

番茄种质资源遗传多样性的 RAPD 分析

张 晓 烜, 许 向 阳, 王 傲 雪, 李 景 富

(东北农业大学 成栋学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:利用 RAPD 分子标记技术,对 63 份番茄种质资源进行了遗传多样性研究。结果表明:从 180 个 RAPD 引物当中,筛选出 22 条稳定性好、多态性强的 RAPD 引物,共扩增出多态性带 207 条,多态性条带比率为 86.96%,63 份番茄栽培品种或品系间的相似系数介于 0.28~0.99 之间,说明 RAPD 能很好的对番茄野生种、近缘野生种和栽培种进行多态性分析。采用 UPGMA 进行聚类分析,得到与生物学分类地位基本一致的结果。

关键词:番茄;种质资源;RAPD;遗传多样性

中图分类号:S 641.202.4 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)13-0115-04

番茄(*Lycopersicon esculentum*)是近代发展起来的一种世界性经济作物。由于其适应范围广,在南纬 45℃至北纬 65℃广大地区均有种植,因其产量高、富含多种维生素、糖类、番茄红素和胡萝卜素(据报道具有抗癌作用)而被世界各地广泛栽培,在我国也是一种重要的蔬菜作物。现利用 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分子标记技术研究番茄种质资源遗传多样性,旨在从 DNA 分子水平上进行亲缘关系鉴定和系统分类,实现分子水平上的辅助鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 番茄材料 63 份番茄材料均来自东北农业大学番茄课题组,是有待于鉴定的种质资源,各材料的编号见表 1。

1.1.2 试验试剂 RAPD 引物、*Taq* DNA 聚合酶、单核苷酸(dNTP)、CTAB 等试剂均购于上海生工生物工程技术服务有限公司,其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2.3 试验仪器 天平、离心机、水浴锅、灭菌锅、烘箱、电冰箱、-70℃冰箱、PCR 仪(美国 PE 公司生产的 PE-480 型)、微波炉、电泳仪、凝胶成像仪。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 DNA 的提取 总 DNA 的提取参照《植物基因工程》(王关林)SDS 法。

1.2.2 RAPD-PCR 反应体系 筛选了上海生物工程公司提供的 180 条 RAPD 随机引物,首先用 03035、

03037、03473 等 3 个番茄品种的混合 DNA 进行引物的筛选工作,从其中共筛选出 22 条稳定性好、多态性强的 RAPD 引物(表 2),然后利用筛选出的多态性好的引物进行 63 份番茄材料的遗传多样性分析。

RAPD 反应体系为 20 μL。反应液组成为:2.0 μL 10×PCRbuffer,0.25 mM/L 的 dNTPs,2.0 mM/L 的 MgCl₂,*Taq* DNA 聚合酶 1 U,15 ng/μL 随机引物(上海生物工程公司),40 ng 模板 DNA。PCR 扩增反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,36℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 90 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。反应在美国 PE 公司生产的 PE-480 型扩增仪上进行,扩增产物在 1.4%的琼脂糖凝胶上电泳分离,溴化乙锭染色后,在紫外凝胶成像系统中观察并拍照。

表 1 用于抗性分析的番茄品种或品系

Table 1 The tomato cultivars or lines used for resisting analysis

编号 No.	品种或品系 Cultivars	编号 No.	品种或品系 Cultivars	编号 No.	品种或品系 Cultivars	编号 No.	品种或品系 Cultivars
1	03031	16	6×03524	32	03075	48	27×20
2	03032	17	9×03524	33	03076	49	27×33
3	03033	18	03HN20	34	03077	50	28×20
4	03034	19	03HN31	35	03078	51	28×25
5	03034 美	20	03050	36	03080	52	28×26
6	03035	21	03051	37	03081	53	LA0448
7	03036	22	03053	38	03082	54	LA1266
8	03037	23	03054	39	22×18	55	LA1322
9	03473	24	03055	40	22×19	56	LA1368
10	03524	25	03057	41	22×20	57	LA2681
11	03690	26	03059	42	22×32	58	LA2767
12	03748	27	03063	43	22×33	59	03730
13	东农 709	28	03064	44	25×17	60	03058
14	秀光	29	03065	45	25×33	61	03052
15	金粉 1 号	30	03067	46	27×16	62	03110
		31	03068	47	27×19	63	03056

第一作者简介:张晓烜(1978-),女,在读博士,讲师,研究方向为生物技术。

责任作者:李景富(1943-),男,教授,博士生导师,研究方向为蔬菜遗传育种和蔬菜种质资源及蔬菜生物技术。

基金项目:国家“863”计划资助项目(2001AA241122)。

收稿日期:2011-04-08

表 2 用于遗传多样性分析的 RAPD 引物及其序列

Table 2 Sequence of RAPD primers used in genetic diversity analysis

引物编号 No	核苷酸序列(5'~3') Nucleotide sequence (5'~3')	引物编号 No	核苷酸序列(5'~3') Nucleotide sequence (5'~3')
S130	GGAAGCTTGG	S22	TGCCGAGCTG
S379	CACAGGCGGA	S119	CTGACCAGCC
S82	GGCACTGAGG	S33	CAGCACCCAC
S134	TGCTGCAGGT	S79	ACCCGGTCAC
S60	ACCCGGTCAC	S123	ACCCGGTCAC
S58	GAGAGCCACC	S96	AGCGTCCTCC
S74	TGCGTGCTTG	S34	TCTGTGCTGG
S55	CATCCGTGCT	S69	CTCACCGTCC
S93	CTCTCCGCCA	S95	ACTGGGACTC
S98	GGCTCATGTG	S363	CCAGCTTAGG
S368	GAACACTGGG	S424	GACCGACCCA

1.2.3 数据的统计分析 RAPD 扩增反应均重复 3 次,取可重复和清晰的条带进行记录,共筛选出 22 条引物(表 2)。每个 RAPD 扩增的条带记录为 1 个遗传位点,扩增条带的有无分别记录为“1”和“0”。该试验的相似系数采用 Nei 和 Li(Nei and Li,1973;Nei and Li,1979)的公式: $S_{ij}=2a/[(a+b)+(a+c)]$,公式中 S_{ij} 代表 2 个材料 i 和 j 之间的相似系数, a 为 2 个材料共用的条带数, b 材料 i 有而 j 没有的条带数, c 为材料 j 有而 i 没有的条带数。 GD (遗传距离) $=1-GS$ (遗传相似系数),利用软件 NTsys2.21 进行聚类分析,建立聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 番茄基因组 DNA 的提取

各样品的基因组 DNA 采用 SDS(稍有改动)抽提法提取,用 0.8%的琼脂糖电泳检测(图 1),从图 1 可以看出,分子量均在 20 kb 左右,并呈一条带,说明所提 DNA 具有良好的完整性,且纯度较高。所得 DNA 产率及其 OD_{260} 、 OD_{280} (如表 3 部分数值)所示。可以看出样品的 OD 值 >1.7 ,其纯度可以作为 RAPD 的模板使用。



图 1 利用 SDS 法提取的 DNA
Fig.1 Electrophoresis of DNA of Tomato gels by SDS
M,marke;2000,2-22 are genomic DNA of diffent tomato leaves

表 3 所提取的部分 DNA 的 OD 值

Table 3 The partial results of OD_{260} and OD_{280} measurement of genomic DNA of Tomato

编号 No.	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	浓度 Concentration /ng· μL^{-1}
1	0.160	0.094	1.702	80.0
2	0.163	0.092	1.772	81.5
3	0.179	0.098	1.827	89.5
4	0.157	0.089	1.764	78.5
5	0.126	0.068	1.853	63.0
6	0.299	0.165	1.812	149.5
8	0.298	0.160	1.863	149.0
9	0.296	0.157	1.883	148.0
10	0.528	0.281	1.879	264.0

2.2 RAPD-PCR 扩增结果

通过对 63 份番茄种质资源的 PCR 扩增,22 条随机引物共扩增出 207 条重复性高,清晰的多态性条带(图 2),多态条带总数为 180 条,占总带数的 86.96%。所用的 22 条引物共扩增的条带数在 6~13 条之间,每个引物平均扩增出 9.41 条带,有多态的条带数在 4~12 之间,每个引物平均扩增出多态性条带数为 8 条带。各引物扩增的多态比率在 66.67%~100.00%之间。扩增片段的大小在 150~2 000 bp 之间。

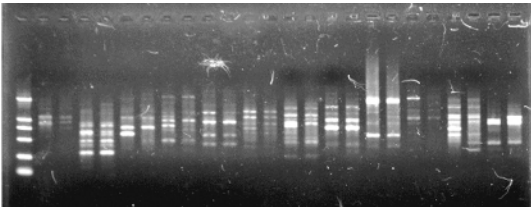


图 2 RAPD 引物对部分品种的扩增结果
Fig.2 Amplified primer amplification of partial variety of results

2.3 RAPD 揭示的种质资源的亲缘关系

将各引物的扩增结果转化为 1、0 数据,采用 Nei 和 Li 公式计算 63 份番茄栽培品种或品系间的相似系数(表 4)。由表 4 可看出,63 份材料之间的相似系数介于 0.28~0.99 之间,说明 RAPD 能很好的对番茄野生种、近缘野生种和栽培种进行多态性分析。根据 RAPD 分析所得的相似系数数值,用 UPGMA 法进行聚类。聚类结果可以初步反映各材料之间的遗传关系远近(图 3,表 5)。从图 3 和表 5 中可以发现,利用 RAPD 方法完全可以把番茄野生或近缘野生种和栽培种明显地分开。在相似系数为 0.59 处,可以把 63 份材料明显的分为 7 个大组,其中 1 个栽培组和 6 个野生组或近缘野生种,分别命名为 A1、A2。在相似系数为 0.70 处,又可进一步将栽培组 A1 组分为 A1-1 和 A1-2 2 组,而在 A1-1 中又可分为 A1-1-1 和 A1-1-2 的 2 组。其中 A1-1 组几乎包括了绝大部分的从欧美国

家所引进的品种,如:美国、以色列、荷兰、法国,这可能是由于在亲本选择上欧美一些国家在育种目标和选择方向上具有很大程度的一致性,从而使品种或品系间差异较小,同时也由于在材料上有一些是引进的杂交组合的原因。并且在 A1-1 组中还包括一些我国生产的一些常用栽培种,如:“东农 709”、“金粉 1 号”、“秀光”等品种,这说明了由于长期与国外交流、引种等原因,使得生产上应用的一些品种也具有了与国外品种较近的亲缘关系。在 A1-2 组中主要是国内的品种或品系。

表 4 RAPD 揭示的 63 份番茄种质的遗传相似系数统计结果

Table 4 Statistics results of genetics similarity among 63 tomato germplasm orlines by RAPD

编号 No.	品种或品系 Cultivars	最小值 Min	最大值 Max	平均 Average	编号 No.	品种或品系 Cultivars	最小值 Min	最大值 Max	平均 Average
1	03031	0.44	0.95	0.85	33	03076	0.48	0.93	0.83
2	03032	0.46	0.98	0.85	34	03077	0.46	0.93	0.81
3	03033	0.46	0.98	0.85	35	03078	0.49	0.93	0.85
4	03034	0.44	0.99	0.82	36	03080	0.44	0.90	0.80
5	03034(美)	0.45	0.99	0.85	37	03081	0.47	0.94	0.85
6	03035	0.45	0.90	0.81	38	03082	0.36	0.80	0.70
7	03036	0.47	0.94	0.83	39	22×18	0.45	0.95	0.81
8	03037	0.45	0.90	0.79	40	22×19	0.45	0.95	0.82
9	03473	0.47	0.94	0.83	41	22×20	0.47	0.97	0.83
10	03524	0.46	0.89	0.79	42	22×32	0.47	0.96	0.87
11	03690	0.46	0.91	0.80	43	22×33	0.45	0.95	0.84
12	03748	0.50	0.94	0.80	44	25×17	0.47	0.95	0.85
13	东农 709	0.47	0.98	0.83	45	25×33	0.46	0.95	0.84
14	秀光	0.46	0.95	0.87	46	27×16	0.48	0.95	0.88
15	金粉 1 号	0.49	0.95	0.88	47	27×19	0.46	0.93	0.84
16	6×03524	0.41	0.91	0.81	48	27×20	0.50	0.95	0.85
17	9×03524	0.45	0.94	0.82	49	27×33	0.46	0.97	0.85
18	03HN20	0.49	0.98	0.86	50	28×20	0.48	0.95	0.84
19	03HN31	0.47	0.94	0.84	51	28×25	0.46	0.95	0.83
20	03050	0.44	0.88	0.79	52	28×26	0.44	0.91	0.81
21	03051	0.46	0.96	0.85	53	LA0448	0.39	0.54	0.51
22	03053	0.47	0.97	0.84	54	LA1266	0.29	0.58	0.53
23	03054	0.50	0.96	0.85	55	LA1322	0.34	0.59	0.49
24	03055	0.40	0.84	0.72	56	LA1368	0.30	0.62	0.57
25	03057	0.48	0.93	0.83	57	LA2681	0.28	0.59	0.42
26	03059	0.45	0.97	0.85	58	LA2767	0.28	0.59	0.53
27	03063	0.43	0.98	0.86	59	03730	0.47	0.84	0.76
28	03064	0.42	0.95	0.83	60	03058	0.47	0.90	0.81
29	03065	0.45	0.97	0.84	61	03052	0.48	0.90	0.80
30	03067	0.45	0.91	0.81	62	03110	0.44	0.88	0.76
31	03068	0.41	0.86	0.77	63	03056	0.47	0.92	0.79
32	03075	0.44	0.90	0.81					

表 5 RAPD 分析的 63 份番茄种质的聚类结果

Table 5 Cluster results of 63 tomato germplasm or lines by RAPD

编号 No.			聚 类 结 果 Cluster results	
A1	A1-1	A1-1-1	I	03031,03032,03033,03034,03034(美)、03063,03064,03057,03473、金粉 1 号、东农 709、秀光、03051、03059、03524
			II	03035、03036、03037、03690、03748、03HN20、03HN31、03054
	A1-1-2	III	9×03524,25×17、22×19、22×33、22×32、27×16、28×25、03081、22×18、28×26、03056、03050	
		IV	03053、03065、03078、03076、03077、03067、22×20、27×33、25×33、6×03524、03075、03080	
		V	27×19、27×20、28×20、03110、03058、03052、03730	
	A1-2		03055、03068、03082	
A2		LA2767、LA0448、LA1322、LA1638、LA1266、LA2681		

3 讨论

遗传多样性研究是番茄遗传育种研究的重要内容,如亲本的选择、选配,绘制指纹图谱,制定种质资源收集计划,鉴定品种间的遗传多样性及研究系统进化关系等等。它决定了这些种质资源在今后的育种实践中的有效利用。而 DNA 分子标记技术的发展为遗传多样性研究提供了新的手段和方法。尤其是 RFLP、RAPD 和 SSR 等分子标记技术为番茄遗传多样性的分

析提供了有力的工具。
该试验利用 RAPD 技术对 63 份番茄种质资源进行遗传多样性分析,采用 Nei 和 Li 公式计算 63 份番茄栽培品种或品系间的相似系数。结果表明,63 份材料之间的相似系数介于 0.28~0.99 之间,平均值为 0.79。说明 RAPD 能很好地对番茄野生种、近缘野生种和栽培种进行多态性分析,但在揭示番茄栽培种多态性的能力上却表现不理想,主要表现为遗传相似系

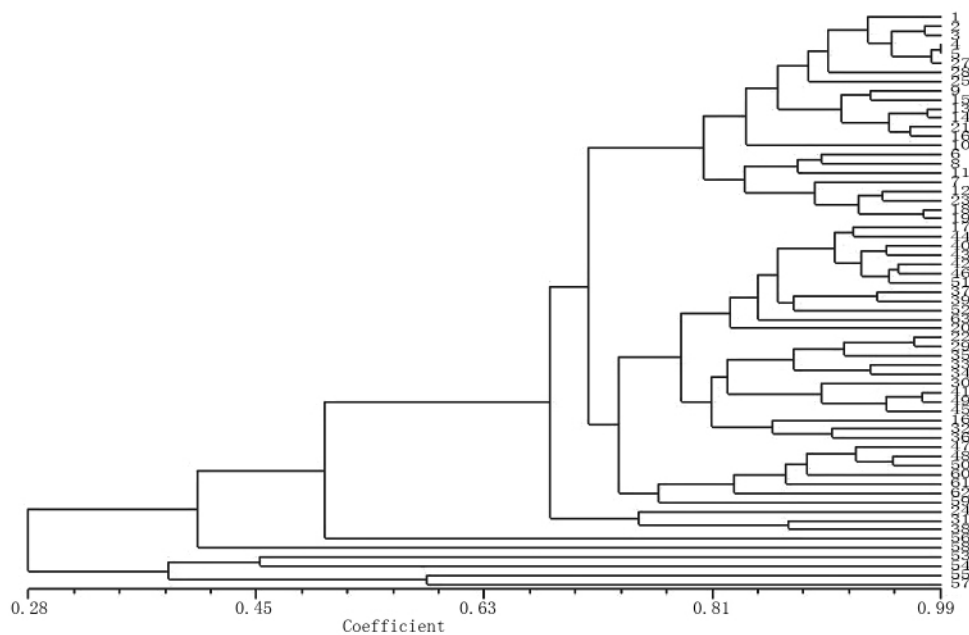


图3 基于 RAPD 数据的 63 份番茄种质的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Dendrogram illustrating the genetic relationships among 63 tomato accessions based on UPGMA cluster analysis of RAPD data

数较高。因为在其中 57 份番茄栽培种之间的相似系数介于 0.70~0.99 之间,其平均值为 0.81。说明供试的番茄的栽培品种或品系间的遗传多样性较差,遗传背景狭窄。其中平均相似系数最高的是金粉一号,平均相似系数为 0.88。平均相似系数最低的是 LA2681,平均相似系数为 0.42。野生番茄材料的平均相似系数较低,这是因为它们与番茄栽培种之间的遗传关系较远的原因。

4 结论

该试验筛选了上海生物工程公司提供的 180 条 RAPD 随机引物,然后利用筛选出的多态性好的引物进行 63 份番茄材料的亲缘关系分析。从其中共筛选出 22 条稳定性好、多态性强的 RAPD 引物。采用 Nei 和 Li 公式计算 63 份番茄栽培品种或品系间的相似系数。63 份材料之间的相似系数介于 0.28~0.99 之间,平均值为 0.79。结果表明 RAPD 能很好地对番茄野

生种、近缘野生种和栽培种进行多态性分析,但在揭示番茄栽培种多态性的能力上却表现不理想,主要表现为遗传相似系数较高。

参考文献

[1] 曹辉庆,李杨瑞,彭宏祥.利用 RAPD 分子标记对南方湿热地区葡萄资源的亲缘关系及分类研究[J].西南农业学报,2004,17(1):61-64.
[2] 陈云鹏,曹家树,缪颖.芸苔类蔬菜基因组 DNA 遗传多样性 RAPD 分析[J].浙江大学学报(农业与生命科学),2000,26(2):131-136.
[3] 旦巴,涂金星,胡书银.西藏油菜种质资源的 RAPD 分子标记分析[J].作物学报,2003,29(1):1-7.
[4] 田苗英,冯兰香,杨翠荣.应用 RAPD 方法获得与番茄 ToMV 抗性基因 Tm^{2nv}连锁的分子标记[J].植物病理学报,2000,30(2):124-127.
[5] Amarger V, Mercier L. Molecular analysis of RAPD DNA based markers: Their potential use for the detection of genetic variability in jojoba [J]. Biochimie. 1995,77:931-936.
[6] Kennard W C. Linkage among RFLP, RAPD isozyme disease resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber[J]. Theor. Appl. Genet. 1994,89:42-48.

RAPD Analysis of Genetic Diversity of *Lycopersicum esculentum*

ZHANG Xiao-xuan, XU Xiang-yang, WANG Ao-xue, LI Jing-fu
(Chengdong College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA(RAPD)method was used to detect genetic variation of 63 varieties of tomato(*Lycopersicum esculentum*). From 180 amplified primer, and screened 22 of good stability, strong amplified polymorphic primers, RAPD primers generated 207 polymorphic bands. Percentage of polymorphic bands(PPB) of RAPD was 86.96%. The similarity coefficient between 0.28~0.99, By UPGMA cluster analysis, get and biology taxonomic position basic consistent results.

Key words: tomato; germplasm resources; RAPD; genetic diversity