

# 番茄抗黄化曲叶病毒基因 *Ty-1* 的双重 SNP 标记的开发

葛乃蓬, 崔 龙, 李汉霞, 叶志彪\*

(华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** 本试验旨在开发一种新的设计共显性 SNP 标记的方法, 以提高 SNP 标记检验的效率, 并将其成功应用于番茄抗黄化曲叶病毒基因 *Ty-1* 的 SNP 标记开发中, 提高了种质资源鉴定和育种分离世代材料筛选的效率。通过对抗病基因 *Ty-1* 和等位感病基因 *ty-1* 的 cDNA 序列进行比对, 挑选了两个稳定扩增的多元非同义突变位点, 分别用来设计 *Ty-1* 和 *ty-1* 的 SNP 标记 NL3 和 NL2, 将两个标记进行混合得到双重 SNP 标记 NL2-3。通过用 NL2-3 检验已知的抗病和感病番茄材料, 验证了其多态性和稳定性。并用 NL2-3 对抗感病材料的 F<sub>3</sub> 代杂交分离群体和普通自交系进行了 *Ty-1* 的筛选, 并经过田间观察进一步验证了该标记的可靠性。此方法开发得到的双重 SNP 标记只需要进行一次 PCR 反应和一次凝胶电泳就可以区分纯合抗、杂合抗、纯合感 3 种基因型, 提高了育种选择的效率。

**关键词:** 番茄; 抗番茄黄化曲叶病基因; 双重 SNP 标记

**中图分类号:** S 641.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 08-1583-08

## Double SNP Marker of *Ty-1* Alleles in a Co-dominant Manner in Tomato

GE Nai-peng, CUI Long, LI Han-xia, and YE Zhi-biao\*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In this research, a novel method to develop co-dominant SNP markers which was called double SNP markers was developed. This new approach was used to obtain a double SNP marker named NL2-3 of *Ty-1* gene resistant to TYLCV (Tomato yellow leaf curl virus) in tomato. The process of developing the NL2-3 double SNP marker included two main steps: Design specific primer pairs of resistant and susceptible genes individually based on two ideal SNP sites and mix the two specific primer pairs in one PCR reaction system with a proper ratio. With SNP marker NL2-3, we identified 5 resistant and 7 susceptible inbred lines and 3 homozygous *Ty-1/Ty-1* resistant individuals, 11 heterozygous *Ty-1/ty-1* ones and 2 homozygous *ty-1/ty-1* susceptible lines from F<sub>3</sub> segregation population. This result was consistent with the field inoculation assay. We concluded that as the first double SNP marker of *Ty-1* gene, NL2-3 can be directly applied to marker-assisted selection and would speed up the screening of

收稿日期: 2014-05-19; 修回日期: 2014-07-22

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25-A-02); 武汉市应用基础研究项目 (2014020101010070, 2013021702010584)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zbye@mail.hzau.edu.cn)

resistant breeding and cultivar evaluation.

**Key words:** tomato; *Ty-1*; double-SNP marker

近几年,由番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)引起的番茄黄化曲叶病已成为全世界番茄生产上危害最严重的病害之一(Jones, 2009)。培育抗病新品种是防治此病的根本途径(Abdelbacki et al., 2010)。已经从野生番茄中定位到了5个抗性基因:*Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-4*和*Ty-5*(Zamir et al., 1994; Hanson et al., 2000, 2006; Ji et al., 2008, 2009a, 2009b; Anbinder et al., 2009; Hutton et al., 2012; Verlaan et al., 2013),目前番茄抗病育种主要是用*Ty-1*及*Ty-3*作为主抗病基因源。*Ty-1*和*Ty-3*为等位基因,且基因序列已被克隆(Verlaan et al., 2013),这为基因标记辅助育种奠定了基础。

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)是指群体基因组DNA序列中单核苷酸的变化,包括单核苷酸的颠换、置换、插入和缺失,单核苷酸的多态性可以是二元、三元和四元的(Wang et al., 1998)。根据已知基因序列,利用SNP位点可以开发出有效的基因标记,与其它分子标记相比,SNP基因标记不会出现标记和目的基因的分离,遗传稳定性高,便于检测。目前开发SNP基因标记过程中应用最广泛的分型技术是等位基因特异PCR技术(Alelle Specific PCR, AS-PCR),主要是指巢式PCR和扩增耐突变系统(Amplification Refractory Mutation System, ARMS-PCR)。

等位基因特异PCR技术(AS-PCR)的基本原理是根据一个SNP位点设计特异引物,特异引物链的3'末端与SNP位点一种碱基类型相同或互补,另一条引物链按照正常引物设计的方法设计即可。特异引物只在一种基因型中有扩增的产物,在另一种基因型中没有。因此通过两次PCR反应和一次凝胶电泳显示扩增产物的有无,确定SNP基因型(Drenkard et al., 2000)。另外,为了提高引物的特异性,很多研究者提出在3'端的第2或第3位引入错配碱基,该错配碱基与3'末端的错配碱基共同作用,大大降低了引物与其3'末端不互补模板之间的错误延伸,从而提高了AS-PCR的准确性(Newton et al., 1989)。

巢式PCR是在设计特异引物的基础上增加1条引物链,与普通引物链形成对照,用3个引物链形成的两对引物进行巢式PCR,提高了引物特异性,减少了假阳性(Soleimani et al., 2003)。

Ye等(2001)研究的ARMS-PCR对巢式PCR做了进一步的改进,设计4条引物,针对SNP位点设计两条延伸方向相反的特异引物,引物的设计遵循AS-PCR错配碱基引入的设计方法,另外两条是外侧的普通链。如此,4条引物组成3对引物对,检测有3条带的是杂合型,有两条带的是纯合型,根据条带的大小可以判定是哪一种纯合型。只需要进行一次PCR反应和一次凝胶电泳就可以区分3种基因型。

本研究在Ye等(2001)的SNP分型技术的基础上做了进一步改进,即选取两个SNP位点,分别设计一对引物,其中一对引物的特异引物链的3'末端与感病SNP位点匹配,另一对引物的特异引物链的3'末端与抗病SNP位点匹配,引物的设计遵循AS-PCR错配碱基引入的方法。为了避免两对引物之间的干扰,选取的两个SNP位点在全基因组上相隔一定的物理距离(NL2和NL3相隔10 271 bp)。如此,4条引物组成3对引物,由于两个SNP位点足够远,非特异的两条引物链组成的引物对在有限的扩增时间内不能扩增出有效片段。此标记只需1次PCR反应和1次凝胶电泳显示就可区分3种基因型,凝胶电泳检测有两条带的是杂合型,有一条带的是纯合型,根据带的大小可以判定是哪一种纯合型,和普通AS-PCR需要两次PCR反应相比,减少了试验步骤,提高了检验效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

于 2013 年 4 月选用本实验室已知的通过 CAPS 标记 (Michelson et al., 1994; Chen et al., 2012) 检验和田间性状观察得到的高世代纯合抗番茄黄化曲叶病毒病材料 (H26、H31、H36、H86), 杂合抗病材料 (FH20、FH21、FH23、FH24) 和感病材料 (AC、HG2、HG4、HG61) 用于 SNP 分子标记的开发。

于 2013 年 10 月进行种质资源的筛选与鉴定: 对本实验室提供的感病材料 HG61 × 纯合抗病材料 H86 的  $F_3$  代分离群体和普通自交系材料进行随机 SNP 分型筛选鉴定。

### 1.2 基因组 DNA (gDNA) 的提取与引物设计

取各供试材料单株幼叶, 参考 CTAB 法 (Roger & Bendich, 1988) 提取基因组 DNA, 用 NanoDrop 2000 测定 OD 值, 并将其稀释至工作浓度  $300 \sim 500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

通过专利 (专利公开号为 WO2012125025 A1) 找到 *Ty-1* 及其感病等位基因 *ty-1* 的 cDNA 序列, 并根据文献 (Verlaan et al., 2013) 得到其 gDNA 序列及其在全基因组上的位置。用 Primer5.0 软件设计特异扩增的 PCR 引物, 引物由华大基因科技服务有限公司合成。

### 1.3 PCR 扩增及产物检测

单组引物 PCR 反应体系  $20 \mu\text{L}$ :  $10\times$  PCR Buffer  $2.0 \mu\text{L}$ , dNTP ( $10 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.4 \mu\text{L}$ , 正反引物 ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $0.4 \mu\text{L}$ , gDNA 模板 ( $300 \sim 500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , *Taq* 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.2 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足  $20 \mu\text{L}$ 。

双重引物 PCR 反应体系  $20 \mu\text{L}$ :  $10\times$  PCR Buffer  $2.0 \mu\text{L}$ , dNTP ( $10 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.4 \mu\text{L}$ , NL2 正反引物 ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $0.4 \mu\text{L}$ , NL3 正反引物 ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $0.2 \mu\text{L}$ , gDNA 模板 ( $300 \sim 500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , *Taq* 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.2 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足  $20 \mu\text{L}$ 。

Buffer、dNTP 和 *Taq* 酶订购自 Transgene 公司。

PCR 反应程序:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $3 \text{ min}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $57^\circ\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  复性  $105 \text{ s}$ , 进行  $35$  个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  保存  $10 \text{ min}$ 。

凝胶电泳检测: PCR 产物用加有 EB (溴化乙锭) 的 1% 琼脂糖在  $100 \sim 120 \text{ V}$  电压条件下电泳  $30 \sim 40 \text{ min}$ , 最终结果在凝胶成像系统上显示。

### 1.4 苗期抗病性鉴定

在密闭的玻璃温室内种植供试番茄材料, 在 3 叶期利用人工释放带番茄烟草花叶病毒的烟粉虱 (浙江大学提供) 接种番茄材料, 不喷施任何杀虫剂, 任其自然发病。接种后定期观察发病情况,  $30 \text{ d}$  后, 待感病对照材料 AC 完全发病时统计供试各番茄材料的发病情况。

番茄烟草花叶病毒病害严重度评价标准 (Friedmann et al., 1998): 0, 植株无任何感病症状; 1, 顶端叶尖和叶缘出现轻微的黄化; 2, 植株上部分叶片的末端出现轻微的黄化和卷曲; 3, 植株的叶片大面积变黄, 卷曲甚至有杯突出现, 同时叶片面积缩小, 但植株仍可继续生长; 4, 植株严重萎缩, 叶片变黄, 呈现杯突和卷曲, 植株停止生长。

与抗病对照 H26 和 FH20 症状一致的植株记为“抗病”, 与感病对照 AC 症状一致的植株记为“感病”。

2 结果与分析

2.1 SNP 位点的选取及引物的设计

通过 MultAlin 在线序列对比软件对比 *Ty-1* 和 *ty-1* 的 cDNA 序列,发现 20 个非同义 cSNP 位点,其中 *Ty-1* 和 *ty-1* 在 313 和 314 位上的碱基分别为 GT 和 CG,在 1 159~1 161 上的碱基分别为 GTG 和 ACA (图 1),分别将此二元 SNP 位点和三元 SNP 位点命名为 NL2 和 NL3。

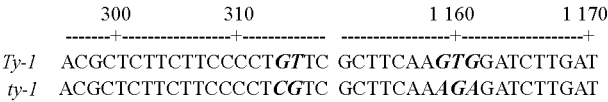


图 1 番茄 *Ty-1/ty-1* 基因 SNP 位点 NL2 和 NL3  
Fig. 1 *Ty-1/ty-1* SNP sites NL2 and NL3 of tomato

根据 NL2 和 NL3 设计特异引物 (图 2, 表 1)。因所选 SNP 位点为多元位点,所以特异引物的 3'末端具有很高的特异性,故没有在 3'末端引入错配碱基。NL2 的特异引物 (NL2-F) 3'端前两位碱基与感病基因 *ty-1* 的互补, NL3 的特异引物 (NL3-R) 3'端的前 3 位碱基与抗病基因 *Ty-1* 的互补。非特异引物 NL2-R 和 NL3-F 则为 *ty-1* 和 *Ty-1* 的通用引物。

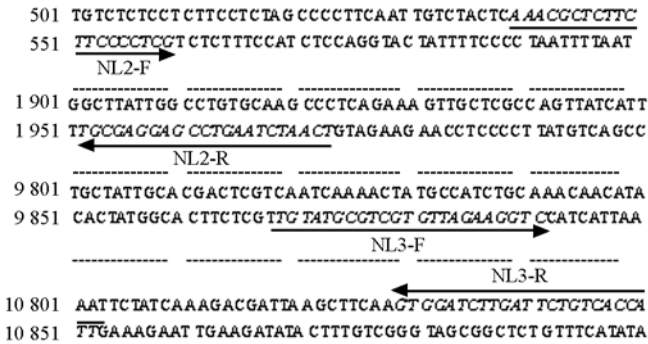


图 2 NL2 和 NL3 引物对在 *ty-1* 基因组上的位置  
Fig. 2 NL2 and NL3 primer pairs indicated in *ty-1* gDNA of tomato

表 1 基于 NL2 和 NL3 两个 SNP 位点的引物设计  
Table 1 The specific primers based on SNP sites NL2 and NL3

引物名称 Name of primer	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length of PCR product
NL3-F	5' TGTATGCGTCGTGTTAGAAGGTC 3'	984
NL3-R	5' AATGGTGACAGAATCAAGATCCAC 3'	
NL2-F	5' AAACGCTCTTCTTCCCCTCG 3'	1 434
NL2-R	5' AGTTAGATTCAAGGCTCCTCGCA 3'	

2.2 SNP 标记特异性和稳定性检验

通过对高世代番茄抗病自交系、感病自交系、抗病杂合材料进行特异引物 PCR 扩增,检验引物 NL2、NL3 及双重 PCR 引物对 NL2-3 的特异性与稳定性。

PCR 检验结果如图 3。在 NL2 引物对中扩增出特异条带 1 434 bp 的材料 (已知感病材料和杂合抗病材料), 其 NL2 位点含有 CG 碱基序列, 即感病等位基因 *ty-1*。在 NL3 引物对中扩增出特异条带 984 bp 的材料 (已知纯合抗病材料和杂合抗病材料), 其 NL3 位点含有 GTG 碱基序列, 即抗病等位基因 *Ty-1*。在 NL2-3 双重引物 PCR 扩增体系中, 能扩增出 1 434 bp 一条特异条带的材料其基因型为 *ty-1/ty-1*, 能扩增出 984 bp 一条特异条带的材料其基因型为 *Ty-1/Ty-1*, 能扩增出 1 434 bp/984 bp 两条特异条带的材料其基因型为 *Ty-1/ty-1*。结果表明, 特异引物 NL2 和 NL3 具有很好的特异性和稳定性, 双重引物 NL2-3 扩增结果是单引物扩增结果的叠加, 且能通过 1 次 PCR 反应和 1 次凝胶电泳, 便能区分供试材料的 3 种基因型。引物 NL2-3 可以用作番茄黄化曲叶病抗病基因 *Ty-1* 的双重 SNP 标记以辅助田间分子育种和种质资源的筛选。

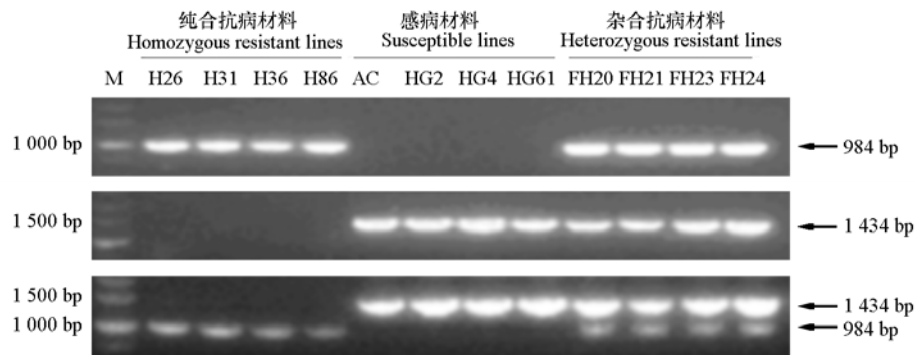


图 3 引物 NL3、NL2 和 NL2-3 PCR 扩增效果的特异性与稳定性  
Fig. 3 Specificity and sensitivity of primers NL3, NL2 and NL2-3

### 2.3 用于普通自交系和杂交分离世代群体的鉴定

用双重引物 NL2-3 对 12 个番茄育种自交系和 HG61 × H86 的  $F_3$  代分离群里中随机挑选的 16 个单株进行鉴定, 选择含有抗病基因 *Ty-1* 的单株。如图 4 所示, H86 为已知的抗病纯合对照, HG61 为感病对照, FH20 为抗病杂合对照。自交系材料 4、5、6、7 和 11 号株系为纯合抗病自交系, 株系 1、2、3、8、9、10 和 12 号株系为感病自交系。 $F_3$  分离材料 13、18、24 号单株为纯合抗病基因型 *Ty-1/Ty-1*; 14、15、17、19、21、22、23、25、26、27 和 28 号单株为杂合抗病基因型 *Ty-1/ty-1*; 16 和 20 号单株为感病基因型 *ty-1/ty-1*。分子鉴定结果 (图 4) 与苗期田间自然抗病观察结果 (表 2) 相一致。

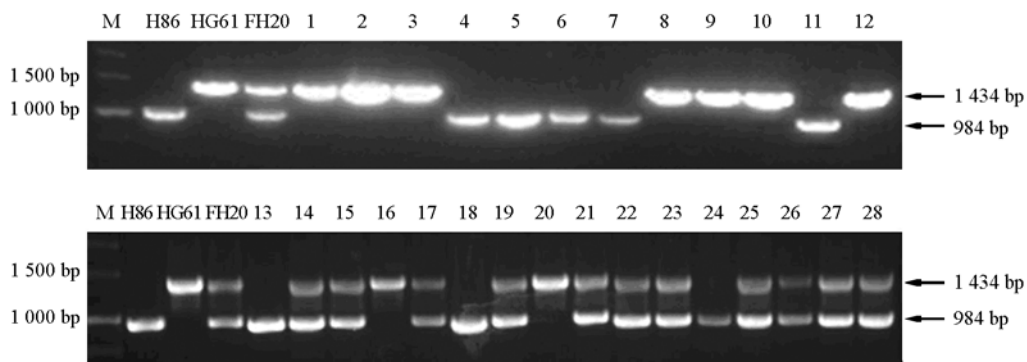


图 4 双重引物 NL2-3 检测番茄自交系 (1~12) 及  $F_3$  分离群体 (13~28) *Ty-1* 的 SNP 分型  
Fig. 4 Assaying SNP genotypes of tomato inbred lines (1~12) and  $F_3$  segregation population (13~28) with primer NL2-3

表 2 番茄自交系及 F<sub>3</sub> 分离群体抗黄化曲叶病毒病调查结果  
Table 2 The tomato inbred lines and F<sub>3</sub> segregation population selection of *Ty-1* and *ty-1*

群体 Population	编码 Number	品种或品系 Strain	田间调查 Field survey	分子鉴定 Molecular identification
自交系 Inbred lines	-	H86	抗病 Resistance	+/+
	-	HG61	感病 Sensibility	-/-
	-	FH20	抗病 Resistance	+/-
	1	HG22	感病 Sensibility	-/-
	2	HG23	感病 Sensibility	-/-
	3	HG8	感病 Sensibility	-/-
	4	H35	抗病 Resistance	+/+
	5	H209	抗病 Resistance	+/+
	6	H5F	抗病 Resistance	+/+
	7	H70	抗病 Resistance	+/+
F <sub>3</sub> 分离群体 F <sub>3</sub> segregation	8	HG17	感病 Sensibility	-/-
	9	HG19	感病 Sensibility	-/-
	10	HG25	感病 Sensibility	-/-
	11	H10	抗病 Resistance	+/+
	12	HG64	感病 Sensibility	-/-
	13	GH86-1	抗病 Resistance	+/+
	14	GH204-1	抗病 Resistance	+/-
	15	GH204-2	抗病 Resistance	+/-
	16	GHG2	感病 Sensibility	-/-
	17	GH1-10	抗病 Resistance	+/-
	18	GH26-1	抗病 Resistance	+/+
	19	GH1-14	抗病 Resistance	+/-
	20	BHG8	感病 Sensibility	-/-
	21	BH1-15	抗病 Resistance	+/-
	22	BH1-16	抗病 Resistance	+/-
	23	BH1-6	抗病 Resistance	+/-
	24	BH1-8	抗病 Resistance	+/+
	25	BH1-17	抗病 Resistance	+/-
	26	BH1-18	抗病 Resistance	+/-
	27	BH1-19	抗病 Resistance	+/-
	28	BH1-7	抗病 Resistance	+/-

3 讨论

3.1 双重 SNP 标记开发方法的应用

双重 SNP 标记作为一种新的 SNP 标记开发的方法，不仅可以应用到番茄抗病基因 *Ty-1* 的 SNP 标记开发过程中，还可以广泛应用到其他抗病基因（如番茄枯萎病抗病基因 *I-2*，叶霉病抗病基因 *Cf-9*，烟草花叶病抗病基因 *Tm-2<sup>a</sup>* 等以及与其他性状相关基因）的 SNP 标记开发中。

另外，由于此方法需要选取两个具有高度特异性和稳定性的 SNP 位点，如果通过序列比对和筛选只能得到一个理想的 SNP 位点，那只能考虑使用 ARMS-PCR，巢式 PCR 和普通的 AS-PCR 的开发方法，如和番茄果皮亮度相关的 *SIGDSL2* 基因的 SNP 标记的开发（Johann et al., 2013）。

如果选取的两个理想的 SNP 位点在全基因组序列上的物理距离比较近，则可以考虑两个特异引物共用一个普通的反向或正向引物，即 3 条引物组成两对引物。

### 3.2 多重 PCR 的影响因素

本试验开发 SNP 标记的方法是在 ARMS-PCR 和多重 PCR 的基础上进行了改进和综合, 多重 PCR 是指在一个 PCR 反应体系中加入多对引物, 同时扩增出多个目的片段。本试验中选取了两个 SNP 位点, 分别针对抗病突变位点和感病突变位点设计特异引物和普通引物, 然后将两对引物在同一 PCR 体系中反应, 即组成双重 PCR 体系。

一个理想的多重 PCR 体系并非单一 PCR 的简单混合, 需要针对各引物的量, PCR 循环体系, PCR 缓冲液成分, dNTP 的用量等进行不断分析和试验。本试验中通过不断调整 NL2 和 NL3 两个引物对的用量比例及双重 PCR 反应体系的退火温度, 发现 NL2 : NL3 的用量为 2 : 1, 退火温度为 57 °C 时扩增效果最理想。

另外, 两个目的基因的扩增片段长度需要有显著差异, 以便进行区分和检测, 在本研究中, 抗感病基因的扩增片段长度分别为 984 bp 和 1 434 bp, 在凝胶电泳检测时很容易区分。

### 3.3 番茄抗黄化曲叶病毒病鉴定

目前, 番茄抗黄化曲叶病毒病鉴定常用的方法有: 烟粉虱接种鉴定 (Azizi et al., 2008), 农杆菌侵染克隆鉴定 (Picó et al., 2001); 嫁接接种鉴定 (Pilowsky & Cohen, 1990) 及基因枪轰击法鉴定 (Lapidot et al., 2007)。本试验为了使检验环境更接近于自然发病情况, 采用了烟粉虱温室接种鉴定的方法。另外, 此方法还适用于大量筛选抗病育种材料。

## References

- Abdelbacki A M, Taha S H, Sitohy M Z, Abou Dawood A I, Abd-El Hamid M M, Rezk A A. 2010. Inhibition of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) using whey proteins. *Virology Journal*, 7: 26.
- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M, Levin I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor Appl Genet*, 119 (3): 519 – 530.
- Azizi A, Mozafari J, Shams-bakhsh M. 2008. Phenotypic and molecular screening of tomato germplasm for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6 (4): 199 – 206.
- Chen S X, Du J N, Hao L N, Wang C Y, Chen Q, Chang Y X. 2012. Identification of markers tightly linked to tomato yellow leaf curl disease and root-knot nematode resistance by multiplex PCR. *Genetics and Molecular Research*, 11 (3): 2917 – 2928.
- Drenkard E, Richter B G, Rozen S, Stutius L M, Angell N A, Mindrinos M, Cho R J, Oefner P J, Davis R W, Ausubel F M. 2000. A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map based cloning in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124 (4): 1483 – 1492.
- Friedmann M, Lapidot M, Cohen S, Pilowsky M. 1998. A novel source of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J Amer Soc Hort Sci*, 123 (6): 1004 – 1007.
- Hanson P, Green S K, Kuo G. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning gemini virus resistance in tomato. *Tomato Genet Coop Rep*, 56: 17 – 18.
- Hanson P M, Bernacchi D, Green S, Tanksley S D, Muniyappa V, Padmaja A S, Chen H, Kuo G, Fang D, Chen J T. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. *J Amer Soc Hort Sci*, 125 (1): 15 – 20.
- Hutton S F, Scott J W, Schuster D J. 2012. 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. *HortScience*, 47 (3): 324 – 327.
- Ji Y, Salus M S, van Betteray B, Smeets J, Jensen K S, Martin C T, Mejía L, Scott J W, Havey M J, Maxwell D P. 2008. Co-dominant SCAR markers for detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* loci from *Solanum chilense* at 25 cM of chromosome 6 of tomato. *Tomato Genet Coop Rep*, 57: 25 – 29.
- Ji Y, Scott J W, Schuster D J. 2009a. Toward fine mapping of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato.

- HortScience, 44 (3): 614 – 618.
- Ji Y, Scott J W, Schuster D J, Maxwell D P. 2009b. Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *J Amer Soc Hort Sci*, 134 (2): 281 – 288.
- Johann P, Cécile B, Daniel J, Virginie, G, Jean-Philippe M, Didier M, Bénédicte B, Jérôme J, Frédéric D, Rothan C. 2013. Analyses of tomato fruit brightness mutants uncover both cutin-deficient and cutin-abundant mutants and a new hypomorphic allele of GDSL lipase. *Plant Physiology*, 164: 888 – 906.
- Jones R A C. 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving, emergence effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141 (2): 113 – 130.
- Lapidot M, Weil G, Cohen L, Segev L, Gaba V. 2007. Biolistic inoculation of plants with *Tomato yellow leaf curl virus* DNA. *Journal of Virological Methods*, 144 (1): 143 – 148.
- Michelson I, Zamir D, Czosnek H. 1994. Accumulation and translocation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology*, 84 (9): 928 – 933.
- Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, Powell S J, Summers C, Kalsheker N, Smith J C, Markham A F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA, the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17 (7): 2503 – 2516.
- Picó B, Ferriol M, Díez M J, Viñals F N. 2001. Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Pathology*, 83 (3): 215 – 220.
- Pilowsky M, Cohen S. 1990. Tolerance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease*, 74 (3): 248 – 250.
- Roger S O, Bendich A J. 1988. Extraction of DNA from plant tissue//Gelvin S B, Schiperoort R A, Verma D S. *Plant Molecular Biology Manual*, A6. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher: 73 – 83.
- Soleimani V D, Baum B R, Johnson D A. 2003. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Mol Biol Rep*, 21 (3): 281 – 288.
- Verlaan M G, Hutton S F, Ibrahim R M, Kormelink R, Visser R G F, Scott J W, Edwards J D, Bai Y L. 2013. The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-Class RNA – dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics*, 9 (3): e1003399.
- Wang D G, Fan J B, Siao C J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris M S, Shen N P, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson T J, Lipshutz R, Chee M, Lander E S. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphism in the human genome. *Science*, 280: 1077 – 1082.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A R, Day I N. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 29 (17): e88.
- Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van-Oss, H, Kedar N, Rabinowitch H D, Czosnek H. 1994. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene *Ty-1*. *Theor Appl Genet*, 88 (2): 141 – 146.