

Codominant-SCAR技术的建立以及在番茄育种中的应用

国艳梅 杜永臣* 王孝宣 朱德蔚 高建昌

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 结合 SCAR 标记的原理与多引物 PCR 技术, 建立了共显性标记技术 Codominant-SCAR。利用该技术对 12 份番茄近等基因系进行了遗传鉴定, 结果表明该方法具有重复性好、迅速、简便、成本低的特点, 可用于番茄和其它作物的分子育种。

关键词: 番茄; SCAR; 共显性标记; 分子标记

中图分类号: S 641.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 06-1026-04

The Development of Codominant-SCAR and Its Application in Tomato Breeding

Guo Yanmei, Du Yongchen*, Wang Xiaoxuan, Zhu Dewei, and Gao Jianchang

(Institute of Vegetables and Flowers, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Codominant-SCAR was developed on the basis of combination of SCAR molecular marker and Multiplex-PCR. We used this new technique to identify twelve tomato NILs. The results indicated that the Codominant-SCAR was characterized by good reproducibility, low cost and time consuming. It is useful for the MAS application in tomato and other crops.

Key words: Tomato; *Lycopersicon esculentum*; SCAR; Codominant marker; Molecular marker

自 1992 年 Tanksley 等^[1]发表了以 RFLP 标记为主的高密度番茄连锁图谱以来, 番茄图谱中的标记不断增加。COS (Conserved Ortholog Set) 标记是利用番茄已有的 EST 序列与拟南芥基因组序列信息开发的一种标记技术, 使番茄图谱的 COS 标记增加到 300 个。但是 COS 标记与 RFLP 等标记一样存在费用高、步骤复杂、周期长、要求高质量 DNA 等缺点, 在辅助育种中很难推广。因此, 在分子育种中一些 RFLP、COS 等标记常被转化成简单方便的 SCAR (特征性片段扩增区域, Sequence characterized amplified region)、CAPS (酶切扩增多态性序列, Cleaved amplified polymorphism sequences) 等标记。SCAR 标记一般是由 RFLP、RAPD、AFLP 等标记转换而来, 其基本原理是根据已获得的标记片段的序列信息, 设计 1 对特异引物, 然后通过 PCR 来揭示多态性。但是多数 SCAR 标记为显性标记, 不能有效地区分纯合体与杂合体的基因型。本研究利用 SCAR 标记的原理和多引物 PCR 技术, 建立了一种共显性标记技术 Codominant-SCAR。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究应用的番茄材料为 TA517, TA1527, E6203, 以及 TA517 的 12 个近等基因系 (02P68、02P69、02P70、02P71、02P72、02P73、02P74、02P75、02P76、02P77、02P78、02P79)。TA517 是以普通番茄 (*Lycopersicon esculentum* E6203) 为遗传背景, 含有来自多毛番茄 (*L. hirsutum* LA1777) 第 4 染色体底部 50 cM 长的一段片段^[2], TA1527 是 TA517 的 1 个亚近等基因系, 含有的野生多毛番

收稿日期: 2005 - 01 - 25; 修回日期: 2005 - 04 - 11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370982); 农业部蔬菜遗传与生理重点实验室项目

*通讯作者 Author for correspondence

茄第4染色体的DNA片段比TA517短,长约为20 dM^[2]。

1.2 DNA的提取

所有试材播种于温室,待幼苗长到6~8片真叶时,提取细嫩叶片中的DNA进行分析。DNA提取参照Williamson等^[3]的CTAB小量提取方法,DNA贮存于-20℃的冰箱中备用。

1.3 引物设计

以COS标记T0974为研究对象,先将其转化成为CAPS标记,并得到了亲本材料TA1527和E6203的CAPS标记的PCR产物。将PCR产物送三博远志公司测序,测序结果分别命名为T0974-2F和T0974-3R。

对T0974-2F和T0974-3R序列用DNAMAN进行同源比较,再用Primer Premier 5.0对T0974-2F和T0974-3R序列进行设计,分别获得与TA1527和E6203基因型一致的显性SCAR引物,并命名为SCAR-A和SCAR-B(表1)。引物设计的最显著特点是SCAR-A和SCAR-B的上游引物分别处于其特异的DNA序列内,每个引物只能与相应的同源序列配对,而下游引物则是同一个引物。SCAR-A和SCAR-B分别与下游引物配对扩增得到分子量不同的PCR产物。

表1 引物名称及序列

Table 1 Primers and sequences

引物 Primers	上游引物序列 Upstream primer sequences	下游引物序列 Downstream primer sequences
COS	5'CGCCTTTCACAGAAAACCAT3'	5'ACTTGCAAAATCAAGGGTCG3'
SCAR-A	5'GTTCCTCTCCGCCGTCGTTCG3'	5'ACTTGCAAAATCAAGGGTCG3'
SCAR-B	5'TCAGACCCATATGAA GTTGTC A3'	5'ACTTGCAAAATCAAGGGTCG3'

SCAR-A和SCAR-B的PCR反应体系相同,均为50 ng模板、2.5 μL 10×PCR buffer、1.0 μL Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹)、1.25 U TaqDNA聚合酶、0.5 μL T0974-2F-138 (10 mmol·L⁻¹)或T0974-3R-115 (10 mmol·L⁻¹)、0.5 μL T0974R (10 mmol·L⁻¹)、2.5 μL dNTPs (10 mmol·L⁻¹),加超纯水至25 μL。

SCAR-A+SCAR-B优化的PCR反应体系:引物比例分别为上游引物SCAR-A (10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL、上游引物SCAR-B (10 mmol·L⁻¹) 1.0 μL及其共有的下游引物 (10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL,其余成分相同。

SCAR-A、SCAR-B及SCAR-A+SCAR-B的PCR扩增的程序相同:92℃ 3 min,40个扩增循环:92℃ 1 min,64℃ 1 min,72℃ 2 min,最后72℃ 8 min,保存温度4℃。

2 结果与分析

图1为利用CAPS引物、SCAR-A和SCAR-B引物对番茄材料TA1527与E6203的PCR扩增结果,以及利用引物SCAR-A+SCAR-B对其F₁的扩增结果。结果表明:CAPS引物扩增的PCR产物相同,约为370 bp,E6203与TA1527都有此谱带;根据E6203的序列设计的特异引物SCAR-B经扩增后仅在E6203中获得270 bp的PCR产物,而TA1527没有该特异谱带,表明该谱带为与E6203基因型一致的显性SCAR标记;根据TA1527的序列设计的特异引物SCAR-A经扩增后仅在TA1527中获得200 bp的PCR产物,而E6203没有该特异谱带,表明该谱带为与TA1527基因型一致的显性SCAR标记;同时加入SCAR-A和SCAR-B对F₁的PCR扩增结果分别获得了与E6203和TA1527基因型一致的谱带,两谱带的多态性正是两个引物多态性的叠加,分子量为270 bp和200 bp,表明获得了可同时区分亲本TA1527、E6203及其杂交一代的共显性SCAR标记。

上述结果表明,在将RFLP、COS或AFLP等多态性有无的标记转化为SCAR标记的过程中,如果同时知道父母本(双亲)的序列,可针对双亲的DNA序列信息设计特异引物,将其转化成与父本或与母本基因型一致的显性SCAR标记。本研究在获得与父本、母本基因型一致的显性SCAR标记的基础上,同时将父母本的特异引物加入到同一PCR反应体系中,得到了能同时鉴定父本、母本及其

杂合体的基因型的特异谱带。这样,本研究结合了 SCAR 标记和多引物 PCR 技术原理建立了能同时检测父本、母本及其杂合体基因型的共显性标记方法,并将其命名为 Codominant-SCAR 技术。

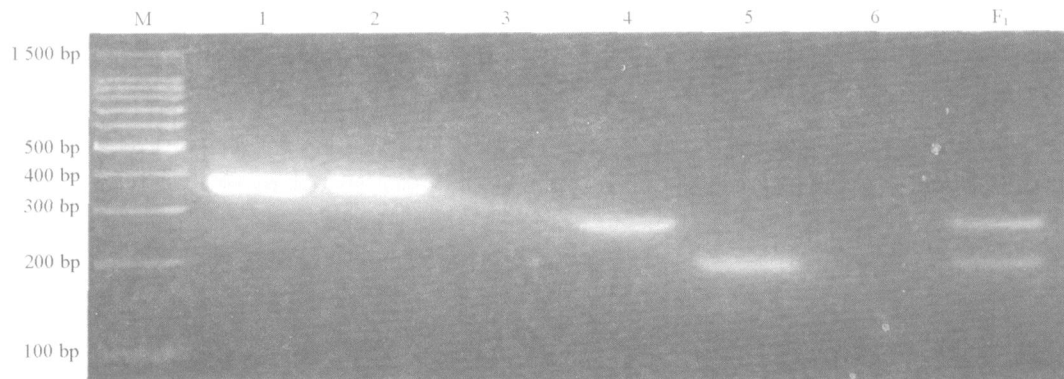


图 1 不同引物对番茄 TA1527、E6203 及其 F₁ 的 PCR 扩增结果

M: 标准分子量; 1, 3, 5: 番茄 TA1527; 2, 4, 6: 番茄 E6203; 1, 2: 未酶切的 CAPS; 3, 4: SCAR-B + 下游引物的 PCR 产物; 5, 6: SCAR-A + 下游引物的 PCR 产物; F₁: SCAR-A + SCAR-B + 下游引物对 F₁ 的扩增结果。

Fig. 1 The result of PCR amplified with different primers

M: 100 bp ladder; 1, 3, 5: tomato TA1527; 2, 4, 6: tomato E6203; 1, 2: noncleaved CAPS; 3, 4: amplified with SCAR-B + downstream primer; 5, 6: amplified with SCAR-A + downstream primer; F₁: amplified with SCAR-A + SCAR-B + downstream primer

02P68 ~ 02P79 是 TA517 的 12 个近等基因系。作者此前已经利用原始 COS 标记 T0974 对这 12 个近等基因系进行了遗传分析, 根据结果已知 02P68、02P69、02P71、02P72 和 02P75 表现出与 TA517 一致的谱带类型, 其余近等基因系与 E6203 表现一致^[4]。本试验中进而将 COS 标记 T0974 转化为 CAPS 标记后对 TA517 的 12 个近等基因系进行遗传鉴定也得到同样的结果。

图 2 为利用 Codominant-SCAR 技术对 TA517 的 12 个近等基因系的遗传鉴定结果。结果表明, TA517、02P68、02P69、02P71、02P72 及 02P75 的多态性表现一致, 得到 1 条 200 bp 的谱带, E6203、02P70、02P73、02P74、02P76、02P77、02P78 及 02P79 多态性表现一致, 得到 1 条 270 bp 的谱带, 与上述已知的结果一致。

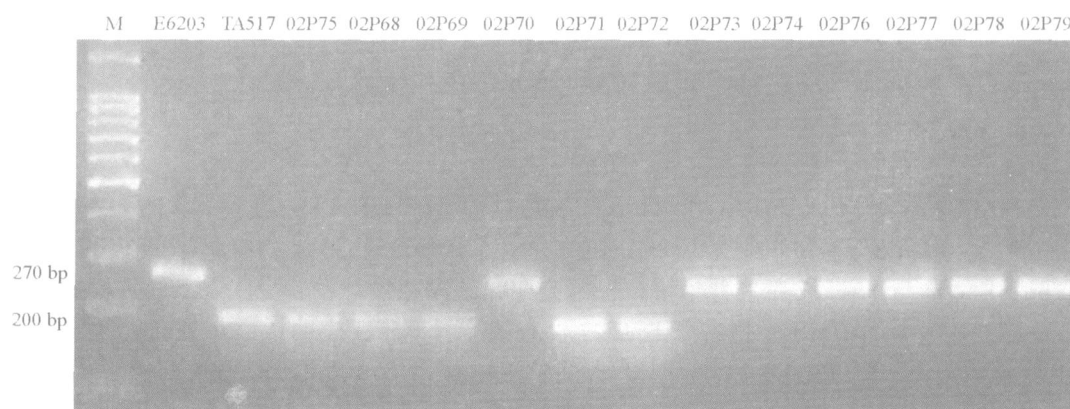


图 2 利用共显性标记技术 Codominant-SCAR 对 TA517 的 11 个近等基因系的遗传鉴定

M: 100 bp 标准分子量; 02P68 ~ 02P79: 分别为 TA517 的 12 个近等基因系。

Fig. 2 The genetic polymorphism of 11 sub-NLs using Codominant-SCAR

M: 100 bp marker; 02P68 - 02P79: 12 NLs of TA517.

3 小结

Codominant-SCAR 技术综合了 SCAR 标记技术与多引物 PCR 技术的优点, 根据已知的序列信息扩增不同长度的 PCR 产物, 获得了共显性标记。该标记是一种十分稳定的分子标记, 在应用上具

有迅速、简便、低成本的特点, 适合于样品的大量分析, 对于构建遗传图谱具优越性。由于共显性标记提供的信息量多, 对于鉴定杂交种子的纯度, 以及为新品种审定、保护品种知识产权等方面也提供了方法和技术借鉴。因此, 该技术对于提高番茄分子标记辅助育种的效率具有很重要的意义。对于番茄、水稻、玉米、拟南芥等序列信息丰富的植物, RFLP、RAPD、AFLP、COS等标记和已克隆的基因都可能根据其双亲的序列信息设计特异引物, 将其转换成共显性的SCAR标记。

参考文献:

- 1 Tanksley S D, Ganal M W, Prince J P, de Vicente M C, Bonierbale M W, Broun P, Fulton T M, Giovannoni J J, Grandillo S, Martin G B, Messeguer R, Miller J C, Miller L, Paterson A H, Pineda O, Roeder M S, Wing R A, Wu W, Young N D. High density molecular linkage maps of tomato and potato genomes. *Genetics*, 1992, 132: 1141 ~ 1160
- 2 Monforte A J, Friedman E, Zamir D. Comparison of a set of allelic QTL-N Ls for chromosome 4 of tomato: deductions about natural variation and implications for gemplasm utilization. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 572 ~ 590
- 3 Williamson V M, Ho J Y, Wu F F, Miller N, Kaboshian I. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 757 ~ 763
- 4 王孝宣. 增强番茄果实颜色基因的精细定位及相关基因的差异表达: [博士论文]. 北京: 中国农业科学院, 2004. 26 ~ 30
Wang X X. The fine mapping of genes increasing fruit color and differential expression of genes related to fruit color in tomato: [Ph. D. Dissertation]. Beijing: the Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2004. 26 ~ 30 (in Chinese)

第五届小菜蛾及其他十字花科蔬菜害虫治理国际研讨会 将在北京召开

由中国农业科学院蔬菜花卉研究所、中国园艺学会和美国康乃尔大学共同主办的第五届小菜蛾及其他十字花科蔬菜害虫治理国际研讨会将于 2006 年 10 月 24 ~ 27 日在北京召开。

会议内容: 十字花科蔬菜害虫的行为学、生物学和生态学, 十字花科作物系统中害虫与植物之间的互作关系, 十字花科蔬菜害虫的生物防治, 植物抗性及生境调控, 杀虫剂及杀虫剂抗性, IPM 研究及其应用。

会议承办单位: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 中国园艺学会。

会议主席: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所所长杜永臣博士、中国园艺学会理事长方智远院士、美国康乃尔大学托尼·谢尔顿 (Anthony M. SHELTON) 教授。

组织委员会主席: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所所长杜永臣博士、中国园艺学会理事长方智远院士。

学术委员会主席: 美国康乃尔大学昆虫系托尼·谢尔顿 (Anthony M. SHELTON) 教授, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所张友军研究员, 浙江大学应用昆虫研究所刘树生教授, 美国康乃尔大学昆虫系赵建周研究员。

会议语言: 英语。**地点:** 北京友谊宾馆。**网站:** <http://www.cicst.org.cn/WMDMOCP>。**论文摘要提交截止日期:** 2006 年 5 月 31 日。

会议秘书处:

联系人: 刘广树

地址: 北京中关村南大街 12 号

电话: 010 - 68919531, 68975140

电子邮箱: liugsh@caas.net.cn; liugsh2008@yahoo.com.cn

国外代表注册费 (美元)

分 类	2006 年 5 月 31 日前注册	2006 年 5 月 31 日后注册
正式代表	400	450
学生	250	300
正式代表参加一天	150	150
学生参加一天	110	110
陪同人员	100	100

国内代表注册费 (人民币)

分 类	2006 年 5 月 31 日前注册	2006 年 5 月 31 日后注册
正式代表	1 200	1 500
学生	800	1 000
陪同人员	700	800

单位: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所

邮编: 100081

传真: 010 - 62174123