



籽用西瓜种质资源 SSR 分析及初级核心种质库构建

石磊, 王萍*, 杨静, 王丰丰, 孙晓华

(内蒙古农业大学农学院, 内蒙古野生蔬菜种质资源与创新重点实验室, 呼和浩特 010019)

摘要: 采用 SSR 分子标记技术对 50 份不同来源的籽用西瓜材料进行遗传多样性研究, 并基于 SSR 分子标记聚类分析采用最小距离逐步抽样法构建籽瓜初级核心种质库。研究表明: (1) 从 106 对 SSR 随机引物中筛选出扩增条带清晰、多态性高的 31 对引物, 共得到 138 条清晰可辨条带, 其中多态性条带 115 条, 占 83.33%, 平均 Shannon's 信息指数(I)为 0.419 3, 平均 Nei's 多样性指数(h)为 0.272 4, 平均有效等位基因数(N_e)为 1.458 0, 平均等位基因数(N_a)为 1.981 4, 说明 50 份籽瓜种质具有丰富的遗传多样性。(2) 用 NTsys2.10e 软件对种质资源聚类分析表明, 种质间的遗传相似系数介于 0.57~0.91 之间, 其中来源地相同的个别种质间遗传相似系数却很小, 而来源地不同的个别种质间的遗传相似系数却很高。(3) 采用最小距离逐步抽样法, 按 70%、60%、50%、40%、30%、20%、10% 的比例抽样后, 各个核心子集遗传多样性指数总体上变化不明显, 但各抽样比例相比, 以抽样比例 20% 获得 10 份初选种质的 N_e 、 h 和 I 达到最高值, 说明抽样 20% 构建的初级核心种质对原始种质具有很好的代表性。

关键词: 籽用西瓜; SSR 分子标记; 种质资源; 遗传多样性; 核心种质

中图分类号: Q346⁺.5; Q789; S651

文献标志码: A

Genetic Diversity Analysis and Construction of Seed Watermelon Core Germplasm Resources by SSR

SHI Lei, WANG Ping*, YANG Jing, WANG Fengfeng, SUN Xiaohua

(College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Wild Peculiar Vegetable Germplasm Resource and Enhancement, Hohhot 010019, China)

Abstract: The genetic diversity of 50 seed watermelon germplasm from different places were analyzed by SSR molecular marker and the primary core collection was constructed by Least Distance Step-wise Sampling(LDSS). The results showed that: (1) 31 pairs of primers which showed high polymorphism were selected from 106 SSR primers, showed 115 polymorphic bands in 138 bands owning 83.33% polymorphic loci, the average of Shannon information index(I), Nei's genetic diversity(h), effective number of alleles (N_e) and number of alleles(N_a) by POPGENE32 analysis was 0.419 3, 0.272 4, 1.458 0 and 1.981 4, respectively, which indicated high genetic diversity in 50 seed watermelon accessions. (2) The clustering result showed that genetic similarity coefficient ranged 0.57–0.91. Some germplasms distributed in different origins and far geographic distance showed high genetic similarity coefficient in 50 accessions. (3) The germplasm were sampled by the method of LDSS and ratio at 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% and

收稿日期: 2016-03-16; 修改稿收到日期: 2016-05-09

基金项目: 内蒙古自然科学基金(2016MS0356); 内蒙古科技计划(20090707, 2010704, 20110711, 20120212); 内蒙古高寒地区高产安全蔬菜生产的研究与创新(NDPYTD2013-3)

作者简介: 石磊(1989–), 男, 在读硕士研究生, 主要从事蔬菜种质资源与种质创新研究。E-mail: 1010969973@qq.com

* 通信作者: 王萍, 副教授, 硕士生导师, 主要从事蔬菜种质资源与种质创新研究。E-mail: wangping@imau.edu.cn

10%，and the genetic diversity parameters of each core subset was compared. The results showed that the change of genetic diversity parameters of each core subset was not clear with the samples reduced in six samplings. But the percentage of polymorphic loci, N_e , h and I of 10 primary accessions were obtained by sampling proportion 20%. It showed that the primary core collection from 20% sampling could well represent the genetic diversities of the whole collection.

Key words: seed watermelon; SSR molecular marker; germplasm resources; genetic diversity; core collection

籽用西瓜 (*Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* var. *megalaspermus* Lin et Chao) 简称籽瓜, 属于葫芦科普通西瓜亚种中的籽瓜变种, 俗称“打瓜”、“瓜籽瓜”, 主要以种子为食用器官, 常根据种子颜色分为黑籽瓜和红籽瓜两大品种^[1]。籽瓜的瓜瓢和瓜皮具有多种微量矿质元素和果胶, 长期食用能够调节人体新陈代谢, 祛除胃寒, 溶蚀软化血管, 增强免疫力, 排除体内沉积毒素, 净化小环境。近年来, 随着栽培面积的不断扩大, 复种指数增加, 籽瓜的一些病害日趋严重, 加之长期采用不规范的常规繁殖留种, 造成各地栽培品种良莠不齐、混杂退化, 致使品质下降、产量不稳, 籽瓜产业的发展受到严重制约。因此, 开展籽瓜种质资源遗传多样性研究, 并建立核心种质库, 对于籽用西瓜育种及种质资源的保存利用具有重要意义。

植物遗传多样性资源是生物遗传的基础。近年来随着遗传资源的急剧减少, 种质资源的保存利用成为急需解决的问题。Frankel^[2-3] 和 Brown^[4] 研究提出核心种质的概念, 即以最小的资源份数最大限度地代表该物种的遗传多样性, 在一定程度上解决了这一问题。近年来国内外关于核心种质的研究较多, 但多是基于农艺表型性状, 表型性状易受环境因素的影响。因此, 只按照表型性状构建核心种质方法是片面的。分子标记辅助育种的研发表明, 其能够在短期内获得大量的遗传信息, 且能稳定、高效地反映种质资源群体中个体间的亲缘关系。近年来, 温景辉^[5]、张维瑞等^[6]、刘娟等^[7]、白成科等^[8] 采用分子标记技术分别研究山葡萄、桂花、野杏、山茱萸等植物种质遗传多样性并构建核心种质都得到了准确的结果。

赵虎基等^[9] 用 RAPD 标记对籽用西瓜的 8 个品种(系)和西瓜种内其它变种的 4 个品种(系)进行了遗传多样性分析。张建农^[10] 用 RAPD 标记对 4 个籽用西瓜、2 个野生西瓜和不同生态类型瓢用西瓜等 34 个品种(系)进行遗传多样性分析。柳唐镜等^[11] 用 RAPD 标记对不同的红籽瓜种质资源亲缘关系进行分析。与前人相比, 本研究运用 SSR 分子

标记技术对 19 个不同来源地的 50 份籽(西)瓜种质材料进行遗传多样性分析, 并基于聚类分析结果采用最小遗传距离逐步抽样法(LDSS)构建籽瓜的初级核心种质库, 能够较为全面地为中国籽瓜种质资源的评价提供参考, 为今后进一步构建籽瓜核心种质奠定基础, 也为籽瓜种质资源的保护利用及育种工作提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所收集的 50 份籽(西)瓜材料来自个 19 省区, 甘肃 13 份, 内蒙古 5 份, 新疆、湖南、美国各 4 份, 宁夏、广东各 3 份, 陕西、前苏联各 2 份, 剩余的 10 份分别来自 10 个省区。其中含野生型种质 2 份, 普通西瓜 2 份。所有材料已经过多代的自交纯化。供试 50 份籽(西)瓜材料(表 1)种植于内蒙古农业大学试验田。参考钱韦等^[12] 的取样方法, 于 2014 年 8 月采集了生长旺盛期的籽瓜幼嫩叶片, 将不同材料叶片放入有标记的塑封袋中, 立即暂时存入冰盒, 带回实验室置于 -80℃ 冰箱中冷冻备用。

1.2 PCR 反应

采用 DNA 提取试剂盒(天根生化有限公司)提取 50 份材料的基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 纯度和浓度, -20℃ 保存备用。选用 106 对随机引物以提取的籽瓜基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 筛选出电泳条带清晰、多态性高、重复性好的 31 对引物(表 2), 分别对 50 份样品基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL^[13], 模板 DNA 2 μL(约 50 ng/μL), 引物 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.8 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 10×Taq Buffer 2 μL, Taq DNA Polymerase 0.1 μL(5 U/μL), ddH₂O 11.1 μL。PCR 扩增程序反应在 BYQ6031 E-505 型 PCR 仪上进行, 程序为: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72℃ 伸 5 min, 4℃ 保存以备电泳, 扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶于 80 V 电压下预电泳 30 min,

表 1 供试籽瓜材料及来源

Table 1 Accessions of seed watermelon and source of germplasm

编号 Code	材料 Accession	类型 Type	来源 Source of germplasm	引种地 Introduction place
1	黑丰 Heifeng	黑籽瓜 Black seed watermelon	内蒙古 Inner Mongolia	内蒙古 Inner Mongolia
2	黑大片-1Heidapian-1	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	甘肃 Gansu
3	哈尔科夫 Haerkefu	普通西瓜 watermelon	前苏联 Former Soviet Union	A
4	陕西红籽 Shanxihongzi	红籽瓜 Red seed watermelon	陕西 Shaanxi	B
5	黑崩筋 Heibengjin	普通西瓜 Watermelon	北京 Beijing	B
6	黑大片-2 Heidapian-2	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃兰州 Lanzhou Gansu	B
7	赤峰打瓜 Chifengdagua	黑籽瓜 Black seed watermelon	内蒙古 Inner Mongolia	内蒙古 Inner Mongolia
8	ZXG1110	红籽瓜 Red seed watermelon	美国 America	B
9	内蒙黑中片 Neimenghei zhongpian	黑籽瓜 Black seed watermelon	内蒙古 Inner Mongolia	内蒙古 Inner Mongolia
10	新疆红(长)Xinjianghon(chang)	红籽瓜 Red seed watermelon	新疆 Xinjiang	新疆 Xinjiang
11	大板红籽瓜(放射网)Dabanhongz- igua (fangshewang)	红籽瓜 Red seed watermelon	甘肃兰州 Lanzhou Gansu	B
12	红中片 Hongzhongpian	红籽瓜 Red seed watermelon	甘肃 Ganshu	甘肃 Ganshu
13	红瓜子 Hongguazi	红籽瓜 Red seed watermelon	宁夏 Xingxia	B
14	明光黑小片 Mingguangheixiaopian	黑籽瓜 Black seed watermelon	安徽 Anhui	安徽 Anhui
15	大板红籽瓜(绿网)Dabanhongzigua (lvwang)	红籽瓜 Red seed watermelon	甘肃兰州 Lanzhou Gansu	B
16	信都红瓜子 Xindouhongguazi	红籽瓜 Red seed watermelon	广西贺州 Guangxihezhou	广西贺州 Guangxihezhou
17	花皮打瓜 Huapidagua	黑籽瓜 Black seed watermelon	山东 Shandong	A
18	甘肃大板 1 号 Gansudaban No. 1	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	B
19	瓜子瓜(红仁)Hongzigua(hongren)	红籽瓜 Red seed watermelon	广东 Guangdong	A
20	ZXG1263(1)	白籽瓜 White seed watermelon	美国 America	B
21	ZXG1153	红籽瓜 Red seed watermelon	美国 America	B
22	中片红籽瓜 Zhongpianhong zigua	红籽瓜 Red seed watermelon	黑龙江泰来 Heilongjiangtailai	黑龙江泰来 Heilongjiangtailai
23	通辽一窝蜂 Tongliaoyiwofeng	黑籽瓜 Black seed watermelon	内蒙古 Inner Mongolia	内蒙古 Inner Mongolia
24	廊坊籽瓜 Langfangzigua	黑籽瓜 Black seed watermelon	河北廊坊 Heibeilangfang	B
25	郑州籽瓜 Zhenzhouzigua	黑籽瓜 Black seed watermelon	河南郑州 He’nanzhenzhou	B
26	大板瓜子 Dabanguazi	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	B
27	红瓜子 Hongzigua	红籽瓜 Red seed watermelon	宁夏 Xingxia	A
28	新疆黑小片 Xinjiang heixiaopian	黑籽瓜 Black seed watermelon	新疆 Xinjiang	新疆 Xinjiang
29	野籽瓜 Yezigua	野生籽瓜 Wild seed watermelon	广东 Guangdong	广东 Guangdong
30	磴口籽瓜 Dengkouzigua	黑籽瓜 Black seed watermelon	内蒙古 Inner Mongolia	B
31	核桃皮籽瓜 Hetaopizigua	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	B
32	建阳月子籽瓜 Jianyangyuezi zigua	黑籽瓜 Black seed watermelon	福建福州 Fuzhou Fujiang	A
33	PI542120	野生籽瓜 Wild seed watermelon	美国 America	美国 America
34	GN-1	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	A
35	道县红籽瓜(黄肉)Daoxianhongzigua (huangrou)	红籽瓜 Red seed watermelon	湖南 Hunan	B
36	点心(83) Dianxin(83)	黑籽瓜 Black seed watermelon	乌克兰 Ukraine	A
37	瓜子瓜(黑仁)Guazigua(heiren)	黑籽瓜 Black seed watermelon	广东 Guangdong	A

Table 1 Continued				
编号 Code	材料 Accession	类型 Type	来源 Source of germplasm	引种地 Introduction place
38	大板 2 号瓜子 Daban No. 2guazi	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	A
39	兰州大板 1 号 Lanzhoudaban No. 1	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	B
40	红籽瓜 Hongzigua	红籽瓜 Red seed watermelon	前苏联 Former Soviet Union	B
41	道县红籽瓜(白肉) Daoxianhongzigua (bairou)	红籽瓜 Red seed watermelon	湖南 Hunan	B
42	江西信丰红瓜子 Jiangxixinfeng hong-guazi	红籽瓜 Red seed watermelon	江西 Jiangxi	江西 Jiangxi
43	花皮籽瓜 Huapizigua	黑籽瓜 Black seed watermelon	陕西 Shaanxi	B
44	宁夏红籽瓜 Ningxiahongzigua	红籽瓜 Red seed watermelon	宁夏 Ningxia	B
45	道县红籽瓜(红肉) Daoxianhongzigua (hongrou)	红籽瓜 Red seed watermelon	湖南 Hunan	B
46	靖远大板 1 号 JingyuandabanNo. 1	黑籽瓜 Black seed watermelon	甘肃 Gansu	B
47	兰州大板 Lanzhoudaban	黑籽瓜 Black seed watermelon	兰州 Lanzhou	A
48	道县红籽瓜(粉红肉) Daoxianhongzigua (fenghongrou)	红籽瓜 Red seed watermelon	湖南 Hunan	B
49	新籽瓜 1 号 Xinzigua No. 1	黑籽瓜 Black seed watermelon	新疆 Xinjiang	新疆 Xinjiang
50	新疆红籽瓜 Xinjianghongzigua	红籽瓜 Red seed watermelon	新疆 Xinjiang	新疆 Xinjiang

注: A. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所; B. 国家西甜瓜种质资源平台(河南, 郑州)。
None: A. Vegetable and Flower Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences; B. The platform of watermelon and muskmelon germplasm resources (Henan, Zhengzhou)

后在 70 W 恒定电压下电泳 90 min 左右, 银染后拍照记录。

1.3 数据分析

利用 0、1 矩阵统计方式构建 SSR 数据库。采用 POPGENE32 软件分析扩增产物的多态位点数、多态位点比率、Shannon’s 信息指数等遗传多样性指数。采用 NTsys2. 10e^[14] 聚类分析软件 UPGMA 法进行聚类分析, 构建聚类图。

1.4 初级核心种质库构建及其评价

用 NTsys2. 10e 软件对种质资源聚类分析后, 采用最小距离逐步抽样法 (LDSS) 构建核心种质^[15]。具体方法为: 通过观察 50 份种质的 UPGMA 聚类图, 将遗传相似系数较大的种质组合随机删除 1 份, 再将剩余的种质再次聚类分析; 再次删除遗传相似系数较大的成对种质中的 1 份种质。以此类推, 直到筛选出能够达到要求的核心种质。第 1 次抽样时, 选出一定份数种质, 运用 NTsys2. 10e 软件对其进行聚类分析; 第 2 次抽样在第 1 次抽样聚类分析的基础上进行, 以此类推。每次抽样后, 均采用 POPGENE32 软件分别对构建的核心种质的 SSR-PCR 扩增数据进行核心种质的遗传多样性分析, 进而评价初级核心种质的代表性。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的多态性分析

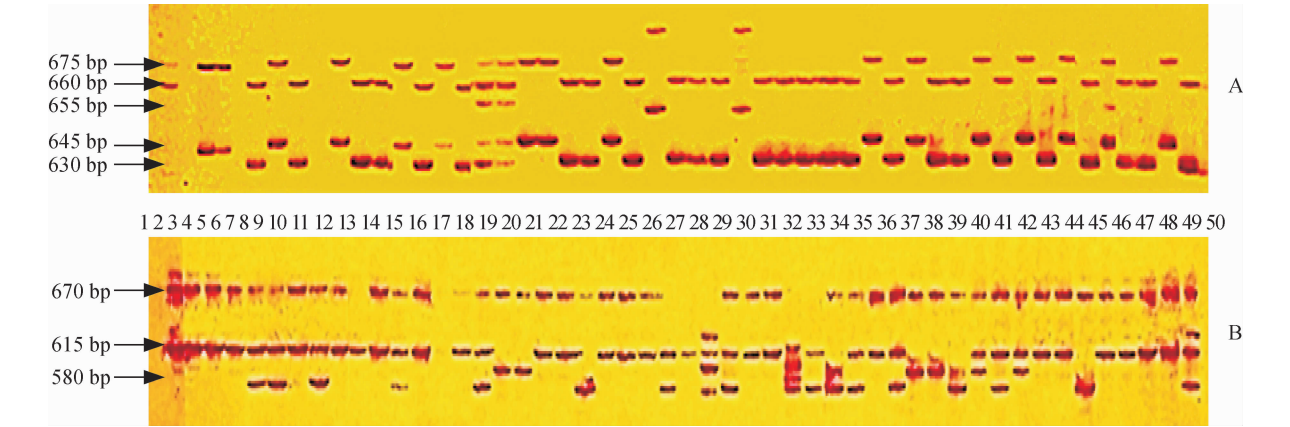
从 106 对 SSR 引物中共筛选出 31 对多态性好、条带清晰的引物, 分别对 50 份材料进行 PCR 扩增, 图 1 为引物 P1、P43 对 50 份籽瓜材料进行 PCR 扩增的电泳图。由图 1 可以看出每个样品体系中均得到了清晰、丰富的条带, 可进行下一步的多样性分析。31 对引物(表 2)对 50 份材料共扩增出 138 条条带。有 115 条重复性好、清晰的多态性条带, 多态性条带比率高达 83. 33%。表明本研究所收集的籽瓜种质资源在分子水平上具有丰富多态性, 种质具有很好的代表性。

2.2 籽瓜种质资源遗传多样性分析

遗传多样性分析结果(表 3)显示, 50 个材料的扩增条带平均 Shannon’s 信息指数为 0. 419 3, 平均 Nei’s 多样指数为 0. 272 4, 平均有效等位基因数为 1. 458 0, 这 50 份种质资源在分子水平上具有丰富的遗传多样性, 具有很高的代表性。

2.3 SSR 聚类分析

31 对随机引物对 50 份籽(西)瓜种质进行 SSR 扩增, 得到 115 条多态性条带, 通过 NTsys 软件处理,



1~50. 编号同表 1

图 1 引物 P1(A)和 P43(B)对 50 份籽瓜材料的 PCR 扩增图谱

1~50. Same as Table 1

Fig. 1 PCR products from primer P1(A)and P43(B) with 50 seed watermelon accessions

表 2 供试 SSR 引物及其 PCR 扩增的多态性			Table 2 SSR primers and polymorphism of PCR amplification		
引物 Primer		序列 Sequence	总带数 No. of bands	多态性条带 Polymorphi bands	多态性比率 Percentage of polymorphic band/%
P1	F	TCTGTGTGGATGCAAATGGT	6	5	83.33
	R	GCTAATCGAGCCCAGTTACG			
P2	F	TCAAAAGGTTTGCCCTAAATGAAA	5	2	40.00
	R	TGCTGATCTCCCATCTTAACCTC			
P4	F	GCAAAGATTGTCTATGAAGCAGCA	4	4	100.00
	R	GCTCATTGGCTTCTTGAATCTGTT			
P5	F	TGCTTCAAAATCTATTACAAATTTGC	5	3	60.00
	R	TTCTTGGTTTCGGGTTTCTTTACA			
P6	F	AAACCATGATTTTACAGGGGATCA	3	3	100.00
	R	TTTCTGTCTTCTTTTGACCAATGC			
P10	F	TGGTTGAAATCAATAAAAAAGTGAA	4	4	100.00
	R	TGGATGTTTTTGGCATTTGA			
P11	F	TTAGCCTAAGCAAGGGTTTTT	3	2	66.67
	R	AAGTACACATTTTAAACAATCAATCCA			
P12	F	TCAAACCGACTGCCATATCA	3	2	66.67
	R	AGCTTGCTTCTCCTGGCCTTT			
P13	F	AAAATTACATCTTAAATGCGCC	4	4	100.00
	R	GGAACATTGACTTCAATCAGCA			
P14	F	TTCTTGAAACTCAACCTCAAA	5	3	60.00
	R	AAAGCGTGTCGAGTGTGAGA			
P15	F	TGGATCATTTGACAGATTTAGCGA	4	4	100.00
	R	CATCACAGTTAACGATCACAAAGGC			
P19	F	TGTTGAGATTCTTTGATTTCAACTGT	6	5	83.33
	R	TGGGTCAAAGTATTTTGTCTTTT			
P20	F	ATGGTTCATTTTCACGTTTCG	6	5	83.33
	R	AAAAATCAAGCAAAGAACAACAT			
P21	F	TTCCACACCAAGGAGGTAGG	4	4	100.00
	R	CATGTCATTCGATAAAGCAGAAA			

Table 2 Continued

引物 Primer		序列 Sequence	总带数 No. of bands	多态性条带 Polymorphi bands	多态性比率 Percentage of polymorphic band/%
P24	F	ATTTCTGGCCCCAGTGTAAG	6	6	100.00
	R	GAACAACGCAACCACGTATG			
P25	F	CCCTATTGCCTATTTTTTCTCAA	6	5	83.33
	R	AAATTTGTGCTCTTCGTGGG			
P29	F	AGCAAATGCATGGGGAAAC	3	3	100.00
	R	TGTTGAATGGAGGCTTTGAG			
P30	F	ATTTCTGGCCCCAGTGTAAG	5	5	100.00
	R	GAACAACGCAACCACGTATG			
P32	F	TCAATTCCAATCATCCATCC	3	3	100.00
	R	TAATGGCCGGACTTTATGC			
P34	F	GAGCAGGGGAGAAGGAAAAC	6	6	100.00
	R	CCAGTAGCTTTTTCCGATGC			
P36	F	TGCTCAATCCACCTTCTC	6	5	83.33
	R	AAAAACAGCAACTCTCCATC			
P43	F	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG	4	4	100.00
	R	GGGAGCCCATATTTTAACC			
P47	F	GCTTTGAAGTTTGTTTAATTTTAGTCC	3	2	66.67
	R	CGCCTCACGCTCTCTAAC			
P52	F	AATCTTCCCCATGCCAAAAC	4	3	75.00
	R	GACTTCCAAACCCTCCCTTC			
P54	F	AAAAATTGAAAATTAGGTGAGGAG	3	2	66.67
	R	TTTTGACTAGGTGTACACTACCTTTG			
P57	F	CAAACAAAACTTAGGAACTAGATTG	4	3	75.00
	R	TTAGCCATGAGGCGTGTACC			
P75	F	AGATGCCCCATTCAAGTTTG	6	6	100.00
	R	TTGAAGGAGAGAGGGAATGG			
P81	F	AGACAGGGAAATCGCAGAGA	2	2	100.00
	R	GGTTAAAGGACGTCGGGATT			
P83	F	TTGGGATGTAGATGTCCGGT	5	5	100.00
	R	TCCCCAATCCAATCCCTAT			
P94	F	ATATGTGTGTCGTGTTCCGC	6	5	83.33
	R	CAGATTTCGAGAGGGAAAA			

表 3 最小距离逐步抽样法构建籽瓜核心种质的遗传多样性								
Table 3 Genetic diversity index of core collection of seed watermelon by LDSS								
抽样 Sample	抽样数 Sample number	等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因 数 Effective number of alleles	Nei's 多样指数 Nei's gene diversity	Shannon's 信息指数 Shannon's information index	多态性位点 Number of polymorphic loci	多态位点率 Percentage of polymorphic loci/%	
抽样前 Before sampling	50	1.9814±0.1438	1.4580±0.3571	0.2724±0.1737	0.4193±0.2237	138	100	
抽样 1 sampling 1	35	1.9783±0.1464	1.4653±0.3468	0.2785±0.1685	0.4282±0.2175	135	97.83	
抽样 2 sampling 2	30	1.9783±0.1464	1.4664±0.3428	0.2801±0.1656	0.4314±0.2125	135	97.83	
抽样 3 sampling 3	25	1.9783±0.1464	1.4725±0.3387	0.2843±0.1627	0.4374±0.2085	135	97.83	
抽样 4 sampling 4	20	1.9783±0.1464	1.4778±0.3270	0.2894±0.1568	0.4453±0.2002	135	97.83	
抽样 5 sampling 5	15	1.9710±0.1684	1.4840±0.3227	0.2934±0.1539	0.4510±0.1960	134	97.10	
抽样 6 sampling 6	10	1.9493±0.2202	1.4849±0.3104	0.2966±0.1471	0.4558±0.1895	131	94.93	
抽样 7 sampling 7	5	1.8623±0.3458	1.4831±0.3238	0.2915±0.1611	0.4424±0.2192	119	86.23	

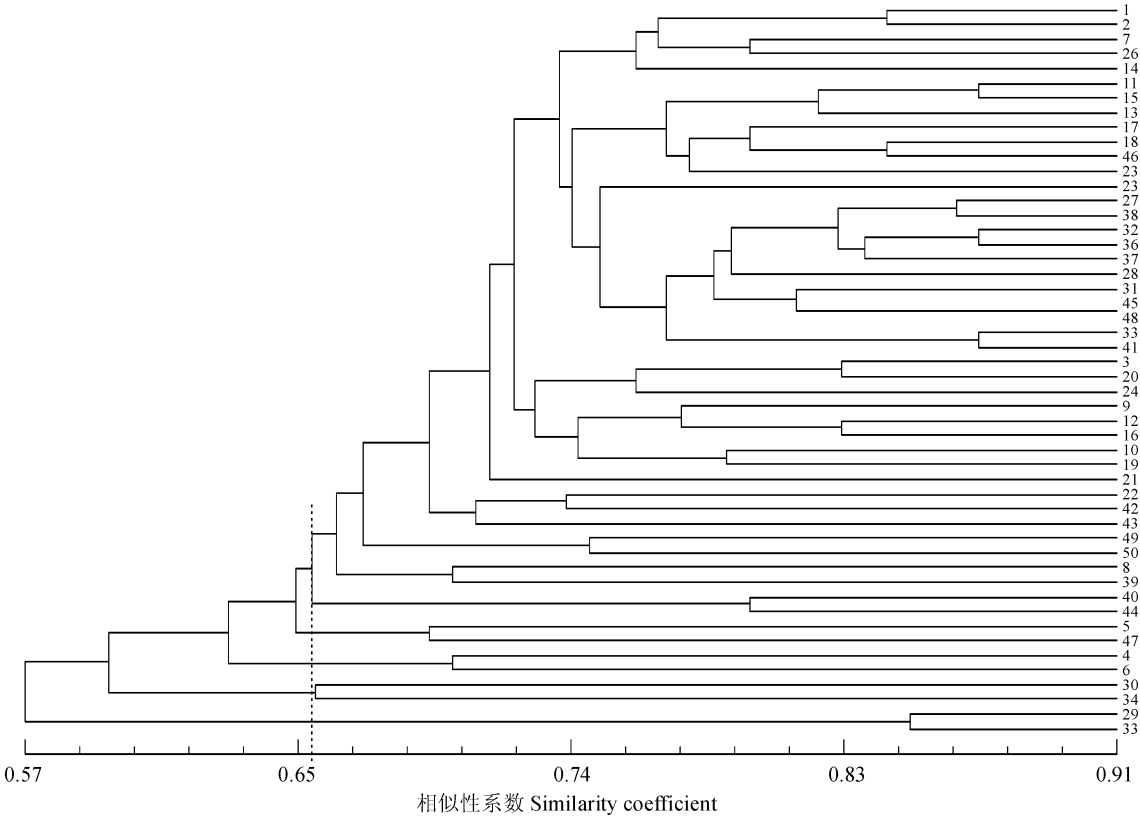


图 2 50 份籽瓜种质资源的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 50 edible seed watermelon germplasms

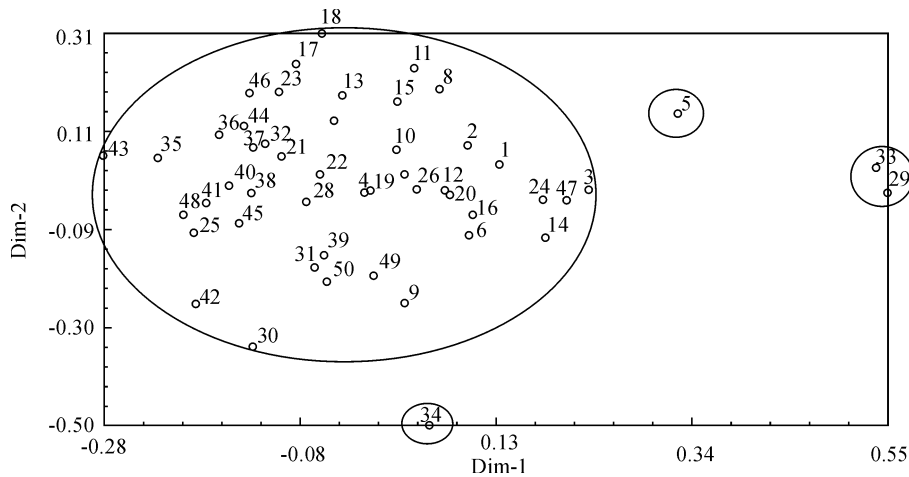


图 3 主成分散点图

Fig. 3 The principal component scatterplot

在获得的相似系数矩阵中,相似系数范围为0.57~0.91,其中种质29和33之间的相似系数最小,表明两者的亲缘关系最远,而亲缘关系最近的1组种质是32和36,相似系数都为0.87。从基于SSR标记的聚类树状图中可知(图2),在相似系数为0.657处,50份籽(西)瓜种质可分为6组。第一组:2份野

生种质,29(野籽瓜)和33(PI542120);第二组:30(磴口籽瓜)和34(GN-1);第三组:4(陕西红籽)和6(黑大片-2);第四组:5(黑崩筋)和47(兰州大板);第五组:40[红籽瓜(苏联)]和44(宁夏红籽瓜);第六组:剩余的40份种质资源,相似系数范围为0.661~0.910。

2.4 基于 SSR 标记的主成分分析

对基于 SSR 标记的数据进行主成分分析,结果显示:第一主成分的方差贡献率为 9.13%,第二主成分的方差贡献率为 7.42%,第三主成分的方差贡献率为 5.74%,累计方差贡献率为 22.84%。根据每份籽瓜种质的主成分之值,绘制第一、二主成分散点图(图 3)。

从图 3 可知,50 份籽(西)瓜种质被分成 4 组,29(野籽瓜)和 33(PI542120)单独划分出来分成一组,5(黑崩筋)独自可分一组,表明这 3 份种质与其它份种质遗传距离较远。而其余份种质相对紧密的聚合在一起,表明它们之间的亲缘关系非常近。虽然主成分分析和聚类分析对 50 份籽(西)瓜种质的分类结果基本一致,都能将野生西瓜种质、普通西瓜种质与籽瓜种质区分开来,但它们所反映的信息不同。聚类分析在揭示密切相关的个体间的关系时能够提供更丰富的信息,而主成分分析偏重于在不同群体之间的聚类上提供更多的信息。

2.5 籽瓜核心种质库的构建及数据分析

先对 50 份籽(西)瓜种质的聚类分析,其结果再用最小距离逐步抽样法(LDSS)进行构建核心种质。共抽样 7 次,每次抽样构建籽瓜核心种质的遗传多样性如表 3。由表 3 可以看出,随着抽样种质数目的减少,遗传多样性参数总体上变化较小;有效等位基因数目变化较小,且抽样 6 的有效等位基因数目最高;Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数均略有增加,而在抽样 6 中达到最高值;多态性位点百分率呈现下降趋势,在抽样 7 下降较明显。抽样 6 所构建的种质库的抽样数是抽样前的 20%。

原始种质除去核心种质后保留下来的种质资源叫做保留种质^[16]。从表 3 可看出核心种质保留了原种质 20%的样品,多态性位点数、等位基因数、有效等位基因数、Nei's 遗传多样性指数和 Shannon

信息指数的保留率分别为 94.93%、97.47%、101.84%、108.88%和 108.71%,可见核心种质能很好地代表原种质遗传多样性。综合上述分析,取抽样 6 为初级核心种质(图 4)。

3 讨论

本研究 SSR 分子标记聚类结果显示,筛选出的 31 对 SSR 引物,对 50 份来自个 19 省区种质资源 PCR 扩增出 138 条清晰的多态性条带,多态性条带比率高达 83.33%,表明本研究收集到的籽瓜种质资源在分子水平上具有丰富的多态性。于海彬等^[17]用筛选出的 12 条 RAPD 随机引物在 51 份籽(西)瓜种质间共扩增出 80 条谱带。其中 74 条为多态性条带,多态性条带的比率为 92.50%,12 条随机引物的平均 Shannon 多样性信息指数为 0.7295;用不同分子标记方法对籽瓜种质研究结果证明了籽瓜 DNA 分子水平上的高度多态性和代表性。

本实验聚类分析中,其遗传相似系数介于 0.57~0.91 之间,除个别种质外,50 个种质聚类结果与地区来源有较高的一致性,表明其亲缘关系比较近,遗传范围狭窄。在相似系数为 0.594 时,将 50 份籽(西)瓜种质分为两大类,2 份野生种质广东野生籽瓜(29)和美国野生籽瓜 PI542120(33)单独聚为一类,剩余 48 份种质聚为另一大类,说明这两份野生种质的基因组和其所携带的遗传信息与其它种质之间的差异较大,表明了野生型与栽培型籽瓜种质间亲缘关系较远,2 份野生种质间遗传关系较近,而栽培型的籽瓜间遗传关系较近。这与赵虎基等前人研究结果相似^[9,11,17]。

通过主成分分析和聚类分析也揭示出了地理上的来源对籽瓜种质资源亲缘关系影响不大。例如,红籽瓜(27)和大板 2 号瓜子(38)的遗传相似系数为 0.866,建阳月子籽瓜(32)和点心(83)(36)的遗传相似系数为 0.874。2 种籽瓜所处地理位置和生态环境不同,却在分子水平上聚为同一类,表明来自不同地区的种质资源之间在分子水平上亲缘关系较近。另外,来自同一地区的种质亲缘关系不一定近,例如来自甘肃省的 8 份种子类型为大板的籽瓜资源,其中大板红籽瓜(放射网)(11)、大板红籽瓜(绿网)(15)、甘肃大板 1 号(18)、大板瓜子(26)、大板 2 号瓜子(38)、靖远大板 1 号(46)亲缘关系比较近,而兰州大板 1 号(39)、兰州大板(47)与它们比较相对较远。综上所述,这可能是由于籽瓜在漫长的发展史中各地区相互引种交流,造成各地区籽瓜出现品种

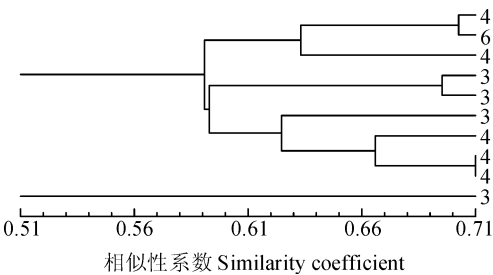


图 4 抽样 6 构建的籽瓜核心种质库聚类图
Fig. 4 Dendrogram of core collection of seed watermelon No.6 sampling

混杂、同名异物和同物异名等的现象。这种现象还需进一步的深入探讨和研究。

核心种质构建是种质资源研究的热点。形态标记作为研究核心种质的指标,有简便和研究费用低等优点,但形态标记的数量少,易受环境条件的影响,对资源的鉴定和分类不够精准,在反映品种间遗传差异的问题上不够真实^[18];DNA 分子标记是近年来发展起来的一种十分有效快速的手段,其中简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记技术具有共显性、结果可靠、重复性好的特点^[19],所以在对核心种质的评价上,利用 SSR 分子标记进行评价相比其它标记具有其独特的优点。

李自超等^[20]认为各物种适宜的核心种质规模不应简单化而定,对应具体的物种,应按照该物种的遗传多样性来定。本实验对 50 份籽(西)瓜种质资源进行最小距离逐步抽样法构建核心种质,并对各抽样进行遗传多样性分析,结果表明随着抽取种质数目的减少,各种质库遗传多样性参数变化较小,几个参数出现了峰值变化,但多态性位点百分率呈现

下降趋势。综合上述分析,确定 20%的核心子集抽样 6 为初级核心种质库。抽样 6 的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 0.296 6 和 0.455 8,而且多态位点比率和等位基因数均达到抽样前的 94%以上,符合核心种质资源代表初始种质资源遗传多样性达到 70%~80%的要求^[21],表明抽样比例为 20%的抽样 6 所构建的种质库具有较高的代表性,更能代表原始群体的遗传多样性。种质资源合理的聚类分组、取样方法、取样比例是构建核心种质的关键之一,后期还需利用更多方法探讨籽瓜种质的核心种质。

丰富的遗传多样性是物种具有更高的适应和存活能力的基础,从而才能提高物种的进化、繁殖以及优化遗传结构的能力^[22]。所以,对现存籽瓜种质资源应该采取一些有效的保护措施。通过建立核心种质库,收集、保存具有较高遗传多样性的种质资源,这些具有丰富的基因多样性资源的地区是将来育种的优良种质库的来源,在制定保护措施和对其利用时应多加注意。

参考文献:

[1] 柳唐镜,汪李平. 籽瓜(籽用西瓜)产业前景展望[J]. 北京农业, 2007, 11: 13-15.
LIU T J, WANG L P. Prospect of the industry of seed watermelon[J]. *Beijing Agriculture*, 2007, 11: 13-15.

[2] FRANKEL O H. Genetic manipulation: impact on man and society[M]// ARBER W, IL I. MENSEE R, PEACOCK W J. Genetic Perspectives of Germplasm Onservation. London: Cambridge University Press, 1989: 161-170.

[3] FRANKEL O H. BROWN A H D. Crop genetic resources: conservation &. evolution[M]//HOLDEN J H W, WIL-LIAMSJ T, *et al.* Current Plant Genetic Resources Today-A Critical Appraisal. London: George Allen &. Urwin Ltd, 1984: 249-257.

[4] BROWN A H D. Core collections: a practical approach to genetic resources management[J]. *Genome*, 1989, 31: 818-824 .

[5] 温景辉. 基于 SSR 分子标记的山葡萄种质遗传多样性研究与核心种质构建[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2011.

[6] 张维瑞,袁王俊,尚富德. 基于 AFLP 分子标记的桂花品种核心种质的构建[J]. 西北植物学报, 2012, 32(7): 1 349-1 354.
ZHANG W R, YUAN W J, SHANG F D. Construction of core collection of sweet osmanthus cultivars based on AFLP

molecular markers [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(7): 1 349-1 354.

[7] 刘 娟,廖 康,赵世荣,等. 利用 ISSR 分子标记构建新疆野杏核心种质资源[J]. 中国农业科学, 2015, 48(10), 2 017-2 028.
LIU J, LIAO K, ZHAO S R, *et al.* Using ISSR markers to construct Xinjiang wild apricot germplasm resources[J]. *Chinese Agricultural Science*, 2015, 48(10): 2 017-2 028.

[8] 白成科,俞君如,于 凤,等. 山茱萸种质资源的 ISSR 遗传多样性分析与初级核心种质库的构建[J]. 西北植物学报, 2009,29(12): 2 401-2 407.
BAI C K, YU J R, YU F, *et al.* Genetic diversity and construction of primary core germplasm in *Cornus officinalis* by ISSR marker[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(12): 2 401-2 407.

[9] 赵虎基,刘锦华,李红霞,等. 籽用西瓜品种(系)间亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 1999, 16(3): 235-238.
ZHAO H J, LE J H, LI H X, *et al.* Genetic relationships of seed watermelon varieties (lines) RAPD analysis[J]. *Journal of Fruit Science*, 1999, 16(3): 235-238.

[10] 张建农. 籽用西瓜种质资源利用和耐贮性生理机理的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.

[11] 柳唐镜, 于海彬, 张 棵, 等. 红籽瓜种质资源亲缘关系 RAPD 分析[J]. 中国农学通报, 2010, **26**(22): 264-270.
LIU T J, YU H B, ZHANG K, *et al.* RAPD analysis of genetic relationship of Red Seed Watermelon germplasm resources[J]. *China Agricultural Bulletin*, 2010, **26**(22): 264-270.

[12] 钱 韦, 葛 颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, **42**(7): 741-750.
QIAN W, GE S, HONG D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza grarzulate* detected by RAPDs and ISSRs[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(7): 741-750.

[13] 周 鹏, 王 萍, 石 磊, 等. 籽用西瓜 SSR 体系的建立与优化[J]. 内蒙古农业大学学报, 2015, **29**(12): 2 401-2 407.
ZHOU P, WANG P, SHI L, *et al.* Establishment and optimization of SSR system for seed used watermelon[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2015, **29**(12): 2 401-2 407.

[14] ROHL F F J. NTSYSpc; Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version2. 1 [CP]. New York: Exeter Software, 2000.

[15] 胡 晋, 徐海明, 朱 军. 基因型值多次聚类法构建作物种质资源核心库[J]. 生物数学学报, 2000, **15**(1): 103-109.
HU J, XU H M, ZHU J. Constructing core collection of crop germplasm by multiple clusters based on genotypic values[J]. *Journal of Biomathematics*, 2000, **15**(1): 103-109.

[16] BROWN A H D. The core collection at the crossroad. //: Core Collection of Plant Genetic resources[PGR]. A Wiley-Sayce Publication, 1995, 3-19.

[17] 于海彬. 籽用西瓜种子生长发育规律与种质资源遗传多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.

[18] 李慧峰, 卢森权, 李彦青, 等. 广西甘薯核心种质构建初探[J]. 广西农业科学, 2010, **41**(7): 732-735.
LI H F, LU S Q, LI Y Q, *et al.* Preliminary study on constructing core collection of sweet potato germplasm in Guangxi[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, **41**(7): 732-735.

[19] 徐海明, 胡 晋, 邱英雄. 利用分子标记和数量性状基因型值构建作物核心种质库的研究[J]. 生物数学学报, 2005, **20**(3): 351-355.
XU H M, H J, QIU Y X. Study on the construction of core collection of crops by using molecular markers and quantitative trait loci [J]. *Journal of Biomathematics*, 2005, **20**(3): 351-355.

[20] 李自超, 张洪亮, 孙传清, 等. 植物遗传资源核心种质研究现状与展望[J]. 中国农业大学学报, 1999, **4**(5): 51-62.
LI Z C, ZHANG H L, SUN C Q, *et al.* Status and prospects of core collection in plant germplasm resource[J]. *Journal of China Agricultural University*, 1999, **4**(5): 51-62.

[21] GU X F, YANG A F, MENG H, *et al.* In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill, cv. Zhanhua[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, **24**(11): 671-676.

[22] FRANKHAM R, BALLOU J D, BRISCOE D A. Introduction to Conservation Genetics [M]. Cambridge: Cambridge Univer City Press, 2002: 10-36.

(编辑: 宋亚珍)