



## 研究报告

## Research Report

# SRAP 标记在丝瓜种质资源研究中的应用

乔燕春<sup>✉</sup>, 李莲芳<sup>✉</sup>, 林鉴荣<sup>✉</sup>

广州市农业科学研究院, 广州, 510308

✉ 通讯作者: 1966511855@qq.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2014 年, 第 12 卷, 第 4 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0004

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

乔燕春等, 2014, SRAP 标记在丝瓜种质资源研究中的应用, 分子植物育种(online), 12(4): 1024-1028 (doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0004)

引用格式(英文):

Qiao et al., 2014, Application of SRAP Marker in Germplasm Resource Research in Loofah, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 12(4): 1024-1028 (doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0004)

**摘要** 本研究利用 SRAP 标记对 31 份丝瓜开展了遗传多样性分析, 结果表明: 利用 20 对 SRAP 引物共计获得 310 条多态性带, 其中 280 条差异带, 30 条公共带, 遗传多样性丰富, 聚类结果和田间丝瓜表现类型完全吻合, 当遗传相似系数为 0.41 时, 普通丝瓜和有棱丝瓜分开, 说明普通丝瓜和有棱丝瓜遗传距离相对较远, 将普通丝瓜定位为有棱丝瓜的亚种可能更合适, SRAP 标记的结果可作为丝瓜田间育种的有效辅助手段, 对丝瓜辅助育种有重要指导意义。

**关键词** 丝瓜; SRAP; 种质资源; 遗传聚类

## Application of SRAP Marker in Germplasm Resource Research in Loofah

Qiao Yanchun<sup>✉</sup>, Li Lianfang<sup>✉</sup>, Lin Jianrong<sup>✉</sup>

Institute of vegetable of Guangzhou Academy of Agricultural sciences, Guangzhou, 510308, P.R. China

✉ Corresponding author, 1966511855@qq.com; ✉ Authors

**Abstract** The genetic diversity was analyzed using SRAP markers for 31 Loofah. The results showed that: 310 polymorphic bands were obtained using 20 pairs of SRAP primers, including 280 polymorphic bands, 30 public bands. This result was similar to the cluster result and phenotype traits of loofah. When the genetic similarity index was 0.41, sponge gourd and angular sponge gourd were separated to two teams, which indicated the genetic distance is relatively far between two types of loofah. so we consider that it was more appropriate for sponge gourd as the subspecies of angular sponge gourd. It is an effective assistant-aids for Loofah breeding using SRAP markers, which has important directive to Loofah breeding.

**Keywords** Loofah; SRAP; Germplasm resource; Genetic clustering

### 研究背景

丝瓜为葫芦科(Cucurbitaceae)丝瓜属中的栽培种, 有普通丝瓜(*Luffa cylindrical* (L.) M.J. Roem)和有棱丝瓜(*Luffa acutangula* (L.) Roxb.)两种类型(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 2010, 中国农业出版社, pp.683-686; 罗少波等, 2006, 广东农业科学,

(1): 15-17), 丝瓜在我们南北地区均有栽培, 尤以广东、广西、台湾等地区 and 长江流域地区栽培为盛。有棱丝瓜是我省主栽瓜类作物, 对于调节蔬菜秋季蔬菜供应有极重要的作用, 丝瓜不但营养丰富, 还具有生津止渴, 解暑消烦之功效(邵兴云, 2004, 生物学通报, 39(5): 9-10), 夏秋季市场需求巨大。丝瓜资源丰富, 类型多样, 从果皮色可分为深绿色、绿色和绿白色等, 棱沟有无棱沟, 浅棱沟和深棱沟; 果型有长棍棒形、棍棒形、短棍棒形; 长圆柱形、圆柱形等。从表型可见丝瓜遗传多样性丰富, 目前有关丝瓜分子标记的报道也有一些(夏军辉和向长萍, 2008; 苏小俊等, 2010; 崔竣杰等, 2012), 但相关

收稿日期: 2014 年 03 月 04 日

接受日期: 2014 年 03 月 12 日

发表日期: 2014 年 06 月 06 日

基金项目: 本研究由广州市科信局科技攻关项目(2010Z1-E381)和广州市农业财政专项资金(2013.1-2014.12)共同资助



研究结果获得评价有所差异。为了进一步证实本研究材料中丝瓜的遗传关系，我们利用SRAP分子标记对31份丝瓜开展了遗传多样性分析，SRAP (sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性)是2004年由美国加州大学蔬菜作物系Li与Quiros 博士研究芸薹属作物时创立的一种分子标记技术，它具有操作简便、高的共显性、重复性好、易于分离条带及测序等优点，被很多研究者用在种质资源的遗传关系、分子遗传图谱等的研究。本研究通过从基因层面对丝瓜材料进行评价，可为丝瓜种质的收集、保存、鉴定、创新、利用以及杂交育种中的亲本选择、选配提供可靠依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 DNA 提取

高质量的 DNA 是保证实验质量的重要环节，本研究采用快速磨样机磨样，快速便捷的提取了高质量的 DNA，完全可以满足本实验的要求(李莲芳等, 2011)。

### 1.2 SRAP 技术分析

本研究通过正反向引物配对，组成99组SRAP引物组合，从中筛选出20个多态性较好的组合对31份丝瓜材料进行分析，获得了稳定的310条遗传条带，图1为引物em7me7在4%聚丙烯酰胺扩增的图样。从电泳图的统计结果来看，共计280条差异带，30条公共带，表现出丰富的遗传多样性，利用NTSYS2.1软件对统计结果进行分析，获得了31份材料的遗传聚类图。从聚类图可见，当遗传相似系数为0.41时，6号普通丝瓜、27号普通丝瓜及20号普通丝瓜聚为一类，说明普通丝瓜和有棱丝瓜存在丰富的遗传多样性，遗传相似系数值为0.41，将其定位于亚种更合适。当遗传相似系数为0.785时，A-24，A-15，A-4-2，C-11，DRZH-0聚为一类，5份丝瓜材料均为大肉瓜类型，当遗传相似系数为0.875时，A-11、09-Z-D-4、C-33、C-41-3、09-Z-D-5、A-24，A-15，A-4-2，C-11，DRZH-0共计10份丝瓜材料聚为一类，这10份材料均为大肉瓜类型，其余18份材料为长条绿皮有棱丝瓜，从单独小聚类可见，F-9、F-12-2来自05秋资s-11，E-33号、F-2来自06年转-13的后代，C-33、C-41-3来自05-M-24的后代；又如G26、G36分别来自06转16、06转12，其中亲本之一是相同的，说明

SRAP 标记可对不同来源材料和遗传进化作系统的聚类分析。

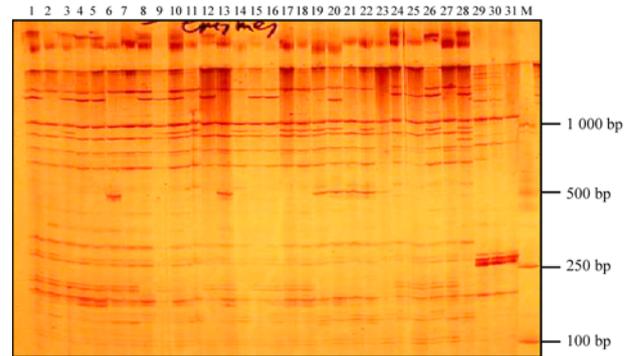


图1 引物em7me7对31份丝瓜的SRAP扩增图样  
Figure 1 Polyacrylamide gel (4%) patterns of 31 Loofah SRAP with primer pairs of em7me7, M was DL1000

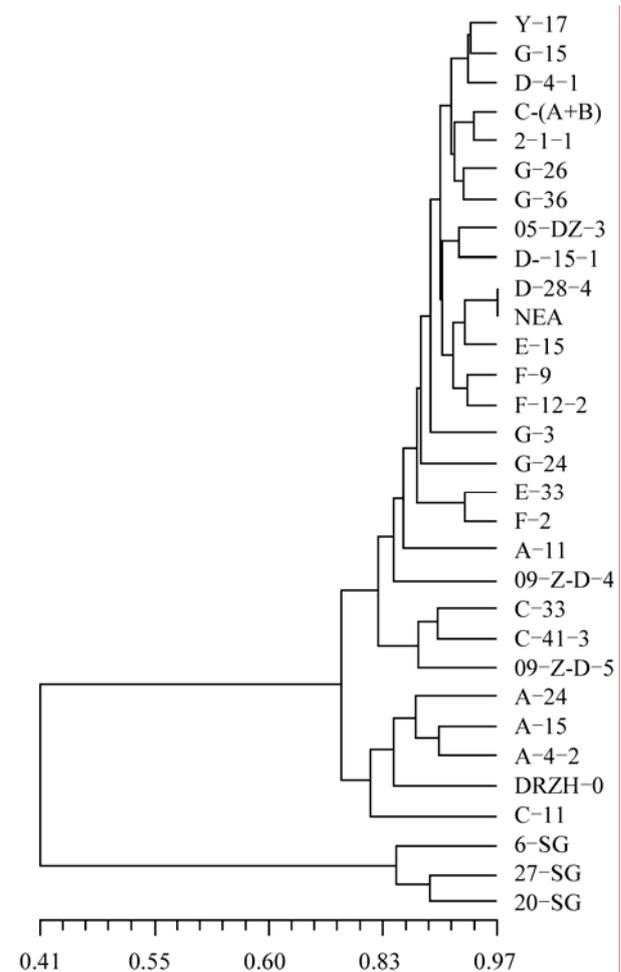


图2 31份丝瓜资源的SRAP聚类分析  
Figure 2 Dendrogram by cluster analysis based on SRAP markers of 31 Loofah

## 2 讨论

种质资源是新品种选育的基础(罗少波等, 2006, 广东农业科学, (1): 15-17), 丝瓜资源丰富, 从表型上来分主要有有棱丝瓜和普通丝瓜两大类型, 有棱丝瓜又分为长条绿皮有棱丝瓜和大肉瓜两种, 为了从分子水平对丝瓜材料进行评价, 本研究利用 SRAP 分子标记对 31 份丝瓜材料开展了遗传多样性研究, 遗传多样性非常丰富, 而且普通丝瓜和有棱丝瓜的遗传关系较远, 本研究认为将普通丝瓜定位为丝瓜的亚种更合适。而且分子标记和田间表现较为吻合, 说明 SRAP 标记较适合分析丝瓜的遗传多样性。这与前人利用 ISSR (苏小俊等, 2010) 和 SRAP (崔竣杰等, 2012) 分析丝瓜的结果比较接近, 而和前人 RAPD (夏军辉和向长萍, 2008) 的实验结果存在差异。说明 SRAP 标记对丝瓜开展遗传多样性分析较为适用。本研究中的部分材料如: F-9、F-12-2 来自 05 秋资 s-11, E-33 号、F-2 来自 06 年转-13 的后代, C-33、C-41-3 来自 05-M-24 的后代; 又如 G26、G36 分别来自 06 转 16、06 转 12, 均单独聚类, 说明 SRAP 标记还适合丝瓜亲缘关系较近材料间的遗传分析。以上结果可见, SRAP 可以作为丝瓜田间选育种的有效辅助手段, 本研究的结果对丝瓜育种研究具有重要指导意义。

## 3 材料与方法

### 3.1 材料

供试材料: 丝瓜重要性状资源 31 份, 其中 28 份丝瓜为有棱丝瓜, 3 份为普通丝瓜; 28 份有棱丝瓜中 18 份丝瓜为长条绿皮有棱丝瓜, 长棒形、皮色深绿; 10 份丝瓜为大肉瓜, 短棒形、皮色绿白, 有斑点(表 1)。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 DNA 提取

DNA 提取采用改良 CTAB 法, 浓度为 2%, 参照陈洁等方法略作改动(陈洁等, 2008, 江苏农业科学, (5): 61-62, 269)。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度及纯度, 将每个样品浓度调至 50 ng/ML -20℃ 备用。

#### 3.2.2 建立丝瓜 SRAP 反应体系

本研究采用均匀设计方案, 建立丝瓜 SRAP 反

应体系, 首先以普通丝瓜材料为模板, 采用正交实验设计  $L_{16}(4^5)$  在 4 个水平上对影响丝瓜 SRAP 反应的 Taq 酶、 $Mg^{2+}$ 、模板、dNTP 及引物等 5 个因素进行了优化, 建立了丝瓜 SRAP-PCR 的最佳反应体系(乔燕春等, 2008; 李莲芳等, 2011)。

表 1 供试 31 份丝瓜材料

Table 1 A list of names of 31 Loofah

编号 No.	种质 Germplasm	编号 No.	种质 Germplasm
1	Y-17	17	F-9
2	05-DZ-3	18	F-12-2
3	D-15-1	19	A-24
4	D-28-4	20	A-11
5	NEA	21	A-15
6	E-15	22	A-4-2
7	G-24	23	C-11
8	C-(A+B)	24	C-33
9	D-4-1	25	C-41-3
10	2-1-1	26	09-Z-D-4
11	G-26	27	09-Z-D-5
12	E-33	28	DRZH-0
13	F-2	29	6-SG
14	G-36	30	27-SG
15	G-3	31	20-SG
16	G-15		

SRAP 扩增程序参照吴红等(2009)并略加优化, 建立的适合本研究的扩增程序为: 94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 5 个循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 8 min。PCR 扩增完成后, 再在 2% 琼脂糖凝胶下电泳 2 h, 检测并拍照。

#### 3.2.3 遗传多样性分析

研究中, 将供试的 9 条正向引物和 11 条反向引物, 两两配对组合, 组成 99 组引物对, 以任意两份材料为模板, 利用 99 个引物组合对材料进行 PCR 扩增, 筛选出 20 对稳定扩增的引物组合(表 2), 对 31 份丝瓜材料进行扩增, 进一步在 4% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分析。将 PCR 产物点样在 4% 聚丙烯酰胺上, 通过在 0.5×TBE 缓冲液中以 2000 v 电压电泳 1.0 小时, 通过干胶, 数据采集、数据分析。利用 NTSYS2.1 软件对采集数据进行 UPGMA 法聚类分析, 得出 31 份丝瓜材料的遗传距离。



表 2 筛选出扩增稳定的 SRAP 引物组合

Table 2 SRAP primer combinations with stable amplification profiles were selected

引物组合 Primer combination	引物序列 Primer sequence	引物组合 Primer combination	引物序列 Primer sequence
em9me6	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	em9me1	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'
em5me5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em10me5	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
em7me7	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	em6me6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'
em9me8	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	em5me4	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
em8me4	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em8me1	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'
em7me1	5'-GACTGCGTACGAATTCOA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em6me7	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'
em6me9	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	em11me5	5'-GACTGCGTACGAATTCCA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
em4me4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em9me7	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'
em7me6	5'-GACTGCGTACGAATTCOA-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	em10me8	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'
em2me5	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em1me4	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3' 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'

## 作者贡献

乔燕春和李莲芳是本研究的方案设计和直接实施者，完成论文初稿。林鉴荣协助完成实验和数据整理。李莲芳为本研究提供研究材料、技术和资金支持，并修改论文定稿。全体作者都阅读并同意最终文本。

## 致谢

本研究由广州市科信局科技攻关项目(2010Z1-E381)和广州市农业财政专项资金(2013.1-2014.12)共同资助。

## 参考文献

Cui J.J., Song J.W., Wang G.P., Lin M.B., Li L.F., and Hu K.L., 2012, Genetic diversity analysis of germplasm resources of towel gourd based on SRAP markers, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 13(6): 1061-1066 (崔俊杰, 宋建文, 汪国平, 林明宝,

李莲芳, 胡开林, 2012, 丝瓜种质资源亲缘关系的 SRAP 分析, *植物遗传资源学报*, 13(6): 1061-1066)

Li L.F., Guo S., and Lin J.R., 2011, Establishment and optimization of SRAP amplification system in loofah, *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*, (15): 160-162 (李莲芳, 郭爽, 林鉴荣, 2011, 丝瓜 SRAP 反应体系的建立与优化, *北方园艺*, (15): 160-162)

Qiao Y.C., Lin S.Q., Liu C.M., and Yang X.H., 2008, Optimization of SRAP analysis and its application in germplasm research of Loquat (*Eriobotrya japonica*), *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 25(3): 348-352 (乔燕春, 林顺权, 刘成明, 杨向晖, 2008, SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源研究上的应用, *果树学报*, 25(3): 348-352)

Su X.J., Xu H., Chen L.Z., Song B., Yuan X.H., and Chen J.F., 2010, Analysis on the phylogenetic relationship of luffa (*Luffa cylindrical* (L.) Roem.) germplasm based on ISSR, *Nanjing Nongye Daxue Xuebao (Journal of Nanjing*

- Agricultural University), 33(3): 42-46 (苏小俊, 徐海, 陈龙正, 宋波, 袁希汉, 陈劲枫, 2010, 丝瓜种质资源亲缘关系的 ISSR 分析, 南京农业大学学报, 33(3): 42-46)
- Wu H., Lin Q., Lei K.R., Chen X., Jiang X.Y., and Tao W.L., 2009, Establishment and optimization of SRAP-PCR amplification system in loofah, Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin), 25(4): 30-34 (吴红, 林清, 雷开荣, 陈旭, 蒋晓英, 陶伟林, 2009, 丝瓜 SRAP-PCR 体系建立与优化, 中国农学通报, 25(4): 30-34)
- Xia J.H., and Xiang C.P., 2008, Analysis of genetic diversity in Luffa via morphological and RAPD markers, Zhongguo Shucai (China Vegetables), (10): 21-25 (夏军辉, 向长萍, 2008, 丝瓜种质资源遗传多样性的形态和 RAPD 标记分析, 中国蔬菜, (10): 21-25)

### 论文荐读

#### 研究论文/Research Article

利用双向电泳方法初步分析大豆根、茎、叶蛋白质特点 / 1008-1015  
Characters of Root, Stem and Leaf Proteins in Soybean Analyzed Using a 2-DE Approach

董玉梅(Dong Y.M.), 苏源(Su Y.), 余萍(Yu P.), 梅馨月(Mei X.Y.), 杨敏(Yang M.), 何霞红(He X.H.), 李成云(Li C.Y.)

#### 研究论文/Research Article

开发 S5 功能标记应用于水稻广亲和品种筛选 / 1016-1023  
Developing Functional Marker for S5 Gene and Screening Wide Compatibility Variety

吴爽(Wu S.), 台德卫(Tai D.W.), 宛煜嵩(Wan Y.S.), 王德正(Wang D.Z.), 张效忠(Zhang X.Z.), 王守海(Wang S.H.)



请扫描二维码, 下载当篇文章