

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00744

甜瓜种质资源遗传多样性的 SRAP 分析

陈芸^{1,2}, 李冠¹, 王贤磊¹

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046;
2. 喀什师范学院生命与环境科学系, 新疆喀什 844000

摘要: 为研究甜瓜材料之间的亲缘关系及其分类, 更有效地利用种质资源, 为培育新品种提供依据, 文章采用 SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) 技术对 61 份甜瓜种质资源的遗传多样性进行研究。结果表明: 从 42 对引物组合中筛选出 16 对扩增条带清晰、多态性高的引物组合分析供试材料, 共检测出 452 个位点, 其中 265 个为多态性位点, 多态性比率达 58.63%, 平均每对引物组合产生 28.56 个位点和 16.56 个多态性位点。61 份材料间的相似系数为 0.48~0.93, 平均为 0.73。这些结果说明, 供试甜瓜材料具有较为丰富的遗传多样性。聚类分析结果表明, 61 个甜瓜品种中首先可分为薄皮甜瓜与厚皮甜瓜两大类, 彼此亲缘关系最远。以遗传相似系数 0.74 为截值, 可把供试材料分为 5 个类群。在生态区域中, 新疆厚皮甜瓜的 Nei's 基因多样性指数(0.2231)和 Shannon's 信息指数(0.3422)最高。

关键词: 甜瓜; SRAP; 遗传多样性

Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucumis melo* L. using SRAP markers

CHEN Yun^{1,2}, LI Guan¹, WANG Xian-Lei¹

1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;
2. Department of Life and Environmental Science, Kashgar Teachers College, Kashgar 844000, China

Abstract: Genetic relationships and classifications of a set of melon accessions were analyzed to provide the experimental support for utilizing effectively genetic materials for breeding. Sequence-related amplified polymorphism technique was adopted to analyze 61 melon accessions. Sixteen primer combinations with clear band pattern and polymorphism were selected from over 42 primer combinations. Four hundred and fifty-two loci were detected by 16 pairs of SRAP primers. Among them, 265 were polymorphic, the polymorphic rate was 58.63%, and 28.56 loci and 16.56 polymorphic loci were amplified by each pairs of primers on average. The genetic similarity coefficient of the 61 accessions ranged from 0.48 to 0.93, with an average of 0.73. These results suggested that there was rich genetic diversity among the melon accessions tested. The varieties examined were clustered into two groups, which were thick-skinned melon and thin-skinned melon. Five groups were clustered according to genetic similarity coefficient of 0.74. The Nei's gene diversity index and Shannon's Information index of melon were 0.2231 and 0.3422, respectively, in Xinjiang, the highest among all the ecological regions.

Keywords: *Cucumis melo* L.; sequence-related amplified polymorphism; genetic diversity

收稿日期: 2009-10-15; 修回日期: 2010-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30660078)和新疆自治区高技术研究发展计划项目(编号: 200711102)资助

作者简介: 陈芸(1981-), 女, 在读硕士, 专业方向: 甜瓜遗传育种。E-mail: chenyun8111@126.com

通讯作者: 李冠(1949-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物生理生化与分子生物学。E-mail: guanli@xju.edu.cn

致谢: 本实验得到新疆葡萄瓜果开发研究中心的廖新福研究员、新疆国家瓜类工程技术研究中心周志成老师和王慧林老师及新疆农业科学院园艺作物研究所伊鸿平研究员在种质方面的支持及实验方面的悉心指导, 在此一并表示衷心感谢!

甜瓜(*Cucumis melo* L.)是一种色、香、味俱佳的世界性水果,其种质资源和变异类型极为丰富,在国内外广泛栽培,是重要的经济作物之一。甜瓜种质资源是其育种和有关生物学研究的基础。要有效、合理地利用甜瓜种质资源,就必须对其进行全面的研究和鉴定,作出科学评价。分子标记技术是评价种质资源遗传多样性的有效手段。利用分子标记研究甜瓜遗传多样性已有报道,所用标记涉及 RAPD^[1]、SSR^[2]、AFLP^[3]等,所用材料多为薄皮甜瓜及育成的主栽种,很少涉及到新疆地方品种。SRAP (Sequence-related amplified polymorphism)即相关序列扩增多态性,是 Li 和 Quiros^[4]发展的一种基于 PCR 的新型分子标记技术。该标记具有多态性丰富、简便、稳定、快速、成本低等特点^[5,6],已被广泛应用于油菜^[7]、桃^[8]、野牛草^[9]、西葫芦^[10]、甜菜^[11]、豌豆^[12]、黄秋葵^[13]、紫菜^[14]、金莲花^[15]等植物的遗传多样性分析。研究表明,SRAP 标记是遗传多样性分析的理想工具。Ahmad 等^[8]应用 SRAP 标记对 38 份桃和油桃种质进行遗传多样性分析,认为 SRAP 标记能与 SSR 标记一样将遗传关系很近的品种区分开来。Ferriol 等^[10]用此技术评价 69 份西葫芦的遗传多样性,发现 SRAP 标记比 AFLP 标记所提供的信息更接近于农艺性状的差异和历史演变结果。

新疆是厚皮甜瓜的次生起源中心之一,种质资源十分丰富,其品种类型之多、品质之佳、分布之广、栽培面积之大均居全国首位。然而关于新疆厚皮甜瓜的全面的遗传多样性分析尚未见到报道。由于在甜瓜杂交育种中有集中利用少数亲本的倾向,导致育成品种亲缘关系相近,遗传基础狭窄。为了培育更高产、优质的甜瓜品种,配制强优势的甜瓜杂交种,避免遗传基础过于狭窄可能造成的危害,有必要对新疆的厚皮甜瓜品种的遗传多样性和遗传基础进行分析。本研究采用 SRAP 分子标记对不同类型新疆厚皮甜瓜的代表性材料及部分薄皮甜瓜品种和国外品种进行亲缘关系和遗传多样性分析,为指导种质资源引进和利用,进而进行分子标记辅助选择育种等提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选取国内外代表性甜瓜材料 61 份(中国新疆 42

份,中国东北地区 6 份,伊朗 4 份,印度 3 份,非洲 2 份,俄罗斯、土耳其、阿富汗、美国各 1 份)(表 1)。其中,新疆厚皮甜瓜材料是根据传统分类结果确定的,涉及新疆甜瓜各变种的各个品种群。种子由新疆葡萄瓜果开发研究中心、新疆国家瓜类工程技术研究中心及新疆农业科学院园艺作物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 甜瓜基因组 DNA 提取和浓度测定

将供试材料播种于温室中育苗,每个品种播种 10~12 株,甜瓜长出 3~4 片真叶时,随机选取 3 株,每株取一片较大的真叶,一起置于研钵中研磨,采用改良的 CTAB 法^[16]提取甜瓜基因组 DNA,经琼脂糖电泳及紫外分光光度法检测 DNA 的浓度与纯度,稀释为 30 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 SRAP 扩增及引物筛选

SRAP 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 51 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。25 μ L 的反应体系包括: DNA 1.8 ng/ μ L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 引物 0.24 μ mol/L, TaqDNA 聚合酶 0.06 U/ μ L (试剂均购自 TaKaRa 公司)。选用 3 份地理来源不同的材料从 42 对引物组合中筛选扩增带型清晰、丰富、多态性高、重复性好的引物组合。采用筛选得到的引物组合扩增全部材料,扩增结果进行统计分析及聚类分析。实验中所用到的引物见表 2,引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2.3 扩增产物检测

取 8 μ L 扩增产物,加入 3 μ L Loading Buffer,用 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶在 BIO-RAD PROTEAN xi cell 电泳槽上进行电泳。电泳缓冲液为 1 \times TBE, 220 V 稳压电泳 2~3 h,电泳结束后,采用银染法进行染色,显色后拍照保存。

1.2.4 统计分析

将 SRAP 电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”,同一位置没有出现的带记为“0”,缺失的带记为“2”,从而形成原始数据阵。用 PopGen Version 1.31 软件计算观察等位基因数(N_a)、有效等位

表1 供试的甜瓜材料

编号	名称	来源	品种特性	市场类型	编号	名称	来源	品种特性	市场类型
1	不详	中国新疆	自交系	厚皮	32	小青皮	中国新疆	地方品种	厚皮
2	白兰瓜(M14)	中国新疆	自交系	厚皮	33	且介可洪	中国新疆	地方品种	厚皮
3	皇后	中国新疆	自交系	厚皮	34	哈曼齐	中国新疆	地方品种	厚皮
4	黑眉毛	中国新疆	自交系	厚皮	35	白皮脆	中国新疆	地方品种	厚皮
5	红心脆	中国新疆	自交系	厚皮	36	早香蜜	中国新疆	地方品种	厚皮
6	卡拉克赛	中国新疆	自交系	厚皮	37	伯克扎德	中国新疆	地方品种	厚皮
7	黄花皮白肉蜜极甘 Huanghuapibairoumijigan	中国新疆	地方品种	厚皮	38	巴登	中国新疆	地方品种	厚皮
8	不详	中国新疆	自交系	厚皮	39	奎克拖拉	中国新疆	地方品种	厚皮
9	伯谢克辛	中国新疆	地方品种	厚皮	40	八一香	中国新疆	地方品种	厚皮
10	恰尔可洪	中国新疆	地方品种	厚皮	41	卡拉其里干	中国新疆	地方品种	厚皮
11	且未加格达	中国新疆	地方品种	厚皮	42	阿克可口奇	中国新疆	地方品种	厚皮
12	炮台红	中国新疆	地方品种	厚皮	43	甜酥瓜	中国河北	地方品种	厚皮
13	新蜜 7	中国新疆	商品杂交种	厚皮	44	神帅	中国辽宁	地方品种	厚皮
14	哈密加格达	中国新疆	地方品种	厚皮	45	美玉	中国长春	地方品种	厚皮
15	新蜜 24	中国新疆	商品杂交种	厚皮	46	黄蜜脆	中国河北	地方品种	厚皮
16	一包糖	中国新疆	地方品种	厚皮	47	盛开花	中国长春	地方品种	厚皮
17	金丽 2 号	中国新疆	商品杂交种	厚皮	48	甜掉牙	中国长春	地方品种	厚皮
18	香梨黄	中国新疆	地方品种	厚皮	49	PI-137854	伊朗	自交系	厚皮
19	黄皮白肉可口奇 Huangpibairoukekouqi	中国新疆	地方品种	厚皮	50	PI-140662	伊朗	自交系	厚皮
20	米籽黄旦子	中国新疆	地方品种	厚皮	51	PI-140631	伊朗	自交系	厚皮
21	米籽瓜	中国新疆	地方品种	厚皮	52	PI-143215	伊朗	自交系	厚皮
22	塔石可洪	中国新疆	地方品种	厚皮	53	20KH	阿富汗	自交系	厚皮
23	新蜜 16	中国新疆	商品杂交种	厚皮	54	PI-164975	土耳其	自交系	厚皮
24	春蕾	中国新疆	商品杂交种	厚皮	55	PI-182938	印度	自交系	厚皮
25	皮极甘	中国新疆	地方品种	厚皮	56	PI-169330	印度	自交系	厚皮
26	白皮可口奇	中国新疆	地方品种	厚皮	57	PI-414723	印度	半野生种	厚皮
27	纳西甘	中国新疆	地方品种	厚皮	58	PI-234607	南非	自交系	厚皮
28	俄罗斯可洪	中国新疆	地方品种	厚皮	59	不详	非洲	野生种	厚皮
29	巴吾喜克	中国新疆	地方品种	厚皮	60	白兰瓜	美国	自交系	厚皮
30	花皮金棒子	中国新疆	地方品种	厚皮	61	黄旦子	俄罗斯	自交系	厚皮
31	木吉可口奇	中国新疆	地方品种	厚皮					

表2 采用的SRAP标记的引物序列

正向引物	反向引物
me1: TGAGTCCAAACCGGATA	em1: GACTGCGTACGAATTAAT
me2: TGAGTCCAAACCGGAGC	em2: GACTGCGTACGAATTTGC
me3: TGAGTCCAAACCGGAAT	em3: GACTGCGTACGAATTGAC
me5: TGAGTCCAAACCGGAAG	em6: GACTGCGTACGAATTGCA
me6: TGAGTCCAAACCGGACA	em9: GACTGCGTACGAATTCAG
me7: TGAGTCCAAACCGGACG	em10: GACTGCGTACGAATTCAT
me8: TGAGTCCAAACCGGACT	-

基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's Information index(I)、Nei's 遗传一致度(Nei's genetic identity)及遗传距离(Genetic distance, GD)。

1.2.5 聚类分析

用 Jaccard 遗传相似系数进行聚类分析, 计算公式:
 $GS_{ij} = N_{ij} / (N_{ij} + N_i + N_j)$
其中: N_{ij} 为材料 i 和材料 j 共有条带数; N_i 为 i 材料特有的条带数; N_j 为 j 材料特有的条带数。采用

NTSYS-pc2.10e 软件进行聚类分析。对原始矩阵用 SimQual 程序求 Jaccard 相似系数, 并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析^[17~19], 并通过 Treeplot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选及 SRAP 引物扩增的多态性

选用小青皮、PI-414723、非洲野生 3 个生境较远的材料从 42 对 SRAP 引物中筛选出 16 对扩增稳定、多态性高的引物, 用 16 对筛选得到的引物组合对 61 份甜瓜基因组 DNA 进行 SRAP 扩增, 共得到 452 条清晰可辨条带。其中, 多态性条带 265 条, 多态性位点百分率为 58.63%, 扩增的 DNA 片段主要集中在 100~2 000 bp 之间。平均每对引物扩增出 28.56 条带, 其中 16.56 条具有多态性(表 3), 表明 SRAP 能检测出较多的遗传位点, 能获的多态性较好的 PCR 结果(代表性图谱见图 1)。

2.2 甜瓜品种间遗传相似性分析

根据 SRAP 引物扩增所得的多态性条带, 采用 NTSYS-pc2.10e 软件对 61 份甜瓜品种进行遗传相似性分析, 得到供试材料遗传相似系数(GS)矩阵。结果表明, 61 份材料间的相似系数为 0.481752~0.930657, 平均为 0.728863。其中来自河北的薄皮材料黄蜜脆与来自新疆的厚皮材料纳西甘间的相似系数最小, 为 0.481752, 说明二者亲缘关系最远; 来自吉林长春的薄皮甜瓜材料甜掉牙与来自辽宁的薄皮材料神帅之间的相似系数最大, 达到 0.930657, 说明二者亲缘关系最近。

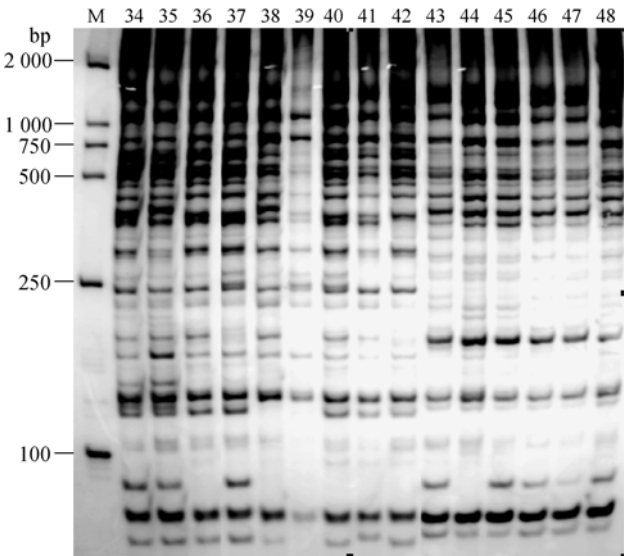


图 1 引物组合 me3-em2 的扩增结果
M: DL2000 Marker。34~48 为甜瓜品种编号, 具体见表 1。

2.3 遗传一致度及遗传距离分析

根据各材料所处地理位置, 将供试材料分为 7 组。其中来自新疆的 42 份材料为第 1 组; 来自辽宁、吉林与河北的 6 份材料为第 2 组; 来自伊朗、阿富汗与土耳其的 6 份材料为第 3 组; 来自印度的 3 份材料为第 4 组; 来自非洲的 2 份材料为第 5 组; 来自美国的 1 份材料和俄罗斯的 1 份材料分别为第 6 和第 7 组。用 PopGen Version 1.31 软件计算各组间 Nei's 遗传一致度及遗传距离, 结果见表 4。整体看来, 第 1 组与第 3 组材料间遗传一致度最高, 且 GD 值最小, 表明这两组材料间亲缘关系最近。第 7 组与第 2 组材料间的遗传一致度最低, 且 GD 值最大, 表明这两组材料间亲缘关系最远。若探讨新疆甜瓜与其它各

表 3 SRAP 引物组合扩增甜瓜基因组 DNA 的多态位点数

引物	总位点数	多态位点数	多态比率(%)	引物	总位点数	多态位点数	多态比率(%)
me1-em2	32	24	75.00	me7-em1	23	13	56.52
me1-em6	31	17	54.84	me7-em2	26	14	53.85
me2-em1	45	34	75.56	me7-em3	30	18	60.00
me3-em2	32	23	71.88	me7-em6	21	11	52.38
me3-em10	33	21	63.64	me7-em9	28	14	50.00
me5-em2	26	15	57.69	me7-em10	26	15	57.69
me6-em1	24	14	58.33	me8-em1	32	12	37.50
me6-em3	21	7	33.33	总计	452	265	—
me6-em6	22	13	59.09	平均	28.25	16.56	58.63

表 4 供试材料的遗传一致度及遗传距离

组	1	2	3	4	5	6	7
1	****	0.6681	0.9475	0.9354	0.8945	0.8524	0.8594
2	0.4034	****	0.6667	0.6545	0.6616	0.5607	0.5529
3	0.0539	0.4055	****	0.9184	0.8967	0.8466	0.8551
4	0.0667	0.4239	0.0851	****	0.8693	0.8247	0.8201
5	0.1115	0.4131	0.1090	0.1401	****	0.8416	0.8083
6	0.1597	0.5785	0.1665	0.1927	0.1724	****	0.8394
7	0.1515	0.5927	0.1565	0.1983	0.2129	0.1750	****

注: 1 为来自新疆的 42 份材料; 2 为来自辽宁、吉林、河北的 6 份材料; 3 为来自伊朗、阿富汗与土耳其的 6 份材料; 4 为来自印度的 3 份材料; 5 为来自非洲的 2 份材料; 6 为来自美国的 1 份材料; 7 为来自俄罗斯的 1 份材料。对角线以上为各组间的遗传一致度, 对角线以下为各组间的遗传距离。

表 5 不同生态区域甜瓜 SRAP 标记的遗传多样性指数

生态区域	遗传多样性指数			
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
中国新疆	1.7482	1.3709	0.2231	0.3422
中国东北	1.2591	1.1758	0.1007	0.1480
阿富汗、伊朗、土耳其	1.4708	1.3237	0.1826	0.2679
印度	1.3978	1.3182	0.1768	0.2532
总体	2.0000	1.4750	0.2876	0.4435

组之间的关系, 则新疆的 42 份厚皮甜瓜与来自土耳其、伊朗、阿富汗的 6 份厚皮甜瓜材料遗传一致度最高, 达到 0.9475; 而这两组间的 *GD* 值最小, 说明这两组间亲缘关系最近。新疆厚皮甜瓜与东北的 6 份薄皮甜瓜材料遗传一致度(0.6681)最低, 并且两者 *GD* 值(0.4034)最大, 说明新疆甜瓜与东北的薄皮甜瓜之间亲缘关系最远。

2.4 不同生态区域甜瓜 SRAP 遗传多样性

用 PopGen Version 1.31 软件计算不同生态区域甜瓜的遗传多样性指数, 结果见表 5。各生态区域内甜瓜观察等位基因数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Nei's 基因多样性指数(*H*)、Shannon's 信息指数(*I*)都以新疆地区的最高; 西亚的阿富汗、伊朗、土耳其的甜瓜材料其次; 中国东北地区的薄皮甜瓜最低。数据分析显示, 新疆甜瓜遗传多样性较为丰富。

2.5 聚类分析

根据 SRAP 谱带数据对 61 份甜瓜进行聚类, 聚类结果如图 2。聚类结果显示, 以相似系数 0.74 为截值, 供试材料分为 V 个类群。第 I 类包括 47 份材料, 主要为新疆厚皮甜瓜地方品种和杂交种。另外, 来自阿富汗、土耳其和伊朗的材料也聚在此类中,

这也和遗传一致度及遗传距离分析得到的结果符合, 说明新疆甜瓜与来自阿富汗、土耳其和伊朗的材料亲缘关系很近。第 I 类包括材料较多, 进一步细分, 又可分为 5 小类: 第 1 小类包括 16 份材料(编号 1、41、3...58), 这 16 份材料按照传统分类结果, 新疆甜瓜 4 个变种的材料都有, 材料 9 和 60 属于卡巴沙变种, 聚在一起, 材料 41 属于瓜旦甜瓜变种的热瓜旦品种群, 材料 5、18 属于夏甜瓜变种的可口奇夏瓜品种群, 聚在一起, 材料 10、33 属于夏甜瓜变种的蜜极甘夏瓜品种群, 聚在一起, 材料 6 属于冬甜瓜变种的可口奇冬瓜品种群, 材料 3 有材料 5 的血缘, 故也聚在此类, 这一小类还包括 4 份国外种质; 第 2 小类包括 20 份材料(编号 61、20、22...37), 包括可口奇夏瓜品种群(编号 19)、可口奇冬瓜品种群(编号 12、31、32)、黄旦子品种群(编号 20、22、61)、纳西甘品种群(编号 27、28)的材料; 第 3 小类包括 4 份材料(编号 13、14、15、16), 为新密系列的两个商品杂交种, 一包糖和哈密加格达; 第 4 小类包括 3 份材料(编号 25、26、29); 第 5 小类包括 4 份材料(编号 2、4、39、40)。第 II 类包括两份材料(编号 55 和 56), 均为印度厚皮甜瓜。第 III 类包括两份材料(编号 57 和 17), 分别为 PI-414723 和金丽 2 号。PI-414723

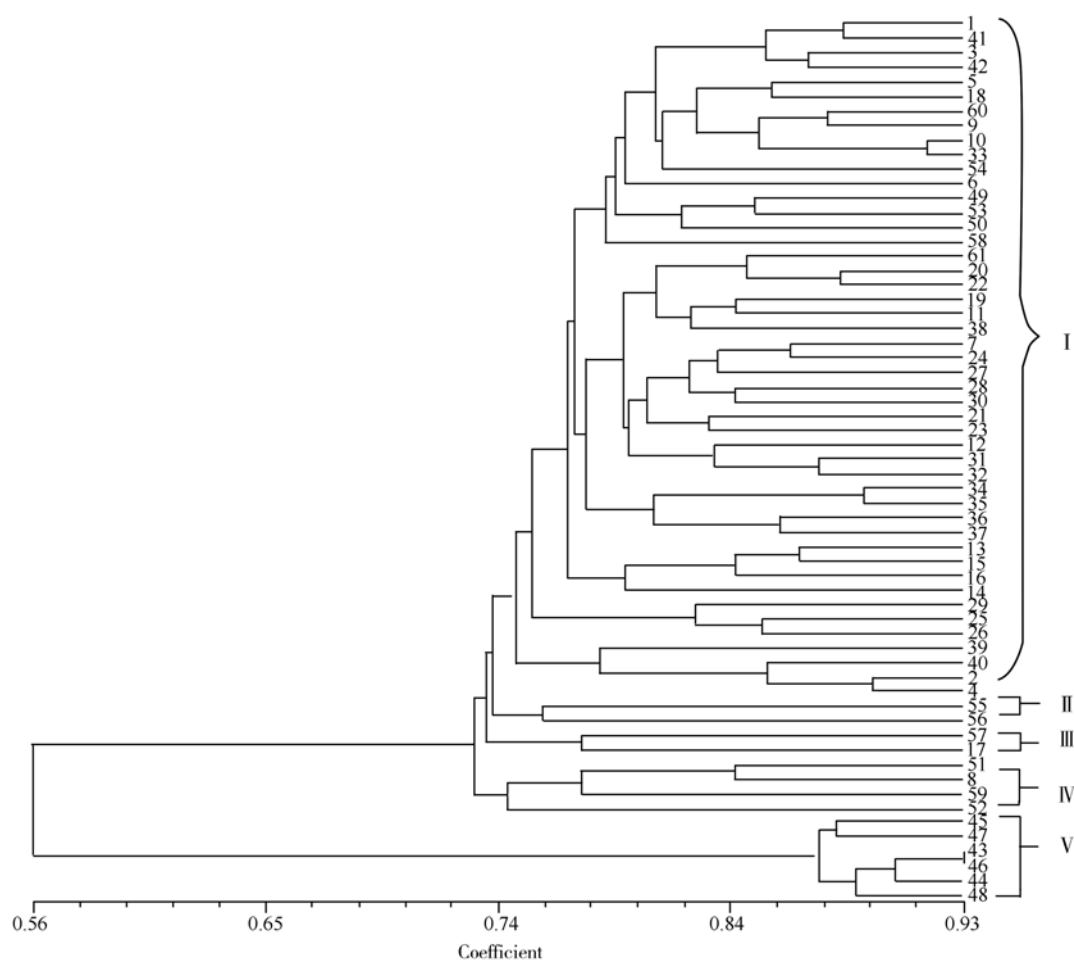


图 2 基于 SRAP 标记构建的甜瓜聚类图

图中阿拉伯数字为品种编号, 具体见表 1; ~ 指 61 份甜瓜品种基于 SRAP 标记划分的 5 个类群。

是来自印度的野生种, 金丽 2 号是由台湾和日本的洋香瓜选育的杂交种, 二者与其他材料亲缘较远, 因而单独聚在一起, 聚类结果表明二者有一定的相似性。第 IV 类包括 4 份材料(编号 51、8、59、52), 其中除了 8 号名称不详的材料来自于新疆吐鲁番外, 其他 3 种均为来自于非洲和伊朗的国外品种。第 V 类包括 6 份材料(编号 43~48), 均为来自吉林、辽宁、河北的薄皮甜瓜材料。

总体上说, 所有供试材料先分为两大类: 厚皮甜瓜和薄皮甜瓜。两类甜瓜指纹图谱差异较大, 这与甜瓜的分类地位基本吻合。实验结果显示, 材料间的亲缘关系与其来源相关, 同样地理来源的材料倾向于聚在一起。传统分类认为, 新疆厚皮甜瓜主要分为 4 个变种以及变种下的若干品种群。聚类结果显示, 来自瓜旦甜瓜变种的材料(编号 61、20、22)聚在一起, 来自卡巴沙变种的材料(编号 60、9)聚在

一起, 符合传统分类结果。而夏甜瓜变种和冬甜瓜变种材料聚类结果是混合的, 不能完全分开, 但这两个变种下的品种群内的材料明显聚在一起, 如可口奇夏瓜品种群(编号 5、18)聚在一起, 可口奇冬瓜品种群(编号 12、31、32)聚在一起, 密极甘夏瓜品种群(编号 10、33)聚在一起。然而属于夏甜瓜变种的纳西甘品种群和属于冬甜瓜变种的可口奇冬瓜品种群聚在了一起。夏甜瓜变种与冬甜瓜变种主要是按照甜瓜的熟性来划分的。实验结果显示, 供试材料聚类结果并未严格按照熟性划分, 说明甜瓜的遗传分化并非由单一因子影响, 而可能是多个因子综合作用的结果。

3 讨论

3.1 SRAP 的扩增效果

实验结果显示, SRAP 稳定性和重复性好, 条带

清晰, 扩增片段大小集中于 100~2 000 bp, 扩增效果良好。实验中使用的 16 对 SRAP 引物组合产生了 256 条多态性条带, 多态性比率为 59%, 平均每对引物扩增出 28.56 条带, 其中 16.56 条具有多态性。甜瓜 SRAP 单对引物扩增条带数高于前人对甜菜^[11]、葱^[20]的研究结果, 说明 SRAP 对甜瓜的扩增效果较好, 能够提供丰富的遗传信息。甜瓜的 SRAP 多态性比率低于前人对西葫芦(72.7%)^[10]、野牛草(95%)^[9]的研究结果, 但高于前人对灵芝(53%)^[21]、不结球白菜(52.09%)^[22]及甜菜(43.7%)^[11]的研究。其原因可能与供试材料类型有关, 本研究使用的绝大多数材料为遗传关系比较近的新疆厚皮甜瓜, 探讨的是亚种内的变异情况。而野牛草材料倍性不同, 西葫芦探讨的是亚种间的遗传变异情况, 故而实验多态性比率低于前人对西葫芦和野牛草的研究结果。同时, 实验研究的多态性比率高于程振家等^[3]利用 AFLP 技术对甜瓜的遗传多样性研究所报道的结果, 其原因可能是由于材料的不同造成的。由此可见, SRAP 技术可以作为研究甜瓜遗传多样性简单、有效的手段。

3.2 新疆厚皮甜瓜的遗传多样性

比较不同生态区域的甜瓜的遗传多样性指数, 发现厚皮甜瓜的遗传多样性指数均高于薄皮甜瓜。证明厚皮甜瓜比薄皮甜瓜有更丰富的多样性, 这也与翟文强等^[23]、姚国新等^[24]的研究结果一致。遗传多样性指数分析表明, 供试材料中新疆甜瓜遗传多样性最为丰富, 供试材料的遗传多样性主要分布于新疆。这一结果可能受到了材料的限制, 实验中能够得到的国外材料相对较少, 但由新疆厚皮甜瓜的各项遗传多样性指数可以看出, 由新疆厚皮甜瓜的各项遗传多样性指数可以看出, 新疆厚皮甜瓜遗传多样性丰富, 有着丰富的变异类型。

本实验新疆厚皮甜瓜分类结果与传统分类结果相比, 存在一定差异, 主要表现在: 实验结果显示, 新疆甜瓜 4 个变种间并无严格界限。实验材料也未完全按照品种群划分开。然而属于同一品种群的材料倾向于聚在一起。分析原因, 可能存在以下几方面: (1) 甜瓜的遗传分化是多因子综合作用的结果, 传统分类的主要分类指标与各品种 SRAP 扩增图谱间的主要差异不一致; (2) 所用的引物并非直接与品质性状有关, 或者与品质性状相关的引物所扩增位

点比例太小, 以致无法区分不同的品质类型。因此, 将传统分类结果与多种分子标记技术分类结果相结合, 才能准确的确定新疆甜瓜的分类地位; (3) 实验误差。PCR 反应非常灵敏, 模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP、引物和 Taq 酶浓度的改变都关系到样本 DNA 所能扩增条带的数量、清晰度以及稳定性。虽然在对材料进行遗传多样性分析前, 已建立了稳定的实验体系^[25], 但难免出现个别样品的个别条带未能扩增出来或扩增的条带较弱, 影响实验结果。数据统计时, 已尽可能提高结果的准确性, 只统计有明显多态性的主带, 忽略弱带, 但也可能在个别较弱条带统计时出现偏差, 影响实验结果的准确性。

3.3 新疆厚皮甜瓜的起源演化

供试材料的遗传一致度及遗传距离分析结果表明, 新疆甜瓜与土耳其、伊朗、阿富汗的 6 份厚皮甜瓜亲缘关系最近, 这也和聚类情况吻合。新疆、土耳其、伊朗、阿富汗历来就被认为是中亚、西亚厚皮甜瓜次生起源中心, 所处地理环境、气候条件相似, 材料间的遗传一致度高达 0.9475, 推测新疆与土耳其、伊朗、阿富汗的厚皮甜瓜有共同的起源。

聚类结果(图 2)表明, 供试材料首先分为厚皮甜瓜和薄皮甜瓜两大类群。这与张建农等^[1]的研究结果相同。关于甜瓜的起源至今尚有争议。“一元论”认为各种甜瓜均起源于同一祖先, 原产非洲, 后在不同生态条件的地区演化成不同的类型。“多源论”认为两类甜瓜起源于不同的地区和祖先, 是否有共同的祖先是争论的焦点。马德伟等^[26]根据对两类甜瓜孢粉学的研究, 发现厚皮与薄皮两类甜瓜各变种间花粉的质量性状相同, 各变种花粉的数量性状值无显著差异认为, 甜瓜各变种间的差异仅仅是不同生态型的地理远缘变种间的差异, 将甜瓜划分厚皮与薄皮两个亚种是不合理的, 支持“一元论”。而本研究发现, 厚皮甜瓜与薄皮甜瓜的指纹图谱差异较大。单对引物即能将二者区别开, 如引物 mel/em6 对供试材料扩增时, 所有的厚皮材料在 100 bp 的位置均无扩增条带, 而 56~61 号薄皮材料在相同位置均有条带产生。遗传一致度和遗传距离分析也显示两类甜瓜亲缘关系较远。因此, 本研究支持“多源论”。

本研究采用 SRAP 分子标记对不同类型新疆厚皮甜瓜的代表性材料及部分薄皮甜瓜品种和国外品

种进行亲缘关系和遗传多样性分析, 研究结果表明, SRAP 标记稳定性和重复性好, 在甜瓜中扩增条带丰富、清晰, 效果良好, 可以作为研究甜瓜遗传多样性简单、有效的手段。

参考文献(References):

- [1] 张建农, 赵建华, 李计红, 曹孜义. 甜瓜种质资源亲缘关系的 RAPD 标记分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(12): 115–120.
- [2] 盛云燕, 栾非时, 陈克农. 甜瓜 SSR 标记遗传多样性的研究. 东北农业大学学报, 2006, 37(2): 165–170.
- [3] 程振家, 王怀松, 张志斌, 郭世荣, 贺超兴. 甜瓜遗传多样性的 AFLP 分析. 西北植物学报, 2007, 27(2): 244–248.
- [4] Li G, Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455–461.
- [5] 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.
- [6] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 朱献文. 新型分子标记—SRAP 与 TRAP 及其应用. 遗传, 2004, 26(5): 777–781.
- [7] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 刘贵华, 张书芬. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础. 中国农业科学, 2006, 39(2): 246–256.
- [8] Ahmad R, Potter D, Southwick SM. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular marker. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 2004, 129(2): 204–210.
- [9] Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I, Gaussoin RE, Riordan TP, Weikat I. Molecular characterization of bufaiograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 328–334.
- [10] Ferriol M, Pioó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271–282.
- [11] 王华忠, 吴则东, 王晓武, 方智远. 利用 SRAP 与 SSR 标记分析不同类型甜菜的遗传多样性. 作物学报, 2008, 34(1): 37–46.
- [12] Espósito MA, Martin EA, Cravero VP, Cointy E. Characterization of pea accessions by SRAP's markers. *Sci Hort*, 2007, 113(4): 329–335.
- [13] Gulsenl O, Karagul S, Abak K. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism. *Biologia Bratislava*, 2007, 62(1): 41–45.
- [14] Qiao LX, Liu HY, Guo BT, Weng ML, Dai JX, Duan DL, Wang B. Molecular identification of 16 *Porphyra* lines using sequence-related amplified polymorphism markers. *Aquatic Bot*, 2007, 87(3): 203–208.
- [15] Ortega OR, Duran E, Arbizu C, Ortega R, Roca W, Potter D, Quiros CF. Pattern of genetic diversity of cultivated and non-cultivated mashua, *Tropaeolum tuberosum*, in the Cusco region of Peru. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 807–821.
- [16] 郭凌飞, 邹明宏, 曾辉, 杜丽清, 陆超忠. 利用改良 CTAB 法提取澳洲坚果成熟叶片高质量 DNA. 分子植物育种, 2007, 5(6): 187–190.
- [17] Vandemark GJ, Ariss JJ, Bauchan GA, Larsen RC, Hughes TJ. Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms. *Euphytica*, 2006, 152: 9–16.
- [18] Guo DL, Luo ZR. Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, 53: 1597–1603.
- [19] Zhuang GQ, Ma DW, Wang WG, Wang SH, Chen F. Genetic diversity of *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack. in Southwest China revealed by AFLP markers. *African J Biotechnol*, 2009, 8(7): 1226–1232.
- [20] 李慧芝, 尹燕桦, 张春庆, 张敏, 李建敏. SRAP 在葱蒜栽培品种遗传多样性研究中的适用性分析. 园艺学报, 2007, 34 (4): 929–934.
- [21] Sun SJ, Gao W, Lin SQ, Zhu J, Xie BG, Lin ZB. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 537–543.
- [22] 韩建明, 侯喜林, 徐海明, 史公军, 耿建峰, 邓晓辉. 不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino)种质资源 SRAP 遗传分化分析. 作物学报, 2007, 33(11): 1862–1868.
- [23] 翟文强, 田清震, 贾继增, 董玉琛. 甜瓜(*Cucumis melo* L.) AFLP 标记的多态性及聚类分析研究. 植物遗传资源科学, 2002, 3(4): 1–7.
- [24] 姚国新, 刘玲, 郭永强, 陈素生, 王建设. 利用 RAPD 标记分析甜瓜种质资源遗传多样性. 首都师范大学学报(自然科学版), 2006, 27(5): 56–67.
- [25] 陈芸, 王贤磊, 夏雪琴, 常菊芹, 李冠. 甜瓜 SRAP-PCR 程序和反应体系的优化. 新疆农业科学, 2009, 46(4): 764–771.
- [26] 马德伟, 高锁柱, 孙岚, 刘金乙, 刘志福. 甜瓜花粉形态研究及起源、分类的探讨. 园艺学报, 1989, 16(2): 134–138.