

應用分子標誌分析番茄種原遺傳歧異度¹

吳靜霞、林煜恆²

摘 要

番茄為世界重要的蔬菜作物，評估所引進核心種原之遺傳歧異度，有助後續育種策略規劃。本研究自國內種苗商蒐集 32 個番茄種原作為參試材料，調查園藝性狀，並利用分子標誌評估種原間之遺傳歧異度。外表型性狀調查結果顯示，其中 20 個品系之果實形狀為圓形，12 個品系為扁形；而 1 個品系之植株型態為停心型，14 個品系為半停心型，17 個品系為非停心型。以 16 組 SSR 和 4 組 InDel 分子標誌分析結果顯示，增幅的 DNA 片段大小範圍自 100 bp 至 330 bp，共偵測到 71 個對偶基因，平均每個基因座有 3.6 個對偶基因；最高和最低多型性資訊含量為分子標誌 T139 之 0.451 及 T163 與 InDel 19 之 0.334，利用 UPGMA 親緣樹狀圖與遺傳距離之主座標分析，顯示可將 32 個種原略分為三群，分別為 28 個與 3 個種原，另 SF22 單一種原為一群。綜上，種原間遺傳歧異度分析結果有助 32 個番茄種原分類、保管與應用育種工作。

關鍵詞：番茄、種原、遺傳歧異度、簡單重複序列

前 言

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) ($2n = 2x = 24$) 屬於茄科作物，原產於南美洲，基因組大小約 900 Mb，為重要的模式作物⁽²⁾。依據聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 統計，2017 年番茄全球收穫面積約 484 萬 ha，占蔬菜總面積 23.6%，年產約 1.8 億 ton，為世界重要的蔬菜作物。行政院農業委員會農糧署農業統計年報顯示，臺灣近 5 年收穫面積平均約 5,198 ha，產量平均約 13 萬 ton，產值約 41.5 億元；從財政部關務署進出口貿易統計資料得知，近 5 年番茄種子進口量平均約 2 ton，產值平均約 4,300 萬元，而出口量平均約 0.9 ton，產值平均達 4,100 萬元，占蔬菜種子產值約 16%，為國內種子出口的大宗品項之一。全球蔬菜種子市場在 2018 年推估為 91 億美元，其中番茄種子規模最大約 9.5 億美元，其次為甜椒、萵苣和甘藍⁽³⁾。

作物品種改良有賴豐富多樣化的種原，然而，番茄非臺灣原生種，相傳由荷蘭引進作為觀賞作物，直到 19 世紀末將番茄作為蔬菜作物進行試驗推廣後，才陸續自各國引進番茄種原⁽¹⁾，因此，瞭解種原間遺傳親緣關係有助番茄育種工作。而番茄屬於自交作物，育種目標以提高品質為主，經

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0957 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

嚴格選拔過程，且長時間的馴化與外表型選拔育成之商業品種，其遺傳多樣性相較其他作物更為狹窄，導致不易鑑別出多型性的分子標誌^(7,14,23)。DNA分子標誌 (molecular marker)被視為用於鑑別植物基因型與判斷遺傳變異的工具之一，其中簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR)又稱微衛星體 (microsatellites)，為真核生物基因組中廣泛存在2-6個核苷酸所組成的重複性DNA序列，其重複的次數在個體間具高度變異性，因此利用重複序列兩端設計引子，可增幅出含有重複序列的片段，即為SSR分子標誌，其特色為再現性、共顯性與多型性，且可快速利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)分析；SSR存在於外顯子 (exon)或非轉譯區的基因組 (gSSR)，及表現序列標誌 (expressed sequence tags, EST)，其中EST為生物體內mRNA反轉錄成cDNA後，轉錄體經過定序所獲得之序列，與gSSR相比，其重複motif前後之序列具有保守性，即多型性較低，適合相近物種或同源基因之研究，且EST-SSR分子標誌與功能性基因具有專一連鎖性⁽²⁵⁾。然而，SSR之多型性在商業品種間較低，近年來也利用在基因組內豐富的單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)區分等位基因變異 (allelic variation)、基因組定位和分子輔助育種⁽⁷⁾；另外，也有部分研究利用插入與缺失 (insertion -deletion, InDel)序列設計作為品種鑑定之分子標誌^(16, 21)。

He等人在2003年利用資料庫序列，成功應用多型性的SSR分子標誌鑑定番茄品種和品系之基因型⁽¹¹⁾。至2012年結合14個國家的研究團隊，針對自交品種Heinz 1706進行第1個番茄全基因組解序，並針對野生種番茄*S. pimpinellifolium*進行初步解序；隔年有研究團隊建構第1個番茄SSR分子標誌資料庫TomSatDB (<http://cabindb.iasri.res.in/tomsatdb>)⁽¹²⁾，隨著次世代定序技術進步，番茄遺傳圖譜持續進行更精密的定位，目前廣為使用的茄科基因資料庫Sol genomics network (SGN; <http://sgn.cornell.edu>)，整合茄科作物的基因組資訊。研究顯示，種原間歧異度分析之可靠性，可透過增加欲分析的分子標誌數目，除了可獲得更多條帶數目，亦能提高分析的穩定性，而物種間的相似係數可選擇Jaccard或Dice作為估算方式⁽⁹⁾。本研究旨在利用分子標誌分析番茄種原遺傳歧異度，選擇親緣較遠的品種進行雜交，以創造遺傳多樣性，未來尚可由外表型與基因型之研究，供育種人員進行種原管理，並作為親本選拔之參考依據。

材料與方法

一、植物材料

本場自欣樺種苗公司蒐集 32 個番茄種原，品種編號為 SF1~SF32，由該公司自世界各地蒐集商業品種，並經過多世代自交選拔，於 2017 年 11 月定植於本場溫室內，田間試驗採用隨機區集設計 (randomized block design)，每個自交系重複 3~5 株，生長期間調查園藝性狀，包括果實形狀 (SHP)、未熟果顏色 (IFC)、成熟果顏色 (RFC)與植株型態 (Hab)等，各項園藝性狀調查則依據行政院農業委員會公告之番茄品種試驗檢定方法中之規定進行。

二、植物核酸萃取

番茄葉片 DNA 萃取係採用自動化核酸萃取儀 (Smart LabAssist-32, 臺灣圓點奈米技術股份有限公司, 臺灣)。取三葉齡番茄葉片 3 cm, 置於 2 mL 厚壁試管中, 加入 800 μ L Lysis buffer (TANBead[®] DNA Extraction Kit, Cat. No. 613A46, 臺灣圓點奈米技術股份有限公司, 臺灣), 與鋼珠震盪 1 min, 將葉片磨成粉末後, 混合均勻並靜置於室溫 5 min。以 8,000 g 離心 5 min, 將上清液注入已預先分注試劑之 96 孔盤, 放入自動化核酸萃取儀, 依操作手冊選擇 (BIO-W4-AUTO) 程式, 約 40 min 完成 DNA 萃取, 再以超微量分光光度計 (NanoDrop[™] One, ThermoFisher Scientific Inc.) 測定 DNA 濃度與品質, 將 DNA 儲存於 -20[°]C 中備用。

三、引子來源與聚合酶連鎖反應

根據前人發表之研究成果, 隨機從番茄 12 條染色體挑選 201 組引子, 其中 181 組為 SSR 或 EST-SSR^(7,8,15,22,25), 20 組為 InDel 類型之引子⁽¹⁹⁾, 引子序列與染色體位置係由茄科基因組資料庫 Solanaceae Genome Network (<http://www.sgn.cornell.edu>) 獲得, 並委託源資國際生物科技股份有限公司合成引子。

聚合酶連鎖反應的每個樣品總體積為 25 μ L, 內含 DNA 模版、5X Taq Master Mix (Fast-Run Taq Master Mix Kit, 波仕特公司, 臺灣)、10 μ M 引子對及無菌蒸餾水。樣品混合後於 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA) 進行, 先以 94 [°]C 反應 10 min, 接著以 94 [°]C 反應 1 min、55~60 [°]C 反應 1 min (依不同引子調整溫度) 及 72 [°]C 反應 1 min, 上述三步驟重覆 30~35 個循環, 最後以 72 [°]C 反應 10 min。經聚合酶連鎖反應所增幅之產物, 加入 6x loading dye, 以 2~3.5 % 的 SFR agarose 在 TBE buffer 中, 100 伏特電壓進行電泳分離約 60 min, 並以 UV 光檢視、照相及貯存影像於電泳影像分析系統 (IS 2000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corporation); 另為提升分析靈敏度, 輔以毛細管電泳儀 (Qsep₁₀₀[™] BiOptic Inc., 基智生物科技股份有限公司, 臺灣) 自動化分析產物片段。

四、遺傳歧異度分析

由電泳結果計算對偶基因的數目 (number of allele), 具多型性之分子標誌, 係依每個基因座不同之對偶基因之有無以 0、1 型式表示, 0 代表該品系未增幅 DNA 片段, 1 代表此品系可增幅 DNA 片段, 並以 iMEC 程式 (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) 計算遺傳歧異度參數⁽⁵⁾, 包括異質結合個體期望值 (expected heterozygosity, He)、多型性資訊含量 (polymorphism information content, PIC)、有效多重比率 (effective multiplex ratio, EMR)、平均遺傳異質性 (mean heterozygosity, H_{avp})、分子標誌指數 (marker index, MI)、鑑別力 (discriminating power, D) 與解析力 (resolving power, Rp) 等。He 為族群中異質結合個體的機率, 其公式為 $1 - \sum P_i^2$; PIC 係分析對偶基因在每個基因座內產生多型性之機率, 其公式為 $PIC = 1 - \sum P_i^2 - \sum \sum P_i^2 P_j^2$, P_i 和 P_j 分別是第 i 個和第 j 個對偶基因在所有種原中出現的頻率⁽⁶⁾; EMR 為所蒐集的種原中, 每次試驗分析的多型性基因座數量, 其公式為 E

$= n\beta$, $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$, n_p 與 n_{np} 分別係多型性與非多型性片段的數量；多型性分子標誌的平均異質性之公式 $H_{avp} = \sum H_{e_n} / n_p$ ；MI 為不同分子標誌的效率，是 EMR 和 H_{avp} 的乘積；D 為隨機選取兩個體間表現不同片段的機率，用以區分個體間差異。 R_p 為評估分子標誌區別能力，其公式為 $R_p = \sum I_b$ ， I_b 為每個片段上多型性資訊。接著利用 NTSYS pc ver 2.2 軟體繪製親緣樹圖與主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA)，透過 SimQual 模組計算 Dice 相似性係數⁽⁹⁾，並將其相似性係數之結果以 SAHN 模組進行群集分析，同時使用不加權算術平均值 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) 繪製相似性樹形圖 (dendrogram)；進行主座標分析時，以 Decnter 與 Eigene 模組繪製二維圖，釐清種原間相對遠近關係。

結果與討論

一、番茄種原性狀調查

蒐集 32 個番茄種原經育苗後定植於溫室，生長期間調查果實型態 (SHP)，其中 20 個品系為圓形 (R)，12 個品系為扁形 (FL)；未熟果顏色 (IFC)，其中 2 個品系為淺綠色 (LG)，28 個品系為綠色 (G)，2 個品系為深綠 (DG)；成熟果顏色 (RFC)，其中 25 品系為紅色 (R) 最多，2 個品系為暗紅色 (B)，5 個品系為粉紅色 (P)；而植株型態 (Hab)，其中 1 個品系為停心型 (DT)，14 個品系為半停心型 (SD)，17 個品系為非停心型 (IN) (表一)。

二、番茄分子標誌多型性篩選

為了穩定聚合酶連鎖反應條件，進行不同黏合溫度 (T_m) 50~60 °C 之引子測試，初步先以外表型歧異度較大之 3 個種原 SF19、SF25 與 SF28，測試從番茄 12 條染色體隨機挑選之 201 組引子，其中 181 組為 SSR 或 EST-SSR，20 組為 InDel 類型之引子⁽¹⁹⁾，接著決定各引子最適黏合溫度後，針對 32 個番茄種原進行遺傳歧異度分析，經過 3 次重複試驗，確認各引子再現性並計算增幅片段數，片段大小範圍約 100 bp 至 330 bp (圖一、圖二)。在 201 組分子標誌多型性篩選測試結果顯示 (表二)，除了在第 2、4、7 與 10 條染色體無挑選出適當的引子外，其餘染色體篩選出至少 1 組分子標誌，共計 20 組引子可增幅清晰且易判斷之單一條帶，多型性比率 (polymorphism percentage) 除了 T111 和 InDel 9 為 66.7%，其餘皆為 100%，其中 16 組為 SSR (8.8%)，4 組為 InDel (20%)，對偶基因數目 (allele number) 範圍介於 2~6 個，總計 71 個，平均每個引子可偵測到 3.6 個對偶基因，與 Joshi 等人研究結果相似，其利用 27 組 SSR 分子標誌分析 8 個番茄單雜交種 (single cross hybrid)，平均獲得 3.33 個對偶基因⁽¹³⁾。另一方面，Choudhary 等人以 25 組 SSR 分子標誌產生 68 個對偶基因，平均產生 2.72 個對偶基因⁽⁸⁾；He 等人利用 65 組多型性 SSR 引子分析 17 個番茄品種與 2 個親本，平均產生 2.7 個對偶基因⁽¹¹⁾；Liu 等人分析 192 個番茄種原，共有 547 組 InDel 分子標誌產生 1,295 個對偶基因，單一分子標誌平均產生 2.4 個對偶基因⁽¹⁶⁾，學者認為對偶基因數目與種原的起源地或種原遺傳 (genetic nature) 有關，包括遺傳多樣性或地理分布距離，較低的對偶基因數可解釋

為種原蒐集區域較窄小⁽⁴⁾，與前人研究結果相比，本研究平均每個基因座偵測到對偶基因數目稍高，推測原因係本研究所蒐集的番茄種原來自世界各地，其地理分布較廣泛。另外，也有研究結果顯示野生種之每個基因座產生較高的對偶基因數目，如 Frary 等人從 12 個 SSR 分子標誌比較番茄栽培種和野生種，前者每個分子標誌平均產生 2.4 個對偶基因，低於野生種平均產生 4.6 個對偶基因⁽¹⁰⁾。

表一、32 個番茄種原外表型態調查資料

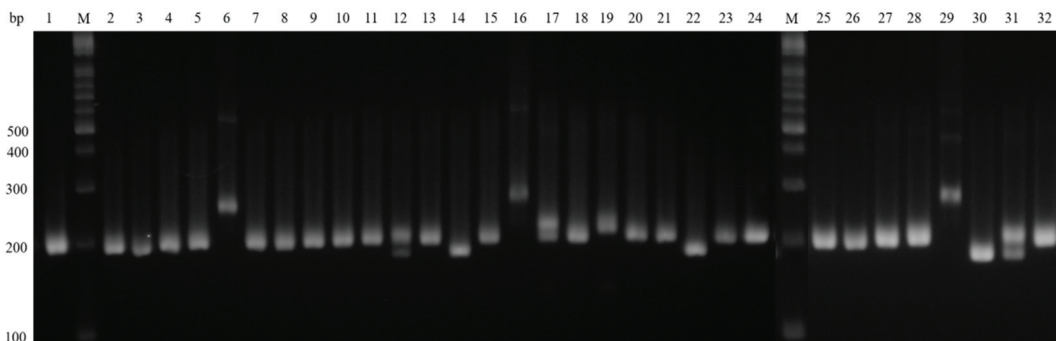
Table 1. The phenotypic survey information of 32 tomato accessions

Accession number	Internal code	SHP ¹	IFC	RFC	SZ	Hab
1	SF 1	FL	LG	R	L	IN
2	SF 2	FL	LG	R	L	IN
3	SF 3	R	G	R	ML	SD
4	SF 4	R	G	R	ML	IN
5	SF 5	R	G	R	L	IN
6	SF 6	FL	G	R	L	IN
7	SF 7	FL	G	R	L	IN
8	SF 8	R	G	R	L	SD
9	SF 9	R	G	R	ML	IN
10	SF 10	R	G	R	L	IN
11	SF 11	R	G	R	L	SD
12	SF 12	FL	G	R	L	IN
13	SF 13	R	G	R	ML	IN
14	SF 14	FL	G	R	L	IN
15	SF 15	FL	G	R	L	SD
16	SF 16	R	G	R	L	IN
17	SF 17	R	G	R	ML	SD
18	SF 18	FL	G	R	L	IN
19	SF 19	R	G	R	ML	SD
20	SF 20	R	G	R	ML	SD
21	SF 21	R	G	R	L	IN
22	SF 22	FL	G	R	L	SD
23	SF 23	R	G	R	L	DT
24	SF 24	R	DG	B	M	IN
25	SF 25	R	DG	B	M	SD
26	SF 26	R	G	P	ML	SD
27	SF 27	R	G	R	ML	SD
28	SF 28	FL	G	P	ML	IN
29	SF 29	FL	G	R	L	IN
30	SF 30	R	G	P	L	SD
31	SF 31	R	G	P	L	SD
32	SF 32	FL	G	P	L	SD

¹SHP is fruit shape: FL=flattened; R=round; IFC=immature fruit color; LG, G, DG are light green, green and dark green, respectively. RFC=ripe fruit color; R, B, P are red, bluish and pink, respectively; Hab=plant habit. DT=determinate; SD=semi-determinate; IN=indeterminate.

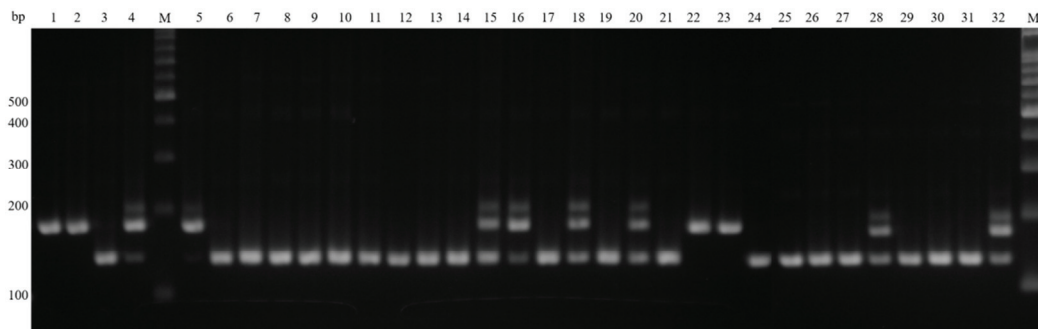
經 iMEC 網站分析遺傳歧異度參數 (表三)，其中共顯性分子標誌 (codominant marker) 之 He 和 PIC 最大值為 0.5，係因若每個基因座有 2 個對偶基因，皆受到對偶基因頻率和數量影響，且其紀錄值為 0 和 1，因此，數值愈高，表示該分子標誌鑑別力愈佳。每組引子之異質結合個體期望值

(He)介於 0.117 (T139)至 0.497 (T163 和 InDel 19)，平均為 0.428，與 Mazzucato 等人研究結果 He 值為 0.44 相似，而 He 值愈高表示其基因座的對偶基因數較具有異質結合個體 (heterozygote) 之可能性。本次分析之 PIC 的範圍介於 0.334 (T163 和 InDel 19)至 0.451 (T139)，平均為 0.362；16 個 SSR 引子之 PIC 平均為 0.364，4 個 InDel 引子之 PIC 平均為 0.356。Phan 等人以 6 個 SSR 和 35 個 InDel 引子分析 62 個番茄 F₁ 品種，PIC 值範圍介於 0.243 至 0.375，平均 0.350⁽²¹⁾，與本研究分析結果類似；單一引子所增幅之多型性片段以 T49、T56 與 T171 產生 6 個片段最多，T18、T26、T44、T139 與 InDel 17 產生 2 個片段最少。研究指出，SSR 分子標誌產生的對偶基因數與分析材料的來源或其遺傳種質資源如遺傳多樣性或地理距離相關，因此，較少的對偶基因數推測是蒐集材料的地理區域較狹窄⁽⁴⁾。分子標誌可作為作物基因型分類的依據之一，從分子層次鑑定，具有節省栽培時間與地力的便利性，並提供與性狀相關的分子標誌作為生物性狀調查之工具⁽⁸⁾，例如 Mazzucato 等人利用 InDel 分子標誌，區分野生種與栽培種外，也從 F₂ 族群定位與果重、可溶性固形物、果形和果色等性狀有關的分子標誌⁽¹⁷⁾；Umar 等人則利用與鹽分調控的候選基因設計 SSR 引子，分析對鹽分耐受性不同的番茄種原之基因型多樣性，並藉由遺傳距離結果作為後續雜交親本選擇之依據⁽²⁴⁾。



圖一、以 SSR 分子標誌 (T173)對 32 個番茄種原增幅之結果

Figure 1. Amplification profile of 32 tomato accessions with the SSR marker (T173)



圖二、以 InDel 分子標誌 (InDel 19)對 32 個番茄種原增幅之結果

Figure 2. Amplification profile of 32 tomato accessions with the InDel marker (InDel 19)

表二、16 組 SSR 和 4 組 InDel 分子標誌序列與多型性統計

Table 2. Sequences and polymorphic survey of 16 SSR and 4 InDel markers

Marker	Primer Sequence (5'→3')	Marker type	Ch ¹	Na	P%	Size range (bp)
T4	F:AATGTCCTTCGTATCCTTTCGT R:CTCGGTTTTAATTTTTGTGTCT	SSR	5	5	100	181-217
T9	F:GTTTTTTCAACATCAAAGAGCT R:GGATAGGTTTCGTTAGTGAAC	SSR	9	4	100	189-228
T18	F:GAAGAAGATGGTGGGGATGA R:CTTGCAACAATCGTGAATGC	SSR	9	2	100	114-121
T26	F:GGACCAAGCGAAGTTGGATA R:CGAGTGTTCGCTTCTCCTC	SSR	9	2	100	167-189
T44	F:GCTCTGTCCTTACAAATGATACCTCC R:CAATGCTGGGACAGAAGATTTAATG	SSR	1	2	100	107-114
T49	F:CGGCGTATTCAAACCTTTGG R:GCGGACCTTTGTTTTGGTAA	SSR	5	6	100	117-659
T56	F:ACAAACTCAAGATAAGTAAGAGC R:GTGAATTGTGTTTTAACATGG	SSR	12	6	100	129-193
T65	F:ATGCACGCAAAGGTTATTCC R:AGTCGAAGTTGGCTTGACCA	SSR	6	5	100	119-206
T111	F:ATCCATCTCCACCACCAAG R:TGGAGTTGCCATTCAAAA	SSR	12	3	66.7	127-141
T139	F:TCAACAGCATAGTGAGGAGG R:TCCTCGGTAATTGATCCACC	SSR	5	2	100	193-210
T163	F:GCAGGTACGCACGCATATAT R:GCTCCGTCAGGAATTCTCTC	SSR	1	3	100	170-212
T165	F:AGCTTCATCCATTACGCCAC R:GTGCATCTGGCGTACCTACC	SSR	12	4	100	278-330
T166	F:CCACAAACAATTCCATCTCA R:GCTTCCGCCATACTGATACG	SSR	8	4	100	215-284
T171	F:TTCTTCCCTTCCATCAGTTCT R:TTTGCTGCTATACTGCTGACA	SSR	3	6	100	185-213
T173	F:TCCTCAAGAAATGAAGCTCTGA R:CCTTGGAGATAACAACCACAA	SSR	6	3	100	180-210
T181	F:GAAACAACAAGTGCTGCATGG R:CTTTTCCATTTATCCCGTAAAA	SSR	12	3	100	190-220
InDel 9	F:TAGGTCAACCTACGCCTGCT R:AGGACCCTTCCATTTTAGCC	InDel	5	3	66.7	170-200
InDel 17	F:TCAAACGAAGATAGGAGTAAGAT R:TGGAACATTGAAGAACAGGT	InDel	11	2	100	200-220
InDel 18	F:GGGCTTGGTTCTTGTGATGA R:GATGGCACATTTCCCTTGGAT	InDel	11	3	100	130-200
InDel 19	F:GAAGCAGATGATGTTTTGGCT R:AGCCTTCTGCGCTTTATTCA	InDel	12	3	100	100-160
Total				71		
Average				3.6		

¹Ch=chromosome; Na=number of alleles; P=polymorphism percentage.

表三、32 番茄種原之分子標誌序列與多型性分析結果

Table 3. Diversity indexes of 16 SSR and 4 InDel markers for population level analysis in the 32 tomato accessions

Marker	He ¹	PIC	EMR	Havp	MI	D	R
T4	0.375	0.387	1.250	0.002	0.003	0.939	1.250
T9	0.430	0.365	1.250	0.003	0.004	0.904	2.000
T18	0.488	0.338	1.156	0.008	0.009	0.670	1.688
T26	0.488	0.338	1.156	0.008	0.009	0.670	0.438
T44	0.492	0.336	1.125	0.008	0.009	0.688	0.750
T49	0.336	0.401	1.281	0.002	0.002	0.955	1.688
T56	0.437	0.362	1.938	0.002	0.004	0.897	3.500
T65	0.415	0.371	1.469	0.003	0.004	0.915	2.188
T111	0.457	0.353	1.063	0.005	0.005	0.877	0.250
T139	0.117	0.451	0.125	0.002	0.000	0.997	0.250
T163	0.497	0.334	1.375	0.005	0.007	0.793	1.125
T165	0.492	0.336	1.750	0.004	0.007	0.811	2.625
T166	0.456	0.354	1.406	0.004	0.005	0.878	1.563
T171	0.359	0.393	1.406	0.002	0.003	0.946	1.813
T173	0.469	0.348	1.125	0.005	0.005	0.862	2.000
T181	0.463	0.350	1.094	0.005	0.005	0.870	1.063
InDel 9	0.385	0.383	0.781	0.004	0.003	0.934	1.438
InDel 17	0.482	0.341	1.188	0.008	0.009	0.651	0.375
InDel 18	0.430	0.365	2.063	0.004	0.009	0.530	1.375
InDel 19	0.497	0.334	1.375	0.005	0.007	0.793	1.750
Average	0.428	0.362	1.269	0.004	0.005	0.829	1.456

¹He= expected heterozygosity; PIC= polymorphic information content; EMR= effective multiplex ratio; Havp = mean heterozygosity; MI= marker index; D= discriminating power; R= resolving power.

有學者推估番茄栽培種之遺傳多樣性 (genetic diversity)，與野生種相比，僅保留不到 5% 的對偶基因多樣性 (allelic diversity)，原因之一為番茄長期馴化過程是透過自花授粉，造成多樣性降低⁽¹⁸⁾；直到 1946 年利用種間雜交方式，使野生種和栽培種間發生基因流 (gene flow)，即透過基因重組方式，在栽培種產生更多具經濟價值之性狀表現，其中以野生種番茄導入抗病性的相關研究成果最多⁽¹³⁾。本研究為了達成抗病新品種之育種目標，近年來陸續蒐集抗病種原，因此，推測此 32 個種原的抗病基因由野生種番茄引入，而抗病基因兩側的染色體片段亦透過雜交育種程序，造成染色體片段交換，由此推斷，上述具多型性之分子標誌，係區分野生種與栽培種番茄之染色體交換的區域。

三、番茄種原群集分析

將具有多型性之 SSR 和 InDel 分子標誌 (T4、T9、T163、T165、T171、T173 和 InDel 18)，進一步比對這些分子標誌所在染色體位置，如 T9 推估與番茄果寬 (fruit width) 性狀相關⁽²⁰⁾，T163 推測與番茄果實形狀相關⁽¹⁷⁾；另外透過 NCBI 網站 BLAST 功能檢視 T4 位於乙烯合成 ACS4 基因，推測與番茄果實成熟調控相關；T165 與 tyrosine-specific transport protein 有關；T171 預測與

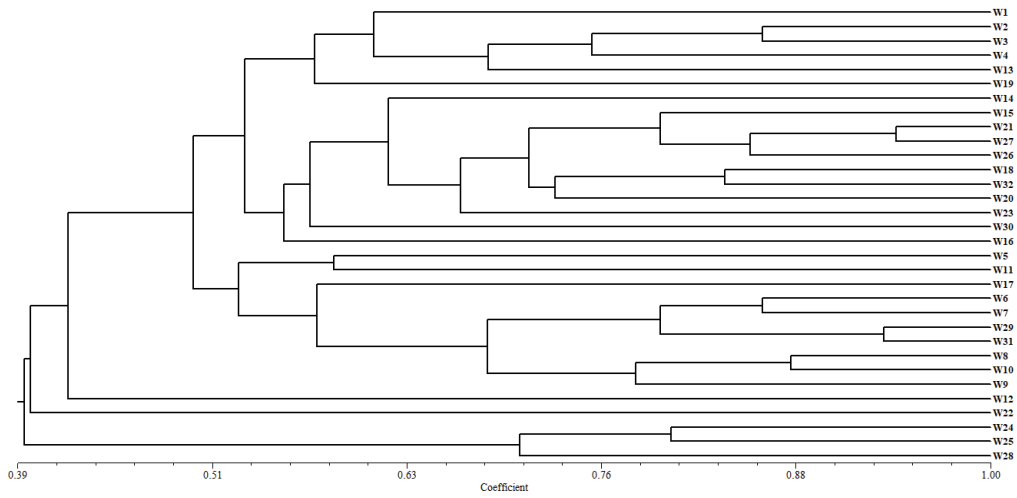
WEB Family protein *At3g02930* 基因有關; T173 預測與 pectinesterase 有關; Indel 18 預測與 NRT1/PTR family 有關。接著進行群集分析和主座標分析, 利用 Dice 相似度公式, 計算種原間相似度 (S_{AB}), 建立相似度矩陣 (S_{DAB})⁽⁹⁾, 估算遺傳係數範圍介於 0.000~0.941, 以 SF21 和 SF27 之相似度最高, SF29 和 SF31 次之, SF2 和 SF24 或 SF25 相似度最低 (表四), 再依據 UPGMA 進行群集分析並製成樹狀圖 (圖三), 在相似度 0.40 處將 32 個番茄種原分成 I、II、III 三群, 第 I 群包含 28 個種原, 第 II 群包含 1 個種原 (SF22), 第 III 群包含 3 個種原 (SF24、SF25 和 SF28)。主座標分析可以將種原間的遺傳歧異度與親緣關係以二維的方式呈現, 前兩個主座標解釋量達 40.2%, 其中 Dim-1 解釋量為 23.7%, Dim-2 解釋量為 16.5% (圖四), 其中 SF24、SF25 和 SF28 等 3 個種原為一群, 與群集分析結果相同, 另一群分布較為分散。部分種原間相似度較高, 推測係因種苗公司蒐集品種的來源較限縮, 且可能長期以相同育種目標進行選拔淘汰, 因此, 導致部分種原間歧異度較低。

以植株外表型調查結果比較, SF21 和 SF27 在果色和果型皆相同, 但植株型態分別為非停心型與半停心型。前人研究指出番茄外表型變異性豐富, 但品種間遺傳變異性 (genetic variation) 僅約 5%⁽¹⁷⁾; Chen 等人分析從 4 個研究單位蒐集之 216 份番茄材料, 包含栽培種、雜交種與自交系等, 在果實性狀如大小、形狀、顏色與重量和植株型態之變異性大, 但從 SSR 和 SNP 分子標誌探討之遺傳變異性為 19.16%, 係因該研究從數個 *S. lycopersicum* 品系間找到多型性 SSR 分子標誌, 而 SNP 分子標誌則根據 *S. pennellii* TA56 和 *S. lycopersicum* TA209 之兩者的多型性所開發, 因次, 在所蒐集的番茄族群間之多型性比率為 4~25%⁽⁷⁾。綜言之, 開發高通量的多型性分子標誌有助提高外表型和遺傳變異性的關聯性, 且應嘗試擴大種原的變異性, 包括從各地蒐集或交換種原, 以有效培育新品種。

表四、32 個番茄種原 SSR 基因型的相似性係數

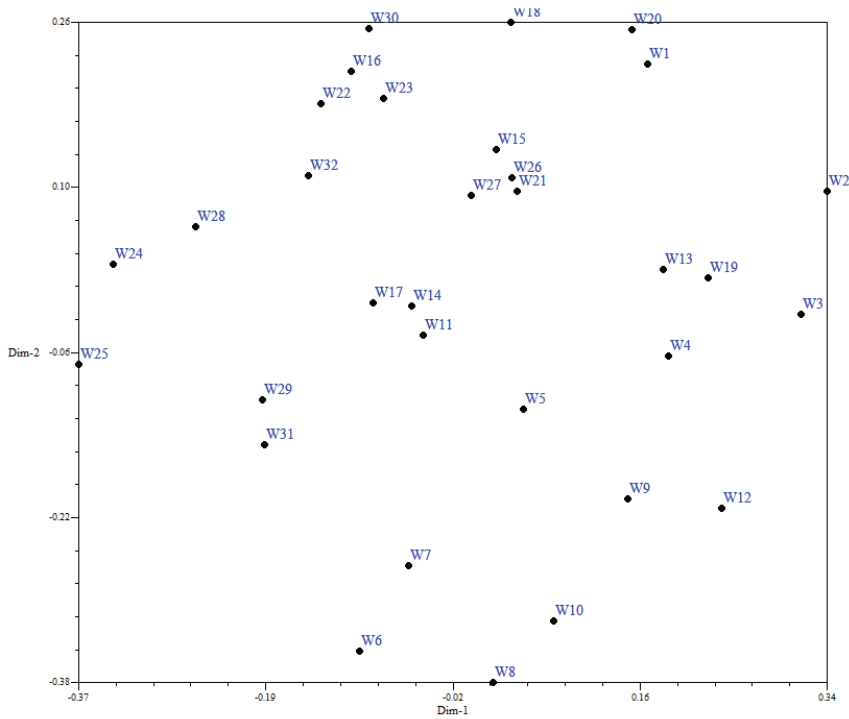
Table 4. Dice coefficients of similarity based on SSR data among 32 tomato accessions

W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19	W20	W21	W22	W23	W24	W25	W26	W27	W28	W29	W30	W31	W32				
W1	1.000																																		
W2	0.714	1.000																																	
W3	0.571	0.857	1.000																																
W4	0.500	0.750	0.750	1.000																															
W5	0.353	0.471	0.471	0.526	1.000																														
W6	0.286	0.286	0.429	0.500	0.588	1.000																													
W7	0.429	0.429	0.571	0.625	0.471	0.857	1.000																												
W8	0.267	0.400	0.533	0.588	0.667	0.800	0.800	1.000	0.778																										
W9	0.471	0.588	0.706	0.632	0.600	0.588	0.706	0.778	1.000																										
W10	0.267	0.533	0.667	0.706	0.556	0.667	0.800	0.875	0.778	1.000																									
W11	0.571	0.429	0.571	0.375	0.588	0.571	0.714	0.533	0.588	0.533	1.000																								
W12	0.286	0.571	0.714	0.625	0.471	0.571	0.429	0.533	0.588	0.533	0.286	1.000																							
W13	0.667	0.667	0.800	0.588	0.444	0.533	0.667	0.500	0.667	0.500	0.667	0.533	1.000																						
W14	0.235	0.471	0.588	0.526	0.400	0.471	0.588	0.556	0.600	0.667	0.471	0.353	0.444	1.000																					
W15	0.556	0.556	0.556	0.600	0.667	0.444	0.556	0.526	0.667	0.526	0.556	0.333	0.632	0.571	1.000																				
W16	0.381	0.381	0.381	0.522	0.417	0.286	0.381	0.273	0.333	0.364	0.476	0.190	0.455	0.583	0.560	1.000																			
W17	0.444	0.333	0.444	0.500	0.286	0.556	0.556	0.526	0.476	0.526	0.444	0.444	0.421	0.571	0.545	0.480	1.000																		
W18	0.526	0.632	0.632	0.667	0.545	0.316	0.421	0.300	0.455	0.400	0.526	0.421	0.600	0.545	0.783	0.692	0.522	1.000																	
W19	0.429	0.571	0.714	0.500	0.471	0.286	0.429	0.533	0.706	0.533	0.429	0.429	0.667	0.471	0.667	0.286	0.444	0.526	1.000																
W20	0.588	0.706	0.706	0.757	0.500	0.235	0.353	0.333	0.500	0.444	0.353	0.471	0.556	0.600	0.762	0.583	0.571	0.818	0.588	1.000															
W21	0.500	0.625	0.750	0.556	0.421	0.500	0.625	0.471	0.632	0.588	0.625	0.500	0.706	0.737	0.800	0.522	0.700	0.762	0.625	0.737	1.000														
W22	0.444	0.333	0.222	0.400	0.190	0.333	0.444	0.316	0.286	0.316	0.222	0.111	0.316	0.476	0.455	0.480	0.455	0.522	0.222	0.476	0.400	1.000													
W23	0.533	0.533	0.400	0.353	0.444	0.400	0.533	0.375	0.444	0.375	0.533	0.133	0.500	0.667	0.737	0.455	0.421	0.600	0.400	0.556	0.706	0.632	1.000												
W24	0.133	0.000	0.133	0.235	0.222	0.400	0.400	0.250	0.222	0.250	0.400	0.133	0.250	0.444	0.316	0.455	0.421	0.400	0.133	0.222	0.353	0.421	0.375	1.000											
W25	0.143	0.000	0.143	0.250	0.353	0.571	0.571	0.400	0.353	0.400	0.571	0.143	0.267	0.471	0.444	0.476	0.556	0.421	0.143	0.235	0.500	0.333	0.400	0.800	1.000										
W26	0.533	0.533	0.667	0.471	0.444	0.533	0.533	0.500	0.556	0.375	0.533	0.533	0.750	0.556	0.737	0.455	0.632	0.700	0.667	0.667	0.824	0.421	0.625	0.375	0.400	1.000									
W27	0.533	0.533	0.667	0.471	0.444	0.533	0.667	0.500	0.667	0.500	0.667	0.400	0.750	0.667	0.842	0.455	0.632	0.700	0.667	0.667	0.941	0.421	0.750	0.375	0.533	0.875	1.000								
W28	0.333	0.222	0.222	0.400	0.667	0.556	0.444	0.421	0.381	0.316	0.556	0.222	0.316	0.476	0.636	0.640	0.545	0.609	0.222	0.476	0.500	0.364	0.526	0.632	0.778	0.526	0.526	1.000							
W29	0.286	0.286	0.429	0.500	0.353	0.714	0.857	0.667	0.588	0.667	0.571	0.286	0.533	0.706	0.667	0.476	0.667	0.526	0.429	0.471	0.750	0.556	0.667	0.533	0.714	0.667	0.800	0.556	1.000						
W30	0.571	0.286	0.429	0.500	0.235	0.286	0.429	0.267	0.353	0.267	0.571	0.143	0.533	0.471	0.556	0.571	0.556	0.526	0.429	0.588	0.625	0.556	0.533	0.400	0.429	0.667	0.667	0.444	0.571	1.000					
W31	0.267	0.267	0.400	0.471	0.444	0.800	0.800	0.750	0.556	0.625	0.533	0.400	0.500	0.667	0.632	0.455	0.737	0.500	0.400	0.444	0.706	0.526	0.625	0.500	0.667	0.750	0.750	0.632	0.933	0.533	1.000				
W32	0.421	0.421	0.421	0.571	0.636	0.526	0.632	0.500	0.545	0.500	0.632	0.211	0.500	0.636	0.783	0.692	0.522	0.833	0.421	0.636	0.667	0.609	0.700	0.500	0.632	0.600	0.700	0.783	0.737	0.526	0.700	1.000			



圖三、32 個番茄種原以 UPGMA 群集分析之樹狀圖

Figure 3. The dendrogram of 32 tomato accessions constructed using the unweighted pair group mean algorithm(UPGMA). The X-axis is indicated the similarity coefficient of Dice



圖四、32 個番茄種原之主座標分析

Figure 4. Principal coordinates analysis for 32 tomato accessions

結 論

本研究利用 DNA 分子標誌分析 32 個番茄種原的遺傳歧異度，其中 20 個分子標誌具多型性，其中 16 個為 SSR、4 個為 InDel，PIC 介於 0.334 至 0.451，在遺傳相似係數 0.40 處被劃分成 3 大類，種原編號 SF21 和 SF27 最相近，而 SF2 與 SF24 或 SF25 遺傳親源關係距離較遠。以外表性狀較無法將種原分類，而透過 SSR 和 InDel 分子標誌於各種原分析其對偶基因頻度，較能顯示種原間變異程度，可協助育種人員管理核心育種材料，提升種原保管及擴大遺傳變異之效益，加速育種工作之速率，作為未來自交系雜交培育品種之參考依據。

誌 謝

本研究由農委會科技計畫補助(計畫名稱：全紅番茄分子標誌輔助抗黃化捲葉病毒育種及快速育成自交系之應用，計畫編號：107 農科-7.6.5-中-D1)，承蒙本場蔬菜研究室提供育種材料與協助田間栽培，本場生物技術與農產加工研究室賴月櫻小姐協助分生試驗分析，謹致謝忱。

參考文獻

1. 劉依昌 2017 台灣番茄的品種演進及迷思 科學發展 533: 42-47。
2. Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.
3. Mordor Intelligence. 2019. Global Tomato Seeds Market - Growth, Trends, and Forecasts (2019-2024). India. Retrieved from <https://www.researchandmarkets.com/reports/4760165/global-tomato-seeds-market-growth-trends-and>
4. Aguirre, N. C., W. López, M. Orozco-Cárdenas, Y. M. Coronado and F. Vallejo-Cabrera. 2017. Use of microsatellites for evaluation of genetic diversity in cherry tomato. *Bragantia* 76: 220-228.
5. Amiryousefi, A., J. Hyvönen and P. Poczai. 2018. iMEC: online marker efficiency calculator. *Appl. Plant Sci.* 6: e01159. doi:10.1002/aps3.1159
6. Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
7. Chen, J., H. Wang, H. Shen, M. Chai, J. Li, M. Qi and W. Yang. 2009. Genetic variation in tomato populations from four breeding programs revealed by single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat markers. *Sci. Hort.* 122: 6-16.
8. Choudhary, P., G. K. Rai, S. Bagati, D. Jamwal, D. Bhadwal, V. R. Shanti and P. K. Rai. 2018. Evaluation of genetic variability in tomato (*Solanum lycopersicum* L. Mill) genotypes using microsatellite Markers. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 2117-2124.

9. Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecol.* 26: 297-302.
10. Frary, A., Y. Xu, J. Liu, S. Mitchell, E. Tedeschi and S. Tanksley. 2005. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theor. Appl. Genet.* 111: 291–312.
11. He, C., V. Poysa and K. Yu. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106: 363–373.
12. Iqbal, M. A., J. Sarika, V. Arora, N. Verma, A. Rai and D. Kumar 2013. First whole genome based microsatellite DNA marker database of tomato for mapping and variety identification. *BMC Plant Biol.* 13: 197. doi.org/10.1186/1471-2229-13-197
13. Joshi, V. and O. Sridevi. 2018. Assessment of genetic diversity in hybrids of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using SSR markers. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 946-951.
14. Kaur, S., A. K. Singh and S. Bagati. 2018. Assessment of genetic diversity in cultivated tomato (*Solanum lycopersicon* L.) genotypes using molecular markers. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 2129-2143.
15. Korir, N. K., W. Diao, R. Tao, X. Li, E. Kayesh, A. Li, W. Zhen and S. Wang. 2014. Genetic diversity and relationships among different tomato varieties revealed by EST-SSR markers. *Genet. Mol. Res.* 13: 43-53.
16. Liu, X., X. Geng, H. Zhang, H. Shen and W. Yang. 2017. Association and genetic identification of loci for four fruit traits in tomato using InDel markers. *Front. Plant Sci.* 8: 1269. doi:10.3389/fpls.2017.01269
17. Mazzucato, A., R. Papa, E. Bitocchi, P. Mosconi, L. Nani, V. Negri, M. E. Picarella, F. Siligato, G. P. Soressi, B. Tiranti and F. Veronesi. 2008. Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor. Appl. Genet.* 116: 657-669.
18. Miller, J. C. and S. D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
19. Ohyama, A., K. Shirasawa, H. Matsunaga, S. Negoro, K. Miyatake, H. Yamaguchi, T. Nunome, H. Iwata, H. Fukuoka and T. Hayashi. 2017. Bayesian QTL mapping using genome-wide SSR markers and segregating populations derived from a cross of two commercial F₁ hybrids of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 130: 1601-1616.
20. Pawar, P., P. H. R. Gowda, Ramegowda and P. Ravishankar. 2016. Phenotypic evaluation and

- molecular characterization of *alc* / vaibhav recombinant inbred population of tomato for yield , shelf life and fruit quality parameters. *Int. J. Agron. Agric. Res.* 8: 25-36.
21. Phan, N. T., M. K. Kim and S. C. Sim. 2016. Genetic variations of F₁ tomato cultivars revealed by a core set of SSR and InDel markers. *Sci. Hortic.* 212: 155-161.
 22. Rajae, A., D. Mingeot, M. Addi, A. Elamrani, H. C. Serghini, A. Mihamou and M. Abid. 2017. Genetic assessment of Moroccan Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes by RAPD and SSR markers. *Atlas J. Biol.* 384-391. doi:10.5147/ajb.v0i0.136.
 23. Saravanan, K. R., R. Rajaram and P. Renganathan. 2004. Studies on genetic diversity using SSR marker associated traits in tomato genotypes (*Lycopersicon esculentum* L.). *European J. Biotechnol. Biosci.* 1:26-29.
 24. Umar, J., A. A. Aliyu, S. Kasimu and A. Lawali. 2018. Identification and analysis of salt responsive candidate gene based on SSRs from tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Int. J. Cell Sci. and Mol. Biol.* 5: 555653. doi:10.19080/IJCSMB.2018.05.555653.
 25. Zhou, R., Z. Wu, F. L. Jiang and M. Liang. 2015. Comparison of gSSR and EST-SSR markers for analyzing genetic variability among tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.). *Genet. Mol. Res.* 14: 13184-13194.

Genetic Diversity of Tomato Germplasm Assessed by Molecular Markers¹

Ching-Hsia Wu and Yu-Heng Lin²

ABSTRACT

Tomato is one of the most important vegetable crops in the world. Genetic diversity estimation of core germplasm is essential for the further breeding program. In this study, we collected thirty-two tomato germplasm from local seed company and investigated horticultural characteristics. The objective of this study is to evaluate the genetic diversity by using simple-sequence repeats (SSRs) and InDel molecular markers. Phenotypic data of fruit shape revealed 20 were round-shaped lines and 12 were flattened-shaped lines. Investigation of plant habit showed that one line was determinate, 14 lines were semi-determinate and 17 lines were indeterminate. The results of 16 SSR and 4 InDel markers indicated that DNA fragments were ranged from 100 to 330 bp and a total of 71 alleles were detected at an average of 3.6 alleles per marker locus. The highest polymorphic information content (PIC) value was determined as 0.451 for marker T139, whereas marker T136 and InDel 19 had the lowest value of 0.334. The UPGMA cluster analysis grouped 32 tomato genotypes into 3 main clusters. Cluster I and III comprised 28 and 3 genotypes, respectively. A single tomato genotype SF22 was grouped in cluster II. The genetic diversity observed within the 32 tomato genotypes will prove to be of significance for germplasm classification, management, and further utilization in tomato breeding program.

Key words:tomato, simple sequence repeat, genetic diversity, molecular marke

¹Contribution No.0957 from Taichung DARES, COA.

²Assistant Researcher, of Taichung DARES, COA.

