

# 设施用厚皮甜瓜品种 SSR 标记遗传多样性分析

刘龙洲<sup>1</sup> 翟文强<sup>2</sup> 陈亚丽<sup>1,3</sup> 陈幼源<sup>1</sup> 朱为民<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>上海市农业科学院园艺研究所/上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106;

<sup>2</sup>新疆农业科学院哈密瓜研究中心, 乌鲁木齐 830091; <sup>3</sup>南京农业大学, 南京 210095)

**摘要:** 使用分布于甜瓜 12 条染色体上的 72 对 SSR 引物, 对我国中东部设施内栽培的 30 个厚皮甜瓜品种进行分析; 56 对 SSR 引物在 30 个品种间表现为多态性。共检测到 138 个等位变异, 每对引物的等位变异数变幅为 2~6 个, 平均为 2.6 个。有效等位变异为 86.16 个, 平均为 2.25。每个 SSR 位点的多态性信息量 (PIC) 变化范围为 0.045~0.725, 平均为 0.390。30 个品种间遗传相似系数变幅为 0.274~0.974 之间, 平均值为 0.665, 且 90.4% 的供试品种其遗传相似系数在 0.474~0.824 之间, 亲缘关系较近; 以遗传相似系数为原始数据, 按 UPGMA 方法将 30 个品种划分为 3 大类群, 结合系谱分析结果表明, 我国中东部设施适宜种植的甜瓜品种遗传多样性不够丰富, 多数品种间的亲缘关系较近, 欲进一步提高中东部地区设施甜瓜产量和品质还需要拓宽亲本选择范围, 扩大遗传背景。

**关键词:** 甜瓜; SSR; 遗传多样性; 聚类分析

## Analysis of Genetic Diversity of Melon Varieties Using SSR Markers

LIU Long-zhou<sup>1</sup> ZHAI Wen-qiang<sup>2</sup> CHEN Ya-li<sup>1,3</sup> CHEN You-yuan<sup>1</sup> ZHU Wei-min<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology/ Horticultural Research Institute, Shanghai Academy

of Agricultural Sciences, Shanghai, 201106; <sup>2</sup> Xinjiang Academy of Agricultural Sciences,

Wulumuqi 830000; <sup>3</sup> Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

**Abstract:** Genetic diversity of 30 melon varieties originating from the Middle-East area Province or introduced from Taiwan area and Japan, was analyzed by 72 SSR primers distributed on 12 melon chromosomes. The results showed that 56 SSR primers of total exhibited polymorphism and 138 alleles were detected with a range from 2 to 6 and n average number of alleles per SSR of 2.6. The effective alleles were 86.16 with an average of 2.25. Each value of allelic polymorphism information content (PIC) ranged from 0.045 to 0.725 based on an average of 0.390 per SSR marker. The genetic similarity of paired varieties varied from 0.274 to 0.974, with an average of 0.665, and the genetic similarity of 90.4% varieties tested ranged from 0.474 to 0.824. According to the methodology of UPGMA, 30 melon varieties could be clustered into three groups based on the generic similarity coefficient as the original data. In combination with pedigree analysis, results showed that the genetic diversity of melon varieties in Middle-East area was not enough at present and it had closer genetic relationship among most varieties. It is important to broaden the genetic resources and explore the genetic background in order to provide high quality melon variety in current melon breeding programs.

**Key words:** Melon; SSR; Genetic Diversity; Cluster analysis

设施用厚皮甜瓜包括厚薄皮杂交类型甜瓜、网纹厚皮甜瓜和哈密瓜品种, 具有耐低温弱光、抗病耐湿的特点。随着甜瓜设施栽培技术改进, 厚

皮甜瓜设施栽培面积在中东部地区逐步扩大起来, 据统计已经达到 10 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>, 新品种的选育很受重视。

收稿日期: 2011-07-09 修回日期: 2012-04-11

基金资助: 国家自然科学基金项目 (31000915); 上海市科委启明星人才计划 (11QA1405700)

作者简介: 刘龙洲, 博士, 研究方向为葫芦科植物基因组和分子标记研究. E-mail: shoujitel@yahoo.com.cn

利用 DNA 分子标记技术研究品种材料的遗传多样性,对于了解品种的遗传信息和遗传关系,有针对性地选择育种材料与亲本选配,拓宽品种群体的遗传基础具有实际意义<sup>[2]</sup>。Jack 等<sup>[3]</sup>、Fei 等<sup>[4]</sup>利用分子标记对美国、西班牙、日本和希腊的甜瓜种质资源的多样性以及亲缘关系进行了分析研究,同时还对来自不同国家或区域的种质作了比较和亲缘关系分析。Ana 等<sup>[5]</sup>利用 RAPD 和 SSR 标记对大量甜瓜种质进行评价,估算选择的西班牙甜瓜种质品系内和品系间的变异,表明所研究的西班牙甜瓜具有较宽的遗传背景。刘万勃等<sup>[6]</sup>和黄树苹<sup>[7]</sup>对来自日本(9 份)、台湾(9 份)、美国(8 份)、法国(3 份)、中国新疆(2 份)等地的 37 份甜瓜种质资源使用 21 个 RAPD 引物和 10 个 ISSR 引物进行了遗传多样性分析,得到薄皮甜瓜和厚皮甜瓜遗传相似系数很高、被划为一类的结论。王美荣等<sup>[2]</sup>使用 SSR 标记将 39 份甜瓜材料(双亲和 F<sub>1</sub>)分为厚皮甜瓜和薄皮甜瓜两大类群;同时进行群体结构分析阐明 84.62% 的育种材料血缘相对比较单一,15.38% 的育种材料拥有混合来源;研究结果为亲本选配、优良育种材料利用提供了技术支持。

我国中东部设施种植的厚皮甜瓜品种数量虽然很多,但适应性广、面积较大的品种还不多;可以说某种程度上厚皮甜瓜生产处于徘徊状态,产量和品质提升缓慢,这与设施内新品种选育上未有突破性进展有必然联系。本研究选用国内各育种单位育成的厚皮甜瓜品种及日本、台湾地区引进的品种共 30 份,利用分布在 12 条染色体上的 72 个 SSR 分子标记研究其遗传多样性,旨在为我国中东部设施厚皮甜瓜品种资源遗传多样性分析和有针对性的选择育种材料培育新品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

为国内育种单位育成及日本、台湾地区引进的厚皮甜瓜品种共 30 份,名称和来源见表 1。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 SSR 反应体系** 150ng/μl 模板 DNA 2.5μl,10pmol/L 引物 0.3μl,5U/μl Taq 酶 0.6μl,20mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1μl,2mmol/L dNTP 2μl。

**1.2.2 SSR 扩增检测方法** 总反应体系为 10μl,反

表 1 30 个甜瓜品种的名称和来源

Table 1 Name pedigree and origin of 30 melon varieties

品种 Variety	来源 Origin	品种 Variety	来源 Origin
超奇蜜宝	内蒙古富达种业公司	伊丽莎白	合肥久易种业公司
昭君一号	新疆农人种业	甬甜 5 号	宁波市农科院
FM 小果哈密瓜	新疆农人种业	金辉一号	上海农科院
蜜天下	台湾农友公司	浙网 29	浙江农科院
夏蜜	台湾农友公司	明珠一号	上海农科院
翠蜜	台湾农友公司	蜜世界	台湾农友公司
黄醉仙	新疆农科院	橙蜜	台湾农友公司
红心脆	新疆农科院	寿研一号	山东寿光良种公司
西博洛托	日本八江农艺株式会社	碧龙	天津市农科院
红冠玉	新疆农科院	西蜜三号	新疆西域种业有限公司
哈密红	上海农科院	红绿早翠	上海农科院
古拉巴	日本八江农艺株式会社	久红瑞 2 号	合肥久易种业公司
玉姑	台湾农友公司	浙甬 2 号	宁波市农科院
雪里红	新疆农科院	中甜 2 号	中国农业科学院
浙甜 1 号	浙江农科院	挪威 851	北京凤鸣雅士良种公司

应程序为 94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 1min,55℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 5min,4℃ 保存。

PCR 扩增产物用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳缓冲液为 1 × TBE,50W 稳功率电泳 1h,10% 乙醇与 0.5% 冰乙酸混合水溶液固定 10min,1.5g/L AgNO<sub>3</sub> 水溶液染色 15min,显影液(15 g/L NaOH,1% 甲醛)显影 10~20min,扫描仪扫描观察。

**1.2.3 数据统计与分析** SSR 扩增产物以 0.1 统计建立数据库。在相同电泳图谱位置上有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 9。每 2 份材料间的遗传差异按 Nei 等<sup>[8]</sup>的方法求算遗传相似系数(genetic similarity,GS)和遗传距离(genetic distance,GD),公式为:GS = 2M<sub>xy</sub> / (M<sub>x</sub> + M<sub>y</sub>),GD = 1 - GS,其中 M<sub>x</sub> 和 M<sub>y</sub> 分别为 X 和 Y 两材料的总频段数,M<sub>xy</sub> 为两材料的公共片段数。根据所得遗传相似系数,使用 NTSYS-pe Ver. 2.10<sup>[9]</sup> 软件进行主坐标分析和基于 UPGMA 法(unweighted pair-group method with arithmetic mean,算术平均非加权配组法)聚类。

### 1.2.4 遗传多样性评价 多态性位点的平均等位变异数 $AP$ , $AP = \sum Ap_i / np$ 。

多态性信息量 (polymorphism index content, 简称  $PIC$ <sup>[10]</sup>),  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ 。

有效等位变异点数 (effective number of alleles)<sup>[11]</sup>,  $E = 1 / \sum p_i^2$ 。

式中  $Ap_i$  为第  $i$  个多态位点上的等位变异数,  $np$  为所检测的多态位点总数;  $p_i$  为第  $i$  个多态位点上的基因频率。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记的多态性

所用 72 对 SSR 引物在 30 个品种能启动 PCR

扩增的有 66 对, 占所用引物的 91.0%。其中具有带型稳定且多态性明显的引物有 56 对 (表 2<sup>[12-14]</sup>), 占所用引物的 76.0%, 分布于甜瓜 12 条染色体上。共检测到 138 个等位变异, 每对 SSR 引物的等位变异数变幅为 2~6 个, 平均为 2.6 个。其中, 引物 CMBR058 和 CM122 的等位位点数最多, 均为 6 个。由表 2 可知, 每个 SSR 位点的  $PIC$  值变化范围为 0.045~0.725, 平均为 0.390。由于多态性信息量是等位变异数和频率的函数, 因此具有较高  $PIC$  值的 SSR 标记 (如 CMBR058) 具有较高的检测效率。根据等位变异数目和有效等位变异数与  $PIC$  值分别评价各标记的多态性检测能力, 其结果不一定一致, 但两者呈极显著正相关 ( $r = 0.909^{**}$ ,  $\alpha = 0.01$ )。

表 2 SSR 引物、染色体位置、等位变异数目、有效等位变异数及  $PIC$  多态性信息值

Table 2 Primer, chromosome location, number of alleles,  $E$  and polymorphism index content ( $PIC$ ) for SSR markers

引物 Primer	染色体 Chr.	等位变异数 $N_a$	有效等位变异数 $N_e$	$PIC$ 值 $PIC$	引物 Primer	染色体 Chr.	等位变异数 $N_a$	有效等位变异数 $N_e$	$PIC$ 值 $PIC$
CMCTN86	1	2	1.784	0.476	AE-4200	2	2	1.742	0.538
CMCT505	1	2	2.143	0.578	GCM548	2	2	2.093	0.653
CMCTN53	1	5	1.564	0.369	TJ24	2	5	1.527	0.417
CMMJ35-3	1	2	1.83	0.423	CMGA36a	2	3	1.787	0.478
CMN22-85	3	2	1.665	0.591	CMM515-4	4	2	1.626	0.668
CMBR100	3	2	2.144	0.679	CM122	4	6	3.124	0.697
CMTCN66	3	3	1.854	0.396	CMAGN73	4	2	1.810	0.447
CSWCT10	3	2	1.923	0.480	CMBR035	4	2	1.878	0.542
CMXET6	5	2	3.965	0.445	CMN21-46	4	2	3.872	0.503
CMTCN9	5	4	2.174	0.769	CMBR089	4	3	2.123	0.869
CMCTN35	5	4	1.456	0.566	CMN21-06	4	2	1.422	0.640
CMATN101	5	2	1.379	0.458	CSCT571b	4	2	1.347	0.518
CMGAN3	5	2	1.381	0.331	CMTCN50	6	2	1.349	0.374
CSWCTT02	5	2	1.301	0.454	CMN61-44	6	2	1.270	0.513
CMAGN75	7	2	1.756	0.517	CMBR058	7	6	3.301	0.631
CMMS004	7	2	2.914	0.769	CMTCN65	8	2	2.846	0.869
CMNCAN90	7	5	1.564	0.696	CMAT141	8	2	1.527	0.786
CMBR028	7	3	1.183	0.468	CMAG59	8	5	1.155	0.529
CMGA15C	7	2	1.431	0.531	CMGAN25	8	2	1.397	0.600
CMATN22	9	2	1.965	0.351	CMBR022	8	4	1.919	0.397
CMN5372A	9	2	3.114	0.769	CMBR007	8	2	3.041	0.869
CMCTN7	9	4	1.854	0.386	CM-9b	10	2	1.810	0.436
CMCTN1b	9	3	2.123	0.518	CMGA172	10	2	2.073	0.585
CMTTC47C	9	2	1.601	0.431	CMBR055	10	5	1.563	0.487
CMAGN45	11	2	3.414	0.579	CSWCT22A	10	2	3.334	0.654
CSWCT18B	11	5	1.654	0.486	CMCTN71	10	2	1.615	0.549
CMATN89	11	2	2.876	0.455	CMGAN24	12	2	2.808	0.514
CMMS35-4	11	2	2.146	0.463	CM39b	12	4	2.096	0.523

$N_a$ : Observed number of alleles;  $N_e$ : Effective number of alleles

从标记所检测的等位变异数目在甜瓜 12 条染色体上分布(表 2)来看,每条染色体所检测的平均等位变异数为 2.00~6.00 个,其中第 7 条染色体上检测到的平均等位变异最多,为 3.33 个,其次是第 1、8 染色体,为 2.7 和 2.8 个。由此说明,供试亲本在第 1、7、8 染色体上的遗传差异较大。

## 2.2 30 个甜瓜品种的遗传相似性分析

根据 56 对 SSR 引物在 30 份供试品种中所获得的 138 个等位变异,按 Nei 的方法利用 NTSYSpc2.0 统计分析软件计算供试品种间的遗传相似系数。所

有供试品种间的遗传相似系数变化范围在 0.274~0.974 之间,平均为 0.665。根据所计算的 563 个遗传相似系数,以 0.025 为组距进行次数分布分析,其结果见图 1。

由图 1 可知,供试品种的遗传相似系数次数呈正态分布,遗传相似系数在 0.474~0.824 之间的数量为 509 个,占整个数据的 90.4%;0.474 以下的有 25 个,占总数的 4.4%;0.824 以上的有 29 个,占总数的 5.2%。说明目前适宜我国中东部种植的甜瓜品种遗传相似性较高,遗传差异较大的品种数量相对较少。

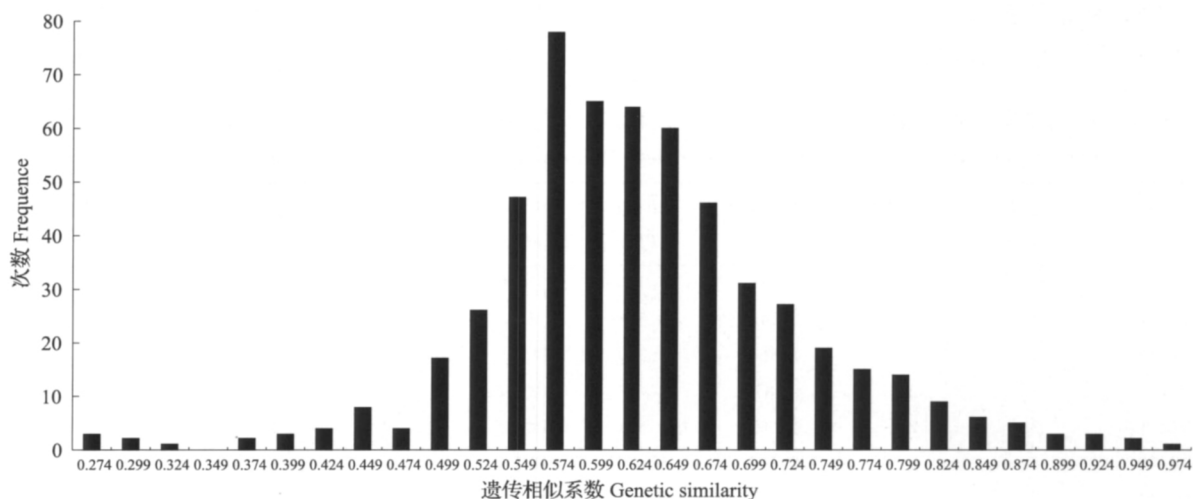


图 1 遗传相似系数的次数分布

Fig. 1 Distribution of genetic similarity

## 2.3 30 个甜瓜品种的聚类分析

由 SSR 分子标记聚类树状图(图 2)可见,在遗传相似系数 0.360 处,供试的 30 份品种可分为三大类。其中第 I 大类包括 17 个品种,又可分为 2 个亚类,第 1 亚类有 12 个品种,包括伊丽莎白、金辉一号、西蜜 3 号、黄醉仙、哈密红、中甜 2 号、西博洛托、蜜世界、古拉巴、明珠一号、久红瑞 2 号、雪里红,其中金辉一号、久红瑞 2 号、伊丽莎白、黄醉仙均为黄皮脆肉类型甜瓜,皮硬耐储存;第 2 亚类有 5 个品种,包括甬甜 5 号、碧龙、玉姑、寿研一号、蜜天下,其中碧龙、寿研一号都包括玉姑的血缘<sup>[15-16]</sup>,虽然甬甜 5 号、蜜天下系谱不清楚,估计可能也与玉姑血缘有一定关系。第 I 大类的 17 个品种均含有光皮脆肉类型品种血缘,因此聚为同一类。第 II 大类有 8 个品种,均为市场上优秀的网纹类型品种,又可分为 2 个亚类,第 1 亚类包括橙蜜、浙网 29、翠蜜、夏蜜、浙甬 2 号、红绿早脆和浙甜 1 号,其中夏蜜是由翠蜜选系而来<sup>[17]</sup>;第 2 亚类只有挪威 851,引自

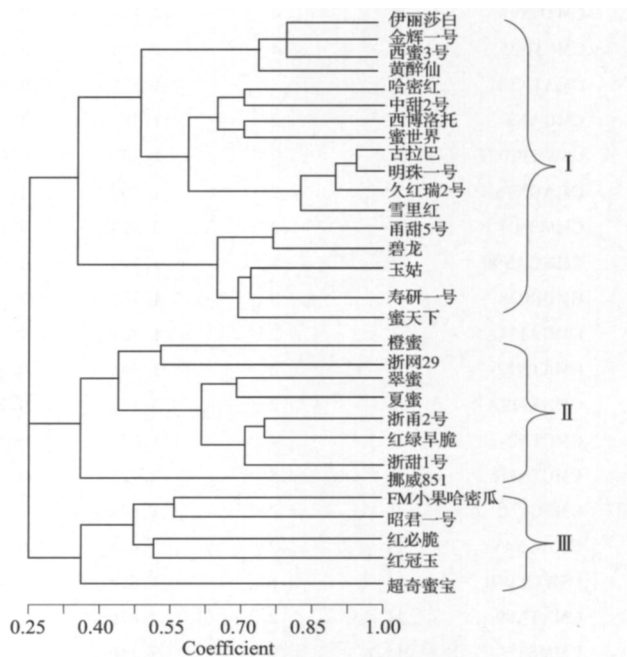


图 2 30 个甜瓜品种 SSR 标记分析聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 30 melon varieties based on SSR marker

挪威。第 III 大类只有 5 个品种,均为大面积推广的哈密瓜类型品种,麻皮肉脆耐储运,因此而单独聚为一类,包括 FM 小果哈密瓜、昭君一号、红心脆、红冠玉、超奇蜜宝。

### 3 讨论

对品种进行聚类分析,是研究品种间遗传差异、杂交育种、亲本选配的重要参考依据。本研究采用分布于甜瓜 12 条染色体上的 72 对 SSR 引物,对我国中东部设施栽培的 30 个厚皮甜瓜品种进行遗传多样性分析,共检测到 138 个等位变异,其中每对 SSR 引物的等位变异数变幅为 2~6 个,平均为 2.6 个;每个 SSR 位点的多态性信息量 (PIC 值) 变化范围为 0.045~0.725,说明 SSR 标记多态性较丰富,比较适合甜瓜材料的聚类分析。供试品种间的遗传相似系数 (GS) 变化范围在 0.274~0.974 之间,主要集中在 0.474~0.824,占整个数据的 90.4%,表明中东部设施厚皮甜瓜的遗传多样性不大,可能是多个品种共用同一亲本或者多个品种是在同一类育种材料基础上选育而来所致<sup>[15-17]</sup>。造成这种现象的主要原因可能是针对同一个区域内的育种目标的相似性加上人工选择作用所致,在同一个生态区这些被保留的种质资源会保留更多的相似特性,同时也难以避免同一区域内品种遗传基础狭窄性,为提高育种效率,充分利用杂种优势今后还需要加大种质资源引种力度,这样才有可能培育出适应性广、优质的高产品种。

聚类结果将本研究中使用的 30 份甜瓜品种基本分为 3 类,第 1 类厚薄皮杂交类型甜瓜,即是国外称的 honeydew 类型,特点是果实短椭圆、果肉厚、品质佳(肉质脆、糖分高、口感好)、抗病性强、适应性强;第 2 类为网纹甜瓜类,即是国外的 cantaloup 类型,特点是外观漂亮、香味浓郁、含糖量高、品质好、耐存储运输;第 3 类为哈密瓜类,即血缘为中亚来源或者我国西北地区来源的甜瓜材料,与国外称为 cassaba 类型冬季甜瓜相近;3 大类群之间的遗传差异还是比较大的,但同一类品种群之内差异并不是很大,下一步需要增加甜瓜材料的亲本一起做聚类分析,希望能将同一类品种群内类似品种区分开。

本试验的引物覆盖于 12 条染色体,可以保证将大部分遗传基础相似的品种聚为一类,这个结果对于亲本选配具有一定指导作用。但是聚类分析结果没能将果皮颜色等形态学上的差异品种单独成

类,例如第一大类第 1 小类中伊丽莎白、金辉一号、黄醉仙、久红瑞 2 号均为黄皮脆肉类型甜瓜,而同类此类的西蜜 3 号、哈密红、中甜 2 号、西博洛托、蜜世界、古拉巴、明珠一号、雪里红均为白皮脆肉类型甜瓜;其原因可能是选用引物中缺乏对于果皮颜色性状选择引物,或者与果皮颜色性状相关的引物所扩增出的位点数占全部引物位点比例太小,以致无法区分不同果皮颜色的厚薄皮杂交类型甜瓜。

#### 参考文献

- [1] 彭冬秀,李秀秀,吕敬刚. 早熟厚皮甜瓜新品种白元首的选育[J]. 中国瓜菜, 2010, 5: 25-26
- [2] 王美荣,许勇,詹永乐,等. 甜瓜育种亲本材料遗传多样性及群体结构的 SSR 标记分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(5): 41-46
- [3] Jack E S, Yael D, Gennaro F, et al. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers [J]. Euphytica, 2000, 115(3): 225-241
- [4] Fei S L, Isabelle D, Jack E S. Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns [J]. Euphytica, 2008, 164: 445-461
- [5] Ana I L, Jack S, Nurit K, et al. Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation [J]. Euphytica, 2006, 127(1): 41-51
- [6] 刘万勃,宋明,刘富中,等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 231-236
- [7] 黄树苹. 甜瓜种质资源遗传多样性及亲缘关系研究 [D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007: 11-12
- [8] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. PNAS, 1979, 76: 5269-5273
- [9] Rolf F J. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.0 [M]. New York: Exeter Software, 1998
- [10] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 163-173
- [11] Kimura M, Ohta T. Mutation and evolution at the molecular level [J]. Genetics, 1993, 73( Suppl): 19-35
- [12] Pe'rin C, Hagen L, De Conto V, et al. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 1017-1034
- [13] Ritschel P S, de Lima Lins T C, Tristan R L, et al. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2004, 4: 9
- [14] Gonzalo M J, Oliver M, Garcia-Mas J, et al. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 802-811
- [15] 吕敬刚,李秀秀,彭冬秀,等. 网纹甜瓜新品种“碧龙” [J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1069
- [16] 赵娜,周晶,方智远,等. 用雌性系配制的甜瓜新品种“寿研 1 号”及其指纹图谱 [J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1711-1712
- [17] 张跃进,陆鸿英,施泽,等. 甜瓜新品种“夏蜜” [J]. 园艺学报, 2010, 37(7): 1197-1198