

番茄 *ss* 基因的连锁分析及其种子发芽特性

李君明 周永健 徐和金 杨宝军

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 证明控制番茄种皮表现为海绵状的基因 *ss* 符合孟德尔遗传规律, 并与幼苗绿茎基因 *ah* 连锁, 位于第 9 条染色体上, 使种皮表现为灰白色。来自 95148 × 红 100 的 F_2 代分离群体的种子, 含有 *ah* 基因的无花青素单株个体较有花青素个体普遍表现为前期 (39 或 51 h) 发芽率较高, 而第 10 天的平均总发芽率却呈现下降趋势; 不同单株个体间差异较大, 总发芽率变化幅度为 54 % ~ 100 %, 表明虽然 *ah* 基因可促进番茄种子的前期发芽, 但还受种子基因型, 尤其是胚或胚乳基因型的影响。番茄种子种皮褐色色素的积累和 *ah*、*aw*、*aa* 等基因无关。种皮颜色和茸毛等性状可以作为明显的形态标记, 直接用于后代个体的选择。

关键词: 番茄; *ss* 基因; 连锁分析; 发芽

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 01-0034-05

普通番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 大多数品种种皮表面着生长茸毛, 种皮灰褐色。Soressi 发现有些突变体 (LA2016) 种子的表面为海绵状, 种皮光滑, 他将控制该性状的基因命名为 *ss* (Spongy seed), 并且对其形成作了初步解释^[1]。作者在育种中发现, 凡携带 *ah* (anthocyaninless, Hoffman) 基因、茎绿色的后代品系种子的种皮均表现为海绵状, 因此 *ss* 基因很有可能和 *ah* 基因连锁。另外, 具 *ah* 的基因型种皮颜色表现为特殊的灰白色。目前对于 *ss* 基因的遗传及其在染色体的位点尚不清楚。我们试通过本研究, 进一步明确该基因的遗传机制, 并通过对其连锁分析初步进行染色体定位, 同时也对番茄种皮颜色和控制植株体无花青素 *aa* (anthocyanin absent)、*ah*、*aw* (Without anthocyanin) 等基因的关系进行探讨。另外, Atanasova 等还发现, 凡携带 *ah* 基因的品系在正常条件和盐胁迫条件下达到 50 % 发芽率所需时间较短^[2,3], 我们也试对 *ah* 基因与番茄种子发芽的关系作初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料 CL1069-0-5-4 番茄是从亚洲蔬菜研究中心 (AVRDC) 引入的含有 *ah* 基因的材料。作者以从 ‘CL1069-0-5-4 × 8746’ 杂交后代中经多年选育获得的携带 *ah* 基因、前期发芽率及总发芽率相对较低 (经 4 年连续测定, 可稳定遗传)、种皮表面灰白色且覆盖海绵状短茸毛的有限生长类型番茄 95148 品系为母本, 以种子前期发芽率及总发芽率相对较高、种皮表面灰褐色且覆生长茸毛的有限生长类型番茄 红 100 品系为父本, 亲本单株连续自交留种后, 1999 年配制组合 (正反交), 秋季加代及回交, 2000 年获得所需亲本、 F_1 (正交: 95148 × 红 100 和反交: 红 100 × 95148)、 F_2 (来自正交后代)、 BC_1 [(95148 × 红 100) × 红 100]、 BC_2 [(95148 × 红 100) × 95148], 其中 F_1 当代和 F_1 上收获的种子为 10 株混采, BC_1 和 BC_2 为当代种子 10 株混采, 50 个 BC_1 和 50 个 BC_2 及 192 个 F_2 分离后代单株的种子分采。为了检测其它控制绿茎的基因与本文所分析种皮性状是否有关, 又从法国农科院 (INRA) 获得了携带 *aa* 基因的 Mog é r 品系, 从美国加州大学 Tomato Genetic Resource Center 获得了携带 *aw* 基因的 3-603、3-121 品系。在正常条件下, 携带 *ah*、*aw* 和 *aa* 基因的纯合品系均表现为幼苗绿茎, 生长期植株完全没有花青素, 而红 100 品系幼苗则表现为紫茎, 整个生长期植株含有花青素。

1.2 种子的获得 于果实完全红熟时及时采收种子, 并检测种子是否在种果内发芽。为了避免盐酸处理等外界条件对种皮性状的影响, 采用常规发酵, 并及时用清水冲洗。收集完全发育好的未发芽种

收稿日期: 2002 - 01 - 11; 修回日期: 2002 - 09 - 09

子晾干, 贮藏在密封的塑料袋中备用。

1.3 性状观察 对上述双亲、 F_1 、 BC_1 和 BC_2 分离后代的各 50 个单株及 F_2 分离后代的 192 个单株上收获的种子, 每一试材随机取样 100 粒在体视镜下分别进行观察, 部分种子脱毛后进行种皮颜色观察, 根据种皮颜色和种毛类型, 进行分类与统计, 对所获得的数据进行 χ^2 测验。

1.4 种子发芽及 *ah* 基因型的判断 种子发芽参照 Atanassova 等方法^[2]。各材料取种子 100 粒, 设 3 次重复。种子置于垫有直径 9 cm 滤纸的培养皿中, 倒入 8 mL 蒸馏水, 加盖放置在 26 的恒温培养箱中发芽。15 h 后统计种子发芽数, 以后每隔 12 h 统计 1 次, 直至第 10 天为止。发芽种子播种于苗盘, 出苗后观察幼苗茎色, 判断 F_2 代及 BC 代不同单株个体茎色的基因型。

1.5 数据处理 百分数首先进行反正弦函数转换处理后再按常法分析。采用刘来福等^[4]编制的计算机软件 (QTGN) 进行方差分析。相关分析采用美国 SAS 研究所编制的统计分析软件。

2 结果与分析

2.1 绿茎 95148 和普通番茄种皮茸毛及颜色比较

如图 1 所示, 不同番茄品种种皮上的茸毛有很大差别, 红 100 品系为长茸毛类型, 茸毛长而密, 呈直立状银白色; 而绿茎 95148 品系茸毛极短, 为海绵状类型。长茸毛类型的种子粒较易粘连, 而海绵类型的种子表皮光滑, 种子呈分散状。红 100 品系种皮颜色为灰褐色, 色泽较深; 95148 品系为灰白色, 色泽较灰, 尤其机械脱毛后更易识别。

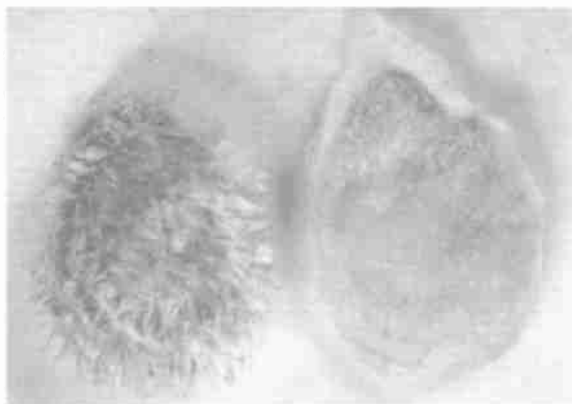


图 1 番茄种皮茸毛的两种不同类型

左: 红 100; 右: 95148

Fig. 1 Two types of tomato seedcoat with hair

Left: Hong 100; right: 95148

2.2 不同类型绿茎突变体种皮性状的比较

虽然含有 *ah*、*aw* 和 *aa* 基因的幼苗均表现绿茎, 但它们分别位于不同的染色体或不同座位上, 其中 *ah* 基因位于第 9 染色体 (座位 9L-24), *aw* 位于第 2 染色体 (座位 2L-59), *aa* 基因位于第 2 染色体 (座位 2L-50)。从表 1 可看出, 它们的种皮的有关性状表现截然不同, 含 *aa* 基因的 *Mogór* 及含 *aw* 基因的 3-603、3-121 等和红 100, 均表现为种皮灰褐色、覆盖长茸毛, 只含有 *ah* 基因的 95148 品系却表现为种皮灰白色, 覆盖海绵状短茸毛。由于上述基因分别位于不同的染色体或座位上, 而且无相关连锁报道, 因此可以推断出番茄种皮性状的形成和色素的积累与 *ah*、*aw*、*aa* 基因并不相关。

2.3 番茄种子种皮性状的连锁分析

2.3.1 P_1 、 P_2 、 F_1 、 F_2 的遗传表现 表 1 表明, 亲本 95148 为种皮灰白色、覆盖海绵状短茸毛类型, 红 100 为种皮灰褐色、覆盖长茸毛类型; F_1 全部表现长茸毛类型, 而在 F_2 代 192 个单株中表现出两种类型, 其中 142 个单株种子为种皮灰褐色、覆盖长茸毛类型, 50 个单株种子为灰白色、海绵状类型, 比值为 2.84 : 1。根据孟德尔一对相对性状遗传理论的分离比例 (3 : 1), 进行 χ^2 测验, χ^2 值为 0.1, 概率 *P* 为 0.75, 表明番茄种皮颜色和茸毛的形成, 均受一对等位基因控制, 控制种子种毛为长茸毛和种皮为灰褐色的基因 *SS* 为显性, 而控制海绵状和灰白色 *ss* 基因为隐性。

2.3.2 回交后代个体的遗传表现 利用亲本 95148、红 100 和正交种分别回交, 获得回交后代并分别种植 50 个单株。结果表明, 与红 100 回交的 50 个单株的种子均表现为种皮灰褐色、覆盖长茸毛类型; 而与 95148 回交的 50 个单株, 表现出种皮灰褐色、覆盖长茸毛和种皮灰白色、覆盖海绵状短茸毛两种不同类型, 其比例为 1.08 : 1, χ^2 测验结果证明符合 1 : 1 的孟德尔遗传分离比例。因此, 进一步证明番茄种皮的颜色和覆盖茸毛类型性状是受单基因控制。

2.3.3 连锁测定 从表 2 还可以看出, BC_1 50 个单株种皮全部表现为种皮灰褐色、覆盖长茸毛类型,

而且茎紫色; BC₂ 50 个单株中凡幼苗为绿茎的后代均表现为种皮灰白色、覆盖海绵状短茸毛类型, 紫茎单株的均为种皮灰褐色、长茸毛类型, 概率值大于 $P = 0.05$ 的评显标准, 说明控制番茄种子种毛为海绵状短茸毛的 *ss* 基因和种皮灰白色 *ah* 基因呈现明显连锁共分离。另外, 在 192 个 F₂ 代分离群体中, 没有新类型种皮性状个体出现, 说明 *ss* 基因和 *ah* 基因没有发生重组, 二基因连锁较为紧密。另外, 目前已知 *ah* 基因位于番茄第九条染色体上, 据此推论 *ss* 基因也应位于第九条染色体上。

表 1 番茄含 *ah* 基因的亲本及其后代和含 *aa*、*aw* 基因种子的茸毛、种皮颜色及幼苗茎色

Table 1 The stem color during seedling stage, seedcoat hair type and color in parents with *ah* gene and their progenies, and genotypes with *aa*, *aw* genes in tomato

亲本及后代 Parents and progenies	植株总数 Total number of plants	茸毛类型	Hair type	种皮 Seedcoat		幼苗茎色 Stem color in seedling
		长茸毛 Long hair	海绵状 Spongy	灰褐 Gray brown	灰白 Gray white	
95148 (<i>ah/ ah</i>)	10	0	10	0	10	绿 Green
红 100 (+ / +)	10	10	0	10	0	紫 Purple
95148 × 红 100 (F ₁)	10	10	0	10	0	紫 Purple
F ₂	192	142	50	142	50	紫 绿 Purple Green
BC ₁	50	50	0	50	0	紫 Purple
BC ₂	50	26	24	26	24	紫 绿 Purple Green
Mog 6r (<i>aa/ aa</i>)	10	10	0	10	0	绿 Green
3-603 和 3-121 (<i>aw/ aw</i>)	10	10	0	10	0	绿 Green

表 2 番茄不同后代材料种皮颜色、覆盖茸毛类型、茎色类型及其共分离

Table 2 The types of seedcoat color, seedcoat hair, stem color, and their cosegregation in progenies in tomato

亲本及后代 Parents and their progenies	总个体数 Total number of plants	长茸毛、 灰褐、紫茎	长茸毛、 灰褐、绿茎	海绵状、 灰白、紫茎	海绵状、 灰白、绿茎	长茸毛、灰褐、紫茎 海绵状、灰白、绿茎
		Long hair, gray brown seed and purple stem	Long hair, gray brown seed and green stem	Spongy, gray white seed and purple stem	Spongy, gray white seed and green stem	Long hair, gray brown seed and purple stem Spongy, gray white seed and green stem
95148	10	0	0	0	10	0 10
红 100	10	10	0	0		10 0
F ₂	192	142	0	0	50	142 50
BC ₁	50	50	0	0	0	50 0
BC ₂	50	26	0	0	24	26 24

2.4 番茄不同世代材料种子的发芽率

2.4.1 亲本、正反交及回交一代种子的发芽情况 由表 3 可知, 双亲及不同世代的种子发芽率差别较大。亲本 95148 在 39 和 51 h 发芽率分别为 12.8 % 和 29.0 %, 第 10 天的总发芽率为 79.27 %; 而红 100 却前期发芽较快, 39 和 51 h 后分别达 24.1 % 和 82.4 %, 总发芽率达 100 %。95148 × 红 100 的 F₁ 代, 前期发芽率较双亲均明显提高, 39 h 达 75.2 %, 总发芽率 97.7 %, 而反交的 F₁ 代却出现显著差异, 前期发芽率均不及双亲, 39 h 明显低于双亲, 但总发芽率与正交的并无明显差异。F₁ 和 95148 回交所获 BC₁ 代种子, 前期发芽率最低, 在 39 和 51 h 仅分别为 0.3 % 和 7.7 %, 总发芽率 82.6 %, 也明显低于 F₁ (97.7 %), F₁ 和红 100 回交所获 BC₂ 代种子, 前期发芽率较 BC₁ 有明显的提高, 分别为 4.7 % 和 38.0 %, 总发芽率却和 F₁ 表现相近 (97.3 %)。说明回交亲本对后代种子的发芽力影响较大。

2.4.2 F₂ 代分离群体的发芽率 95148 × 红 100 正交 192 个 F₂ 代单株, 个体间前期及总发芽率均差异极大, 出现明显的分离。39 h 不同单株种子发芽率的变化幅度为 0 ~ 79.7 %, 总发芽率的变化幅度为 54 % ~ 100 %。由表 4 可以看出, 绿茎纯合基因型 (*ahah*) 的后代群体种子在 39 h 和 51 h 的平均发芽率, 均极显著高于紫茎杂合基因型 (+ / *ah*) 和紫茎纯合基因型 (+ / +) 的后代群体。50 份携带

纯合 *ah* 基因的单株组成的绿茎群体，在 39 和 51 h 种子发芽率的变异系数也均较其它两个群体显著低，说明个体间差异相对较小，前期发芽率普遍较高；而 142 份紫茎单株中，包括 92 份紫茎杂合基因型（*ah*/+）单株及 50 份紫茎纯合基因型（+/+）单株的种子，51 h 前发芽率却表现较低，尤以 39 h 最为明显，而且变异系数也最大，说明个体间差异较大。还可以看出，含 *ah* 基因的绿茎群体平均总发芽率呈现下降趋势。

表 3 番茄 95148 (*ah/ah*) 和红 100 (+/+) 及其不同后代种子的发芽率

Table 3 The germination rate of 95148 (*ah/ah*), Hong100 (+/+), and their different progenies (%)

亲本及后代	时间 Time (h)												
Parents and Progenies	15	27	39	51	63	75	87	99	111	135	183	219	240
95148	0.7	0.7	12.8	29.0	44.1	52.4	59.3	62.8	68.6	73.8	81.0	81.4	81.7
红 100	0.0	0.0	24.1	82.4	91.5	93.5	95.8	96.4	98.7	9.7	99.7	99.7	100
95148 × 红 100	5.3	6.6	75.2	94.4	95.0	95.4	96.0	96.7	97.3	97.7	97.7	97.7	97.7
红 100 × 95148	0.0	0.0	3.3	20.0	46.3	62.0	80.3	86.3	90.0	93.0	94.3	95.0	96.0
BC ₁	0.0	0.0	0.3	7.7	19.1	30.4	45.1	55.2	63.5	72.6	79.6	81.6	82.6
BC ₂	0.0	0.0	4.7	38.0	77.7	84.3	92.3	95.0	95.7	95.7	95.7	97.0	97.3

表 4 番茄 F₂ 分离群体不同茎色后代单株种子的平均发芽率变化

Table 4 The average germination rate, standard deviation and coefficient of variation of individuals with different stem color derived from F₂ segregated population (%)

茎 色 Stem color	39 h			51 h			10 d		
	平均发芽率 Average germination rate	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation	平均发芽率 Average germination rate	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation	平均发芽率 Average germination rate	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation
绿茎纯合基因型群体 * Genotypes with homozygous <i>ah</i> gene (<i>ahah</i>) *	28.55 **	14.68	51.42	53.73 **	12.39	23.06	83.2	9.63	11.57
紫茎杂合基因型群体 * Genotypes with heterozygous <i>ah</i> gene (+/ <i>ah</i>) *	3.82	5.22	136.65	37.55	16.84	44.85	85.6	8.86	10.35
紫茎纯合基因型群体 * Genotypes with homozygous anthocyanin gene (+/+) *	3.54	4.26	120.34	37.65	20.95	55.64	87.5	11.57	13.22

注：* 192 个 F₂ 分离单株中有各自基因型的群体。 ** 0.01 显著水平。

Note: * The individuals with different stem color derived from 192 F₂ segregated population. ** Means the significant difference at 0.01 level.

3 结论与讨论

控制番茄绿茎的突变基因有 *a*、*aa*、*aw*、*al*、*ah* 等十几种，它们在纯合状态时，幼苗均表现明显的绿茎而被用于种子纯度的快速鉴定^[5]，其中 *ah* 基因又和 *Tm₂^a* 基因紧密连锁^[5,6]，可作为苗期筛选抗番茄花叶病毒病 (ToMV) 的形态标记。最近，Atanasovaa 等证明，凡携带 *ah* 基因的品系在正常或盐胁迫条件下，种子发芽率达到 50 % 所需时间较短^[2,3]，本试验也证实了上述结论。本试验还初步证明了种皮灰白色且覆盖海绵状短茸毛的性状与 *ah* 基因紧密连锁，因此在后代分离群体中可通过种皮特性直接进行早期选择，提高育种工作效率。

本文只是对番茄种皮的颜色和种毛类型的性状做初步遗传分析，控制番茄种皮上的长茸毛性状，除有主效基因 *ss* 外，可能还有其它修饰基因或调控基因起着一定的作用。而本项研究证明 *ss* 基因和 *ah* 紧密连锁，故 *ss* 可能同样位于 *ah* 所在的第九条染色体上^[1,7~9]。

95148 品系的种子经 4 年连续测定，总发芽率（分别为 76.8 %，74.3 %，78.9 %，79.3 %）受环境影响较小而且可稳定遗传，来自 95148 × 红 100 的 F₂ 代分离群体中的不同单株个体间、双亲正反交及回交当代，种子的总发芽率差异较大，这些结论均说明番茄种子的总发芽率主要是由胚、胚乳等的不同基因型决定^[10~13]。本文虽然得出了种皮性状和茎色连锁、茎色又和种子发芽率相关，但种皮、茎色及发芽率三者间的关系并不完全一致。另外，目前已经发现大豆及芥蓝种子种皮的颜色和植株体花青素有关^[14,15]，但本试验明确了番茄种子种皮褐色色素的积累和控制植株体为无花青素的

aa、*ah*、*aw* 等基因并不相关。当然种皮色素的组成、形成及与种子发芽是否相关还有待于进一步明确。花青素影响玉米种子的发育已有报道^[16]。我们在研究中也发现, 携带 *ah* 基因的 95148 品系, 果实中未发育完全的种子较多, 而完全发育的种子不正常苗率较高。因此, 花青素对番茄种子的形成、发育等是否有影响, 也需要进一步明确。

参考文献:

- Soressi G P. Spongy seed (*ss*), a new plant character which modifies the seed hair appearance. Rep. Tomato Genet. Coop., 1967, 17: 49 ~ 50
- Atanassova B, Shtereva L, Mölle E. Effect of three anthocyaninless genes on germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II. Seed germination under stress conditions. Euphytica., 1997, 97 (1): 31 ~ 38
- Atanassova B, Shtereva L, Mölle E. Effect of three anthocyaninless genes on germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II. Seed germination under optimal conditions. Euphytica., 1997, 95 (1): 89 ~ 98
- 刘来福, 毛盛贤, 黄远樟. 作物数量遗传学. 北京: 农业出版社, 1984. 341 ~ 442
- Danailov Z V. An indeterminate hybrid variety of tomato. Rasteniev " dni-Nauki., 1997, 34 (1): 47 ~ 49
- Providenti R, Robinson R, Schroeder W. Order of *ah*, *nv*, *Tnr2* on chromosome 9. Rep. Tomato Genet. Coop., 1965, 15: 56
- 余延年, 吴定华, 陈竹君. 番茄遗传学. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1999. 5
- Atherton J G, Rudich J. 番茄. 郑光华, 沈征言 译. 北京: 北京农业大学出版社, 1988. 11
- Tanksley S D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics., 1992, 132: 1141 ~ 1160
- Groot S P C, Karssen C M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. Planta., 1987, 171: 525 ~ 531
- Foolad M R, Lin G Y. Genetic analysis of low-temperature tolerance during germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant breeding, 1998, 117: 171 ~ 176
- Foolad M R, Chen F Q, Lin G Y. RFLP mapping of QTLs conferring cold tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. Molecular breeding, 1998, 4: 519 ~ 529
- Foolad M R, Chen F Q, Lin G Y. RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during germination in an interspecific cross of tomato. Theor. Appl. Genet., 1998, 97: 1133 ~ 1144
- Jung C S. Variation of anthocyanin content in color-soybean collections. Korean Journal of Crop Science, 1996, 41 (3): 302 ~ 307
- Tanaka A, Tano S, Chantes T, et al. A new Arabidopsis mutant induced by ion beams affects flavonoid synthesis with spotted pigmentation in testa. Genes and Genetic Systems, 1997, 72: 3, 141 ~ 148
- Procissi A. Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds. Plant Cell, 1997, 9 (9): 1547 ~ 1557

The Linkage Analysis of *ss* Gene and Its Effect on Seed Germination in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Li Junming, Zhou Yongjian, Xu Hejin, and Yang Baojun

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The genetic mechanism of *ss* gene controlling expression of spongy seedcoat was proved to fit Mendelian fashion in this paper. It was linked with *ah*, which showed obvious anthocyaninless (*Hoffman*) during seedling stage and located on chromosome 9. Its seedcoat also showed the typical gray white color. The anthocyaninless individuals derived from progeny of the F_2 crossing between 95148 as female parent and Hong 100 as male parent showed higher germinating rate respectively in 39 and 51 hours compared to these individuals with anthocyanin. But the great difference existed among these anthocyaninless individuals which also gave the tendency with low total germinating rate in 10 days. The germinating rate in 10 days in F_2 population varied from 54 % to 100 %. The results showed that *ah* gene could improve the prophase seed germinating but it still depended on the seed genotype, especially that of the embryo or endosperm. Further, the accumulation of brown pigment in seedcoat was not related with *ah*, *aw* and *aa* genes. The described characterization of seedcoat in this paper could be directly used to select the progenies as a visual morphological marker.

Key words: Tomato; *ss* gene; Linkage analysis; Germination