



公開

不公開

執行機關識別碼：010102FDZ2

# 行政院農業委員會九十二年度科技研究計畫研究報告

資訊庫編號：922058

計畫名稱：**尋找與番茄耐熱性狀基因連鎖的核酸逢機增殖多型性標誌 (II)**

計畫編號：92農科-1.1.2-糧-Z2(13)

執行期限：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：林冠宏

研究人員：陳惠美

執行機關：私立中國文化大學

合作機關：亞洲蔬菜研究發展中心

## 尋找與番茄耐熱性狀基因連鎖的核酸逢機增殖多型性標記(II)

林冠宏 郭忠吉 陳惠美

中國文化大學園藝系 亞洲蔬菜研究與發展中心

**中文摘要:** 本計畫利用 random amplified polymorphic DNA (RAPD)技術來尋找與番茄耐熱數量性狀基因連鎖之分子標記，以做為篩選耐熱、高品質番茄之指標。實驗材料為 45 個 F7 重組自交系，其親本為 L4422 與 CL5915。以 200 個 OPERON 引子進行 2 親本以及 43 個 F7 重組自交系之 RAPD 分析，利用混合分離族群分析法，將高開花數、低開花數，高結果數、低結果數，高結果率、低結果率、高果重、低果重以及高產量、低產量之 DNA 混合後，篩選各引子之多型性條帶，結果發現其中 14 個 primers 產生明顯之 RAPD polymorphisms。此 14 個 primer 共可產生 88 個 DNA 條帶，其中 23 個條帶具多型性；平均每一引子產生 6.3 個條帶，有 1.6 個條帶具多型性。結合性狀調查數據與 RAPD 電泳資料，進行基因連鎖圖譜分析和數量性狀基因座之定位。

**關鍵詞:** 核酸逢機增殖多型性標誌 random amplified polymorphic DNA marker、耐熱性狀 heat tolerance trait、數量性狀 quantitative trait loci、標誌輔助選育 marker-assisted selection、分子育種 molecular breeding、番茄 tomato

**英文摘要:** Heat tolerance in tomato is a quantitatively inherited trait and affected by environmental conditions. A total of 43 F7 recombinant inbred tomato lines (derived from a heat tolerant line CL 5915 crossed with a heat sensitive line L4422) were grown in the greenhouse at PCCU in the summer of 2002. Four heat tolerance-related traits were scored in the study: flower number, fruit number, fruit set, fruit yield and fruit weight. RAPD analysis was used to identify any primers associated with the flower number, fruit number and fruit weight by bulking DNAs of skewed lines. A total of 200 random primers were screened. Only 14 RAPD products generated by OPERON primer with DNA template from L4422, CL5955 and F7 RILs were found polymorphism between high and low fruit number, flower rate and yield. Among them, 23 bands are informative and will be used for  $\chi^2$  test. Combination of the mentioned 5 traits and the informative markers, we should be able to identify and locate the RAPD markers linked to the QTL of trait using Mapmaker softwares.

### 前 言

番茄在高溫逆境下許多生理及生化的機制受阻而使得產量降低。一般而言，番茄在高溫下，花粉粒的數目與活性，花粉管的發芽率，柱頭突出(影響柱頭授粉率)，胚珠的發展及授精率，種子的形成，開花數，果實大小，果實品質，果實著色率，果實軟化程度等物理、生理、生化的作用都會受到影響。另外，因高溫而產生的熱休克蛋白(heat shock protein)，乙烯，荷爾蒙，酵素，代謝物，毒性物或細胞膜的改變等也會對植物造成傷害(Kuo, *et al.* 1986; Fu, *et al.* 1998; 曾及李 1988)。當然，植物受高溫的影響及傷害與其品種、生長時期、年齡、反應的器官、外在溫度高低、高溫逆境期長短也都有關係 (Vierlin 1990)。Rick (1976 and 1988) 及陳氏(1998)對野生種番茄抗逆境之生態、生理、遺傳資源與變異及育種的利用有非常詳細的報

告。另外，陳氏(1995)也對番茄在高溫多濕環境下的栽培與管理有非常完整的描述，番茄在台灣夏季的產期是從5月至9月中南部為主，一般而言，在30°C以上開花與結果不良(耐熱品種除外)，而日溫高於32°C則茄紅素(lycopene)形成受阻而影響果實著色。而光照需有至少35000lux以上的強度及長達12~14小時方能正常開花與結果。

番茄在高溫下是否能正常結果乃由許多複雜的數量遺傳因子所控制，亞洲蔬菜研究發展中心(亞蔬)在1994 & 1997的年度報告指出番茄的結果率(fruit setting)及果重(fruit weight)等與產量有關的一些耐熱性狀是一個polygene的性狀。利用傳統雜交與回交的育種方法，亞蔬現已育成一些耐熱的品種，如CL 5915-153耐熱小果，CL 5915-206耐熱大果，亞蔬六號及櫻桃番茄等。因此本研究計劃是要利用RAPD的技術來找出與番茄耐熱數量性狀基因連鎖的一些分子標記當成篩選指標，配合傳統回交育種的方法(QTL marker-assisted selection)(Tanksley et al. 1996)來快速、有效且正確地選育出耐熱性高且高品質的番茄品種。這對於熱帶、亞熱帶地區或其他因特殊經濟或環境所需求的地區都可以提供一些不同遺傳變異的耐熱番茄品種。

### 試驗材料與方法

在91年夏季5月到9月，於中國文化大學園藝系簡易網室(四週覆蓋透明塑膠布)種了亞蔬在1997年夏季及冬季所選育出的45個F7重組自交系(recombinant inbred line, CLN1639 F7, 其親本為耐熱的番茄野生種CL5915-93，母系及不耐熱的野生種L4422, *L. pimpinellifolium* Mill, 父系)，每個品系種6顆種子於穴盤中(同時也種兩個親本CL5915-93及L4422)，約3週後再將小苗定植至8吋的塑膠盆中，介質為泥炭土：砂：土壤=2：2：1。定植後，每隔2~3天澆一次水，定期施肥，並噴灑藥劑避免病蟲害發生。植株生長至40~50公分時，開始作整枝、立支柱等栽培管理的工作。

本實驗之設計為CRD，每一個品系作3重複，在盆栽後約2到4個月則陸續開始作45個品系(含兩親本及F7 RIL)共135株之5個與耐熱性狀有關的調查。

- (1) 結果率: 即總共果實數除以總開花數之值。單株總開花數乃是去計數從第2到第6花序的所有開花數目。
- (2) 平均單果重: 總共果實的重量除以果實的數目。
- (3) 平均產量: 單株之平均總果實重。
- (4) 單株總開花數: 第2~6花序之開花數目。
- (5) 單株總果實數: 乃是去計數從第2到第6花序的所有成熟(紅熟期)的果實數目, 只要果實的半徑大於1cm均數之。

萃取各番茄品系之葉片DNA，依據以上性狀調查資料，依混合分離族群分析法(Bulked Segregant Analysis)之原理，選擇具偏性的品系，將其分為兩群：開花數多/開花數少、結果數多/結果數少、結果率高/結果率低、果實重/果實輕、產量多/產量少。將屬於同一群之6~8個品系之DNA混合進行RAPD分析。

將不同外表型之番茄DNA pool利用單一隨機引子(Primer)以random amplified polymorphic DNA之技術進行PCR擴增反應，分析PCR產物經電泳後所觀察到之多型性，辨識出與耐熱性狀相關的primers當作RAPD marker，並結合番茄外表性狀(phenotype)例如果重、開花數等調查資料與RAPD之分析結果(genotype)，以Mapmaker建立一個由RAPD marker構築成之基因連鎖圖譜。之後再分析Mapmaker/QTL資訊，由此找出與耐熱性狀基因(QTL)連鎖之RAPD marker。

## 結果與討論

Primer 用美國 OPERON 公司所合成的隨機序列為核酸引子(random primer) 來進行 PCR (polymerase chain reaction), 之後將 PCR 產物跑 1.5% agarose 膠並放在 gel document 之 UV 燈下拍照記錄結果, 再去 score (screen)這些 RAPD polymorphism 的 data。本試驗之目標為進行 200 個 primer 之 RAPD 分析, 並從中挑出與高開花數、高結果數、及高果重有關的引子, 而這些與耐熱性狀有關的引子, 將是日後要育出耐熱性高且品質高的番茄品種之指標。目前已完成共 200 個 primer 對番茄兩親本(L4422、CL5915-93)及 43 個 F7 品系之 RAPD 分析, 其中共有 14 個 primer 可辨識出多型性, 分別為 C09、D06、D08、D11、D12、K02、K06、K08、K14、K20、X01、P06、P08、S13。此 14 個 primer 序列之 GC 含量百分比多在 60%~70%之間, 平均為 63.6%。進行 RAPD PCR 時, 一共可擴增 88 個 DNA 條帶, 其中 23 個條帶具多型性; 平均每一引子產生 6.3 個條帶, 有 1.6 個條帶具多型性。(見表 1)。再使用個別的引子與所栽植之兩親本及 43 個 F7 重組自交系進行 RAPD 之 genotyping, 由電泳結果判讀出具有明顯多型性之條帶(如圖 1 之 1.2 kb 或 0.8 kb 處), 將各品系之多型性的有/無轉換為 1/0 的資訊並作 Goodness-of-fit 之  $\chi^2$  檢定, 期了解是否符合孟德爾定律 1:1 之分離比, 以判斷該多型性的條帶是否可作為有效之分子標誌。最後結合性狀調查數據與 RAPD 電泳資料, 進行基因連鎖圖譜分析和數量性狀基因座之定位。而目前我們正在進行 Mapmaker 等軟體資料的輸入與分析。

表 1. 番茄之 14 個篩選出之 RAPD 隨機引子分析條帶表

Primer	Sequence	%GC	Amplified band	Polymorphic bands
C09	CTCACCGTCC	60	6	2
D06	ACCTGAACGG	60	5	2
D08	GTGTGCCCCA	70	8	1
D11	AGCGCCATTG	60	2	2
D12	CACCGTATCC	60	4	1
K02	GTCTCCGCAA	60	7	2
K06	CACCTTTCCC	60	9	2
K08	GAACACTGGG	60	6	1
K14	CCCGCTACAC	70	6	1
K20	GTGTCGCGAG	70	6	1
X01	CTCACCGTCC	70	7	2
P06	GTGGGCTGAC	70	7	1
P08	ACATCGCCCA	60	7	3
S13	GTCGTTCTG	60	8	2
Total		63.6	88	23
Average			6.3	1.6

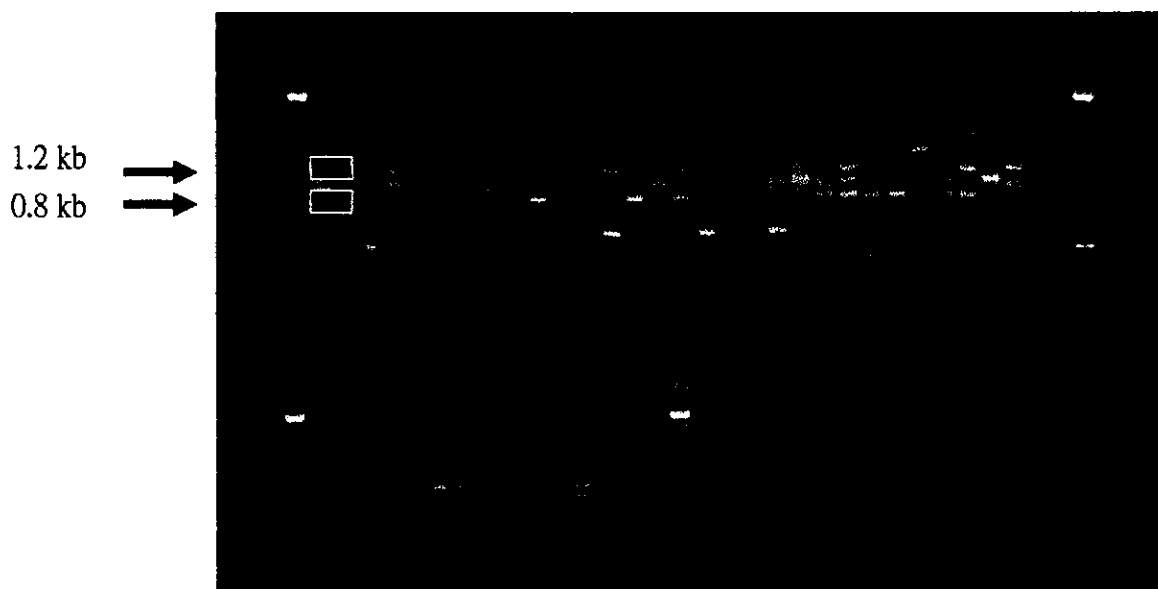


圖1.以Operon引子P08對兩親本L4422，CL5915及43個F7重組自交系進行 RAPD之Genotyping data。在0.8kb及1.2 kb處有多型性產生。

#### 參考文獻

- 陳正次 (1995) 番茄. 台灣農業要覽(2). P 437-636
- 陳正次 (1998) 番茄育種. 蔬菜育種技術研習會專刊. 台灣農試所特刊第73號, p 231-284.
- 曾夢蛟, 李本湘 (1988) 高溫逆境與作物品種改良. 蔬菜品種改良研究會專輯. P 185-194.
- AVRDC Report (1997) AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- AVRDC Report (1994) AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- Fu P, RW Wilen, AJ Robertson, RT Taylor, LV Gusta (1998) Heat tolerance of cold acclimated Puma winter rye seedling and the effect of a heat shock on freezing tolerance. *Plant Cell Physiol.* 39: 942-949.
- Fulton TM, J Chunwangse, SD Tanksley (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 207-209.
- Hashizume T, I Shimamoto, and M Hirai (2003) Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon. *Theor. Appl. Genet.* 106:779-785.
- Kuo CG, HM Chen, HC Chen (1986) Plant hormones in tomato fruit-set and develop at high temperatures. *FFTC Book Ser. No. 34:* pp.53-70.
- Link V, AK Sinha, P Vashista, MGHofmann, RK Proels, R Ehness, and T Roitsch (2002) A heat-activated MAP kinase in tomato: a possible regulator of the heat stress response. *FEBS Letters* 531(2): 179-183
- Lohar DP, WE Peat (1998) Floral characteristics of heat-tolerance and heat-sensitive tomato cultivars at high tempature. *Sci Hort* 73: 53-60.

- Low D, K Brandle, L Nover, and C Forreiter** (2000) Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta* 211: 575-582.
- Paran I, Goldman I, Zamir D** (1997) QTL analysis of morphological traits in a tomato recombinant inbred line population. *Genome* 40:242-248.
- Pressman E, MM Peet, and DM Pharr** (2002) The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann. Bot.(Lond.)* 90: 631-636.
- Rick CM** (1976) Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. *Genet Agrar* 30: 249-259.
- Rick CM** (1988) Tomato-like nightshades: Affinities, autoecology and breeder's opportunities. *Econ Bot* 42: 145-154.
- Rivero RM, JM Ruiz, PC García, LR López-Lefebvre, E Sánchez, and L Romero** (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160(2): 315-321
- Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J, Beck-Bunn T** (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92:213-224.
- Virlin E** (1990) Heat shock protein function and expression in plants. In R Alscher, J Cumming, eds. *Stress response in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Wiley-Liss, New York, pp 357-375.
- Zhang HB, MA Budiman and RA Wing** (2000) Genetic mapping of jointless-2 to tomato chromosome 12 using RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1183-1189.