

基于茄子基因组重测序的 InDel 标记开发及应用

吉康娜¹, 邱俊杰¹, 林丹妮¹, 颜爽爽¹, 田时炳², 曹必好¹, 邱正坤¹

(¹广东省蔬菜工程技术研究中心/华南农业大学园艺学院, 广州 510642; ²重庆市农业科学院蔬菜花卉研究所, 重庆 401329)

摘要: 茄子是我国重要的蔬菜作物, 然而相比于其他茄果类蔬菜, 分子标记在茄子中的应用较少。本研究基于 2 份在果实与抗性上存在显著差异的茄子的全基因组重测序数据, 鉴定出 151327 个 InDel 位点, 随机选择并设计了 180 个 InDel 标记, 利用重测序材料及其杂交一代进行有效性鉴定, 结果显示: 180 个 InDel 标记均可获得 PCR 扩增产物, 其中 62 个标记具有多态性, 多态率为 34.7%。基于 62 个 InDel 标记聚类分析结果揭示出 24 份紫红长茄自交系的遗传多样性, 其中 46 个标记表现出多态性, 每个标记的 Nei's 基因多样性指数在 0.0799~0.4991 之间, Shannon's 多样性指数分布在 0.1732~0.6923 之间。基于 24 个 InDel 标记聚类分析结果揭示出 143 份茄子品种的遗传多样性, 在遗传相似系数 0.65 处, 143 份茄子品种大体可以分为 I ~ VII 七大类群。基于 2 对 InDel 标记的茄子品种纯度鉴定结果与田间鉴定结果相吻合。

关键词: 茄子; 分子标记; InDel; 种质分析; 品种纯度鉴定

Development and Application of Eggplant InDel Markers Based on Whole Genome Re-sequencing Datasets

Ji Kang-na¹, Zhi Jun-jie¹, Lin Dan-ni¹, Yan Shuang-shuang¹, Tian Shi-bing², Cao Bi-hao¹, Qiu Zheng-kun¹

(¹Guangdong Vegetable Engineering and Technology Research Center/College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; ²The Institute of Vegetable and Flower Research, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329)

Abstract: Eggplant (*Solanum melongena* L.) is one of the important vegetables in China. However, the application of molecular markers in eggplant is much less than other solanaceous fruit vegetables. In this study, 151327 of InDels were *in silico* identified by taking advantage of whole genome re-sequencing of two eggplant lines. The InDel markers targeting 180 InDel loci were developed, which were subjected in tests of two re-sequencing eggplant lines and their derived hybrid line. Out of that, sixty-two (34.7%) of total markers were polymorphic between both varieties. 62 out of the 180 InDel markers were then used to investigate the genetic diversity and specificity of 24 red-purple long eggplant lines. Among the 62 InDel markers, 46 markers were polymorphic among the eggplant lines. The variation of Nei's gene diversity index and Shannon's diversity index was between 0.0799-0.4991 and 0.1732-0.6923, respectively. In addition, 24 InDel out of the 46 markers were further used to investigate the genetic diversity and specificity of 143 varieties. By using UPGMA, 143 varieties were grouped into seven classes (I - VII) when the genetic similarity coefficient is 0.65. The results from purity test of variety from two InDel (EP-215 and EP-1203) markers matched well with those from field experiments.

Key words: eggplant; molecular marker; InDel; germplasm analysis; purity test

收稿日期: 2019-01-30 修回日期: 2019-03-12 网络出版日期: 2019-04-01

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190130001>

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: 15535992568@163.com

通信作者: 邱正坤, 研究方向为茄果类蔬菜遗传育种, E-mail: qiu Zhengkun@scau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发项目 (2017YFD0101904); 国家自然科学基金项目 (31801863, 31672156)

Foundation project: National Key R&D Program of China (2017YFD0101904), The National Natural Science Foundation of China (31801863, 31672156)

茄子 (*Solanum melongena* L.) 是世界上重要的蔬菜作物之一, 属茄科 (*Solanaceae*) 茄属 (*Solanum* L.) 一年生草本植物^[1]。2015 年, 中国茄子栽培面积已达到 80.6 万 hm^2 , 产量高达 300 亿 kg ^[2]。近年来, 随着我国设施农业栽培面积的不断扩大, 茄子已成为了设施栽培农业中主要蔬菜作物之一^[3]。然而, 茄子遗传背景狭窄, 且不同地域消费者对茄子的商品果外观 (果色和形状) 要求差异很大, 传统育种方法很难满足。随着现代分子育种技术的快速发展, 分子标记将在茄子遗传育种研究中发挥着重要的作用。

事实上, 分子标记在基因定位和克隆、遗传资源分析和利用、品种真实性和纯度鉴定以及作物新品种选育中都有着非常重要的作用。例如, Gur 等^[4]利用分子标记将来自野生番茄潘娜利中的 3 个染色体片段聚合到加工番茄品种 M82 中, 育成了 IL789 品系。不管是在逆境还是适宜环境条件下, IL789 品系产量均显著高于 M82^[4]。与其他茄科类作物如番茄、辣椒、马铃薯等相比, 茄子可供使用的分子标记过少。近年来在茄子上开发应用最多的是 SSR 标记。杨洋等^[5]根据茄子热胁迫抑制性消减杂交技术获得的 EST 序列开发设计了 32 对 SSR 引物。汪国平等^[6]利用近缘物种转移法分析了番茄中 1046 对 SSR 标记在茄子及其他茄科作物上的通用性情况, 发现其中 887 对能在茄子基因组 DNA 上扩增出产物。魏明明等^[7]基于茄子转录组数据在茄子基因组中共检索到 8316 个 SSR 位点, 并开发设计了 858 对 SSR 引物, 在 17 份茄子材料中其引物多态性约为 47%。

插入/缺失多态性 (InDel, Insertion/Deletion) 标记是由于等位基因位点处的 DNA 序列在不同个体间发生了核苷酸片段的插入/缺失而产生的长度多态性变异^[8]。InDel 标记在基因组内分布和密度仅次于单核苷酸多态性标记 (SNP, single nucleotide polymorphism)^[9-12]。茄子基因组中平均每 1 kb 含有约 0.8 个 SNP, 0.07 个 InDel^[13]。InDel 标记的扩增产物带型简单清晰, 且稳定性和产物分离效果均明显优于 SSR 标记^[14]; 与分型系统复杂的 SNP 标记相比, InDel 检测简单便捷, 对仪器设备和技术要求较低, 在电泳技术平台上即可进行^[15]。因此, 开发、鉴定和功能分析动植物中的 InDel 越来越受到研究者的关注^[16-19]。Yang 等^[20]通过比较分析醋栗番茄 LA1589 和栽培番茄 Heinz1706 全基因组序列信息, 开发了 3029 个长度差异大于 2 bp 的 InDel 引物。郭广君等^[21]通过辣椒全基因组重测

序数据在一年生辣椒和灌木状辣椒中分别检测到了 533523 个和 1664770 个 InDel, 并随机鉴定了其中 40 个 InDel 标记, 35 个 InDel 具有多态性。Li 等^[22]根据 2 份大豆重测序数据监测到 28908 个 InDel (1~5 bp)。在大豆粒重 QTL 位点 *qSW-17-2* 附件开发了 5 个 InDel 标记, 利用在 5 个 InDel 标记进一步将 *qSW-17-2* 定位到 0.5 Mbp 范围内^[22]。Zhang 等^[23]根据 11 份藜麦重测序数据, 在藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 中开发了 85 个 InDel 标记和 62 个 SSR 标记对 129 份藜麦材料进行基因分型。结果表明, InDel 标记可应用于群体结构分析和核心种质分析中, 加快藜麦分子育种进程^[23]。在茄子中, Barchi 等^[24]基于简化基因组测序 (RAD tag sequencing) 数据在 305E40 和 67/3 两份茄子自交系中检测到了约 10000 个 SNPs、1000 个 InDels 和 2000 个 SSR 位点。随后, Barchi 等^[25]和 Portis 等^[26]利用 388 个 SNP 标记、43 个 SSR 标记、3 个 CAPS 标记、11 个 RFLP 标记和 27 个 COS II 标记, 以 305E40 和 67/3 及其 F_2 为材料, 构建了茄子遗传图谱, 并对 20 个农艺性状进行 QTL 定位分析。然而, 相比于其他作物, 目前茄子中的 InDel 标记较少, 其应用也较为有限。

本研究利用 2 份茄子材料的重测序数据分析两者之间的 InDel, 同时, 利用不同重测序材料及其杂交 1 代的茄子材料对开发出的 InDel 标记加以验证, 以期为茄子遗传图谱构建、基因定位和克隆、种质和品种纯度鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究用于重测序的茄子材料 S86 和 BW2 来自重庆市农业科学院蔬菜花卉研究所, 其中 S86 为紫红长茄、高感青枯病; BW2 为绿茄、果实呈卵圆形、高抗青枯病。用于 InDel 引物聚类分析的 24 份茄子高代自交系来自华南农业大学园艺学院, 均为华南紫红长茄类型; 143 份茄子品种来自广东省农业技术推广总站 (表 1)。用于品种纯度分析的 NFNG-3 号茄子品种来自广东省农业技术推广总站, 田间纯度鉴定茄子材料种植于广东省茂名市新华农场, 共计 166 株。

1.2 茄子基因组重测序和 InDel 位点分析

取茄子幼嫩叶片置于液氮中研磨后提取基因组总 DNA, DNA 提取使用天根生化科技 (北京) 有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305)。基因

表1 143份供试茄子品种的基本信息

Table 1 The information of 143 eggplant varieties

编号 Code	来源 Origin	果色 Fruit color	果形 Fruit shape	编号 Code	来源 Origin	果色 Fruit color	果形 Fruit shape	编号 Code	来源 Origin	果色 Fruit color	果形 Fruit shape
K1	湖南	紫红	长棒	K49	广东	紫	长	K97	四川	紫黑	长
K2	广东	紫红	长	K50	陕西	紫红	长	K98	四川	紫黑	长
K3	广西	紫红	长	K51	北京	紫红	线	K99	北京	紫黑	长
K4	广东	紫红	长	K52	广东	紫	长	K100	北京	紫黑	长
K5	广东	紫黑茄	长	K53	广东	紫红	长	K101	四川	紫黑	长
K6	广西	紫红	长棒	K54	广东	紫红	长	K102	四川	紫黑	长
K7	广东	紫红	长棒	K55	广东	紫红	长	K103	四川	紫黑	长
K8	广东	紫黑茄	长	K56	广东	紫红	长	K104	海南	紫黑	长
K9	广西	紫红	长棒	K57	云南	紫	椭圆	K105	陕西	紫黑	线
K10	广西	紫红	长棒	K58	陕西	紫黑	长	K106	四川	紫黑	线
K11	广东	紫红	长棒	K59	广东	绿	长	K107	四川	紫黑	线
K12	广东	紫红	长	K60	广东	紫红	椭圆	K108	北京	紫黑	长
K13	广东	紫红	长	K61	甘肃	紫红	长棒	K109	四川	紫黑	线
K14	广东	紫红	长	K62	福建	紫红	线	K110	北京	紫黑	长
K15	广东	紫红	长棒	K63	中国台湾	白	长	K111	四川	紫黑	长
K16	广东	紫红	长	K64	香港	紫黑	椭圆	K112	北京	紫黑	长
K17	广东	紫红	长	K65	北京	紫黑茄	长棒	K113	上海	紫黑	线
K18	广西	紫	长	K66	北京	紫黑茄	长	K114	四川	紫黑	长
K19	云南	紫红	长	K67	北京	紫黑	长棒	K115	山东	紫黑	长
K20	广东	紫红	长	K68	福建	紫	线	K116	北京	紫黑	线
K21	陕西	紫红	长	K69	广东	紫	线	K117	四川	紫黑	长
K22	广东	紫红	长棒	K70	江苏	紫黑	长棒	K118	四川	紫黑	长
K23	广东	紫红	长	K71	广东	紫红	椭圆	K119	四川	紫黑	长
K24	广东	白	长	K72	广东	绿	长	K120	山东	紫红	圆
K25	广东	紫	长棒	K73	广东	绿	长	K121	陕西	紫黑	椭圆
K26	陕西	紫红	长	K74	陕西	绿	长	K122	广东	紫	线
K27	福建	紫红	长	K75	陕西	绿	长	K123	陕西	绿	椭圆
K28	广东	紫红	长棒	K76	陕西	绿	长	K124	北京	紫红	长
K29	广东	紫红	长	K77	陕西	绿	长	K125	四川	紫黑	长
K30	广西	紫红	长棒	K78	陕西	绿	长	K126	福建	—	—
K31	广东	紫黑	圆	K79	陕西	绿	长	K127	北京	紫黑	长
K32	广东	紫红	长	K80	陕西	绿	长	K128	四川	紫	长
K33	广东	—	—	K81	广东	紫黑	长	K129	四川	紫红	长
K34	海南	紫黑	长	K82	四川	紫黑	长棒	K130	四川	紫绿	长
K35	广西	紫黑	长	K83	上海	紫黑	长棒	K131	陕西	紫红	线
K36	广东	紫红	长	K84	中国台湾	紫黑	长棒	K132	广东	绿	长
K37	陕西	紫红	长	K85	广东	紫黑	长	K133	云南	紫黑	长
K38	四川	紫红	长	K86	云南	紫黑	长	K134	山东	紫红	长棒
K39	广东	紫红	长	K87	四川	紫红	长	K135	四川	紫黑	长棒
K40	广东	紫	长	K88	四川	紫黑	长	K136	山东	紫黑	长棒
K41	广东	紫红	长棒	K89	陕西	绿	椭圆	K137	陕西	紫红	长
K42	云南	紫红	长	K90	山东	紫黑	长	K138	山东	紫黑	长棒
K43	中国台湾	—	—	K91	四川	紫黑	长	K139	陕西	紫黑	长棒
K44	广东	紫红	紫红	K92	四川	紫黑	长	K140	香港	白	长
K45	云南	紫红	长	K93	四川	紫黑	长	K141	陕西	绿	椭圆
K46	四川	紫	长	K94	北京	紫黑	圆	K142	广东	紫红	长
K47	广东	紫红	长	K95	河南	紫黑	圆	K143	陕西	紫	长
K48	广东	紫	线	K96	四川	紫黑	长				

—表示数据未知

—means the data is unclear

组重测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。获得的原始数据去除接头序列和数据质控后,有效测序数据通过 BWA 软件,比对茄子参考基因组 (SME_r2.5.1), 比对结果经 SAMTOOLS 去除重复。使用 GATK 软件进行 InDel 检测分析。利用 SnpEff 软件根据 InDel 位点在参考基因组上的位置信息进行注释。

1.3 InDel 引物设计

根据重测序数据预测到的 InDel 位点,筛选插入/缺失碱基数大于 10,且测序深度大于 4 的位点。基于茄子基因组测序信息,将筛选的位点定位在基因组上,取该 InDel 位点上下游各 200 bp 碱基序列进行引物设计。利用 Primer 6.0 设计引物,其中上游引物设计范围为 1~190 bp,下游引物设计范围为 210~401 bp,产物大小为 100~150 bp,退火温度为 52~60 ℃。

1.4 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳

每份茄子材料取 1 小片幼嫩叶片置于液氮中研磨,采用改良 CTAB 法^[27]提取基因组总 DNA,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测后,将 DNA 浓度调至 20 ng/μL 备用。PCR 采用 Promega 公司的绿色 DNA 聚合酶预混液 (Green Mix),反应体系 (10 μL) 包括: 1 μL 模板 DNA (20 ng/μL)、5 μL

DNA 聚合酶预混液、1 μL 正向引物 (10 μmol/L) 和 1 μL 反向引物 (10 μmol/L)、2 μL 超纯水。反应程序为 95 ℃ 预变性 4 min; 95 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 32 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min; 8 ℃ 保持。扩增产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳 1.5~2.0 h 时 (180 V), 凝胶成像系统下拍照记录。

2 结果与分析

2.1 茄子 InDel 标记的鉴定

通过与参考基因组序列比较, BW2 茄子品种和 S86 品种的全基因组范围内共检测到的 InDel 数量分别为 105076 个和 88965 个, 其中位于外显子的 InDel 数量分别为 4393 个 (4.18%) 和 3637 个 (4.09%) (图 1)。通过进一步全基因组比较分析, BW2 和 S86 间的 InDel 数量为 151327 个。

2.2 InDel 标记有效性鉴定

根据预测的 InDel 位点,随机选取 180 个 InDel 位点设计引物。经 PCR 检测发现, 180 对引物在 BW2、S86 及 F₁ (BW2 × S86) 中均能扩增出条带, 且扩增产物大小与预测大小相吻合。其中 62 对 InDel 引物 (表 2) 在 BW2、S86 及 F₁ 有多态性 (图 2), 多态率为 34.7%。

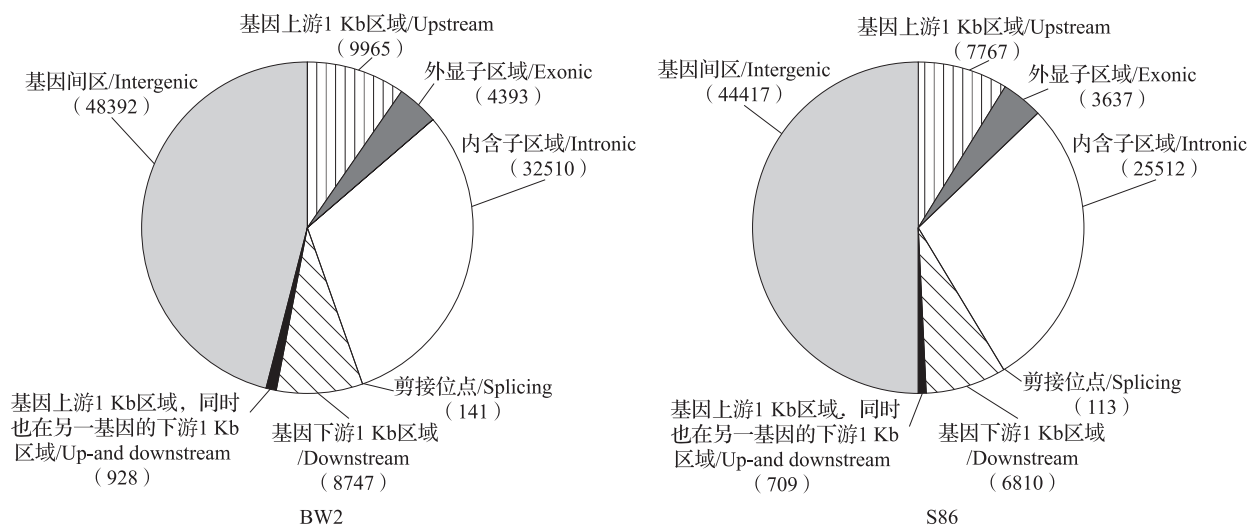


图 1 全基因组 InDel 位点的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatic analysis of InDels in two eggplant varieties

2.3 InDel 标记在茄子种质资源鉴定中的应用

以本课题选育的 24 份高代自交系茄子 (均为紫红长茄) 分析上述 62 个 InDel 标记在茄子种质资源鉴定中的应用情况。经过 PCR 检测发现, 62 对引物在 24 份茄子材料中均能扩增出条带 (图 3), 且扩增产物大小与预测大小相吻合。经统计, 在 62 个标记中, 46 个标记表现出多态性, 多态率达到 74.2%。

利用 Popgene 32 软件对 46 对引物在 24 份茄子材料中的扩增结果进行分析, 每对引物的基因多样性指数在 0.0799~0.4991 之间, 均值为 0.2105; Shannon's 多样性指数分布在 0.1732~0.6923 之间 (表 2)。

利用 NTSYSpc 中的 UPGMA 方法对 24 份茄子自交系进行聚类分析 (图 4), 在遗传相似系数 0.66 处茄子自交系分为四大类。

表 2 对具有多态性的茄子 InDel 标记信息

Table 2 62 polymorphic InDel markers developed in this study

InDel 标记 InDel marker	上游引物序列 Forward sequence	下游引物序列 Reverse sequence	产物大小 (bp) Length	香农多样性指数 Shannon's	基因多样性指数 Nei's	聚类分析所用标记 Marker used for UPGMA	品种纯度分析所用标记 Marker used for purity test
EP-1131	ATCCAATAAGATTTGAGCA	ATCCGTCCTAACAATTCCT	145	0.6923	0.4991		
EP-215	CAATCTTCAAGTCACAACCA	ATTTTCACGAATCACAAAC	123	0.6853	0.4922	√	√
EP-1665	TGGGACAAATTCAACTATTTT	ATCAACATTAACGTGGTGA	128	0.6792	0.4861	√	
EP-1795	TGTCCATCAATATAACAATCTG	TTCATAATTCAAAGCATGTTT	129	0.6792	0.4861	√	
EP-931	TGTCGCCAATATTCTCATT	TGAAGTCAAGATGTCAATCCT	153	0.6792	0.4861	√	
EP-1203	GAGAGAAAAGAGAAAGAGGGC	AATCCTTAGCAAAAAGGAAAA	156	0.6713	0.4783	√	√
EP-1371	GCTCATATAAATGGGTGAGA	TGATGTTTGTTCGATTGTT	134	0.6713	0.4783	√	
EP-1079	TTATTTGATGCAGTTTTTGG	TCACCATGACACTTTTCTCA	118	0.6616	0.4688	√	
EP-1135	CAGAGTTATGTGGAATCCTG	AGTTTTTATTCAGTCCACG	90	0.6616	0.4688	√	
EP-1215	TTTAAGCTGGCTGCTATTTT	CCTACTGTCCATCGAGAAAG	133	0.6500	0.4575	√	
EP-1359	TTAGCTAACTGAGTCACCCAT	AATTGTGTTGGAAGCACTTT	110	0.6500	0.4575	√	
EP-1367	AAAACGATTTTCGTTCTAGG	TGTCCTTTGTAGCAATTTGGA	143	0.6500	0.4575	√	
EP-1605	AAGATTCCGTATAATTGCGT	GAGAGTTGGGGCTATGTTATT	146	0.6500	0.4575	√	
EP-995	ATCTTATAGCTTATGGCGCA	ACTATTTTCGCACTTCCTCAA	139	0.6500	0.4575	√	
EP-1633	AAAAAGCGATTCAGAGTAGAT	TTCTAATCAATGCCATAAA	146	0.6211	0.4297		
EP-1311	TGCAAAAGTGCATACAACCTC	AAGAGGCTTATCCCATCATT	158	0.5841	0.3950	√	
EP-1487	CGAGATATGATCGTATAACATT	CCAATGCCTTACAACCTATG	156	0.5841	0.3950	√	
EP-1691	CCTCCCTAATGTCTTCTCAA	CAAGTCAAAAATTGATATGGTTC	152	0.5623	0.3750	√	
EP-1139	GTCAATTTCAATTTGCCTGT	TGTGTGACCGTCTGATCTAA	125	0.5383	0.3533	√	
EP-1297	AGGTCGAGTTCAAACGCT	TCAAGAGTAAAAATTTGGGG	150	0.5383	0.3533	√	
EP-1067	TTGAGGGATATCTTTATTTTTG	GGTGTTTGGTAGGAAGAATTA	235	0.5383	0.3533	√	√
EP-1539	TGCACATTTTTAACTTCATCA	GGGGAAATTTAATTCAACAA	150	0.5117	0.3299		
EP-1331	ATTCAGCATGTATCAGGAGG	ATATCAAAAAGCAAATGTGGG	155	0.4826	0.3047		
EP-985	ACTCAACGAACACCCCTTCTA	CAAATGTTGTAGCTGCTGAA	83	0.4826	0.3047		
EP-1295	TACTAAAACCCGAAGCACTC	TCCTTTGGTTCACAGCTTAT	152	0.4506	0.2778		
EP-1641	TCAATTGATTAGGTTTGGAG	TCAACTCATCTTTTTGTTAGA	144	0.4506	0.2778		
EP-1533	GAGAGCTATTCAGTGGTCGT	CCGTATCCAAAATACATGGT	155	0.4506	0.2778		
EP-1223	TTTTTCTTTTGGTTCCTTTTT	TGGGGAGGGTAAAATATACA	128	0.3768	0.2188		
EP-1225	TAGCAGGGATTGGATTAAA	AAAATTTGATTGGGTCTTGA	118	0.3768	0.2188		
EP-1517	GGAAAATATGATGGAAGTCG	GCATCACTACTCTTGGAAT	86	0.3768	0.2188		
EP-1647	CAATGATCCATTCAACGATA	GAAAGTTGTGACTTTTGCT	114	0.3768	0.2188		
EP-731	TGGTTATGCAAAATCAAGGT	CCTGTGTCTCGAATTCAACT	89	0.3768	0.2188		
EP-1577	GCGACCTATGTCTTCTGAAC	ATTGAATGGTTTTGATCACC	139	0.3341	0.1866		

表 2(续)

InDel 标记 InDel marker	上游引物序列 Forward sequence	下游引物序列 Reverse sequence	产物大小 (bp) Length	香农多样性指数 Shannon's	基因多样性指数 Nei's	聚类分析所用标记 Marker used for UPGMA	品种纯度分析所用标记 Marker used for purity test
EP-1209	AAATAATTTTGAAACCCCGT	TTGGAGAAATATAAGGTCCAAT	160	0.2868	0.1528		
EP-1431	AATAGTGAAAATCATGGTGC	CGCTAACTAAGAATTTTATTCC	140	0.2868	0.1528		
EP-1561	TGATCGGAGTAAAAATACACCT	TGAGACATCACCATCGTTTA	158	0.2868	0.1528		
EP-719	AATTCCTTTAGAGGGGTCCAG	CAGGAAGTATTTGTTTCCCA	110	0.2868	0.1528		
EP-1347	CAGTATAGTTTGCCAAGAGTCA	ATGGCCATGAATCAAAATAA	201	0.2868	0.1528		
EP-1411	ACTATGAAGTTAAAGGGTTGGT	GGAATGTGAGAGAACTAAAGTG	156	0.2338	0.1172		
EP-1651	TTCATTATCAAGTATGGGGC	ACAAAGGAAATCCATGAGTG	143	0.2338	0.1172		
EP-1751	CAAAATAGTGCGAAAATCAA	ACTTGTATTTGCCTTACTCAAG	80	0.2338	0.1172		
EP-1537	AGATTCATCAGGTGGATTG	CAAGTTCGAGGGTGTTTTAA	155	0.2338	0.1172		
EP-1033	TGCACTCATCTCATTAACCA	GTTAGAAGTTGACGCTCAGG	93	0.1732	0.0799		
EP-1563	TCCACTCATCTCATCAATCA	GGGGTGTGAGTGAAGTCTAA	154	0.1732	0.0799		
EP-1535	TGTTTTTCATTCAACCACAAG	ATTTACCACTATTCCACCCC	138	0.1732	0.0799		
EP-915	ACAGTTCATGCGAATCTT	TTGTTTCATATAAAGCAGCGA	93	0.1732	0.0799		
EP-463	TTGAAAAGCGGAATGTTAT	TTGGTTAACATGAATTTCCC	151				
EP-833	GCTGTGATTGTGGAGTCATA	ACTCAAGTTACTACGACGGC	157				
EP-899	GATTGGTTTGGTGCTGTAAT	TGAGCGAGTTAGTGTGTTCA	134				
EP-943	CAAAGTCCTAAGATACTGGAAA	AGGAAAATACTTGCAACCAA	136				
EP-975	CGTGACCCTATTTTCCTATG	TAGGGGTCTAAATTCACCCT	115				
EP-1031	AGAGGAATTCACACTTTT	TATAAGGTCCTTTTGGCTCA	158				
EP-1189	CACAGCTCTCTAAACTCAAGG	AAAAGCACTTCAAAATTCCA	155				
EP-1321	GAAGTGAAGAAATTGGAGTCG	CTCTTCTTTAGCGATGCACT	120				
EP-1343	GGTGGATTTTCCACAGTAA	ATAAATTCAGCTCAAAACGG	140				
EP-1369	AAGTTCCTCCATACAAGTTT	GAATTGCAAAGATGCAGAAT	116				
EP-1387	TTGGGAACATACGTGTTAAA	CAAAAGGAGAATTTGGATATTT	158				
EP-1407	GACGAAAAGTGTTATCTGATA	AAACGCAACTTTCGTAACAA	140				
EP-1507	TCATTAATTCACCCCTCTG	TGAATGGATAGGTATGGAGG	109				
EP-1567	TTTACGTTCCAAAATCATCA	CGAGCGACTTTATTGACATA	159				
EP-1689	CCGAGACTAAATTTACAGG	GGCTTCACAGCTTAAACATT	142				
EP-1721	AATAATAACGTGCATGGCTT	CAACAACATACCAACTTGTGA	159				

√表示此分子标记用于聚类分析或品种纯度分析

√ indicates the marker was used UPGMA or purity test

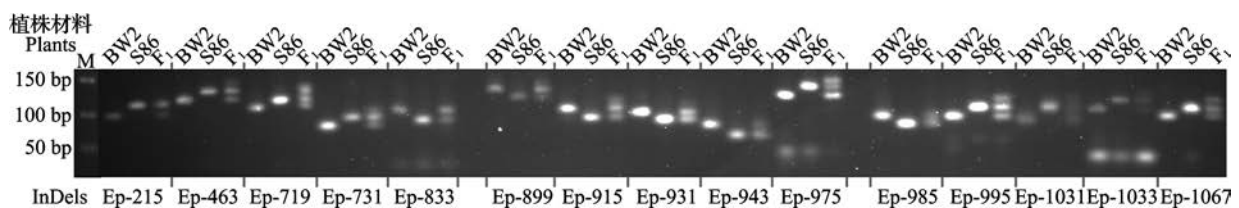


图 2 部分有效 InDel 引物在 BW2、S86 和 BW2 × S86 中的 PCR 扩增结果

Fig.2 Indel accuracy experimental validation PCR products from lines BW2, S86 and BW2 × S86

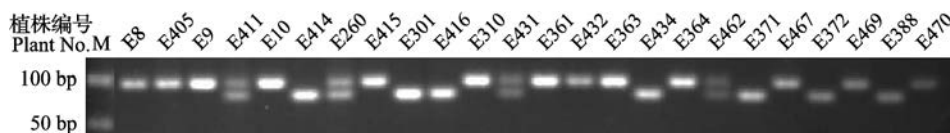


图3 InDel 引物 EP-1135 对 24 份茄子自交系的 PCR 扩增结果
Fig.3 PCR products in 24 eggplant lines with InDel marker EP-1135

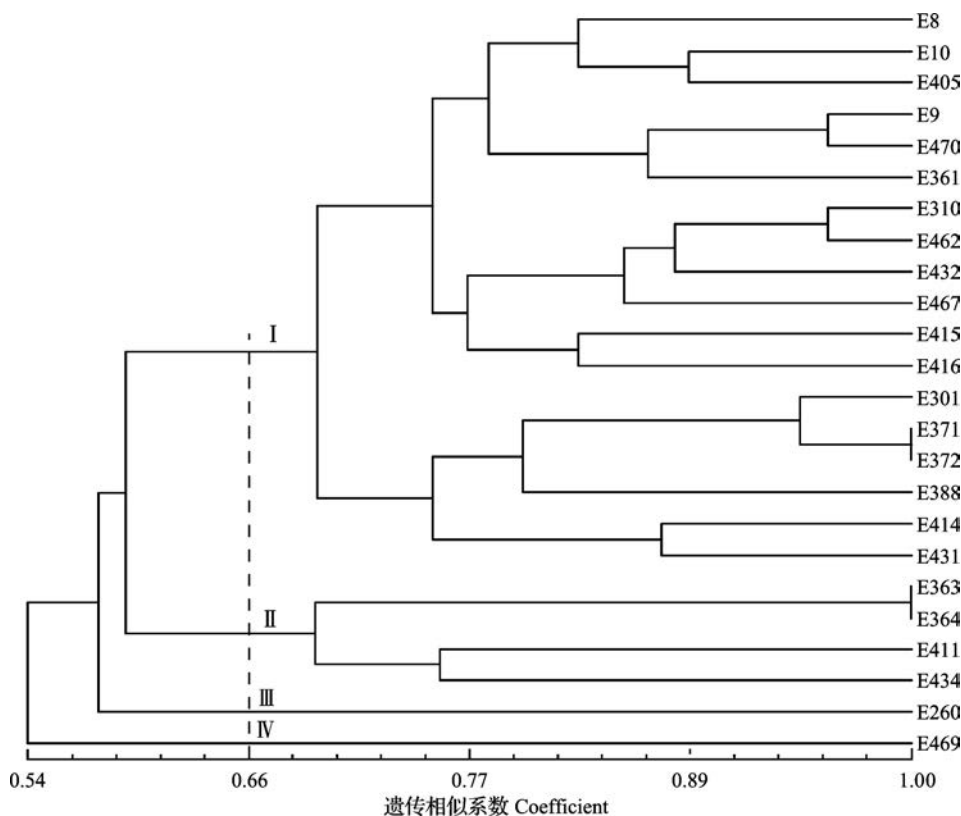


图4 24 份茄子自交系的 UPGMA 聚类图
Fig.4 UPGMA dendrogram of 24 eggplant lines

2.4 茄子品种 InDel 遗传多样性聚类分析

基于 62 对引物在 24 份茄子高代自交系中的基因多样性指数,筛选前 21 个 InDel 标记用于茄子选育品种遗传相似性分析。其中 19 对引物(表 2)能在所有 143 份品种(表 1)中扩增出条带。基于 19 个 InDel 标记,对 143 个茄子品种进行树状聚类分析(图 5),在遗传相似系数 0.65 处,143 份茄子品种大体可以分为 I ~ VII 七大类群,其中类群 I 和 III 为最大类群。I 类群包含 61 份材料(K1~K61),其茄子类型主要为来自华南地区的紫红长茄。III 类群共包含 66 份材料(K65~K130),其茄子品种来源及类型较为广泛,包括紫红长茄、紫黑长茄及绿茄等。

2.5 InDel 标记在品种纯度中的应用

从 19 个多态性标记中抽取 3 对多态性较好的引物(EP-215、EP-1203 和 EP-1067),利用该 InDel 标记对茄子品种“NFENG-3”进行纯度鉴定。所选用茄子群体大小为 166 株。3 对 InDel 引物在 166 株植株中均扩增出条带,其中 2 对(EP-215、EP-1203)具有多态性。2 对引物扩增出的条带中有 149 株的扩增条带表现一致,17 株出现不一致的条带,品种纯度为 89.8%。图 6 为引物 EP-1203 对 166 株植株扩增出的部分条带。分子标记检测结果与品种田间纯度鉴定结果(90.4%)接近,且与田间检测结果符合率达 99.3%,说明 InDel 标记能够用于茄子杂种 1 代纯度的快速鉴定。

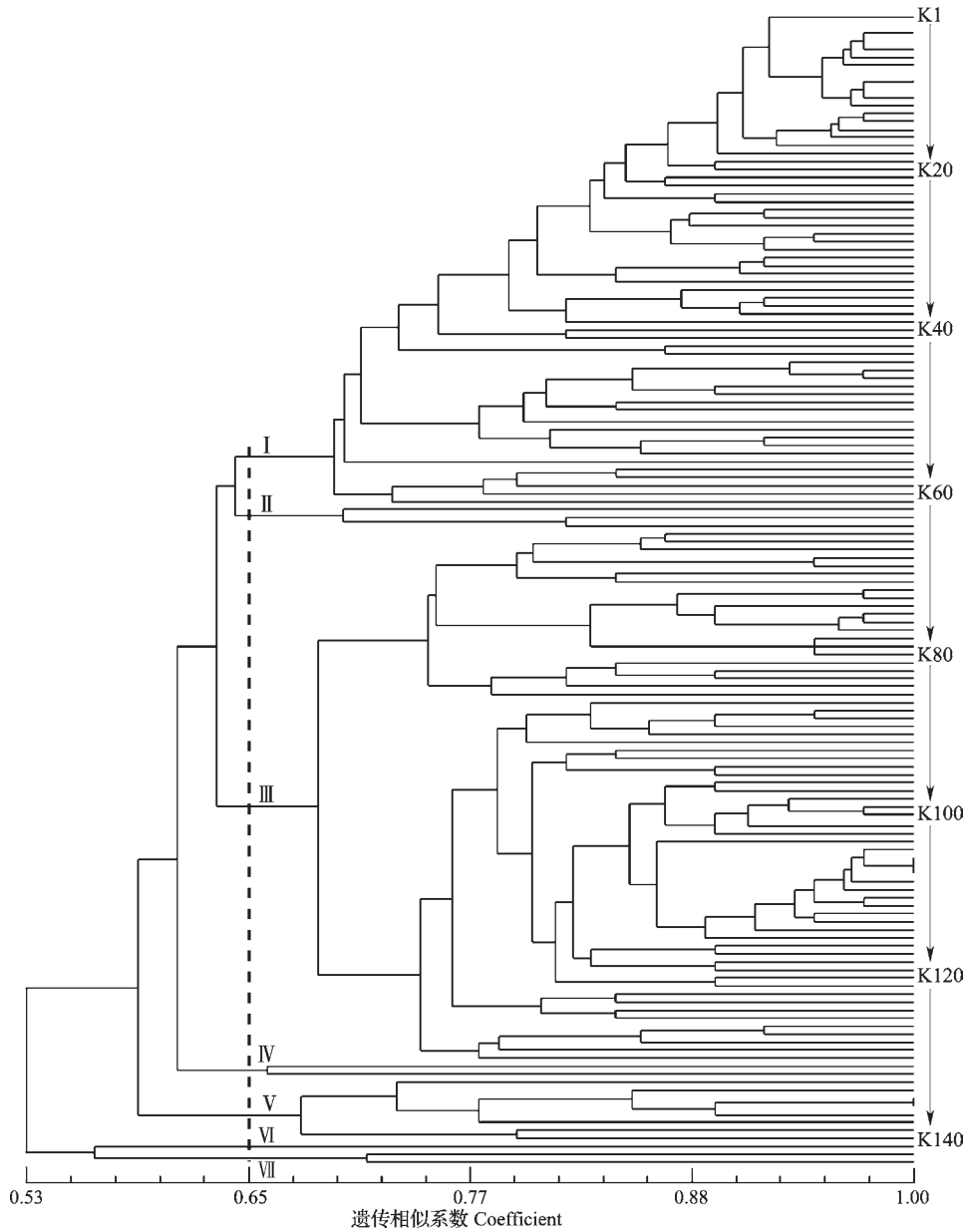


图 5 143 份茄子品种的 UPMGA 聚类图

Fig.5 UPGMA dendrogram of 143 eggplant varieties



图 6 InDel 引物 EP-1203 对杂交种 NFENG-3 号茄子的部分检测图谱

Fig.6 PCR amplification in individual plants of variety NFENG-3 with InDel marker EP-1203

3 讨论

近年来,随高通量测序成本的不断降低,越来越多的研究者开始利用已有的测序数据或重测序数据,开发相应作物的分子标记,例如 SNP 标记和 InDel 标记。然而,SNP 检测成本及其对设备需

求高,难以大范围普及和推广,尤其是在发展中国家^[28-29]。相反,InDel 标记检测成本低,对检测设备无特殊要求,操作简单易行。作为一种分子标记,InDel 标记现已成功应用于法医个体识别和亲权鉴定^[30-31]。同样,InDel 标记在水稻、小麦、番茄和黄瓜上也取得了较大的研究进展^[32-33]。

本研究通过茄子重测序数据,分析了2份不同来源茄子基因组中的InDel位点。与前人研究结果相类似,InDel位点主要分布于基因间隔序列及基因上/下游1 Kb区间(图1)。约4.1%的InDel位于茄子外显子区域(图1),略高于甘蓝型油菜(3.1%)^[34],而明显高于辣椒(0.2%)^[21]。其原因可能是本研究中使用的茄子材料与茄子参考基因组使用的茄子材料的亲缘关系较远,导致两者间InDel数量,尤其是分布于外显子区域的数量较多。本研究用于重测序的2份茄子材料BW2和S86,其果形、果色、抗病性及植株形态差异较大。据此推测BW2和S86茄子材料的亲缘关系较远。InDel分析结果显示,BW2和S86间的InDel数量(151327)也明显多于BW2(105076)或S86(88965)与参考基因组间的InDel数量。BW2和S86间丰富的InDel数量将为茄子抗病基因(抗青枯病)和主要农艺性状基因(果形、果色等)定位和克隆奠定基础。

经有效性鉴定,BW2和S86间InDel标记的多态率为34.7%,其多态率远低于其他作物。例如,在大白菜(*Brassica rapa*)自交系L144和Z16间,639对InDel标记中491对具有多态性,多态率达到76.8%^[35];大白菜自交系He102与06-247间InDel标记多态性为63.6%^[36]。普通栽培番茄Heinz1706与醋栗番茄LA1589间InDel标记的多态率也高达82.4%^[20]。在番茄中,其InDel的选择标准为插入/缺失碱基数大于2 bp^[20];在白菜中,其InDel的选择标准为插入/缺失碱基数大于3 bp或3~5 bp^[35-36]。而本研究中为了便于利用琼脂糖凝胶电泳分析,InDel的选择标准为插入/缺失碱基数大于10 bp。由于选择的插入/缺失碱基数较大,其假阳性也相应的增加,从而导致InDel标记的多态率低于其他物种中的InDel多态率。

在24份华南型紫红长茄材料中,62个InDel标记中46个具有多态性。基于46个InDel标记的分析结果,E371和E372、E363和E364间没有差异(图4)。其原因可能是E371和E372、E363和E364为姊妹系,加之分子标记较少且标记在染色体上的分布可能不均。InDel标记聚类分析结果显示(图5),143份茄子品种中,遗传相似系数最小为0.53,说明我国茄子品种遗传背景较为狭窄,这与前人的报道相同^[3]。143份茄子品种中,遗传相似系

数大于95%的品种有34份,遗传相似系数为100%的茄子品种有11份。本研究用于InDel聚类分析所用到的分子标记较少,其结果仍有待于进一步验证。

在番茄、茄子中的研究结果表明,SSR和InDel标记在品种纯度鉴定结果与田间鉴定结果相吻合,表明分子标记在品种纯度鉴定中的可靠性^[37-38]。事实上,与传统的田间检验相比较,以DNA为基础的分子标记技术因检测位点多,多态性好,遗传稳定且比较容易受环境条件影响,在杂交种纯度鉴定方面目前已成为一种法定有效的方法。本研究从3对引物中筛选获得2对InDel标记在NFENG-3号茄子品种中的166株植株DNA中有多态性,且2对引物检测结果相吻合。根据分子标记鉴定结果,该茄子品种纯度为89.8%,结果与田间纯度鉴定较吻合,说明InDel标记EP-1023可以用于NFENG-3茄子品种纯度的快速鉴定。

本研究结果可为茄子遗传图谱构建,功能基因挖掘、分子标记辅助育种、遗传多样性分析及品质纯度鉴定等研究工作提供候选分子标记。

参考文献

- [1] Taher D, Solberg S Ø, Prohens J, Chou Y Y, Rakha M, Wu T H. World Vegetable Center Eggplant Collection: origin, composition, seed dissemination and utilization in breeding. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1484
- [2] 马兆红. 从生产市场需求谈我国番茄品种的变化趋势. *中国蔬菜*, 2017, 1(3): 1-5
Ma Z H. Variety of Chinese tomato from production market demand. *China Vegetables*, 2017, 1(3): 1-5
- [3] 连勇, 刘富中, 田时炳, 陈钰辉, 张映. “十二五”我国茄子遗传育种研究进展. *中国蔬菜*, 2017, 1(2): 14-22
Lian Y, Liu F Z, Tian S B, Chen Y H, Zhang Y. Advances of research on genetics and breeding of eggplant during ‘The Twelfth Five-year Plan’ in China. *China Vegetables*, 2017, 1(2): 14-22
- [4] Gur A, Zamir D. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e245
- [5] 杨洋, 田时炳, 王永清, 罗章勇, 王之劲, 王鹤冰, 汝学娟, 张世才, 朱利泉. 茄子耐热相关EST-SSR分子标记的研究. *西南农业学报*, 2012, 25(5): 1798-1804
Yang Y, Tian S B, Wang Y Q, Luo Z Y, Wang Z J, Wang H B, Ru X J, Zhang S C, Zhu L Q. Study on EST-SSR markers related to thermotolerance of eggplant. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(5): 1798-1804
- [6] 汪国平, 牛玉, 汪文毅, 乐素菊, 林鉴荣. 番茄SSR标记在茄子及其他茄科作物上的通用性分析. *华南农业大学学报*,

- 2014, 35(4): 56-60
- Wang G P, Niu Y, Wang W Y, Le S J, Lin J R. Transferability of tomato SSR markers to eggplants and other Solanaceous vegetables. *Journal of South China Agricultural University*, 2014, 35(4): 56-60
- [7] 魏明明, 陈钰辉, 刘富中, 张映, 连勇. 基于转录组测序的茄子 SSR 标记开发. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(6): 1082-1091
- Wei M M, Chen Y H, Liu F Z, Zhang Y, Lian Y. Development of SSR markers for eggplant with transcriptome sequencing data. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(6): 1082-1091
- [8] Weber J L, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 2002, 71: 854-862
- [9] Pan C H, Ai-Hong L I, Dai Z Y, Zhang H X, Liu G Q, Wang Z B, Yu-Yin M A, Yin Y J, Zhang Y F, Zuo S M. InDel and SNP markers and their applications in map-based cloning of rice genes. *Rice Science*, 2008, 15: 251-258
- [10] Usdin K. The biological effects of simple tandem repeats: lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Research*, 2008, 18: 1011-1019
- [11] Montgomery S B, Goode D L, Kvikstad E, Albers C A, Zhang Z D, Mu X J, Ananda G, Howie B, Karczewski K J, Smith K S. The origin, evolution, and functional impact of short insertion-deletion variants identified in 179 human genomes. *Genome Research*, 2013, 23: 749-761
- [12] Shen Y, Jiang H, Jin J P, Zhang Z B, Xi B, He Y Y, Wang G, Wang C, Qian L L, Li X, Yu Q B, Liu H L, Chen D H, Gao J H, Huang H, Shi T L, Yang Z N. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiology*, 2004, 135: 1198-1205
- [13] Barchi L, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Valè G, Toppino L, Rotino G L. Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. *Bmc Genomics*, 2011, 12: 304
- [14] 冯芳君, 罗利军, 李荧, 周立国, 徐小艳, 吴金红, 陈宏伟, 陈亮, 梅捍卫. 水稻 InDel 和 SSR 标记多态性的比较分析. *分子植物育种*, 2005, 3(5): 725-730
- Feng F J, Luo L J, Li Y, Zhou L G, Xu X Y, Wu J H, Chen H W, Chen L, Mei H W. Comparative analysis of polymorphism of InDel and SSR markers in rice. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(5): 725-730
- [15] 潘存红, 王子斌, 马玉银, 殷跃军, 张亚芳, 左示敏, 陈宗祥, 潘学彪. InDel 和 SNP 标记在水稻图位克隆中的应用. *中国水稻科学*, 2007, 21(5): 447-453
- Pan C H, Wang Z B, Ma Y Y, Yin Y J, Zhang Y F, Zuo S M, Chen Z X, Pan X B. InDel and SNP markers and their application in map-based cloning of rice genes. *Chinese Journal of Rice Science*, 2007, 21(5): 447-453
- [16] Xian H H, Lin C L, Zhi Y P, Bao Y W, Sai J T, Mao Y D, Jing J L, Fang X Z, Yun D Z, Hong Y G. A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in arabidopsis. *Plant Journal*, 2010, 63: 880-888
- [17] houvik D, Upadhyaya H D, Rishi S, Deepak B, Gowda C L L, Shivali S, Sube S, Tyagi A K, Parida S K. Genome-wide insertion-deletion (InDel) marker discovery and genotyping for genomics-assisted breeding applications in chickpea. *DNA Research*, 2015, 22: 377-386
- [18] 李斯更, 沈镒, 刘博, 邱杨, 张晓辉, 张忠华, 王海平, 李锡香. 基于黄瓜基因组重测序的 InDel 标记开发及其应用. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(2): 278-283
- Li S G, Shen D, Liu B, Qiu Y, Zhang X H, Zhang Z H, Wang H P, Li X X. Development and application of cucumber InDel markers based on genome re-sequencing. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(2): 278-283
- [19] 李群三, 陈景斌, 顾和平, 袁星星, 陈新, 崔瑾. 基于 InDel 标记的国内绿豆品种遗传多样性分析及指纹图谱构建. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 122-128
- Li Q S, Chen J B, Gu H P, Yuan X X, Chen X, Cui J. Genetic diversity and fingerprint analysis of mungbean varieties from China based on InDel markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(1): 122-128
- [20] Yang J, Wang Y, Shen H, Yang W. In silico identification and experimental validation of Insertion-Deletion polymorphisms in tomato genome. *DNA Research*, 2014, 21: 429
- [21] 郭广君, 孙茜, 刘金兵, 潘宝贵, 刁卫平, 戈伟, 高长洲, 王述彬. 基于辣椒基因组重测序的 InDel 标记开发及应用. *江苏农业学报*, 2015, 31(6): 1400-1406
- Guo G J, Sun Q, Liu J B, Pan B G, Diao W P, Ge W, Gao C Z, Wang S B. Development and application of cucumber InDel markers based on genome re-sequencing. *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 2015, 31(6): 1400-1406
- [22] Li Y H, Bo L, Reif J C, Liu Y L, Li H H, Chang R Z, Qiu L J U. Development of insertion and deletion markers based on biparental resequencing for fine mapping seed weight in soybean. *Plant Genome*, 2014, 7(3): 1-8
- [23] Zhang T, Gu M, Liu Y, Lv Y, Zhou L, Lu H, Liang S, Bao H, Zhao H. Development of novel InDel markers and genetic diversity in *Chenopodium quinoa* through whole-genome re-sequencing. *Bmc Genomics*, 2017, 18: 685
- [24] Barchi L, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Valè G, Toppino L, Rotino G L. Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. *Bmc Genomics*, 2011, 12: 304
- [25] Barchi L, Lanteri S, Portis E, Vale G, Volante A, Pulcini L, Ciriacci T, Acciarri N, Barbierato V, Toppino L. A RAD tag derived marker based eggplant linkage map and the location of QTLs determining anthocyanin pigmentation. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43740
- [26] Portis E, Barchi L, Toppino L, Lanteri S, Acciarri N, Felicioni N, Fusari F, Barbierato V, Cericola F, Vale G. QTL mapping in eggplant reveals clusters of yield-related loci and orthology with the tomato genome. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89499
- [27] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular*

- Biology Reporter, 1997, 15: 8-15
- [28] Ribaut J M, Vicente M D, Delannay X. Molecular breeding in developing countries: challenges and perspectives. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13: 213-218
- [29] Slater A T, Cogan N O I, Forster J W. Cost analysis of the application of marker-assisted selection in potato breeding. *Molecular Breeding*, 2013, 32: 299-310
- [30] Li C T, Zhang S H, Zhao S M. Genetic analysis of 30 InDel markers for forensic use in five different Chinese populations. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10: 964
- [31] Fondevila M, Phillips C, Santos C, Pereira R, Gusmao L, Carracedo A, Butler J M, Lareu M V, Vallone P M. Forensic performance of two insertion-deletion marker assays. *International Journal of Legal Medicine*, 2012, 126: 725-737
- [32] Wu D H, Wu H P, Wang C S, Tseng H Y, Hwu K K. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. *Euphytica*, 2013, 192: 131-143
- [33] 王娟, 刘宇, 李春娟, 闫彩霞, 赵小波, 单世华. 基于简化基因组的花生 InDel 标记开发和功能解析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 179-187
- Wang J, Liu Y, Li C J, Yan C X, Zhao X B, Shan S H. Development and functional analysis of peanut insertion and deletion (InDel) markers based on genotyping-by-sequencing (GBS). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(1): 179-187
- [34] 岳晓鹏. 基于甘蓝型油菜基因组重测序开发 InDel 标记. 武汉: 华中农业大学, 2014
- Yue X P. Development of InDel markers based on whole genome resequencing in *Brassica Napus*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014
- [35] Bo L, Yan W, Wen Z, Jie D, Hui W, Yang C, Feng C, Xiaowu W, Jian W. Development of InDel markers for Brassica rapa based on whole-genome re-sequencing. *Theoretical & Applied Genetics*, 2013, 126: 231-239
- [36] 张志刚, 赵智中, 李巧云, 王晓, 刘栓桃, 王淑芬, 徐文玲, 刘贤姻, 刘辰. 大白菜 InDels 标记开发及其在剩余杂合体鉴定中的应用. *农业生物技术学报*, 2016, 24(4): 510-518
- Zhang Z G, Zhao Z Z, Li Q Y, Wang X, Liu S T, Wang S F, Xu W L, Liu X X, Liu C. Development of InDels markers and their usage in detection of residual heterozygous lines in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(4): 510-518
- [37] 张录霞, 甘中祥, 李倍金, 魏强, 闫德林, 张勇, 迟庆勇, 彭刚. 利用 InDel 标记鉴定加工番茄杂交种纯度. *分子植物育种*, 2016, 14(6): 1533-1537
- Zhang L X, Gan Z X, Li B J, Wei Q, Yan D L, Zhang Y, Chi Q Y, Peng G. Hybrid purity identification of processed tomato by InDel markers. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(6): 1533-1537
- [38] 王利英, 乔军, 石瑶, 王振英, 李素文. 茄子 SSR 多态性引物的筛选及品种纯度鉴定. *华北农学报*, 2012, 27(4): 98-101
- Wang L Y, Qiao J, Shi Y, Wang Z Y, Li S W. Selection of SSR core primers and varieties purity identification in eggplant. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(4): 98-101

欢迎订阅 2020 年《茶叶科学》

《茶叶科学》是由中国科协主管, 中国茶叶学会和中国农业科学院茶叶研究所主办, 中文核心期刊, 中国科学引文及中国学术期刊综合评价数据库来源期刊, CA、CAB 等收录, 影响因子等期刊评价指标列同类期刊第一。主要报道最新涉茶科技成果, 内容包括茶树栽培、育种、病虫害防治、茶叶加工、生化、机械、技术经济、茶饮料、茶食品和保健品、茶的医用保健等。国内连续出版物号 CN 33-1115/S, 国际连续出版物号 ISSN 1000-369X。

双月刊, 大 16 开本。自 2018 年起, 每期定价 20 元, 全年订价 120 元 (2018 年以前的期刊仍按每期 10 元征订)。为简化手续, 订刊只需在汇款单上写清收刊地址、收件人、订购数量等详细信息即可, 并可一次订购今后 1~3 年的期刊。款到即寄期刊及发票。免邮费。

征订方式:

(1) 邮汇地址: 浙江省杭州市梅灵南路 9 号中国农业科学院茶叶研究所, 收款人:《茶叶科学》编辑部, 邮编: 310008;

(2) 银行汇款: 开户银行: 中国农业银行杭州市西湖支行, 帐号: 19000101040005296, 开户名: 中国农业科学院茶叶研究所。银行汇款时请在附言中注明“茶叶科学”。

汇款后, 请电子邮件 (cykx@vip.163.com) 告知详细联系地址、邮编、联系人、发票抬头、发票抬头为企事业单位的请提供税号或统一社会信用代码 (抬头为个人的除外) 以及所征订的年份和期数。并将汇款凭证扫描后电子邮件发给我们, 以便我们财务对账。

投稿方式: 请进入《茶叶科学》网站 (www.tea-science.com) 后, 进入采编系统线上投稿进行网上在线投稿。

电话: 0571-86651482 (投稿及订刊)

E-mail: cykx@vip.163.com (订刊)

传真: 0571-86651482

网址: www.tea-science.com