

# 西瓜种质资源遗传差异的 SRAP 和 EST-SSR 分析

赵胜杰,刘文革,阎志红,何楠,包文凤

( 中国农业科学院 郑州果树研究所,河南 郑州 450009)

摘要: 利用 30 对 SRAP( Sequence related amplified polymorphism) 引物和 11 对 EST-SSR 引物对西瓜 9 份栽培自交系、3 份美国材料和 6 份非洲野生种进行了遗传多样性分析。结果表明,栽培种与野生种间多态性比率高达 92.11%,野生种间多态性比率为 34.11%,栽培种间多态性比率仅为 21.05%。3 份美国材料的扩增带多数与栽培种相似,但也扩增出了一些特异条带。试验表明 SRAP 和 EST-SSR 用于西瓜作物的遗传分析是高效可行的。

关键词: 野生西瓜; 栽培西瓜; 多态性; SRAP; EST-SSR

中图分类号: S651.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0076-04

## Studies of Watermelon Genetic Diversity Using SRAP and EST-SSR

ZHAO Sheng-jie, LIU Wen-ge, YAN Zhi-hong, HE Nan, BAO Wen-feng

( Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, China)

**Abstract:** The genetic diversities were studied using 30 SRAP primer pairs in 9 cultivated watermelon lines, 3 American lines, 6 African wild lines. The results implied that the polymorphic percentage between cultivated lines and wild lines was 92.11%, the polymorphic percentage in wild lines was 34.11%, and in cultivated lines was 21.05%. The bands of American lines were mostly the same as cultivated lines, and some specific bands were amplified. The results showed that SRAP and EST-SSR were highly effective and feasible on watermelon studying.

**Key words:** Wild watermelon; Cultivated watermelon; Polymorphic; SRAP; EST-SSR

野生西瓜多存在于非洲南部的沙漠地带,恶劣的生存环境使野生西瓜积累了丰富的遗传变异,拥有很多优良的农艺性状,如抗枯萎病、病毒病和耐低温弱光等,这些优良性状在培育新种质和发掘优良抗性基因方面具有重要的作用。前人研究表明,栽培西瓜间 RAPD 多态性较低,而与野生西瓜类型间多态性较丰富<sup>[1-4]</sup>。本试验拟利用 SRAP( Sequence Related Amplified Polymorphism) 分子标记<sup>[5-7]</sup>和根据西瓜 EST 序列开发的 EST-SSR 标记分析野生西瓜和栽培西瓜的遗传差异,探讨 SRAP 和 EST-SSR 的适用性和多态性,并研究野生西瓜资源等位基因的遗传变异,为发掘和利用野生西瓜优良基因奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试西瓜材料包括 9 个栽培自交系,3 个美国引种,6 个非洲野生种,共计 18 份,主要农艺性状见

表 1。

表 1 供试材料和编号

Tab.1 Varieties and code

序号 No.	名称或编号 Name or code	类型 Type	序号 No.	名称或编号 Name or code	类型 Type
1	日美66	栽培种	10	PI169253	美国引种
2	新青	栽培种	11	PI186975	美国引种
3	蜜枚	栽培种	12	PI296341	野生种
4	京欣一号母本	栽培种	13	PI271769	野生种
5	02B4	栽培种	14	PI271775	野生种
6	郑州3号母本	栽培种	15	PI482331	野生种
7	89选9	栽培种	16	PI482312	野生种
8	黄玫	栽培种	17	A76	野生种
9	PI149232	美国引种	18	203Z	栽培种

#### 1.2 DNA 提取与 PCR 反应

每份材料取 20 粒种子,破壳催芽后置于装有细沙的培养盒中,在 25℃ 人工发芽箱中培养 10 d,采用 CTAB 法提取新鲜嫩叶的基因组 DNA。SRAP 引物参考 Ferriol 等<sup>[8]</sup>的引物,从中选出 5 条正向引物和 6 条反向引物,正向引物和反向引物两两搭配组合,形成 30 个引物组合。引物序列见表 2。SRAP

收稿日期: 2010-04-31

基金项目: 国家科技支撑计划( 2006BAD01A7-6-03); 河南重大科技攻关项目( 072101110500); 河南省自然科学基金项目( 082300430170)

作者简介: 赵胜杰( 1979-),男,河南临颖人,助理研究员,硕士,主要从事西瓜多倍体育种和生物技术研究。

通讯作者: 刘文革( 1966-),男,河南灵宝人,研究员,博士,主要从事西瓜多倍体育种和生物技术研究。

程序设计参考 Li 和 Quiros<sup>[9]</sup>的方法 ,稍作修改。扩增程序为:94℃ 预变性 5 min ,前 5 个循环的温度设定为 94℃ 1 min、35℃ 1 min、72℃ 2 min; 再进行 35 个循环:94℃ 1 min、50℃ 1 min、72℃ 1 min; 最后 72℃ 5 min 延伸扩增。反应体系总体积 10 μL ,包含 0.25 mmol/L dNTPs ,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ,1.0 μmol/L 引物 ,1.0 U *Taq* 酶。EST-SSR 引物系利用 NCBI 收录的 cDNA 序列筛选并开发而来 ,引物序列见表 3。EST-SSR 扩增反应体系的总体积为 10 μL ,含有 1 μL 的 10 × PCR Buffer、0.25 μL 的 10 mmol/L

dNTP、0.1 μL 的 *Taq* DNA 聚合酶( 5 U/μL) 、2.5 μmol/L 的正反引物各 1 μL 和 20 ng 模板 DNA。扩增反应程序为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min ,55℃ 复性 1 min ,72℃ 延伸 1 min ,35 个循环;72℃ 延伸 5 min。

1.3 显色

采用北京君意东方电泳设备有限公司生产的 JY5000 型电泳仪。银染显色参考张军等<sup>[10]</sup>的方法 ,略有改进。

表 2 SRAP 引物与序列

Tab.2 Primers of SRAP employed and their sequence

引物名称 Primer	引物序列( 5'-3') Sequence of primer	引物名称 Primer	引物序列( 5'-3') Sequence of primer
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
EM1	GACTGCGTACGAATTAAT		

表 3 EST-SSR 引物与序列

Tab.3 Primers of EST-SSR employed and their sequence

引物名称 Primer	引物序列 Sequence of primer	引物名称 Primer	引物序列 Sequence of primer
ZZGSS-1	F: CCATTAGGCGGTGAGGTGT R: CTCCCGTGGGTGATTGA	ZZGSS-7	F: ATTAGGCGGTGAGGTGTC R: CCCGTGGGTGATTGATG
ZZGSS-2	F: GATTCCATTAGGCGGTGAG R: CGTGGGTGATTGATGTTGT	ZZGSS-8	F: TGGCTTCCGTTGCTACTT R: TCATCCACCGCTTCCTCA
ZZGSS-3	F: ACCATCCCAGACTTTACTGC R: TCGCCCTCCTTGACATA	ZZGSS-9	F: GCGGTAGTAGAGGAAAAGTAG R: CGTGGGTGATTGATGTT
ZZGSS-4	F: TGGCAAAGCTCTTCAAATC R: AACCCATACCAACAGCAACA	ZZGSS-10	F: TCGGATCTAGCGCAAGGT R: GCTCAGGAGGGAGTTACG
ZZGSS-5	F: TGGCGATGAAGACGACCTA R: CAGAATCAGCGACAAACC	ZZGSS-11	F: GCTTGGCTGTTTGTTGTFAC R: CGTGGGTGATTGATGTT
ZZGSS-6	F: GTTGCCGCTTTCCTACTT R: ACCACCGTTTCTGTTCTCT		

2 结果与分析

2.1 引物的多态性

从表 4 可以看出 ,所有 30 对 SRAP 引物组合均能扩增出清晰的条带。共产生有效条带 314 条 ,平均每对引物组合产生 10.5 条 ,除 ME1/EM1、ME1/EM2、ME1/EM3 组合 ,其余 27 对组合均能扩增出多态性条带。314 条扩增带中多态性条带 158 条 ,每对组合的多态性条带 0 ~ 11 条不等 ,平均每对组合产生多态性条带 5.3 条 ,单个组合的多态性比率在 7.1% ~ 83.3%。根据软件合成的 11 对 EST-SSR 引物中有 3 对引物( ZZGSS-3、ZZGSS-8、ZZGSS-11) 没能扩增出条带 ,其余 8 对引物获得到了清晰条带 ,扩增条带最多为 6 条 ,最少的有 2 条 ,所有引物最少有

1 条多态性带 ,引物对 ZZGSS-1、ZZGSS-2、ZZGSS-6、ZZGSS-7 和 ZZGSS-10 全部扩增条带都有多态性。

2.2 西瓜栽培种与野生种的多态性

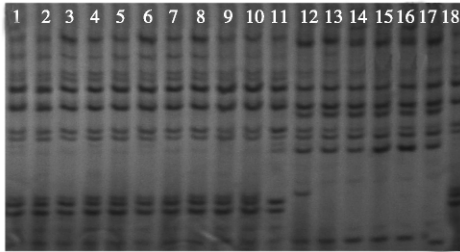
SRAP 引物组合中 ,除 ME1/EM1、ME1/EM2、ME1/EM3 组合外 ,其余 27 对引物组合都能够在栽培种与野生种间产生多态性 ,单个引物组合在栽培种与野生种间揭示的多态性位点数差别很大 ,最少的为 1 个 ,最多的能达到 8 个。说明不同的引物组合多态性差异较大。图 1 为 ME4/EM3 在栽培种与野生种间的扩增结果 ,共产生 8 个不同位点的多态性。8 对有效的 EST-SSR 在栽培种和野生种间均检测到多态性 ,多态性位点最多有 6 个 ,最少有 1 个 ,图 2 为 ZZGSS-1 的扩增结果 ,共产生 6 个多态性位点。综合 SRAP 引物和 EST-SSR 引物 ,除去扩增失

败的 3 个 EST-SSR 引物 ,栽培种与野生种间多态性 比率高达 92. 11% 。

表 4 SRAP 和 EST-SSR 引物组合产生的多态性

Tab. 4 The number of polymorphic bands generated by SRAP and EST-SSR primer pairs

引物组合 Primer pair	总条带数 Total number of band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性 比率/% Polymorphic rate	引物组合 Primer pair	总条带数 Total number of band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性 比率/% Polymorphic rate
ME1 /EM1	5	0	0	ME4 /EM4	14	9	64. 3
ME1 /EM2	9	0	0	ME4 /EM5	16	7	43. 8
ME1 /EM3	7	0	0	ME4 /EM6	12	9	75. 0
ME1 /EM4	9	4	44. 4	ME5 /EM1	9	3	33. 3
ME1 /EM5	14	1	7. 1	ME5 /EM2	14	11	78. 6
ME1 /EM6	12	7	58. 3	ME5 /EM3	16	4	25. 0
ME2 /EM1	9	7	77. 8	ME5 /EM4	9	3	33. 3
ME2 /EM2	9	7	77. 8	ME5 /EM5	8	4	50. 0
ME2 /EM3	9	6	66. 7	ME5 /EM6	8	3	37. 5
ME2 /EM4	9	4	44. 4	ZZGSS-1	6	6	100. 0
ME2 /EM5	9	5	55. 6	ZZGSS-2	6	6	100. 0
ME2 /EM6	8	3	37. 5	ZZGSS-3	0	0	0. 0
ME3 /EM1	12	10	83. 3	ZZGSS-4	3	2	66. 7
ME3 /EM2	8	5	62. 5	ZZGSS-5	4	2	50. 0
ME3 /EM3	13	9	69. 2	ZZGSS-6	6	6	100. 0
ME3 /EM4	7	2	28. 6	ZZGSS-7	6	6	100. 0
ME3 /EM5	13	9	69. 2	ZZGSS-8	0	0	0. 0
ME3 /EM6	9	4	44. 4	ZZGSS-9	2	1	50. 0
ME4 /EM1	9	7	77. 8	ZZGSS-10	5	5	100. 0
ME4 /EM2	12	7	58. 3	ZZGSS-11	0	0	0. 0
ME4 /EM3	16	8	50. 0				



1 ~18. 西瓜材料( 表 1) 序号 ,下同。

1 -18. Name of variety the same as in Tab. 1 ,The same below.

图 1 引物组合 ME4/EM3 的扩增结果

Fig.1 Amplified band of primer pairs ME4/EM3

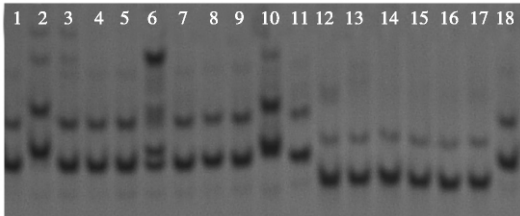


图 2 引物组合 ZZGSS-1 的扩增结果

Fig.2 Amplified band of primer ZZGSS-1

### 2.3 野生种间多态性

30 对 SRAP 引物组合有 13 对在 6 个非洲野生种间扩增出多态性 ,多态性比率为 34. 21% ,说明野生西瓜间存在一定的遗传变异。这 13 对引物组合中 ,单个引物组合产生的多态性位点数 1 ~3 个不等 ,多数为 1 个多态性位点 ,即某一材料扩增出的特异条带。如图 3 箭头所示 ,引物对 ME5/EM1 在 12 号材料即 PI296341 扩增出 1 条特异带。而 8 个

ESR-SSR 均未在野生种间检测出多态性。

### 2.4 栽培种间多态性

9 个栽培种均为郑州果树研究所多年选育的纯合自交系 ,30 对 SRAP 引物组合中有 4 对组合在栽培种间扩增出多态性条带 ,多态性条带均为某一材料的特异带 ,分别为 ME1 /EM4 在 89 选 9 扩增出一条特异带 ,ME1 /EM6 在 89 选 9 上缺失一条特异带 ,ME2 /EM5 在郑州 3 号母本扩增出一条特异带 ,ME5 /EM2 在 02B4 扩增出一条特异带。8 对 EST-SSR 引物有 4 对在栽培种间检测到多态性 ,如图 2 所示 ,引物 ZZGSS-1 在 9 个栽培种间检测到 5 个多态性位点。综合用于分析的 SRAP 和 EST-SSR ,栽培种间多态性比率仅为 21. 05% ,显示了较低的多态性。

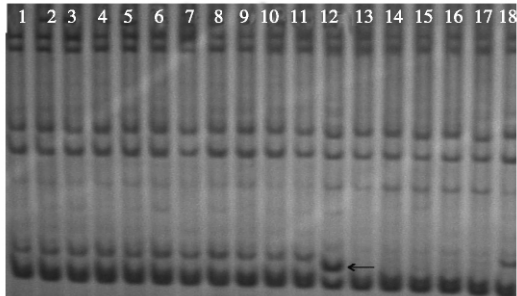


图 3 引物组合 ME5/EM1 扩增结果

Fig.3 Amplified band of primer pairs ME5/EM1

### 2.5 3 份美国引种材料的扩增结果

3 份从美国引进的材料扩增条带多数与 9 个栽

培种一样,只在个别位点出现了特异条带。其中 ME1/EM4、ME3/EM2、ME4/EM3、ME4/EM5、ME4/EM6、ME5/EM2 分别在 PI186975 扩增出特异条带, ME3/EM6 在 PI149232 扩增出特异条带, ZZGSS-1、ZZGSS-2、ZZGSS-7 和 ZZGSS-9 均在 PI169253 扩增出特异条带。图 4 为 ME3/EM6 扩增结果。

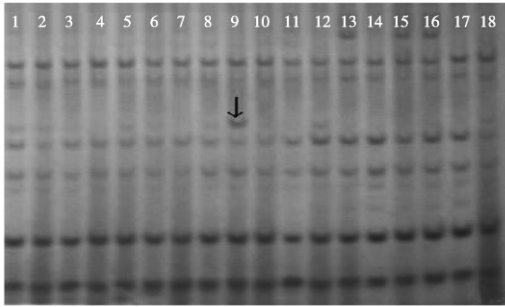


图 4 引物组合 ME3/EM6 扩增结果

Fig. 4 Amplified band of primer pairs ME3/EM6

### 3 讨论

目前,用于西瓜种质资源遗传多样性分析和遗传连锁图谱构建的分子标记主要是 RAPD、ISSR 和 AFLP。RAPD 重复性差,且为显性标记,AFLP 操作流程复杂,这些都限制了标记的进一步利用,需要开发更加稳定、更加方便的新型标记。SRAP 是 Li 和 Quiros<sup>[9]</sup>于 2001 年开发出的一种新的 PCR 标记,该标记多态性丰富,信息量大,且操作简单,成本适中,已广泛用于西瓜种质资源鉴定和西瓜遗传连锁图谱构建等研究<sup>[11-13]</sup>。EST-SSR 是基于 EST 序列或 cDNA 克隆开发的一种新型 SSR 分子标记,EST-SSR 来自基因的编码区,可能与功能基因的表达具有直接的联系,因此,它比传统的基因组 SSR 拥有更多的优越性。为研究 SRAP 和 EST-SSR 在西瓜作物上的适应性和多态性,利用 30 对 SRAP 引物和 11 对 EST-SSR 引物对 18 份西瓜资源进行了分析,结果发现其中的 27 对 SRAP 引物和 8 对有效 EST-SSR 引物在栽培种与野生种间揭示出多态性,多态性比率高达 92.11%。说明栽培种与野生种之间存在很高的多态性,遗传关系比较远,这与前人的研究结论相一致。这些变异位点可能与野生资源抗病、抗逆、高产等优良性状相关,如果作为外源优良基因转育到栽培品种,将为功能基因的发掘和克隆提供很好的材料平台。试验中发现有 13 对引物组合在 6 个非洲野生种间扩增出多态性,多态性比率达到 43.3%,说明自然界的野生西瓜资源也存在比较丰富的遗传变异,但 8 对 EST-SSR 标记在野生资源间并未检测到多态性。另外有 4 对 SRAP 引物和 4 对 EST-SSR 引物在栽培种间扩增出多态性条带,并且

每对引物仅能揭示很少的等位基因变异,这可能与参试的材料太少有关,但也足以说明西瓜栽培种间遗传狭窄,核心育种材料单一。如果要实现育种上新的突破,必须扩大种质资源的利用范围。而通过同源转基因利用野生资源无疑是一种理想的选择,即通过大规模的杂交和回交,把野生西瓜的优良基因导入栽培自交系,或分子标记辅助选择培育大量的近等基因系,这在西瓜育种和优异基因发掘和利用中将大有可为。

### 参考文献:

- [1] Zhang X P, Rhodes B B. RAPD molecular marker in watermelon [J]. Hort Science, 1993, 28(5): 223.
- [2] Lee S L, Shin J S, Park K *et al.* Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon (*C. lanatus*) germplasm [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 719 - 725.
- [3] Levi A, Thomas C E, Wehner T C *et al.* Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon [J]. Hort Science, 2001, 36(6): 1096 - 1101.
- [4] Levi A, Thomas C E, Keinath A P *et al.* Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accession [J]. Genet Resources Crop Evol, 2001, 48: 559 - 566.
- [5] 张安世, 邢智峰, 韦慧彦, 等. 苔藓植物 SRAP 反应体系的优化 [J]. 河南农业科学, 2009(11): 108 - 111.
- [6] 郭大龙, 侯小改, 张静, 等. 牡丹 SRAP 反应体系的建立及正交设计优化 [J]. 河南农业科学, 2008(12): 110 - 113.
- [7] 李晓慧, 王从彦, 徐小利, 等. 西瓜 SRAP-PCR 反应程序的建立与体系的优化 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 38 - 41.
- [8] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271 - 282.
- [9] 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 Brassica [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455 - 461.
- [10] 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测 [J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 267 - 269.
- [11] 李晓慧, 王从彦, 张四普, 等. 西瓜二倍体及同源多倍体 SRAP 多态性分析 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 61 - 63.
- [12] 李严, 张春庆. 西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析 [J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 643 - 647.
- [13] Levi A, Thomas C E, Trebitsh T *et al.* An extended linkage map for watermelon based on SRAP, AFLP, SSR, IS-SR and RAPD markers. [J]. Amer Soc Hort Sci, 2006, 131(3): 393 - 402.