

# 利用高代回交群体定位醋栗番茄发芽期与幼苗期耐冷 QTL

刘冰, 杜永臣\*, 王孝宣, 国艳梅, 高建昌, 朱德蔚, 戴善书

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 以醋栗番茄 LA722 和普通番茄 9706 为材料, 利用发芽期大规模低温胁迫筛选方法和 AB-QTL 方法对野生醋栗番茄发芽期和幼苗期的耐冷性 QTL 进行了定位研究, 构建了包括 273 个 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 株系的高代回交作图群体, 以种子相对发芽指数和苗期耐冷指数作为耐冷指标, 检测到 5 个与发芽期耐冷性相关的 QTLs, 分别位于第 1、2、5、11 染色体上, 2 个与幼苗期耐冷性相关的 QTLs, 分别位于第 2 和第 8 染色体上。其中, 控制发芽期耐冷性的 *qRGI-2-1* 和 *qRGI-5-1* 贡献率分别为 12.8% 和 32.9%。有 12 个单株的自交后代 (BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub>) 在发芽期和幼苗期的耐冷性都达到或优于 LA722 的水平, 且果实质量等农艺性状均接近或优于普通番茄 9706, 可作为番茄耐冷育种材料。

**关键词:** 番茄; 醋栗番茄; 耐冷性; 高代回交 QTL 分析

**中图分类号:** S 641.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 07-1093-09

## QTL Analysis of Cold Tolerance from *Solanum pimpinellifolium* During Seed Germination and Seedling Stages Using Advanced Backcross Population

LIU Bing, DU Yong-chen\*, WANG Xiao-xuan, GUO Yan-mei, GAO Jian-chang, ZHU De-wei, and DAI Shan-shu

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

**Abstract:** An advanced backcross population of 273 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> individuals was developed derived from the cross *Solanum pimpinellifolium* LA722 × *Solanum lycopersicum* 9706 and a map was constructed containing 35 CAPS markers and 62 SSR markers. The QTLs controlling cold tolerance were mapped in the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* LA722 by mass screening test under cold stress. Using MQM mapping method, seven QTLs controlling cold tolerance were mapped in five chromosomes. The five QTLs conferring cold-tolerance during seed germination were mapped to chromosomes 1, 2, 5 and 11, while the two QTLs conferring cold-tolerance during seedling stage were mapped to chromosome 2 and 8. The QTLs on chromosomes 2 and 5 (*qRGI-2-1* and *qRGI-5-1*) could explain 12.8% and 32.9% of the phenotypic variance, respectively. The cold tolerance of 12 tomato self-offspring (BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub>) during seed germination and seedling stages was at or better than that of LA722 and the agronomic traits, such as fruit weight, were also close to or better than normal tomato variety 9706. So these lines can be used as tomato

收稿日期: 2010-03-29; 修回日期: 2010-06-17

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30571274, 30771474); 国家 '863' 计划项目 (2006AA10Z1A6, 2007AA10Z178); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A7); 农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yongchen.du@mail.caas.net.cn)

cold-resistant breeding materials.

**Key words** :tomato ;*Solanum pimpinellifolium* ;cold tolerance ;advanced backcross QTL (AB-QTL)

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是喜温作物, 低温胁迫对其种子萌发、幼苗生长及开花坐果都有显著影响 (王孝宣 等, 1996; Foolad et al., 1999; Eduardo, 2000; 王容青 等, 2007)。番茄保护地和早春露地栽培中经常遭受低温冷害, 选育耐冷性强的品种是番茄育种的主要目标之一。

研究表明, 番茄的耐冷性是数量性状, 耐冷基因多存在于醋栗番茄 (*Solanum pimpinellifolium*)、多毛番茄、潘那利番茄等野生种中, 发掘和利用耐冷野生资源是番茄耐冷性遗传改良的重要途径。Vallejos 和 Tanksley (1983) 早在 1983 年就利用普通番茄 T3 与多毛番茄 LA1777 杂交得到的 BC<sub>1</sub> 分离群体定位了控制低温下番茄叶片间隔指数的 QTL, 得到 3 个 QTLs 位点, 分别位于第 6、第 7 与第 12 染色体上。Foolad 等 (1998, 1999) 以普通番茄 NC84173 与醋栗番茄 LA722 杂交得到的 BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 分离群体研究了影响番茄发芽期耐冷性的 QTL, 在 (11 ± 0.5) °C 的低温胁迫下共鉴定出 6 个 QTLs, 分别位于第 1、第 4、第 8 染色体上。Truco 等 (2000) 利用普通番茄 T5 与多毛番茄 LA1778 杂交得到的 BC<sub>1</sub> 分离群体, 对根部低温胁迫下控制嫩茎萎蔫的 QTL 进行了研究, 鉴定出低温下控制嫩茎萎蔫的 6 个 QTLs 位点, 分别位于第 5、第 6、第 7、第 9、第 11、第 12 染色体上, 其中含有最大表型变异 (33%) 的位点位于第 9 染色体上。上述研究均以 BC<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 等早期世代群体进行 QTL 定位, 获得的材料含有野生番茄的不良性状较多, 含有的外源野生番茄的 DNA 片段比较长, QTL 与产量低、果实小、品质低劣等不良农艺性状之间的连锁累赘较大, 难以直接应用于育种实践。

针对上述问题, Tanksley 和 Nelson (1996) 将 QTL 检测与育种相结合, 提出了高代回交 QTL 分析法 (advanced backcross QTL analysis, AB-QTL), 在完成 QTL 定位后的 1~2 年即可得到可直接用于生产的新品系。Tanksley 和 Nelson (1996)、Moncada 等 (2001)、李爱国等 (2008)、潘颖等 (2010) 用 AB-QTL 分析法对番茄、水稻和棉花的研究结果充分表明了该方法对野生种质资源中有利基因的发掘是可行的。AB-QTL 分析法的不足之处在于进行 QTLs 分析的群体往往较小, 导致以栽培番茄优良亲本为遗传背景含野生番茄目标基因的单株出现的概率较低, 特别是包含所有野生番茄目标性状的基因的优异单株出现的概率更低。另外对大规模群体植株进行表型鉴定缺少简单有效的鉴定方法。

本研究中利用农艺性状优良的栽培番茄骨干亲本 9706 和耐冷性优良的醋栗番茄 LA722 为材料, 结合发芽期大规模低温鉴定筛选技术和 AB-QTL 分析方法对野生醋栗番茄的耐冷 QTL 进行分析, 并将耐冷 QTL 转育至栽培番茄骨干系中。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所选育的普通番茄材料 9706 (具有产量高, 抗叶霉病、病毒病、枯萎病等特点的优良骨干亲本) 和美国加州大学番茄遗传中心 (Tomato Genetics Resource Center, TGRC) 提供的野生醋栗番茄材料 LA722 (经鉴定, 发芽期和幼苗期对低温胁迫均有较强的抗性, 与普通番茄杂交不存在不亲和、不育、不稔等问题, 具有抗病性)。

本研究所用的 461 对 CAPS 引物、112 对 RFLP 引物和 147 对 SSR 引物的序列均来自康奈尔大学网站 (<http://www.sgn.cornell.edu>), 245 对 SSR 引物序列由华南农业大学园艺学院汪国平老师惠赠, 16 对 SSR 引物序列参照 Juan 等 (2005) 的文章。RFLP 标记需转化为 CAPS 标记, 根据康奈尔大学公布的序列信息, 经过倒转互补由 Primer 3.0 程序设计引物, 建立的 CAPS 标记仍用其原来的 RFLP

标记名称。引物由上海生工生物工程有限公司和北京三博远志生物技术有限责任公司合成。10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP、5 U · μL<sup>-1</sup> *Taq* 聚合酶, 100 bp DNA Ladder 购自天根生化科技有限公司。CAPS 标记所用限制性内切酶购自宝生物工程有限公司 (TaKaRa)。电泳所用试剂购自北京化工厂。GoldenView 核酸染料购自北京博迈德科技发展有限公司。

## 1.2 群体构建

2006 年春于中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室以 LA722 为父本、9706 为母本配制杂交组合并得到 F<sub>1</sub> 代种子, 于秋温室将 F<sub>1</sub> 代种子播种, 用栽培番茄 9706 作父本回交并获得大量 BC<sub>1</sub> 代种子, 同时采收自交 F<sub>2</sub> 种子。于 2007 年播种前将 BC<sub>1</sub> 代种子和 F<sub>2</sub> 代种子进行发芽期低温胁迫筛选: 将约 20 万粒种子均匀地铺在底部铺有纱布的白磁盘中, 加入蒸馏水, 加盖后置于 (10 ± 1) °C 低温光照培养箱 (HPG-280B, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司) 中。两个世代各筛选出最早发芽的前 100 粒种子播种春温室, BC<sub>1</sub> 代单株与 9706 回交, 获得 BC<sub>2</sub> 种子; F<sub>2</sub> 单株自交, 获得 F<sub>3</sub> 种子。同样方法进行发芽期耐冷性筛选, 分别将两个世代最早发芽的前 100 粒种子于 2007 年秋温室播种, BC<sub>2</sub> 代单株与 9706 回交, 获得 BC<sub>3</sub> 种子; F<sub>3</sub> 单株自交, 获得 F<sub>4</sub> 种子。将发芽期耐冷性筛选得到最早发芽 (最耐冷) 的 39 粒 BC<sub>3</sub> 种子播种于春温室, BC<sub>3</sub> 单株自交, 按单株分收 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 种子。BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 种子经室温催芽, 种植于秋温室, 每个株系随机选择长势一致的 7 株幼苗共 273 株 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 用于基因型分析, 构建图谱, BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 自交得到 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 种子, 按单株分别采种, 用于发芽期和幼苗期的耐冷性鉴定。

## 1.3 发芽期和幼苗期耐冷性鉴定

273 个 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 株系中每个株系随机选取 400 粒饱满的种子, 平均分为 2 份, 分别置于两个垫有蒸馏水浸湿滤纸的 9 cm 培养皿中, 加盖后将其中 1 份置于 (10 ± 1) °C 低温光照培养箱中, 另 1 份则置于 25 °C 室温 (对照) 中, 均保持黑暗条件。每天更换一次蒸馏水。每个株系设 2 次重复。每天定时调查发芽种子数 (芽长 1 mm, Wolf et al., 1986), 调查 50 d。发芽指数 = (Σ T<sub>i</sub>N<sub>i</sub>) / S, 其中 T<sub>i</sub> 为发芽的天数, N<sub>i</sub> 为在第 i 天发芽的种子数, S 为试验结束时的发芽总数 (Foolad et al., 1998)。相对发芽指数 = [(低温处理下发芽指数 - 室温对照的发芽指数) / 对照的发芽指数] × 100% (程海涛等, 2008)。发芽指数和相对发芽指数值越小, 表明种子在低温下的发芽速度越快, 耐冷性越强。

273 个 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 株系中每个株系随机挑选 50 粒发芽的种子于温室内播种育苗, 以草炭、蛭石、鸡粪 (6:3:1) 为培养介质, 自然光照, 温度保持在 15 ~ 30 °C, 常规管理。待完全长出 3 片真叶时, 每个株系随机选择 5 株幼苗置于 2 °C 冷库中低温处理两昼夜, 据幼苗受伤害程度进行分级。0 级: 叶片正常, 未受冷害; 1 级: 仅少数叶片边缘有轻度的皱缩萎蔫; 2 级: 近半数叶片萎蔫死亡, 但主茎未死, 恢复常温后能长出新叶; 3 级: 半数以上的叶片萎蔫死亡; 4 级: 植株全部死亡。每个株系设 3 次重复。冷害指数 =  $\sum x_a / (n \times x) = (x_1a_1 + x_2a_2 + \dots + x_na_n) / nT$ , 其中, x<sub>1</sub>、x<sub>2</sub>、x<sub>3</sub>...x<sub>n</sub> 表示各级冷害的株数, a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>、a<sub>3</sub>...a<sub>n</sub> 表示各冷害等级, T 为调查的总株数 (党秋玲等, 2005)。

## 1.4 CAPS 标记分析和 SSR 标记分析

待幼苗长到三叶一心时, 取刚展开的嫩绿叶片, 采用 CTAB 法 (Murry & Thompson, 1980) 提取 DNA, 利用分光光度计测定 DNA 浓度。采样方法: 父、母本, F<sub>1</sub> 代及 BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub>、F<sub>4</sub> 等 3 个混合群体采用混合采样的方法; 用于连锁图谱构建的 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 代采用各个单株分别采样的方法。

CAPS 标记分析: 优化后的 CAPS 反应体系为 25 μL, 包括 50 ng 模板 DNA、2.5 μL 10 × PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>)、2.0 μL dNTPs (2.5 mmol · L<sup>-1</sup> each)、1.25 U *Taq* DNA 聚合酶、每个引物的浓度为 0.2 μmol · L<sup>-1</sup>

(最终浓度), 覆盖 20  $\mu\text{L}$  石蜡油。PCR 扩增反应在 PTC-200<sup>TM</sup> Peltiter thermal cycler 中进行, 程序为 94 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 55 复性 1 min, 72 延伸 2 min, 循环 35 次; 72 延伸 10 min, 置于 4 下保存。扩增产物利用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳 (0.5  $\times$  TBE 缓冲液), 利用凝胶成像系统检测。在 PCR 扩增产物与预期结果一致的情况下, 对 PCR 产物用限制性内切酶消化。限制性内切酶反应体系为: 1.5  $\mu\text{L}$  限制性内切酶缓冲液, 0.2  $\mu\text{L}$  限制性内切酶 (10  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 3.3  $\mu\text{L}$  超纯水, 10.0  $\mu\text{L}$  PCR 产物。根据不同的限制性内切酶选择不同的反应温度, 水浴中反应 4 h 以上。利用 2% 琼脂糖凝胶电泳酶切产物, 在凝胶成像系统下检测酶切产物。

SSR 标记分析: 优化后的 SSR 扩增采用 10  $\mu\text{L}$  反应体系, 包括 20 ng 模板 DNA、1.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer (含  $\text{Mg}^{2+}$ )、0.8  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  each)、0.5 U *Taq* DNA 聚合酶、每个引物的浓度为 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (最终浓度), 覆盖 10  $\mu\text{L}$  石蜡油以防止反应过程中水分的蒸发。优化的 PCR 扩增反应在 PTC-200<sup>TM</sup> Peltiter thermal cycler 中进行, 反应程序为 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 72 延伸 7 min, 置于 4 下保存。不同引物的退火温度在 50 ~ 60 之间。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染统计分析。

根据电泳谱带结果, 记录 CAPS 和 SSR 共显性标记的类型: 与亲本普通栽培番茄 9706 相同纯合带型记为“ A ”, 与亲本野生醋栗番茄 LA722 相同纯合带型记为“ B ”, 两亲本的杂合带型记为“ H ”, 模糊或缺失数据记为“ U ”。对每个标记的带型在群体中的分布进行  $\chi^2$  测验, 检测其显著性。

## 1.5 分子遗传图谱的构建及 QTL 分析

连锁图的构建采用 JoinMap4.0 软件。以 LOD 值 2.0 作为阈值, 利用“Kosambi”作图函数, 构建分子连锁图。QTL 的检测利用 MapQTL4.0 软件。用“Permutation Test”命令 (1 000 次重复), 估计每一个连锁群在  $\alpha = 0.05$  水平上的 LOD 阈值。选择多模型 QTL 作图法 (multiple QTL model MQM) (Jansen, 1993) 检测可能存在的 QTLs, 同时估计 QTLs 的遗传效应和对该性状表型变异的贡献率。QTLs 的命名方法参照 McCouch 等 (1997) 的命名法。

## 1.6 耐冷番茄株系的创制

对 LA722、9706 及其 273 份  $\text{BC}_3\text{S}_1$  代自交后代 ( $\text{BC}_3\text{S}_2$  个体) 的相对发芽指数和幼苗冷害指数进行方差分析, 筛选出极耐冷单株。根据 QTLs 定位的结果, 对主效 QTLs 区域的标记和极耐冷单株作基因型分析, 结合株高、果实质量等田间农艺性状, 选出在表型和 QTLs 分析中均表现耐冷且农艺性状优良的单株作为育种材料。

# 2 结果与分析

## 2.1 醋栗番茄 LA722、9706 和普通番茄 9706 及其和 $\text{BC}_3\text{S}_2$ 的耐冷性鉴定

LA722、9706 和  $\text{BC}_3\text{S}_2$  的发芽期和幼苗期耐冷性鉴定结果 (表 1) 表明, 9706 的种子相对发芽指数和幼苗冷害指数显著高于 LA722, 表明其耐冷性显著低于 LA722, 这与预期结果一致。

$\text{BC}_3\text{S}_2$  群体内的相对发芽指数和幼苗冷害指数分离广泛, 出现了部分明显的双向超亲株系, 2 个时期耐冷性强于 LA722 的超亲株系分别占 17.22% 和 31.50%, 且  $\text{BC}_3\text{S}_2$  群体的种子相对发芽指数和冷害指数呈近似正态的连续分布 (图 1), 符合 QTL 作图要求和分析要求。

相关性分析表明, 番茄发芽期的耐冷性 (RGI) 和幼苗期的耐冷性 (CI) 在 0.05 水平上存在显著相关性 ( $r = 0.153$ )。

表 1 双亲及 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 群体的耐冷性状表型  
Table 1 Phenotypic performance of cold tolerance in two parents and their BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> population

材料 Material	相对发芽指数 Relative germination index	幼苗冷害指数 Chilling index
9706	6.49 ± 0.32a	2.43 ± 0.22a
LA722	3.71 ± 0.24b	1.37 ± 0.09b
BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	5.80 ± 0.13ab	1.71 ± 0.04ab

注：表中同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。  
Note : Different small letters in each column mean significant difference at 0.05 level.

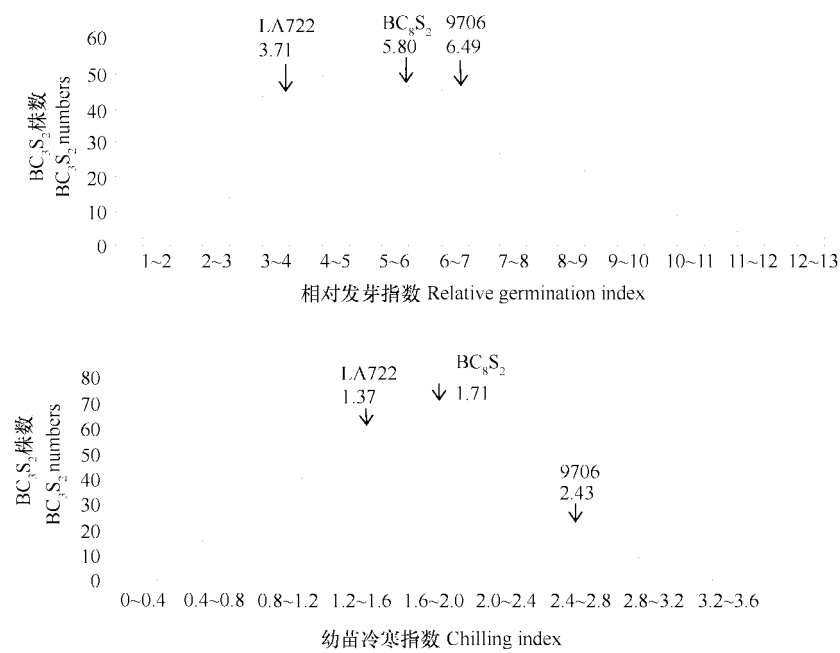


图 1 番茄耐冷相关性状在 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 群体中的分布

Fig. 1 Frequency distribution of characters associated with cold-tolerance in BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> population

2.2 CAPS 和 SSR 标记分析

在用双亲和 BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub>、F<sub>4</sub> 池进行 SSR 和 CAPS 筛选后，从 408 个 SSR 标记中筛选出 61 个标记，从 573 个 CAPS 标记中筛选出 35 个标记。图 2 和图 3 为利用 CAPS 标记 U221402 和 SSR 标记 SSR331 对 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 群体部分单株的检测结果，这两个标记均为共显性标记，能够区分父、母本及杂合个体的基因型。

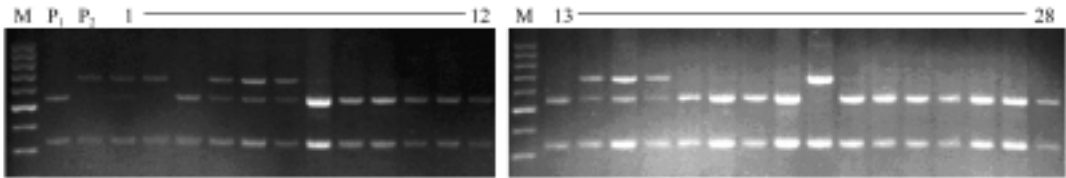


图 2 U221402 在亲本及 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 群体部分单株中的多态性表现

P<sub>1</sub> : 9706 ; P<sub>2</sub> : LA722 ; 1 ~ 12 , 13 ~ 28 : BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 单株 ; M : 100 bp DNA ladder.

Fig. 2 Amplification of U221402 in parents and some BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> population individuals

P<sub>1</sub> : 9706 ; P<sub>2</sub> : LA722 ; 1 - 12 , 13 - 28 : BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> populations ; M : 100 bp DNA ladder.

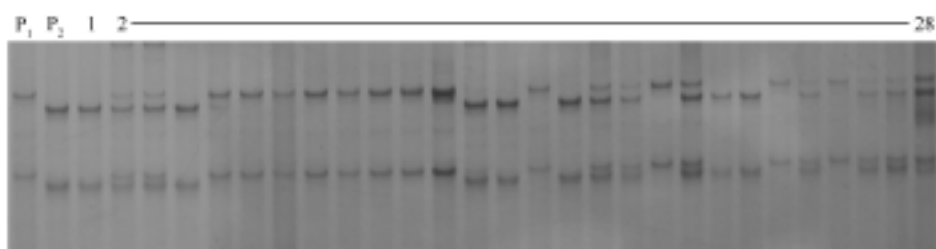


图 3 SSR331 在亲本及 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 群体部分单株中的多态性表现

P<sub>1</sub> : 9706 ; P<sub>2</sub> : LA722 ; 1 ~ 28 : BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 单株。

Fig. 3 Amplification of U221402 in parents and some BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> population individuals

P<sub>1</sub> : 9706 ; P<sub>2</sub> : LA722 ; 1 – 28 : BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> populations.

### 2.3 耐冷性 QTL 分析

利用 MapQTL4.0 软件中的 MQM 模型, 共检测到 7 个与种子发芽期和幼苗期耐冷性相关的 QTLs, 分布在 5 条染色体上 (表 2)。与相对发芽指数相关的 5 个耐冷 QTLs 中, 有 2 个位于第 1 染色体上, 其余 3 个分别位于第 2、第 5、第 11 染色体上, 单个 QTL 贡献率的变幅为 3.2% ~ 32.9%, 对该性状表型变异的总贡献率为 61.8%。其中 *qRGI-1-1*、*qRGI-1-2*、*qRGI-2-1* 和 *qRGI-5-1* 加性效应为正, 以父本 LA722 的等位基因为增效基因, 累计贡献率为 53.4%; 位于第 11 染色体上的 *qRGI-11-1* 加性效应为负, 以母本 9706 的等位基因为增效基因。在上述与发芽期耐冷性相关的 QTLs 中, 以 *qRGI-2-1* 和 *qRGI-5-1* 对该性状的贡献率较大, 分别为 12.8% 和 32.9%, 为主效基因, 与其紧密连锁的分子标记分别为 SSR331 和 U221402 (图 2, 图 3)。

幼苗期检测到的 2 个耐冷 QTLs 位于第 2 和第 8 染色体上, 单个 QTL 的贡献率分别为 3.3% 和 4.9%, 加性效应均为正, 增效基因来自父本 LA722。

表 2 多模型作图法定位的 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 群体中耐冷相关性状的 QTL

Table 2 QTLs analysis for cold-tolerance in BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> population using multiple QTL model

性状 Trait	数量性状 位点 QTL	染色体 Chromosome	位置/cM Position	标记区间 Marker interval	LOD 值 LOD score	加性效应 Additive effect	贡献率/% Variance explained
相对发芽指数 Relative germination index	<i>qRGI-1-1</i>	1	10.0	SSR75 – SSR29 *	2.15	0.42	4.5
	<i>qRGI-1-2</i>	1	24.8	SSR29 * – SSRD127	2.02	0.77	3.2
	<i>qRGI-2-1</i>	2	30.2	SSR5 – SSR331 *	8.84	0.74	12.8
	<i>qRGI-5-1</i>	5	30.0	SSR162 – U221402 *	4.84	0.81	32.9
	<i>qRGI-11-1</i>	11	12.0	T1205 * – SSRD71	3.67	-1.61	8.4
幼苗冷害指数 Chilling index	<i>qCI-2-1</i>	2	13.4	C2_At5g08420 – C2_At3g02300 *	2.10	0.06	3.3
	<i>qCI-8-1</i>	8	69.6	SSRD68 – TG302 *	2.75	0.44	4.9

\* 表示较接近 QTL 一侧的标记。

\* mean the most closely associated molecular marker to the true QTL positions.

2.4 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 果实质量等主要农艺性状表现

BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 群体在株高（4 穗时）、果实质量、果肉可溶性固形物含量等几个性状上与亲本 LA722 相比均得到了改良，各性状表现优于亲本 LA722 的个体占 7.84% ~ 100%，优于 9706 的个体占 14.29% ~ 60.44%（表 3）。在株高高于亲本的 204 个单株中，分别有 32 个和 65 个单株的自交后代（BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub>）在发芽期和幼苗期的耐冷性达到或高于亲本 LA722 的水平，12 个单株的自交后代在两个时期的耐冷性均达到或高于亲本 LA722 的水平，这些单株的果实质量也都接近或优于亲本 9706。以上结果表明，醋栗番茄优良耐冷性状的种质成功导入到了 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 株系中，同时保持了栽培番茄优良的农艺性状，因此，可以从中选择到综合性状优良的耐冷株系。

表 3 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 群体其他主要性状表现

Table 3 Performance of other main traits in BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> population

性状 Traits	变异范围 Range	平均数 Mean	超 LA722 个体/% Over LA722 individuals	超 9706 个体/% Over 9706 individuals
四穗株高/cm 4-ear plant height	59.00 ~ 143.00	94.14	74.36	14.65
果实质量/g Fruit weight	3.05 ~ 248.16	71.70	100.00	14.29
可溶性固形物含量/% Soluble solids content	2.80 ~ 8.20	5.50	7.84	60.44

图 4 为以发芽期 2 个主效 QTLs *qRGI-2-1* 和 *qRGI-5-1* 的含有量为例，描述了部分 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 单株的基因型分布。由图 4 可知，单株 164-2 和 164-4 同时含有 2 个主效 QTLs，且这 2 个单株的果实质量与 LA722 相比均得到了一定程度的改良（表 4），可以作为农艺性状优良的耐冷株系保存下来。单株 161-5 虽不含有发芽期的 2 个主效 QTLs，但是含有本研究定位到的其他微效 QTLs，也表现出了较高的耐冷性，说明番茄耐冷性是多个 QTLs 共同作用的结果。

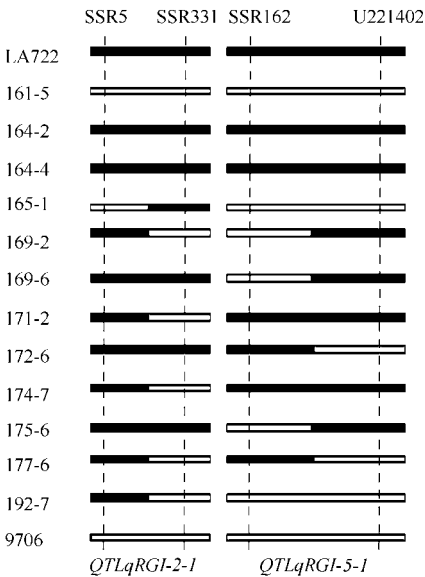


图 4 部分耐冷番茄单株的基因型图

黑色条形：含有 LA722 基因；白色条形：不含 LA722 基因。  
Fig. 4 Graphical genotypes for partial cold-tolerant individuals  
Black bar：Contained LA722 gene；White bar：Not contained LA722 gene.

表 4 部分耐冷单株的果实质量

Table 4 Fruit weight for partial cold-tolerant individuals

单株 Individuals	相对发芽指数 Relative germination index	幼苗冷害 指数 Chilling index	果实质量/g Fruit weight
LA722	3.71	1.37	1.39
161-5	2.02	0.93	129.13
164-2	3.68	1.27	68.59
164-4	3.19	1.17	33.15
165-1	3.70	1.20	116.39
169-2	3.53	1.35	119.30
169-6	3.38	1.33	99.15
171-2	3.20	1.00	89.07
172-6	3.58	0.80	99.15
174-7	2.78	0.90	104.13
175-6	3.38	0.97	100.42
177-6	3.28	1.07	70.14
192-7	3.64	1.00	93.54
9706	6.49	2.43	107.17

### 3 讨论

本研究中以相对发芽指数和幼苗冷害指数分别作为番茄发芽期和幼苗期耐冷性的指标,对醋栗番茄 LA722 和栽培番茄 9706 配制的 BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 群体进行了耐冷性鉴定。结果表明,醋栗番茄 LA722 的相对发芽指数和冷害指数均较小,耐冷性较高。BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 群体不同基因型个体的相对发芽指数和幼苗冷害指数均不同,且都呈近似正态连续分布,说明番茄耐冷性状为多基因控制的数量性状。这与前人在番茄发芽期 (Foolad et al., 1998) 和营养生长期耐冷性 (Foolad & Lin, 2001) 的研究结果类似。

目前有关番茄耐冷方面的研究已取得一定的成果,但与番茄的产量、品质、抗性等重要农艺性状的 QTL 分析相比,由于耐冷性的鉴定较复杂,受环境影响较大,因此遗传研究起步较晚。Foolad 等 (1998) 利用醋栗番茄和栽培番茄配制的 BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 群体,在第 1、第 4 染色体上得到了耐冷性 QTLs。其中,位于第 1 染色体上的 3 个 QTLs 来自醋栗番茄亲本,位于第 4 染色体上的 2 个 QTLs 来自栽培番茄亲本。Foolad (2007) 利用重组自交系 F<sub>9</sub>RIL 又在第 1、第 2、第 3、第 8、第 12 染色体上定位了一些 QTLs。本研究利用 MQM 作图法得到的发芽期耐冷性 QTL 分别位于第 1、第 2、第 5、第 11 染色体上,通过图谱比较,本研究定位于第 1 染色体上的微效 QTL 与 Foolad 定位的位于第 1 染色体上微效 QTL 基本在同一染色体区域,证实了包含 1 个或多个 QTL 的第 1 染色体区域与番茄发芽期耐冷性有紧密的联系,在第 1 染色体上存在与发芽期耐冷性相关的基因。本研究检测到的位于第 5 染色体上的 QTL 贡献率为 32.9%,可能为新的发芽期主效耐冷 QTL,这将对下一步的基因克隆及品种改良提供参考。

本试验在第 2 和第 8 染色体上定位了 2 个幼苗期耐冷 QTLs,对表型变异的贡献率分别为 3.3% 和 4.9%。Vallejos 和 Tanksley (1983) 曾以多毛番茄和普通番茄杂交得到的 BC<sub>1</sub> 群体作为研究材料,在第 6、第 7、第 12 染色体上检测到了与番茄苗期耐冷性相关的 QTLs。本研究检测到的 QTLs 与其位置不同。关于番茄不同发育时期耐冷性的遗传关联,之前的研究多表明番茄苗期耐冷性 QTL 与发芽期耐冷性 QTL 大多不相同。本研究对番茄种子相对发芽指数和幼苗冷害指数的相关性分析表明,BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 群体在 2 个时期的耐冷性存在显著相关性,但是在进行 QTL 检测时,并未发生共定位现象,仅是在第 2 染色体上同时定位到了发芽期与幼苗期的耐冷 QTL,且与发芽期耐冷性相关的 QTL 对该性状表型变异的贡献率较大 (12.8%),有必要对其作进一步的精细定位,以获得在目标 QTL 两侧与之连锁更紧密的分子标记。

上述 QTLs 定位结果在染色体位置和数量上的差异一方面可能是因为本试验所做的遗传连锁图谱的密度不大,标记在几个连锁群上的分布不是很均匀,一些效应较小的 QTL 可能检测不到;另一方面可能是由于鉴定方法的不同,以发芽期为例,本试验中采用的相对发芽指数是一个新的标准,Foolad 等 (1999) 是直接选用低温下的发芽指数,没有除去常温下种子发芽能力本身的差异,与其相比,相对发芽指数的值较小,可能导致检测的 QTL 数和贡献率较少。

AB-QTL 分析方法使得 QTL 检测和育种得到了更好的结合,但若 QTL 分析的群体未经选择,会导致含野生种目标基因的单株出现的概率较低,特别是包含所有野生种目标性状基因的优异单株出现的概率更低。本研究采用发芽期大规模的低温胁迫筛选方法,在得到耐冷性 QTLs 的同时获得了优良的耐冷株系。农艺性状优良的 164-2 和 164-4 不仅在发芽期和幼苗期的耐冷性均优于强于 LA722 的水平,还同时含有发芽期的 2 个主效 QTLs。说明利用 AB-QTL 分析法结合发芽期大规模的低温胁迫筛选将野生醋栗番茄的耐冷性 QTLs 向普通番茄转育且保持普通番茄优良的农艺性状是行之有效的,利用上述株系继续与 9706 回交 2~3 代,同时结合标记辅助选择优良农艺性状 QTL,将可构建出含有优良农艺性状的耐冷近等基因系。



## References

- Cheng Hai-tao ,Jiang Hua ,Xue Da-wei ,Guo Long-biao ,Zeng Da-li ,Zhang Guang-heng ,Qian Qian. 2008. Mapping of QTLs underlying tolerance to alkali at germination and early seedling stages in rice. *Acta Agronomica Sinica* , 34 (10) : 1719 – 1727. (in Chinese)
- 程海涛,姜 华,薛大伟,郭龙彪,曾大力,张光恒,钱 前. 2008. 水稻芽期与幼苗前期耐碱性状 QTL 定位. *作物学报* , 34 (10) : 1719 – 1727.
- Dang Qiu-ling , Yu Chao , Wang Zhen-li. 2005. Studies on the chilling resistance and physiological index in processing tomatoes after treating seeds by ABA. *Journal of Shihezi University : Natural Science* , 23 (3) : 349 – 351. (in Chinese)
- 党秋玲,余 超,王祯丽. 2005. ABA 处理种子对加工番茄幼苗抗寒力及相关生理指标的影响. *石河子大学学报 : 自然科学版* , 23 (3) : 349 – 351.
- Eduardo Oyanedel. 2000. Quantitative trait loci analysis of chilling tolerance in tomato [Ph. D. Dissertation]. Ithaca : Cornell University. (in USA).
- Foolad M R ,Chen F Q ,Lin G Y. 1998. RFLP mapping of QTLs conferring cold tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Molecular Breeding* , 4 : 519 – 529.
- Foolad M R , Lin G Y , Chen F Q. 1999. Comparison of QTLs for seed germination under non-stress , cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* , 118 : 167 – 173.
- Foolad M R , Lin G Y. 2001. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato , *Lycopersicon esculentum* Mill. *Euphytica* , 122 : 105 – 111.
- Foolad M R. 2007. Genetic mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* , 1 – 52.
- Jansen R C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* , 135 : 205 – 211.
- Juan J , Ruiz , Garcia-Martinez S , Pico B , Gao M Q , Quiros C F . 2005. Genetic variability and relationship of closely related spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* , 130 : 88 – 94.
- Li Ai-guo ,Zhang Bao-cai ,Li Jun-wen ,Shi Yu-zhen ,Liu Ai-ying ,Yang Ze-mao ,Liu Zhi ,Yu Xiao-nan ,Yuan You-lu. 2008. QTL analysis of yield related traits using *G. hirsutum* × *G. barbadense* advanced backcross populations. *Molecular Plant Breeding* , 6 (3) : 504 – 510. (in Chinese)
- 李爱国,张保才,李俊文,石玉真,刘爱英,杨泽茂,刘 志,余筱南,袁有禄. 2008. AB-QTL 法定位陆海杂种棉花产量相关性状. *分子植物育种* , 6 (3) : 504 – 510.
- McCouch S R ,Cho Y G ,Yano M ,Paul E ,Blinstrub M ,Morishima H ,Kinoshita T . 1997. Report on QTL nomenclature. *Rice Genetics Newsletter* , 14 : 11 – 13.
- Moncada P ,Martinez C P ,Borrero J ,Châtel M ,Gauch H ,Guimaraes E P ,Tohmé J ,McCouch S R. 2001. Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* × *Oryza rufipogon* BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> population evaluated in an upland environment. *Theor Appl Genet* , 102 : 41 – 52.
- Murray M G , Thompson W F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* , 8(19) : 4321 – 4326.
- Pan Ying ,Wang Xiao-xuan ,Du Yong-chen ,Hu Hong ,Gao Jian-chang ,Guo Yan-mei ,Dai Shan-shu ,Zhu De-wei. 2010. Mapping QTLs conferring salt tolerance during germination in *solanum pimpinellifolium* using AB-QTL. *Acta Horticulturae Sinica* , 37 (1) : 39 – 46. (in Chinese)
- 潘 颖,王孝宣,杜永臣,胡 鸿,高建昌,国艳梅,戴善书,朱德蔚. 2010. 利用高代回交群体定位野生醋栗番茄发芽期耐盐 QTL. *园艺学报* , 37 (1) : 39 – 46.
- Tanksley S D , Nelson J C. 1996. Advanced backcross QTL analysis : A method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* , 92 : 191 – 203.
- Truco M J , Randall L B , Bloom A J , Clair D A. 2000. Detection of QTLs associated with shoot wilting and root ammonium uptake under chilling temperatures in an interspecific backcross population from *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* , 101 (7) : 1082 – 1092.
- Vallejos C E , Tanksley S D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. *Theor App Genet* , 66 (3-4) : 241 – 247.
- Wang Rong-qing ,Ruan Mei-ying ,Yang Yue-jian ,Zhou Guo-zhi ,Ye Qing-jing ,Yao Zhu-ping ,Chen Li-ping ,Li Zhi-miao. 2007. Effects of sub-low temperature on the fruit setting of tomato and the screening of tolerant lines. *Acta Agriculturae Zhejiangensis* , 19 (3) : 206 – 210. (in Chinese)
- 王荣青,阮美颖,杨悦俭,周国治,叶青静,姚祝平,陈丽萍,李志邈. 2007. 亚低温对番茄座果的影响及耐低温材料的筛选. *浙江农业学报* , 19 (3) : 206 – 210.
- Wang Xiao-xuan , Li Shu-de , Dong Hui-rui , Gao Zhen-hua , Dai Shan-shu. 1996. Effect of low temperature stress on several proptrles of tomato during seedling and florescence. *Acta Horticulturae Sinica* , 23 (4) : 349 – 354. (in Chinese)
- 王孝宣,李树德,东惠茹,高振华,戴善书. 1996. 低温胁迫对番茄苗期和花期若干性状的影响. *园艺学报* , 23 (4) : 349 – 354.
- Wolf S , Yakir D , Stevens M A , Rudich J. 1986. Cold temperature tolerance of wild tomato species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* , 111 (6) : 960 – 964.