

无籽西瓜品种 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析

赵胜杰,朱红菊,路绪强,何楠,刘文革

(中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009)

摘要:利用 SSR 标记构建了 27 份中国无籽西瓜主栽品种的 DNA 指纹图谱并进行了遗传多样性分析。22 对多态性引物共扩增出 58 种基因型,基因型数 2~5 个不等,平均 2.64 个。平均多态性信息量(PIC)为 0.40,变化范围为 0.19~0.66。有 4 个品种具有特征谱带。27 个品种遗传相似系数变化范围为 0.7045~1.0000,平均 0.8683。组合 22 对引物,除无法区分郑抗无籽 1 号与雪峰花皮无籽,其余品种均能一一区分开。采用类平均法进行聚类分析,在相似系数 0.83 处,可将 27 个品种分为 3 大类。研究表明,核心 SSR 标记适用于构建无籽西瓜品种的 DNA 指纹图谱,我国主栽无籽西瓜品种遗传相似度较高,亟需加强种质创新。

关键词:无籽西瓜品种;SSR;指纹图谱;遗传多样性

Construction of DNA Fingerprinting and Analysis of Genetic Diversity with SSR Markers for Seedless Watermelon Major Varieties in China

ZHAO Sheng-jie, ZHU Hong-ju, LU Xu-qiang, HE Nan, LIU Wen-ge

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

Abstract: Simple sequence repeat (SSR) markers were used to construct the DNA fingerprinting database and analyze the genetic diversity of 27 seedless watermelon major varieties in China. 22 polymorphic primer pairs could amplify 58 genotypes, and 2.64 genotypes were detected by each primer pair with the range from 2 to 5. The PIC values ranged from 0.19 to 0.66 with the mean of 0.40. 4 varieties had unique bands. The genetic similarity coefficients of the 27 varieties ranged from 0.7045 to 1.0000 with the mean of 0.8683. Besides Zhengkangwuzi No1 and Xuefenghuapiwuzi, the other varieties could be separated clearly from each other. Furthermore, all the varieties were classified into 3 groups, at the level of genetic similarity coefficient 0.83 according to cluster analysis by UPGMA method. The results indicated that core SSR markers were very suitable for the DNA fingerprinting construction of seedless watermelon varieties. On the other hand, the major seedless watermelon varieties in China had higher genetic similarity and strengthening germplasm innovation would be needed.

Key words: seedless watermelon variety; SSR; fingerprinting; genetic diversity

无籽西瓜食用方便、经济效益高,栽培面积逐年增加。据全国无籽西瓜科研与生产协作组不完全统计,2009 年我国无籽西瓜栽培面积约为 23 万 hm^2 ,遍及 20 多个省(直辖市)^[1]。目前市场上推广的无籽西瓜品种繁多,品种间相似度较高,不乏存在同物

异名、同名异物的现象,给种植户的选择造成了很大困扰。加之栽培西瓜资源遗传基础相对狭窄,使得单纯依靠田间形态性状鉴定品种真实性变得越来越困难。

以分子标记为基础的 DNA 指纹鉴定技术具有

收稿日期:2013-04-15 修回日期:2013-05-15 网络出版日期:2013-10-22

URL:<http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1544.020.html>

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-26-03);“十二五”国家科技支撑项目(2012BAD02B00)

第一作者主要从事西瓜多倍体育种研究。E-mail:zhsj00001@163.com

通信作者:刘文革,主要从事西瓜多倍体育种与生物技术研究。E-mail:lwgmw@163.com

简单快速、准确可靠等优点,逐步发展成为品种纯度和真伪性鉴定的重要技术手段。国际植物新品种权保护联盟(UPOV, international union for the protection of new varieties of plants)已将 SSR 和 SNP 确定为构建植物 DNA 指纹数据库的常用标记方法。其中 SSR 标记因其技术成熟、成本较低,已逐步用于构建马铃薯^[2]、番茄^[3]、甘蓝^[4]、甜瓜^[5]、柑橘^[6]、梨^[7]和香菇^[8]等主要园艺作物的 DNA 指纹图谱。有关西瓜作物 SSR 分子标记分析的报道也很多。张法惺等^[9]采用 SSR 分子标记技术对 96 份不同生态型西瓜种质资源的遗传多样性进行了研究。美国农业部蔬菜研究中心的 A. Levi 等^[10]从 100 条西瓜 EST 序列中合成了 40 个 EST-SSR 引物,用这些引物分析了 25 个地方品种和 13 份西瓜资源 PIs(包括 4 个 *Citrullus colocynthis*, 5 个 *C. lanatus* var. *citroides* 和 4 个 *C. lanatus* var. *lanatus*) DNA 指纹及遗传多样性。研究发现大部分的标记在地方品种和 PIs 资源间存在多态性,但是在地方品种间多态性较低。本研究小组利用新开发的 EST-SSR 对包括野生西瓜在内的

的不同西瓜材料的遗传多样性进行了分析,发现野生种与栽培种遗传亲缘关系较远,栽培种间遗传差异很小^[11],这与 A. Levi 等^[10]的研究结果相符。国家蔬菜研究中心的许勇研究团队在西瓜全基因组测序的基础上,通过大规模标记筛选,发掘出 23 对西瓜核心 SSR 引物,构建了 100 份西瓜材料的 DNA 指纹^[12]。以上研究所用试验材料大多是有籽西瓜,针对三倍体无籽西瓜品种的 DNA 指纹及遗传多样性分析的报道却很少。目前,西瓜 DNA 指纹图谱鉴定技术标准已通过国家审定,借鉴标准中引用的西瓜核心 SSR 引物构建我国无籽西瓜主栽品种的 DNA 指纹图谱,对客观评价我国无籽西瓜品种的遗传多样性以及强化品种知识产权保护具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料来源于国内多个科研院所,共计 27 份,为当前国内主栽无籽西瓜品种(表 1)。

表 1 参试材料编号及名称

Table 1 Varieties and code in the study

编号 Code	品种名 Variety name	来源 Source	编号 Code	品种名 Variety name	来源 Source
1	雪峰花皮无籽	湖南省瓜类研究所	15	津蜜 10 号	天津科润蔬菜研究所
2	雪峰大玉无籽 5 号	湖南省瓜类研究所	16	津蜜 30 号	天津科润蔬菜研究所
3	雪峰蜜黄无籽	湖南省瓜类研究所	17	花蜜	北京市农业技术推广站
4	郑抗无籽 1 号	中国农业科学院郑州果树研究所	18	暑宝	北京市农业技术推广站
5	郑抗无籽 3 号	中国农业科学院郑州果树研究所	19	广西 3 号	广西农业科学院园艺研究所
6	红伟无籽	中国农业科学院郑州果树研究所	20	桂冠 1 号	广西农业科学院园艺研究所
7	莱卡红无籽 2 号	中国农业科学院郑州果树研究所	21	鄂西瓜 12 号	湖北省农业科学院经济作物研究所
8	郑抗无籽 5 号	中国农业科学院郑州果树研究所	22	鄂西瓜 8 号	湖北省农业科学院经济作物研究所
9	绿野无籽	中国农业科学院郑州果树研究所	23	新优 38 号	石河子市蔬菜研究所
10	洞庭 1 号	岳阳市西甜瓜科学研究所	24	新优 39 号	石河子市蔬菜研究所
11	黑童宝无籽	岳阳市西甜瓜科学研究所	25	菊城无籽 6 号	开封市农林科学院西瓜研究所
12	金丽黄无籽	岳阳市西甜瓜科学研究所	26	菊城无籽 3 号	开封市农林科学院西瓜研究所
13	神玉无籽	岳阳市西甜瓜科学研究所	27	小玉无籽	江苏省农业科学院蔬菜研究所
14	津蜜 1 号	天津科润蔬菜研究所			

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 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 °C 人工发芽箱中培养 10 d, CTAB 法^[13]提取新鲜嫩叶的基因组 DNA。

1.2.2 SSR 引物筛选 以 23 对西瓜核心 SSR 引物^[12]和 7 对核心扩展引物,以及本课题组开发的 8 对 EST-SSR 作为候选引物,由上海博彩生物科技有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及电泳 扩增反应体系的总体积

为 10 μL , 含有 1 μL 10 \times PCR buffer、0.8 μL 2.5 mmol/L dNTP、0.1 μL *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL)、10 $\mu\text{mol/L}$ 正反引物各 0.5 μL 和 20 ng 模板 DNA。扩增反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染染色, 照相并记录结果。

1.2.4 数据统计与分析 统计分子量在 100 ~ 320 bp 的条带, 相同迁移位置有带记为 1, 无带记为 0。多态性信息量 (polymorphism information content) *PIC* 值的计算公式: $PIC = 1 - \sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率。先根据扩增结果计算引物的等位位点数及频率, 然后利用软件计算 *PIC*

值。采用 NTSYS-pc V 2.10 软件进行聚类分析, SimQual 程序求 Jaccard 相似系数, SHAN 程序中的 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) 进行聚类分析, 并通过 Treeplot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

从参试的 38 对候选引物中选择稳定性强、具多态性的 22 对引物用于品种 DNA 指纹分析 (表 2)。22 对多态性引物共扩增出 58 种基因型, 基因型数 2 ~ 5 个不等, 平均 2.64 个, 平均多态性信息量 (*PIC*) 为 0.40, 变化范围为 0.19 ~ 0.66。以引物 BVWS00433 最高, 引物 BVWS00048 最低 (表 3)。

表 2 SSR 引物序列

Table 2 Primers of SSR employed and their sequence

编号 Code	正向序列 Forward (5'-3')	反向序列 Reverse (5'-3')
BVWS00297	ACAACCTTTGATTGATTCACGATG	AAGTAAAAGACCCCTTTTCCCAAAC
BVWS00048	TCAAAAAGGTTTGCCCTAAATGAAA	TGCTGATCTCCCATCTTAAACCTC
BVWS00208	GCAAAGATTGTCTATGAAGCAGCA	GCTCATTTGGCTTCTTGAATCTGTT
BVWS01734	AAAATTACATCTTAAATGCGCC	GGAACATTGACTTCAATCAGCA
BVWS00441	TGGTTGAAATCAATAAAAAGTGAA	TGGATGTTTTTGGCATTTGA
BVWS00658	TTAGCCCTAAGCAAGGGTTTTT	AAGTACACATTTTTAAACAATCAATCCA
BVWS00106	TGGCCCTAGAAGATTATTGAGCTGC	CATTATCACATGGCAGATAATGGAAA
BVWS01897	TTCTTGAAACTCAACCCTCAAA	AAAGCGTGTCGAGTGTGAGA
BVWS00433	TCTTTTAAGTTTTGAGGGAGAGC	TTCCCAAGCTAGCCCTTTTCA
BVWI00170	AACGCACGATAGTTAGAAGG	TGACTAATFAAACTTAACTCAGACT
BVWS00369	TGAGAAAATGGAAGATGCAAATGA	TTCTTCTCACTCTCTCCTAAGATTTTTGC
BVWS00209	TGCTTCAAAATCTATTCACAATTTGC	TTCTTGTTTTCGGGTTTTCTTTACA
BVWS00333	TGTTGAGATTCTTTGATTTCAACTGT	TGGGTCAAAGTATTTTTGCTTTTT
BVWS01843	CCCCCGCCAAAATTAATAA	CACCCGTGTAAAGGTGGTAAA
BVWS02048	TCTGTGTGGATGCAAATGGT	GCTAATCGAGCCCAGTTACC
BVWS00228	GGAAGAGTGAGGTGATAAATCAATATGT	AATTGGCCCAAATATCCATATGAC
BVWS02433	ATTTCTGGCCCCACTGTAAG	GAACAACGCAACCACGTATG
BVWS01358	CCCTATTGCCTATTTTTCTCAA	AAATTTGTGCTCTTCGTGGG
BVWS00358	CATTTCCGTTTTCCATTTTCTTCAC	AAGTAACATCAAGCAGTTCGCCAT
BVWS00177	TTCAACCAAGCAGTCTTAAACACAA	GATGCATTAAGATTTTTCGTTTTCGC
GD2	CCATTAGCGGTGAGGTGT	CTCCCGTGGGTTGATTGA
GD21	TCGGATCTAGCGGAAGGT	GCTCAGGAGGGACTTTTACC

表 3 引物扩增基因型数及 PIC 值

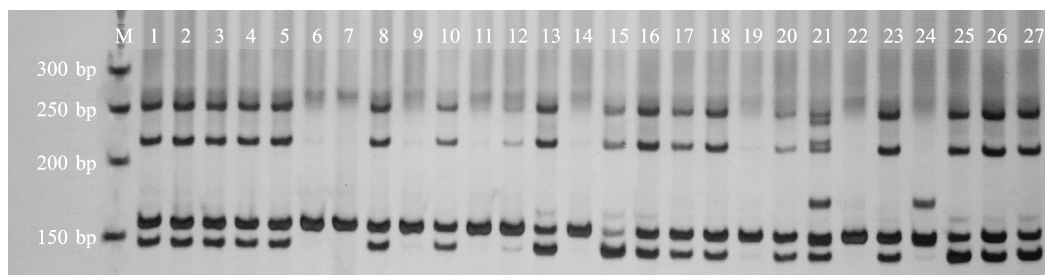
Table 3 The amplified genotype number and PIC value

编号 Code	基因型数 No. of genotypes	PIC 值 PIC value	编号 Code	基因型数 No. of genotypes	PIC 值 PIC value
BVWS00297	2	0.37	BVWS00209	4	0.50
BVWS00048	2	0.19	BVWS00333	3	0.58
BVWS00208	2	0.37	BVWS01843	3	0.40
BVWS01734	2	0.31	BVWS02048	2	0.26
BVWS00441	2	0.36	BVWS00228	2	0.37
BVWS00658	3	0.48	BVWS02433	4	0.54
BVWS00106	2	0.36	BVWS01358	2	0.26
BVWS01897	2	0.37	BVWS00358	3	0.42
BVWS00433	5	0.66	BVWS00177	2	0.31
BVWI00170	2	0.36	GD2	3	0.50
BVWS00369	2	0.36	GD21	4	0.44

2.2 品种指纹图谱分析

4 个品种具有特征谱带,分别为神玉无籽、鄂西瓜 12 号、新优 39 号和菊城无籽 6 号,这 4 个品种仅用 1 个特征引物即可与其他品种区分开,神玉无籽和菊城无籽 6 号分别有 2 个特征引物,即

BVWS00048、BVWS00358 和 BVWS00433、BVWS00209。GD21 能在鄂西瓜 12 号和新优 39 号 2 个品种上表现出特征谱带,鉴别力较强,进行品种指纹鉴定时可优先采用。GD21 扩增结果如图 1。



1~27 为样品编号

1-27; Sample number

图 1 引物 GD21 对 27 个品种的扩增结果

Fig. 1 The amplified bands of GD21 in the 27 varieties

2.3 遗传多样性分析

利用 NTSYS-pc V 2.10 软件进行遗传相似性分析,结果表明,27 个主栽品种间遗传相似系数变化范围为 0.7045(新优 39 号与雪峰大玉无籽 5 号)~1.0000(雪峰花皮无籽与郑抗无籽 1 号),平均为 0.8683,表明新优 39 号与雪峰大玉无籽 5 号遗传差异最大,郑抗无籽 1 号与雪峰花皮无籽血缘关系高度相似。组合 22 对引物,除无法区分郑抗无籽 1 号与雪峰花皮无籽,其余品种均能够一一区分开。

聚类分析结果表明(图 2),在相似系数 0.83 处,参试品种能够分为 3 大类,其中 A 类包括 17 个品种, B 类包括 9 个品种, C 类有 1 个品种。A 类可以分为 A1、A2 亚类。A1 亚类包括 9 个品种,分别是雪峰花皮无籽、雪峰蜜黄无籽、郑抗无籽 1 号、莱卡红无籽 2 号、津蜜 1 号、津蜜 30 号、广西 3 号、鄂西瓜 8 号和新

优 38 号, A2 亚类包括 8 个品种,分别是雪峰大玉无籽 5 号、郑抗无籽 5 号、绿野无籽、洞庭 1 号、黑童宝无籽、津蜜 10 号、桂冠 1 号和小玉无籽。

3 讨论

SSR 标记具有共显性、数量丰富、多态性高等优势,国际植物新品种权保护联盟已将 SSR 确定为构建植物 DNA 指纹数据库的常用标记方法。品种 DNA 指纹图谱分析,主要有 3 种方法,即特征谱带法、引物组合法与核心引物组合法^[14]。核心引物组合是指通过大量引物筛选,从中选取多态性丰富、鉴别力强、重复性好的少数引物形成组合,通过不同引物的有限组合,可以大大提高引物的鉴别能力。西瓜全基因组测序已经完成,通过测序发掘出大量 SSR 位点,从中筛选出了 23 对核心 SSR,对构建西

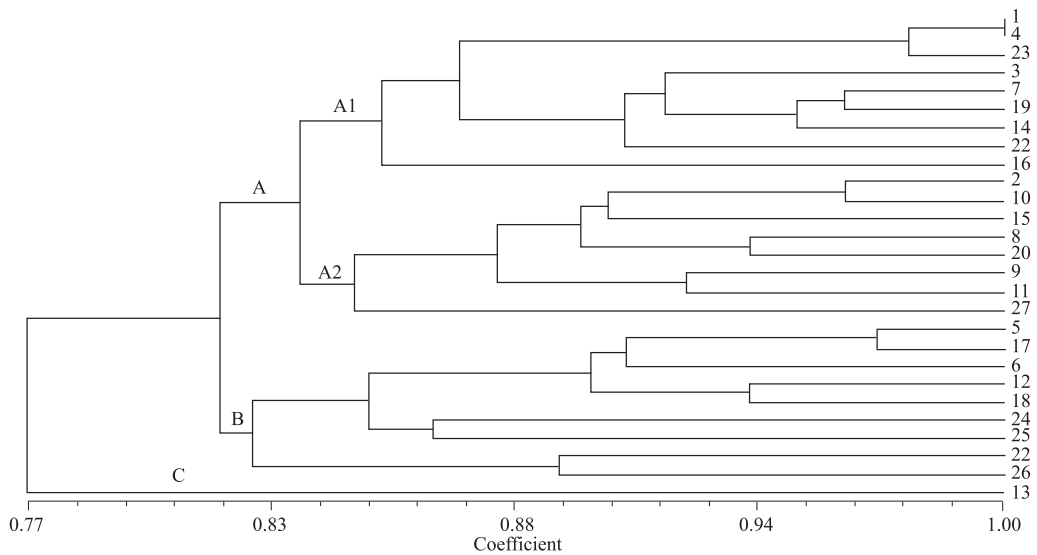


图 2 27 个品种的聚类图

Fig. 2 The cluster analysis dendrogram for 27 varieties

瓜品种 DNA 指纹图谱具有重要的参考利用价值。本课题组首次尝试将这 23 对核心引物用于本单位无籽西瓜品种指纹图谱的构建,发现其中多态性较高的 8 对引物可把参试的 15 个品种区分开,核心引物显示了较高的多态性和鉴别力^[15]。为进一步检测这些核心引物的多态性和鉴别力,客观评价我国当前主栽无籽西瓜品种的遗传多样性,课题组在全国范围内征集了 27 个无籽西瓜品种进行研究,这些品种大多通过国家或省审定,为当前国内主栽品种。研究表明,利用核心 SSR 引物鉴别西瓜品种真实性、构建品种 DNA 指纹图谱是可行的。另外,为增加引物组合的鉴别力,减少引物组合数量,节约成本,可在已有核心引物的基础上,继续筛选其他多态性较高的 SSR 标记,共同用于品种鉴定和指纹图谱构建。

前人的研究表明,我国栽培西瓜资源遗传基础狭窄,亲缘关系相对较近^[16-17]。加之育种上单一多次重复利用几个骨干亲本,使其长期处于人工选择的压力下,进一步造成西瓜栽培种间亲缘关系趋近,不同品系间的遗传多态性降低。本研究征集了 27 份来源于国内多个育种单位的无籽西瓜品种,SSR 分子标记分析发现参试品种遗传相似系数最小为 0.7045,最大为 1.0000,平均相似系数 0.8683,说明参试品种存在较高的遗传相似性。我国主栽无籽西瓜品种遗传多样性较低,推测是少数几个骨干四倍体亲本被重复使用造成的,不排除存在同物异名的现象。因此,在今后的育种工作中应加强西瓜四倍体等种质创新力度,同时强化品种知识产权保护,以保障我国无籽西瓜产业健康发展。

参考文献

- [1] 刘文革. 我国无籽西瓜产业发展状况与对策[J]. 长江蔬菜: 学术版, 2010(8): 121-127
- [2] 段艳凤, 刘杰, 卞春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457
- [3] Bredemeijer G M M, Cook R J, Ganai M W, et al. Construction and testing of microsatellite database containing more than 500 tomato varieties[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 1019-1026
- [4] 陈琛, 张兴桃, 程斐, 等. 秋甘蓝品种的 SSR 指纹图谱的构建[J]. 园艺学报, 2011, 38(1): 159-164
- [5] 王美荣, 许勇, 詹永乐, 等. 厚皮甜瓜品种组合 SSR 指纹图谱构建[J]. 中国农学通报, 2010, 26(20): 47-51
- [6] 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
- [7] 高源, 田路明, 刘凤之, 等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446
- [8] 叶翔, 黄晨阳, 陈强, 等. 中国主栽香菇品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 1067-1072
- [9] 张法惶, 栾非时, 盛云燕. 不同生态类型西瓜种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 中国蔬菜, 2010(14): 36-43
- [10] Levi A, Wechter P, Davis A. EST-PCR markers representing watermelon fruit genes are polymorphic among watermelon heirloom cultivars sharing a narrow genetic base[J]. Plant Genet Res, 2008, 7(1): 16-32
- [11] 赵胜杰, 刘文革, 阎志红, 等. 西瓜种质资源遗传差异的 SRAP 和 EST-SSR 分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 76-79
- [12] 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(2): 329-342
- [13] Murray H G, Thomson W F. Rapid isolation of higher weight DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4325
- [14] 王风格, 赵久然, 郭景伦, 等. 比较三种 DNA 指纹分析方法在玉米品种纯度及真伪鉴定中的应用[J]. 分子植物育种, 2003, 1(5): 655-661
- [15] 赵胜杰, 关立颖, 阎志红, 等. 郑抗系列无籽西瓜品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 中国瓜菜, 2012, 25(4): 1-4
- [16] 郭军, 许勇, 寿森严, 等. 西瓜种质资源遗传亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2002, 3(1): 7-13
- [17] 段会军, 马峙英, 张彩英, 等. 西瓜品种间亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(1): 27-30