

番茄栽培品种 SSR 标记和形态 标记的遗传多样性分析

王日升^{1,2}, 李杨瑞^{2*}, 杨丽涛³, 李立志¹, 方锋学¹, 李文嘉¹

(1. 广西农业科学院蔬菜研究中心, 南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

3. 广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要: 比较了 SSR 标记和形态标记在研究番茄栽培品种遗传多样性上的应用。用 7 对 SSR 引物检测了 11 个番茄栽培品种的遗传多样性, 共得到 53 条带, 每一个位点上扩增出 2-9 条带, 平均为 6 条; 品种间遗传相似系数在 0.39-0.84 之间, 平均遗传相似系数为 0.60。根据 11 个形态学性状表型值计算的遗传相似系数在 0.27-0.72 之间, 平均遗传相似系数 0.58。用 UPGMA 进行聚类分析, SSR 标记和形态标记都可依果肉颜色和果实大小将供试材料分组, 即黄色和红色果肉, 樱桃小番茄和大、中果形的混合型; 两种方法对番茄栽培品种遗传多样性的评价相近。

关键词: 番茄; 简单序列重复; 形态标记; 遗传多样性

中图分类号: Q16

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)02-0120-06

Analysis of Genetic Diversity Based on SSR and Morphological Markers among Tomato Cultivars

WANG Ri-sheng^{1,2}, LI Yang-rui^{2*}, YANG Li-tao³, LI Li-zhi¹,
FANG Feng-xue¹, LI Wen-jia¹

(1. Vegetable Research Center, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China; 3. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The analysis of genetic diversity among tomato cultivars was compared by simple sequence repeat (SSR) and morphological markers. Seven SSR primers were used to detect the genetic diversity among 11 tomato cultivars, and total 53 bands were obtained, the average bands per SSR primer pair being 6 with a range from 2 to 9. Mean genetic similarity coefficient among cultivars was 0.60, varying from 0.39 to 0.84. According to 11 phenotype values of morphological characters, the mean genetic similarity coefficient was 0.58, varying from 0.27 to 0.72. Cluster analysis by unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) showed that both SSR and morphological markers could well distinguish the tomato cultivars by the colour of mesocarp and fruit size. The results of the evaluations of genetic diversity in tomato cultivars based on the two methods were similar.

Key words: Tomato; Simple sequence repeat; Morphological marker; Diversity

遗传标记是基因型特殊的易于识别的表现形式, 形态标记是描述生物外部特性特征的传统遗传标记, 即植物的外部特征, 如株高、穗长、粒色、千粒

重等, 具有简单直观的优点。虽然它与细胞标记 (cell markers)、生化标记 (biochemical markers) 都属于基因表达的结果, 是对基因的间接反映, 但标记

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-12-12

基金项目: 广西农科院科技发展基金(200405)资助

* 通讯作者 Corresponding author

数日有限,多态性较差,易受环境的影响,不能满足种质资源鉴定和育种工作的需要。而 DNA 分子标记是直接在 DNA 上检测生物之间的差异,是 DNA 水平遗传变异的直接反映,它具有不受生育期、环境和基因表达与否的限制,数量极多,遍及整个基因组,且有多态性高和遗传稳定的特点^[1]。

近年来,国内已有利用随机扩增多态 DNA (RAPD)技术研究番茄属遗传多样性的报道^[2-4],然而因 RAPD 本身的局限性限制了其应用,而微卫星 DNA (microsatellite DNA)由于具有稳定性、多态性高和操作简单等优点,近年来在许多作物中广泛使用^[5],目前尚无利用 SSR (简单序列重复 Simple sequence repeat)标记研究番茄栽培品种遗传多样性的报道。本研究比较了 SSR 标记和形态标记在研究番茄栽培品种遗传多样性上的应用,以了解番茄遗传多样性与各形态学性状的相关程度,及两种标记在研究番茄遗传多样性上的优劣,为番茄的种质资源利用和育种提供科学依据。

1 材料和方法

材料 选取广西农业科学院蔬菜研究中心保存的形态学性状相差较大的 11 个杂交一代番茄作为研究对象(表 1)。田间试验在广西农业科学院蔬菜研究中心中试基地进行,按常规方法进行管理。

DNA 提取 参照 Ausubel^[6]的 CTAB 法提取番茄基因组 DNA,用 0.8% 琼脂糖凝胶检测 DNA 质量。

表 1 11 个供试番茄品种

Table 1 Eleven tested tomato cultivars and the origin

编号 No.	品种名 Cultivars	来源地 Origin
1	新夏番茄 Xinxia	广州 Guangzhou
2	Irsel-AI-146	以色列 Israel
3	Sun No.1	美国 US
4	Sun No.2	美国 US
5	瑞珍番茄 Ruizhen	台湾 Taiwan
6	金可丽 Jinkeli	台湾 Taiwan
7	红姑娘番茄 Hongguniang	江苏 Jiangsu
8	石头番茄 Stone	澳大利亚 Australia
9	抗青8621 Kangqing8621	广西 Guangxi
10	美星番茄 Meixin	广州 Guangzhou
11	向阳红 Xiangyanghong	江苏 Jiangsu

SSR 引物 本研究共用了 32 对 SSR 引物,用于统计分析的 7 对多态性引物选自 Brown^[7]的报道和 NCBI 上公开发布的分子标记连锁图(表 2),由上海生工合成。

聚合酶链(polymerase chain reaction, PCR)反应、电泳和染色 PCR 反应体系参照 Brown 等^[7]的方法,并稍加修改。反应总体积为 25 μ l,其中含有 0.5 U *rTaq* 聚合酶(购自大连宝生物公司),SSR 引物 0.3 μ mol/L, dNTPs 100 μ mol/L,模板 DNA 40–100 ng, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,94 $^{\circ}$ C 30 s,48 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C 或 55 $^{\circ}$ C 45 s(视所用微卫星引物确定,表 2),72 $^{\circ}$ C 105 s;接着 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,共 34 次循环,之后 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物用 6.0% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染检测。

表 2 SSR 引物

Table 2 Primers for SSR analysis

引物名称 Primer	重复单元 Repeat motif	重复次数 Replicates	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	循环次数 No. of cycle	引物序列 (上游序列,下游序列) Primer sequence (forward, reverse)	染色体号 Chromosomal number
SSR52	AAC	9	53	35	TGATGGCAGCATCGTAGAAG GGTCCGAAGGGATTACAGA	7
SSR76	CGG	7	56	35	ACGGGTCGTCTTTGAAACAA CCACCGGATTCTTCTTCGTA	11
SSR117	TC	11	56	35	AATTCACCTTTCTCCGTCG GCCCTCGAATCTGGTAGCTT	1
SSR332	GAG	6	53	35	GTTTGATGTGGCTCCTGGTT AACTCCATTACAGATGTGGC	1
SSR450	AT	13	56	35	GGAATAACCTCTAACTGCGGG CGATGCCTTCATTGGACTT	4
SSR44	GA	54	56	35	TCATCTGCAATTCATGGCTC AGTCAAGGATGTGCTTCCC	12
Tom236/237*	AT	16	48	40	GTTTTTCAACATCAAAGAGCT GGATAGGTTTCGTTACTGAACT	10

* 引自文献[6],其余引自 NCBI。Cited from reference [6], the others from NCBI.

数据处理 在数据处理中,我们只分析图片中清晰的条带,将有条带的记录为“1”,否则为“0”^[4]。根据 Dice 系数计算相似系数,利用 $D=1-S$ 得到遗传距离,用 SAS(Version 8.1) 软件 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean, 算术平均非加权配组法) 中密连法 (density linkage method) 进行聚类分析。

观察记载的形态学性状参照《蔬菜品种调查记载项目及标准说明》^[6] 进行调查。质量性状按照表 3^[9] 所列形态学性状进行标准化变换,以“1”表示基因座位为显性,以“0”表示基因座位为隐性;裂果性状参照陈兰荪^[10] 方法自定义为 1,不裂果自定义为 0;数量性状取平均值后参照陈兰荪^[10] 方法进行标准化变换。之后用与分析 SSR 标记相同方法进行相似系数计算、UPGMA 聚类分析。

2 结果和分析

2.1 形态性状和 SSR 标记分析

从 11 个番茄品种的 11 个主要形态学性状的

调查结果(表 4)可以看出:在 11 个性状中,黄色果肉(6 号)和大果形(3 号)是显著区别于其他 9 个品种的性状,(樱桃形)小番茄(5、6 号)是显著区别于其他 9 个品种的性状;除品种 3、5、6 号外的 8 个品种中,只有叶形和心室数是共同性状,另外 9 个性状虽各有异同,但依据任一性状都不能将它们区别开。供试品种 11 个形态学性状的遗传相似系数介于 0.27–0.72 之间,平均遗传相似系数为 0.58,各品种间遗传距离见表 5。

7 对 SSR 引物共检测到 53 条带,每一个位点上检测到 2 到 9 条带,平均为 6 条,11 个番茄品种间遗传相似系数介于 0.39–0.84 之间,平均遗传相似系数为 0.60。从番茄品种间两种标记的遗传相似系数和平均遗传相似系数来看,两种方法所反映出的遗传多样性与对多样性的评价相近。

2.2 聚类结果分析

从 SSR 标记聚类图(图 2)可以看出,在 7 个 SSR 位点上,供试品种在聚类密度为 73.10 时,可分为 I、II、III 三大类,I 类为黄色果肉的(樱桃)小番

表 3 形态学性状数量化表

Table 3 Morphologically quantitative characters

名称 Name	1	0	隐性基因符号 ^[8] Recessive gene	染色体座位 ^[8] Chromosomal locus
叶型 Leaf shape	普通叶	薯叶	c	6L—104
叶色 Leaf color	深	浅(带黄色)	l	10S—18
果肉色 Mesocarp color	红色	黄色	y	1S—30
棱沟 Stripe	无	有	gs	7S—5
绿果肩 Green fruit shoulder	有	无	u	10S—19
生长习性 Growth habit	无限生长型	有限生长型	sp	6L—105
生长类型 Growth form	高秧蔓生	直立矮生	p	
心室数 No. of locules (个)	2–3	>5		

表 4 11 个番茄栽培品种形态学性状调查表

Table 4 Morphological characters in 11 tomato cultivars

性状 Characters	品种编号 Cultivars										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
叶形 Leaf shape	普通	普通	普通	普通	普通	普通	普通	普通	普通	普通	普通
叶色 Leaf color	绿	深绿	深绿	浅绿	绿	绿	绿	深绿	绿	深绿	深绿
裂果性 Fruit dehiscence	是	否	是	否	否	否	是	否	是	否	是
果肉色 Mesocarp color	桔红	鲜红	鲜红	鲜红	鲜红	黄	鲜红	红	红	鲜红	桔红
棱沟 Stripe	无	有	有	有	无	无	无	有	有	无	无
绿果肩 Green fruit shoulder	有	有	无	有	无	无	有	有	无	有	无
生长习性 Growth habit	有限	无限	有限	有限	无限	无限	无限	有限	无限	无限	无限
生长类型 Growth form	蔓生	蔓生	直立	直立	蔓生	蔓生	蔓生	直立	蔓生	直立	蔓生
心室数 No. of locules	多	多	多	多	少	少	多	多	多	多	多
果实重量 Fruit weight (g)	98.4	99.0	162.4	95.0	8.5	12.0	68.6	104.6	60.9	84.1	79.2
株高 Plant height(cm)	98.7	143.7	86.2	78.1	127.7	125.7	131.7	127.4	96.1	149.7	141.0

表 5 11 个番茄栽培品种间形态标记的遗传距离
Table 5 Genetic distance among eleven tomato cultivars based on morphological markers

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.000										
2	0.750	1.000									
3	0.857	0.794	1.000								
4	0.667	0.853	0.746	1.000							
5	0.700	0.833	0.750	0.761	1.000						
6	0.698	0.509	0.638	0.444	0.627	1.000					
7	0.816	0.721	0.792	0.600	0.667	0.600	1.000				
8	0.769	0.781	0.714	0.667	0.700	0.465	0.816	1.000			
9	0.746	0.845	0.730	0.800	0.746	0.480	0.679	0.780	1.000		
10	0.717	0.769	0.632	0.750	0.656	0.410	0.720	0.755	0.800	1.000	
11	0.780	0.873	0.762	0.857	0.806	0.480	0.679	0.780	0.879	0.867	1.000

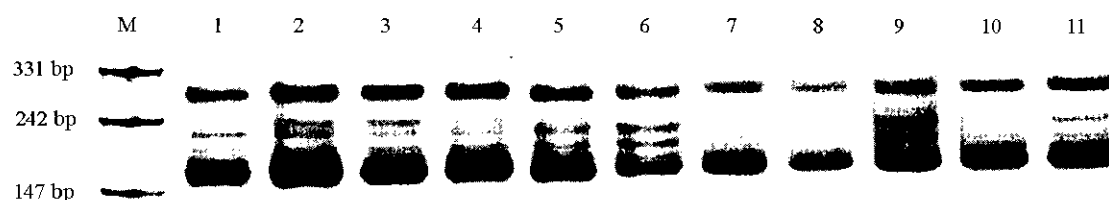


图 1 引物 SSR450 对 11 个番茄栽培品种扩增产物结果

Fig.1 Amplification results from eleven tomato cultivars with primer SSR450

M. μ c19 DNA/MspI(Hpa II) 分子量标记; 1-11 为品种号, 见表 1。Molecular marker: μ c19 DNA/Msp(Hpa II); 1 to 11 represent tomato cultivars as in Table 1.

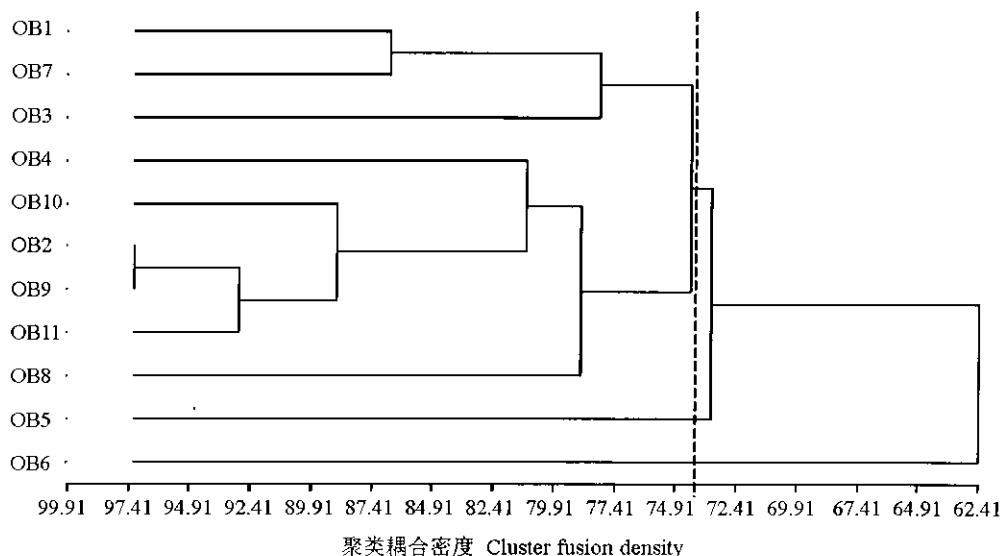


图 2 11 个番茄栽培品种 SSR 标记聚类图

Fig. 2 Dendrogram of eleven tomato cultivars obtained by SSR cluster analysis

茄(6号), II、III 类都为红色果肉, 其中 II 类为(樱桃形)小番茄(5号), III 类为大果形(3号)、中果形的混合类型。从形态标记聚类图(图 3)可以看出, 供试品种在聚类密度为 87.98 时, 分为 I、II、

III、IV 四大类, 品种 3、5 和 6 号各自单独聚为一类, 其他 8 个品种聚为一类; I 大类包括 1 个品种(3号), 为红色、多心室、大果形番茄; II 大类包括 1 个品种(6号), 为黄色、少心室、无限生长型、蔓生的

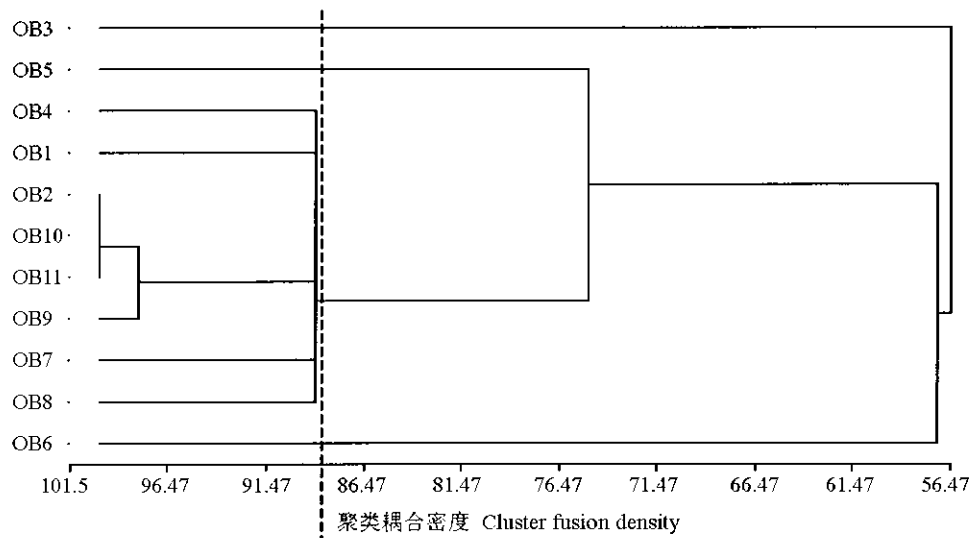


图 3 11 个番茄栽培品种形态学性状聚类图

Fig. 3 Dendrogram of eleven tomato cultivars obtained by cluster analysis of morphological characters

(樱桃形)小番茄;III 大类包括 1 个品种(5 号),为红色、少心室、无限生长型、蔓生的(樱桃形)小番茄,IV 大类包括 8 个品种,全部为红色、多心室中果形番茄。可见应用 SSR 标记和形态标记能够明显将黄色和红色果肉的番茄及(樱桃形)小番茄和大果形番茄区分开。

比较图 2 和图 3 可见,SSR 标记与形态性状的聚类结果相近但不完全相同:图 3 中除品种 3 号单独聚类外,其他 10 个品种聚类结果与图 2 基本一致,只是图 2 和图 3 中红色、中果形的品种排序有所差异而已。

3 讨论

番茄在园艺学上的分类有如下 5 种:按叶型分类、按株型分类、按果型与果色分类、按用途分类和按生态型分类。在按果型分类中再按果实大小细分时,又分为大果型番茄和小果型番茄;按果色分类时,分为火红色、粉红色、橙黄色、金黄色、黄色和淡黄色^[9]。李景富^[10]等对番茄属 9 个种 43 份材料进行了 RAPD 分析,将其分为野生种与普通番茄两个类群,野生种包括 8 个野生种 19 份材料,普通番茄共选 24 份材料,包括野生亚种 4 份,半栽培亚种 8 份,栽培亚种 12 份,但他们未进行分子标记与形态等农艺性状的相关性研究。SSR 标记则依据微卫星 DNA 的多态性。本研究中,番茄栽培品种在用 SSR

标记分析时,首先按果肉色分为黄色和红色两大类;红色果肉的番茄按果实大小又可分为樱桃形小番茄和中大果型两大类,这与其在园艺学上的分类中按果色和果型分类结果基本一致。供试品种间 SSR 标记与形态标记的遗传相似系数范围和平均遗传相似系数相近,说明二者用于研究番茄遗传多样性是可行的。据初步推测,以形态性状为研究对象时,SSR 标记效率较高。

我们认为 SSR 标记的聚类方法优于形态标记的聚类方法,这可以从图 3 比图 2 显得相对较紊乱和区别程度相对较差得到佐证。当然本试验所用的 SSR 引物数和番茄品种总数少,但它仍然克服了标记数目少,多态性较差,易受环境等常规遗传标记的缺点^[11]而得到与 11 个形态学性状相近的结果。虽然 SSR 引物设计必须依赖测序,需要足够的投资、人力和时间,成本相对较高,但其具有稳定性、多态性高等优点^[12],因此设想在构建番茄种质资源指纹图谱时,应优选 SSR 标记,同时选用其他的 DNA 分子标记,如 RFLP、RAPD、AFLP 等,这样不致造成有用 DNA 片断的流失。

参考文献

- [1] Jia J Z(贾继增). Molecular germplasm diagnostics and molecular marker-assisted breeding [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 1995, 29(4):1-10. (in Chinese)
- [2] Zhao L X(赵凌侠), Li J F(李景富), Tang K X(唐克轩), et al. Genetic analysis of *Lycopersicon* by RAPD markers [J]. J Fudan

- Univ (Nat Sci)(复旦大学学报自然科学版), 2002, 41(2):222-226. (in Chinese)
- [3] Li J F(李景富), Zhao L X(赵凌侠), Xu X Y(许向阳), et al. Genetic diversity analysis of *Lycopersicon* by RAPD markers [J]. J Northeast Agri Univ(东北农业大学学报), 2004, 35(1):11-16. (in Chinese)
- [4] Zhang H Y(张洪溢), Yu Y N(余延年), Wang R P(王锐萍), et al. An analysis of genetic diversity of the germplasm resources of *Lycopersicon esculentum* and the application of RAPD [J]. J Plant Genet Resour (植物遗传资源学报), 2003, 4(2):151-156. (in Chinese)
- [5] Zhao Y(赵勇), Yang K(杨凯), Ali A, et al. Evaluation of rice germplasm using SSR markers of functional gene in rice [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 2002, 35(4):349-353.(in Chinese)
- [6] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 1998. 37.
- [7] Brown P, Tanksley S D. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome [J]. Mol Gen Genet, 1996, 250:39-49.
- [8] 中国农业科学院蔬菜研究所. 蔬菜品种调查记载项目及标准说明 [M]. 1981.
- [9] 余延年, 吴定华, 陈竹君. 番茄遗传学 [M]. 长沙:湖南科技出版社, 1999. 17, 28-32.
- [10] 陈兰荪. 生物数学引论 [M]. 北京:科学技术出版社, 1988. 190-193.