

10个加工番茄品种的分子鉴别

于拴仓, 柴敏, 姜立纲

(国家蔬菜系统工程技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 采用 RAPD, RGA 和 SRAP 分子标记技术对 10 个加工番茄品种进行了分子鉴别的研究。12 个 RAPD 随机引物扩增后共产生了 23 个多态性位点; 2 对 RGA 引物产生了 11 个多态性位点; 1 对 SRAP 引物产生了 7 个多态性位点。分析单引物的品种鉴别能力发现, RGA 和 SRAP 标记具有较高的鉴别效率。通过双引物组合分析发现, 双引物组合 S391 和 em4+ me1 或 PK4+ PK2 和 em4+ me1 可用于 10 个加工番茄品种的分子鉴别, 并获得了各品种独特的核酸指纹。

关键词: 加工番茄; 分子鉴别; RAPD; RGA; SRAP

中图分类号: S641.2 Q789

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2005)01-0017-06

Varieties Identification of Processing Tomato Using Molecular Markers

YU Shuan-cang, CHAI Min and JIANG Li-gang

(National Engineering Research Center for Vegetable, Beijing 100089, China)

Abstract Three kinds of molecular markers, including RAPD, RGA and SRAP were employed to differentiate 10 processing tomato varieties. In this study, 23 polymorphic loci were produced by 12 RAPD primers, 11 polymorphic loci by 2 RGA primer pairs, and 7 polymorphic loci by 1 SRAP primer pair. The informative data by each primer or primer pair were used to identify 10 processing tomato varieties, respectively. It showed that RGA and SRAP marker were more effective. Moreover, to distinguish the 10 varieties, two-primer-combinations were tested. Primer-combinations, S391 and em4+ me1 or PK4+ PK2 and em4+ me1 could be used to identify the 10 processing tomato varieties and produced specific fingerprint of each varieties.

Key words Processing tomato; Molecular identification; RAPD; RGA; SRAP

番茄加工业已成为我国新疆等地区的支柱产业。在过去的 10 多年, 加工番茄的生产中, 大面积种植的仍然是从美国引进并经筛选后的 87-5 UC82 等常规品种。但近年来, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所、新疆农业科学院园艺研究所、新疆石河子蔬菜研究所等单位相继推出一批具有市场竞争力的杂一代加工番茄品种, 在生产上占据了一定的市场份额。品种的多元化亦使得品种的真实性检验成为目前的重要研究内容之一。

一, 它直接影响生产的产量和质量。建立快速、准确的种子质量检测方法已成为各级政府、种子生产、经营部门和广大农民十分关注的问题, 也是规范市场经济秩序迫切需要解决的技术之一。传统的种子质量检验方法主要通过田间性状鉴定, 田间性状鉴定所需周期长, 耗费大量人力、物力和财力, 并且许多性状的表现常受栽培措施及环境因子的影响, 影响检测的精确度。随着分子生物学技术的飞速发展, 新的有效的分子标记方法不断涌现, 这无疑给加工番茄品种基因型鉴定开辟了一

品种的遗传真实性是种子质量的重要标志之

收稿日期: 2004-10-18 修回日期: 2004-12-02

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2002AA244021)资助项目。

作者简介: 于拴仓(1971-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事蔬菜遗传育种及分子标记辅助育种研究。

Tel: 010-51503009, E-mail: yusc@sohu.com, yushuancang@nrcv.com

条新的发展途径,但这方面的研究至今尚未见报道。RAPD具有操作简单、快速、用材量少、引物通用性强,适用于不同生物基因组的分析等优点。因而,该技术已被应用于鲜食番茄品种的纯度及遗传多样性研究^[1~4]。另外,其他的分子标记如SSR探针技术也有应用的报道^[5]。

本研究拟采用 RAPD RGA(Resistance gene analogs)和 SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)分子标记分析技术,从DNA水平上研究10个加工番茄品种的遗传多样性,获得加工番茄品种的DNA指纹数据,为加工番茄育种提供理论依据,并为加工番茄品种鉴别提供准确、可靠的方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选用10个加工番茄品种,分别为红杂14、87-5、北蔬67号、北蔬3号、新番8号、新番11号、红杂12、红杂16、春圆95-2和加工518,均由北京蔬菜研究中心番茄育种课题组提供。

1.2 DNA提取

每品种种植5株,待2片真叶时取心叶,混匀后,取30mg提取DNA。DNA提取参照Dorokhov等^[6]的方法,样品的浓度用Pharmacia Biotech(Biochrom)公司的Spectrophotometer Ultrospec 2000进行测定,用ddH₂O稀释后贮存于-80℃的冰箱中备用。

1.3 RAPD分析

试验从100多条随机引物中筛选出具有多态性的引物12条(表1)进行RAPD分析。RAPD反应体系为20μL,包括0.25mmol/L dNTP, 1

× PCR buffer, 1.0mmol/L MgCl₂, 1.2U Taq酶(MBI Fermentas), 8pmol随机引物, 30ngDNA和ddH₂O。用MJ Research PTC-200扩增仪扩增,热循环程序为:94℃变性3min; 36℃复性1min, 72℃延伸1min, 94℃变性20s, 40个循环; 36℃复性1min, 72℃延伸10min。采用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,EB染色,用Alpha Innotech公司的ChemilmagerTM 5500照相系统进行凝胶照相。

1.4 RGA分析

按Zhang等^[7]发表的引物序列进行合成,试验从8对RGA引物中选用了2对多态性丰富、扩增结果稳定的引物进行分析,引物分别为PK1(上游引物)+PK2(下游引物)和PK3(上游引物)+PK4(下游引物),序列见表1,由北京三博远志科技有限公司合成。反应体系为15μL,包括× PCR buffer, 0.20mmol/L dNTP, 3.5mmol/L MgCl₂, 1.2U Taq酶(MBI Fermentas), 12pmol上游引物和下游引物, 30ngDNA和ddH₂O。用MJ Research PTC-200扩增仪扩增,热循环程序为:94℃变性2min; 94℃变性1min, 48℃复性1min, 72℃延伸1.5min, 35个循环; 72℃延伸7min。扩增产物加等量loading buffer后94℃变性处理5min,用4%的变性聚丙烯酰胺凝胶80W恒功率电泳2.0h,最后进行银染显色。

1.5 SRAP标记分析

采用Li和Quiros^[8]发表的引物,试验从4对SRAP引物中选用了多态性丰富、扩增结果稳定的1对引物进行分析,引物为em1(上游引物)+me1(下游引物),序列见表1。引物由北京三博远志科技有限公司合成。

表1 RAPD RGA和SRAP引物名称与核苷酸序列

Table 1 Primers of RAPD RGA and SRAP employed and their sequence

| 编号 Code | 引物名称 Name of primers | 序列 Sequence of primer | 编号 Code | 引物名称 Name of primers | 序列 Sequence of primer |
|------------|-------------------------|--------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|
| 1 | S40 | GTTGCGATCC | 10 | S391 | ACGATGAGCC |
| 2 | S60 | ACCCGGTCAC | 11 | S433 | AGCGTCACTC |
| 3 | S91 | TGCCCC TCGT | 12 | BI26 | GCAGCTGACC |
| 4 | S92 | CAGCTCACGA | 13 | pk1 | GCATTGGAACAAGGTGAA |
| 5 | S169 | TGGAGAGCAG | 14 | pk2 | AGGGGGACCACCACGTAG |
| 6 | S187 | TCCGATGCTG | 15 | pk3 | TAGTTCGGACGTTTACAT |
| 7 | S206 | CAAGGGCAGC | 16 | pk4 | AGTGTCTTGTAGGTTATC |
| 8 | S304 | CCGCTACCGA | 17 | em1 | GCATTGGAACAAGGTGAA |
| 9 | S374 | CCCCTACAC | 18 | me1 | AGGGGGACCACCACGTAG |

Note: 1~12 are RAPD primers; 13~16 are RGA primers; 17 and 18 are SRAP primers.

反应体系为 $15\mu\text{L}$, 包括 0.20 mmol/L dNTP, \times PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.2 U Taq酶 (MBI Fermentas), 12 pmol 上游引物和下游引物, 30 ng DNA 和 ddH₂O。用 MJ Research PTC-200 扩增仪扩增, 热循环程序为: 94°C 变性 2 min ; 94°C 变性 1 min , 35°C 复性 1 min , 72°C 延伸 1.5 min , 5个循环; 94°C 变性 1 min , 50°C 复性 1 min , 72°C 延伸 1.5 min , 35个循环; 72°C 延伸 7 min 。扩增产物加等量 loading buffer 后 94°C 变性处理 5 min 。电泳及银染如文中 1.4。

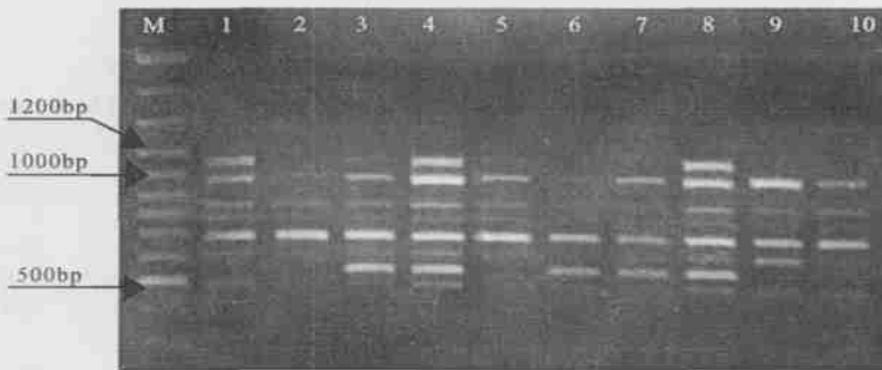
1.6 数据统计

电泳图谱中的每一个多态性谱带看作一个遗传位点, 根据各分子标记的迁移率及其有无统计, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 统计结果利用软件 STATISTICA for Windows Release 4.5 进行分析, 利用 Euclidean distances 和 Unweighted pair-group average 方法获得遗传距离并进行聚类

2 结果与分析

2.1 3种标记多态性分析及其聚类分析

在本研究室前期研究基础上, 选用了在番茄中多态性较好的 100 多个随机引物进行筛选, 其中只有 30 个引物在 10 个加工番茄品种中产生了多态性位点, 最终筛选出扩增稳定、带型清晰的 12 个 RAPD 随机引物, 这 12 个 RAPD 随机引物共产生了 23 个多态性位点, 由表 1 可见, 每个 RAPD 引物产生的多态性位点数在 1~4 之间; 同样, 从 8 对 RGA 引物中选用了 2 对引物进行分析, 共产生了 11 个多态性位点; 从 4 对 SRAP 引物中选用了 1 对引物进行分析, 产生了 7 个多态性位点。可见, 加工番茄品种之间分子水平上的多态性不是十分丰富, 在 3 种分子标记中, 以 RGA 和 SRAP 标记的检测效率较高。图 1 和图 2 分别为 RAPD 和 SRAP 的电泳图谱



M: 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas); 1~10 分别为红杂 14 87-5 北蔬 67号、北蔬 3号、新番 8号、新番 11号、红杂 12 红杂 16 春圆 95-2 和加工 518

Lane M: 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas); Lane 1~10: 10 processing tomato varieties

图 1 RAPD 引物 S391 的检测结果

Fig. 1 RAPD profile generated by primer S391

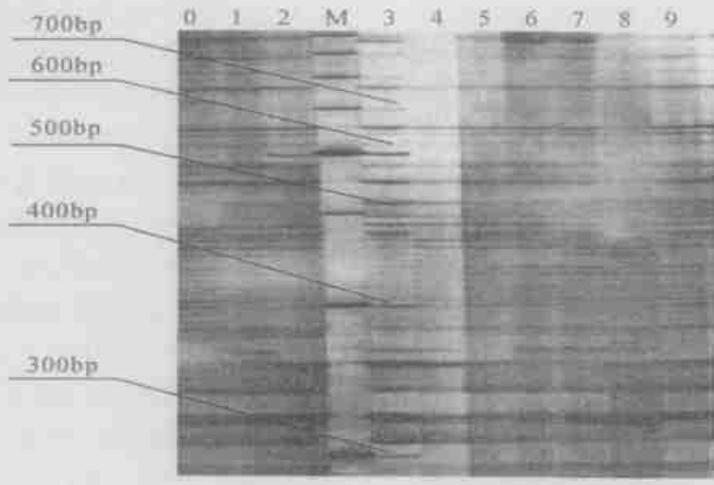
将每个多态性谱带看作一个遗传位点, 利用本研究中 15 个引物 (组) 所产生的 41 个多态性数据进行遗传距离的计算和聚类分析, 结果见图 3 品种间遗传距离介于 2.0~5.2 之间, 最大距离存在于红杂 16 和红杂 14 87-5 及新番 8 号之间; 最小距离存在于 87-5 和新番 8 号之间。可见, 用这些引物进行 PCR 扩增就可以将 10 个加工番茄品种完全区分开来。

2.2 单个引物 (组) 可以鉴别的品种数

在分子鉴别中, 最理想的情况是利用最少的引物 (组) 组合进行尽量多的品种鉴别。本研究中利用单个引物的多态性数据计算遗传距离, 确定

单个引物所能区分的品种数。表 2 中列出了各个引物 (组) 扩增所能区分的品种数, 在 RAPD 引物中多态性位点最多的 BI26 能区分 2 个品种, 即春圆 95-2 和红杂 14; 引物 S91 和 S391 也能鉴别 2 个品种, S60 S92 和 S374 只能鉴别出 1 个品种, 其他 6 个 RAPD 随机引物单独使用时不能鉴别出 10 个加工番茄中的任何 1 个品种; 本研究所用的 2 对 RGA 引物鉴别能力较强, 其中 PK1+PK2 就能鉴别出红杂 16 北蔬 67 号等 5 个品种; 1 对 SRAP 引物产生的 7 个多态性位点可将新番 11 号、加工 518 等 4 个品种鉴别出来。由此可见, RGA 和 SRAP 标记具有较高的鉴别效率, 但用

单一引物(组)不能将 10个品种区分开来



1- 10分别为红杂 14 87-5 北蔬 67号、北蔬 3号、新番 8号、新番 11号、红杂 12 红杂 16 春圆 95-2和加工 518; M: 100bp DNA Ladder (Invitrogen) Lane 1- 10 10 processing tomato varieties; Lane M: 100bp DNA Ladder (Invitrogen)

图 2 SRAP引物 PK1+ PK2的检测结果

Fig. 2 SRAP profile generated by primer pair PK1+ PK2

表 2 各引物(组)的多态性位点数及其所能区分的品种数

Table 2 Number of polymorphic loci of primer (pairs) and varieties can be distinguished

| 引物名称 Name of primers or primer pairs | 多态性位点数 Number of polymorphic loci | 可以区分的品种数 Number of varieties discriminated | 可以区分的品种名称 Name of varieties distinguished |
|--|---|--|---|
| S187 | 1 | 0 | |
| S60 | 2 | 1 | 北蔬 3号 |
| B126 | 4 | 2 | 春圆 95- 2,红杂 14 |
| S92 | 3 | 1 | 北蔬 3号 |
| S40 | 2 | 0 | |
| S91 | 2 | 2 | 红杂 14, 87- 5 |
| S391 | 2 | 2 | 红杂 16, 87- 5 |
| S374 | 3 | 1 | 春圆 95- 2 |
| S304 | 1 | 0 | |
| S169 | 1 | 0 | |
| S206 | 1 | 0 | |
| S433 | 1 | 0 | |
| PK3+ PK4 | 3 | 2 | 加工 518,红杂 14 |
| PK1+ PK2 | 8 | 5 | 红杂 16,北蔬 67号,北蔬 3号,加工 518,红杂 14 |
| em1+ me1 | 7 | 4 | 新番 11号,加工 518,北蔬 3号,红杂 14 |

2.3 部分双引物组合可以鉴别的品种数

为了鉴别 10个加工番茄品种,本研究将鉴别效率较高的 9个引物(组)进行两两组合,利用特定双引物组合的多态性信息计算遗传距离,探讨其鉴别品种的能力,结果见表 3 引物组合后明显地提高了品种鉴别的能力,所能鉴别的品种数均超过 2个,如引物 S391单独使用时只能鉴别 2个品种,而与其他引物组合使用时鉴别的品种数均大于 3个,特别是与 em1+ me1引物组一起应用

时可鉴别全部的 10个加工番茄品种。另外,PK1 + PK2与 em1+ me1引物组一起应用时也可鉴别全部的 10个加工番茄品种。因此,在本研究所用的引物范围内,双引物组合 S391与 em1+ me1或 PK1+ PK2与 em1+ me1可用于 10个加工番茄品种的鉴别,表 4列出了 10个加工番茄品种由引物 S391 em1+ me1和 pk1+ pk2产生的数字化核酸指纹。

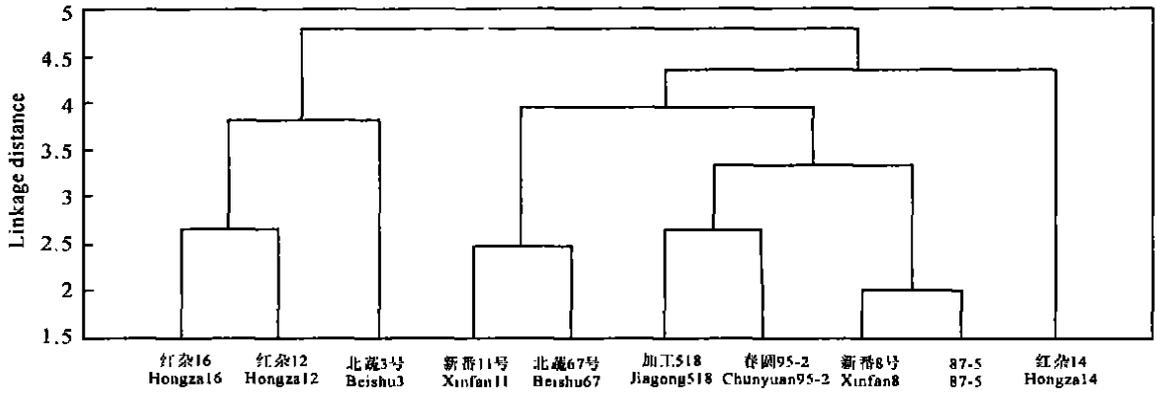


图 3 10个加工番茄品种的聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of 10 processing tomato genotypes according to molecular marker data

表 3 部分双引物组合可以鉴别的品种数

Table 3 Number of varieties distinguished by part of two-primer-combinations

| 引物名称 Name of primers or primer pairs | S60 | BI26 | S92 | S91 | S391 | S374 | PK3+ | PK4 | PK+ | PK2 | em+ | me1 |
|--|-----|------|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| S60 | 1 | | | | | | | | | | | |
| BI26 | 4 | 2 | | | | | | | | | | |
| S92 | 2 | 3 | 1 | | | | | | | | | |
| S91 | 4 | 3 | 3 | 2 | | | | | | | | |
| S391 | 3 | 4 | 5 | 3 | 2 | | | | | | | |
| S374 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 1 | | | | | | |
| PK3+ PK4 | 5 | 4 | 6 | 6 | 6 | 5 | | 2 | | | | |
| PK+ PK2 | 6 | 8 | 7 | 5 | 5 | 8 | | 8 | | 5 | | |
| em+ me1 | 5 | 5 | 5 | 8 | 10 | 6 | | 5 | | 10 | | 4 |

表 4 10个加工番茄品种由 S391 em+ me1和 pk+ pk2产生的数字化核酸指纹

Table 4 Fingerprint of 10 processing tomato by S391 em+ me1 and pk+ pk2

| 引物 Name of primers or primer pairs | 多态性片 段长度 (bp) Length of polymorphic bands | 红杂 14 Hongza 14 | 87-5 | 北蔬 67号 Beishu 67 | 北蔬 3号 Beishu 3 | 新番 8号 Xinfan 8 | 新番 11号 Xinfan 11 | 红杂 12 Hongza 12 | 红杂 16 Hongza 16 | 春圆 95-2 Chunyuanyuan 95-2 | 加工 518 Jiagong 518 |
|--|---|--------------------------|------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------------|
| S391 | 550 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 1150 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| PK+ PK2 | 935 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 570 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 530 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | 470 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| | 370 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 325 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| | 322 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 235 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| em+ me1 | 50 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 410 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 280 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 270 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 260 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 242 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 229 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

3 讨论

本研究利用 3种分子标记分析技术对 10个加工番茄进行了品种鉴别的研究,发现这些加工

番茄品种之间分子水平上的多态性不是十分丰富,遗传基础较为狭窄,这也为品种真实性鉴定带来一定困难。本研究在大量试验基础上,获得了 41个多态性位点,分析了单个引物及部分双引物

组合的鉴别能力,最终用两个双引物组合将 10 个加工番茄品种区分开来,并获得了 10 个加工番茄品种独特的 DNA 指纹,这将为品种审定、特异性检验、新品种专利保护和利用提供重要依据。这些研究方法和结果对植物种质资源遗传多样性的分析、植物新品种保护、以及种苗质量仲裁检验等具有重要理论意义和实践价值。

通过本研究发现,RGA和 SRAP标记具有较高的检测效率。RGA标记是以抗病基因类似序列(Resistance gene analogs, RGAs)扩增为基础的分子标记技术,扩增的是具功能的抗病基因片段,扩增产率高,具有稳定、简便的特点,已被越来越多地应用于植物的分子育种当中^[9];SRAP通过独特的引物设计对内含子区域、启动子区域进行特异扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性,该标记具有简便、稳定、产率高、在基因组中分布均匀等优点^[10]。这两种分子标记均是在较为严格的条件下PCR扩增获得多态性位点,且为功能性分子标记,二者在分子鉴别及分子标记研究中具有广阔的应用前景。本研究将二者与RAPD随机扩增多态性结合进行分子鉴别的研究,所获得的多态性位点将具有较强的代表性,具有更强的鉴别能力,在一定程度上保证了品种鉴别的可靠性。

参考文献:

- [1] Kaemmer D, Weising K, Beyermann B, *et al.* Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA [J]. *Plant Breed*, 1995, 114: 12~ 17.
- [2] 高蓝,傅建熙,王建华,等. RAPD法检测番茄种子纯度的研究 [J]. *西北植物学报*, 2001, 21(3): 562~ 565.
- [3] Rom M, Bar M, Rom A. Purity control of F1-hybrid tomato cultivars by RAPD markers [J]. *Plant Breeding*, 1995, 114: 188~ 190.
- [4] 栾雨时,苏乔,李海涛,等. 利用 RAPD技术快速鉴定番茄杂种纯度 [J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 247~ 251.
- [5] 栾雨时,安利佳,黄百渠,等. 用 SSR探针进行番茄品种的DNA指纹分析 [J]. *园艺学报*, 1999, 26(1): 51~ 53.
- [6] Dorokhov D B, Klocke E. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes [J]. *Russ J. Genet*, 1997, 33: 443~ 450.
- [7] Zhang L P, Khan A, *et al.* A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* × *lycopersicon hirsutum* cross [J]. *Genome*, 2002, 45: 133~ 145.
- [8] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction. Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 223: 455~ 461.
- [9] 王海燕,刘大群,杨文香. 植物抗病基因类似序列研究进展及展望 [J]. *河北农业大学学报*, 2002, 25(Sup): 164~ 168.
- [10] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction. Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455~ 461.