

王仁汉,李文丽,王 富,等. 与番茄果实颜色连锁的 InDel 标记及其应用[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):32-34.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.007

# 与番茄果实颜色连锁的 InDel 标记及其应用

王仁汉,李文丽,王 富,王 辉  
(青岛农业大学园艺学院,山东青岛 266109)

**摘要:**利用与番茄果实颜色性状紧密连锁的标记 InDel - P 分别对 4 份红果番茄高代自交系和 4 份粉红色番茄高代自交系进行检测,结果显示该标记在 4 份红果番茄高代自交系中均可扩增出 960 bp 的 DNA 特异片段,而在 4 份粉红色番茄高代自交系中可扩增出 360 bp 左右的特异片段;利用该标记对 48 份后代材料进行进一步检测,结果显示,在待检的 32 份普通番茄后代材料中有 2 份未扩增出条带,17 份表现粉红色,9 份表现红色,4 份同时扩增出了 2 条条带;对 16 份樱桃番茄也进行 PCR 检测,结果表明有 11 份后代材料鉴定结果为粉红色,另外 5 份材料鉴定结果为红色。本试验所涉及的 30 份普通番茄材料和 16 份樱桃番茄材料分子检测的准确率为 86.7% 和 62.5%。

**关键词:**番茄;分子标记;果实颜色;InDel - P 分子标记  
**中图分类号:** S641.203.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0032-03

番茄(*Solanum lycopersicon*)属于茄科番茄属,是世界范围内广泛种植的蔬菜作物之一。番茄果实色泽是叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮和花青苷等多种色素的综合表现<sup>[1]</sup>,随着果实发育代谢过程中相关色素含量及组分的变化,果实颜色表现出差异性,类胡萝卜素中的番茄红素在果实颜色形成中具有决定性作用<sup>[2-4]</sup>。番茄果实颜色受到很多基因控制,现已研究发现至少有 9 个基因位点(*r*、*t*、*B*、*Del*、*dg*、*hp*、*ogc*、*MOB*等)对番茄的果实颜色有很大的影响<sup>[5-8]</sup>。近年来,有研究证实 *MYB* 转录因子在番茄果实颜色形成中发挥决定性作用<sup>[9]</sup>。黄三文等研究发现,在粉果番茄 *SIMYB12* 基因起始密码子上游 4 kb 处存在大小为 603 bp 的 DNA 序列缺失,并开发为 InDel 标记 InDel - P<sup>[10]</sup>。本研究利用与番茄果实颜色相关的 InDel - P 分子标记对 4 份红果番茄高代自交系和 4 份粉红色番茄高代自交系进行 PCR 检测,随后对 48 份后代材料进行 PCR 检测,试图验证 InDel - P 标记是否可用于番茄果实颜色

分子标记辅助筛选,进而加快番茄果实色泽选育进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料取自青岛农业大学园艺学院番茄育种田,共计 56 份。红果番茄高代自交系 4 份,编号 P1 ~ P4,粉红色番茄高代自交系 4 份,编号 P5 ~ P8。待检测分离后代番茄材料计 48 份,其中编号 1 ~ 24 为粉红色普通番茄,编号 25 ~ 28、45 ~ 48 为红果普通番茄,编号 33 ~ 38 为黄果樱桃番茄,编号 39 ~ 44 为粉红色樱桃番茄。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 鉴定番茄果实颜色相关的 InDel 分子标记的引物参照黄三文等提供的序列<sup>[10]</sup>合成;引物序列见表 2,所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 鉴定所用的特异性引物信息

标记类型	引物	引物序列
InDel	InDel - P_F	5' - AGTGACGAACAACCGACCTA - 3'
	InDel - P_R	5' - CCTCACAAACGCGGACAAA - 3'

1.2.2 番茄样品 DNA 的提取纯化及检测 使用北京天根生物科技有限公司植物 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA,提取方法参照试剂盒说明书。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

1.2.3 PCR 扩增反应 PCR 反应体系:模板 DNA (20 ~ 80 ng/μL) 5.0 μL, 10 × PCR Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, 高纯 dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 引物 F/R (10 μmol/L) 各

收稿日期:2016-09-21  
基金项目:山东省现代农业产业技术体系建设专项(编号:SDAIT-05-02);山东省自然科学基金(编号:ZR2010CM047、ZR2014CQ034);青岛农业大学高层次人才科研基金(编号:663-1115041);山东省良种工程。  
作者简介:王仁汉(1989—),男,山东东明人,硕士,主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究。E-mail:2425262088@qq.com。  
通信作者:王 辉,博士,主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究。E-mail:fromstick@163.com。

for loci affecting litter size and ovulation rate in swine[J]. Journal of Animal Science,2001,79(1):60-67.

[13] Bazan J F. Haemopoietic receptors and helical cytokines[J]. Immunology Today,1990(10):350-354.

[14] Wells J A, de Vos A M. Hematopoietic receptor complexes[J]. Annual Review of Biochemistry,1996,65(1):609-634.

[15] 王立辛,苏玉虹,高继红. 猪 *ESR*、*FSH-β* 和 *PRLR* 基因合并基因型对产仔数的影响[J]. 中国农学通报,2011,27(29):18-22.

[16] Isler B J, Irvin K M, Neal S M, et al. Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine[J]. Journal of Animal Science,2002,80(9):2334-2339.

[17] 吴圣龙. 猪 *FUT1* 和 *SLA-DQB* 基因多态性及抗病育种基础研究[D]. 扬州:扬州大学,2006.

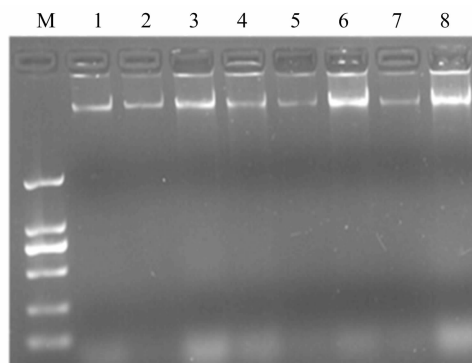
[18] 李盛霖,林长光,朱志明,等. 大白、长白及其杂交母猪 *FSH-β* 基因多态性与繁殖性状的相关分析[J]. 福建农业学报,2006,21(4):330-333.

1.0  $\mu\text{L}$ , easy *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 PCR 扩增产物约 10  $\mu\text{L}$ , 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检查 PCR 扩增结果, 自动凝胶成像系统观察照相, 记录电泳结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 试验样品 DNA 质量检测

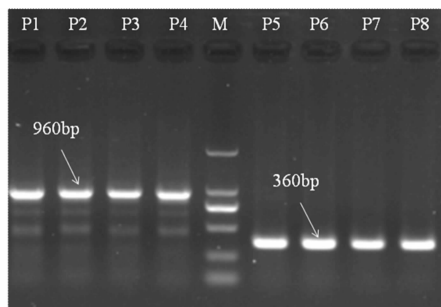
提取的 DNA 电泳条带明亮整齐 (图 1), 符合 PCR 分析要求。紫外分光光度计检测样品浓度  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} < 2.0$ , 取 5.0  $\mu\text{L}$  DNA 母液稀释至约 40 ng/ $\mu\text{L}$  用于 PCR 扩增。



M—DL2000 marker; 1~8—部分番茄材料的基因组 DNA  
图1 番茄基因组 DNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶上的检测结果

### 2.2 与番茄果色性状相关的标记在 8 份已知果色的高代自交系中的验证

利用与番茄果实颜色相关的标记 InDel - P 对 8 份已知果色的番茄高代自交系中的 PCR 扩增结果显示 (图 2), 在 4 份不同来源的红果番茄高代自交系中均可扩增出 960 bp 的特异 DNA 片段, 另外在 750、500 bp 左右还有 2 条较弱的非特异性扩增条带, 而在 4 份不同来源的粉红果番茄高代自交



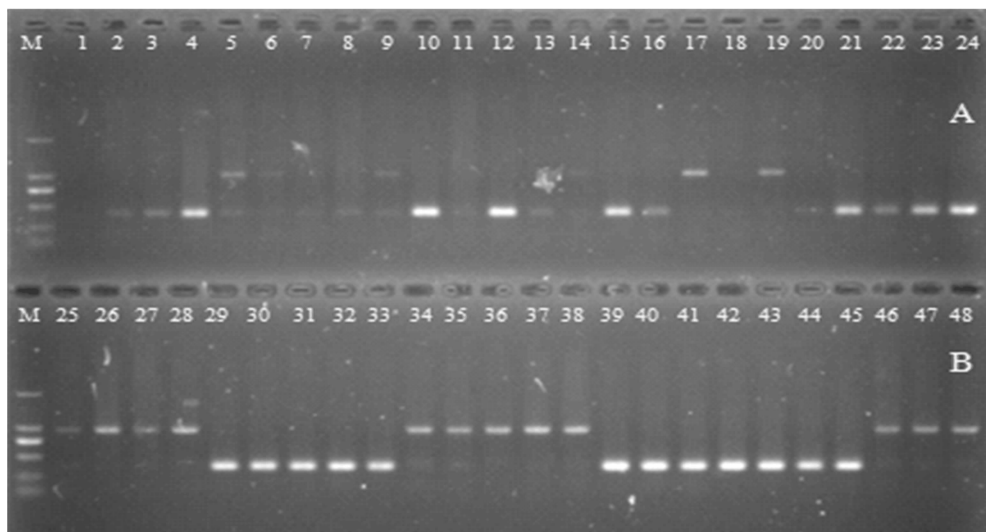
P1~P4—红果番茄; M—Marker DL2000; P5~P8—粉红果番茄

图2 InDel-P 引物在 8 份已知果色番茄高代自交系中的 PCR 扩增产物电泳结果

系中均可扩增出 360 bp 的特征谱带, 可见该标记能很好地用于区分红果番茄和粉红果番茄材料。

### 2.3 与番茄果色性状相关的标记在 48 份番茄分离后代中的应用

为了验证 InDel - P 分子标记与番茄果色基因间的连锁关系, 对 48 份番茄分离后代进行 PCR 验证试验, 结果显示, (图 3) 在 32 份普通番茄中有 2 份未扩增出条带, 有 17 份扩增出 360 bp 的 DNA 特异性条带, 有 9 份扩增出 960 bp 条带, 此外, 有 4 份同时扩增出 2 条条带, 说明控制果色的基因位点处于杂合的状态; 16 份樱桃番茄中有 11 份后代材料扩增出 360 bp 的特征条带, 分子鉴定结果为粉红色; 另外 5 份材料仅扩增出 960 bp 的特征谱带, 分子鉴定结果为红色。针对这 48 份材料的果实颜色进行严格的田间调查统计, 田间调查结果 (表 3) 显示, 30 份普通番茄中有 4 份材料 (编号为 5、6、9、14) 的果实颜色与分子鉴定结果存在出入, 16 份樱桃番茄中有 6 份材料 (编号为 33、34、35、36、37、38) 的果实颜色与分子鉴定结果存在出入。所涉及的普通番茄材料中分子检测的准确率为 86.7%, 樱桃番茄材料中的准确率为 62.5%, 可见该标记可有效地用于普通番茄分子标记辅助选择, 而樱桃番茄的准确率较低。



M—Marker DL2000; 1~48—番茄后代材料编号

图3 与果实颜色相关的 InDel 标记在番茄后代材料中的应用

表 3 供试番茄材料 PCR 检测情况

后代编号	鉴定颜色	田间颜色	后代编号	鉴定颜色	田间颜色	后代编号	鉴定颜色	田间颜色
1	—	粉红	17	红色	红色	33	粉红	黄色
2	粉红	粉红	18	—	粉红	34	红色	黄色
3	粉红	粉红	19	红色	粉红	35	红色	黄色
4	粉红	粉红	20	粉红	粉红	36	红色	黄色
5	红/粉	粉红	21	粉红	粉红	37	红色	黄色
6	红/粉	粉红	22	粉红	粉红	38	红色	黄色
7	粉红	粉红	23	粉红	粉红	39	粉红	粉红
8	粉红	粉红	24	粉红	粉红	40	粉红	粉红
9	红/粉	粉红	25	红果	红果	41	粉红	粉红
10	粉红	粉红	26	红果	红果	42	粉红	粉红
11	粉红	粉红	27	红果	红果	43	粉红	粉红
12	粉红	粉红	28	红果	红果	44	粉红	粉红
13	粉红	粉红	29	粉红	粉红	45	粉红	红色
14	红/粉	粉红	30	粉红	粉红	46	红色	红色
15	粉红	粉红	31	粉红	粉红	47	红色	红色
16	粉红	粉红	32	粉红	粉红	48	红色	红色

3 小结

番茄的颜色取决于果肉与果皮的颜色,受很多基因控制,番茄果皮受  $Y-y$  等位基因控制,果肉红、黄和橙等常见的 3 种颜色由  $R-r$  与  $T-t$  这 2 对等位基因控制, $T-t$  基因对于  $R$  基因起隐性上位作用<sup>[11-12]</sup>。尽管番茄果实颜色受多个遗传位点控制,但是控制番茄果皮颜色的  $Y$  基因是一个转录因子  $SIMYB12$  在调控果实颜色方面具有重要作用<sup>[9]</sup>。黄三文等基于转录因子基因  $SIMYB12$  开发了与番茄果实颜色密切相关的 InDel 标记 InDel-P<sup>[10]</sup>,理论上该标记可以实现番茄果色的分子标记辅助选择。

本研究对番茄果色性状相关的标记 InDel-P 在育种中的应用价值进行了考察,该标记可在普通红果番茄中同时扩增至 960 bp 的 DNA 特异片段,而在普通粉果番茄中仅扩增至 360 bp 的特异片段。对 48 份番茄分离后代进行 PCR 检测和田间鉴定,结果显示,普通番茄分子鉴定与田间鉴定的吻合度为 86.7%,樱桃番茄材料中的准确率为 62.5%,可见该标记可有效地用于普通番茄分子标记辅助筛选,而在樱桃番茄中的利用效率较低。

转录因子  $SIMYB12$  为控制番茄果皮颜色的  $Y$  基因,该基因的表达导致番茄果皮中积累大量类黄酮而成为黄色,最终使得果肉颜色为红色的番茄最终呈现红色,而粉果果皮中该基因不表达,所以果皮中没有类黄酮的积累,从而使红肉果实最终呈现粉色<sup>[9-10]</sup>。由此可以推断,黄果番茄果皮中  $SIMYB12$  应该是表达的,从而 PCR 可扩增至 960 bp 的 DNA 特异片段,这也基本解释了 5 份黄果樱桃番茄(编号为 34~38)分子鉴定表现为红色的结论。

本研究中有 4 份材料分子鉴定结果显示  $SIMYB12$  基因在这 4 份材料中处于杂合状态,而田间鉴定颜色表现为粉红色,这不能用红色对于粉红为显性的遗传规律进行解释;另外,编号为 33 的黄果樱桃番茄果色颜色与分子鉴定颜色之间也无

法合理解释,这些同样反映了番茄果实颜色遗传的复杂性。

参考文献:

[1] 郑小林,张佳佳,励建荣. “凯特” 杧果栽培中果实套袋对其采后品质及贮藏性的影响[J]. 园艺学报,2011,38(4):657-665.

[2] Long M, Millar D J, Kimura Y, et al. Metabolite profiling of carotenoid and phenolic pathways in mutant and transgenic lines of tomato: identification of a high antioxidant fruit line[J]. Phytochemistry, 2006,67(16):1750-1757.

[3] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. Plant Journal, 2008,54(4):733-749.

[4] Jones C M. Evaluation of carotenoids and anthocyanins in high pigment, processing, heirloom and anthocyanin fruit tomatoes[D]. Oregon State: Oregon State University, 2000.

[5] Bramley P M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development[J]. Journal of Experimental Botany, 2002,53(377):2107-2113.

[6] 罗志丹. 番茄果实颜色与质地调控基因  $SISGR1$  和  $nsLTP$  的功能鉴定[D]. 武汉:华中农业大学,2012.

[7] 孟凡娟,王 富. 番茄果实内番茄红素的合成及影响因素[J]. 北方园艺,2001(5):15-17.

[8] Wann E V. Tomato germplasm lines T4065, T4099, T5019, and T5020 with unique genotypes that enhance fruit quality[J]. HortScience, 1997,32(4):747-748.

[9] 陈云云,罗静瑶,赵 惠,等. 番茄果实颜色相关  $MYB$  转录因子的基因表达研究[J]. 广东农业科学,2013,40(18):127-129.

[10] 黄三文,祝光涛,林 涛,等. 与番茄果实颜色性状相关的分子标记及应用:CN104087576A[P]. 2014-10-08.

[11] 余延年,吴定华,陈竹君. 番茄遗传学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1999:36-37.

[12] 林 涛,李锦泉,黄青峰,等. 樱桃番茄果色的遗传分析[J]. 福建农业学报,2013,28(10):987-992.