

DNA 分子标记技术在番茄育种上的应用

王胜阳^{1,2}, 张喜春¹

(1. 北京农学院植物科技系 102206; 2. 新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 主要介绍了分子标记技术应用于遗传育种中的几种方法, 并综述了 DNA 分子标记技术在番茄的遗传育种研究、番茄遗传图谱、亲缘关系和遗传多样性研究、品系指纹图谱构建及品种纯度鉴定、基因定位和标记辅助选择中的一些应用。并对分子标记在番茄育种上的进一步应用做出了展望。

关键词: 番茄; DNA 分子标记; 遗传育种

中图分类号: S 603.2; S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)06-0050-04

蔬菜育种是蔬菜改良最重要的一种途径^[1]。它包含两方面的工作, 一是确认所需有用的遗传变异是否存在于育种材料之中, 二是采取有效的办法把目标基因转移到品种中去, 观察性状表现, 稳定后应用于栽培, 从而实现品种的大面积生产^[2]。生物技术的创新发展和广泛应用给传统的遗传育种研究带来了巨大的改变, 目前分子标记技术的应用尤为显著^[3]。

20 世纪 80 年代, 标记技术逐渐发展到植物遗传育种领域, 使得广大学者大大加深了对某些性状遗传规律的认知^[4]。自从 1974 年 Rick^[5] 等人对番茄进行分子标记的遗传研究以来, DNA 分子标记技术的应用获得了相当大的发展, 运用 DNA 分子标记技术已经建立了接近饱和的番茄高密度分子遗传图谱^[6], 在番茄上有超过 285 个已知的形态学的、生理学的和抗病性的标记, 36 种同工酶和超过 1 000 个限制性内切酶片段长度多态性标记(RFLP)。此外, 当前有超过 162 000 个表达序列标签(EST), 大约 3.2% 已经被绘制成图谱。标记和图谱被应用在抗病性和许多其他的园艺特性的基因或数量性状遗传位点(QTL)定位和标记上。这些信息可以被用在不同的方面, 如分子标记辅助选择育种(MAS)和目标基因或数量性状遗传位点(QTL)的基因克隆研究中^[7]。

1 DNA 分子标记的介绍

在番茄遗传育种研究工作中使用的 DNA 分子标记主要涉及基于 Southern 杂交的限制性片段长度多态性

标记(RFLP)、基于 PCR 技术的 DNA 扩增方法的随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD), 和简单重复序列标记(SSR)、以及基于 PCR 与酶切相结合的扩增片段长度多态性标记(AFLP)和切割扩增的多态性序列标记(CAPS)等, 它们在番茄遗传图谱、亲缘关系和遗传多样性研究、品系指纹图谱构建及品种纯度鉴定、基因定位、和标记辅助选择等方面都有广泛的应用。

RFLP 是英文 restriction fragment length polymorphism 的缩写。该技术由 Grodzicker 等人于 1974 年创立, 其基本原理是: 植物基因组 DNA 经限制性内切酶酶切后, 通过电泳将大小不同的酶切片段按照各自的长度分离, 通过 Southern 吸印与标记的探针杂交, 放射自显影检测酶切片段的多态性, 此方法稳定可靠^[8]。

RAPD 是英文 randomly amplified polymorphic DNA 的缩写。1990 年 Williams 等人发表了一篇关于检测核苷酸序列多态性的 RAPD 标记法, 它是以基因组总 DNA 为模板, 利用随机引物对模板进行 PCR 扩增得到多态性 DNA 片段, 然后通过电泳检测片段的多态性, 以此来诊断生物体内在基因排布与外在性状表现规律的技术。它基于 PCR, 无需预先知道 DNA 序列信息^[2]。

SSR 是英文 simple sequence repeat 的缩写。简单重复序列(SSR)又叫微卫星 DNA (microsatellite DNA)。所谓微卫星是由 2~6bp 的重复单位串联而成, 一个微卫星长度一般小于 100bp, 不同品种或个体核心序列的重复次数不同, 但重复序列两端序列多是保守的单拷贝序列, 因此可以根据这两端的序列设计与核心序列互补的一对特异引物, 通过 PCR 扩增其间的核心微卫星 DNA 序列, 利用电泳分析不同基因型个体在每个 SSR 位点上的多态性^[2,8]。只要引物确定, 使用极为简单, 结果很稳定。

AFLP 是 amplified fragment length polymorphism 的缩写。它是 1993 年由 Zabeau 和 Vos 发明并申请欧洲专利, 之后于 1995 年以论文形式发表的检测 DNA 多态

第一作者简介: 王胜阳(1981-), 男, 新疆农业大学与北京农学院联招在读园艺蔬菜学硕士, 从事番茄育种研究, E-mail: poq2046.student@sina.com。

通讯作者: 张喜春, 男, 副教授, E-mail: Xichunzhang@sina.com。

基金项目: 北京市教委引进人才专项经费, 北京市优秀人才培养专项经费和北京农学院引进人才专项基金资助(KM200410020087)。

收稿日期: 2007-02-15

性的方法。它基于三个方面, DNA 的限制及寡核苷酸接头的连接作用、多组限制性酶切片段的特异性扩增和被扩增片段的凝胶分析^[9]。它的原理是把限制性酶切片段通过 PCR 反应进行扩增, 再把扩增好的酶切片段通过聚丙烯酰胺凝胶等高分辨率的分析胶电泳, 最后检出片段的多态性。它建立在 PCR 和 RFLP 标记技术基础上, 被认为是最有效的分子标记^[10]。

CAPS 是英文 cleaved amplified polymorphic sequence 的缩写。CAPS 技术也是利用 PCR 对 RFLP 标记进行了转化, CAPS 技术与 AFLP 技术相反, 它是在先获得某个位点特异扩增产物的基础上, 再将该扩增产物进行酶切, 电泳检测酶切片段的多态性^[8]。

2 番茄遗传图谱的构建

遗传图谱 (genetic map) 是以染色体重组交换率为相对长度单位, 以遗传标记为主体所建构的染色体线状连锁图谱^[11]。伴随以 RFLP 为代表的分子标记的出现, 遗传作图在许多物种中得到了飞速发展^[12]。值得一提的是植物中的第一张 RFLP 标记图谱^[13], 第一张含有 1000 多个分子标记的高密度图谱全都是在番茄上首先完成的^[14]。

番茄的分子遗传图谱主要是发展自 1992 年 Tanksley^[15] 等学者利用栽培番茄 *Lycopersicon esculentum* cv VF36-Tm2a 与潘那利番茄 *Lycopersicon pennellii* LA716 的 F₂ 代群体建构出的番茄遗传图谱。这个图谱以 RFLP 遗传标记为主并包含有同工酶和形态学等遗传标记, 它包括遗传标记 1 030 个, 共占 1 276 个图距单位, 这个高密度的遗传图谱, 大约每 1.2cM (厘摩) 就有一个标记。使番茄的遗传图谱达到了一个新的水平。

随着分子标记的不断发展, 已报道了很多番茄分子遗传图谱的研究。Zhang 等利用栽培番茄与多毛番茄的 BC₁ 群体制作了含 142 个 RFLP 标记、29 个抗病基因域 (RGAs)、总长度为 1 469cM 的番茄分子遗传图谱, 标记平均间距为 8.6cM^[16]。Colwyn 等人在运用 AFLP 标记构建番茄分子遗传连锁图谱时, 利用分离群体和 728 个引物, 从 42 000 个 AFLP 片段中筛选出了 3 个 AFLP 标记, 并将它们定位在番茄第 1 条染色体的短臂上。在 728 个引物中每个引物组合产生 58 个 AFLP 片段, 33.3% 具有多态性^[17]。刘杨等人把一种在每序花数、始花节位和单果重等性状上存在显著差异的栽培番茄和野生醋栗番茄进行杂交, 之后把产生的 142 个 F₂ 代单株作为作图群体, 使用 SSR 标记技术构建了一个番茄遗传连锁图谱, 此图谱包含 112 个标记, 总长度为 808.4 cM, 标记平均间距 7.22 cM^[18]。

番茄遗传图谱的构建在番茄基因组研究中起了非常重要作用, 它可以为基因定位、基因克隆、基因组结构和功能的研究, 和番茄的分子标记辅助育种打下良好的

基础^[12]。

3 亲缘关系和遗传多样性研究

分子标记技术检测的是番茄在基因组水平上的差异, 它不受外界环境的影响, 因而具有客观和稳定的特点, 它在分析种质亲缘关系及检测种质资源多样性方面发挥着相当大的作用, 利用分子标记可以确定亲本之间的亲缘关系及遗传差异, 确定亲本之间的遗传距离, 进一步划分出杂交优势群, 提升杂种优势潜力^[19]。

Villand 等人对亚洲蔬菜研究与开发中心 (AVRDC) 所收集到的 96 种全球范围的番茄品种进行了 RAPD 标记研究, 他们使用 41 个 RAPD 引物分析了这 96 个品种, 共产生出 98 个多态性 RAPD 标记。结果表明来源于厄瓜多尔、秘鲁和智利的品种间的差异大于来自其它地区的品种, 普通番茄内部品种之间存在着地域引起的差异^[20]。

宋建等人从 400 对 SSR 引物中筛选出 24 对多态性高、扩增稳定、重复性好的引物, 对来自国内外的 36 份番茄材料进行 SSR 标记, 之后利用 NTSYS 软件对所得结果进行聚类分析, 36 份材料被聚成 7 大类, 结果说明番茄材料之间存在一定程度的遗传分化, 野生种的亲缘关系较远, 而栽培番茄的亲缘关系较近, 遗传背景狭窄; 野生种与栽培品种之间的亲缘关系也较远^[21]。温庆放等人应用 RAPD 的方法对 32 个国内外樱桃番茄品种进行了分析, 筛选出的 27 个引物扩增出 207 条谱带, 其中有 139 条多态条带, 多态性程度为 67.15%, 根据 RAPD 位点对这些品种的基因型进行了聚类分析, 绘制了 32 个樱桃番茄的亲缘关系树状图^[22]。

李景富等人对番茄属 9 个种的 43 份材料进行了 RAPD 分析, 将番茄属分为 4 个类群。通过对遗传丰度、遗传离散度、基因杂合度和 Shannon 表型多样性指数的分析, 得出结论为野生类群的遗传多样性大于普通番茄类群, 这表明在野生类群中存在着较为丰富的可用于番茄遗传育种的遗传资源^[23-24]。

DNA 分子标记技术在番茄种质亲缘关系和遗传多样性的研究中有快速和准确的优势, 为现阶段蔬菜育种中减少杂交组合数目、有效划分杂交优势群、提高品种质量及育种效率提供有力依据, 对于番茄种质资源的收集与保存, 尤其是在育种上的应用展现了广阔的前景^[19-25]。

4 品系指纹图谱构建及品种纯度鉴定

番茄, 又叫西红柿、洋柿子等, 品种数量非常多, 它们的品种名和地方俗名混淆使用, 而且从国外引入品种的音译名杂乱不规范, 造成很多同名异物和同物异名的现象, 给品种资源的收集、分类、保存和利用造成不必要的麻烦^[26]。品系指纹图谱的建立可以规范番茄品种, 解决很多不便。建立起标准的品种指纹图谱, 就可以在分

析研究时将需要鉴定的品种的指纹与标准指纹进行对照分析,进而明确品种类别和品种纯度^[27]。

Broun 等人对 GATA 和 GACA 重复序列作图,结果表明它们在基因组中不是随机分布,而是集群分布,特别是紧邻于着丝粒分布,分析认为(GATA)_n和 GACA 可用于检测品种的多态性^[28]。栾雨时等人用放射性同位素标记人工合成的简单重复序列(GATA)₄,与经 DraI 酶切的 8 个番茄栽培品种的 DNA 进行 Southern 杂交,得到的 DNA 指纹可见各品种间都有差异带型,而且各品种内单株与单株之间无差异^[29]。

Rom 等人对 3 个番茄品种(Naama, Ty 20, 5692)的 F₁ 杂交种进行了纯度分析,提取每个杂种及其亲本二叶期叶片的 DNA 进行 RAPD 分析,从 50 个随机引物中筛选出两个引物用以区分杂种一代和母本,表明 RAPD 标记可用于杂种鉴定^[30]。李丽等人对京丹 1 号和毛粉 802 两个番茄品种的 F₁ 代杂交种纯度运用 RAPD 标记进行了鉴定,此研究结果显示,双引物的扩增反应对于鉴定双亲亲缘关系极近的杂交种纯度比单引物扩增反应更有效,经过进一步分析证明 RAPD 标记在鉴定双亲亲缘关系极近的杂交种纯度上是可靠的^[31]。

高蓝等人以番茄 F₁ 代杂交品种强选 1 号的干种子为材料,用 RAPD 标记方法成功地对种子的纯度进行了初步的鉴定,这种方法无需进行田间种植即可完成番茄杂种纯度的鉴定工作^[32],2006 年高蓝等人又对西北地区广泛种植的优良番茄一代杂交品种纯度进行了 RAPD 分析,结果表明毛粉 808、毛粉 802、毛粉 818、强选 1 号和西粉 3 号这 5 个番茄品种及其亲本之间的遗传背景比较接近。实验还为找到准确性更高的 SCAR 标记打下基础^[33]。栾雨时等^[34]、李继红等^[35]、蒲汉丽等人^[36]也都成功地利用 RAPD 技术进行了番茄的品种纯度分析。

可以说分子标记在构建品种指纹图谱上区别于其它的杂种纯度鉴定手段,它不受栽培条件的影响,可以通过计算机系统管理,能更好、更准确地认定和保护品种,并进行进一步研究^[37]。

5 基因定位

蔬菜作物的许多重要的农艺性状一部分表现为质量性状遗传的特点,如抗病性、抗虫性、某些抗逆性和育性等;另一部分表现为数量性状遗传特点,如产量、品质、抗性、成熟期等^[38]。质量性状是分离群体中表现为不连续变异而显示质的差异的性状^[3]。近等基因系分析法(NILS)和分离群体分组分析法(BSA)是寻找与目标基因紧密连锁的分子标记的有效方法。这两种方法主要运用于质量性状基因定位的研究^[39]。数量性状是一类受多基因控制的复杂性状。多基因在染色体上的位置称为数量性状基因座(QTL)^[40]。

Chunwongse 等人利用分子标记与 QTL 结合将新

的抗晚疫基因 Ph-3 定位在第 9 染色体上,证明这个基因与原来的晚疫病抗性基因 Ph(定位于第 7 染色体)或 Ph-2(定位于第 10 染色体)是非等位基因^[41]。田苗英等应用 RAPD 标记技术,在 F₂ 代群体中采用 BSA 法分别构建了抗 ToMV 病 DNA 混合池及感 ToMV 病 DNA 混合池,最终获得了与番茄 ToMV(烟草花叶病毒)抗性基因 Tm 2^{mv} 连锁的分子标记 O PD20h700,其遗传距离为 7.067cM,LOD 值为 16.768,此结果不仅可用于番茄抗 ToMV 育种材料的筛选与鉴定,而且还为日后定位和克隆此基因打下基础^[42]。

卫丽等人采用 AFLP 标记与 BSA 技术相结合的方法,对由显性核基因(RL-4)控制的番茄野生种 *L. peruvianum* 抗白粉病抗性进行了研究。在 F₂ 代抗病池和感病池间随机筛选了 256 对引物,利用 Joinmap 软件对筛选结果进行连锁分析,找到了与番茄抗白粉病基因 RL-4 连锁的 6 个 AFLP 标记,起遗传距离分别为 4.3、5.5、5.5、5.6、6.6 和 11.9cM^[43]。

刘杨等人以每序花数性状差异显著的栽培番茄与野生醋栗番茄杂交产生的 F₂ 为作图群体,应用 SSR 标记构建了番茄的遗传连锁图谱也鉴定出 2 个控制每序花数的,分别位于第 2 和 5 染色体上,其结果与很多学者关于控制花数性状定位的研究结果比较彼此之间均有很大的差异,说明数量性状由多基因控制很复杂,研究手段与结果不稳定^[44]。

在番茄遗传育种中 QTL 技术的应用很广泛,其中 Tanksley 教授作出的贡献尤为突出,他应用高代回交 QTL 法(AB-QTL)将野生种 *L. hirsutum* 的特异 QTL 导入到加工番茄品种 E6203 中,使其产量增加了 48%,可溶性固形物含量增加 22%,番茄红素含量增加 33%,并且这些结果经过了各种生产环境的考验,相对传统育种使这些性状指标每年以 1%的速度增长是相当卓越的成绩^[45]。

6 标记辅助选择

近年来,蔬菜作物中有许多重要的性状基因已被标记,并已经在育种实践中应用,这就是所谓的分子标记辅助选择(MAS)^[46]。因此一旦发现某一目标基因被定位在某一染色体上,就可以选择分散在染色体不同位点的标记,逐渐逼近,找到该基因的分子标记^[47]。

Chague 等鉴定了与 Sw-5 基因连锁的 4 个 RAPD 标记,其连锁距离不超过 10.5cM,其中两个似乎与 Sw-5 紧密连锁,还有 1 个以排斥相连锁,这就能够对杂合性的和易感性的植株做出鉴定^[48]。陈丽静等人利用一个 PCR 反应体系,同时对分别与番茄的抗番茄花叶病毒病的 Tm 2² 基因和抗斑点萎凋病毒病的 Sw-5 基因紧密连锁的 SCAR 标记进行了扩增筛选,经验证此方法可用于苗期早期辅助选育,能加快番茄育种进程^[49]。

寿森炎等人以番茄高抗青枯病品种“T51A”与高感青枯病品种“T9230”为材料,用 64 个 EcoRI/MseI 引物组合对两亲本及其 F₂ 代抗病和感病基因池进行了 AFLP 标记分析,扩增出的约 4 200 条带中有 2 条为稳定差异。经过 F₂ 代分离群体对 2 个特异条带与目的基因的遗传连锁性进行的分析,结果表明特异条带 AAG/CAT 与抗青枯病基因 RRS-342(暂定名)紧密连锁,二者之间的遗传距离为 6.7cM。将 AAG/CAT 片段回收、克隆及测序,将其成功地转化为 SCAR 标记,可以进一步应用于标记辅助育种^[30]。

于拴仓等人根据番茄叶霉病抗病基因 Cf-5 的基因序列设计特异扩增引物,以 7 个含有不同叶霉病抗病基因的品种为试材,成功建立了 Cf-5 基因的共显性 CAPS 标记。此研究为 Cf-5 基因的分子标记辅助育种奠定了良好基础^[51]。

李红双等人应用 RAPD 技术筛选到一个与番茄抗根结线虫病基因紧密连锁 RAPD 标记 OPD20₄₅₄,并将其成功地转化成了 SCAR 标记 SCD20₁₀₀₀,此研究结果为进一步实现分子标记辅助选择育种及克隆抗根结线虫病基因打下了基础^[52]。

李君明等人以来自保加利亚含有 ps-2 基因的不育材料 CMC1ps2 为母本,以加工番茄 92155 为父本构建了 123 个 F₂ 分离群体,采用 AFLP 分子标记技术,通过对 64 对 AFLP 引物组合的筛选,获得了与可育基因 ps-2 位点紧密连锁的 3 个 AFLP 标记,它们与可育基因 ps-2 的遗传图距分别是 6.04cM、6.04cM、6.06cM,位于可育基因的同侧,分别扩增出 390bp、150bp、80bp 的 DNA 片段。获得的 3 个标记可直接用于标记辅助选育,加速番茄雄性不育的转育和应用^[53]。

7 展望

番茄既是蔬菜也是水果,其中含有丰富的维生素 C 对心血管有良好的保护作用;番茄红素具有良好的抗氧化作用,能清除体内废物,增加免疫力。它也是营养师大力提倡的减肥食品。它早已成为人们日常生活中的不可缺少的食物。因此, DNA 分子标记技术在番茄遗传图谱、亲缘关系和遗传多样性研究、品系指纹图谱构建及品种纯度鉴定、基因定位、和标记辅助选择等方面的研究与应用非常有实用意义。

该文章大都选用的是国内学者、研究成果,这说明我国近些年分子标记方面的研究的很多,文章也很多。虽然分子标记实验的药品很多都对身体有害,但许多研究人员都在做分子标记,很多学校和科研单位都已建备相对完善的实验室和实验程序,这会给目前以至以后的科学育种研究带来很大的推进及影响,希望我们能更好、更有效的利用分子标记技术,多做一些有意义、有创新的研究,使其更有成效地应用于科技研究中,同

时也希望能将分子标记技术与常规育种更好的结合起来,培育出更多对菜农和食用者都有益的好品种来。

参考文献

[1] 尹贤贵 王小佳. DNA 分子标记及其在番茄遗传育种中的应用[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(6): 663-667.

[2] 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: 218-219.

[3] 钱惠荣 郑康乐. DNA 标记和分子育种[J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 1.

[4] 王军. 山葡萄雄性性状及山欧杂种果色的 RAPD 标记[D]. 杨凌: 西北农业大学, 1997.

[5] Rick C M, Zobel W, Fobes J F. Four peroxidase loci in red fruited tomato species: Genetics and geographic distribution [J]. P. N. A. S. USA, 1974, 71(3): 835-839.

[6] 高蓝, 李浩明. DNA 分子标记在番茄遗传育种研究中的应用[J]. 遗传 HEREDITAS (Beijing), 2003, 25(3): 361-365.

[7] M. R. Foolad, A. Shama. Molecular Markers as Selection Tools in Tomato Breeding, ISHS Acta Horticulturæ 695 25 November 2005, Orlando FL, USA vol 1, Number of articles: 53.

[8] 孙秀峰 陈振德 李德全. 分子标记及其在蔬菜遗传育种中的应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2005 36(2): 317-321.

[9] Pieter Vos. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Reseach, 1995 23(21): 4407-4414.

[10] 王斌. AFLP 的原理及其在植物分子生物学研究中的应用[M]. 走向 21 世纪的植物分子生物学. 科学出版社, 2000 5: 348-350.

[11] 邓俭英 方锋学. 分子标记及其在蔬菜研究中的应用[J]. 长江蔬菜, 2005, 08: 42-46.

[12] 陆朝福 朱立煌. 植物育种中的分子标记辅助选择[J]. 生物工程进展, 1995, 15(4): 11-17.

[13] Paterson A H, Lander E S, Hewitt J D, et al. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map or restriction fragment length polymorphism [J]. Nature, 1988, 335: 721-726.

[14] 刘仲齐 薛俊, 张要武. 番茄分子连锁图谱的发展和分子标记辅助育种[J]. 天津农业科学, 2004, 10(1): 37-40.

[15] Tanksley S D, Ganal M W, Prince J P, et al. High density molecular linkage maps of tomato and potato genomes [J]. Genetics, 1992, 132: 1141-1160.

[16] Zhang L P, Khan A, Nino-Liu D, et al. A Molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations resistance gene analogs based on a Lycopersicon esculentum× Lycopersicon hisutum cross [J]. Genome, 2002, 45(1): 133-146.

[17] Colwyn M T, Vos P, Zabeau M. The Plant Journal [J], 1995, 8(5): 785-794.

[18] 刘杨, 陈火英, 魏毓棠, 等. 番茄 SSR 遗传连锁图谱的构建及几个产量相关性状 QTLs 的定位[J]. 自然科学进展, 2005, 15(6): 748-752.

[19] 高慧敏 张颖君. 分子标记在蔬菜种质资源和育种上的应用[J]. 河北农业科学, 2005 9(2): 78-81.

[20] Villand J, Skroch P W, Lai T, et al. Genetic variation among accessions from primary and secondary centers of diversity [J]. Crop Sci, 1998 38: 1339-1347.

[21] 宋建, 陈杰, 陈火英, 等. 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.

[22] 温庆放 朱海生. 樱桃番茄种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 福建农业学报, 2006, 21(1): 59-62.

注: 参考文献 23~53 省略, 有需要者请与编辑部联系。