

番茄黄化曲叶病毒抗病基因 *Ty-2* 的 SCAR 标记筛选

王琳珊, 宋层孝, 宋建军, 任素贤, 陈文静

(河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

摘要:以抗病杂合体(*Ty-2/ty-2*)、抗病纯合体(*Ty-2/Ty-2*)和感病纯合体(*ty-2/ty-2*)番茄为试材,以提取植物的基因组 DNA 作为模板,根据与抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的 RFLP 标记设计特异引物,采用 DNA 聚合酶链式反应的方法,筛选获得了 2 个与抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的、且稳定可靠的 SCAR 标记,分别命名为 T0302-1 和 T0302-2。结果表明:T0302-1 和 T0302-2 两个标记均为共显性分子标记,可用于番茄抗病育种的辅助选择中。该研究旨在筛选获得与番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的分子标记,为番茄抗病育种提供技术支撑。

关键词:番茄;番茄黄化曲叶病毒病;*Ty-2* 基因;分子标记

中图分类号:S 641.201 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0094-06

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)广泛种植于我国南北各地,是世界上最主要的蔬菜作物之一。番茄的病害种类繁多,其中,番茄黄化曲叶病毒病(Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD)是近年来影响番茄生产的一种毁灭性病害,其病源为番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)。TYLCV 属于双生病毒亚组 III,是一种单链环状 DNA 病毒,主要由烟粉虱传播^[1]。培育抗病品种是防治番茄黄化曲叶病毒病的根本途径,目前已发现并可利用的番茄黄化曲叶病毒的抗病基因有 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-4* 和 *Ty-5*^[2-6]等 5 个基因。

Ty-2 基因是发现较早的抗病基因之一,其来源于野生多毛番茄(*Lycopersicon habrochaites*),被定位在 11 号染色体长臂上。起初,该基因被定位在标记 TG393 (103 cM)和 TG36(84 cM)之间,大约 14.6 cM 的距离范围之内^[7]。后来,又进一步被定位在 TG26 (92 cM)和 TG36(84 cM)之间^[3]。RFLP 标记 TG105A (90 cM)和 T0302(89 cM)与 *Ty-2* 基因连锁较紧密。2002 年, GARCIA 等^[8]利用 RFLP 标记 TG105A 设计特异引物对基因型分别为 *Ty-2/Ty-2* 和 *ty-2/ty-2* 的番茄材料进行 PCR 扩增,之后用限制性内切酶 *Taq* I 对扩增产物进行酶切,没有区分开这 2 种基因型的材料,推测可能是因为 *Ty-2* 位于番茄 11 号染色体抗性基因热点上,受到枯

萎病抗性基因 *I-2* 的干扰,产生了假阳性。随后, GARCIA 等^[9]又根据 RFLP 标记 T0302 设计特异引物,对基因型为 *Ty-2/Ty-2*、*ty-2/ty-2* 以及 *Ty-2/ty-2* 的番茄材料进行 PCR 扩增,结果分别鉴定出了这 3 种不同的基因型。分子标记的有效性和实用性取决于它与目标基因的连锁强度,在特定条件下获得的分子标记能否适用于其它的育种系统还有待于进一步研究。

随着分子标记技术的不断发展,分子标记辅助选择已经成为番茄抗病育种工作中的有效工具。筛选并建立抗病基因 *Ty-2* 的分子标记,必将大大提高选择的准确性,加快番茄抗病育种进程。在番茄抗病育种中常用的分子标记主要有限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记、随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphism DNA, RAPD)标记、简单序列重复标记(Simple sequence repeat polymorphisms, SSR)、序列特异性扩增区标记(Sequence-characterized amplified region, SCAR)和酶切扩增多态性序列标记(Cleaved amplified polymorphism sequences, CAPS)等。SCAR 标记和 CAPS 标记一般多为共显性标记,能够区分杂合子和纯合子,操作方便快捷、结果稳定、准确性高,在番茄辅助选择育种中具有十分广阔的应用前景^[10-11]。该研究以抗病杂合体(*Ty-2/ty-2*)、抗病纯合体(*Ty-2/Ty-2*)和感病纯合体(*ty-2/ty-2*)番茄为试验材料,根据已发表的与抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的 RFLP 标记设计特异引物进行 PCR 扩增,筛选获得了 2 个与抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的 SCAR 标记,并利用不同来源、不同遗传背景的种质资源材料对获得的 SCAR 标记的有效性进行验证,以期获得与番茄黄化曲叶病毒病抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的分子标记,为番茄抗病育

第一作者简介:王琳珊(1986-),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为番茄抗病基因分子标记。E-mail:wanglinshanwls@163.com.

责任作者:宋建军(1963-),男,河北宁晋人,博士,教授,硕士生导师,现主要从事番茄抗病育种等研究工作。E-mail:songjj63@126.com.

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(14226310D)。

收稿日期:2015-02-05

种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

标记筛选所用的番茄材料有 3 种,分别是感病纯合体‘金棚一号’(ty-2/ty-2)、抗病杂合体‘1102’(Ty-2/ty-2)

表 1 标记筛选和验证所用番茄材料

Table 1 Tomato materials used in screening and verification of molecular markers

编号 No.	番茄品种 Tomato cultivars	基因型 Genotype	材料来源 Source of materials
1	‘金棚一号’‘Jinpeng 1’	ty-2/ty-2	西安秦皇种苗有限公司 Xi'an Qinhuang Seedling Co., Ltd.
2	‘1102’	Ty-2/ty-2, I-2/—	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology
3	‘CLN2498D’	Ty-2/Ty-2	台湾亚洲蔬菜研究中心 Asian Vegetable Research and Development Center
4	‘CLN2123A’	Ty-2/Ty-2	台湾亚洲蔬菜研究中心 Asian Vegetable Research and Development Center
5	‘H24’	Ty-2/Ty-2	台湾亚洲蔬菜研究中心 Asian Vegetable Research and Development Center
6	‘1116’	ty-2/ty-2, I-2/I-2	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology
7	‘1117’	ty-2/ty-2, I-2/I-2	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology
8	‘1118’	ty-2/ty-2, I-2/I-2	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology
9	‘1119’	ty-2/ty-2, I-2/I-2	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology
10	‘1120’	ty-2/ty-2, I-2/I-2	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology
11	‘1121’	ty-2/ty-2, I-2/I-2	河北科技大学 Hebei University of Science and Technology

1.2 试验方法

1.2.1 特异引物设计 根据已发表的与 Ty-2 紧密连锁的 RFLP 标记 TG105A 和 T0302(图 1),参考国内外发表的文献^[8-9],选用 3 对特异引物。引物由北京华大基因研究中心合成,引物名称和序列详见表 2。

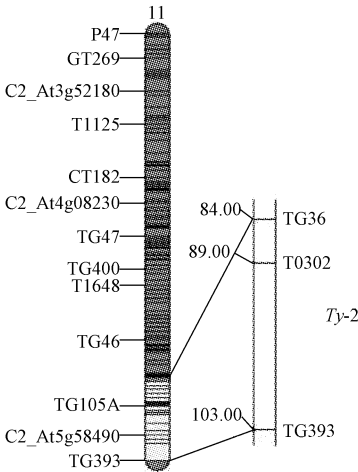


图 1 抗病基因 Ty-2 在番茄染色体上的遗传图谱^[7]

Fig. 1 Genetic mapping of Ty-2 resistance gene on tomato chromosome^[7]

表 2 试验所用的 PCR 引物

Table 2 PCR primers used in the experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
T0302-1 F	5'-TGGCTCATCTGAAGCTGATAGCGC -3'
T0302-1 R	5'-AGTGATACATCCTTGCCATTGACT -3'
T0302-2 F	5'-TGGCTCATCTGAAGCTGATAGCGC -3'
T0302-2 R	5'-TGAT (T/G) TGATGTTCTC (T/A) TCTCT (C/A) GCCTG-3'
TG105A F	5'-CTTCAGAAATTCCTGTTTGTAGTCAGTTGAACC -3'
TG105A R	5'-ATGTCACATTGTGTGCTTGGACCATCC -3'

和抗病纯合体‘CLN2498D’(Ty-2/Ty-2)。其中,‘1102’还含有枯萎病的抗性基因 I-2。标记验证所用材料,还选用了 6 种含有 I-2 基因但不含 Ty-2 基因的番茄材料以及 2 种抗病纯合材料‘CLN2123A’和‘H24’,共计 11 种材料(表 1)。

1.2.2 DNA 提取 所用番茄材料在育苗盘中育苗,当长出 3~4 片真叶时采取上部幼叶,采用 CTAB 法提取基因组 DNA,利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度^[12]。将提取的 DNA 储存于 -20℃ 冰箱中备用。

1.2.3 PCR 扩增反应 以上述番茄材料的基因组 DNA 为模板,利用设计合成的特异引物进行 PCR 扩增。3 对引物使用的 PCR 反应体系相同,总体积为 25 μL (表 3)。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,35 个循环后,72℃ 延伸 10 min。

表 3 PCR 反应体系

Table 3 PCR reaction system

成分 Constituents	体积 Volume/μL
dNTP (10 mmol/L)	1.0
正向引物 Forward primer	1.5
反向引物 Reverse primer	1.5
10×PCR 缓冲液 10 × PCR buffer	2.5
Taq I 酶 Enzyme Taq I (5 U/μL)	0.3
模板 DNA Template DNA (10 ng/μL)	1.0
ddH ₂ O	17.2

1.2.4 酶切反应 酶切体系为 Taq I 酶 1 μL,buffer 2 μL,PCR 产物 7 μL,终体积用水补足 20 μL。水浴锅中 65℃ 保温 1.5 h,loading buffer 终止反应。

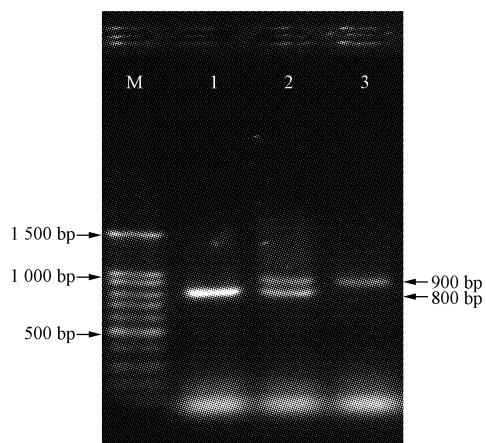
1.2.5 凝胶电泳 PCR 扩增产物或酶切反应产物均于 2% 的琼脂糖凝胶中电泳。电泳所用时间为 50 min,电压为 90 V。电泳结果用 EB 染色后,用凝胶成像系统观察拍照。

2 结果与分析

2.1 分子标记筛选

2.1.1 引物 T0302-1 的 PCR 扩增结果 抗病纯合基因

型材料‘CLN2498D’扩增出 1 条特异条带,DNA 片段大小为 900 bp,感病纯合基因型材料‘金棚一号’扩增出 1 条特异条带,DNA 片段大小为 800 bp,抗病杂合基因型材料‘1102’同时扩增出大小为 900 bp 和 800 bp 的 2 条特异条带(图 2)。获得的 T0302-1 标记不仅可以区别抗病材料和感病材料,还能够区别抗病杂合体和抗病纯合体,是一个共显性 SCAR 标记。



注: M: 100 bp DNA Ladder; 1: ‘金棚一号’; 2: ‘1102’; 3: ‘CLN2498D’。图 3~5 同。

Note: M: 100 bp DNA Ladder; 1: ‘Jinpeng 1’; 2: ‘1102’; 3: ‘CLN2498D’. The same as Fig. 3~5.

图 2 引物 T0302-1 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplified results using T0302-1 primers

2.1.2 引物 T0302-2 的 PCR 扩增结果 抗病纯合基因型材料‘CLN2498D’扩增出 1 条特异条带,DNA 片段大小为 600 bp,感病纯合基因型材料‘金棚一号’扩增出 1 条特异条带,DNA 片段大小为 450 bp,抗病杂合基因型材料‘1102’同时扩增出大小为 600 bp 和 450 bp 的 2 条特异条带(图 3)。获得的 T0302-2 标记不仅可以区别抗

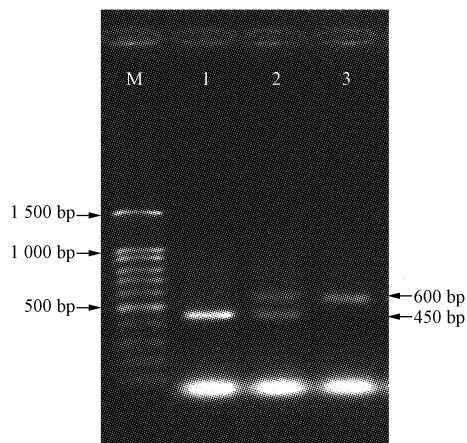


图 3 引物 T0302-2 的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplified results using T0302-2 primers

病材料和感病材料,还能够区别抗病杂合体和抗病纯合体,是一个共显性 SCAR 标记。

2.1.3 引物 TG105A 的 PCR 扩增及酶切结果 抗病杂合、抗病纯合和感病基因型 3 种材料,引物 TG105A 均扩增出特异条带,DNA 片段大小为 450 bp(图 4)。由此推断引物设计和扩增程序是可行的,扩增出的特异片段是目的基因或等位基因附近的 DNA 片段。引物 TG105A 的 PCR 扩增产物经限制性内切酶 *Taq* I 酶切后,不同基因型材料间具有酶切多态性。抗病杂合基因型材料‘1102’和抗病纯合基因型材料‘CLN2498D’均产生了大小为 300 bp 和 100 bp 的 2 个特异片段,感病基因型材料‘金棚一号’产生了大小为 200 bp 和 100 bp 的 2 个特异片段(图 5)。获得的 TG105A 标记能够区别抗病材料和抗病材料,但不能区别抗病纯合体和抗病杂合体,

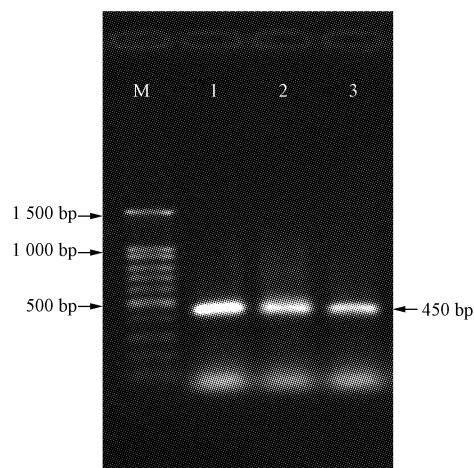


图 4 引物 TG105A 的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplified results using TG105A primers

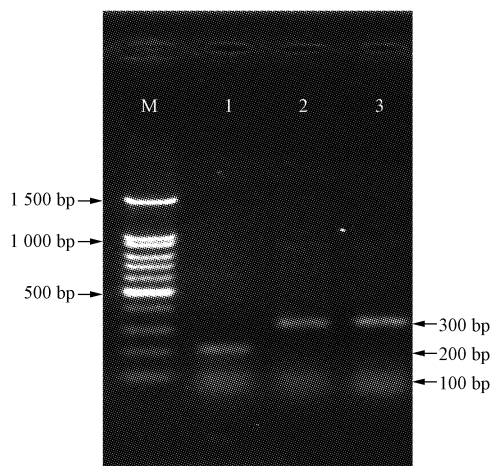


图 5 引物 TG105A PCR 扩增产物的酶切结果

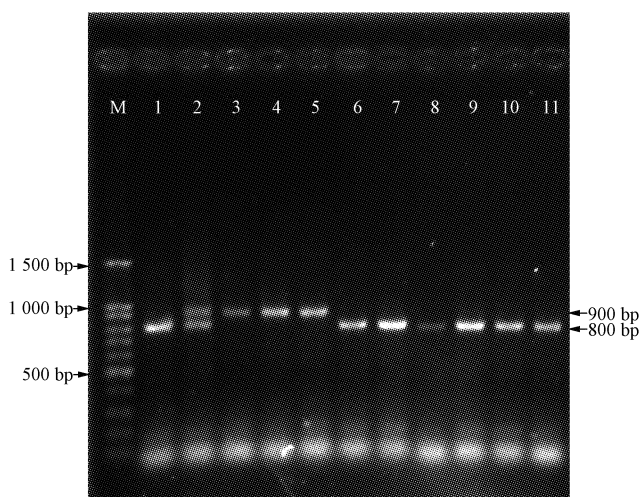
Fig. 5 *Taq*I enzyme digestions of PCR products using TG105A primers

是一个显性的 SCAR 标记,难以在辅助选择育种上直接应用。

2.2 分子标记的验证

分子标记的有效性是指若改变了亲本来源,分子标记与目标基因之间的交换值不会有大的变化,这样才能保证分子标记辅助选择的可靠性。上述获得的 TG105A 标记是 1 个显性的 SCAR 标记,难以在辅助选择上直接应用,获得的 T0302-1 和 T0302-2 两个标记为共 SCAR 共显性分子标记,有望在实际的辅助选择中应用。因此,利用 11 种不同来源、不同遗传背景的番茄种质资源材料对获得的 T0302-1 和 T0302-2 标记的有效性进行了验证。

T0302-1 SCAR 标记的验证结果如图 6 所示,抗病纯合基因型的 3 种材料均扩增得到 900 bp 的特异片段,感病纯合基因型的 7 种材料均得到大小为 800 bp 的特异片段,抗病杂合基因型材料‘1102’同时得到 900 bp 和 800 bp 的特异片段。



注:M;100 bp DNA Ladder;1:‘金鹏一号’;2:‘1102’;3:‘CLN2498D’;4:‘CLN2123A’;5:‘H24’;6:‘1116’;7:‘1117’;8:‘1118’;9:‘1119’;10:‘1120’;11:‘1121’。图 7 同。

Note: M; 100 bp DNA Ladder; 1: ‘Jinpeng 1’; 2: ‘1102’; 3: ‘CLN2498D’; 4: ‘CLN2123A’; 5: ‘H24’; 6: ‘1116’; 7: ‘1117’; 8: ‘1118’; 9: ‘1119’; 10: ‘1120’; 11: ‘1121’. The same as Fig. 7.

图 6 引物 T0302-1 的 PCR 扩增结果

Fig. 6 The electrophoretic image of PCR product with T0302-1 primers

T0302-2 SCAR 标记的验证结果如图 7 所示,抗病纯合基因型的 3 种材料均扩增得到 600 bp 的特异片段,感病纯合基因型的 7 种材料均得到大小为 450 bp 的特异片段,抗病杂合基因型材料‘1102’同时得到 600 bp 和 450 bp 的特异片段。

验证结果显示无论种质材料是否含有 *I-2* 基因,

T0302-1 和 T0302-2 这 2 个标记均表现出特异条带,没有受到 *I-2* 基因的干扰。表明获得的分子标记在不同遗传背景、不同来源的番茄材料中表现稳定可靠、有效性高。与 T0302-1 标记相比较,T0302-2 标记更加清晰、容易辨认,是一个比较理想的共显性标记。

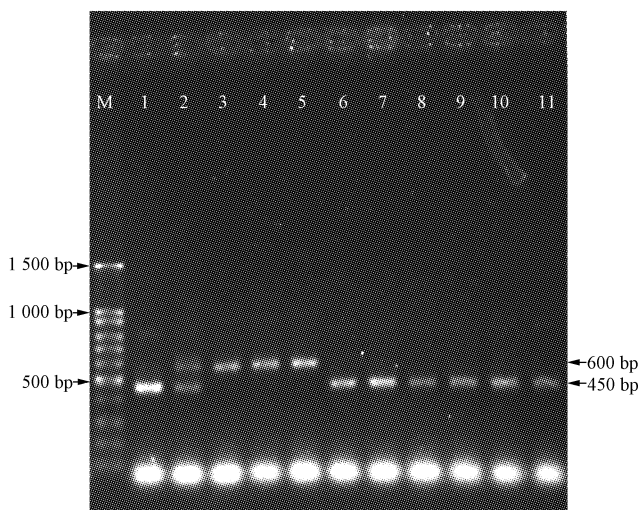


图 7 引物 T0302-2 的 PCR 扩增结果

Fig. 7 The electrophoretic image of PCR product with T0302-2 primers

3 结论与讨论

该研究筛选获得了 2 个与抗病基因 *Ty-2* 紧密连锁的共显性 SCAR 标记,即 T0302-1 和 T0302-2 标记。利用 T0302-1 引物进行 PCR 扩增,抗病纯合基因型材料得到 900 bp 的特异片段,感病纯合基因型材料得到 800 bp 的特异片段,抗病杂合基因型材料得到 800 bp 和 900 bp 2 个特异片段。利用 T0302-2 引物进行 PCR 扩增,抗病纯合基因型材料得到 600 bp 的特异片段,感病纯合基因型材料得到 450 bp 的特异片段,抗病杂合基因型材料得到 450 bp 和 600 bp 2 个特异片段。这 2 个标记都可以区别抗病杂合体和抗病纯合体材料,均为共显性 SCAR 标记。同时,综合比较发现,T0302-2 标记更加清晰和容易辨认,是一个比较理想的共显性标记,可以应用于实际的辅助选择育种中。

培育抗病品种是防治黄化曲叶病毒病的根本途径,在抗病育种过程中抗病材料的筛选与鉴定是一个最重要的关键环节。番茄黄化曲叶病毒病的抗病性鉴定的方法,主要有田间自然鉴定和烟粉虱接种鉴定等方法^[13]。田间自然鉴定和烟粉虱接种鉴定周期长、易受外界条件影响,而分子标记技术可以从 DNA 水平上鉴定出抗病位点,不受外界条件限制,提高了选择的准确性和育种效率^[14]。因此,分子标记技术已经成为番茄抗病育种工作中的一种有利辅助工具。SCAR 分子标记技术

是在 RAPD 标记基础上发展起来的,可以创建更加稳定和可靠的共显性标记,是番茄分子标记辅助选择育种中应用最为广泛的一项技术^[15]。该研究筛选获得的 T0302-1 和 T0302-2 标记均为能够区分抗病纯合体和抗病杂合体的共显性 SCAR 标记,这些结果与 GARCIA 等^[9]的研究结果相一致。GARCIA 等^[8]以抗病纯合体和感病纯合体为材料,利用 RFLP 标记 TG105A 设计特异引物进行 PCR 扩增,经内切酶 *Taq* I 酶切后,没有获得酶切多态性,可是,该研究获得的 TG105A 标记虽具酶切多态性,但不能区分抗病纯合体和抗病杂合体,是一个显性标记,难以在辅助选择育种上应用,这可能与研究中所用的种质资源材料不同有关。抗病基因 *Ty-2* 位于番茄 11 号染色体的抗性热点上,同一分子标记应用于不同的种质资源材料进行抗病性筛选时,有时会产生假阳性的结果,影响选择效率^[8-9,16]。该研究筛选获得的 T0302-1 和 T0302-2 标记,经过不同来源、不同遗传背景番茄材料的验证,均稳定可靠、有效性高,虽然不一定适用于所有的育种体系,但至少适用于本育种体系或种质资源材料遗传背景相近的其它育种体系。T0302-1 和 T0302-2 标记尽管是依据 *Ty-2* 基因附近的 RFLP 标记序列设计特异引物创建的,但它们与 *Ty-2* 抗病基因之间的确切遗传距离还不清楚,有待于进一步研究。研究并创建与 *Ty-2* 抗病基因更加紧密连锁的新的分子标记也是今后的重要研究内容。

抗病特别是抗番茄黄化曲叶病毒病已成为番茄抗病育种的重要育种目标之一,番茄黄化曲叶病毒病抗病基因分子标记的筛选与创建是辅助选择育种的关键所在。该研究根据抗病基因 *Ty-2* 附近的 RFLP 标记序列设计特异引物进行 PCR 扩增,筛选获得了 2 个稳定性好、可靠性高的共显性 SCAR 标记,这将为 *Ty-2* 抗病基因分子标记辅助选择育种提供高效的选择手段,从而大大推动番茄黄化曲叶病毒抗病育种的进展。

参考文献

- [1] 宋建军,刘红霄,仇燕,等. 番茄黄化曲叶病毒病的发生分布及防治对策[J]. 北方园艺,2010(7):147-150.
- [2] ZAMIR D, EKSTEIN-MICHELSON I, ZAKAY Y, et al. Mapping and

introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(2):141-146.

- [3] HANSON P, GREEN S K, KUO G. *Ty-2* a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato[J]. Tomato Genetic Cooperative Report, 2006, 56:17-18.
- [4] 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]. Molecular Breeding, 2007, 20:271-284.
- [5] JI Y F, SCOTT J W, SCHUSTER D J, et al. Molecular mapping of *Ty-4*, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2009, 134(2):281-288.
- [6] ANBINDER I, REUVENI M, AZARI R, et al. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*[J]. Theor Appl Genet, 2009, 119:519-530.
- [7] HANSON P M, BERNACCHI D, GREEN S, et al. Mapping of a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line [J]. Journal of the American Society of Horticultural Science, 2000, 125:15-20.
- [8] GARCIA B E, MAXWELL D P. Analysis of sequences from the TG105 marker of Chromosome 11 as a tag for *Ty-2* locus from *S. habrochaites* [EB/OL]. <http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/TG105.pdf>. 2011-12-12.
- [9] GARCIA B E, GRAHAM E, JENSEN K S, et al. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance *Ty-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm[EB/OL]. <http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/MAS-Protocols/Ty2-TGC-Garcia.pdf>. 2011-12-16.
- [10] 许丽,李莹,林凤. DNA 分子标记及其在作物遗传育种中的应用[J]. 沈阳师范大学学报, 2006, 24(4):466-469.
- [11] 王胜利,张喜春. DNA 分子标记技术在番茄育种上的应用[J]. 北方园艺, 2007(6):50-53.
- [12] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [13] 国艳梅,杜永臣,王孝宣,等. 番茄黄化卷叶病毒病(TYLCV)的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(5):30-35.
- [14] RICK C M, ZOBEL R W, FOBES J F. Four peroxidase loci in red-fruited tomato species:genetics and geographic distribution[J]. PNAS USA, 1974, 71(3):835-839.
- [15] 国艳梅,杜永臣,王孝宣,等. Codominant-SCAR 技术的建立以及在番茄育种中的应用[J]. 园艺学报, 2005, 32(6):1026-1029.
- [16] 韩璇璇,宋建军,王琳珊,等. 番茄黄化卷叶病毒病抗病基因 *Ty-1* 的 CAPS 标记建立[J]. 中国农学通报, 2012, 28(1):195-200.

Screening of SCAR Molecular Markers Linked to *Ty-2* Gene Resistant to Tomato Yellow Leaf Curl Disease

WANG Linshan, SONG Cengxiao, SONG Jianjun, REN Suxian, CHEN Wenjing

(College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract: Resistant heterozygotes (*Ty-2/ty-2*), resistant homozygotes (*Ty-2/Ty-2*) and susceptible homozygotes (*ty-2/ty-2*) were used as experimental materials. Based on the published RFLP markers tightly linked to *Ty-2*, three pairs of

油用及观赏牡丹花粉超微结构的比较研究

宣亚楠^{1,2}, 胡永红², 李欣¹, 杜玉玲¹, 闫永庆¹

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国科学院 上海辰山植物科学研究中心, 上海市资源植物功能基因组学重点实验室, 上海辰山植物园, 上海 201602)

摘要:在扫描电镜下对5个不同种源的杨山牡丹、8个观赏牡丹品种(包括5个中国中原品种和3个日本品种)和3个牡丹芍药杂交种的花粉超微结构进行观察并对其形态指标进行比较研究。结果表明:不同种源及品种间花粉纹饰差异显著。杨山牡丹以穴状纹饰为主,观赏牡丹品种以网状为主,杂交种以皱波-网状为主。牡丹花粉的极轴长、赤道面宽、极轴长/赤道面宽、萌发沟长、萌发沟宽和穿孔直径均大于牡丹芍药杂交种,但脊宽均小于杂交种。通过比较研究芍药属花粉的超微结构,其花粉形态的差异可以作为资源利用和品种鉴定的初步依据,进一步为牡丹园艺品种的起源、演化以及种类间亲缘关系等的研究提供孢粉学证据。

关键词:杨山牡丹;中原牡丹;日本牡丹;芍药牡丹杂交种;花粉超微结构

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0099-05

花粉是植物携带遗传信息的雄性生殖细胞,其形态受外界环境影响很小,具有很强的遗传保守性和稳定性^[1],植物在世代相传过程中,花粉基本上保持其固有形态特征,如形状、轮廓、纹饰以及花粉壁结构,这些形态和结构特征是鉴别植物种的重要依据之一^[2-3],不仅可以为植物的起源、系统演化、古植物学、地质学等方面提供重要证据^[4],在品种分类、种属间分类、品种间亲缘关系和品种起源等分析方面也具有重要意义^[5-7]。

牡丹(*Paeonia* section *Moutan* DC.)属芍药科(*Paeoniaceae*)芍药属(*Paeonia* L.)牡丹组(*Sect. Moutan* DC.)木本植物,花大色艳,雍容华贵,具有较高的观赏价值,也是国花的主要候选者。早在东汉时期,人们就发现其药用价值,牡丹开始从野生转变为栽培,距今已经有1600多年栽培历史^[8-10]。

初步统计现有栽培面积达20267 hm²,年产种子量达57855 t,牡丹种子含油量高达27%~40%,其中超过90%为不饱和脂肪酸,亚麻酸的含量高达40%,高于橄榄油、玉米、大豆和向日葵。牡丹籽油具有很高营养价值,油用牡丹将成为后续研究的重点^[11-13]。

对于芍药属花粉形态,国内学者曾经开展过一些研究。早在1984年,席以珍^[14]对9种芍药属花粉形态及其外壁超微结构进行观察发现外壁纹饰主要分为细网状纹饰、粗网状纹饰、穴状纹饰、皱波状纹饰,但其研究局限于基本的形态描述,并没有对花粉形态指标进行量化。郭先锋等^[15]在此基础上对4种野生芍药的花粉形态进行研究,建立了芍药花粉形态的量化指标,并运用聚类分析方法探讨它们之间的亲缘关系。袁涛等^[16]对5个牡丹野生种花粉进行研究,初步建立了牡丹花粉形态的量化指标,将花粉外壁纹饰划分为4个类型,其演化途径是小穴状纹饰→穴状纹饰→网状纹饰→粗网状纹饰,王佳^[17]对不同居群的杨山牡丹花粉进行孢粉学的研究,结果表明不同居群的花粉差异较大。何丽霞等^[18]通过对9个中国野生牡丹种花粉进行研究,对牡丹组革质花盘亚组的5个种12个居群的花粉进行了观察,结果

第一作者简介:宣亚楠(1988-),女,硕士研究生,研究方向为园林植物逆境生理生态研究。E-mail: xuanyanan2008@163.com.

责任作者:闫永庆(1966-),男,博士,教授,现主要从事园林植物逆境生理生态等研究工作。

基金项目:上海市绿化与市容管理局重点攻关资助项目(G142435);上海市资源植物功能基因组学重点实验室资助项目(14DZ2260400)。

收稿日期:2015-01-29

specific primers were designed for PCR amplification. As a result, two steady-going and effective SCAR markers, T0302-1 and T0302-2, were found. The results showed that T0302-1 and T0302-2 were co-dominant SCAR markers, which could be used in marker assistant selection for tomato disease resistance breeding. This paper was aimed to obtain molecular markers tightly linked to Ty-2 gene resistant to tomato yellow leaf curl virus and afford technical supports for tomato disease resistance breeding.

Keywords: tomato; tomato yellow leaf curl disease; Ty-2 gene; molecular marker