

# 棕果番茄 *gf* 位点等位基因的分子检测

曹丹丹, 孙朝辉, 任平平, 宋莹, 程斐

(青岛农业大学园艺学院 山东青岛 266109)

**摘要:** 红果番茄 *GF* 基因位点的绿果肉 (green-flesh, *gf*) 突变体有 *gf*、*gf*<sup>2</sup>、*gf*<sup>3</sup>、*gf*<sup>4</sup>、*gf*<sup>5</sup> 共 5 种等位基因, 因其特殊的果实颜色而受到大众喜爱。笔者调查发现, *gf* 位点突变体具有抗番茄褪绿病毒病的功能, 但有些棕果番茄并不是 *gf* 位点突变体。从 300 份候选材料中选取 6 份棕果番茄材料, 并以易感褪绿病毒的番茄红果材料 ‘T2015-47’ 为对照, 以 *gf* 位点特异引物进行检测。试验结果表明, ‘T2016-33’ 不能酶切出 109 bp 和 57 bp 的特异条带, 为 *gf* 基因突变体; ‘2012-2’ 酶切出 187 bp 和 171 bp 的特异条带, 为 *gf*<sup>2</sup> 基因突变体; ‘T2015-66’ 和 ‘T2016-32’ 酶切出 216 bp 和 18 bp 的特异条带, 为 *gf*<sup>4</sup> 基因突变体。建立了利用分子标记快速准确鉴定出棕果番茄是否为 *gf* 位点突变体的方法, 为选育抗褪绿病毒的棕果番茄品种提供了辅助手段。

**关键词:** 棕果番茄; *gf* 位点; 基因标记

## Molecular screen for *gf* gene in six brown tomato varieties

CAO Dandan, SUN Zhaohui, REN Pingping, SONG Ying, CHENG Fei

(Horticultural College of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China)

**Abstract:** There are five mutant genes including *gf*, *gf*<sup>2</sup>, *gf*<sup>3</sup>, *gf*<sup>4</sup>, *gf*<sup>5</sup> for *GF* allele. The mutant gene result in red tomato turn into green and brown tomato. The brown tomatoes is one of the most favored fruits by people for its special fruit colour. Our latest research showed that *gf* mutant gene was strongly resistant to *Tomato Chlorosis Virus* (ToCV). In order to establish rapid molecular screen method for *gf* gene, 6 brown tomato varieties were chosen from 300 candidates as materials and the red tomato ‘2015-47’ was used as control. The result showed that none of 109 bp and 57 bp specific bands were digested for variety ‘T2016-33’ that was *gf* mutant; a 187 bp and a 171 bp specific bands were amplified for variety ‘2012-2’ that was *gf*<sup>2</sup> mutant; a 216 bp and a 18 bp specific bands were amplified for ‘T2015-66’ and ‘T2016-32’ that were *gf*<sup>4</sup> mutant. In this experiment we established a rapid and exact method to identify the *gf* mutant gene that accelerate brown tomato breeding.

**Key words:** Brown tomato; *gf* locus; Molecular marker

在许多植物的果实成熟和叶片衰老过程中, 叶绿素不降解或降解不完全导致其出现滞绿现象, 发生的个体为滞绿突变体<sup>[1]</sup>。到目前为止, 在拟南芥、玉米、烟草、高粱等诸多植物中都发现了滞绿突变体<sup>[2-5]</sup>。Thomas 和 Howarth<sup>[3]</sup>根据衰老时叶绿素含量和光合能力将滞绿突变体分为了 5 类。目前, 人们对番茄的需求不止于风味, 更重视它所起到的保健功能, 紫果或棕果番茄具有独特的外观, 富含强抗氧化能力的花青苷, 营养价值较高, 受到人们的极大关注<sup>[6]</sup>。但是研究发现, 并不是所有的紫果或棕果番茄均富含花青苷, 有些紫果或棕果番茄属于 C 型非功能型绿果肉突变体, 这种类型的番茄在果实转红期间叶绿素并不完全消失, 而且番茄红素逐渐

积累, 也会使果实呈现棕色至紫黑色等不同程度颜色的变化<sup>[7]</sup>。虽然同自然生长的紫果或棕果番茄相比, 番茄绿果肉突变体中花青苷含量低, 但它的出现为番茄植株叶片衰老的机制研究、果实成熟以及基因功能研究提供了新的思路。同时, 番茄绿果肉突变体在粉虱入侵后对病毒的抗病性方面也表现较好, 对生产的意义巨大。

近年来, 越来越多的人开始利用分子生物学的方法对滞绿突变体进行研究。番茄 *gf* 位点突变体, 也就是番茄绿果肉突变体, 最早在 1955 年被发现, 经研究发现该突变体是由第八染色体上的单个隐性基因 *SGR* (即 *GF* 基因) 控制的, 该基因位于 *CT265* 和 *CT148* 之间 0.44 cM 区域<sup>[8-10]</sup>。为了确定

收稿日期: 2017-03-12; 修回日期: 2017-06-14

基金项目: 山东省农业良种工程项目: 番茄、黄瓜、西葫芦种质资源精准鉴定与创新利用研究 (2016LZGC033)

作者简介: 曹丹丹, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为蔬菜学。E-mail: 18765908245@163.com

通信作者: 程斐, 男, 副教授, 研究方向为蔬菜学。E-mail: chengfei246246@163.com

该基因的变化, HU 等<sup>[11]</sup>克隆了番茄 *gf* 位点突变体和野生番茄中的 *LeSGR1* 基因, 进行 DNA 序列比对, 比对结果发现, 在番茄 *gf* 位点突变体中发生了单核苷酸替换, 导致氨基酸发生了变化。Barry 等<sup>[7]</sup>发现 *gf* 位点有 *gf*、*gf*<sup>2</sup>、*gf*<sup>3</sup>、*gf*<sup>4</sup>、*gf*<sup>5</sup> 共 5 种等位基因, 并且开发了检测 *gf*、*gf*<sup>2</sup>、*gf*<sup>5</sup> 突变体的标记。肖良军等<sup>[12]</sup>用 RT-PCR 法扩增到 *gf* 突变体中的 cDNA 序列, 将其与红色番茄 *GF* 基因的 cDNA 序列进行比对, 设计出检测 *gf*<sup>3</sup>、*gf*<sup>4</sup> 突变体的 dCAPS 标记。笔者综合了上述分子标记的方法对 6 种棕果番茄材料进行检测, 以确定试验材料是否为 *gf* 位点突变体及所属突变体类型, 为后续番茄材料的抗病育种以及相应 *SGR* 基因研究提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 7 份番茄材料由青岛农业大学程斐老师提供, 从 300 份候选材料中筛选而来, 其中 ‘T2015-65’ ‘T2015-66’ ‘2012-2’ ‘2012-3’ ‘T2016-33’ ‘T2016-32’ 为棕果番茄, 编号 1~6, 以 ‘T2015-47’ 红果番茄为对照。所有番茄均于 2015 年 5 月中旬播种于 72 孔穴盘中, 待幼苗长至 3 叶 1 心时移栽至即墨试验基地, 常规管理。

1.1.2 试剂及引物设计 特异性引物参考 Barry 等<sup>[7]</sup>和肖良军等<sup>[12]</sup>的设计, 由青岛擎科梓熙生物有限公司合成。各引物序列及扩增产物长度见表 1。酶切所需限制性内切酶 Hpy188I 酶由 NEB 公司提供, 限制性内切酶 MseI 酶、DdeI 酶由 Takara 生物技术有限公司提供。其他用于 PCR 反应和凝胶电泳的试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

表 1 引物序列及扩增片段长度

引物	核苷酸序列 5'—3'	产物大小/bp
U316068F	GGACTTTTATCAAACAGCTAACTTGCA	2 550
U316068R	GGCACAACCCAACCTTACAATAATTGTA	
<i>gf</i> allele-f	GTCCATTGCCACATTAGTGAGGCC	166
<i>gf</i> allele-r	GACACAGGACCAATAACAATTTTGGA	
<i>gf</i> <sup>2</sup> caps-f	ATCTTGAATCTGCATCTACATCGTA	358
<i>gf</i> <sup>2</sup> caps-r	CCTATGGTTGTGTGTTTGATCCTCC	
dCAPS-F	CTATTGGTTTGATATTGTTA	231
dCAPS-R	CTGAGAATTATTGTGGCTT	

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 取番茄新鲜幼嫩叶片, 采用北京天根生物科技有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒提取番茄基因组 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量, -20 °C 冰箱中保存备用。

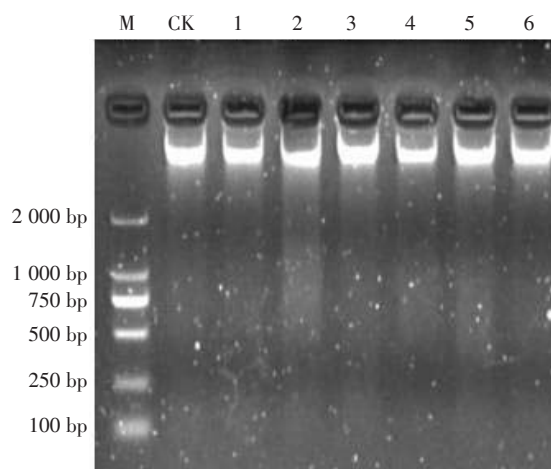
1.2.2 PCR 扩增和酶切 PCR 反应总体系为 20 μL: 模板 DNA 20 ng, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 0.4 μL, 上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 1.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1.25 U, 10×Buffer 2.0 μL, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20 μL。

用表 1 中引物对 *gf*allele-f/*gf*allele-r 对番茄基因组 DNA 进行 PCR 扩增后, 产物经限制性内切酶 Hpy188I 于 37 °C 下酶切 1 h, 可检测是否为 *gf* 突变体; 利用引物对 *gf*<sup>2</sup> caps-f/*gf*<sup>2</sup> caps-r 进行 PCR 扩增后, 产物经限制性内切酶 MseI 于 60 °C 下酶切 1 h, 可检测是否为 *gf*<sup>2</sup> 突变体; 用引物对 dCAPS-F/dCAPS-R 进行 PCR 扩增, 产物经限制性内切酶 DdeI 于 37 °C 下酶切 1 h, 可检测是否为 *gf*<sup>3</sup> 或 *gf*<sup>4</sup> 突变体; 用引物对 U316068F/U316068R 进行 PCR 扩增可检测是否为 *gf*<sup>5</sup> 突变体。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 退火 (*gf*allele-f/*gf*allele-r 60 °C、*gf*<sup>2</sup> caps-f/*gf*<sup>2</sup> caps-r 58 °C、dCAPS-F/dCAPS-R 50 °C、U316068F/U316068R 54 °C) 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。各 PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 酶切片段用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 番茄基因组 DNA 电泳检测

在紫外分光光度计下检测基因组 DNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值, 比值均在 1.9 左右, 纯度较高, 可以用于后续试验。同时, 用琼脂糖电泳检测的 DNA 条带清晰, 无降解弥散现象(图 1), 质量较好。



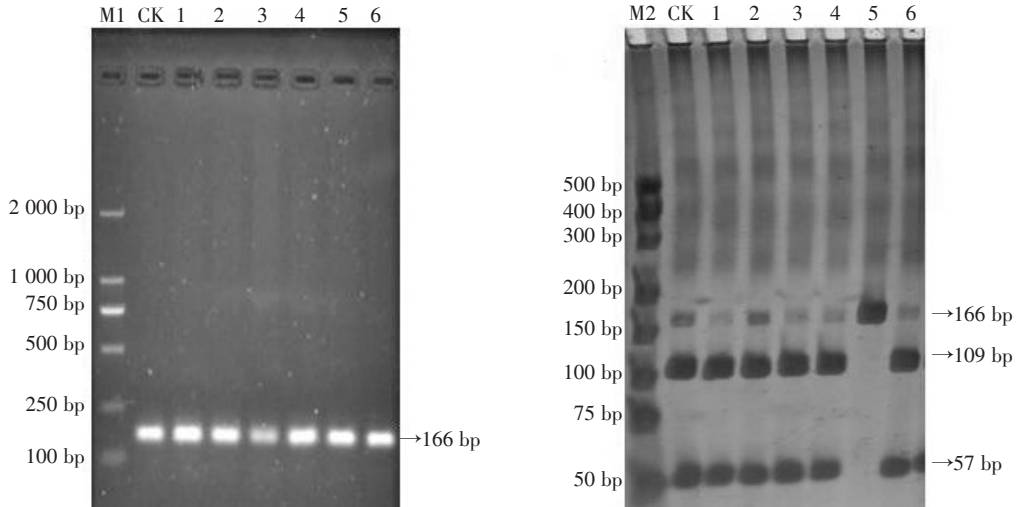
M: DL 2000 DNA Marker; CK: T2015-47; 1~6: T2015-65、T2015-66、2012-2、2012-3、T2016-33、T2016-32(下同)。

图 1 番茄基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

### 2.2 棕果番茄材料 *gf* 基因的分子标记检测

用特异性引物 *gf* allele-f/*gf* allele-r 对番茄基因组 DNA 进行 PCR 扩增,所有材料均能扩增出 166 bp 的条带(图 2)。PCR 产物经限制性内切酶 Hpy188I 酶切后,在 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳下检

测, *gf* 突变体番茄的 PCR 产物不能被酶切,其他的均能被酶切为 109 bp 和 57 bp 的条带。结果显示, 1~4、6 号番茄材料同对照一样,都能被酶切为 2 条带,只有 5 号不能被酶切,即番茄材料‘T2016-33’为 *gf* 基因突变体。



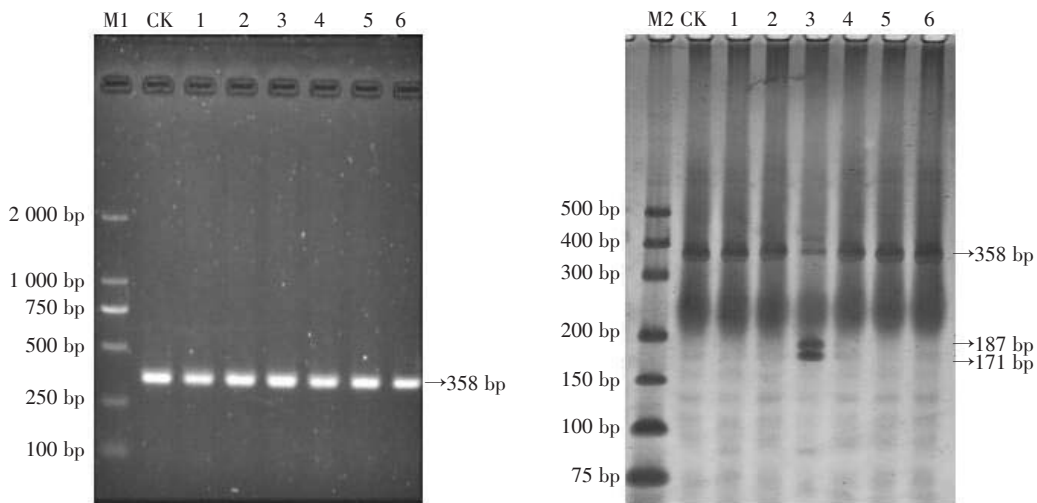
M1:DL2000 DNA Marker; M2:DL500 DNA Marker。

图 2 *gf* 基因的分子标记检测

### 2.3 棕果番茄材料 *gf*<sup>2</sup> 基因的分子标记检测

用特异性引物 *gf*<sup>2</sup> caps-f/*gf*<sup>2</sup> caps-r 对番茄基因组 DNA 进行 PCR 扩增,所有材料均能扩增出 358 bp 的条带(图 3)。经限制性内切酶 MseI 酶切

后, *gf*<sup>2</sup> 突变体番茄的 PCR 产物被酶切为 187 bp 和 171 bp 的片段,其他的不能被酶切。结果显示, 1、2、4~6 号条带与对照相同,没有被酶切,3 号被酶切为 2 条带,即番茄材料‘2012-2’为 *gf*<sup>2</sup> 基因突变体。



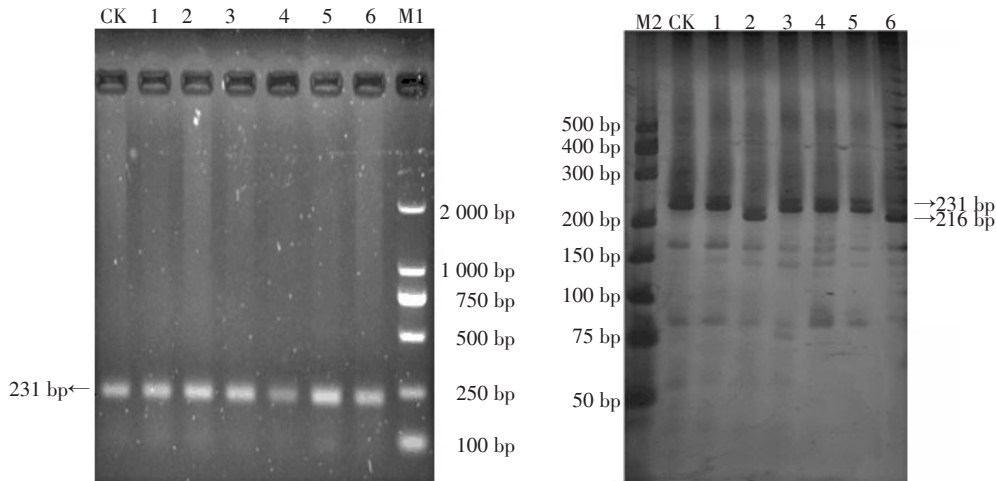
M1:DL2000 DNA Marker; M2:DL500 DNA Marker。

图 3 *gf*<sup>2</sup> 基因的分子标记检测

### 2.4 棕果番茄材料 *gf*<sup>3</sup> 和 *gf*<sup>4</sup> 基因的分子标记检测

用特异性引物 dCAPS-F/dCAPS-R 对番茄基因组 DNA 进行 PCR 扩增,所有材料均能扩增出 231 bp 的条带(图 4)。PCR 产物在限制性内切酶 DdeI 酶

切后,若为 *gf*<sup>4</sup> 突变体,PCR 产物则被酶切为 216 bp 和 18 bp 的片段,若为 *gf*<sup>3</sup> 突变体,被酶切为小于 200 bp 的片段,其他的不能被酶切。结果显示, 2、6 号被酶切为 216 bp 和 18 bp 片段(18 bp 片段较小,



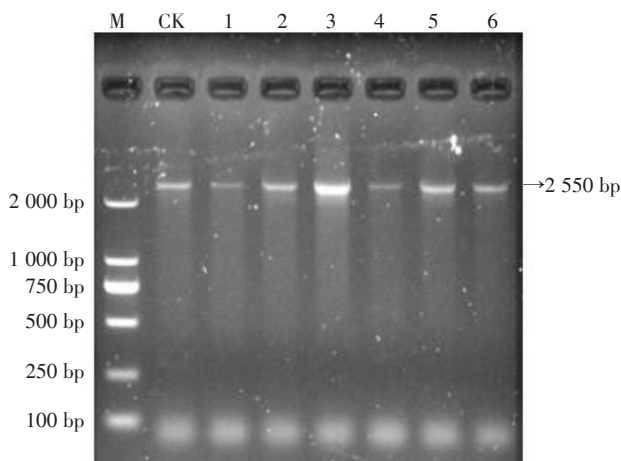
M1:DL2000 DNA Marker; M2:DL500 DNA Marker。

图4 *gf*<sup>3</sup>和*gf*<sup>4</sup>基因的分子标记检测

图中未显示),而未有小于200 bp的条带,其他材料与对照相同均未被酶切,所以‘T2015-66’和‘T2016-32’为*gf*<sup>4</sup>突变体。

### 2.5 棕果番茄材料*gf*<sup>5</sup>基因的分子标记检测

用特异性引物对 U316068F /U316068F 在红果番茄中可扩增到2550 bp左右的片段。经测序比对发现,*gf*<sup>5</sup>突变体在核苷酸的1262~2425 bp之间有1163 bp的缺失,若为*gf*<sup>5</sup>基因突变体,则PCR扩增后只有1400 bp左右的片段。结果显示,6份番茄材料扩增结果与对照相同,均能扩增到2550 bp的片段,未有1400 bp的条带,说明无*gf*<sup>5</sup>突变体。



M:DL2000 DNA Marker。

图5 *gf*<sup>5</sup>基因的分子标记检测

综合以上结果,对7个试验材料的基因型和等位基因进行了统计,结果如表2所示。

表2 7份番茄材料*gf*位点基因型及等位基因统计

编号	材料名称	基因型	等位基因
CK	T2015-47	GF/GF	--
1	T2015-65	GF/GF	--
2	T2015-66	C→T	<i>gf</i> <sup>4</sup>
3	2012-2	A插入	<i>gf</i> <sup>2</sup>
4	2012-3	GF/GF	--
5	T2016-33	A→T	<i>gf</i>
6	T2016-32	C→T	<i>gf</i> <sup>4</sup>

## 3 讨论

番茄果实成熟时色泽由绿转红是由色素种类和含量变化所致,主要是由于叶绿素含量下降和类胡萝卜素含量升高<sup>[13-15]</sup>。番茄中有很多自然突变体,在果实成熟时,诸多的番茄绿果肉突变体中,无论是*gf*突变体中单核苷酸的替换,*gf*<sup>2</sup>突变体中单核苷酸的插入,*gf*<sup>3</sup>和*gf*<sup>5</sup>突变体中核苷酸的缺失,还是*gf*<sup>4</sup>提前形成终止密码子,都会保留相当数量的叶绿素,使其呈现铁锈色至紫黑色不同程度的颜色。Barry等<sup>[7]</sup>在26份棕果、紫果或黑果番茄材料中检测到了数量不等的5种*gf*位点突变体,肖良军等<sup>[12]</sup>从8份棕果材料中检测到了1个*gf*、3个*gf*<sup>2</sup>、4个*gf*<sup>4</sup>突变体,但未发现*gf*<sup>3</sup>和*gf*<sup>5</sup>突变体。本试验利用Barry等<sup>[7]</sup>和肖良军等<sup>[12]</sup>设计的分子标记对6份棕果番茄材料分别进行了分子检测,结果显示在4份棕果番茄中检测到了1个*gf*、1个*gf*<sup>2</sup>、2个*gf*<sup>4</sup>突变体,但未检测到*gf*<sup>3</sup>和*gf*<sup>5</sup>突变体,是由于试验材料较少,今后应该进一步收集资源。在其他2份



棕果番茄中未检测出突变体,说明‘T2015-65’和‘2012-3’为富含花青苷的正常棕果番茄。

笔者调查发现,番茄绿果肉突变体在番茄褪绿病毒侵染后,与其他番茄植株相比,黄化叶片极少,整株黄化程度较低,针对番茄褪绿病毒表现出良好抗性。但国内外对 *gf* 位点突变体抗或耐番茄褪绿病毒机制的研究不多。本试验结果为番茄抗褪绿病毒病品种选育中有效跟踪和利用 *gf* 位点突变体奠定了基础,今后将从生理生化和遗传方面对 *gf* 位点基因突变体与抗番茄褪绿病毒的关系进一步深入研究,为育种工作提供理论依据。

参考文献

[1] 陈文峻,蒯本科.植物的滞绿突变[J].植物生理学报,1998,35(4):321-324.

[2] ZACARIAS L, REID M S. Role of growth-regulators in the senescence of arabidopsis-thaliana leaves[J]. Physiologia Plantarum, 1990, 80(4):549-554.

[3] THOMAS H, HOWARTH C J. Five ways to stay green[J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(51):329-337.

[4] CRAFTSBRANDNER S J, LEGGETT J E, Sutton T G, et al. Effect of root-system gent-oype and nitrogen fertility on physiological differences between burley and flue-cured tobacco.1. single leaf measurements[J]. Crop Science, 1987, 27(3):535-539.

[5] AKHTAR M S, GOLDSCHMIDT E E, JOHN I, et al. Altered patterns of senescence and ripening in *gf*, a stay-green mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)(J). Journal of Experimental Botany, 1999, 50(336):1115-1122.

[23] PERKINS V P, COLLINS J, HASSELL R, et al. Lycopene content of mini watermelon varieties grown at four locations[J]. Hort-Science, 2005, 40(4):1091.

[24] PERKINS V P, COLLINS J. Varition in carotenoids among miniwatermelons produced in four locations in the eastern U. S. [C]//Cucurbitaceae. Cucurbitaceae, 2006. North Carolina:Organizing Committee, Cucurbitaceae, 2006:597-602.

[25] 李莉,李佳,高青,等.昼夜温差对番茄生长发育,产量及果实品质的影响[J].应用生态学报,2015,26(9):2700-2706.

[26] 李纪锁,沈火林,石正强.基因型和环境条件对番茄果实内番茄红素含量的影响[C]//中国园艺学会第六届青年学术讨论会论文集,2004.西安:陕西科学技术出版社,2004:509-514.

[27] HARDING R W, SHORPSHIRE W J. Photocontrol of carotenoid biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1980, 31(1):217-238.

[6] WOLD A B, ROSENFELD H J, HOLTE K, et al. Colour of post-harvest ripened and vineripened tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as related to total antioxidant capacity and chemical composition[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(3):295-302.

[7] BARRY C S, PANDEY P. A survey of cultivated heirloom tomato varieties identifies four new mutant alleles at the green-flesh locus [J]. Molecular Breeding, 2009, 24(3):269-276.

[8] KERR E A. Linkage relations of *gf*[J]. Tomato Genetics Cooperative Reports, 1957(8):21.

[9] BARRY C S, MCQUINN R P, CHUNG M Y, et al. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retain mutations of tomato and pepper[J]. Plant Physiology, 2008, 147(1):179-187.

[10] 孙佩光,吴琼,徐碧玉,等.植物滞绿基因 STAY-GREEN 的研究进展[J].植物生理学报,2015,51(7):1017-1023.

[11] HU Z L, DENG L, YAn B, et al. Silencing of the *LeSGRI* gene in tomato inhibits chlorophyll degradation and exhibits a stay-green phenotype[J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(1):27-34.

[12] 肖良军,陆佳楠,李宁,等.棕果番茄果实颜色遗传及 *gf* 位点序列变异分析[J].园艺学报,2015,42(1):38-46.

[13] 姚建刚,张贺,许向阳,等.番茄果实成熟过程中色泽变化的研究进展[J].中国蔬菜,2010(8):1-6.

[14] 赵润洲,刘鸣韬.番茄果实色泽与色素组成的关系[J].河南农业科学,2011,40(9):98-100.

[15] 宋曼曼.加工番茄果实发育过程中类胡萝卜素、果胶和糖积累特性的研究[D].新疆石河子:石河子大学,2011.

[28] THOMPSON W F, WHITE M J. Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991, 42(16):423-46.

(上接第7页)

**郑重声明**

本刊最近接到部分作者反映,有冒充与本刊合作的网站骗取作者版面费的情况,为避免作者上当受骗,本刊郑重声明:本刊只接收网上投稿(投稿系统: <http://zgxc.cbpt.cnki.net>);编辑部电话:0371-65330927;本刊无个人账户接收作者版面费。

《中国瓜菜》编辑部