

西瓜 DUS 测试标准品种 SSR 指纹图谱构建及应用

范建光^{1,2}, 张海英², 宫国义², 肖 菁³, 郭绍贵², 任 毅², 张 洁², 王秀峰¹, 马艳明³, 许 勇²

(¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018; ²北京市农林科学院蔬菜研究中心/农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097; ³新疆农业科学院农作物品种资源研究所, 乌鲁木齐 830000)

摘要:采用代表最大限度西瓜遗传多样性的 SSR 核心引物组合, 分析了西瓜 DUS 测试指南中 24 份西瓜标准品种的遗传多样性与核酸指纹。以基于重测序获得的 SNP 标记构建的 17 份西瓜材料的系统发育树为参照, 对 24 份标准品种进行了遗传多样性分析, 在遗传相似系数 0.80 处将 24 份标准品种分为 3 大类群, 结果表明核酸指纹分类比传统形态学分类更为准确。采用二维 (QR) 编码构建了西瓜 24 份标准品种的 SSR 指纹图谱, 并利用本技术以保护品种京欣 2 号与对照品种京欣 1 号为例, 进行了 DUS 分子鉴定测试, 共扩增 32 个 SSR 位点, 京欣 1 号和京欣 2 号之间有 4 个位点存在差异, 品种间遗传相似系数为 0.89, 比形态学鉴定的差异位点更多。本研究建立的西瓜 DUS 标准品种 SSR 指纹图谱与分子检测技术, 可以应用到西瓜品种 DUS 分子检测实践, 同时也为西瓜品种纯度与真实性鉴定及遗传背景分析提供了技术依据。

关键词:西瓜; 标准品种; 指纹图谱

Construction and Application of SSR Fingerprint Database of the Example Varieties in Watermelon DUS Testing

FAN Jian-guang^{1,2}, ZHANG Hai-ying², GONG Guo-yi², Xiao Jing³, GUO Shao-gui², REN Yi²,
ZHANG Jie², WANG Xiu-feng¹, MA Yan-ming³, XU Yong²

(¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018; ²Beijing Vegetable Research Centre, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China)/Ministry of Agriculture, Beijing 100097; ³Institute of Crop Germplasm Resource, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000)

Abstract: A core set of SSR markers which represent the maximize watermelon genetic diversity was used to analyze the genetic diversity of 24 example varieties in watermelon DUS testing, then the SSR fingerprint database of these varieties was constructed. Based on the SNP-based dendrogram for the 17 resequencing lines, we evaluated the genetic relationship among these varieties, and they were classified into 3 groups at the similarity coefficient of 0.80, this marker-based clustering showed more accurate than the traditional morphological clustering. Using two-dimensional (QR) code, the SSR fingerprint database of 24 example varieties was constructed. The utility of this detection system in DUS molecular test was analyzed using a PVP varieties Jingxin No.2 and its control Jingxin No.1, there were 4 polymorphic alleles among 32 alleles and their similarity coefficient was 0.89. It showed more polymorphic alleles and more accurate than morphological identification. The SSR fingerprint database of example varieties and molecular detection system used in this study could be applied in DUS molecular test of watermelon. Moreover, they would provide a basis for genetic purity, genetic background screening, and authenticity fast evaluation of watermelon.

Key words: watermelon; example varieties; fingerprint database

收稿日期: 2013-01-31 修回日期: 2013-03-07 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1121.004.html>

基金项目:农业部产业体系项目 (CARS-26); 国家自然科学基金项目 (31171980); 科技部科技支撑项目 (2012BAD02B00); 北京市自然科学基金项目 (6122015); 公益性行业 (农业) 专项经费项目 (20090300812)

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: 635388149@qq.com

通信作者: 许勇, 研究方向为蔬菜学。E-mail: xuyong@nerv.org

西瓜作为重要的经济作物,在我国种植业结构调整和促进农民致富增收中发挥着重要作用^[1]。然而,西瓜品种多、乱、杂的状况严重影响了育种者的权益和西瓜种业的健康发展,知识产权保护问题日益严峻。作为新品种保护的技术基础和授权的科学依据,DUS 测试工作,即特异性(distinctness)、一致性(uniformity)和稳定性(stability)测试,愈来愈受到重视^[2]。

传统的 DUS 测试主要以形态特征为基础,受环境影响大、稳定性差、测试周期长,其标准统一的品种描述和测试技术规程在实际操作过程中较难执行,严重影响 DUS 测试的有效性和权威性^[3]。分子标记因具有多态性高、测试周期短、不受环境影响等显著优势,成为新品种测试审查和品种鉴定的发展方向^[4]。目前,SSR(simple sequence repeats)技术被认为是植物新品种测试中较理想的标记技术,已经成功应用于油菜^[5]、水稻^[6]、小麦^[7]、玉米^[8]和番茄^[9]等多种农作物的 DUS 测试,但开展科学、规范的西瓜 DUS 分子测试研究尚未见报道。确定最大限度反映西瓜品种遗传多样性的核心引物是开展 DUS 测试的一个核心问题,随着西瓜全基因组测序计划的完成^[10],为确定最大限度反映西瓜品种遗传多样性的核心引物提供了技术基础。本研究在此基础上,首先依据覆盖整个基因组的 3889080 个 SNP 位点对 17 份重测序材料进行全景检测分析并绘制系统发育树,以此系统发育树为模版,利用不同 SSR 引物组合对上述测序品种材料进行遗传多样性分析,并比较分析二者的研究结果,选取与系统发育树结果

表 1 供试西瓜材料

Table 1 Watermelon varieties used in this study

编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety
1	97103	10	Black-diamond	19	都 1 号	28	黑美人选系	37	K7
2	RZ-901	11	Sy-904304	20	早花	29	三白	38	Tomato-seed
3	JX-2	12	PI296341-FR	21	黑崩筋	30	2000-S52	39	AU-SweetScarlet
4	JLM	13	PI386019	22	蜜宝	31	长灰	40	Sugarlee-D
5	JXF	14	PI482303	23	日本短蔓	32	Calhoun-Grey-D	41	PI296341-FR-D
6	XHBFGM	15	PI482276	24	信白 91-2	33	克仑生	42	京欣 1 号
7	RZ-900	16	PI482271	25	桂引 6 号	34	郑州 96B90	43	京欣 2 号
8	Sugarlee	17	PI595203	26	乙女	35	中育 10 号		
9	Calhoun-Grey	18	红 1 号	27	2000-203	36	无杈早		

1~17:重测序材料;18~41:西瓜 DUS 测试标准品种;42~43:DUS 测试品种及对照品种

1-17: Watermelon resequencing line,18-41: Watermelon example varieties in DUS test,42-43: DUS test varieties and its control

1.2 SSR 测试

将上述材料每份取 10 粒种子,播种后于 2 叶 1 心(西瓜为双子叶植物)时摘取幼嫩叶片混合取样。

一致的引物组合作为检测遗传多样性的引物组合,迅速获得了最大限度准确反映遗传多样性关系的核心引物组合^[11]。本研究工作重点是将这套核心引物组合应用于 DUS 品种的分子测试。构建品种数量多、类型齐全、数据准确的指纹数据库是开展西瓜品种 DUS 特异性检测的必备数据基础^[12],但在参试材料较多的情况下,很难保证年度之间及不同电泳胶图之间鉴定结果的可比性和记录带型的准确性,采用核心引物组合构建的标准品种指纹代码将如同一把标尺,为准确读取测试品种的图谱数据起到示例和校验作用。因此,标准统一、数据准确的标准品种指纹图谱是进一步大规模构建西瓜品种指纹数据库的基石。

本研究拟首先采用基于西瓜基因组序列开发的核心引物组合,对 DUS 测试指南中规定的 24 份西瓜标准品种和 17 份重测序材料进行遗传多样性分析,并采用 QR 编码构建标准品种指纹图谱,然后基于该指纹图谱数据库,以已获得保护权的西瓜品种京欣 2 号(品种权号:20020082.8)及其对照品种京欣 1 号为例,开展分子检测与形态学检测的比较,为进一步规范和完善西瓜 DUS 分子测试提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料共 43 份,其中西瓜重测序的材料 17 份,参加 DUS 分子测试的材料 2 份,均由北京农林科学院蔬菜研究中心提供;西瓜 DUS 测试的标准品种 24 份,由新疆农科院农作物品种资源研究所提供(表 1)。

采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[13]。

本研究所选用的 23 对引物是基于西瓜全基因组序列开发的能最大限度代表遗传多样性的 SSR

引物^[11],引物信息见表 2。引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。PCR 反应体系(12.5 μL):1.25 μL 10 × PCR buffer;1 μL dNTPs (2.5 mmol/L);2 μL 上下游混合引物(2.5 mmol/L),0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL),2 μL 模板 DNA (20 ng/μL);超纯水 6.05 μL。反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s;55 ℃ 退火 15 s;72 ℃ 延伸 15 s;34 个循环;72 ℃ 延伸 4 min;10 ℃ 保存。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,采用快速银染法显色并照相记录。

1.3 形态学测试

参考刘丽娟等^[14]方法,将 24 份 DUS 测试西瓜标准品种在北京农林科学院蔬菜中心试验基地种植。按照国际植物新品种保护联盟(UPOV,international union for the protection of new varieties of plants)的西瓜 DUS 测试要求,采用西瓜 DUS 测试指南(国家标准试用版 2010)中规定的 56 个性状对 24 个西瓜 DUS 标准品种进行形态测试。

1.4 统计分析

对于 SSR 测试的电泳结果,规定在凝胶相同迁移率位置上,有条带的记为 1,无条带的记为 0,构成“0,1”矩阵。按照 M. Nei 等^[15]的方法计算品种(系)间的相似系数。 $GS_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$,式中 N_{ij} 为两品种(系)间相同带型的 DNA 位点数目, N_i 、 N_j 分别为 i

和 j 两品种(系)相比对的 DNA 位点总数。将形态学数据划分为质量性状和数量性状两大类,对于质量性状,按照性状的有无分别赋值,有记为 1,无记为 0;对于数量性状而言,按照西瓜 DUS 测试指南规定,按照等级的有无分别赋值,有记为 1,无记为 0。采用 NT-SYS-PC 2.02 软件,采用非加权配对算术平均法(UP-GMA, unweighted pair-group method with arithmetic means)建立遗传相似系数聚类图,并分别对形态标记、分子标记计算出的遗传聚类结果进行比较,获得其遗传相似系数相关散点图并计算二者的相似系数。

1.5 指纹图谱构建

首先进行指纹代码构建,采用英文字母和数字组合对每个核心引物多态性位点赋值(表 2 中的 QR 编码),记录每个品种经不同的核心引物扩增获得的多态性位点,形成由字母和阿拉伯数字组成的该品种 SSR 指纹代码^[16]。例如:红 1 号的部分 SSR 指纹代码为 BF2CG2DG4,表示该品种经 BVWS02048 引物扩增出 BVWS02048_2 的多态性位点,经 BVWS00048 引物扩增出 BVWS00048_2 的多态性位点,BVWS00106 引物扩增出 BVWS00106_4 的多态性位点。然后采用仙居朝歌软件有限公司出品的 QRCode 转化工具 QR 精灵 2.12 进行二维编码,将各个品种的名称、指纹图谱代码一起录入该软件,形成指纹图谱 QR 编码。

表 2 代表最大限度西瓜遗传多样性的 SSR 核心引物信息

Table 2 Information of 23 core set of SSR markers which represent the maximize watermelon genetic diversity markers

引物	上游引物序列	下游引物序列	多态性位点	QR 编码
SSR marker	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Polymorphic sites	QR code
BVWS02048	TCTGTGTGGATGCAATGGT	GCTAATCGAGCCCAGTTACG	BVWS02048_1	BF1
			BVWS02048_2	BF2
			BVWS02048_3	BF3
BVWS00048	TCAAAAGGTTTGCCCTAAATGAAA	TGCTGATCTCCCATTCTTAACCTC	BVWS00048_1	CG1
			BVWS00048_2	CG2
BVWS00106	TGGCCTAGAAGATTATTGAGCTGC	CATTATCACATGGCAGATAATGGAAA	BVWS00106_1	DG1
			BVWS00106_2	DG2
			BVWS00106_3	DG3
			BVWS00106_4	DG4
BVWS00208	GCAAAGATTGTCTATGAAGCAGCA	GCTCATTGGCTTCTTGAATCTGTT	BVWS00208_1	FG1
			BVWS00208_2	FG2
BVWS00209	TGCTTCAAAATCTATTACAAATTTGC	TTCTTGGTTTCGGGTTTCTTTACA	BVWS00209_1	GG1
			BVWS00209_2	GG2
			BVWS00209_3	GG3
			BVWS00209_4	GG4
			BVWS00209_5	GG5
BVWS00233	AAACCATGATTTTACAGGGGATCA	TTTCTGTCTTCTTTTGACCAATGC	BVWS00233_1	HG1
			BVWS00233_2	HG2
			BVWS00233_3	HG3

表 2(续)

引物	上游引物序列	下游引物序列	多态性位点	QR 编码
SSR marker	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Polymorphic sites	QR code
BVWS00314	GAGGAGAATCGGTTCTTGACATA	TTGAGCATCCTTGGGACTATCATT	BVWS00314_1	IW1
			BVWS00314_2	IW2
			BVWS00314_3	IW3
BVWS00369	TGAGAAAATGGAAGATGCAAATGA	TTCTTCTCACTCTCTCCTAAGATTTTGC	BVWS00369_1	KW1
			BVWS00369_2	KW2
BVWS00433	TCTTTTAAGTTTTGAGGGAGAGC	TTCCCAAGCTAGCCTTTTCA	BVWS00433_1	LW1
			BVWS00433_2	LW2
			BVWS00433_3	LW3
			BVWS00433_4	LW4
			BVWS00433_5	LW5
BVWS00441	TGCTTGAAATCAATAAAAAGTGAA	TGGATGTTTTTGCCATTTGA	BVWS00441_1	WM1
			BVWS00441_2	WM2
			BVWS00441_3	WM3
BVWS00658	TTAGCCTAAGCAAGGGTTTTT	AAGTACACATTTTAAACAATCAATCCA	BVWS00658_1	WN1
			BVWS00658_2	WN2
			BVWS00658_3	WN3
BVWS00948	TCAAACCGACTGCCATATCA	AGCTTGCTTCCTGGCCTTT	BVWS00948_1	GM1
			BVWS00948_2	GM2
			BVWS00948_3	GM3
BVWS01734	AAAATTACATCTTAAATGCGCC	GGAACATTGACTTCAATCAGCA	BVWS01734_1	QW1
			BVWS01734_2	QW2
BVWS01897	TTCTTGAAACTCAACCTCAAA	AAAGCGTGTGAGTGTGAGA	BVWS01897_1	RW1
			BVWS01897_2	RW2
			BVWS01897_3	RW3
BVWS00155	TGGATCATTTGACAGATTTAGCGA	CATCACAGTTAACGATCACAAGGC	BVWS00155_1	RC1
			BVWS00155_2	RC2
BVWS00228	GGAAGACTGAGGTGATAAATCAATATGT	AATTGGCCCCAAATATCCATATGAC	BVWS00228_1	RD1
			BVWS00228_2	RD2
			BVWS00228_3	RD3
			BVWS00228_4	RD4
BVWS00236	CTTGAGCATTTGGCTTCCTAGTGT	GTCAAAATGTCTTTGATTCCCAA	BVWS00236_1	RE1
			BVWS00236_2	RE2
			BVWS00236_3	RE3
BVWS00297	ACAAC TTGATTGATTGCACGATG	AAGTGAAAGACCCTTTTCCCAAAC	BVWS00297_1	RF1
			BVWS00297_2	RF2
			BVWS00297_3	RF3
BVWS00333	TGTTGAGATTCTTTGATTTCAACTGT	TGGGTCAAAGTATTTTGCCTTTTT	BVWS00333_1	RG1
			BVWS00333_2	RG2
			BVWS00333_3	RG3
BVWS00826	ATGCTTCATTTTCACGTTCG	AAAAATCAAGCAAAGAACAACAT	BVWS00826_1	SA1
			BVWS00826_2	SA2
			BVWS00826_3	SA3
BVWS00839	TTCCACACCAAGGAGGTAGG	CATGTCATTGATAAAGCAGAAA	BVWS00839_1	SC1
			BVWS00839_2	SC2
			BVWS00839_3	SC3
BVWS01843	CCCCGCCAAAATTAAAA	CACCCGTGTAAAGGTGCTAAA	BVWS01843_1	SD1
			BVWS01843_2	SD2
BVWI00170	AACGCACGATAGTTAGAAGG	TGACTAATTAACTACACTCAGACT	BVWI00170_1	SF1
			BVWI00170_2	SF2

2 结果与分析

2.1 基于 SSR 标记西瓜 DUS 标准品种遗传多样性分析

众多学者研究表明,系统进化树能从基因组水平真实反映重测序材料之间的遗传亲缘关系,是开展植物遗传多样性研究的 DNA 序列证据^[17-18]。本研究采用能最大限度反映西瓜品种遗传多样性的 23 对核心 SSR 引物^[11],对 17 份西瓜重测序材料、24 份 DUS 测试西瓜标准品种及保护品种京欣 2 号(20020082.8)、对照品种京欣 1 号进行了遗传多样性分析,并以基于重测序获得的 SNP 标记构建的 17 份西瓜材料的系统进化树为参照^[11],分析发现

17 份重测序材料聚类结果与之一致。同时将 24 份西瓜 DUS 测试标准品种在相似系数 0.8 处划分为 3 类:第 1 类包括红 1 号、都 1 号、早花等 13 份材料,与 6 份测序材料 97103、JX-2、JLM 等被聚为一类,这 13 份 DUS 标准品种属于 *Citrullus lanatus* subsp. *vulgaris* 的东亚生态型;第 2 类包括 AU-SweetScarlet、长灰、中育 10 号等 10 份材料,与 5 份测序材料 Black-diamond、Calhoun-Gray 等被聚为一类,这 10 份 DUS 标准品种属于 *Citrullus lanatus* subsp. *vulgaris* 的美洲生态型;第 3 类包括 PI296341-FR,与同为 *Citrullus lanatus* subsp. *lanatus* var. *lanatus* 的 3 份测序材料聚为一类(图 1)。

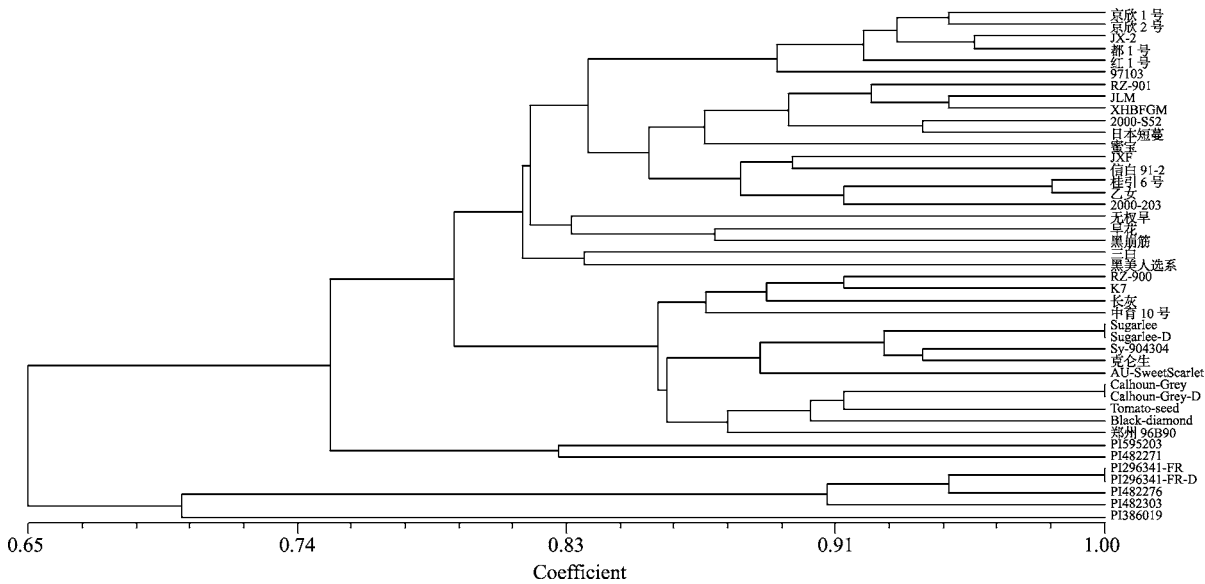


图 1 43 份供试材料 SSR 分析聚类结果

Fig. 1 Dendrogram of 43 watermelon varieties based on SSR markers

2.2 SSR 标记与形态学标记聚类比较

将形态学标记数据形成的“0,1”矩阵,采用 UP-GMA 法聚类分析(图 2),发现在相似系数为 0.66 处可以将 24 份 DUS 测试西瓜标准品种分为 2 类:第 1 类包括红 1 号、K7、长灰、PI296341-FR-D 等 19 份材料,第 2 类包括 Calhoun-Grey-D、克仑生等 5 份材料。与 SSR 分类结果相比,形态学聚类结果比较混乱,如 PI296341-FR-D 是属于 *Citrullus lanatus* subsp. *lanatus* var. *lanatus* 的野生西瓜材料,却与信白 91-2 等栽培材料聚在一起;长灰来源于美国,是典型的美洲类型材料,但被聚集在东亚类型材料中,说明形态学聚类分析不能准确反映品种间的亲缘关系。由于形态学检测手段容易受环境、栽培措施等

外界条件的影响,同时所选用的有限形态学标记数量也不可能完全反映品种间形态上的所有差异,因此形态学聚类分析结果存在很大的局限。本研究进一步分析发现各品种间的形态相似系数和分子遗传相似系数二者之间的相关系数仅为 0.186,差异无统计学意义(图 3)。如 K7 和红 1 号形态相似系数为 0.91,但分子遗传相似系数只有 0.80;而日本短蔓和 2000-S52 形态相似系数只有 0.68,而二者的分子遗传相似系数却为 0.93。

本研究结果表明,形态学检测手段的准确性低于 SSR 检测手段,利用形态学标记手段进行 DUS 检测可能不能准确地反映品种之间的差异和品种本身的特异性。

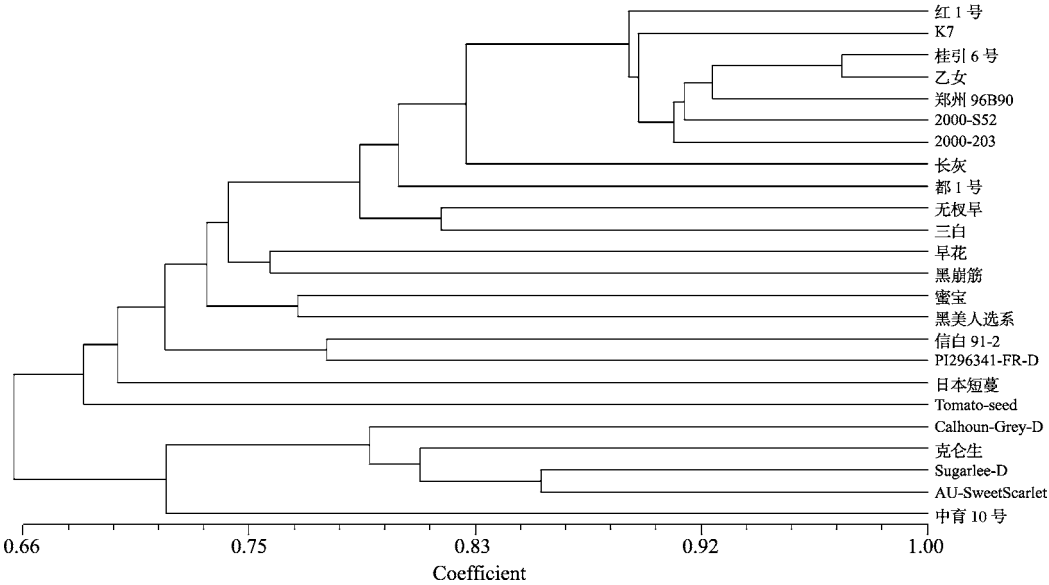


图2 24份西瓜DUS标准品种形态分析聚类结果

Fig.2 Dendrogram of 24 watermelon example varieties based on morphological traits of DUS test

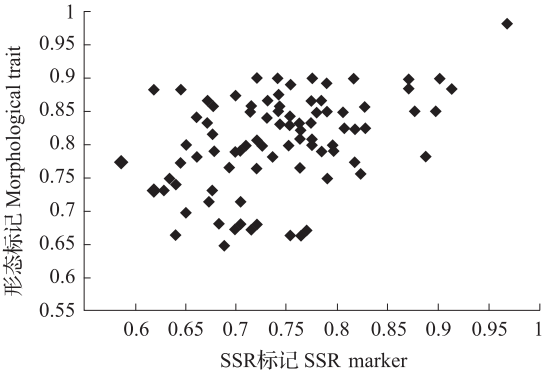


图3 SSR标记与形态学标记相似系数散点图

Fig.3 Scatterplot of similarity coefficients between SSR markers and morphological traits

2.3 西瓜 DUS 测试标准品种指纹图谱构建

2.3.1 24 份西瓜 DUS 标准品种指纹代码 以 23 个核心引物标记建立了 24 个西瓜 DUS 标准品种的指纹代码(表 3)。由于每一条字符串都具有唯一性,可标识 1 个品种,由此建立了 24 个标准品种的分子身份证。以此进行 DUS 测试时,发现这些标准品种的指纹代码如同一把标尺,可以准确读取各测试品种的图谱数据。

2.3.2 指纹图谱 QR 编码 本研究利用仙居朝歌软件有限公司出品的 QRCode 转化工具 QR 精灵 2.12 对所有标准品种指纹代码进行二维编码,将各个品种的名称和指纹代码等信息一起录入该软件,最终建成 24 份标准品种指纹图谱 QR 二维编码数据库。例如图 4 中品种 K7 的指纹图谱 QR 编码包含以下信息:名称-K7;指纹代码信息-

BF1CG2DG4FG1GG5HG2IW2KW2LW4WM3WN1GM1QW1RW1RC1RD3RE1RF1RG2SA2SC1SD2SF2。

2.4 采用 SSR 指纹图谱技术开展西瓜保护品种分子测试的验证

以已获得品种保护权的西瓜品种京欣 2 号(20020082.8)及其对照品种京欣 1 号为例,利用构建标准品种指纹图谱的技术对 2 个品种进行分子特异性测试。利用 23 对核心引物,在 2 个品种上共扩增 32 个 SSR 位点,其中 4 个位点存在差异,品种间遗传相似系数(GS)为 0.89。参考王立新等^[7]研究结果,遗传相似系数小于 0.90 的品种间差异显著互为特异品种,因此可以认为京欣 1 号和京欣 2 号为特异的 2 个品种,且区别于 24 个 DUS 标准品种(图 1)。但按照传统形态学 DUS 测试报告,2 个品种只存在 1 个性状的形态学差异,即京欣 2 号的种子为黑子,而京欣 1 号的种子为麻子。结果表明 SSR 标记比形态学鉴定能更多且更准确地反映出品种内在的遗传学差异。

3 讨论

目前国际上通用的 DUS 测试主要是以植物的表观形态特征作为指标,测试结果容易受环境因素的影响,且周期较长。随着育种材料遗传基础的日益狭窄及选育品种数目的日益增多,品种间的差异越来越小,单纯的依靠传统植物学性状已经难以准确鉴别,基于 DNA 多态性的分子标记正在成为新品种 DUS 测试的发展方向^[20],已有学者先后采用 RAPD、ISSR、AFLP 和 SRAP 等标记技术进行新品

表 3 24 份西瓜 DUS 标准品种 SSR 指纹图谱代码

Table 3 The SSR fingerprinting codes of 24 watermelon example varieties

品种	SSR 指纹代码
Varieties	SSR fingerprinting code
红 1 号	BF2CG2DG4FG1GG4HG2IW2KW2LW2WM3WN2GM2QW2RW2RC2RD2RE2RF1RG1SA3SC2SD2SF2
无杈早	BF1CG2DG4FG1GG3HG1IW2KW2LW2WM2WN1GM1QW2RW1RC1RD3RE1RF1RG2SA2SC2SD2SF2
早花	BF2CG2DG4FG1FG2GG3HG2IW2KW2LW2WM2WN2GM1QW1RW2RC1RD2RE2RF1RG2SA3SC2SD3SF1
K7	BF1CG2DG4FG1GG5HG2IW2KW2LW4WM3WN1GM1QW1RW1RC1RD3RE1RF1RG2SA2SC1SD2SF2
三白	BF2CG1DG4FG1GG3HG2IW2KW1LW2WM2WN2GM2QW2RW1RC1RD3RE2RF2RG2SA3SC2SD3SF1
信白 91-2	BF2CG1DG1FG1GG3HG2IW2KW2LW3WM3WN1GM1QW2RW2RC1RD3RE2RF1RG2SA3SC2SD2SF1
黑崩筋	BF2CG1DG2FG1GG3HG2IW2KW2LW2WM2WN2GM1QW2RW2RC1RD3RE2RF2RG2SA3SC2SD2SF1
都 1 号	BF2CG2DG4FG1FG2GG2HG1IW2KW2LW1WM2WN2GM2QW2RW1RC1RD2RE2RF2RG1SA3SC2SD3SF2
桂引 6 号	BF2CG2DG1FG1GG5HG2IW2KW2LW2WM3WN1GM2QW1RW1RC1RD2RE2RF1RF2RG1RG2SA2SC2SD2SF1
乙女	BF2CG2DG1FG1GG3HG2IW2KW2LW2WM3WN1GM2QW1RW1RC1RD2RE2RF2RG2SA3SC2SD2SF1
长灰	BF2CG2DG4FG1GG5HG2IW2KW1LW4WM3WN1GM1QW1RW1RC1RD3RE1RF1RG1SA3SC2SD2SF1
Calhoun-Grey-D	BF1CG2DG4FG1GG5HG1IW1KW1LW4WM2WN1GM2QW2RW1RC1RD3RE1RF2RG2SA3SC1SD2SF1
克仑生	BF1CG2DG4FG1GG5HG1IW2KW1LW4WM3WN1GM1QW1RW1RC1RD3RE1RF2RG1SA2SC1SD2SF1
PI296341-FR-D	BF3CG1DG3FG2GG1HG3IW3KW2LW5WM1WN1GM3QW2RW2RC2RD4RE3RF3RG3SA1SC2SD1SF1
郑州 96B90	BF2CG2DG4FG1GG4HG2IW2KW1LW4WM2WN2GM2QW1RW1RC1RD2RE1RF2RG1SA2SC2SD2SF1
Sugarlee-D	BF1CG2DG4FG1FG2GG5HG1IW2KW1LW4WM3WN2GM1QW2RW1RC1RD2RE1RF1RG1SA2SC2SD2SF1
中育 10 号	BF1CG2DG1FG1GG3HG1IW2KW2LW4WM2WN2GM1QW1RW1RC1RD2RE1RF2RG1SA2SC2SD2SF1
2000-S52	BF2CG2DG1FG1GG5HG2IW1IW2KW1LW2WM2WN2GM2QW1RW3RC1RD2RE2RF1RG1SA3SC2SD3SF1
蜜宝	BF2CG2DG4FG1GG3HG2IW1KW1LW2WM2WM3WN2GM2QW1RW1RC1RD2RE1RF1RG1RG2SA3SC2SD2SF1
黑美人选系	BF1CG1DG1FG1FG2GG5IW2KW2LW2WM2WN3GM2QW2RW1RC1RD2RE2RF1RG2SA3SC2SD2SF1
Tomato-seed	BF1CG2DG1FG1GG4IW2KW1LW4WM2WN2GM2QW1RW1RC1RD1RE1RF1RG1SA3SC2SD2SF1
AU-SweetScarlet	BF2CG2DG4FG1GG4HG1IW2KW1LW3WM3WN2GM2QW2RW1RC1RD1RE1RF1RG1SA2SC2SD2SF1
2000-203	BF2CG2DG1FG1GG3HG2IW2KW2LW4WM2WN2GM2QW1RW1RC1RD1RE2RF2RG1SA2SC2SD2SF1
日本短蔓	BF2CG2DG1FG1GG4HG2IW2KW1LW1WM2WN2GM2QW1RW2RC1RD2RE2RF1RG2SA3SC2SD2SF1

种鉴定,而这些标记均是采用无基因组序列信息的标记技术,尽管有一定的实用性,但标记随机性强、稳定差。SSR 技术具有共显性、重复性好等优点,是目前进行 DUS 检测中的首选标记^[21]。为提高 SSR 技术的检测效率,玉米、小麦等大田作物采用核心引物进行相关研究^[22-23]。核心引物指均匀覆盖染色体全基因组,多态性、稳定性、重复性等综合特性好,可作为初步研究优先选用的一套引物。由于核心引物相对固定,不同实验室均可使用该套引物进行相关研究。但并非所有 SSR 引物都具有同等检测结果和检测效率,不同引物组合的检测能力差异极大,无法准确判断引物组合是否正确地反映参试品种的特异性和遗传多样性。理论上,只有进行每个品种全基因组序列的比较才能正确反映不同品种的特异性^[24]。西瓜全基因组测序与重测序的完成^[10]为快速获得最大限度反映西瓜品种遗传多样性的核心引物提供了可能,本研究所采用的核心引物就是基于这个前提获

得,利用该套核心引物可以准确反映标准品种的遗传亲缘关系,适用于迅速构建品种的指纹数据库。

采用基于全基因组序列开发的核心引物,本研究构建了 DUS 测试标准品种的指纹图谱,并成功地对保护品种京欣 2 号的特异性测试验证,说明本研究建立的 DUS 测试技术体系适用于西瓜 DUS 测试。利用核酸指纹库进行 DUS 测试品种的特异性检测将是未来 DUS 测试的核心,而核酸指纹库的首要要求是建库材料品种数量足够多,其次作为建库材料品种的指纹图谱是唯一的;如果建库数量有限,指纹图谱不唯一,必然极大地限制核酸指纹库的有效性和可行性。今后可以利用本研究所选用的核心引物组合建立包含育种材料、审定品种、DUS 测试品种等众多材料的核酸指纹图谱,将核酸指纹转化成 QR 二维编码数据库,最终获得数量多、品种全的核酸指纹数据库,以便准确迅速地进行后续品种资源的鉴定管理。

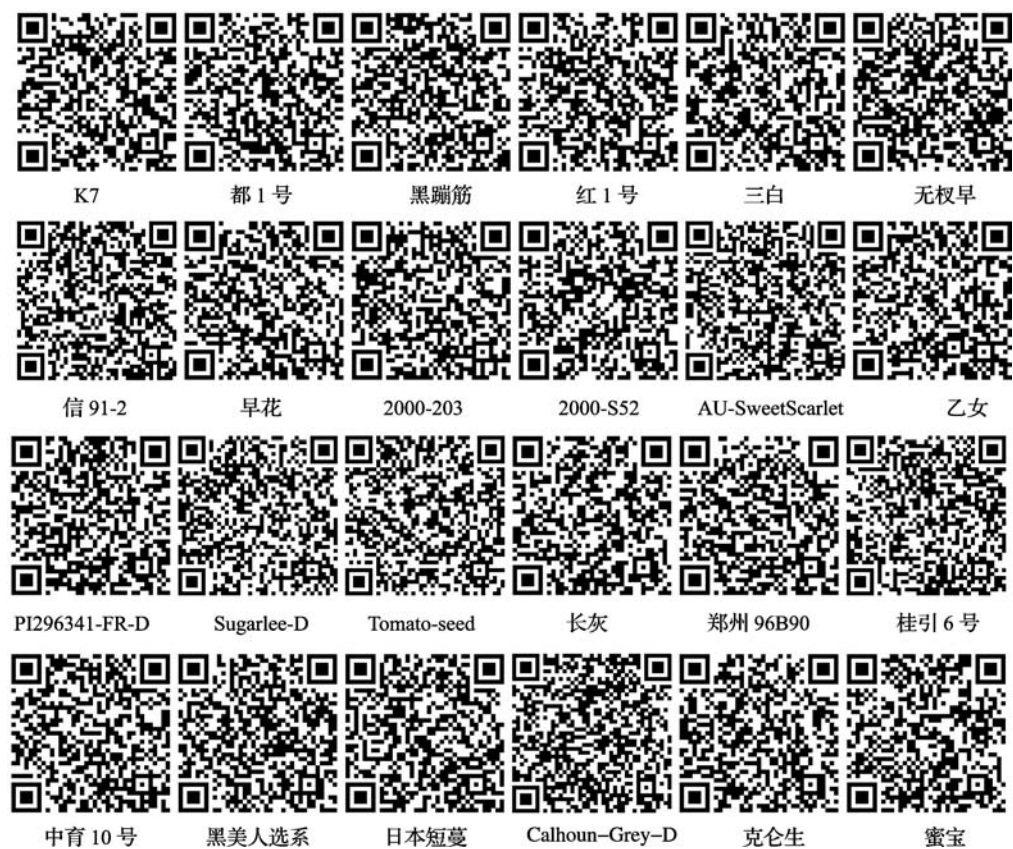


图 4 24 份西瓜 DUS 测试标准品种指纹图谱 QR 编码

Fig. 4 The QR codes of 24 watermelon example varieties in DUS test

参考文献

[1] 杨艳涛,张琳,吴敬学. 2011 年我国西甜瓜市场及产业发展趋势与对策分析[J]. 北方园艺, 2012 (15):183-187

[2] 张晗,姚凤霞,刘永杰,等. EST-SSR 标记在冬小麦品种 DUS 测试中的应用[J]. 麦类作物学报, 2010,30 (5):801-806

[3] 陈海荣,顾晓君. 浅谈西瓜新品种的保护[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002 (4):36-37

[4] Dolores Vález M, Ibáñez J. Assessment of the uniformity and stability of grapevine cultivars using a set of microsatellite markers[J]. Euphytica, 2012, 186: 419-432

[5] 陆光远,伍晓明,张冬晓,等. SSR 标记分析国家油菜区试品种的特异性 and 一致性[J]. 中国农业科学, 2008,41 (1): 32-42

[6] 程本义,施勇峰,沈伟峰,等. 水稻品种 DNA 指纹检测技术体系及其应用[J]. 杂交水稻, 2008,23 (1):54-59

[7] 王立新,常丽芳,李宏博,等. 小麦区试品系 DUS 测试的分子标记[J]. 作物学报, 2010,36 (7):1114-1125

[8] 张华生,王凤格,赵久然,等. 利用形态性状和 SSR 标记进行玉米品种的特异性鉴定[J]. 玉米科学, 2011,19 (3):51-55

[9] Cooke R J, Bredemeijer G M M, Ganai M W, et al. Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci[J]. 2003, 132: 331-341

[10] Guo S G, Zhang J G, Sun H H, et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions[J]. Nat Genet, 2012, 10: 1038

[11] Zhang H Y, Wang H, Guo S G, et al. Identification and validation of a core set of microsatellite markers for genetic diversity analysis in watermelon, *Citrullus lanatus* Thunb. Matsum. & Nakai [J]. Euphytica, 2012, 186: 329-342

[12] 杨坤,吕波,张新明,等. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试基本概念解读[J]. 中国种业, 2011(12):21-24

[13] Murry H G, Thompspon W F. Rapid isolation of weight DNA[J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321-4322

[14] 刘丽娟,舒烈波,罗利军,等. SRAP 标记与形态学标记在西瓜 DUS 测试中的比较[J]. 植物遗传资源学报, 2011,12 (5): 790-795

[15] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273

[16] 雷天刚,何永睿,吴鑫,等. 柑橘栽培品种(系)DNA 指纹图谱库的构建[J]. 中国农业科学, 2009,42 (8):2852-2861

[17] Chor B, Tulle T. Maximum likelihood of evolutionary trees: hardness and approximation[J]. Bioinformatics, 2005,1(21): 97-106

[18] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:249-263

[19] 智丽,滕中华,李先源,等. 23 种野生百合遗传关系的 SRAP 分析[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(4): 677-684

[20] 张肖娟,孙振元. 植物新品种保护与 DUS 测试的发展现状[J]. 林业科学研究, 2011, 24 (2): 247-252

[21] Noli E, Teriaca M S, Sanguineti M C, et al. Utilization of SSR and AFLP markers for the assessment of distinctness in durum wheat[J]. Mol Breeding, 2008, 22: 301-313

[22] 王凤格,赵久然,戴景瑞,等. 玉米通用 SSR 核心引物筛选及高通两多重 PCR 复合扩增体系建立[J]. 科学通报, 2006,51 (23):2738-2746

[23] 李根英, Susanne D, Marilyn L W, 等. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 分子标记试剂盒的研发[J]. 作物学报, 2006, 32 (12):1771-1778

[24] 陈仲中,汪旭升,朱军. 基于水稻基因组序列 SSR 的多态性分析[J]. 中国水稻科学, 2005,19 (4):303-307