

# 甜瓜属 REMAP 分子标记体系的建立及应用

王东, 江彪, 娄群峰, 陈劲枫

(作物遗传与种质创新国家重点实验室·农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室·南京农业大学 南京 210095)

**摘要:** 基于甜瓜属 *Ty1-copia* 类逆转座子的长末端重复序列信息, 结合 ISSR 引物序列, 在体系优化的基础上建立了适用于甜瓜属物种的 REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) 标记体系。对 46 份甜瓜属不同类型材料进行聚类分析, 证明该标记体系能有效检测甜瓜属不同类型材料间的多态性, 可以用于甜瓜属作物品种鉴定及指纹图谱构建。

**关键词:** 甜瓜属; 分子标记; REMAP; 多态性

## Development and Application of REMAP Molecular Marker System in *Cucumis*

WANG Dong, JIANG Biao, LOU Qun-feng, CHEN Jin-feng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement · Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement, Ministry of Agriculture · Department of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, 210095, China)

**Abstract:** REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) marker system was developed based on the long terminal repeat (LTR) sequence of *Ty1-copia* retrotransposon in *Cucumis* and combination of the ISSR primer sequence. Forty-six cultigens in *Cucumis* were genotyped using REMAP markers and the results indicated REMAP can efficiently detect polymorphism among different melon material. Thus it can be used for cultivar identification and fingerprinting in *Cucumis*.

**Key words:** *Cucumis*; Molecular marker; REMAP; Polymorphism

逆转座子 (retrotransposon) 是高等植物中种类最多、分布最广的一类可移动因子, 其转座过程以 RNA 为中间媒介, 通过逆转录酶所主导的 DNA-RNA-DNA 方式转座, 每转座 1 次, 其拷贝数就增加 1 次, 从而成为植物基因组的重要组成部分。根据是否具有长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR) 可将其分为 LTR 和非 LTR 两类<sup>[1-2]</sup>。目前研究较多的是 LTR 类逆转座子, 是一类异质性很高的群体, 以高拷贝数形式出现, 广泛存在于所有染色体中, 在植物中表现出插入多态性<sup>[3]</sup>。

逆转座子因具有分布广泛、高度异质性及拷贝数多等特性, 使其成为研究植物遗传多样性和进化的理想工具。逆转座子微卫星多态性标记 (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism, REMAP) 是基于逆转座子 LTR 序列并结合 ISSR 开发的应用比较广泛的标记之一。已有研究表明 REMAP 标记具有谱带丰富、多态性高以及操作简便等优点<sup>[4]</sup>, 在品种鉴定和遗传多样性分析方面具

有广泛的应用价值<sup>[5-6]</sup>。

甜瓜属包含甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 和黄瓜 (*C. sativus* L.) 2 种重要经济作物, 但其遗传基础狭窄, 黄瓜栽培种间的多态性仅为 3%~9%<sup>[7]</sup>, 进一步开发多种分子标记体系对于促进甜瓜属植物基因组研究具有重要意义。笔者前期研究发现逆转座子在黄瓜的基因组中分布广泛<sup>[8]</sup>, 并且开发了 SSAP 标记<sup>[9]</sup>。虽然 SSAP 标记能够有效地揭示甜瓜属不同材料间的遗传多样性, 但是该标记体系基于酶切和 PCR 技术, 对 DNA 质量要求较高, 且操作步骤繁琐, 在一定程度上限制了其应用<sup>[10]</sup>。因此, 进一步开发多态性高、操作简单的标记体系具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取来自不同地区、不同生态型的 46 份甜瓜属材料, 其中包括黄瓜近缘野生种 *C. hystrix* 及其与栽培黄瓜北京截头杂交加倍后形成的异源四倍体新种

收稿日期: 2011-04-15; 修回日期: 2011-04-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30830079); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20090097110024); 江苏省科技支撑计划 (BE2009310)

作者简介: 王东, 男, 在读硕士生, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。电话: 025-84396279; 电子信箱: 2009104059@njau.edu.cn

通讯作者: 陈劲枫, 男, 教授, 博导, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。电子信箱: jfchen@njau.edu.cn

*C. hytivus* (表 1)。所用材料均为本实验室多年自交保存资源。

表 1 供试甜瓜属材料

编号	名称	类型(来源)	染色体数目
1	EC1	欧洲温室型黄瓜	2n=2x=14
2	EC5	欧洲盐渍型黄瓜	2n=2x=14
3	Hazerd	欧洲温室型黄瓜	2n=2x=14
4	Beit Alpha	美国生态型黄瓜	2n=2x=14
5	Marketmore 97	美国生态型黄瓜	2n=2x=14
6	5211	种间渐渗系黄瓜	2n=2x=14
7	7011A	美国生态型黄瓜	2n=2x=14
8	PI483342	美国生态型黄瓜	2n=2x=14
9	PI508454	美国生态型黄瓜	2n=2x=14
10	PI508455	美国生态型黄瓜	2n=2x=14
11	PO2	华北生态型黄瓜	2n=2x=14
12	PO1	华北生态型黄瓜	2n=2x=14
13	PO3	华北生态型黄瓜	2n=2x=14
14	CC1	华北生态型黄瓜	2n=2x=14
15	北京截头	华北生态型黄瓜	2n=2x=14
16	平望	华南生态型黄瓜	2n=2x=14
17	SWCC8	西双版纳黄瓜	2n=2x=14
18	SWCC9	西双版纳黄瓜	2n=2x=14
19	SWCC10	西双版纳黄瓜	2n=2x=14
20	SWCC12	西双版纳黄瓜	2n=2x=14
21	二早子	华南生态型黄瓜	2n=2x=14
22	酸黄瓜 <i>C. hystrix</i>	黄瓜近缘野生种	2n=2x=24
23	新种 <i>C. hytivus</i>	黄瓜种间杂交种	2n=4x=38
24	PI436533	塞内加尔甜瓜	2n=2x=24
25	PI136170	意大利甜瓜	2n=2x=24
26	PI136229	加拿大甜瓜	2n=2x=24
27	PI295431	澳大利亚甜瓜	2n=2x=24
28	PI323498	中国甜瓜	2n=2x=24
29	PI157071	中国甜瓜	2n=2x=24
30	AMES2829	美国甜瓜	2n=2x=24
31	PI525135	埃及甜瓜	2n=2x=24
32	PI525141	埃及甜瓜	2n=2x=24
33	PI500362	赞比亚甜瓜	2n=2x=24
34	PI505601	赞比亚甜瓜	2n=2x=24
35	PI525115	埃及甜瓜	2n=2x=24
36	PI249897	赞比亚甜瓜	2n=2x=24
37	PI196477	巴西甜瓜	2n=2x=24
38	PI185111	加纳甜瓜	2n=2x=24
39	PI299568	南非甜瓜	2n=2x=24
40	PI292190	南非甜瓜	2n=2x=24
41	PI374152	南非甜瓜	2n=2x=24
42	PI324525	阿富汗甜瓜	2n=2x=24
43	PI476332	俄罗斯甜瓜	2n=2x=24
44	PI489689	墨西哥甜瓜	2n=2x=24
45	PI507873	匈牙利甜瓜	2n=2x=24
46	AMES2830	美国甜瓜	2n=2x=24

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 供试植株统一播种于温室中,待植株长至第 5 片真叶时,取刚展开的新叶,采用 CTAB 法提取基因组 DNA,利用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭显色进行 DNA 浓度定量。

1.2.2 REMAP 引物的设计与合成 REMAP 标记体系的正、反向引物分别来源于 Ty1-copia 类逆转

座子的 LTR 序列和 ISSR 引物,其中 Ty1-copia 类逆转座子序列信息来源于 GenBank,登录号为 GQ326556,引物序列信息见表 2。引物由上海英骏生物有限公司合成。

表 2 甜瓜属 REMAP 引物信息

序列来源	引物名称	序列	退火温度
Ty1-copia	LTRA	TCGCTGAAGTGAATGGTGCTC	55 °C
ISSR	J1	ACACACACACACACACCGC	
	J2	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	

1.2.3 REMAP 反应体系的建立 前期通过调整反应体系中 DNA 模板量、*Taq* 酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 和引物等各成分的比例,优化扩增体系。确定 REMAP 标记的反应体系为:20 μL 反应体系中,10×buffer 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>、Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>、dNTPs 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>、*Taq* 酶 1.0 U、0.4 μmol·L<sup>-1</sup> 引物,模板 DNA 50 ng。PCR 扩增反应在 PTC-100 PCR 仪上进行,扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,40 个循环;循环结束后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 终止反应。

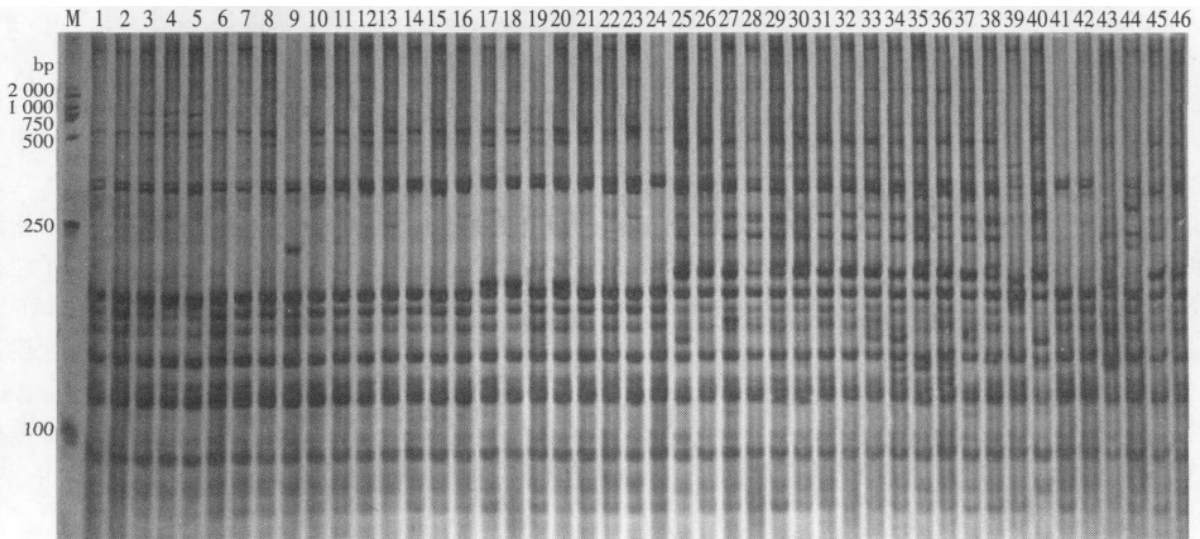
1.2.4 PCR 产物检测 1 μL 上样缓冲液与 6 μL PCR 产物混合后,在 2% 琼脂糖凝胶上以 1×TAE 缓冲液进行电泳,EB 染色,在凝胶成像系统中采集图像。1 μL 上样缓冲液和 3 μL PCR 产物混匀后,6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染检测。

1.2.5 聚类分析 对 REMAP 引物检测结果分析,每条多态性条带为 1 个数据统计条带,并采用 1(有带)和 0(无带)的方法统计条带,最后用 NTSYSpc 2.11 软件进行分析作图。

2 结果与分析

2.1 REMAP 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

图 1 显示,46 份甜瓜属材料中共扩增出 33 条条带,其中 23 份黄瓜材料扩增出 22 条条带,其中 14 条为共有条带,差异率为 36.36%。这 22 条条带大多集中于 100~250 bp;23 份甜瓜材料扩增出的条带数为 33 条,黄瓜材料中出现的 22 条条带在甜瓜材料中仍都存在。各个甜瓜材料均得到 14~28 条条带,其中 11 条为共有条带,集中于 100~750 bp,表现差异率 66.67%。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示,甜瓜属材料在 100~750 bp 扩增出 26 条多态性条带,表明在 REMAP 标记扩增中产生了大量大小相近条带,而这对于分辨率较低的琼脂糖凝胶电泳而言,很难得到清晰详尽的指纹图谱。琼脂糖凝胶电泳适合于一般的核酸检测,但相对于扩增条带较多的标记如 REMAP,则需要分辨率更高的电泳。由此



M. DL 2 000 Marker; 1-46. 代表材料见表 1。

图 1 LTRA-J1 引物在 46 份甜瓜属材料中的扩增结果

可见,为了得到更加准确的指纹图谱,6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳应优先选择,这与 Leigh 等<sup>[11]</sup>和王利英等<sup>[12]</sup>的分析结果一致。

2.2 基于 REMAP 标记的甜瓜属材料的聚类分析

根据 REMAP 分子标记引物 LTRA -J1 和 LTRA -J2 对材料的检测结果进行统计分析,利用 NTSYSpc2.11 获得甜瓜属 46 份材料的聚类图谱,将 46 份材料分为 2 个类群(图 2)。

第一类群包含 27 份材料,绝大多数为黄瓜材料,但还包含 4 份甜瓜材料。该标记能够把遗传距离狭窄的各个黄瓜材料区分开。该类群分为 5 个亚类,亚类 A1 含有 EC1、EC5、PI 508454、北京截头、黄

瓜近缘野生种 *C. hystrix*、黄瓜种间杂交种 *C. hytivus*。其中黄瓜种间杂交种 *C. hytivus* 及其双亲北京截头和黄瓜近缘野生种 *C. hystrix* 在分支树中分在同一个分支中,表现出极近的亲缘关系。亚类 A2 中有 8 份材料,包括 PI 508455、二早子、平望、SWCC10、PI 436533、SWCC8、SWCC12、SWCC9,其中 4 份西双版纳材料亲缘关系表现出一定的相似度。在亚类 A3 中含有 10 份材料,大多为美国生态型及华北生态型材料。其余 2 个亚类 A4 和 A5 均为甜瓜材料,亚类 A4 共有 2 份材料,分别是来自南非的甜瓜 PI 374152 和来自阿富汗的甜瓜 PI 324525;亚类 A5 为俄罗斯甜瓜 PI 476332。亚类 A4、A5 材料与黄瓜有

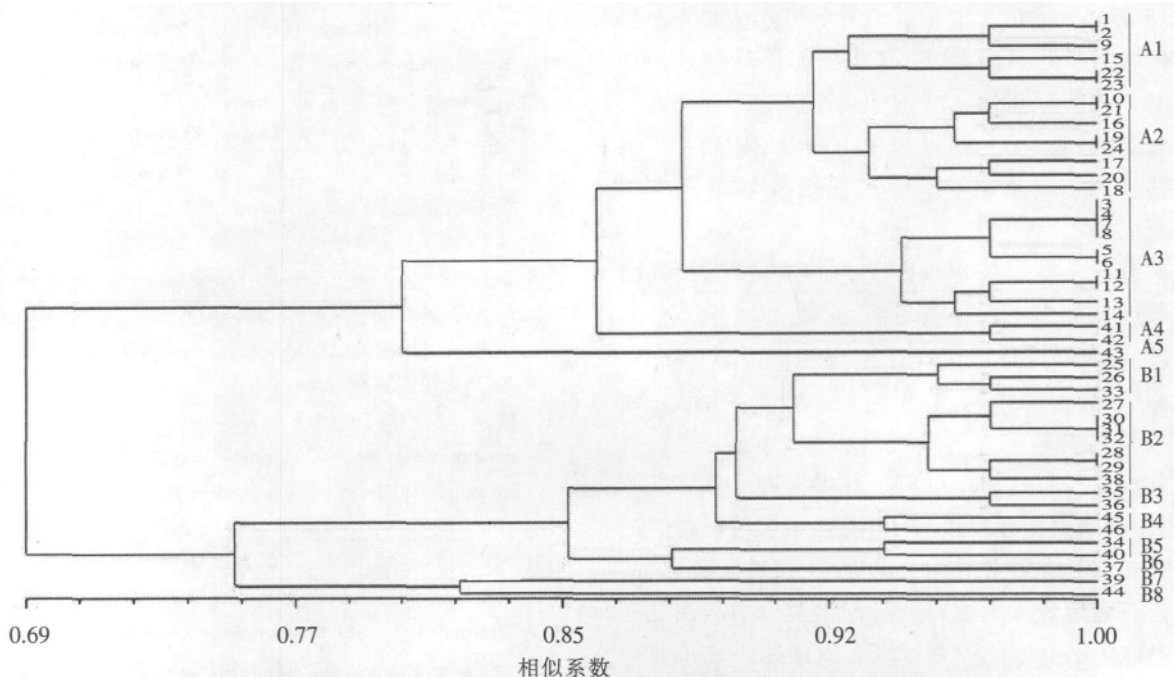


图 2 基于 REMAP 标记的 46 份甜瓜属材料聚类分析



着较近的亲缘关系。

第 类群全部为甜瓜材料,分为 8 个亚类,相互间遗传距离较远,可以清晰地分辨出各个甜瓜材料。亚类 B1 含有意大利甜瓜 PI 136170、加拿大甜瓜 PI 136229 和赞比亚甜瓜 PI 500362。亚类 B2 中,亲缘关系较近的 2 个中国甜瓜,现在在中国仍然广泛种植,另外 2 个埃及甜瓜在埃及普遍种植。亚类 B3 中包含 1 个埃及甜瓜 PI 525115 和 1 个赞比亚甜瓜 PI 249897。另外亚类 B4~B8 中材料较少,与其他甜瓜材料亲缘关系也较远。对甜瓜材料聚类分析后发现,甜瓜材料较黄瓜材料相互间亲缘关系较远,遗传变化较大。

### 3 讨 论

根据 Ty1-copia 类逆转座子的 LTR 序列设计引物,与 ISSR 引物组合成 REMAP 分子标记,建立了适合于甜瓜属材料的 REMAP 分子标记体系,并应用于甜瓜属不同类型材料间的遗传多样性分析。在前期琼脂糖电泳中检测的条带数量远远低于聚丙烯酰胺凝胶电泳中检测的数量。REMAP 扩增出的谱带在 100~750 bp 较为集中,弱带较多,根据不同检测方式的比较,认为高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳应优先选择。

为了阐明 REMAP 扩增谱带的来源,与 ISSR 单引物的扩增结果进行了比较。试验结果表明,单 ISSR 引物扩增产物与 REMAP 标记的扩增产物差别较大。ISSR 引物扩增条带主要集中于 250~2 000 bp,而 REMAP 标记扩增条带集中于 100~750 bp。同时从扩增条带数目来看,ISSR 引物在黄瓜材料中共扩增出 7 条条带,甜瓜材料中扩增出 9 条条带,远远低于 REMAP 标记的 33 条条带。证明 REMAP 扩增图谱的来源主要是逆转座子和 ISSR 引物共同作用的结果。

逆转座子标记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<sup>[13]</sup>。笔者利用 2 对 REMAP 引物对甜瓜属 46 份材料进行聚类分析,成功将甜瓜属材料分成 2 个类群、13 个亚类,能够有效区分黄瓜材料和甜瓜材料。其中类群 分为 5 个亚类,相互间遗传差异率较小,说明了黄瓜材料的遗传变异狭窄。类群 分为 8 个亚类,遗传距离远,甜瓜材料表现出较大的遗传变异。聚类分析表明建立的 REMAP 分子标记体系可以有效地用于甜瓜属材料的遗传多样性分析。

### 4 结 论

本试验在前期体系优化的基础上建立了适用于甜瓜属材料的 REMAP 分子标记体系,并通过不同的检测方法比较,确定聚丙烯酰胺凝胶电泳应优先选择。通过 REMAP 分子标记体系和 ISSR 分子标记体系的比较,证实了 REMAP 谱带是逆转座子和微卫星序列共同作用的结果,并将开发的 REMAP 标记体系应用于 46 份甜瓜属材料的遗传多样性分析。建立的甜瓜属 REMAP 分子标记体系,对进一步开展甜瓜属相关分子生物学研究,如建立高密度遗传图谱、重要目标性状定位、生物多样性与系统进化研究等具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Kumar A. The adventures of the Ty1-copia group of retrotransposons in plants[J]. Trends in Genetics, 1996, 12(2): 41-43.
- [2] Grandbastien M A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(5): 181-187.
- [3] Kumar A, Bennetzen J L. Plant retrotransposons[J]. Annual Review of Genetics, 1999, 33: 479-532.
- [4] Kalendar R, Grob T, Regina M, et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 704-711.
- [5] Guo Dalong, Zhang Haiqing, Luo Zhengrong. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis[J]. Plant Science, 2006, 170(3): 528-533.
- [6] Claudio D, Gabriella D L, Tommaso G, et al. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification [J]. Tree Genetics & Genomes, 2010, 6(3): 451-466.
- [7] Kenerd W C, Potter K, Dijkhuizen A, et al. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89(1): 42-48.
- [8] 江彪, 娄群峰, 刁为平, 等. 黄瓜属 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1147-1154.
- [9] 娄群峰, 刘强, 陈劲枫. 黄瓜 SSAP 标记技术的建立[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 82-85.
- [10] Berenyi M, Gichuki T, Schmidt J. Ty1-copia retrotransposon-based S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) for genetic analysis of sweet potato[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(6/7): 862-869.
- [11] Leigh F, Kalendar R, Lea V, et al. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques[J]. Molecular Genetics Genomics, 2003, 269(4): 464-474.
- [12] 王利英, 杜永臣, 张斌, 等. 茄子 IRAP 和 REMAP 分子标记的开发[J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1363-1367.
- [13] Miller W J, Capy P. Mobile genetic elements as natural tools for genome evolution[J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 260: 1-20.