

# 番茄 *Ty-3*、*I-2* 和 *Mi* 基因多重 PCR 体系的建立与应用

李冬艳, 薛东齐, 李景富\*, 许向阳, 姜景彬

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 本研究利用已知基因型的番茄材料, 筛选出抗番茄黄化曲叶病 *Ty-3* 基因紧密连锁的分子标记 SCAR1、抗枯萎病 *I-2* 基因紧密连锁的分子标记 SCAR2 和抗根结线虫病 *Mi* 基因紧密连锁的分子标记 SCAR3, 并应用这 3 个分子标记建立能同时鉴定 *Ty-3*、*I-2* 和 *Mi* 基因的多重 PCR 体系。经多次验证, 扩增的特异性片段与单引物扩增片段一致, 其结果准确可靠, 可用于同时对 3 个抗病基因的鉴定。利用该体系对 300 份番茄材料进行种质资源筛选, 结果表明分子检测结果与接种鉴定结果几乎吻合。本研究建立的多重 PCR 方法简易、高效、快速, 为番茄抗病材料的筛选、分子标记辅助聚合育种工作奠定了基础。

**关键词:** *Ty-3*; *I-2*; *Mi*; 多重 PCR; 聚合育种

中图分类号: S641.2

文献标志码: A

文献编号: 1003-8701(2016)02-0039-05

## Simultaneous Identification of *Ty-3*, *I-2*, and *Mi* Genes by Multiple PCR and Its Application on Tomato

LI Dongyan, XUE Dongqi, LI Jingfu\*, XU Xiangyang, JIANG Jingbin

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Tomato of known genotype was used in the study to identify tomato *Ty-3* gene, *I-2* gene and *Mi* gene, which tightly linked to tomato yellow leaf curl virus disease-resistant gene *Ty-3*, tomato Fusarium wilt resistant gene *I-2* and tomato root-knot nematode resistant gene *Mi*, respectively. We established a multi-PCR method which can be utilized to identify these resistant genes in tomato simultaneously with the three SCAR makers. After several times tests, the PCR products were completely correspond to the amplified bands produced by single SCAR primer. The consistent results showed that three resistant genes could be identified simultaneously by using corresponding primers under the adapted amplification conditions. We screened 300 different tomato germplasm using the multi-PCR method. The results showed molecular detection was the same as vaccination identification. The technical procedure is very simple, efficient and fast. It could be useful for molecular marker assisted breeding and screening of tomato resistant germplasm.

**Key words:** *Ty-3*; *I-2*; *Mi*; Multiple PCR; Polymerization breeding

番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 是世界范围内广泛种植的蔬菜之一, 在世界农业经济和农业市场中占有重要的地位。长期以来, 番茄的生产受到许多病害的影响。迄今为止已鉴定出 200 多种番茄病害, 严重威胁我国番茄产业的发展<sup>[1]</sup>。番茄黄化曲叶病 (tomato yellow leaf curl virus diseases, TYLCD) 于 1939 ~ 1940 年在以色列首次发现<sup>[2]</sup>, 目前在世界各地均有发生<sup>[3-4]</sup>。该病害是造成番茄减产和品质降低的最主要因素之一。目前没有

防治 TYLCD 的特效药物, 最好的办法就是选育抗病品种<sup>[5]</sup>, 其中 *Ty-3* 基因是抗黄化曲叶病的主效基因, 因此被广泛应用于抗病品种的选育<sup>[6]</sup>。番茄枯萎病 (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) 也是危害番茄生产的主要病害之一。1940 年, Wellman<sup>[7]</sup> 发现番茄枯萎病菌存在生理小种分化现象, 并发现 3 个生理小种<sup>[8-10]</sup>, 且在野生番茄中发现 *I-1*、*I-2*、*I-3* 3 个抗病基因<sup>[11]</sup>。由于 *I-2* 基因同时抗生理小种 1 和 2, 因而在番茄抗病育种中受到重视<sup>[12]</sup>。根结线虫病 (root-knot nematode) 严重危害作物生产, 寄主范围达 2 000 多种<sup>[13]</sup>。目前国际已经报道的根结线虫有 80 多种<sup>[14]</sup>, 我国报道的根结线虫的有效种有 39 种<sup>[15]</sup>。番茄是对根结线虫最敏感的作物之一, *Mi* 基因具有广谱抗性, 能够有效

收稿日期: 2015-11-05

基金项目: 十二五农村领域国家科技计划项目 (2012BAD02B029)

作者简介: 李冬艳 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为番茄种质资源的研究和利用。

通讯作者: 李景富, 男, 教授, E-mail: Lijf\_2005@126.com

抵抗除北方根结线虫以外的其它3种主要根结线虫<sup>[16]</sup>,因此被主要应用于番茄抗根结线虫育种中。

多重PCR这一概念由Chamberian等<sup>[17]</sup>率先于1988年提出,广泛应用于基因诊断、病虫害检测、植物分子育种、种质纯度鉴定及转基因检测等研究。多重PCR是指在一个反应体系中同时扩增多个目的片段的PCR技术。与单个PCR相比具有高灵敏度、高效率、低成本的特点,一经提出便得到众多研究者的青睐<sup>[18]</sup>,但多重PCR对引物浓度、Mg<sup>2+</sup>浓度、Taq DNA聚合酶浓度、dNTP浓度、反应的循环参数(包括退火温度、退火及延伸时间等)等实验条件要求及其严格。

目前,多重PCR技术已被广泛应用于番茄抗病育种研究,如利用多重PCR技术同时鉴定*Cf-9*和*Tm-1*基因<sup>[19]</sup>、*Ty-1*和*Mi*基因<sup>[20]</sup>、*Ty-2*和*Ty-3*基因<sup>[21]</sup>、*Ty-1*、*Ty-2*、*Mi*和*Cf-5*基因<sup>[22]</sup>、*Ty-2*、*Ty-3*和*I-2*基因<sup>[23]</sup>等,这些都能有效提高育种效率,对促进多抗品种选育起很大作用。但能同时鉴定抗番茄黄化曲叶病、枯萎病和根结线虫病的多重PCR技术体系目前未见报道。为了更好地利用已开发

的番茄抗病基因,在前人研究的基础上,本研究利用*Ty-3*、*I-2*和*Mi*基因紧密连锁的SCAR分子标记建立了能同时检测这3种抗病基因的多重PCR技术体系,以应用于番茄分子标记辅助选择育种中对这3种基因型材料的同时筛选,提高选择效率,节省人力物力,降低实验成本。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验所用番茄材料序号及基因型如表1所示。其中1号为不含任何抗病基因的Moneymaker,2~4号为高代纯合自交系,5号为4号(母本)和2号(父本)杂交所得F1材料,6号为4号(母本)和3号(父本)杂交所得F1材料。其中1号来自TGRC(Tomato Genetics Resource Center);3号为课题组保存;2号、4号从亚洲蔬菜研究发展中心(Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC)引进。1~300为本课题组保存的番茄自交系。

### 1.2 引 物

表1 试验所用材料及基因型

序号	材料	来源	基因型		
1	Moneymaker	TGRC	<i>milmi</i>	<i>ty-3/ty-3</i>	<i>i-2/li-2</i>
2	13065	亚蔬中心(AVRDC)	<i>milmi</i>	<i>Ty-3/Ty-3</i>	<i>I-2/I-2</i>
3	14550	东农番茄研究所	<i>milmi</i>	<i>ty-3/ty-3</i>	<i>i-2/li-2</i>
4	14621	亚蔬中心(AVRDC)	<i>Mi/Mi</i>	<i>ty-3/ty-3</i>	<i>i-2/li-2</i>
5	(14621×13065) F1	东农番茄研究所	<i>Milmi</i>	<i>Ty-3/ty-3</i>	<i>I-2/li-2</i>
6	(14621×14550) F1	东农番茄研究所	<i>Milmi</i>	<i>ty-3/ty-3</i>	<i>i-2/li-2</i>

番茄抗黄化曲叶病*Ty-3*基因的SCAR标记引物参照Ji Y等<sup>[24]</sup>的设计,番茄抗枯萎病基因*I-2*的SCAR标记引物设计参照Simons等<sup>[25]</sup>的设计,番茄抗根结线虫基因*Mi*的SCAR标记引物参照Wil-

liamson等<sup>[26]</sup>设计。不同基因型材料的特异性引物序列及其扩增片断见表2和表3,引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。

表2 所用引物序列

标记	连锁基因	退火温度(°C)	引物序列
SCAR1	<i>Ty-3</i>	58	F: 5'-GGTAGTGGAAATGATGCTGCTC-3' R: 5'-GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC-3'
SCAR2	<i>I-2</i>	53	F: 5'-ATTTGAAAGCGTGGTATTGC-3' R: 5'-CTTAAACTCACCATTAAATC-3'
SCAR3	<i>Mi</i>	57	F: 5'-TTCTCTAGCTAAACTTCAGCC-3' R: 5'-TTTTCGTTTTTCCATGATTCTAC-3'

### 1.3 DNA提取及单基因PCR扩增体系

采用快提DNA的方法。取幼嫩、干净、无病的番茄材料2g装入灭过菌的1.5mL离心管,在液氮下研磨成粉末,加入300μL 0.4mol/L NaOH,沸

水浴1min,10000r/min离心2min,用移液枪吸取75μL上清液于新离心管中,并加入450μL 0.1mol/L Tris-cl(pH=8),-20°C冰箱中保存备用。

用于PCR反应的所有药品均购自康为世纪公

司。用于单基因扩增的 PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 包括 DNA 模板 (浓度) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (10 mmol/L), Taq 酶 1 U, 2.5 mmol/L 的 dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ buffer 3  $\mu\text{L}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ )。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $T_m$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min) 38 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶。

表 3 不同基因型及其 SCAR 标记扩增的特异性片段

标记	基因型	扩增产物 (bp)
SCAR1	<i>Ty-3/Ty-3</i>	450
	<i>Ty-3/ty-3</i>	450/320
	<i>ty-3/ty-3</i>	320
SCAR2	<i>I-2/I-2</i>	960
	<i>I-2/i-2</i>	960
	<i>I-2/i-2</i>	无
SCAR3	<i>Mi/Mi</i>	720
	<i>Mi/mi</i>	720
	<i>mi/mi</i>	无

#### 1.4 多重 PCR 体系的建立

多重 PCR 总体系为 25  $\mu\text{L}$ , 包括 DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , SCAR1 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , SCAR2 上下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , SCAR3 上下游引物各 0.86  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L 的 dNTP 2  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1 U, 10 $\times$ buffer 4  $\mu\text{L}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ )。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min)  $\times$  15 个循环, (94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min)  $\times$  17 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶。

## 2 结果与分析

### 2.1 与 *Ty-3* 基因紧密连锁特异标记片段的获得

经 SCAR1 标记特异引物扩增后, 含抗病纯合基因 2 号材料扩增出 450 bp 特异片段, 含抗病杂合基因的 5 号材料扩增出 450 bp 和 320 bp 特异片段, 其余感病材料扩增出 320 bp 的特异片段 (图 1), 且此基因的带型亮度几乎一致, 但出现了引物二聚体和脱带现象, 但是不影响对此基因型的鉴定, 因此该方法能够应用于分子标记辅助育种中对 *Ty-3* 基因的选择。

### 2.2 与 *I-2* 基因紧密连锁特异标记片段的获得

经 SCAR2 标记特异引物扩增后, 含抗病纯合基因 2 号和抗病杂合基因的 5 号材料扩增出 960 bp 特异片段, 其余感病材料无特异性片段扩增 (图 2), 对此基因的鉴定效果比较理想, 带型亮度比较好, 没有出现脱带现象且引物二聚体也不是

很明显。因此该方法能够应用于分子标记辅助育种中对 *I-2* 基因的选择。

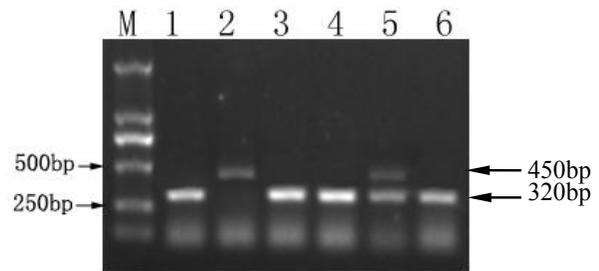


图 1 SCAR1 标记特异引物扩增

注: M: DL2000 DNA marker; M: DL2000 DNA marker;  
1 ~ 6: Moneymaker、13065、14550、14621、(14621 $\times$ 13065) F1、  
(14621 $\times$ 14550) F1

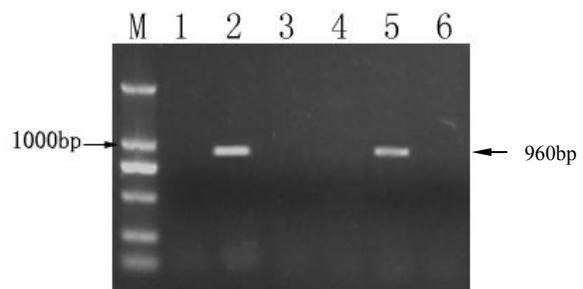


图 2 SCAR2 标记特异引物扩增

注: M: DL2000 DNA marker; M: DL2000 DNA marker;  
1 ~ 6: Moneymaker、13065、14550、14621、(14621 $\times$ 13065) F1、  
(14621 $\times$ 14550) F1

### 2.3 与 *Mi* 基因紧密连锁特异标记片段的获得

经 SCAR3 标记特异引物扩增后, 含纯合抗病基因的 4 号材料和杂合抗病基因 5 号和 6 号材料扩增出 720 bp 特异片段, 其余感病材料无特异性片段 (图 3), 对此基因型的鉴定效果较前两个基因鉴定效果都好, 带型亮度各方面效果都比较理

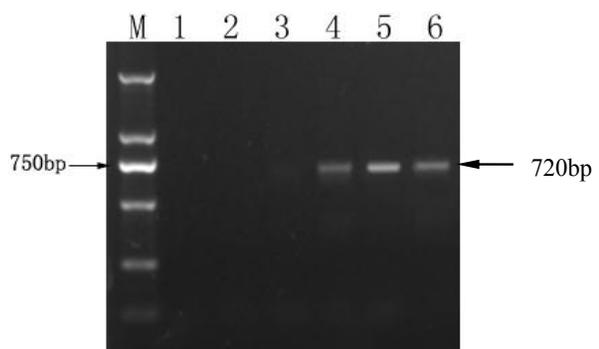


图 3 SCAR3 标记特异引物扩增

注: M: DL2000 DNA marker; M: DL2000 DNA marker;  
1 ~ 6: Moneymaker、13065、14550、14621、(14621 $\times$ 13065) F1、  
(14621 $\times$ 14550) F1

想。因此,该方法能够应用于分子标记辅助育种中对 *Mi* 基因的选择。

#### 2.4 *Ty-3*、*I-2*和 *Mi*基因多重PCR技术的建立

经 SCAR1、SCAR2、SCAR3 正反引物扩增后,含抗病基因的 5 号材料扩增出 450 bp、320 bp、720 bp 和 960 bp 四条特异性片段;含纯合 *I-2* 和 *Ty-3* 基因的 2 号材料扩增出 960 bp 和 450 bp 两条特异性片段;含纯合 *Mi* 基因的 4 号材料扩增出 720 bp 和 320 bp 两条特异性片段,不含任何抗病基因的材料扩增出 320 bp 特异性片段(图 4)。结果表明,利用该多重 PCR 技术能够扩增出每个引物的目标条带,因此应用该多重 PCR 技术可以同时鉴定 *Ty-3*、*I-2* 和 *Mi* 基因。

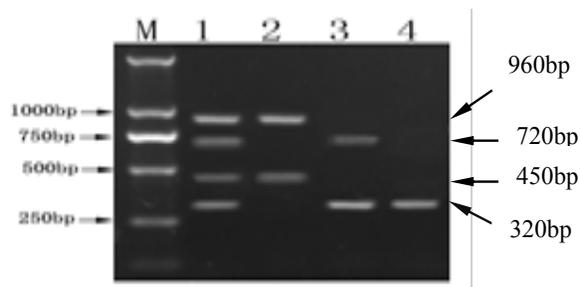


图 4 *Ty-3*、*I-2*和 *Mi*基因多重PCR扩增结果

注: M: DL2000 DNA marker; M: DL2000 DNA marker;

1 ~ 4: (14621×13065) F1、13065、14621、Money maker

#### 2.5 利用多重PCR技术对300份番茄材料的基因型进行鉴定

利用本研究建立的多重PCR技术对东北农业

大学番茄研究所已经过接种鉴定的300份番茄材料(15001~15300)进行基因型鉴定。图5(部分材料基因型)所示,15020、15021、15022、15023、15024、15026、15027、15031和15032含杂合 *Ty-3* 基因,15025、15028、15029与15030不含 *Ty-3* 基因,15020、15021、15022、15023、15024、15025、15026、15027、15029、15030、15031和15032含 *I-2* 基因,15020、15021、15022、15023、15024、15025、15026、15027含 *Mi* 基因。此鉴定结果与田间接种鉴定结果几乎一致(表4)。其中15020在分子标记检测中是抗黄化曲叶病(含 *Ty-3*),而在田间接种却表现感病(S),15026在分子检测中是抗枯萎病菌(含 *I-2*),而在田间接种表现为感病(S)。因此该多重PCR体系能够应用于分子标记辅助育种的选择,在苗期就能对植株的基因型进行鉴定。综上所述,分子标记技术可在育种中用于对材料进行抗性的辅助筛选,能够缩短育种年限,降低工作量。

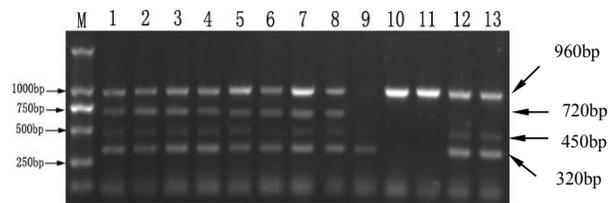


图 5 利用多重PCR技术对种质资源进行鉴定结果

注: M: DL2000 DNA marker; 1 ~ 13: 15020 ~ 15032;

M: DM2000 DNA marker; 1 ~ 13: 15020 ~ 15032

表 4 田间接种鉴定结果

编号	TY病毒	枯萎病菌	根结线虫	编号	TY病毒	枯萎病菌	根结线虫
15020	S	R	HR	15027	R	R	HR
15021	R	HR	R	15028	S	S	S
15022	R	R	R	15029	S	R	S
15023	HR	HR	HR	15030	S	R	S
15024	R	R	R	15031	HR	HR	S
15025	S	R	R	15032	R	R	S
15026	R	S	R				

### 3 讨论

随着分子标记技术的发展与成熟,应用分子标记辅助选择多抗番茄品种加速了番茄育种进程,对提高番茄品质与产量具有重要意义,因此具有广阔的应用前景。多重PCR具有高灵敏度、高效率、高覆盖率、低实验成本、低工作量、加速实验进程等优点,是植物生物学研究的核心技术,

该技术具有多方面的应用。2011年,赵芹等<sup>[27]</sup>根据小西葫芦黄花叶病毒、番木瓜环斑病毒和黄瓜花叶病毒的外壳蛋白基因保守区序列设计了特异引物,建立了能同时检测以上3种病毒的多重PCR检测体系。2013年,邱良焱等<sup>[28]</sup>以转 *Bar*、*Bt* 基因的双抗稻米为试验原料,针对其水稻内源基因 *SPS* 和外源基因设计多重PCR检测体系,成功地应用该体系快速地检测出原料中的全部6条目

标基因。在种质纯度及相关资源材料的鉴定、植物分子育种、植物基因表达研究等方面也有广泛应用,且正与当代的先进技术结合逐渐成为分子育种中重要的研究方法。

番茄黄化曲叶病、枯萎病和根结线虫病是近年来番茄生产上逐年加重的重要病害,且各病害的生理小种分化极快,而采用常规育种费时、费力,还需要较大面积的试验田。近年来在作物育种中常采用分子标记辅助育种与常规育种相结合。在分子标记辅助育种中常采用的一项技术是多重PCR技术,此技术高效、快速、准确,能在植物苗期对大量材料的基因型进行筛选,不受气候环境因素的影响且不影响作物的生长,大大缩短了育种年限,为育种工作节约了大量时间。

本实验采用快速提取DNA方法,且利用Ty-3、I-2和Mi的SCAR标记的显性或共显性标记构建多重PCR体系,无需酶切,只需一次PCR和一次电泳即可完成对3种抗病基因的鉴定,省时、省工、降低成本。本实验所构建的多重PCR体系,可为多基因鉴定及分子标记辅助选择育种提供极大便利。但本研究所提取的DNA浓度低,虽可以用于PCR的快速扩增,但能否应用于其他分子生物学试验,还需进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] 李景富. 中国番茄育种学(1版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2011: 264-265.
- [2] Pico B, Diez M J, Nuez F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop II. The tomato yellow leaf curl virus: a review[J]. Sci. Hortic(mesterdam), 1996, 67(3-4): 151-196.
- [3] Varma A, Malath I V G. Emerging geminivirus problems. A serious threat to crop production[J]. Annals of Applied Biology, 2003 (142): 145-164.
- [4] Boulton M I. Geminiviruses: major threats to world agriculture [J]. Annals of Applied Biology, 2003(142): 143.
- [5] 王建军, 邓军均, 高敏. 番茄黄化曲叶病抗病基因及其分子标记研究进展[J]. 陕西农业科学 2011(3): 158-160.
- [6] Ji Y F, Schuster D J, Scott J W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato[J]. Mol. Breeding, 2007, 20(3): 271-284.
- [7] Wellman F L, Blaisdell D J. Differences in growth characters and pathogenicity of Fusarium nomenclature for pathogenic wilt isolations tested on three tomato varieties[J]. Technical Bulletin United States Department of Agriculture, 1940(705): 28.
- [8] Gabe H L. Standardization of races of Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1975(64): 156-159.
- [9] Conway W S, Mac Hardy W E. Distribution and growth of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici race 1 or race 2 within tomato plants resistant or susceptible to wilt[J]. Phytopathology, 1978(8): 938-942.
- [10] Grattidge R, O'Brien R G. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland[J]. Plant Disease, 1982(66): 165-166.
- [11] Beckman C H, Elgersma D M, Machardy W E. The localization of fusarial infection in the vascular tissue of single-dominant-gene resistant to tomatoes[J]. Phytopathology, 1972(62): 1256-1260.
- [12] 于拴仓, 邹艳敏. 番茄枯萎病抗性基因I-2的显性分子标记及其应用[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 806-810.
- [13] 泰勒 A L, 萨塞 J N. 植物根结线虫(生物学、分类学和防治)[M]. 北京: 中国: 农业出版社, 1978: 1-7.
- [14] Karssen G. The Plant-parasitic Nematode Genus Meloidogyne Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe [M]. Drukkerij Modern: Bennekom, 1999: 4-12.
- [15] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 1-4.
- [16] 彭德良. 蔬菜线虫病害的发生和防治[J]. 中国蔬菜, 1998 (4): 57-58.
- [17] Chamberian J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Detection Screening of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus via Multiplex DNA Amplification [J]. Nucl Acids Res, 1988(16): 1141-1156.
- [18] 陈明洁, 方 倜, 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.
- [19] 宋 燕, 陈丽静, 李君明, 等. 利用多重PCR反应同时筛选番茄Cf-9和Tm-1基因[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 165-169.
- [20] 于 力, 朱龙英, 万延慧, 等. 多重PCR技术鉴定番茄Ty-1和Mi基因[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 165-169.
- [21] 许 爽, 褚云霞, 张 辉, 等. 多重PCR技术鉴定番茄Ty-2和Ty-3基因及田间验证, 分子植物育种, 2009, 7(5): 954-958.
- [22] 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基因的研究[J]. 北方园艺, 2013(9): 119-123.
- [23] 孔凡慧, 李 帅, 赵婷婷, 等. 番茄Ty-2、Ty-3和I-2多重PCR鉴定技术, 分子植物育种, 2014, 13(1): 184-189.
- [24] Ji Y, Salus M S, van Betteray B, et al. 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[J]. Report of the Tomato Genetics Cooperative, 2007(57): 25-28.
- [25] Simons G, Groenendik J, Wijbrandi J, et al. Dissection of the Fusarium I-2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy[J]. Plant Cell, 1998(10): 1055-1068.
- [26] Williamson V M, Ho J Y, Wu F F, et al. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi in tomato [J]. Theor App l Genet, 1994(87): 757-763.
- [27] 赵 芹, 李华平, 谢大森, 等. 4 侵染节瓜的 3 种病毒多重 PCR 检测体系的建立[J]. 园艺学报, 2011, 38(11): 2215-2222.
- [28] 邱良焱, 肖有玉, 刘 佳, 等. 多重PCR法检测转Bar、Bt基因双抗稻米[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 139-142.

(责任编辑:王 昱)