

西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析

李 严 张春庆*

(山东农业大学农学院, 泰安 271018)

摘 要: 利用新型分子标记 SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) 进行西瓜杂交种遗传多态性的研究, 利用 25 个引物组合对当前生产上推广的 20 个西瓜杂交种进行扩增, 从中筛选得到 20 个多态性引物组合, 共产生 135 个多态性条带, 平均每个引物组合产生 7.11 个多态性条带, 显示了较高的多态性比率。聚类分析 20 个引物组合的扩增结果, 20 份材料分为 3 大类, Jaccard's 相似系数在 0.29~0.86 之间。

关键词: 西瓜; 杂交种; 多态性; SRAP

中图分类号: S 651 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 04-0643-05

Studies on Genetic Diversity with a Molecular Marker SRAP of Watermelon Hybrids

Li Yan and Zhang Chunqing*

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Study on genetic diversity of watermelon could benefit the research of cultivar property right protecting, seed purity testing, and genetic breeding. A new molecular marker system-SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) was firstly applied on 20 watermelon hybrids genetic diversity research. 20 primer pairs selected from 25 amplified 135 polymorphic bands with an average of 7.11 polymorphic bands per primer pair. Cluster analysis using UPGMA method based on the data of SRAP amplified bands by 20 primer pairs showed 20 hybrids could be distinguished into three main groups. Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.29 - 0.86.

Key words: Watermelon; Hybrid; Polymorphism; SRAP

由于西瓜本身遗传基础狭窄, 造成品种间多态性较低, 国内外曾利用各种技术进行西瓜多态性分析, 有些研究表明利用蛋白质或同工酶谱带的差异可以区分部分西瓜品种^[1,2], 有的却认为同工酶和蛋白质很难或者无法在栽培品种之间产生多态性^[3,4]。欧阳新星等^[5]曾针对‘京欣 1 号’及其父母本筛选了 320 个 RAPD 引物, 仅得到 1 个引物可以区分母本和杂交种, 不能区分父本和杂交种。这说明与其他作物相比, 西瓜需要选择多态性更高的分子标记技术才能有效地区分不同种质材料。车克鹏等^[6]利用 AFLP 技术对 30 个西瓜核心种质材料进行分析, 建立了可以相互区分的指纹图谱。但是 AFLP 技术操作复杂成本昂贵, 应用受到限制, 新型 PCR 标记技术——相关序列扩增多态性 SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) 可以弥补上述不足。SRAP 标记最早是在芸薹属作物中开发利用, 目前已在马铃薯、水稻、莴苣、花椰菜、油菜、大蒜、棉花等植物中应用, 用于遗传多样性分析、比较基因组学、图谱构建等方面^[7], 在国外应用较多^[8~13], 国内很少。本试验利用此项技术对当前生产上推广的 20 个西瓜杂交种多态性进行鉴定, 为解决西瓜品种多态性较低的问题提供了可能性, 可为葫芦科其他作物的多态性研究提供有益的参考。

1 材料与方法

供试材料为 20 个当前生产上推广的西瓜 F₁ 杂交种 (图 2), 购自泰安市南关种子市场, 全部为

收稿日期: 2004 - 11 - 11; 修回日期: 2005 - 01 - 12

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: cqzhang@sda.u.edu.cn)

2003年收获的种子,其熟期、果形、叶形、粒形等农艺性状各不相同,具有代表性。试验地点为山东农业大学农学院种子科学与工程试验室,时间为2003~2004年。SRAP引物参考 Ferriol等^[10]论文中的引物,从中选出5条正向引物和5条反向引物,正向引物和反向引物两两搭配组合,形成25个引物组合。正向引物(forward primer)有ME-1、ME-2、ME-6、ME-7、ME-8,反向引物(reverse primer)为EM-1、EM-2、EM-5、EM-3、EM-6。引物由上海生工合成,Taq酶和反应底物均购自上海生工。

DNA提取方法参考Li等^[8]的方法做了调整,将提取叶片DNA改为提取干种子DNA,并进行了扩增效果的比较。PCR扩增反应体系和反应程序参考Ferriol等^[10]方法。PCR反应程序在PTC-100温度循环仪(美国产)上进行。扩增产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,凝胶浓度为10%,电泳缓冲液为1×TBE,稳压120V,电泳至溴酚蓝移到凝胶底部结束。凝胶银染参考张军等^[14]的方法,银染后的凝胶利用复日凝胶成像仪拍摄保存。试验3次重复。

数据分析计算:每个引物组合的多态性比率(%)=引物组合扩增的多态性条带数/总条带数×100,每个引物的鉴别能力(%)=此引物组合可鉴别的品种类别数/总品种数×100,采用Jaccard's相似系数,使用NTSYS-PC 2.0软件,非加权组平均法(UPGMA)聚类。相似系数计算公式为: $S_{ij} = a / (a + b + c)$,其中a表示两份样品共有带数,b表示i样品特有的条带数,c表示j样品特有的条带数。

2 结果与分析

2.1 DNA提取方法的比较

将提取叶片DNA改为直接提取干种子的DNA,提取的DNA经核酸浓度测定仪检测显示质量较好,与叶片提取的DNA经过扩增后比较,带型和效果一致。说明可以直接利用种子DNA进行SRAP分析。这对样品的运输保存、缩减检验时间和降低成本具有实用价值。

2.2 引物的多态性分析

将25个引物组合用于扩增20个杂交种,除了5个引物组合ME-2/EM-2、ME-7/EM-2、ME-7/EM-3、ME-7/EM-5、ME-8/EM-1扩增不成功或者没有多态性之外,其余20个引物均能产生多态性(表1),其中多态性较高的引物组合有ME-1/EM-2、ME-1/EM-3、ME-1/EM-6(图1)、ME-2/EM-1、

表1 20个引物组合产生的多态性

Table 1 The number of polymorphic bands generated by 20 primer pairs

组合编号 Primer pair serial number	组合名称 Name of primer pair	总条带数 Total number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphic rate (%)	可鉴别的类别数 Number of distinguishable kind	鉴别能力 Distinguished ability (%)
1	ME-1/EM-1	13	4	31	6	30
2	ME-1/EM-2	18	9	50	14	40
3	ME-1/EM-3	22	15	68	19	95
4	ME-1/EM-5	11	4	36	6	30
5	ME-1/EM-6	17	10	58	10	50
6	ME-2/EM-1	18	5	28	9	45
8	ME-2/EM-3	21	9	43	12	60
9	ME-2/EM-5	17	5	29	19	95
10	ME-2/EM-6	17	8	47	14	70
11	ME-6/EM-1	16	6	38	14	70
12	ME-6/EM-2	23	15	65	19	95
13	ME-6/EM-3	16	8	50	14	70
14	ME-6/EM-5	15	2	13	3	15
15	ME-6/EM-6	18	9	50	17	85
16	ME-7/EM-1	12	4	33	7	35
20	ME-7/EM-6	13	2	15	3	30
22	ME-8/EM-2	15	5	33	6	30
23	ME-8/EM-3	17	8	47	9	45
24	ME-8/EM-5	13	2	15	3	15
25	ME-8/EM-6	19	5	26	7	35

ME-2/EM-3、ME-6/EM-2、ME-6/EM-6、ME-8/EM-6等。每个组合可产生 11~23 条清晰条带（表 1）。20 个引物组合共产生 135 条多态性条带，每个组合的多态性条带数有 2~15 不等，平均每个引物组合产生 7.11 个多态性条带，单个引物组合的多态性比率在 13%~68% 之间。这说明 SRAP 多态性较高，适于分析西瓜等遗传差异小的作物。

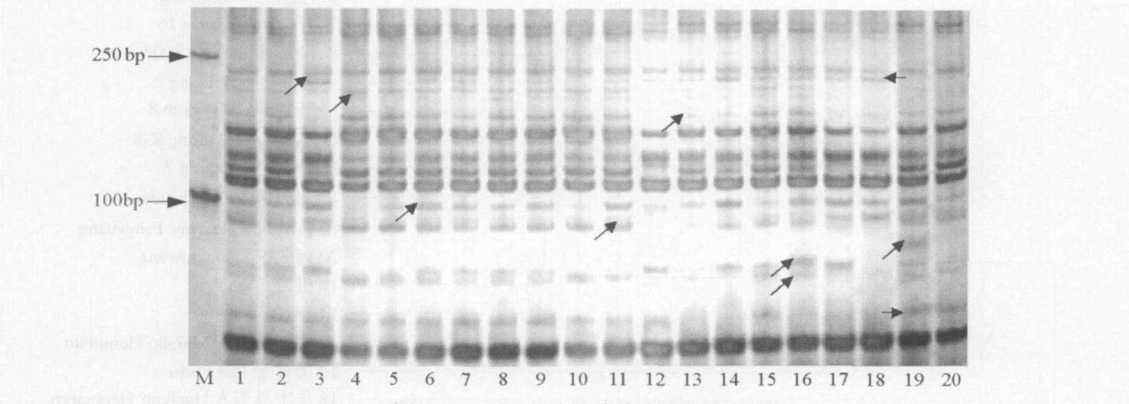


图 1 引物 ME-1/EM-6 对 20 个杂交种的扩增结果

M 为 DL2000，1~20 号品种见图 2，箭头表示多态性条带。

Fig 1 The amplification result of 20 watermelon hybrids by the primer pair ME-1/EM-6

M is DNA marker (DL2000). Cultivar number is the same as Fig 2, Arrows show polymorphic bands

2.3 品种多态性鉴定

20 个引物组合的鉴别能力在 15%~95% 之间，其中 3 个引物组合 ME-1/EM-3、ME-2/EM-5、ME-6/EM-2 的鉴别能力均达到 95%，可以用来区分大部分品种。没有得到完全区分所有品种的单个引物组合。这说明部分品种之间亲源关系极为接近。本试验分别对每两组引物组合的扩增结果采用 Jaccard's 相似系数进行 UPCMA 聚类分析，得到可以完全区分 20 个品种的 14 组引物组合搭配（表 2），选取其中的两对引物组合分别扩增比较结果，就可以达到完全鉴别的目的。从表 2 中可以看出，13 个引物组合（编号为 3，12，15，6，11，2，1，8，13，16，23，20，10）可以用来搭配成为双引物组合用于鉴别，选择引物组合进行搭配的原则主要依据各引物组合的鉴别能力，一般鉴别能力越高，搭配的组的鉴别能力越高，品种间多态性越高。

表 2 可以完全鉴别 20 个杂交种的两对引物组合的搭配表

Table 2 Two primer pair combination to identify 20 hybrids

组合搭配 (序号)	总多态性条数	相似系数范围	组合搭配 (序号)	总多态性条数	相似系数范围
Primer pair combination	Polymorphic bands number	Range of J's coefficient	Primer pair combination	Polymorphic bands number	Range of J's coefficient
3 + 12	30	0.25 ~ 0.86	3 + 16	19	0.29 ~ 0.81
3 + 15	24	0.25 ~ 0.86	3 + 20	17	0.17 ~ 0.86
3 + 6	20	0.28 ~ 0.88	3 + 23	23	0.17 ~ 0.89
3 + 11	21	0.25 ~ 0.85	12 + 2	24	0.30 ~ 0.92
3 + 1	19	0.20 ~ 0.88	12 + 15	24	0.19 ~ 0.88
3 + 8	24	0.34 ~ 0.85	15 + 11	15	0.29 ~ 0.92
3 + 13	23	0.29 ~ 0.81	11 + 10	14	0.29 ~ 0.91

根据 20 对引物组合的扩增结果对 20 个杂交种进行聚类分析（图 2），Jaccard's 相似系数在 0.29~0.86 之间。在相似系数为 0.57 的水平上，可以将试材分为 3 大类，1~8 号为 1 类，9~11 号为 1 类，13~16 号、19、20 号为 1 类。12、17、18 号由于遗传差异过大，难以归类。结果显示，试材间农艺性状越相似，相似系数越高，例如相似系数较高 2 号和 3 号之间以及 19 号和 20 号之间无论在籽粒性状还是果实性状上甚至产地来源上均一致。一般来说，农艺性状相近的品种之间具有较近的亲缘关系，这说明 SRAP 标记可以用来研究种质资源的亲缘关系。

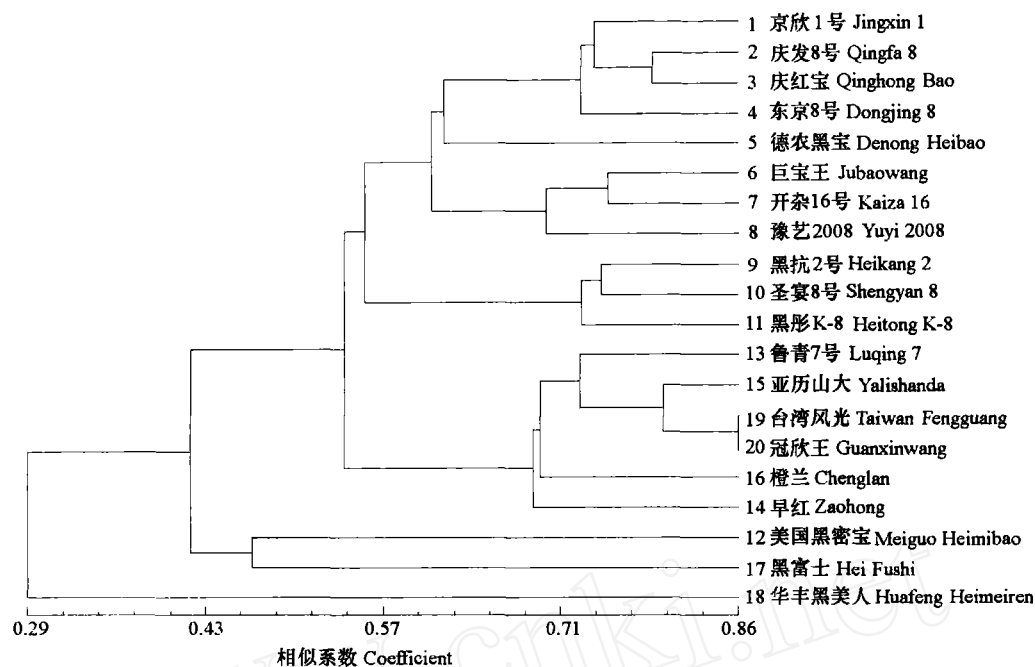


图 2 20个西瓜杂交种材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 20 watermelon hybrids

3 讨论

SRAP标记技术与 RAPD方法相比, 具有较高的引物多态性比率和鉴别能力, 能够区分绝大多数栽培品种, 对于遗传差异过小的个别品种虽然尚不能利用单个引物组合进行鉴别, 但是这些往往具有相似农艺性状、即使采用田间种植也无法鉴别的品种之间可以选择鉴别能力较高的两个引物组合联合鉴别。SRAP聚类分析结果可以用来研究品种间的亲源关系。SRAP的上游引物和下游引物可以通用, 两两搭配组合, 提高了引物的利用效率, 与 SSR相比省却了引物开发的困难, 与 AFLP相比省却了酶切、连接、扩增杂交等繁琐步骤, 成本较低。SRAP具有 RAPD同样的操作简便性, 仅在扩增产物的检测上采用较复杂的聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染技术, 但是与琼脂糖电泳检测结果相比, 分辨率大大提高, 而且不使用溴化乙锭, 不会造成环境污染, 减少操作危险性。多次重复试验结果稳定, 克服了 RAPD重复稳定性差的缺点。本文仅讨论了部分 SRAP引物组合, 而且与林忠旭等^[13]对棉花品种多态性的 SRAP研究结果相比, 西瓜的 SRAP多态性水平相对低, 是与西瓜自身遗传资源有关, 另外是否与反应体系和反应程序有关还有待于进一步研究。

参考文献:

- 1 王 玺. PAGE法鉴定西瓜杂交种研究初报. 沈阳农业大学学报, 1996, 3, 27 (1): 92~94
Wang X. Studies on PAGE method for the variety identification of hybrid watermelon seeds. Journal of Shenyang Agricultural University, 1996, 3, 27 (1): 92~94 (in Chinese)
- 2 李 丽, 郑晓鹰, 邢宝田. SDS-PAGE蛋白电泳技术在 F₁ 代杂交种纯度鉴定中的应用. 种子, 2000, 6: 51~53
Li L, Zheng X Y, Xing B T. Application of SDS-PAGE on F₁ hybrids purity identification. Seed, 2000, 6: 51~53 (in Chinese)
- 3 Zamir D, Navot N, Rudich J. Enzyme polymorphism in *Citnallus* and *C. colocithis* in Israel and Sinai. Plant Systematics and Evolution, 1984, 146: 163~170
- 4 Navot N. Linkage relationship of 19 protein coding genes in watermelon. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 72 (3): 274~278
- 5 欧阳新星, 许 勇, 张海英. 应用 RAPD技术快速进行西瓜杂交种纯度鉴定的研究. 农业生物技术学报, 1999, 7 (1): 23~27
Ouyang X X, Xu Y, Zhang H Y. Rapid identification of hybrid purity in watermelon using RAPD. Journal Agricultural Biotechnology, 1999, 7 (1): 23~27 (in Chinese)
- 6 车克鹏, 许 勇, 梁春阳. 西瓜核心种质的 AFLP指纹图谱和 SCAR 标记. 植物学报, 2003, 45 (6): 731~735

- Che K P, Xu Y, Liang C Y. AFLP fingerprint and SCAR marker of watermelon core collection. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45 (6): 731 ~ 735 (in Chinese)
- 7 任 羽, 王得元, 张银东. 相关序列扩增多态性 (SRAP) 一种新的分子标记技术. *中国农学通报*, 2004, 12: 11 ~ 12
- Ren Y, Wang D Y, Zhang Y D. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP): a novel technique for molecular marker. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 12: 11 ~ 12 (in Chinese)
- 8 Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *B. russiae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455 ~ 461
- 9 Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 271 ~ 282
- 10 Ferriol M, Pico B, Pascual Fernandez de Cordova, Nuez F. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker. *Crop Science*, 2004, 44: 653 ~ 664
- 11 Budak H, Sheaman R C, Pamaksiz I. Molecular characterization of *B. buffalograss* germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 328 ~ 334
- 12 Li G, Gao M, Yang B, Quiros C F. Gene for gene alignment between the *B. russiae* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 168 ~ 180
- 13 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP在棉花 F₂ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析. *遗传学报*, 2004, 31 (6): 622 ~ 626
- Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F₂ segregation population and genetic diversity in cotton. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31 (6): 622 ~ 626 (in Chinese)
- 14 张 军, 武耀廷, 郭旺珍. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测. *棉花学报*, 2000, 12 (5): 267 ~ 269
- Zhang J, Wu Y T, Guo W Z. Markers in cotton with PAGE/silver staining. *Cotton Science*, 2000, 12 (5): 267 ~ 269 (in Chinese)

欢迎购阅下列新书

- | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 - 1 《英汉生物学词汇》(第二版) 99元 | 1 - 57 《微注射和转基因实验指南》66元 | 1 - 80 《耐盐植物研究》108元 |
| 1 - 7 《PCR技术实验指南》(译) 110元 | 1 - 58 《真核生物转录调控——概念、策略和方法》86元 | 1 - 81 《染色体带: 基因组的图型》32元 |
| 1 - 8 《植物生理与分子生物学》94元 | 1 - 59 《DNA与RNA基本操作技术》52元 | 1 - 82 《生物安全》68元 |
| 1 - 9 《英汉生物学词汇》106元 | 1 - 60 《蛋白质组学: 从序列到功能》50元 | 1 - 83 《生物芯片分析》100元 |
| 1 - 11 《蛋白质结构分析》(译) 46元 | 1 - 62 《植物基因工程》(第2版) 97元 | 1 - 84 《生物信息学: 方法与实践》47元 |
| 1 - 13 《蛋白质电泳实验技术》29元 | 1 - 63 《基因组》55元 | 1 - 85 《生物信息学中的计算机技术》(影印版) 56元 |
| 1 - 14 《分子遗传学》70元 | 1 - 64 《植物数量性状遗传体系》57元 | 1 - 86 《实用生物化学与分子生物学词典》86元 |
| 1 - 17 《植物分子遗传学》(第二版) 88元 | 1 - 65 《体外培养的原理与技术》165元 | 1 - 87 《数量遗传学》38元 |
| 1 - 22 《英汉化学化工词汇》(第四版) 110元 | 1 - 66 《PCR技术实验指南》(第二版) (影印版) 110元 | 1 - 88 《统计遗传学》67元 |
| 1 - 24 《精编分子生物学实验指南》(译) 123元 | 1 - 67 《RNA实验技术手册》75元 | 1 - 89 《探索基因组学、蛋白质组学和生物信息学》(附光盘) 67元 |
| 1 - 25 《植物分子生物学实验指南》(译) 52元 | 1 - 68 《蛋白质化学与蛋白质组学》85元 | 1 - 90 《现代细胞分子生物学技术》166元 |
| 1 - 26 《蛋白质纯化与鉴定实验指南》(译) 52元 | 1 - 69 《蛋白质与蛋白质组学实验指南》(影印版) 110元 | 1 - 91 《现代英汉生物工程词典》75元 |
| 1 - 27 《实用分子生物学方法手册》32元 | 1 - 70 《蛋白质组学: 理论与方法》53元 | 1 - 92 《植物成分功能》111元 |
| 1 - 31 《被子植物有性生殖图谱》96元 | 1 - 71 《分子酶学工程导论》56元 | 1 - 93 《植物分子育种》69元 |
| 1 - 32 《基因工程原理》(第二版) 上册 58元 | 1 - 72 《分子生物学实验室工作汉英图解指南》53元 | 1 - 94 《植物生物化学与分子生物学》(全彩色) 289元 |
| 1 - 33 《基因工程原理》(第二版) 下册 78元 | 1 - 73 《高级分子生物学要义》179元 | 1 - 95 《中国农作物及其野生近缘植物染色体图谱》203元 |
| 1 - 38 《植物生殖遗传学》30元 | 1 - 74 《高级植物分子生物学》85元 | 1 - 96 《中国园林花卉植物染色体图谱》251元 |
| 1 - 39 《蛋白质技术手册》33元 | 1 - 75 《基础生物化学》144元 | 1 - 97 《种子生理研究》124元 |
| 1 - 41 《英汉生物化学及分子生物学词典》88元 | 1 - 76 《基因及其表达》(第二版) 58元 | 1 - 98 《种子植物系统学》111元 |
| 1 - 43 《分子细胞生物学》78元 | 1 - 77 《进化生物技术 - 酶定向分子进化》45元 | 1 - 99 《种子植物形态解剖学导论》(第二版) 57元 |
| 1 - 44 《现代遗传学原理》77元 | 1 - 78 《景观生态学原理及应用》53元 | |
| 1 - 48 《细胞信号转导》(第三版) 55元 | 1 - 79 《抗体技术实验指南》46元 | |
| 1 - 50 《细胞实验指南》(译)(上、下) 244元 | | |
| 1 - 52 《分子克隆实验指南》(第三版) 187元 | | |
| 1 - 53 《生物信息学: 序列与基因组分析》82元 | | |
| 1 - 54 《生物化学技术原理及应用》(第三版) 45元 | | |
| 1 - 56 《分子生物学》89元 | | |

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部, 邮编: 100081。