

利用 cDNA-AFLP 研究辣椒细胞核雄性不育差异表达基因

杨 高 强^{1,2}, 霍 秀 文²

(1. 沈阳市农业科学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要:辣椒细胞核雄性不育两用系在辣椒杂交种配制方面有着非常重要的应用, 为了进一步了解其不育性的分子机理, 利用 cDNA-AFLP 对辣椒细胞核雄性不育两用系‘AB23’可育株和不育株花蕾的 mRNA 指纹图谱进行了初步分析。结果表明: 共获得 19 个差异表达的 TDF, 均来自可育株。在可育株花蕾中得到了 19 个 TDFs, 其中 13 个 TDFs 功能已知, 2 个功能未知, 4 个没有找到同源序列。对 13 个已知序列的分析表明, 这些基因涉及了细胞的代谢、转录、胞间运输和信号转导等相关过程。通过半定量 RT-PCR 技术对获得的 19 个 TDFs 进行验证, 其表达特征与 cDNA-AFLP 结果一致。

关键词:辣椒; 核雄性不育基因; cDNA-AFLP

中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)13-0132-05

辣椒的细胞核雄性不育是辣椒杂种优势利用的重要途径之一, 其不育株败育彻底, 恢复源广, 但在杂交种生产时需要拔除 50% 的可育株, 这就给种子生产带来了很多不便。

目前, 世界上已发现了近 20 个辣椒核雄性不育基因^[1], 而我国辣椒遗传育种专家发现的第 1 个核雄性不育隐性基因是由沈阳市农业科学院辣椒课题组发现, 该不育基因来自于“克山尖椒”中自然发生的一雄性不育突变株^[2]; 两用系不育株的不育性受 1 对隐性不育基因(*msms*)控制, 不育株表现为花药瘦瘪, 无花粉粒, 王得元和 Bosland^[1]将这个基因暂命名为 *msc1*, 收录在最新的辣椒基因名录中。目前, 沈阳市农业科学院辣椒育种课题组已利用这个基因转育出一批辣椒核不育两用系, 在培育一代杂种中发挥着重要作用^[3], 但到目前为止, 对其分子遗传机理的研究还很欠缺, 因此, 明确该不育基因的分子控制机理对有效指导辣椒杂交种生产, 具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 辣椒细胞核雄性不育两用系‘AB23’由沈阳市农业科学院辣椒育种课题组提供, 连续姊妹交 32 代, 可育株和不育株 1:1 分离, 其育性遗传符合由 1 对隐性基因控制的遗传模式, 姊妹交后代群体内可育株基因型为 *Msms*, 不育株基因型为 *msms*。可育株花药及花粉发育正常, 不育株花药瘦瘪, 无花粉粒, 可育株和不育株除育性外其它性状高度一致(图 1)。2010 年 1 月 25 日播种在沈阳市农业科学院辣椒课题育苗温室内, 3 月 20 日进行育性鉴定, 22 日各选取可育株和不育株 20 株, 取不同时期花蕾分别混合, 液氮速冻后, 保存于 -70℃ 冰箱, 用于分析辣椒花蕾的基因表达差异。



图 1 AB23 不育株花(左)AB23 可育株花(右)

Fig. 1 The flower of ‘AB23’ male sterile (left) and its male fertile (right)

1.1.2 试剂 引物由上海生工生物工程有限公司合成, *Taq* 酶、dNTP、DNA 分子量标准、RNAprep pure 植物总 RNA 试剂盒和凝胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司;

第一作者简介:杨高强(1979-), 男, 硕士, 农艺师, 现主要从事辣椒遗传育种研究工作。E-mail: gaoqiang0120@163.com.

责任作者:霍秀文(1968-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事蔬菜种子资源与遗传育种研究工作。E-mail: xiuwenhuo@yahoo.com.

基金项目:沈阳市科技计划资助项目(F10-077-3-00)。

收稿日期:2012-03-07

RNase-Free DNase I、T 载体为 Promega 公司产品;限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI*、RNaseH、*T₄* DNA Ligase、*T₄* DNA Polymerase、*E. coli* DNA Polymerase I 均为美国 NEB 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 cDNA-AFLP 按照 RNAprep pure 植物总 RNA 试剂盒说明书提取辣椒花蕾的总 RNA, 去除所含的微量 DNA, 继而按照 cDNA Synthesis Kit 说明书合成 cDNA 双链。cDNA-AFLP 反应体系及程序参照 Bachem C W 等^[4]的方法, 内切酶为 *EcoRI* 和 *MseI*。用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶分离反应产物, 条带银染显示参照 Sangi-
netti C J 等^[5]的方法, 2 次重复。

1.2.2 差异条带的回收、克隆、测序和分析 将差异片段用刀片从聚丙烯酰胺凝胶上切下, 将其放入 1.5 mL 离心管中, 加入 400 μ L 高盐 Buffer, 室温放置 24 h, 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清。扩增产物回收纯化后, 用 Promega pGEM-T Vector system I 进行蓝白斑筛选, 单克隆经验证后送上海生工生物工程有限公司测序。测序结果通过 NCBI 数据库在线进行分析。

1.2.3 差异表达基因的半定量 RT-PCR 验证 根据辣椒的 *Actin* 基因序列设计 1 对特异引物作为内参, 进行半定量 RT-PCR 验证, 基因的特异引物见表 1。分别提取可育株和不育株不同时期混合花蕾的总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, 用作 RT-PCR 模板。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 60 s, 52~58 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

表 1 用于 RT-PCR 分析的部分特异性引物

Table 1 The specific primer for RT-PCR analysis

转录片段 TDF	引物序列(5'~3')	Primer sequences
Actin	L: CCAAGAGACTACATCAACTCT	R: TCTTTGCTCATTCTATCAGC
TDF-01	L: AAAGGAGAAGATGAAGAAAAG	R: GTCAACCACTAAACCAAAACC
TDF-02	L: GGGGAAATCTGCTGAGAACTA	R: TTTCAACAGCCAAACAAGTGC
TDF-03	L: TAACTGGACATAATGGACCTG	R: AAACACTCCAAACCTTCACTG
TDF-07	L: GGAATTGCTGCTAAGGATTGG	R: ACGCTAAGAAGAAAGTGTCAAA
TDF-08	L: TAGCAACTTCGACTGTTTAC	R: TCCATCAAAGACCTCTCAAT
TDF-11	L: GGAAACCACTTCCACTTCA	R: GGATTTCACCTCTGATAGCACAA
TDF-12	L: TAATCTGCGGTTTCACTCTG	R: CGTATGAAGATCATTTGCACAA
TDF-16	L: TAGGAAGATAGGCATTCAGTG	R: CTAATAATCTCAGCAGCATCC
TDF-18	L: GAGGGGACTAATGAGTGGTAT	R: GGAATGAAAATGTGCTTCTTAC
TDF-20	L: AGGGTTTGAACAAGCATTTCT	R: ACTCCAGTTCACAACTTCTCAA
TDF-21	L: TCACTTTCCAACATCCAATA	R: CTACCTTCTTCCAATGATTC
TDF-22	L: ATGCGAATTGGAGCAATAGA	R: CCTCAGGTTTGGGTATGGTG

2 结果与分析

2.1 cDNA-AFLP 结果分析

该试验选择性扩增选用 16 条 *EcoRI* (E+2) 引物和

8 条 *MseI* (M+3) 引物, 组成 128 对引物组合, 对可育株混合花蕾和不育株混合花蕾进行扩增, 结果显示平均每条泳道大约有 28 条带, 长度在 50~600 bp; 共筛选到 10 对重复性好且有差异的引物。结果表明, 可育株和不育株花蕾转录组具有明显的差异, 所获得的差异带类型既有有和無的差异, 也有表达量的差异。10 对引物组合在可育株花蕾中共检测到 19 条能重复出现的差异 TDFs。图 2 显示的是有多态性的引物对扩增得到的部分结果。

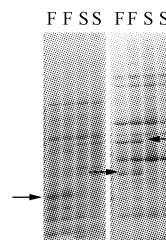


图 2 利用 cDNA-AFLP 获得的部分差异表达基因

注: F: 可育株混合花蕾; S: 不育株混合花蕾, 图 3 同。

Fig. 2 Differentially expressed genes obtained by cDNA-AFLP

Note: F: Fertile bud pool; S: Sterile bud pool, the same Fig. 3.

2.2 差异片段功能分析

获得的 19 个 TDF 经序列分析表明, 均为非冗余序列, 在 NCBI 的公共数据库中经 BlastX 或 Blastn 在线检索, 13 个 TDF 存在较高的同源性, 功能未知或无同源性的 6 条(表 2)。其中 TDF-01 与番茄花药绒毡层特异表达并编码富含甘氨酸蛋白的基因在核苷酸序列上有较高的同源性, TDF-11 与拟南芥果胶甲酯酶有较高的同源性, TDF-12 与推测的拟南芥脂质转移蛋白也有很高的同源性。已有研究表明, 上述 3 个基因与育性相关, 说明 TDF-01、TDF-11、TDF-12 可能是与辣椒育性相关的基因; 同时, TDF-18 和 TDF-23 分别与拟南芥和蓖麻的海藻糖合酶有较高的同源性, 暗示可能有多多个海藻糖合酶基因参与了辣椒雄配子的发育过程; TDF-08 和 TDF-26 编码的蛋白质功能未知, TDF-2、TDF-9、TDF-15 及 TDF-25 经 BlastX 和 Blastn 检索没有同源系列, 说明可能得到了与辣椒雄配子发育相关的新基因。

2.3 半定量 RT-PCR 分析

为了保证试验结果的可信度, 对 19 条特异表达的 TDFs 进行了半定量 RT-PCR 验证, 结果显示, 19 个 TDFs 在辣椒可育株花蕾和不育株花蕾之间均存在显著

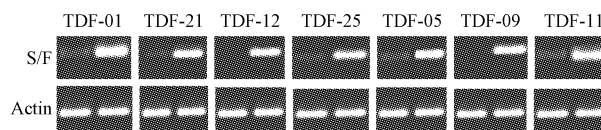


图 3 部分差异表达基因的 RT-PCR 验证

Fig. 3 Expression validation of differentially expressed genes by RT-PCR

的差异表达,RT-RCR 验证结果与 cDNA-AFLP 的试验结果一致,表明该试验所得到的结果是可靠的,利用

cDNA-AFLP 来分析辣椒的基因表达差异是完全可行的。图 3 显示的是半定量 RT-RCR 试验的部分结果。

表 2 TDF 序列同源性比较结果

Table 2 Analyses of TDF sequences similarity using Blast

片段编号 No.	片段长度 Length	功能预测 Function characterization	E-值 E-value	一致性 Identity/%
TDF-01	403	Glycine rich protein (LOC544300), mRNA [Solanum lycopersicum] ^N	6. 00e-45	75
TDF-02	203	无同源性		
TDF-03	266	推测的蓖麻 F-box 蛋白 F-box family protein, putative [Arabidopsis thaliana] ^X	7. 00e-17	68
TDF-05	314	拟南芥谷胱甘肽转移酶 glutathione S-transferase [Arabidopsis thaliana] ^X	2. 00e-20	83
TDF-07	302	拟南芥 emp24/ gp25L/ p24 结构域蛋白家族 emp24/ gp25L/ p24 family/ GOLD domain-containing protein [Arabidopsis thaliana] ^X	8. 00e-37	81
TDF-08	254	Unknown protein [Arabidopsis thaliana] ^X	6. 00e-42	81
TDF-09	372	无同源性		
TDF-11	297	拟南芥果胶甲酯酶 Pectin methylesterase [Arabidopsis thaliana] ^X	4. 00e-21	76
TDF-12	338	推测的拟南芥脂质转移蛋白 Lipid transfer protein, putative [Arabidopsis thaliana] ^X	2. 00e-28	73
TDF-15	284	无同源性		
TDF-16	276	马铃薯钙离子依存的蛋白激酶 3 mRNA 序列 Calcium-dependent protein kinase 3 mRNA, complete cds [Solanum tuberosum] ^N	2e-57	94
TDF-17	221	蒲公英 TO54-2 TO54-2 [Taraxacum officinale] ^X	4. 00e-21	100
TDF-18	362	拟南芥 GDP-L 海藻糖合酶 GDP-L-fucose synthase [Arabidopsis thaliana] ^X	1. 00e-23	81
TDF-20	294	拟南芥铁氧化还原蛋白 2Fe-2S ferredoxin-like protein [Arabidopsis thaliana] ^X	2. 00e-16	85
TDF-21	205	Nuclear RNA polymerase A2 (NRPA2) mRNA, complete cds [Arabidopsis thaliana] ^N	2. 00e-20	83
TDF-22	337	水稻的 SMC1 蛋白 SMC1 protein [Oryza sativa] ^X	5. 00e-38	86
TDF-23	209	推测的蓖麻海藻糖合酶 Fucose synthase putative [Ricinus communis] ^X	1. 00e-13	80
TDF-25	280	无同源性		
TDF-26	237	Unknown [Zea mays] ^X	1. 00e-12	88

注: X, P 分别代表 BlastX, BlastN 分析。

Note: X, N represented the analyses of sequences using BlastX, BlastN, respectively.

3 结论与讨论

应用 cDNA-AFLP 技术研究基因的特异性表达^[6], 已经在马铃薯、玉米、白菜等作物的基因表达差异分析中得到了较好的结果^[7-9]。该研究利用 cDNA-AFLP 技术分析了辣椒核不育两用系‘AB23’可育株和不育株混合花蕾的基因表达差异,在可育株混合花蕾中得到了重复性好的特异表达 TDFs,对得到的 TDFs 进行半定量 RT-PCR 验证,表达特征与 cDNA-AFLP 结果一致,说明该技术所获得的片段是可靠的。

植物雄配子的发育不仅受很多表达基因的严格控制,而且基因的表达调控也受到很多体内外因子的影响,任何一个基因或调控因子的变化或者异常都会使花药发育不正常^[10-11],该研究可育株花蕾特异表达的基因片段 TDF-01、TDF-11、TDF-12,在不育株花蕾中其表达受到抑制或不表达,说明它们对辣椒可育株花蕾的发育有重要的作用,但是它们是否对该材料的育性产生影响还需进一步研究。有研究结果表明花药绒毡层特异表达的富含甘氨酸蛋白,与花粉的发育相关。Arabidopsis^[12]和 Brassica^[13-14]的花药绒毡层细胞中也存在特意表达的 GRP 油脂蛋白,其具有膜结合特性,可能与脂质的稳定性有关;Itabashi E 等^[15]发现水稻的细胞质雄性不育的育性恢复基因 *Rf2* 编码的蛋白质含有富甘氨酸结构域,在发育和成熟的花粉囊中可以检测到 *Rf2* 的表达。陈蕊红等^[16]通过利用蛋白质组学技术对小麦质核互作型

雄性不育系及其保持系在花药发育的蛋白质进行了差异研究发现,甘氨酸富集蛋白质仅在不育系中表达,而在保持系中缺失,推测可能由于甘氨酸富集蛋白在绒毡层组织中的特异表达,在花粉发育的特定阶段,使得绒毡层组织的正常发育受到影响,致使小孢子失去营养来源而逐渐消退,导致雄性不育的发生。

果胶甲酯酶是植物细胞果胶代谢的关键酶,细胞壁中的果胶在果胶甲酯酶的作用下脱甲基,随后在多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶等酶的共同作用下降解^[17-18],众多学者在研究植物雄性不育时发现,与果胶代谢相关的基因和植物的育性相关,刘志勇等^[19]利用 cDNA-AFLP 技术在大白菜核雄性不育两用系‘AB02’的可育株花蕾中得到了一个特异表达的大白菜果胶甲酯酶基因 *BrPME1*,该基因在不育株花蕾中不表达,得出了大白菜果胶甲酯酶基因 *BrPME1* 是一个与大白菜育性相关的基因;王永勤等^[20]也在白菜核不育两用系‘Bajh97-01A/B’的可育株花蕾中发现了特异表达的果胶甲酯酶基因 *BcMF3*,且与 *BrPME1* 的表达模式相似。

植物的脂质转运蛋白(LTPs)具有很多的生物学功能,在植物生长、发育及抗逆过程中发挥着非常重要的作用,而其在生殖发育中的作用越来越引起学者们的关注^[21-22]。Ariizumi T 等^[23]研究发现,拟南芥的 LTP12 在其花粉发育的单核和二核花粉期表达,并将其定位在花药的绒毡层细胞,它的作用被认为是在花粉发育过程中

将脂质从绒毡层传递到花粉外壁。Foster G D 等^[24]在甘蓝型油菜的花药绒毡层和小孢子中发现了特异表达的 *LTP* 基因,另有研究表明,在碧桃、水稻^[25-26] 的生殖器官中也存在特异表达的 *LTP* 基因,它们也可能跟花粉壁发育所需物质的累积积淀有关。

从该研究获得的可育株花蕾特异表达的 19 个 TDFs 来看,有些片段涉及了细胞的代谢、转录、胞间运输、信号传导等多个生物学过程,同时有些片段功能未知或没有找到同源序列,说明还有一些未知基因参与了辣椒雄配子的发育,同时也说明辣椒雄配子的发育可能受到多个基因的表达调控。对这些特异表达的 TDFs 进一步研究,将有助于更多地了解辣椒雄配子发育的分子机制,为辣椒核雄性不育相关基因的研究奠定基础。

参考文献

- [1] Wang D Y, Bosland P W. The genes of Capsicum [J]. Hor science, 2006, 41(5): 1169-1187.
- [2] 杨世周. 辣椒雄性不育两用系的选育[J]. 园艺学报, 1981, 8(3): 49-53.
- [3] 杨凤梅, 薛庆华. 辣椒雄性不育两用系选育及其利用[J]. 辣椒杂志, 2005(2): 9-10.
- [4] Bachem C W, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. The Plant Journal, 1996, 9: 745-753.
- [5] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914-921.
- [6] Kehoe D M, Volland P, Omerille S. studies on differential gene expression of higher plant and other photosynthetic organisms [J]. Trends in Plant Science, 1994, 4: 38-41.
- [7] Christian W B, Bachem Rutger S, Van Der Hoeven, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant Journal, 1996, 9: 745-753.
- [8] Wang Y Q, Cao J S, Fu Q G, et al. Differential Expression Analysis of Genic Male Sterility A/B Lines in Chinese Cabbage-Pak-Choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) [J]. Agricultural Sciences in China, 2003, 2(2): 195-199.
- [9] 吴敏生, 高志环, 戴景瑞. 利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米的基因差异表达[J]. 作物学报, 2001, 27(3): 339-342.
- [10] McCormick S. Control of male gametophyte development [J]. The Plant Cell, 2004, 16: 142-153.
- [11] McCormick S. Male gametophyte development [J]. The Plant Cell, 1993, 5: 1265-1275.
- [12] DeOliveira D E, Franco L O, Simoens C, et al. Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins [J]. Plant J, 1993, 3: 495-507.
- [13] Robert L S, Gerster J, Allard S, et al. Molecular characterization of two *Brassica napus* genes related to oleosins which are highly expressed in the tapetum [J]. Plant J, 1994, 6: 927-933.
- [14] Ross J H E, Murphy D J. Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae [J]. Plant J, 1996, 9: 625-637.
- [15] Itabashi E, Iwata N, Fujii S, et al. The fertility restorer gene, *Rf2*, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein [J]. The Plant Journal, 2011, 65(3): 359-367.
- [16] 陈蕊红, 叶景秀, 张改生, 等. 小麦质核互作型雄性不育系及其保持系花药差异蛋白质组学分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(4): 431-440.
- [17] Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, et al. Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2006, 224(4): 782-791.
- [18] Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz E J. New insights into pectin methylesterase structure and function [J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(6): 267-277.
- [19] 刘志勇, 李承斌, 叶雪凌, 等. 大白菜果胶甲酯酶基因 *BrPME1* 的克隆及特征分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 325-334.
- [20] 王永勤, 余小林, 曹家树. 白菜小孢子发育相关基因 *BcMF3* 的分离及序列分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(11): 1302-1308.
- [21] Blein J P, Coutos-Thévenot P, Marion D, et al. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms [J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(7): 293-296.
- [22] Imin N, Kerim T, Weinman J J, et al. Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers [J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(2): 274-292.
- [23] Ariizumi T, Amagai M, Shibata D, et al. Comparative study of promoter activity of the three anther-specific genes encoding lipid transfer protein, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and polygalacturonase in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Rep, 2002, 21: 90-96.
- [24] Foster G D, Robinson S W, Blundell R P, et al. A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores [J]. Plant Science, 1992, 84(1): 187-192.
- [25] Botton A, Begheldo M, Rasori A, et al. Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch) [J]. Plant Science, 2002, 163(5): 993-1000.
- [26] Boutrot F, Meynard D, Guiderdoni E, et al. The *Triticum aestivum* non-specific lipid transfer protein (TaLtp) gene family: comparative promoter activity of six TaLtp genes in transgenic rice [J]. Planta, 2007, 225(4): 843-862.

Differentially Distinguished Expressed Genes in Chili Pepper Genic Male Sterility(GMS) Using cDNA-AFLP

YANG Gao-qiang^{1,2}, HUO Xiu-wen²

(1. Shenyang Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110034; 2. Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 TY-1 的 PCR 检测

杜玉丽¹, 张子君², 李海涛², 邹庆道²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁省农业科学院 蔬菜研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:利用特异引物对 3 份抗病纯合材料(基因型 Ty-1/Ty-1)和 4 份感病纯合材料(基因型 ty-1/ty-1)进行 PCR 扩增, 抗、感材料均产生 398 bp 的 PCR 扩增片段, 抗病和杂合抗病材料的酶切产物存在 Taq I 酶切位点, 酶切后分别产生了 303 和 98 bp 以及 398、303 和 98 bp 的片段, 而纯合感病材料的扩增产物无此酶切位点, 酶切后仍为 398 bp 的片段。该标记能够区分抗病材料、感病材料及抗病杂合材料, 是与番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 Ty-1 紧密连锁的共显性标记。利用该标记对 13 份番茄杂交种进行检测, 有 8 份杂交种含有 Ty-1 抗病基因, 3 份材料不含 Ty-1 抗病基因。利用这条标记对国内的 13 份番茄自交系进行检测, 13 份材料均不含 Ty-1 抗病基因。

关键词:番茄黄化曲叶病毒; Ty-1; 分子标记

中图分类号:S 436.412.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)13-0136-04

番茄(*Solanum lycopersicum*)是一种世界性经济作物, 它品种多, 产量高, 营养丰富, 用途广泛。限制番茄生产发展和产量的主要原因在于病害的流行危害和逆境条件的制约^[1]。近年来, 随着番茄保护地面积的不断扩大, 生产中出现的病虫害问题逐年加重, 新的病害不断出现, 每年因病虫害就可使番茄减产 10%~20%, 严重时可能绝收。

病毒病是番茄生产中最常见、发病最普遍的危害之一, 其中番茄黄化曲叶病毒病(Tomato yellow leaf curl virus disease, TYLCVD)是世界范围内流行的一种毁灭性的病毒病, 已成为世界番茄生产的限制性因素^[2], 一

旦发病, 很难控制。该病害于 20 世纪 30 年代末在以色列首次被发现^[3], 是一类由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播的双生病毒(Geminiviruses), 为菜豆金色花叶病毒属(*Begonurvirints*)成员^[4]。近年来, 该病害在世界各地大面积爆发并有逐年加重的趋势。自 2005 年开始, 我国广东、广西、台湾、上海、北京、江苏、浙江、河南、河北、山东等地均有发生的报道^[5-6], 并呈现由南向北迅速蔓延的趋势, 给当地的番茄生产造成极其严重的损失。番茄抗 TYLCV 育种始于 20 世纪 70 年代, 目前已培育出了一些抗病品种, 伴随着检测及鉴定技术及其它相关研究的发展, 近年来番茄抗 TYLCV 育种研究在各个方面都有了新的进展^[7]。

目前番茄黄化曲叶病毒病的抗病基因有 Ty-1, Ty-2, Ty-3, Ty-3a, Ty-4 和 Ty-5 等, 研究较多的是 Ty-1, Ty-2 和 Ty-3 基因, 其中 Zamir 等^[8]认为 Ty-1 基因为主效基因, 该基因为不完全显性单基因, 并将其定位在番

第一作者简介:杜玉丽(1986-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 现主要从事番茄抗黄化曲叶病毒病等研究工作。E-mail: duyuli325@163.com.

责任作者:李海涛(1956-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事蔬菜遗传育种研究工作。E-mail: haitao57@sohu.com.

收稿日期:2012-03-15

Abstract: Genic male sterility is an important way to utilize the heterosis of chili pepper, So, pilot studies were conducted for better understanding the mechanism of the chili pepper GMS, establish chili fertile plants buds and sterility plant buds cDNA library between the homozygous genic male sterility two-type line 'AB23' and by using cDNA-AFLP in chili pepper genic male sterility of sterility genes for preliminary research. The results showed that there were 19 bands expressed in a higher level in fertile plant buds, Among them, 13 bands homologous sequences function known, 2 bands function unknown and 4 bands were maybe some novel genes. The 13 homologous sequences function known participated in the following biological process: metabolism, transcription, cellular transport, signal transduction mechanism etc. Furthermore, RT-PCR demonstrates that it was consistent with the result of cDNA-AFLP. This study result will help us understand that the development of chili pepper male gametes and could give basic information about the genic male sterility in chili pepper.

Key words: chili pepper; genic male sterility; cDNA-AFLP