

茄子 IRAP 和 REMAP 分子标记的开发

王利英^{1,2}, 杜永臣^{1*}, 张 斌², 石 瑶², 王秋锦³, 赵福宽³

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 天津科润蔬菜研究所, 天津 300384; ³ 北京农学院生物技术系, 北京 102206)

摘 要: 根据烟草和大麦中反转录转座子 Bare-1 和 Tto1 的 LTR 保守区域设计引物, 对 14 份茄子材料进行 PCR 扩增, 分别采用琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物, 建立了茄子 IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) 和 REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) 分子标记技术体系。两种方法均得到了多态性丰富的指纹图谱, 为茄子品种鉴定和指纹图谱构建提供了新途径。

关键词: 茄子; 分子标记; 反转录转座子; IRAP; REMAP

中图分类号: S 641.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 09-1363-05

Development of Molecular Markers IRAP and REMAP in Eggplant

WANG Li-ying^{1,2}, DU Yong-chen^{1*}, ZHANG Bin², SHI Yao², WANG Qiu-jin³, and ZHAO Fu-kuan³

(¹ *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*; ² *Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, Tianjin 300384, China*; ³ *Department of Biological Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China*)

Abstract: Primers were designed based on LTR reserve region of Bare-1 and Tto1 in tobacco and barley. Fourteen varieties of eggplant were used as experimental materials for PCR amplification. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis were adopted to detect amplification products and the technique of IRAP and REMAP molecular marker were constructed. Polymorphic fingerprints were obtained using two methods (IRAP and REMAP), new methods were developed for variety appraisal and fingerprint in eggplant.

Key words: eggplant; molecular marker; retrotransposon; IRAP; REMAP

反转录转座子广泛存在于植物基因组中, 是目前所知数量最大的一类可活动因子 (McAllister & Werren, 1997), 根据是否具备长末端重复序列 LTR (long terminal repeat) 可分为 LTR 型和非 LTR 型反转录转座子 (陈志伟和吴为人, 2004), 目前研究较多的是 LTR 型反转录转座子。近年来, 几种基于反转录转座子的分子标记技术在遗传多样性 (Ellis et al., 1998)、品种鉴定 (Breto et al., 2001) 和连锁图谱构建 (Manninen et al., 2000) 等方面得到了广泛应用。

IRAP 和 REMAP 是 Kalendar 等 (1999) 基于大麦的反转录转座子首先开发出来两种检测效率高、重复性强的分子标记方法。REMAP 根据反转录转座子两端的 LTR 保守序列和微卫星序列设计引物, 检测反转录转座子与简单重复序列之间的多态性。IRAP 根据反转录转座子两端的 LTR 保守序列设计引物, 检测相邻同一家族的反转录转座子插入位点间的多态性。

植物反转录转座子具有较高的相似性, 相同类型的反转录转座子保守性较强。然而同一植物内相同类型的反转录转座子又具有高度的异质性。因而本研究中参照茄科作物或其它作物的反转录转座子

收稿日期: 2008-03-04; 修回日期: 2008-08-11

基金项目: 农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yongchen.du@mail.caas.net.cn)

致谢: 感谢中国农业科学院蔬菜花卉研究所徐东辉博士对本试验给予的指导和帮助。

设计引物,进行茄子相关分子标记的研究。目前基于反转录转座子的分子标记技术在番茄、辣椒 (Sheh et al., 2005)、烟草 (肖炳光和杨本超, 2006) 等茄科作物的遗传多样性研究中已有报道。育种工作者先后用 RAPD 和 ISSR 方法对茄子部分品种和资源进行了遗传多样性分析及亲缘关系鉴定 (封林林 等, 2002; 毛伟海 等, 2006; 陈杰, 2007), 而基于反转录转座子的标记方法尚未见应用, 茄子中有关 LTR 型反转录转座子的全序列也尚未见报道。

作者试图通过 IRAP 和 REMAP 方法构建部分品种的指纹图谱, 为进一步开展茄子品种鉴定和遗传多样性分析提供新的借鉴, 同时为茄子反转录转座子的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2006 年 10 月—2007 年 4 月在北京农学院生物技术系实验室进行。14 份茄子材料 (表 1) 同时播种, 长至 7~8 片叶时随机选取 3~5 株, 各采 1 片心叶混合, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA。

表 1 材料编号及来源

Table 1 The varieties and their sources in the experiment

编号 No.	品种 Variety	果形 Fruit shape	果色 Fruit colour	来源 Origin
1	黑珍长茄 Heizhen Changqie	细长形 Slim long	紫黑 Dark purple	中国 China
2	耐热黑无敌 Naire Heiwudi	圆形 Round	黑亮 Black shining	中国 China
3	黑圆 40 茄 Heiyuan 40 Qie	圆形 Round	紫黑 Dark purple	中国 China
4	大茼茄 Damin Qie	圆形 Round	紫红 Aubergine	中国 China
5	黑龙王长茄 Heilongwang Changqie	长形 Long	紫黑 Dark purple	韩国 Korea
6	巨丰茄 Jufeng Qie	椭圆形 Ellipse	深紫 Thick purple	中国 China
7	加州紫茄王 Jiazhou Ziqiewang	长形 Long	紫黑 Dark purple	美国 America
8	超九叶茄 Chaojiuye Qie	扁圆形 Oval	紫黑 Dark purple	中国 China
9	EGGPLANT	短棒形 Short virgate	深紫 Thick purple	意大利 Italy
10	神园长茄 Shenyuan Changqie	长形 Long	紫黑 Dark purple	日本 Japan
11	京茄二号 Jingqie 2	圆形 Round	紫黑 Dark purple	中国 China
12	红玉茄子 Hongyu Qiezi	扁圆形 Oval	紫红 Aubergine	中国 China
13	京丰九叶茄 Jingfeng Jiuyeqie	圆形 Round	紫黑 Dark purple	中国 China
14	京海黑美 Jinghai Heimei	卵形 Ellipse	紫黑 Dark purple	中国 China

由于目前茄子相关遗传信息很少, 还没有 LTR 型反转录转座子全序列的报道, 所以分别选用了已报道的烟草和大麦的反转录转座子 Bare-1 和 Tto1 的 LTR 保守区域设计引物 (表 2), 两个反转录转座子都是 Copia 类型。IRAP 根据 Tto1 设计为单引物; REMAP 为双引物, 正向引物为简单重复序列 (GA)₉C, 反向引物根据 Bare-1 设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 RAP 和 REMAP 引物

Table 2 Primers of IRAP and REMAP

反转录转座子 Retrotransposon	来源 Source	标记 Marker	引物 Primer	序列 Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
Bare-1	大麦 Barley	REMAP	RK	Reverse: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGTTATC Forward: (GA) ₉ C	52
Bare-1	大麦 Barley	IRAP	P _{8.4}	Reverse: CAGCACACGTACAACACG Forward: AGGATGACCTCATTGATTACC	48
Tto1	烟草 Tobacco	IRAP	X ₂	TCCGCTGTGCAGTAGTGTCTTAGTG	54

1.2 IRAP 和 REMAP 反应体系及 PCR 程序设定

IRAP 和 REMAP 两种标记方法的引物设计原则存在区别, 但反应体系相同。因此本试验前期以

IRAP 所设计引物进行体系优化, 并应用两种方法构建指纹图谱。反应体系确定为 20 μL 。其中包括: 1 \times PCR 缓冲液, 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 6 μmol 引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA 30 ng。PCR 扩增反应程序设定为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度根据不同引物设定, 时间为 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

1.3 PCR 产物检测

1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 上样量 10 μL (1 μL 负载缓冲液和 9 μL PCR 产物), EB 染色。6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 上样量 3 μL (2 μL PCR 产物和 1 μL 负载缓冲液), 银染检测。Bio-Rad Gel DocTM XR 凝胶成像系统采集图像。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的检测结果比较

图 1 为引物 $P_{8.4}$ 对 14 份材料扩增产物采用不同方式凝胶电泳结果。琼脂糖电泳共扩增出 8 条带, 其中 2 条为共有带 (图 1, A 中箭头所示)。而聚丙烯酰胺电泳共显示出 22 带, 其中 4 条为共有带 (图 1, B 中箭头所示)。在 500 ~ 1 000 bp 之间聚丙烯酰胺凝胶上检测到至少 5 种琼脂糖凝胶电泳上没有检测到的带型, 一些在琼脂糖凝胶电泳上分辨不清的弱带在聚丙烯酰胺上能够清楚地显示。以 3 号 DAN 为例, 聚丙烯酰胺凝胶电泳在 250 ~ 1 000 bp 之间检测到了 5 条琼脂糖电泳没有显示的条带。所以, 应采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测产物。Leigh 等 (2003) 的研究也表明, IRAP 扩增出的带较多, 琼脂糖凝胶很难检测, 宜采用分辨率更高的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

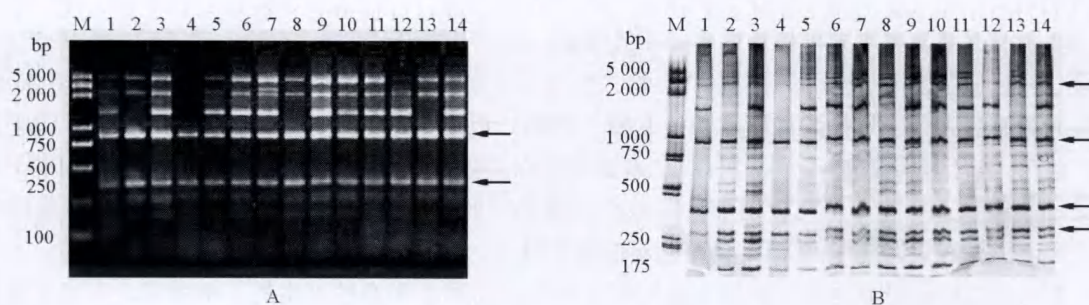


图 1 琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果比较

引物: $P_{8.4}$ 。A: 琼脂糖凝胶电泳结果; B: 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果; 1~14 品种名称见表 1。箭头示共有带。

Fig. 1 Comparison of electrophoresis by agarose and polyacrylamide gel

Primer: $P_{8.4}$. A: Agarose gel; B: Polyacrylamide gel; 1~14. The cultivar names are in Table 1. Arrows show common bands.

2.2 不同标记方法对 14 份材料的扩增结果

经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, REMAP 和 IRAP 两种方法在 14 份材料上都扩增出了多态性丰富的谱带, 每份材料都有其独特的指纹图谱, 这两种分子标记可以应用为茄子指纹图谱构建和品种鉴定。同时也说明茄子中存在 *Copia* 类型的反转录转座子, 且具有高度的异质性。

REMAP 扩增范围为 400 ~ 2 000 bp, 在 750 ~ 1 700 bp 共扩增出了 29 种带型, 有 3 条大约为 1 700、1 000 和 500 bp 的共有带, 差异带率为 89.7%, 在不同材料间扩增出的带数介于 5 ~ 17 条。IRAP 的扩增范围为 300 ~ 3 000 bp, 共扩增出了 30 种带型, 仅有一条大约为 3 000 bp 的共有带, 差异带率为 96.7%, 不同材料间扩增出的带数为 2 ~ 17 条。

8 号超九叶茄和 13 号京丰九叶茄是两个植株长势、果形果色极为相似的晚熟品种。在 REMAP 扩增图谱中, 8 号和 13 号至少有 5 条清晰的共有带, 差异带也很明显, 750 ~ 1 000 bp 之间的带型很容

易将二者区别开。在 IRAP 扩增图谱中, 两个品种在 1 000 ~ 3 000 bp 之间有 4 条带共享, 但是在 300 ~ 750 bp 之间 8 号比 13 号带型丰富, 两个品种同样得到很好区分。

引物 RK 扩增的条带较多, 且片段明显集中在 2 000 bp 以下, 以烟草反转录转座子设计的 IRAP 引物 X₂ 同样扩增出了 3 000 bp 左右的大片段。

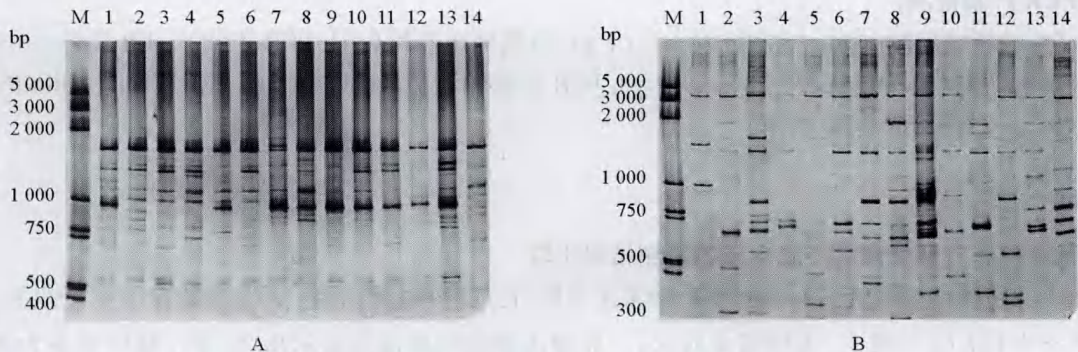


图 2 REMAP 和 IRAP 两种标记方法扩增结果的比较

A: REMAP 引物 RK; B: IRAP 引物 X₂; 1~14 号品种名称见表 1。

Fig. 2 Comparison of amplifications of REMAP and IRAP in eggplant

A: REMAP, primer RK; B: IRAP, primer X₂; 1~14. The cultivar names are in Table 1.

3 讨论

以往报道都是利用同种植物内 Gypsy 或 Copia 进行引物设计, 比如 Petr (2006) 利用豌豆中 5 个 Gypsy 类型的反转录转座子设计 IRAP 引物, 区分了遗传背景极为相似的豌豆品种, 并将 33 个品种依据亲缘关系进行了分类。肖炳光和杨本超 (2006) 以烟草中 3 个 Copia 类型的反转录转座子设计引物, 对 59 份烤烟品种进行了聚类分析。本试验中以大麦中 Copia 类型反转录转座子进行 IRAP 和 REMAP 引物设计, 引物筛选比较困难, 但是以同属茄科的烟草中相关序列进行引物设计筛选则相对容易。这说明反转录转座子的 LTR 具有相对的保守性。

本试验以标记开发为主, 两种方法对供试材料都得到了多态性丰富的扩增谱带, 丰富了茄子指纹图谱构建、品种鉴定和遗传多样性分析的分子标记方法, 也为今后开展茄子反转录转座子的相关研究奠定了基础。与其它传统分子标记一样, IRAP 和 REMAP 都是基于 PCR 的反应, 扩增结果受底物浓度、退火温度和扩增程序等因素影响。本试验在优化反应体系过程中发现, 两种方法对循环次数要求较高, 循环达到 40 次扩增图谱才清晰正常, 宜采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以提高对弱带的分辨率。

Miller 和 Cagy (2004) 指出, 反转录转座子较常规标记具有灵敏度高、基因组覆盖度广和多态性丰富等特点, 尤其适用于种质鉴定、遗传多样性及系统发育分析。杜晓云和罗正荣 (2006) 利用 IRAP 方法建立了部分柿属植物的指纹图谱, 并很好区分了应用 RAPD 和 ISSR 不能区分的芽变品种。Breto 等 (2001) 利用 IRAP 和 REMAP 在克里迈丁桔上发现了很多标记, 将用 RAPD 和 ALFP 不能区分的品种区分开。肖炳光和杨本超 (2006) 利用 IRAP 标记方法对 59 份烤烟品种进行扩增, 5 条引物共扩增出 151 条带, 其中多态性条带 145 条, 平均每个引物扩增多态性带数为 29.0 条, 平均多态性比率 96%, 远高于 RAPD 和 ISSR 标记的分析结果。

理论上反转录转座子可以任意方向整合入基因组中, 因此同一个反转录转座子家族的两个成员可以以 3 种形式相邻: 头对头、尾对尾和头对尾。应用 IRAP 方法前两种形式只需一个单引物可以产生 PCR 产物, 后一种形式则必须用 5' 和 3' LTR 两个引物。Kalendar 等 (1999) 也指出, 由于 IRAP 标记性极高, 不太适合种间系谱研究, 但在栽培种内则非常有利用价值。IRAP 和 REMAP 能够追踪一插

入事件及其后代, 可广泛应用于种质资源的分类演化和遗传多样性分析。

反转录转座子在植物中分布广泛、高异质性、种内种间具有丰富的序列和插入多态性, 在逆境条件下容易被激活从而产生新的突变, 能够横向、纵向传递, 从而使得基于反转录转座子的分子标记技术逐渐受到重视。本研究初步建立了茄子 IRAP 和 REMAP 的分子标记技术体系, 对进一步开展茄子反转录转座子相关技术的研究和应用具有重要意义。

References

- Breto M P, Ruiz C, Pina J A, Asins M J. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21 (2): 285–293.
- Chen Jie. 2007. RAPD analysis of genetic relationship among the cultivated eggplant and wild relatives [M. D. Dissertation]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University. (in Chinese)
- 陈杰. 2007. 茄子种质资源的 RAPD 分析 [硕士论文]. 上海: 上海交通大学.
- Chen Zhi-wei, Wu Wei-ren. 2004. Plant retrotransposons and their application. *Hereditas*, 26 (1): 122–126. (in Chinese)
- 陈志伟, 吴为人. 2004. 植物中的反转录转座子及其应用. *遗传*, 26 (1): 122–126.
- Du Xiao-yun, Luo Zheng-rong. 2006. Establishment of the inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) reaction system and construction of fingerprint in some *Diospyros* spp. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14 (6): 931–936. (in Chinese)
- 杜晓云, 罗正荣. 2006. 部分柿属植物 IRAP 反应体系的建立和指纹图谱构建. *农业生物技术学报*, 14 (6): 931–936.
- Ellis T H N, Poyser S J, Knox M R, Vershinin A V, Ambrose M J. 1998. Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Molecular and General Genetics*, 260 (1): 9–19.
- Feng Lin-lin, Qu Dong-yu, Lian Yong, Jin Li-ping, Wang Xiao-wu, Song Yan. 2002. Analysis of genetic relationship among eggplant varieties. *China Vegetables*, (4): 35–36. (in Chinese)
- 封林林, 屈冬玉, 连勇, 金黎平, 王晓武, 宋燕. 2002. 利用 RAPD 分析部分茄子品种的亲缘关系. *中国蔬菜*, (4): 35–36.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A. 1999. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (6): 704–711.
- Leigh F, Kalendar R, Lea V, Lee D, Donini P, Schulman A. 2003. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Mol Gen Genomics*, 269: 464–474.
- Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman A H. 2000. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular and General Genetics*, 264: 325–334.
- Mao Wei-hai, Du Li-ming, Bao Chong-lai, Hu Tian-hua, Zhu Qin-mei, Hu Hai-jiao. 2006. Genetic diversity and genetic relatives analysis of southern long-eggplant germplasm based on inter-simple sequence repeat (ISSR). *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (5): 1109–1112. (in Chinese)
- 毛伟海, 杜黎明, 包崇来, 胡天华, 朱琴妹, 胡海娇. 2006. 我国南方长茄种质资源的 ISSR 标记分析. *园艺学报*, 33 (5): 1109–1112.
- McAllister B F, Werren J H. 1997. Phylogenetic analysis of a retrotransposon with implication for strong evolutionary constraints on reverse transcriptase. *Molecular Biology and Evolution*, 14 (1): 69–80.
- Miller W J, Capy P. 2004. Mobile genetic elements: Protocols and genomic applications. *Methods in Molecular Biology*, 260: 146–171.
- Petr Smykal. 2006. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Apple Genetic*, 47 (3): 221–230.
- Sheh May Tam, Corinne Mhiri, Aat Vogelaar, Marcel Kerkvekd, Stephen R, Pearce, Marie-Angele Gandbastien. 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet*, 110: 819–831.
- Xiao Bing-guang, Yang Ben-chao. 2006. Analysis of genetic differences among flue-cured tobacco varieties by IRAP markers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (6): 1119–1124. (in Chinese)
- 肖炳光, 杨本超. 2006. 利用 IRAP 标记分析烤烟品种间遗传差异. *西北植物学报*, 26 (6): 1119–1124.