

# IRAP 分子标记在茄子种质资源亲缘关系分析中的应用

赵海艳<sup>1</sup>, 赵 纯<sup>2</sup>, 杨爱珍<sup>1</sup>, 王秋锦<sup>1</sup>, 孙清鹏<sup>1</sup>, 赵福宽<sup>1</sup>

(1. 北京农学院 生物技术系, 北京 102206; 2. 北京小川纸制品有限公司, 北京 101300)

**摘要:** 参考马铃薯和烟草的反转录转座子 LTRs 保守区域设计引物, 对 34 份茄子材料进行 PCR 扩增, 得到了多态性丰富的指纹图谱。聚类分析将 34 份茄子材料分为三大类群, 表明 IRAP 分子标记适合于茄子种质资源的亲缘关系分析。

**关键词:** 茄子; 种质资源; 分子标记; IRAP

中图分类号: S641.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008) 增刊-0194-04

## Application of IRAP Molecular Marker in Relationship Analysis of Eggplant Germplasm Resource

ZHAO Hai yan<sup>1</sup>, ZHAO Chun<sup>2</sup>, YANG Ai zhen<sup>1</sup>, WANG Qiu jin<sup>1</sup>,  
SUN Qing peng<sup>1</sup>, ZHAO Fu kuan<sup>1</sup>

(1. Department of Biotechnology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;  
2. Beijing Xiaochuan Paper Corporation, Beijing 101300, China)

**Abstract:** Primers were designed based on LTR reserve region of retrotransposon in potato and tobacco. 34 varieties of eggplant were used as experimental material for PCR amplification, polymorphhic finger maps were obtained. 34 varieties of eggplant were classified into 3 groups by Clustering analysis. The study showed that IRAP were suitable for genetic diversity analysis in eggplant.

**Key words:** Eggplant; Germplasm resource; Molecular marker; IRAP

IRAP(Inter retrotransposon amplified polymorphism) 是一种基于植物反转录转座子的分子标记。反转录转座子作为高度异源种群以多拷贝的形式广泛分布在植物染色体上, 并在物种间或物种内表现出插入位点的多态性; 而且, 活跃的反转录转座子可以在基因组中制造新的插入位点, 引起植物基因组 DNA 序列的变化<sup>[1]</sup>。IRAP 分子标记的原理是根据反转录转座子的 LTR(Long terminal repeat) 包含的保守序列而设计引物, 这些引物在 PCR 过程中可以与 LTRs 反转录转座子的相应区域退火, 从而扩增出相邻的同一家族的反转录转座子成员间的片段<sup>[2]</sup>。

本研究以 34 个茄子(*Solanum melongena* L.) 品种为供试材料, 用 IRAP 分子标记技术分析茄子种

质资源亲缘关系, 在 DNA 分子水平上探讨茄子品种的遗传变异, 为提高茄子种质资源在育种上的利用效率提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料

本研究以从国内外收集到的 34 个茄子(*Solanum melongena* L.) 品种为供试材料, 材料名称及来源见表 1。

#### 1.2 基因组 DNA 的提取

取茄子幼苗新鲜叶片, 用 CTAB 法提取基因组 DNA。

收稿日期: 2008-09-11

基金项目: 北京市教委“植物逆境生物学科研平台建设”资助项目(5075101019)

作者简介: 赵海艳(1981-), 女, 四川绵阳人, 硕士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

通讯作者: 赵福宽(1962-), 男, 内蒙古察右中旗人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事蔬菜育种及生物技术与教学工作。

表 1 材料及编号  
Tab. 1 Materials and Numbers

| 编号<br>Number | 名称<br>Materials | 来源<br>Source | 编号<br>Number | 名称<br>Materials | 来源<br>Source |
|--------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| 1            | HL- 03          | 中国           | 18           | 超九叶茄            | 中国           |
| 2            | HL- 01          | 中国           | 19           | 京海黑美            | 中国           |
| 3            | HL- 02          | 中国           | 20           | 神园长茄            | 日本           |
| 4            | 绿长茄子            | 中国           | 21           | 红玉茄子            | 中国           |
| 5            | 绿茄子             | 中国           | 22           | 京丰九叶茄           | 中国           |
| 6            | 长紫茄子            | 中国           | 23           | 京茄二号            | 中国           |
| 7            | 圆紫茄子            | 中国           | 24           | 茄杂三号            | 中国           |
| 8            | 紫光大圆茄           | 中国           | 25           | 黑将军             | 中国           |
| 9            | 新尚 0503         | 中国           | 26           | 茄杂一号            | 中国           |
| 10           | 二茛茄             | 中国           | 27           | 抗病巨无霸           | 中国           |
| 11           | Eggplant        | 意大利          | 28           | 快剑长茄            | 韩国           |
| 12           | 耐热黑无敌           | 中国           | 29           | 湘研茄子            | 中国           |
| 13           | 黑圆 40 茄         | 中国           | 30           | 茄杂八号            | 中国           |
| 14           | 大茛茄             | 中国           | 31           | 黑珍长茄            | 中国           |
| 15           | 黑龙王长茄           | 韩国           | 32           | 紫冠王 106         | 美国           |
| 16           | 巨丰茄             | 中国           | 33           | 黑金刚长茄           | 韩国           |
| 17           | 加洲紫茄王           | 美国           | 34           | 京海黑秀            | 中国           |

1.3 IRAP 分析

1.3.1 IRAP-PCR 引物的设计与合成 根据已报道的马铃薯和烟草的反转录转座子 LTRs 保守区域设计 2 组引物(引物代号为 Z1、Z2),由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3.2 IRAP-PCR 反应程序的建立 在预备试验基础上,设定 PCR 基本扩增程序为:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s;46℃退火 30 s;72℃延伸 2 min;72℃充分延伸 10 min,38 个循环。

1.3.3 PCR 产物检测 取 1/6 上样缓冲液与 PCR 产物混合后,在 1.8% 琼脂糖凝胶上,用 1×TBE 缓冲液以 3.5 V/cm 电压电泳 1.5~2.0 h,EB(0.5 μg/mL)染色 30 min,在凝胶成像系统中观察并摄影记录。

1.3.4 IRAP 扩增产物统计及聚类分析 数据记录与分析采用 Quantity one 一维凝胶分析软件自动读取 IRAP 扩增产物,有条带的记为 1,无条带的记为 0,系统自动生成 1 与 0 形式的报告单,将报告结果录入 POPGENE 1.31,计算 IRAP 扩增产物的有效等位基因位点数和多态性位点数,然后进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 茄子 IRAP 扩增结果

用设计的 2 组引物进行 IRAP 扩增都能扩增出多态性条带(图 1~4)。Z1 引物扩增出的带数为 1~5 条,检测到多态性带 4 条;Z2 引物扩增出的带数为 1~8 条,检测到多态性带 7 条。Z2 引物扩增出的带数和检测到的多态性带数均高于 Z1 引物。

2.2 IRAP 聚类分析

由聚类图(图 5)可知在等值线处将 34 份茄子品种分为三大类群:第一类群包括茄杂一号、湘研茄子、HL-01、黑珍长茄、耐热黑无敌、HL-03、紫冠王 106、快剑长茄、圆紫茄子、长紫茄子、黑圆 40 茄、抗病巨无霸、绿茄子、巨丰茄、京丰九叶茄、加州紫茄王、神园长茄、黑金刚长茄、茄杂三号、大茛茄、黑龙王长茄、京海黑秀、红玉茄子、京海黑美、超九叶茄,共计 25 份材料;第二类群包括京茄二号、茄杂 8 号、HL-02、黑将军、紫光大圆茄、绿长茄子、二茛茄、新尚 0503,共计 8 份材料;第三类群为从意大利引进的品种 EGGPLANT,单独聚为一类。

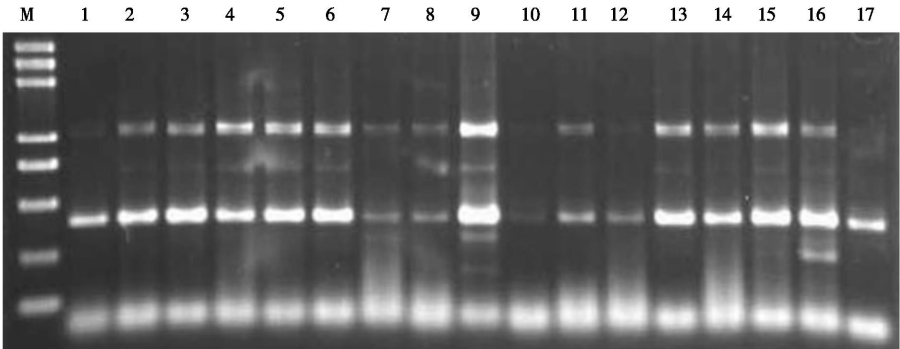


图 1 Z1 引物对 1~17 号材料的 IRAP PCR 扩增结果

Fig. 1 The IRAP PCR result with primer of Z1 for 1-17 materials

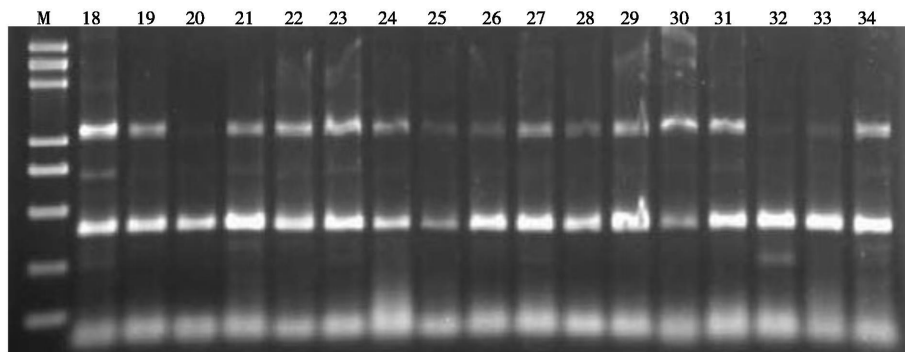


图 2 Z1 引物对 18~ 34 号材料的 IRAP PCR 扩增结果

Fig. 2 The IRAP PCR result with primer of Z1 for 18~ 34 materials

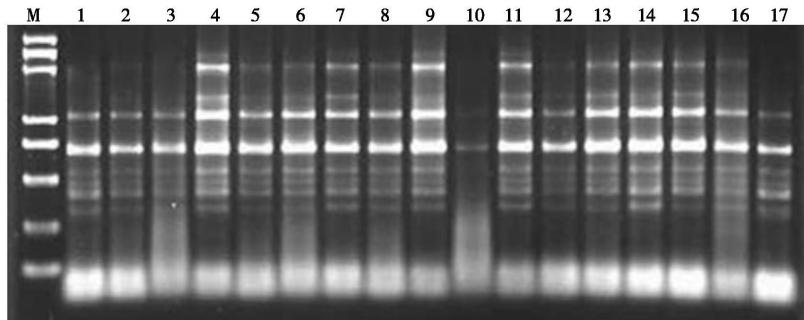


图 3 Z2 引物对 1~ 17 号材料的 IRAP PCR 扩增结果

Fig. 3 The IRAP PCR result with primer of Z2 for 1~ 17 materials

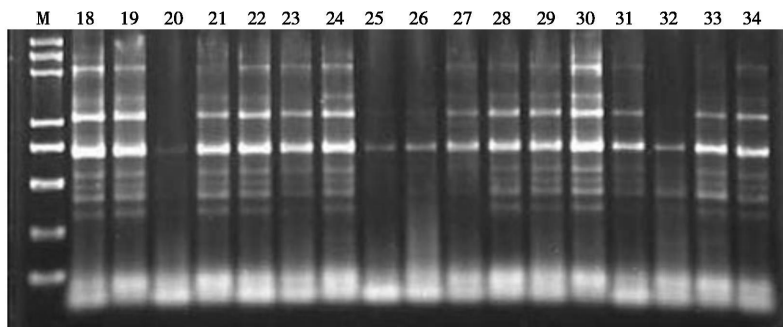


图 4 Z2 引物对 18~ 34 号材料的 IRAP- PCR 扩增结果

Fig. 4 The IRAP- PCR result with primer of Z2 for 18~ 34 materials

### 3 讨论

反转录转座子具有拷贝数众多及在基因组中广泛分布的特点, 因此, 基于反转录转座子的分子标记技术在植物亲缘关系分析和基因作图方面具有巨大的潜在优势。随着许多植物的基因组测序计划的进行以及转座元件分析软件的开发, 越来越多种植物的转座元件将被发现和解析, 基于转座元件的分子标记技术也会应用得越来越广泛。IRAP 标记技术利用锚定 LTRs 5' 或是 3' 末端的引物来扩增目的片段。一个反转录转座子巢式插入或是邻近插入, 另一反转录转座子都会扩增出 IRAP 条带。该技术依赖于 PCR 技术, 因此利用荧光标记, 在全自动分析仪上能实现多元化。此外, IRAP 不需要对模板 DNA

进行限制性酶切, 但在 2 个 LTRs 之间也存在多态性, 主要是因为在一个反转录转座子的 LTRs 插入了新的反转录转座子。如今, IRAP 标记技术已经被开发用于白菜属<sup>[3]</sup>、大麦属<sup>[4,5]</sup>和稻属<sup>[6]</sup>等植物类群的生物多样性和系统发育的研究。此外, IRAP 标记技术还应用于基因组进化的研究<sup>[7]</sup>, 大麦和小麦<sup>[8]</sup>基因图谱的构建等。最新研究表明, IRAP 标记技术能获得豌豆栽培种高保真的指纹图谱, 比 SSR、AFLP、SSAP、RBIP 等方法在豌豆上的应用更精确, 每次 PCR 分析获得的信息量更多, 大大的缩减了时间和花费<sup>[9]</sup>。基于反转录转座子的分子标记较常规分子标记具有灵敏度高、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、亲缘关系分析、遗传多样性及系统发育分析, 具有广泛的应用前景。

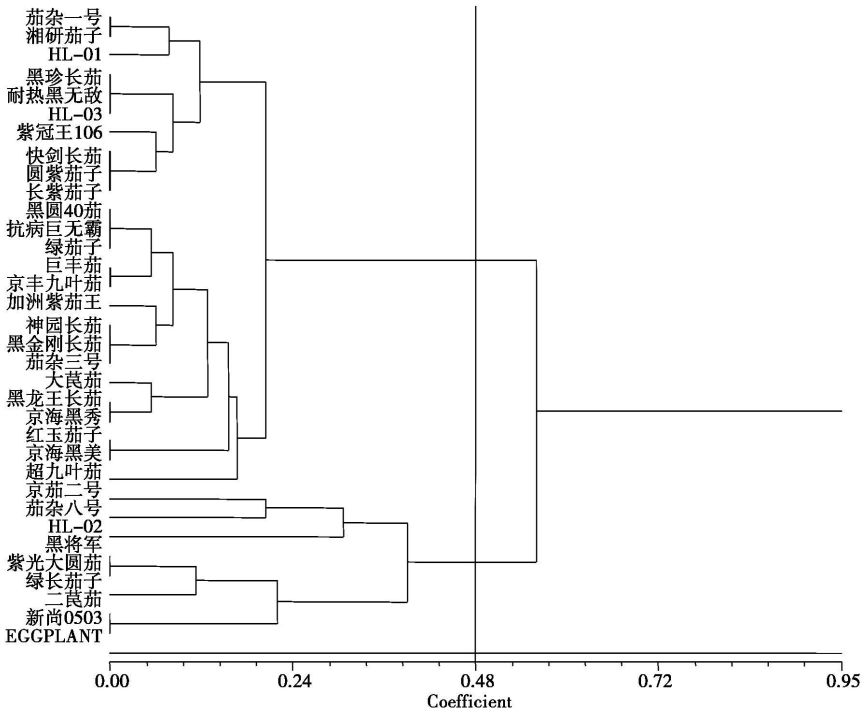


图 5 34 份茄子品种聚类图

Fig. 5 Dendrogram of 34 accessions

参考文献:

[ 1 ] Kumar A, Bennetzen J I. Plant retrotransposons[ J ] . Annu Rev Genet, 1999, 33: 479– 532.

[ 2 ] Leigh F, Kalendar R, Lea V, *et al.* Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques[ J ] . Mol Genet Genom, 2003, 269( 4 ): 464– 474.

[ 3 ] Tatout C, Warwick S, Lenoir A, *et al.* SINE insertions as clade markers for wild crucifer species[ J ] . Mol Biol Evol, 1999, 16: 1614– 1621.

[ 4 ] Waugh R, Mclean K, Flavell A J, *et al.* Genetic distribution of BARE- 1 like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence specific amplification polymorphisms (SSAP)[ J ] . Mol Gen Genet, 1997, 253: 687– 694.

[ 5 ] Manninen O, Kalendar R, Robinson J, *et al.* Application of BARE 1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley[ J ] . Mol Gen Genet, 2000, 264: 325– 334.

[ 6 ] Iwamoto M, Nagashima H, Nagamine T, *et al.* pr SINE like insertion of the CatA catalase homologs and phylogenetic relationships among Aagenome, Oryza and related species[ J ] . Theor Appl Genet, 1999, 98: 853– 861.

[ 7 ] Yannic G, Baume A, Ainouche M. Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* ( Poaceae ), a saltmarsh species in decline along the Western European Coast[ J ] . Heredity, 2004, 93( 2 ): 182– 188.

[ 8 ] Boyko E, Kalendar R, Korzun V, *et al.* Combined mapping of *Aegilops tauschii* by retrotransposon, microsatellite, and gene markers[ J ] . Plant Mol Biol, 2002, 48: 767– 790.

[ 9 ] Petr Sm kal. Development of an efficient retrotransposon based fingerprinting method for rapid pea variety identification[ J ] . J Appl Genetic, 2006, 47( 3 ): 221– 230.