸10 min。

*Ph-3*基因单引物扩增PCR反应体系同*Ty-2*基因,PCR扩增程序退火温度为58℃,72℃延伸30 s,其他条件相同;酶切体系25 μL:2.2 μL ddH₂O,10×Buffer 2.5 μL,*Mva*I(*Bst*NI)酶(10 U/μL) 0.3 μL,混合后加到20 μL PCR产物

中,水浴温度37℃条件下,酶切2 h。

普通PCR产物于加有Gold View的1.2%琼脂糖凝胶、110 V电压下电泳20~30 min检测,在伯乐凝胶成像分析系统上显示结果。

以上PCR SuperMix(+dye)混合液、easyTaq酶、Buffer和dNTP订购自北京全式金生物技术公司,快切酶FastDigest *Mva*I和限制性内切酶*Mva*I(*Bst*NI)酶订购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

2 结果与分析

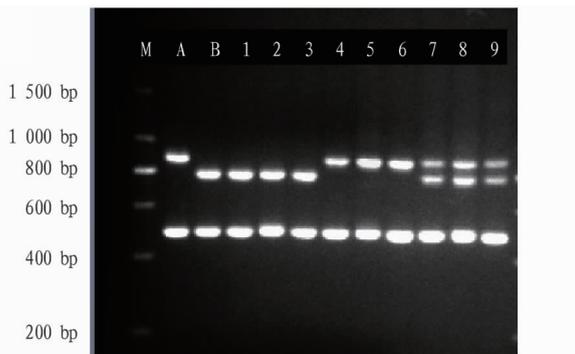
2.1 酶切前扩增的特异标记片段

分子标记SCAR引物T0302和CAPS引物TG328,分别与*Ty-2*基因和*Ph-3*基因紧密连锁,在PCR体系中同时加入这2对引物扩增后,酶切前产物条带清晰,目的条带符合预期,所有材料均可扩增出500 bp的条带(*Ph-3*基因酶切前抗感杂3种基因型的条带都是500 bp),另外基因型为*ty-2/ty-2*的B:CK2和材料1~3号扩增出一条800 bp的特异性片段,基因型为*Ty-2/Ty-2*的A:CK1和材料4~6号扩增出900 bp的SCAR标记的特异性片段,而基因型*Ty-2/ty-2*的材料7~9号还扩增出900、800 bp这2条特异性片段,可见同时加入这2对引物酶切前对扩增产物条带没有影响、互不干扰(图1)。

2.2 扩增产物酶切后的特异标记片段

为提高效率,同时加入2对引物扩增,20 μL产物加入快切酶,进行25 μL体系的酶切反应,凝胶电泳检测显示结果,以构建*Ty-2*和*Ph-3*这2个基因标记的多重PCR体系。结合表1和图2:2对引物的PCR条带清晰,材料1与B(CK2)基因型相同,双感对应显示2条特异性条带800、500 bp;基因型为*ty-2/ty-2*、

Ph-3/ph-3 的材料 2, 有 800、500 和 260 bp 大小的 3 条特异性条带; 材料 3 的基因型为 *ty-2/ty-2*、*Ph-3/Ph-3*, 只有 2 条特异性条带 800、260 bp。纯合抗病基因型为 *Ty-2/Ty-2* 的 A; CK1 和材料 4~6 号的 900 bp 特异性片段酶切成约 550、350 bp 的 2 条带, 4 号材料 (*Ty-2/Ty-2*、*ph-3/ph-3*) 显示有 3 条带, 5 号材料含杂合 *Ph-3* 基因酶切成 500、260 bp, 共有 4 条带, 6 号和 A (CK1) 的基因型为双抗 (*Ty-2/Ty-2*、*Ph-3/Ph-3*), 有 550、350 和 260 bp 大小的 3 条特异性条带。材料 7~9 号, 含杂合 *Ty-2* 基因对应应有 900、800、550 和 350 bp 大小的 4 条带, 加上 *Ph-3* 基因对应显示的条带, 双杂材料 8 号最多有 6 条带。

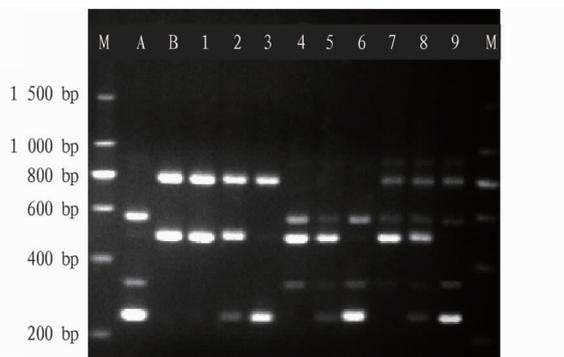


注: M. DNA Marker; A. CK1, 基因型 *Ty-2/Ty-2*、*Ph-3/Ph-3*; B. CK2, 基因型 *ty-2/ty-2*、*ph-3/ph-3*; 1~9 同表 1

Note: M. DNA Marker; A. CK1, the amplification of gene type *Ty-2/Ty-2*、*Ph-3/Ph-3*; B. CK2, the amplification of gene type *ty-2/ty-2*、*ph-3/ph-3*; 1~9. Same with table 1

图 1 酶切前的特异性片段

Fig. 1 Specific fragments before enzymatic digestion



注: M. DNA Marker; A. CK1, 基因型 *Ty-2/Ty-2*、*Ph-3/Ph-3*; B. CK2, 基因型 *ty-2/ty-2*、*ph-3/ph-3*; 1~9 同表 1

Note: M. DNA Marker; A. CK1, the amplification of gene type *Ty-2/Ty-2*、*Ph-3/Ph-3*; B. CK2, the amplification of gene type *ty-2/ty-2*、*ph-3/ph-3*; 1~9. Same with table 1

图 2 酶切后的特异性片段

Fig. 2 Specific fragments after enzymatic digestion

经多次重复试验结果表明, 快切酶将纯合 *Ty-2* 基因型的特异性片段 900 bp 切成约 550、350 bp 的 2 条带, 而杂合 *Ty-2* 基因型则表现为 900、800、550 和 350 bp 共 4 条带, 感番茄 *Ty2* 的 800 bp 大小的特异性条带无酶切位点; *Ph-3* 基因扩增产物酶切结果不受干扰。该多重 PCR 同时检测 2 个基

因 *Ty-2* 和 *Ph-3* 时, 可以通过分子标记电泳检测显示找到各自的带型, 这 9 份材料跑出对应基因型的 9 种带型, 最多显示有 6 条带的是双杂材料 8 号的带型。

2.3 同时检测 *Ty-2* 和 *Ph-3* 基因多重 PCR 体系的优化 研究过程中对 *Taq* 酶含量、2 对引物浓度、退火温度、PCR 扩增循环数, 以及快切酶用量和酶切时间等因素进行多重 PCR 技术的优化。最终确定使用前述试验方法中的 2× Easy*Taq* PCR SuperMix (+dye) 混合液扩增时, 不再增加 *Taq* 酶用量, CAPS 标记 TG328 引物正反引物浓度降为各 0.2 μL (10 mmol/L), 调整多重 PCR 退火温度为 56 °C、快切酶酶切反应为 10 min, 其他条件不变的情况下, 可获得清晰可辨的条带。

2.4 多重 PCR 体系的验证与应用 用该多重 PCR 技术, 对 24 份番茄材料进行 2 个基因 *Ty-2* 和 *Ph-3* 的基因型鉴定 (图 3, 编号 1~24 表示材料 801~824)。材料 1、5、8 和 14 带型相同, 有 550、350 和 260 bp 大小的 3 条带, 其基因型为双抗。材料 2、4、13 和 20 均有 800、260 bp 大小的 2 条带, 表明它们的基因型为 *ty-2/ty-2*、*Ph-3/Ph-3*; 材料 3 显示的 4 条带, 可知其基因型为 *Ty-2/Ty-2*、*Ph-3/ph-3*; 材料 6、7、9~12 这 6 份材料仅有 800、500 bp 大小的 2 条带, 说明它们的基因型为双感; 编号 15~19 和 21~23 共 8 份材料, 显示了相同的 5 条带, 表明其基因型为 *Ty-2/ty-2*、*Ph-3/Ph-3*; 材料 24 的带型表明它的基因型是 *ty-2/ty-2*、*Ph-3/ph-3*。

结合表 2, 单引物普通 PCR 鉴定可得材料 1、3、5、8 和 14 这 5 份材料含纯合 *Ty-2* 基因; 7、15~19 和 21~23 这 9 份材料有 2 条带, 说明其含杂合 *Ty-2* 基因; 800 bp 的单条带表明剩余的 10 份材料基因型是 *ty-2/ty-2* (图 4)。番茄晚疫病 *Ph3* 基因 CAPS 标记结果如图 5, 含有 *Ph3* 纯合抗病基因型的材料含有酶切位点, PCR 产物酶切后会产生 260 bp 的特异条带, 杂合基因型材料酶切后有 500 bp 和 260 bp 的 2 条特异条带, 而纯合感病基因型材料酶切后只有 1 条长度为 500 bp 的条带。材料 6、7 和 9~12 这 6 份材料显示只有 500 bp 的单条带, 含纯合感病基因; 2 份材料有 2 条带, 说明材料 3 和 24 含杂合 *Ph-3* 基因; 其他 16 份材料均含有纯合抗病基因。

上述多重 PCR 技术检测的材料基因型与单引物普通 PCR 分别检测所获的基因型进行综合比对, 两者最终结果一致, 说明选用 SCAR 标记 T0302 引物和 CAPS 标记 TG328 引物, 同时检测 *Ty-2*、*Ph-3* 基因的多重 PCR 体系可行性得到进一步验证。结合图 2 和图 3, 实际运用读图时, 带型显示为 6 条带的双杂材料和显示 800 bp 和 500 bp 这 2 条带的双感材料首先淘汰, 材料双抗基因型组合的带型 (显示为 3 条带 550、350 和 260 bp) 优先入选, 再根据这 2 个基因的优先顺序进行读图及材料选留, 如以检测 *Ty-2* 基因优先时先找无 800 bp 条带的带型, 以检测 *Ph-3* 基因优先时先找无 500 bp 条带的带型, 这样很容易通过读图判断筛选到目标基因型的材料。

3 结论与讨论

为快速准确地鉴定筛选到番茄抗性目标基因, 要求检测技术必须具有可靠性和操作的便利性。该研究在多重 PCR 体系优化研究过程中, 对 *Taq* 酶含量、2 对引物的正反引物浓



注: M. DNA Marker; 1~24. 801~824

Note: M. DNA Marker; 1~24. 801~824

图3 多重 PCR 对种质材料的鉴定结果

Fig.3 Identification results of germplasm materials by using multiple PCR



注: M. DNA Marker; 1~24. 801~824

Note: M. DNA Marker; 1~24. 801~824

图4 单引物普通 PCR 对种质材料 *Ty-2* 基因型的鉴定

Fig.4 Identification results of *Ty-2* genotypes of germplasm materials by single primer PCR



注: M. DNA Marker; 1~24. 801~824

Note: M. DNA Marker; 1~24. 801~824

图5 单引物普通 PCR 对种质材料 *Ph-3* 基因型的鉴定

Fig.5 Identification results of *Ph-3* genotype of germplasm materials by single primer PCR

度、退火温度、PCR 扩增循环数,及酶切反应中酶用量和反应时间等条件进行摸索。最终确定多重 PCR 反应体系为 20 μL ; 2 \times EasyTaq PCR SuperMix (+dye) 10 μL , SCAR 标记正反引物各 0.4 μL (10 mmol/L), CAPS 标记正反引物各 0.2 μL (10 mmol/L), DNA 模板 1 μL (100 ng), ddH₂O 补足至 20 μL 。PCR 扩增程序中退火温度为 56 $^{\circ}\text{C}$, 时间 1 min, 酶切时间调整为 10 min, 其他条件不变。

同时使用 2 个共显性分子标记的 2 对引物扩增时, 酶切前对扩增产物没有影响, 产物经酶切后, 可清晰分辨出最多

有 6 条带, 而且每个带型条带间距适当、容易区分不同的带型。通过带型可知该多重 PCR 体系酶切反应, 对 *Ph-3* 基因的扩增产物酶切结果不变, 与该基因单引物普通 PCR 技术鉴定所得的条带大小相同; 而 *Ty-2* 纯合抗病基因型 900 bp 的条带酶切成 550 和 350 bp 的 2 条带, 杂合基因型酶切后有 900、800、550 和 350 bp 的 4 条带, 但对基因型 *Ty-2/ty-2* 和 *ty-2/ty-2* 的 800 bp 的条带没有影响, 因此仍可通过带型判断它们的基因型。

(下转第 115 页)

境条件的限制,还有很多技术问题需要在生产实践中进一步探讨和完善解决。

3.1.2 嫁接时间。时间选择是嫁接成活的一个主要影响因素^[15]。通过多年的针叶树嫁接试验分析,一般针叶树嫩枝嫁接最适宜的时间是在5月下旬—6月中上旬。嫁接过早,接穗和砧木内部组织发育不完全;过晚,因气温过高,不利于组织愈合的产生^[16]。研究表明,温度在15~35℃时能产生愈伤组织,温度在25~30℃时愈伤组织生长最快。考虑到拉萨地区自然条件和气候特点,嫁接选择在5月底—6月初进行。

3.1.3 接穗保存。在长途运输中,如何保持接穗的新鲜和活力是需要解决的关键技术问题^[11]。此次嫁接试验接穗来自陕西榆林,到达西藏拉萨,由于路途遥远,运输时间长。运输过程必须在保温箱低温环境中进行,即在放置接穗的保温箱中隔层放置冰冻矿泉水、冰袋和接穗,尽可能减少接穗水分损失或出现高温现象。运达目的地之后,接穗必须立即放入4℃的冰柜中进行保鲜储藏,抑制接穗萌动,待嫁接使用,并组织技术人员在短时间内完成嫁接。

3.2 结论

3.2.1 接穗规格。彰武松嫩枝接穗嫁接成活率差异较大,为了提高成活率,嫁接时,必须选择粗度适宜、生长健壮的接穗。

3.2.2 嫁接时间。时间选择是提高嫁接成活率的关键,温度在15~35℃时能产生愈伤组织,温度在25~30℃时愈伤组织生长最快。嫁接过早或过晚,由于气温高低的变化,都会影响愈伤组织的产生。根据拉萨地区气候特点,彰武松嫩枝嫁接选择在5月底—6月初进行。

(上接第104页)

此多重PCR检测显示结果表明,共有9种带型对应相应的基因型,与单引物普通PCR分别鉴定的基因型综合分析后的结果一致。分子标记技术发展很快,李宗俊等^[18]采用委托专业机构检测的方式,使用第三代分子标记技术,利用KASP标记基于已知SNP检测来辅助番茄育种。然而短期内多数育种者在学习利用新技术的同时,充分应用已有设备和相应技术还是必经阶段。该多重PCR体系的基础是第二代分子标记技术,在实践中,即使带型中部分条带显色较弱,只要掌握一定的认读技巧,也可以通过带型的条带组成判断基因型,它能同时检测番茄抗黄化曲叶病毒病基因Ty-2和抗晚疫病基因Ph-3,且能区分其9种基因型组合,分子标记操作简便实用和省时高效。

参考文献

- [1] 薛东齐,李景富,许向阳,等. 番茄黄化曲叶病毒的系统发育分析及多重PCR快速检测[J]. 中国蔬菜,2012(24):27-35.
- [2] 徐鹤林,李景富. 中国番茄[M]. 北京:中国农业出版社,2007:205-207.
- [3] 李景富. 中国番茄育种学[M]. 北京:中国农业出版社,2011:213-220.
- [4] 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 DFDGL-class RNA-dependent RNA polymerases[J]. PLoS Genet, 2013, 9(3):1-11.
- [5] GARCIA B E, GRAHAM E, JENSEN K S, et al. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus resistance Ty2 locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm[J]. Tomato Genet, 2007, 57:21-24.

3.2.3 保存时间。嫩枝接穗保存时间与嫁接成活率呈负相关。存放时间越长,嫁接成活率越低。此次嫁接试验采用的接穗来自陕西榆林,属于长途运输的接穗,不宜长时间存放,为了提高嫁接成活率,应增加嫁接技术人员,短时间内完成嫁接试验。

参考文献

- [1] 罗怀斌,杨帆. 西藏人工造林主要树种选择[J]. 中南林业调查规划, 2012, 31(3):27-29.
- [2] 张翠叶. 拉萨市造林绿化成绩、存在的问题及对策分析[J]. 西藏科技, 2013(7):37-38, 44.
- [3] 大普穷,张昆林,叶彦辉,等. 西藏拉萨市工程造林的制约因素及其对策初探[J]. 西藏科技, 2010(5):13-15.
- [4] 旺加. 浅谈西藏植树造林存在的问题及应对策略[J]. 西藏科技, 2017(3):70-71.
- [5] 孟鹏,李玉灵,张柏习,等. 沙地彰武松与樟子松苗木抗旱生理特性比较[J]. 林业科学, 2010, 46(12):56-63.
- [6] 赵金龙,冷从斌,周建洪,等. 拉萨北山地区人工造林绿化树种选择初探[J]. 林业建设, 2019(1):24-29.
- [7] 米玛次仁,普布次仁,旦增尼玛,等. 拉萨南山和北山土壤物理性质分析[J]. 吉林农业, 2015(6):68-69.
- [8] 罗红,普布顿珠,朱雪林,等. 西藏人工造林作业区土壤肥力评价[J]. 应用生态学报, 2017, 28(5):1507-1514.
- [9] 罗红,吴建普,边巴多吉,等. 西藏人工造林作业区土壤养分特征研究[J]. 土壤学报, 2017, 54(2):421-433.
- [10] 夏成财,王纯华. 樟子松嫁接育苗速生丰产浅析[J]. 黑龙江农业科学, 2009(5):179-180.
- [11] 杨涛,刘喜东,王强,等. 樟子松嫩枝嫁接成活率的影响因素[J]. 西北农业学报, 2014, 23(7):191-196.
- [12] 李德玉,龙作义,李雪,等. 嫁接方法对红松异砧嫁接苗木质量的影响[J]. 中国林副特产, 2010(1):9-10.
- [13] 陈晓阳,沈熙环. 林木育种学[M]. 北京:高等教育出版社,2005.
- [14] 史文中. 彰武松嫁接繁殖技术[J]. 山西林业科技, 2013, 42(3):44-45.
- [15] 杜景升,侯林,孙仲序,等. 嫁接时间与管理措施对侧柏袋接育苗的影响[J]. 山东林业科技, 1993(2):17-19.
- [16] 谭健晖,杨章旗,覃开展. 马尾松嫁接种子园树体修剪试验[J]. 广西林业科学, 2003, 32(3):134-137.

- [6] BRADSHAW J E, HACKER C A, LOWE R, et al. Detection of a quantitative trait locus for both foliage and tuber resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] on chromosome 4 of a dihaploid potato clone (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) [J]. Theoretical and applied genetics, 2006, 113:943-951.
- [7] ROBBINS M D, MASUD M A T, PANTHEE D, et al. Marker-assisted selection for coupling phase resistance to Tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (Late Blight) in tomato [J]. HortScience, 2010, 45(10):1424-1428.
- [8] 张春芝. 番茄抗晚疫病 QTL 及 Ph-3 基因的分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.
- [9] ZHANG C Z, LIU L, WANG X X, et al. The Ph-3 gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans* [J]. Theoretical and applied genetics, 2014, 127(6):1353-1364.
- [10] 胡明瑜,白文钦,潘晓雪,等. 番茄抗晚疫病基因 Ph-3 的分子标记开发及应用[J]. 植物病理学报, 2018, 48(4):560-566.
- [11] 孔凡慧. 利用分子标记辅助选择技术创制番茄抗多种病害与耐贮藏育种材料的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2015.
- [12] 陈宝玲,甘桂云,王先裕,等. 126 份番茄材料的抗性基因分子标记检测[J]. 中国蔬菜, 2016(6):34-41.
- [13] 陈明洁,方周,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, 27(10):33-36.
- [14] 刘超勤,李景富,许向阳,等. 四重 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):119-123.
- [15] 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.
- [16] 孔凡慧,李帅,赵婷婷,等. 番茄 Ty-2, Ty-3 和 I-2 基因多重 PCR 鉴定技术[J]. 分子植物育种, 2015, 13(1):184-189.
- [17] 陈昆松,李方,徐昌杰,等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4):529-531.
- [18] 李宗俊,王先裕,刘梦蛟,等. 利用 KASP 分子标记技术辅助筛选多抗番茄材料[J]. 中国蔬菜, 2019(8):42-46.