

# 加工番茄种质资源的 SSR 分析

王柏柯<sup>1,2</sup>, 杨生保<sup>2</sup>, 余庆辉<sup>2</sup>, 徐明<sup>1</sup>, 王文魁<sup>1</sup>, 罗淑萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830091; <sup>2</sup>新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

**摘要:**为探明加工番茄种质资源间的亲缘关系, 利用 SSR 标记对 20 份加工番茄品种及育种材料进行了多样性分析。结果表明: 从 49 对 SSR 引物中筛选出 12 对扩增稳定、条带清晰且多态性丰富的引物进行分析, 共获得 43 个位点, 多态性位点为 37 个, 多态位点比率 86%; 供试材料间的遗传相似系数介于 0.419 ~ 1.000 之间, 说明加工番茄种质资源间存在一定的遗传差异; 通过 UPGMA 法聚类分析, 将 20 份材料分为 3 大族群, 其中亲缘关系较远的不同族群间及亚类间的种质资源可作为杂交育种的亲本。

**关键词:**加工番茄; 种质资源; SSR; 遗传多样性

## Genetic Analysis of Processing Tomato Germplasms by SSR Markers

WANG Bai-ke<sup>1,2</sup>, YANG Sheng-bao<sup>2</sup>, YU Qing-hui<sup>2</sup>, XU Ming<sup>1</sup>, WANG Wen-kui<sup>1</sup>, LUO Shu-ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830091;

<sup>2</sup>Institute of Horticulture, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091)

**Abstract:** Simple sequence repeats (SSR) marker was used to analyze genetic diversity of 20 samples of processing tomato and verify the genetic relationship. 43 bands were selected using the 12 primers, which were highly reproducible, clear, and polymorphic and screened out of 49 primers. Among the obtained bands, 37 were polymorphic bands, accounting for 86% of the total bands. The genetic similarity coefficient among the accessions ranged from 0.419 to 1.000, which indicated that genetic basis was relatively abundant among these processing tomato resources. And by UPGMA cluster method, the 20 samples of processing tomato were classified into 3 major groups, of which the materials with distant genetic relationship between major groups or sub-major groups might be used as elite germplasms for further genetic improvement.

**Key words:** processing tomato; germplasm; SSR; genetic diversity

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 原产于南美洲西部太平洋沿岸安第斯山脉的秘鲁、厄瓜多尔、玻利维亚、智利等国的高原或谷地<sup>[1]</sup>, 1957 年沈德绪按栽培学分类将番茄分为蔓生和直立 2 类, 从用途上可分为鲜食番茄和加工番茄 2 大类<sup>[2-3]</sup>。随着分子标记技术的发展, 特别是 SSR 标记, 由于其检测速度快, 所需 DNA 量少, 信息量大, 标记呈共显性等优点而得到了广泛的应用, 前人已利用 SSR 标记进行了大量有关番茄资源遗传多样性的研究。2002 年, S. Suliman-Pollatschek 等<sup>[4]</sup> 尝试开发可用于栽培番茄

的 SSR 标记, 共找到 114 个随机分布在染色体不同位置上的新 SSR, 其中 52% 在 13 个栽培番茄中显示多态性, 82% 在栽培种和野生种之间具有多态性, 16% 在 11 个商业化的品种中具多态性。A. Frary 等<sup>[5]</sup> 分析了 109 个 SSR 标记在 7 个栽培番茄中揭示多态性的能力, 结果显示 44% 的 SSR 标记能够检测到差异, 表明这些 SSR 标记在检测栽培番茄的多态性时是非常有用的。以上都是针对鲜食番茄或野生番茄的研究, 而就我国新疆地区大面积栽培的加工番茄, 其遗传多样性的研究鲜有报道。

收稿日期: 2013-04-01 修回日期: 2013-06-01 网络出版日期: 2013-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1312.031.html>

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2012211B40); 国家星火计划项目 (2011GA89001); 新疆维吾尔自治区“十二五”重大专项 (201230116)

第一作者研究方向为番茄遗传育种, E-mail: wangbaike1981@sina.com

通信作者: 罗淑萍, 研究方向为分子生物学, E-mail: luoshuping2008@163.com

新疆地处 37°05' ~ 47°55'N,光照强,昼夜温差大,气候干燥,多沙质土壤,非常适合加工番茄的生产栽培。近年来,加工番茄在新疆北疆天山一带和南疆焉耆盆地得到广泛种植,所产的加工番茄由于质量好、病虫害少,固形物和红色素含量高等特点<sup>[6]</sup>,享有世界优质番茄酱的美誉。本研究利用 SSR 分子标记,选取具有代表性的加工番茄种质资源为研究对象,筛选多态性引物,对新疆地区现有的典型种质资源进行遗传分析,一方面从分子水平阐明新疆加工番茄品种资源的遗传特性和亲缘关系;另一方面通过聚类分析构建新疆加工番茄资源的核

心种质。旨在为丰富加工番茄育种理论和生产指导提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

本研究筛选了具有代表性的 20 份加工番茄种质材料(表 1),均来自新疆农业科学院园艺作物研究所,于 2010 年 4 月种植于新疆农业科学院安宁渠试验场育苗温室,所有材料均在育苗穴盘中育苗,待幼苗长到 3 ~ 4 片真叶时采嫩叶提取 DNA。

表 1 供试材料

Table 1 List of materials

编号 Code	品种名称 Name of varieties	品种类型 Type	编号 Code	品种名称 Name of varieties	品种类型 Type
FQ-1	新番 40 号父本	自交系	FQ-11	雄性不育系	不育系
FQ-2	新番 40 号母本	自交系	FQ-12	新红 18 号母本	自交系
FQ-3	新番 39 号父本	自交系	FQ-13	新番 4 号母本	自交系
FQ-4	新番 39 号母本	自交系	FQ-14	AP-1	杂交种
FQ-5	新番 41 号父本	自交系	FQ-15	AP-2	杂交种
FQ-6	新番 41 号母本	自交系	FQ-16	AP-3	杂交种
FQ-7	屯河 8 号父本	自交系	FQ-17	AP-4	杂交种
FQ-8	屯河 8 号母本	自交系	FQ-18	AP-5	杂交种
FQ-9	新番 36 号父本	自交系	FQ-19	AP-6	杂交种
FQ-10	新番 36 号母本	自交系	FQ-20	AP-7	杂交种

### 1.2 DNA 提取

从每份参试材料中选择 1 株品种特性明显且生长良好的植株,取其幼嫩叶片,采用改良 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取番茄基因组 DNA,提取液中加入水溶性 PVP,防止酚类物质的氧化。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, -20 °C 保存。

### 1.3 SSR 引物

根据 J. J. Ruiz 等<sup>[8]</sup>、汪国平<sup>[9]</sup>以及康奈尔大学的网站(<http://www.sgn.cornell.edu>)公布的 49 对番茄 SSR 引物序列,由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.4 PCR 扩增体系及电泳

PCR 在 tc-512 型 PCR 扩增仪上完成,25 μL 反应体系中含 10 × PCR Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L each) 1.6 μL, 正、反向引物 (10 pmol/L) 各 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶

0.25 μL, 50 ng/μL 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.65 μL。PCR 程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 40 s, 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 最后冷却至 4 °C。扩增产物经 4% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 min 后,以硝酸银染色显影。

### 1.5 谱带记录及数据分析

凝胶干燥后,形成 DNA 多态性图谱,选择清晰的谱带进行统计,扩增产物在相同迁移位置有带赋值为 1,无带赋值为 0,建立原始数据矩阵。对扩增产物的条带总数和多态性条带进行数量统计,计算不同引物的多态性条带百分率 (PPB, percentage of polymorphic bands)。利用 NTSYS 2.2 软件中的 SIMQUAL 程序计算 Dice 相似系数矩阵,用 SHAN 程序中的 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) 方法进行聚类

分析,并通过 Treeplot 模块生成聚类图,分析样品间亲缘关系。聚类结果等级界线的划分参照陈守良等<sup>[10]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选及多态性分析

从 49 对 SSR 引物中筛选出 12 对谱带清晰且呈

现多态性的引物对 20 份加工番茄资源进行 PCR 扩增(表 2),SSR 标记数较多,多态性丰富(图 1);12 对引物共扩增出 43 条 100~900 bp 的谱带,平均每对引物扩增出 3.6 条谱带,其中多态性谱带 37 条,多态率达 86.0%,各引物多态性比率在 66.7%~100% 之间;不同引物扩增的多态性存在较大差异,多态性谱带在 2~4 条之间。

表 2 12 对 SSR 引物的扩增结果及多态性

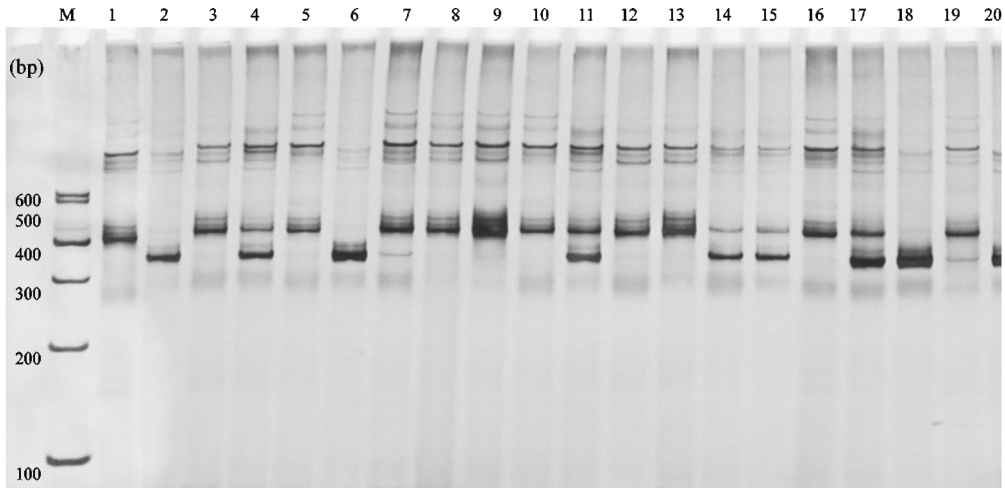
Table 2 Allelic variation of 12 SSR markers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度(°C) Annealing temperature	总位点数 No. of loci	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性比率(%) Polymorphic proportion
SSRD100	ATATCAATGGGAAAACATAGCCT AGCGGTTTTGATTGAAAAGGA	55	3	2	66.7
SSR306	ACATGAGCCCAATGAACCTC AACCATTCCGCACGTACATA	54	4	4	100
SSR214	AAATFCCAACACTTGCCAC CCCACCACTATCCAAAACC	55	4	4	100
LEaat003	CTTGAGGTGGAAATATGAACAC AAGCAGGTGATGTTGATGAG	58	4	4	100
SSR111	TTCTTCCTTCCATCAGTTCT TTGCTGCTATACTGCTGACA	55	5	4	80.0
SSR22	GATCGGCAGTAGGTGCTCTC CAAGAAACACCCATATCCGC	56	3	2	66.7
SSR276	CTCCGGCAAGAGTGAACATT CGACGGAGTACTTCGCATTT	55	4	4	100
SSR594	TTCGTTGAAGAAGATGATGGTC CAAAGAGAACAAGCATCCAAGA	56	4	4	100
SSR38	GTTTCTATAGCTGAAACTCAACCTG GGGTTTCATCAAATCTACCATCA	55	3	2	66.7
SSR63	CCACAAACAATTCCATCTCA GCTTCCGCCATACTGATACG	54	3	3	100
SSR115	CACCCTTTATTTCAGATTCCTCT ATTGAGGGTATGCAACAGCC	55	3	2	66.7
SSR41	CCACAATTAACAACCTTGGTACGTAT AGCTAATGCCTTTGATATAGTCTGC	56	3	2	66.7
总计 Total			43	37	86.0
平均 Average			3.6	3.1	

### 2.2 遗传相似系数分析

利用 NTSYS 2.2 分析软件,计算 20 份供试材料间的遗传相似系数。供试品种间的遗传相似系数介于 0.419~1.000 之间,其遗传相似系数越大,说明二者的遗传距离越小;新番 39 号母本与 AP-6 品种间的遗传相似系数最小,为 0.419,新番 36 号母本与 AP-5 品种间的遗传相似系数次之,为 0.452;新

番 41 号父本与屯河 8 号母本品种间的遗传相似系数最大,为 1.000(这 2 个品种还需更多的引物标记进行区分),AP-6 与 AP-7 品种间的遗传相似系数次之,为 0.968。新番 40 号两亲本间的相似系数为 0.484,新番 36 号两亲本间的相似系数为 0.484,屯河 8 号两亲本间的相似系数为 0.677,新番 39 号两亲本间的相似系数为 0.548,新番 41 号两亲本间的



M:Marker;1~20 为供试材料编号

M:Marker,1-20 represent the line number provided in this experiment

图1 引物 SSRD100 扩增加工番茄种质的 SSR 产物图谱

Fig. 1 SSR pattern amplified by primer SSRD100 from germplasm of processing tomatos

相似系数为 0.871,可见除新番 41 号外,其他各品种两亲本间的遗传相似系数都较小,说明其品种杂交组配比较合理,益于杂种优势。

### 2.3 SSR 聚类分析

根据相似系数,采用 UPGMA 法进行聚类分析,建立聚类分析树状图(图 2),以遗传相似系数 0.6 为阈值,可将 20 个供试材料分为 3 大类群。第 I 类群仅包含 1 个品种新番 40 号父本,说明品种的独特性。第 II 类群包括 17 个加工番茄品种,表明 17 个加工番茄品种的亲缘关系较近;以相似系数 0.7 为阈值,可将第 II 类群分为 2 个亚类,第 1 亚类包括 10 个品种,

分别是新番 40 号母本、新番 39 号父本、新番 41 号母本、新番 4 号母本、新番 41 号父本、屯河 8 号母本、AP-2、雄性不育系、AP-3 和 AP-4。第 2 亚类包括 7 个品种,分别是新红 18 号母本、屯河 8 号父本、新番 36 号父本、AP-1、AP-5、AP-6 和 AP-7,但第 2 亚类与第 1 亚类间的亲缘关系较远。其中新番 40 号母本与新番 39 号父本、新番 41 号父本与屯河 8 号母本、屯河 8 号父本与新番 36 号父本、AP-6 与 AP-7,这些品种两两之间的亲缘关系十分接近;第 III 类群包括 2 个番茄品种,新番 39 号母本和新番 36 号母本,说明二者之间的遗传背景比较相似。

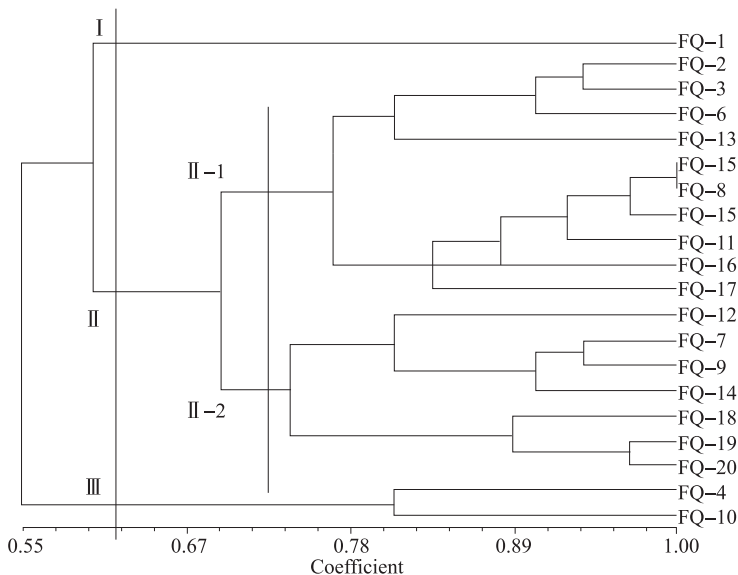


图 2 20 份加工番茄样品的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 The UPGMA dendrogram of 20 samples of processing tomato

## 3 讨论

### 3.1 SSR 分子标记在不同番茄资源中的多态性

与其他遗传标记相比,SSR 分子标记可以直接检测到 DNA 分子结构的变异,反映研究材料本质上的差别,检测速度快,所需 DNA 量少,信息量大,标记呈共显性。因此,其在生物起源、进化和遗传变异性研究中得到了广泛的应用<sup>[11-12]</sup>。

本研究筛选了 12 对多态性好的 SSR 引物,对 20 份加工番茄栽培材料进行了遗传多样性分析,平均扩增出 3.1 个多态性位点,在 43 个可扩增出的片段中有 86.0% 表现为多态性,而 E. Z. Kochieva 等<sup>[13]</sup>对 58 个野生和栽培番茄品种进行 SSR 多态性分析,在 318 个可扩增的片段中有 95.6% 表现出多态性。可见,SSR 分子标记在番茄种质资源材料识别和区分上具有多态性高的特点,但由于栽培种的人为选择,其遗传变异水平低于野生种。

### 3.2 不同类型番茄种质的遗传关系

番茄在园艺学中有 5 种分类方法,分别为按叶型、按株型、按果型与果色、按用途和按生态型分类,在按用途分类中分为鲜食番茄和加工番茄 2 大类<sup>[14]</sup>。王日升等<sup>[15]</sup>先后用 SSR 分子标记将 24 份番茄品种分为抗病毒材料和易感病毒材料 2 大类,并依据果肉颜色和果实大小将 11 个番茄栽培品种进行了分组。金凤媚等<sup>[16]</sup>通过 SSR 分子标记聚类分析,最后形成的 4 大类群和品质特性聚类分析结果一致。宋建等<sup>[17]</sup>选来自国内外的 36 份番茄材料,将其聚为 7 大类。本研究注重于加工番茄遗传育种的现状,将 20 份典型的加工番茄育种资源材料聚为 3 大类群,第 I 类群只有 1 个品种单独被分开,说明其品种的独特性;第 II 类群为 17 个品种,说明这些品种间的亲缘关系较近,但第 II 类群的 2 个亚类之间存在一定的遗传差异;第 III 类群包括 2 个品种,说明二者之间遗传背景比较相似。本研究结果证实了加工番茄种质材料间存在一定程度的遗

传分化,为今后的品种选育工作提供了一定的科学依据。

### 参考文献

- [1] 徐鹤林,李景福. 中国番茄[M]. 北京:中国农业出版社,2007:10-11
- [2] 沈德绪. 番茄研究[M]. 北京:科学出版社,1957:74-80
- [3] 熊美兰. 国内外番茄育种动态及发展趋势[J]. 长江蔬菜,1991(5):5-6
- [4] Suliman-Pollatschek S, Kashkush K, Shats H. Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum* [J]. Cell Mol Biol Lett, 2002,7(2A):583-597
- [5] Fray A, Xu Y, Liu J. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and Breeding experiment[J]. Theor Appl Genet, 2005, 111:291-312
- [6] 张勇,毛浩亮,王柏柯,等. 几个加工番茄新品种在不同地区的适应性研究[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(5):998-1002
- [7] Smith J S C, Chin E C L, Shu H. An evaluation of the utility of SSR loca as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(1-2):163-173
- [8] Ruiz J J, García-Martínez S, Picó B, et al. Genetic variability and relationship of closely related spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers[J]. J Am Soc Hortie Sci, 2005, 130(1): 88-94
- [9] 汪国平. 番茄微卫星标记的发展及区段定位[D]. 广州:华南农业大学, 2008
- [10] 陈守良,徐克学,盛国英. 中国散生竹类的数量分类和确定分类等级的探讨[J]. 植物分类学报, 1983, 21(2):113-120
- [11] 王效宁,韩东飞,云勇,等. 利用 SSR 标记分析海南普通野生稻的遗传多样性[J]. 植物资源遗传学报, 2007, 8(2):184-188
- [10] 张赤红,张京,赵会英,等. 应用 SSR 标记对 61 个国家大麦遗传多样性的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1):15-19
- [13] Kochieva E Z, Ryzhova N N, Khrapalova I A. Genetic diversity and phylogenetic relationships of the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis[J]. Genetika, 2002, 38(8):1133-1142
- [14] 余延年,吴定华,陈竹君. 番茄遗传学[M]. 长沙:湖南科技出版社,1999:28-32
- [15] 王日升,李杨瑞,杨丽涛. 番茄栽培品种 SSR 标记和形态标记的遗传多样性分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(2):120-125
- [16] 金凤媚,薛俊,郑艳红. 番茄遗传资源的聚类分析研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(6):49-54
- [17] 宋建,陈杰,陈火英. 利用 SSR 分子标记分析番茄的遗传多样性[J]. 上海交通大学学报:农业科学版, 2006, 24(6):524-528