

汪国平, 牛 玉, 汪文毅, 等. 番茄 SSR 标记在茄子及其他茄科作物上的通用性分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 56-60.

番茄 SSR 标记在茄子及其他茄科作物上的通用性分析

汪国平¹, 牛 玉^{1,2}, 汪文毅¹, 乐素菊³, 林鉴荣⁴

(1 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642; 2 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737; 3 仲恺农业工程学院 生命科学学院, 广东 广州 510225; 4 广州市农业科学研究院, 广东 广州 510308)

摘要:【目的】利用已完成测序的番茄基因组发展大量的 SSR 标记, 并将这些标记转移到茄子及其他茄科作物上, 节省开发 SSR 标记的成本。【方法】本研究利用近缘物种转移法分析了番茄 SSR 标记在茄子及其他茄科作物上的通用性情况。【结果和结论】1 046 对番茄 SSR 引物中有 887 对能在茄子基因组 DNA 上扩增出产物, 425 对引物扩增出的带型在番茄与茄子间相似程度高, 标记的通用率为 40.6%; EST-SSR 比基因组 SSR 的通用性更好, 前者通用率为 54.5%, 后者为 38.9%; 414 个通用 SSR 标记被电子定位到番茄染色体上, 不同染色体来源的标记通用率明显不同; 93 对引物在 2 份用于遗传图谱构建的栽培茄子亲本间表现出多态性; 获得的 425 对通用引物在马铃薯、辣椒、枸杞上通用率分别为 96.2%、78.1%、54.1%。

关键词:番茄; 茄子; SSR 标记; 通用性; 茄科蔬菜
中图分类号:S641.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)04-0056-05

Transferability of tomato SSR markers to eggplants and other Solanaceous vegetables

WANG Guoping¹, NIU Yu^{1,2}, WANG Wenyi¹, YUE Suju³, LIN Jianrong⁴

(1 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China;
3 College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
4 Guangzhou Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510308, China)

Abstract:【Objective】Tomato genome was sequenced and a large number of SSR markers could be obtained. Cross-species amplification of tomato SSR markers will be an economic method to add up the number of robust SSR markers in eggplant and Solanaceous vegetables. 【Method】This study tested a large set of tomato SSR markers on eggplant and other Solanaceous vegetables by close relative species transfer method. 【Result and conclusion】887 out of 1046 tested tomato SSR markers could successfully amplify on eggplants, but only 425 produced very similar bands on tomatoes and eggplants, giving a transfer rate of 40.6%. EST-SSR markers were found to be more transferable than genomic SSR markers (54.5 and 38.9% respectively). 414 transferable SSR markers were mapped electronically onto tomato genome and their distribution on individual chromosomes highly varied. 93 SSR markers showed polymor-

phism on two eggplant parents used for genetic map construction. When testing 425 cross-species SSR markers on potatoes, peppers and lycium, the transferability rates were 96.2%, 78.1% and 54.1%, respectively.

Key words: tomato; eggplant; SSR markers; transferability; Solanaceous vegetables

目前,多种分子标记技术可以用于分子遗传研究,其中微卫星标记(Microsatellite),又称简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR)具有多态性丰富、重复性好、检测方便、标记多呈共显性、在基因组中分散分布等特点,已广泛应用于遗传图谱构建、品种指纹图谱绘制、品种纯度检测及目标性状分子标记筛选^[1].微卫星标记已成为分子育种中最重要的遗传标记之一.

由于微卫星标记具有种族特异性,使用 SSR 标记的前提是要知道重复序列两侧的 DNA 序列,因而存在引物开发的问题.获取微卫星标记的方法主要有基因组测序法、筛选基因组文库法、微卫星富集法、数据库查找法和近缘物种转移法等 5 种^[2].目前茄科作物中番茄、马铃薯已经完成基因组测序^[3-4],可以发展海量的 SSR 标记,但在其他茄科作物上可供利用的 SSR 标记数目不多,还不能满足这些作物分子育种的需要,有必要发展更多的 SSR 标记.

近缘物种转移法是一种简便快速地发展 SSR 标记的方法,微卫星侧翼序列在属内种间、甚至在科内属间是保守的、相似的,因此,同种、属、科的不同物种可以使用同一种微卫星引物进行扩增.茄科作物种类较多,比较基因组学研究已经证明茄科作物间基因组保守性较强^[5-7].根据番茄基因组序列已发展了大量 SSR 标记,本文对这些标记在茄子及其他茄科蔬菜作物上的通用性进行了研究,以期将部分标记转移到茄子上,节省开发茄子 SSR 标记的成本.

1 材料与方法

1.1 植物材料及 DNA 提取

供试材料:栽培番茄“860”(华南农业大学园艺学院番茄课题组选育),栽培茄子“湖南小圆茄”(湖南省收集的地方品种)、“Blacknite”(澳大利亚购买的常规品种),3 个材料均经多代纯化;辣椒为“东方神剑”品种,马铃薯、枸杞为广州岑村蔬菜基地采集,品种名未知.

上述材料均取 1~2 片幼叶,按 Hemming 等^[8]的方法提取各植物材料的总 DNA.

1.2 SSR 标记及方法

共试验了 1 046 对番茄 SSR 引物.其中 112 对

EST-SSR 引物根据 SGN 网站(<http://sgn.cornell.edu>)及 He 等^[9]公布的引物序列合成;32 对基因组 SSR 根据 Suliman-Pollatschek 等^[10]公布的引物序列合成;902 对基因组 SSR 由课题组根据番茄 BAC 末端序列、基因组序列设计,引物序列暂时未公布.

20 μL PCR 反应体系包括 0.15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs,1 $\times$ PCR 反应缓冲液,50~100 ng 的 DNA 模板,1 U *Taq* 酶.反应在 PE9700 型热循环仪中进行.所用的反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环 35 次;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min. PCR 产物用 6% 聚丙烯酰胺变性胶电泳,250 V 条件下稳压电泳约 3 h;普通银染显带,数码相机照相.对扩增模糊、无扩增产物的 SSR 标记进行 2 次分析,以确保该结果不是由 PCR 扩增失败引起.

1.3 SSR 标记电子定位

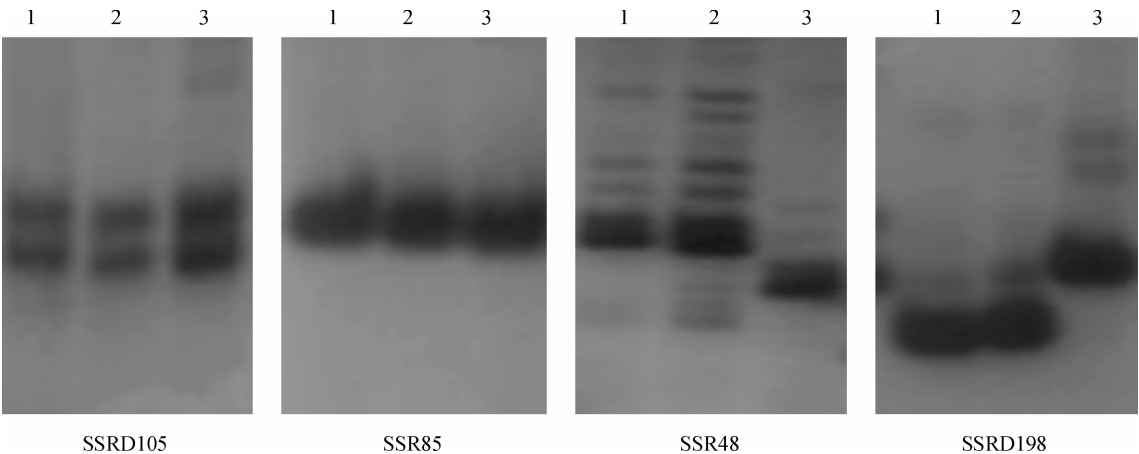
在 SGN 网站提供的 Blastn 界面将 SSR 引物序列与番茄基因组序列(版本 2.4)进行比对,确定标记在番茄染色体上的位置.

2 结果与分析

2.1 番茄 SSR 引物在茄子基因组 DNA 上的扩增情况

根据电泳后主带的情况,在茄子基因组 DNA 上番茄 SSR 引物的扩增带型(图 1)出现以下几种类型:1)扩增出较强的主带,茄子与番茄有 1 条主带的大小非常一致(标记 SSRD105、SSR85);2)扩增出较强的主带,茄子与番茄有 1 条主带的大小相差不大(标记 SSR48、SSRD198);3)扩增出多条主带,且与番茄主带无对应条带;4)扩增出多条弱带;5)不能扩增出任何条带.

试验共检测了 1 046 对番茄 SSR 引物,有 887 对在茄子基因组 DNA 上扩增出了产物,642 对引物扩增出了第 1、第 2、第 3 种类型较强的主带,占总标记数的 61.4%,其中第 1 种引物 135 对,第 2 种引物 290 对(163 对扩增出的产物比番茄大,127 对比番茄小),第 1、2 种引物扩增出的带型在番茄与茄子间相似程度高,可以转用到茄子上,以此得到标记的通用率为 40.6%.



图中 1、2、3 泳道品种分别为湖南小圆茄,Blacknite,860

图 1 番茄 SSR 引物在茄子和番茄 DNA 上扩增出的带型

Fig. 1 The band patterns of tomato SSR markers amplified on eggplant and tomato DNAs

比较 EST-SSR 与基因组 SSR 的扩增情况:试验共检测了 112 对番茄 EST-SSR 引物,结果有 98 对能有效扩增,95 对能扩增出清晰主带,其中 61 对为第 1、2 种引物,可以在茄子上通用,通用率为 54.5%;试验共检测了 934 对番茄基因组 SSR 引物,结果有 789 对能有效扩增,529 对能扩增出清晰主带,其中 364 对为第 1、2 种引物,可以在茄子上通用,通用率为 38.9%. 说明 EST-SSR 比基因组 SSR 的通用性明显要好.

2.2 引物通用性与基序长度的关系

对在茄子上能通用的番茄 SSR 引物标记位点重复序列按基序长度进行分类,结果(图 2)表明,通用 SSR 无论来源于 EST 还是基因组,2 核苷酸基序出现的频率最大,3 核苷酸基序出现频率次之,但 2 核苷酸基序出现频率基因组 SSR 大于 EST-SSR,而 3 核苷酸基序出现频率是 EST-SSR 明显高于基因组 SSR,其他核苷酸基序类型(4、5、6 核苷酸)出现频率在基因组 SSR 和 EST-SSR 间差别不大.

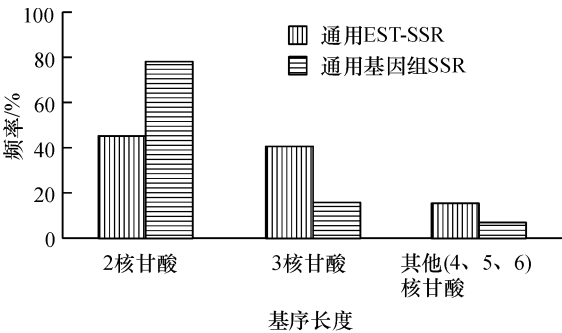


图 2 番茄 SSR 不同长度基序的频率分布

Fig. 2 The frequency distributions of different motifs of tomato SSR

2.3 保守 SSR 标记在番茄染色体上的分布

将 1 046 对番茄 SSR 引物与番茄基因组序列比对进行电子定位,结果有 15 对不能定位,有 33 对定位于染色体 0 (即测序后不能组装的序列),998 对能定位到番茄的各条染色体上;番茄、茄子间保守的 425 对引物中,3 对不能定位,8 对定位于染色体 0, 414 对能定位到各条染色体上. 对 414 对标记的定位结果按 EST-SSR、基因组 SSR 进行统计,统计结果见表 1. 从表 1 中可以看出,通用 SSR 标记比率在不同染色体上明显不同,染色体 9 上标记的通用率最高 (60.5%),染色体 10 次之 (53.3%);而染色体 7 上标记的通用率最低 (29.2%),其次是染色体 12 (31.7%).

2.4 保守引物在 2 份茄子间的多态性

425 对在茄子上能有效扩增的番茄引物中,有 67 对能在 2 份栽培茄子间扩增出多态条带,多态标记比率为 15.8%. 由此看来,尽管 SSR 引物的通用性较高,但在茄子不同材料上的多态性比例较低,这可能是因为用于多态性比较的 2 个茄子亲本都来源于栽培种,亲缘关系比较近.

在 2 份栽培茄子间扩增出多态性的引物中,部分标记带型表现为长度大小的差别,而且相差只有几个碱基,可能为共显性标记,但需要使用 F₁ 进行验证;部分标记带型为有无的差别,表现为显性标记特性.

2.5 保守引物在其他茄科作物上的通用性

对番茄、茄子间保守的 425 对 SSR 引物在其他茄科蔬菜上的通用性进一步检查,在马铃薯、辣椒、枸杞上分别有 96.2%、78.1%、54.1% 的引物能扩增出第 1、2 种带型.

表 1 通用 SSR 标记在番茄染色体上的分布

Tab.1 The chromosome distribution of transferable tomato SSR markers

染色体	EST-SSR			扩增标记数			合计		
	扩增 标记数	通用 标记数	通用标记 比率/%	基因组 SSR	通用 标记数	通用标记 比率/%	扩增 标记数	通用 标记数	通用标记 比率/%
1	11	7	63.6	82	31	37.8	93	38	40.9
2	11	7	63.6	68	21	30.9	79	28	35.4
3	10	6	60.0	72	35	48.6	82	41	50.0
4	13	6	53.8	78	30	38.5	91	36	42.9
5	10	6	46.2	79	31	39.2	89	37	41.6
6	12	6	50.0	91	34	37.4	103	40	38.8
7	8	2	25.0	64	19	29.7	72	21	29.2
8	6	2	33.3	85	36	42.4	91	38	41.8
9	12	9	75.0	69	40	58.0	81	49	60.5
10	10	6	60.0	50	26	52.0	60	32	53.3
11	6	3	60.0	69	25	36.2	75	28	37.3
12	3	1	33.3	79	25	31.6	82	26	31.7
合计	112	61	54.5	886	353	39.8	998	414	41.5

3 讨论与结论

SSR 标记在茄科作物间具有一定的通用性. 邵光金等^[11]证明茄子的 SSR 标记可以应用于番茄;陈晓莹^[12]证明番茄 SSR 可以用于辣椒. 本试验进一步证明番茄 SSR 标记可以应用于茄子、马铃薯、辣椒和枸杞. 由于番茄、马铃薯已经进行了全基因组测序, 可以发展出海量的 SSR 标记, 将这些标记转移到其他未测序的茄科作物上, 可以大大节省标记开发的成本.

目前茄子上开发出的 SSR 标记不多, 有必要发展更多的 SSR 标记. Stägel 等^[13]利用数据库序列发展了 50 对 EST-SSR, 其中有 39 对能成功扩增; Nunome 等^[14]于 2003 年通过筛选基因组文库的方法发展了 37 对 SSR 引物, 其中 23 对能成功扩增; 该课题组随后再通过筛选基因组文库的方法发展了 2 265 对 SSR 引物, 但只在文章中公布了用于构建 SSR 遗传图谱的 300 多对引物序列^[15-16]. 卢婷等^[17]用 23 对番茄 SSR 标记应用于茄子聚类分析, 证明番茄 SSR 标记可以在茄子上部分通用. 本研究进一步扩大了试用标记的数量, 将 425 个番茄 SSR 标记转到茄子上, 并找到在茄子作图亲本间具有多态性的 67 个标记, 这不仅为茄子遗传图谱构建及基因定位奠定了基础, 而且可以进一步用这些标记做锚定标记, 进行番茄、茄子间的比较基因组作图, 这将比应用 COS 标记进行比较作图简便得多^[5]. 番茄已经完成了全

基因组测序, 番茄、茄子间锚定标记的获得, 将为利用基因组间的微共线性发展加密标记及基因克隆提供参考.

试验中部分标记不能被电子定位, 可能原因有三: 一是未定位标记存在于番茄基因组测序的 gap 区域; 二是本试验部分标记是根据番茄的 BAC 末端发展的, 而 BAC 末端测序是单一 read, 存在一定的测序错误, 和基因组序列比对不上; 三是 EST-SSR 及来自 Suliman-Pollatschek 等^[10]研究的基因组 SSR, 所用的原始番茄材料与番茄测序材料不同.

本研究发展的 SSR 标记通用性比十字花科作物低, 崔秀敏等^[18]的研究结果表明, 69 对不结球白菜 SSR 引物在芸苔属其他 8 种作物上的通用性扩增率在 49.3% ~ 85.5%, 而且 33% 的 SSR 引物在芸薹属近缘种间具有丰富的多态性. 为了提高标记的通用性, 可对进行番茄和马铃薯全基因组序列比对, 在保守位点发展标记, 并适当引入简并碱基, 从而实现 1 套引物在不同茄科作物间通用.

参考文献:

[1] 汪国平, 胡开林, 梁树南, 等. 番茄微卫星标记研究进展[M]//雷建军. 园艺学进展: 第 5 辑. 广州: 广州出版社, 2002: 379-383.

[2] 李明芳, 郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态[J]. 遗传, 2004, 26(5): 769-776.

[3] ZOUINE M, LATCHÉ A, ROUSSEAU C, et al. The to-
<http://xuebao.scau.edu.cn>

- mato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution[J]. *Nature*, 2012, 485(7400):635-641.
- [4] XU X, PAN S, CHENG S, et al. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato[J]. *Nature*, 2011, 475(7355):189-195.
- [5] WU F, EANNETTA N T, XU Y, et al. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum* [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 118:1279-1293.
- [6] DOGANLAR S, FRARY A, DAUNAY M C, et al. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae[J]. *Genetics*, 2002, 161(4):1697-1711.
- [7] WANG Y, DIEHL A, WU F, et al. Sequencing and comparative analysis of a conserved syntenic segment in the Solanaceae[J]. *Genetics*, 2008, 180(1):391-408.
- [8] HEMMING M N, BASUKI S, MCGRATH D J, et al. Fine mapping of the tomato *I-3* gene for fusarium wilt resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for *I-3* [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 409-418.
- [9] HE C, POYSA V, YU K. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 363-373.
- [10] SULIMAN-POLLATSCHEK S, KASHKUSH K, SHATS H, et al. Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum* [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, 7(2A): 583-597.
- [11] 邵光金, 牛玉, 乐素菊, 等. 茄子 SSR 标记在番茄上的通用性分析[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(5): 909-912.
- [12] 陈晓莹. 辣椒疫病抗性基因的遗传规律及 SSR 标记研究[D]. 广州:华南农业大学, 2009.
- [13] STÄGEL A, PORTIS E, TOPPINO L, et al. Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:357.
- [14] NUNOME T, SUWABE K, IKETANI H, et al. Identification and characterization of microsatellites in eggplant[J]. *Plant Breeding*, 2003, 122(3):256-262.
- [15] NUNOME T, NEGORO S, KONO I, et al. Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119(6):1143-1153.
- [16] FUKUOKA H, MIYATAKE K, NUNOME T, et al. Development of gene-based markers and construction of an integrated linkage map in eggplant by using *Solanum* orthologous (SOL) gene sets[J]. *Theor Appl Genet*, 2012, 25(1):47-56.
- [17] 卢婷, 汪国平, 林明宝, 等. 应用 SSR 标记分析茄子遗传多样性的研究[J]. *中国蔬菜*, 2008(增刊): 5-9.
- [18] 崔秀敏, 侯喜林, 董玉秀. 不结球白菜 SSR 引物的高效开发及其通用性研究[J]. *科技导报*, 2005, 23(11): 20-23.

【责任编辑 霍 欢】