

黄瓜 23 对高多态性 SSR 标记的筛选与评价

吕 婧*, 时秋香*, 任 毅, 张忠华, 黄三文**

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 目前在黄瓜种质研究中仍然缺乏可用的引物。利用黄瓜基因组连锁遗传图谱开发的 995 对备选 SSR 引物, 挑出在 7 条染色体上均匀分布且能扩增出清晰稳定单一条带的多态性引物 23 对, 并利用这些引物对黄瓜种质遗传多样性进行了探讨。通过来自不同国家和地区的 30 份代表性黄瓜种质资源进行 SSR 扩增分析, 从中能够得到 153 条多态性条带。不同引物分析得到的种质遗传多样性差异较大, 供试种质间平均期望杂合度为 0.57, 平均 PIC 值 (多态性信息量) 为 0.60。23 对引物可以清晰检测出亚洲、欧美和印度群体遗传多样性, 较客观地反映了群体结构和地域性差异等信息。

关键词: 黄瓜; 基因组连锁遗传图谱; SSR 标记; 种质遗传多样性

中图分类号: S 642.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 11-2140-09

Screening and Evaluation of 23 High Polymorphism SSR Markers in Cucumber

Lü Jing*, SHI Qiu-xiang*, REN Yi, ZHANG Zhong-hua, and HUANG San-wen**

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: At present, useful primers in the study of cucumber germplasm are scarce, in this study, 23 SSR primers are selected from the 995 primers of cucumber genome linkage map, the 23 SSR primers distribute on the linkage map uniformly and can amplify clear, stable and single bands, using these markers, the genetic diversity of 30 cucumber (*Cucumis sativus* L.) accessions from different countries or regions was detected, and 153 polymorphism bands were got. Genetic diversity differs among 23 primers. The expected heterozygosity of detected resources is 0.57, and the average of PIC (Polymorphism information content) value is 0.60. The results distinctly prove the genetic diversity among Asian, European and India resources by 23 primers and objectively reflect information including population structure and regional differences.

Key words: cucumber; genome linkage map; SSR marker; germplasm genetic diversity

在国际黄瓜基因组计划完成的背景下 (Huang et al., 2009), 高密度的黄瓜连锁遗传图谱也已经在全基因组序列的基础之上构建完成 (Ren et al., 2009), 共开发了 995 对 SSR 引物。SSR 引物具有普遍性、高多态性、共显性等特点, 是遗传分析中有用的分子标记 (Tautz, 1989), 尤其在优良

收稿日期: 2011 - 07 - 04; 修回日期: 2011 - 08 - 31

基金项目: 农业部 ‘948’ 项目 (2008-Z42); 国家自然科学基金项目 (30972011); 国家 ‘863’ 计划项目 (2010AA10A108)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: huangsanwen@caas.net.cn)

种质资源挖掘方面具有准确快捷的作用(张广平等, 2006)。

目前对于利用分子标记手段对世界黄瓜资源进行遗传多样性分析还鲜有报道。李锡香等(2004)采用表型性状分析的方法对于国家蔬菜种质资源库中的 1 434 份(1 393 份中国资源, 41 份国外资源)黄瓜资源的研究表明, 中国资源多样性丰富。沈镒等(2009)用 13 个来自于黄瓜和甜瓜 EST 序列以及黄瓜和甜瓜基因组的引物, 对 273 份西双版纳黄瓜种质群体进行遗传多样性的分析, 发现遗传差异在不同样本、不同种质以及不同来源地群体间均一定程度地存在, 同时数量较多的样本有利于全面了解其遗传变异, 因此可以加强对不同地域、不同类型种质资源的收集。陈劲枫等(2003)采用 SSR 和 RAPD 两种分子标记对 22 份黄瓜属不同类型材料的亲缘关系进行了研究。穆生奇等(2008)从甜瓜基因组, 甜瓜 EST 序列, 黄瓜基因组, 黄瓜 EST 序列中挑选 62 对多态性 SSR 引物对 59 份栽培黄瓜进行分析, 将供试材料分为 7 大类群, 显示较好的区域性分布规律。

先前的研究多是根据文库、其他葫芦科 EST 序列与部分基因组序列的测序结果挑选引物。本研究中利用从黄瓜基因组连锁图谱中综合挑选的 23 对引物, 对于收集得到的 30 份黄瓜种质资源的遗传多样性进行了分析, 旨在验证所挑选的 23 对引物是否具备高多态性, 为下一步的核心种质构建工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取黄瓜种质资源共 30 份, 其中美国国家种质资源库资源 13 份、荷兰种质资源库资源 7 份和中国农业科学院蔬菜花卉研究所种质资源室资源 10 份(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取

每份材料随机选取 5 株, 剪取一片小嫩叶, 剪碎混合后, 用 CTAB 法结合高通量的 Retsch 细胞破碎仪(Retsch Inc., Haan, Germany)和 96 孔 COSTAR 深孔板(Corning Inc., New York)进行 DNA 快速提取。提取的 DNA 加水溶解, 于 -20°C 保存。

1.2.2 标记来源和反应条件

用于进行资源分析的位点来自黄瓜基因组遗传图谱上的 995 个位点, 标记位置、距离均由已发表的黄瓜高密度遗传图谱上得到。

在检测 995 个 SSR 位点多态性时, 采用了 11 份遗传差异明显的黄瓜自交系材料(Ren et al., 2009), 这 11 份材料包括:“中长”系列(228、9930 和新泰密刺); 华南系列(白叶三和 00956); 西南系列(西双版纳-1、西双版纳-2); 欧洲温室类型(65G 和 9110 Gt); 美国切片类型(Marketmore 76)以及日本类型(185)。计算多态信息含量 PIC 值(Elston, 2005)。

10 μL PCR 优化反应体系包括: $5\times$ buffer 2 μL , dNTPs 0.3 μL ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 上下游引物各 0.2 μL ($10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), TaqDNA 聚合酶 0.05 μL ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), DNA 模板 5 μL ($10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), H_2O 2.25 μL 。扩增程序为 95°C 预变性 2 min, 95°C 变性 30 s, 57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 共循环 35 次, 最后 72°C 延伸 10 min。

设计荧光引物沿用以下标准: GC 含量为 40%~60%, 引物片段长度为 19~30 bp, 正反引物退火温度相差不超过 5°C , 且正反引物退火温度分别要在 57°C 以上, 不形成二级结构, 3'端没有 3 个以上的连续 G 或 C。引物由上海生工生物工程服务有限责任公司合成。

将引物分为 7 组, 分别标以不同的荧光, FAM 是蓝色, HEX 是绿色, TAMRA 是黄色, ROX

是红色，每组内 4 对引物组合原则是：扩增片段长度差别大于 30 bp。

1.2.3 SSR 标记多态性检测

挑选 30 份来自不同国家种质资源库的材料以检测 995 个位点的多态性高低。扩增反应在 9700PCR 仪（Applied Biosystems Inc.）上进行。SSR 扩增产物利用银染法检测：PCR 反应结束后 10 μ L 体系加入 6 \times 加样缓冲液 3 μ L，离心后用于电泳分析，用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶在 160 V 恒功率下电泳 2 h。之后银染检测，显色后在荧光灯下统计引物多态性。

1.2.4 片段分析和数据统计

用 23 对荧光引物扩增 30 份黄瓜资源，利用 3130xl 测序仪测定 PCR 产物 DNA 片段数和片段大小，在 GeneMapper（Applied Biosystems Inc.）软件上分析仪器运行的数据结果，将最终结果以文本形式输出。

1.2.5 遗传多样性分析

应用 Powermarker（Liu & Muse, 2005）软件计算 PIC 值并统计位点情况。期望杂合度值 H_e 根据软件 POPGENE 计算得出，其中 H_e 值范围从 0（说明无多态性）到 1（说明无限多个等位形式具有相同的频率）。

表 1 黄瓜收集材料
Table 1 Cucumber accessions used for this study

材料编号 No.	材料名称 Name	来源地 Source	类型 Type
1	北京小刺 Beijing Xiaoci	北京 Beijing	华北类型 North China type
2	青皮八杈 Qingpi Bacha	吉林浑江 Hunjiang, Jilin	华北类型 North China type
3	津研四号 Jinyan 4	天津 Tianjin	华北类型 North China type
4	黄铁无刺瓜 Huangtie Wucigua	山西永和县 Yonghe County, Shanxi	华北类型 North China type
5	叶三白 Yesanbai	河北遵化县 Zunhua County, Hebei	华北类型 North China type
6	青岛秋叶儿三 Qingdao Qiuyeersan	山东青岛 Qingdao, Shandong	华北类型 North China type
7	洪门黄瓜 Hongmen Huanggua	江苏连云港 Lianyungang, Jiangsu	华北类型 North China type
8	大刺黄瓜 Daci Huanggua	四川会理县 Huili County, Sichuan	华南类型 South China type
9	秋黄瓜 Qiu Huanggua	广东 Guangdong	华南类型 South China type
10	冷露黄瓜 Lenglu Huanggua	湖南郴州 Binzhou, Hunan	华南类型 South China type
11	Nemet Kigyo	匈牙利 Hungary	地方品种 Landrace
12	752	荷兰 Netherlands	黄瓜 group Cucumber
13	Muromskij	俄罗斯 Russian Federation	未知 Unknown
14	A-C-3	西班牙，特威尔 Spain, Teruel	栽培品种 Cultivar
15	Ames 1208	土耳其，开赛里 Turkey, Kayseri	地方品种 Landrace
16	Klinsky Mestnyj	前苏联 Union of Soviet Soc. Rep.	未知 Unknown
17	SC 53-B（6）	美国 United States	未知 Unknown
18	National Pickle	美国 United States	加工黄瓜 Gherkin
19	Rasht	伊朗 Iran	黄瓜 group Cucumber
20	N2/81	刚果 Dem. Rep. of the Congo	黄瓜 group Cucumber
21	Small Green	印度 India	栽培品种 Cultivated material
22	9162	印度，卡纳塔克邦 India, Karnataka	地方品种 Landrace
23	KSM 486	印度，中央邦 India, Madhya Pradesh	地方品种 Landrace
24	Balam Khiri	印度，中央邦 India, Madhya Pradesh	地方品种 Landrace
25	KSM 596	印度，中央邦 India, Madhya Pradesh	地方品种 Landrace
26	Kakri	印度，马哈拉施特拉 India, Maharashtra	地方品种 Landrace
27	USM 255	印度，拉贾斯坦邦 India, Rajasthan	地方品种 Landrace
28	USM 316	印度，拉贾斯坦邦 India, Rajasthan	地方品种 Landrace
29	USM 355	印度，拉贾斯坦邦 India, Rajasthan	地方品种 Landrace
30	Pradesh Khira	印度，北方邦 India, Uttar	地方品种 Landrace

2 结果与分析

2.1 引物筛选

根据黄瓜基因组连锁遗传图谱挑选位点时, 主要考虑以下 4 个方面: (1) 保证标记均匀分布在 7 条染色体上; (2) 保证每条染色体的长臂、短臂上各有一个引物; (3) 多态性信息量 (PIC) 较高; (4) 扩增条带清晰单一。

基于以上 4 个原则, 首先挑选出 120 个位点进行引物的重新设计与扩增, 根据扩增胶图的清晰度进一步筛选, 剔除掉扩增条带不理想的位点。在此基础上进一步在每个染色体上均匀挑选 3 ~ 4 个位点, 原则上在染色体的两端挑选两个位点, 中间挑选两个位点, 遗传距离相近; 分别查看这些位点的 PIC 值情况, 选择 PIC 值较高的位点组合, 如果挑选的位点 PIC 值不够高, 就稍微向上或下移动位点。利用这个位点的序列设计引物, 使扩增片段长度处于 90 ~ 500 bp 之间。

挑选出 23 对扩增多态性好的引物, 编号、序列以及在染色体上的分布见表 2 和图 1。

图 1 显示 1 号与 2 号染色体上均匀分布 4 对引物, 3 号到 7 号染色体均匀分布 3 对引物, 每条染色体长臂与短臂上至少分布了一对引物, 引物之间的距离最小为 7.1 cM, 最大为 53.7 cM, 平均距离为 29.4 cM, 基本符合挑选原则 (表 2)。在挑选得到的所有位点上平均多态性信息含量为 0.60 (结果未列出)。

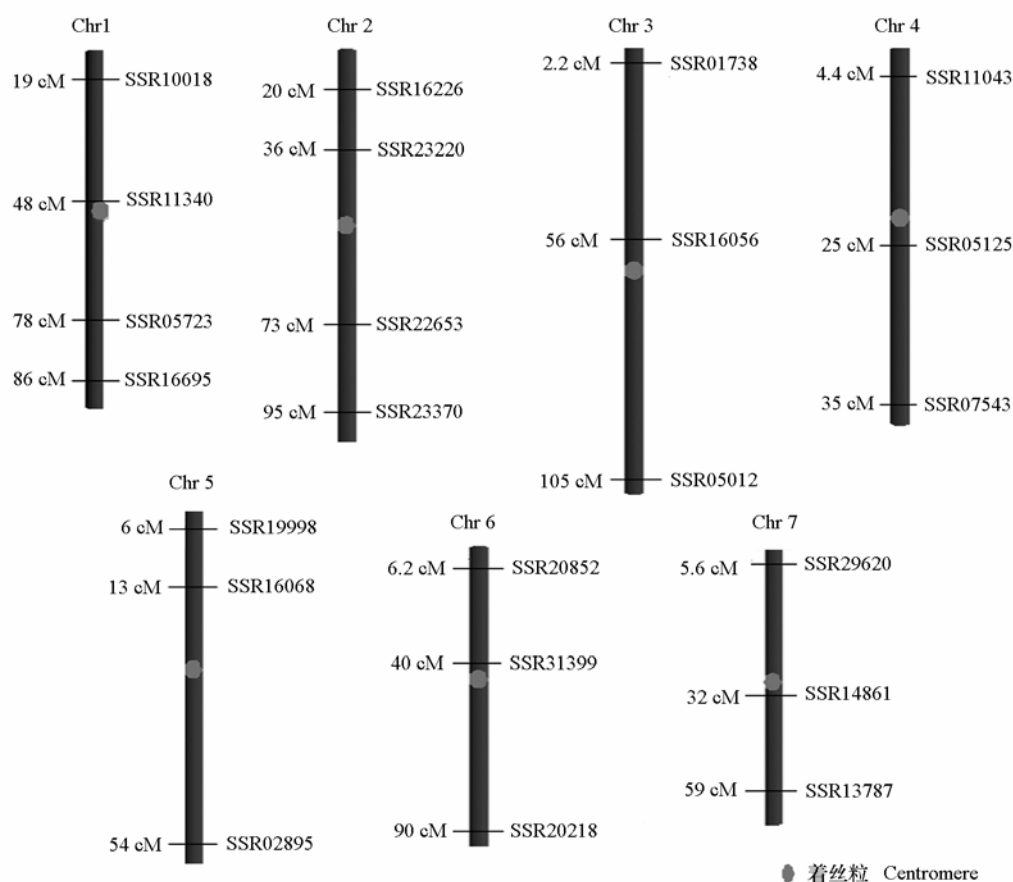


图 1 23 对引物在黄瓜染色体上的分布

Fig. 1 The distribution of SSR in 7 chromosomes

表 2 黄瓜遗传多样性分析的引物
Table 2 The primers screened out for the genetic diversity analysis of cucumber germplasm

引物编号 Locus	染色体位置 Chromosomal location	重复序列类型 Repeat sequence type	引物序列 (5'→3') Primer sequence	多态性信息含量 PIC value
SSR31399	6	(AT) ₁₈	F: AGCTCCGAGGATACCCATCT R: AGAAGAACACCTGGAACAGACA	0.67
SSR23220	2	(AGAAGG) ₁₃	F: GGGATGGGATCTGGGTTTG R: GTGTGGAAATATGTGGAGGGAG	0.50
SSR20852	6	(TA) ₃₀	F: GGTTTCCATTGAACTCGTAGC R: GGCTGTCCATTTTGTAGAACC	0.74
SSR20218	6	(AGA) ₂₈	F: TCGCCACGTCCTCTATATC R: GCTAATGAAGGGGGAGGAGA	0.60
SSR16226	2	(TCTT) ₇	F: GCGTTAAAATTCCCAACGG R: GGAGAGAAATTGGAATTCGGCAG	0.62
SSR16068	5	(AG) ₁₂ (AAAGAG) ₅	F: GTGCAAAACGGAGTGAGGTG R: GTTTGGGTTTGGTTCTGATG	0.57
SSR13787	4	(AT) ₁₈	F: GCAACTCCAACCAATCCCTC R: GGCAGCTAAATTCAACTCACC	0.76
SSR10018	1	(AAG) ₁₉	F: GGGTCTAATATTTGGGGATGG R: GGTTGTTCTTGTGGAATGTG	0.65
SSR05125	4	(CACCCCT) ₆	F: GCACATTCAAATTTACTTGGGAG R: GCTTTAAGTTTGATGGTAGGGTAG	0.68
SSR02895	5	(AT) ₁₉	F: GTGAAGAAATGAGTTGGCAAGTC R: GGAGGGAATGTTGGATCAGC	0.88
SSR16695	1	(CAT) ₁₄	F: GGACTAGAAACACAATCCCACG R: GTTTGGTTTGCTTCAAGTAGGTTT	0.39
SSR14861	7	(ATAC) ₁₉	F: CGGTAGTCTACTTGGTTGAAATG R: GTAAATAGGACGAAGGAAAACCAC	0.70
SSR01738	3	(GAA) ₉	F: GCGTAGGGAAAGTAAATCAAATAGG R: GGCATAAGAAATGATACGACC	0.42
SSR29620	7	(GAGATG) ₈	F: TGCTTGGAAGTTTGTCCTGTC R: GGTTTATTGGATGATGGGTC	0.64
SSR23370	2	(TA) ₁₇	F: GATTATGAGGATGAACCACACC R: GCCAACAACCTCTCTTATCGAAC	0.76
SSR22653	2	(AG) ₂₀	F: TGAATTTCTTTGGTGGATTCAA R: GGGAGAAGAAGGGGAGATTG	0.55
SSR19998	5	(AATC) ₁₂	F: CTTTGCCAAGCATCTCACC R: GTTTGCGTCTGCGGTTCTG	0.30
SSR16056	3	(CACCCCT) ₆	F: GGGTTTGATAGTGGAGATTATCA R: GGTCCTTTTCCACTCAATCCATT	0.68
SSR11340	1	(AG) ₁₈	F: TTGTTTTTGTGGGCACTCA R: GTGCATCACTCACCCCTTC	0.76
SSR11043	4	(GAA) ₁₆	F: TACACCTCTGCGAAGCACC R: GTTTCGCACTCACTCTTTACCG	0.64
SSR07543	4	(GA) ₁₃	F: GGTTTGGCTTTCCTTTCACTC R: GGTTCCCCAAATCAAATCAC	0.63
SSR05723	1	(AT) ₁₇	F: GGGTGTAATGGCTTTTCTG R: GGTTCTAATCCAACGAGTGC	0.38
SSR05012	3	(TCT) ₈	F: TTAAATGGCGTCGAAATGGT R: GTTCCATTAACGAGCTTCCC	0.34

2.2 SSR 引物的多态性

23 个引物在 30 份种质中共扩增出 153 条多态性带。平均每个引物产生 6.7 条多态性带。不同引物扩增的多态性带数差异较大（图 2），产生多态性带数最多的引物是 SSR02895 和 SSR20852，分别产生了 18 条和 13 条多态性带；产生片段差异最大的引物为 SSR10018、SSR20852 和 SSR02895，PCR 产物片段长度从 94 bp 到 415 bp（表 3）。

Powermarker 结果显示，引物 SSR01738 在中国资源中有特异且唯一长度片段；引物 SSR23220、SSR16226、SSR01738、SSR29620、SSR11340 在印度资源中有特异且唯一长度片段；SSR07543 在欧美资源中有特异且唯一片段。引物 SSR14861 在 3 种资源中同时有特异片段。另外，SSR20852、SSR13787、SSR10018、SSR02895、SSR16056 在中国和欧美资源中有特异片段；SSR05125、SSR16695、SSR23370、SSR19998、SSR19998 在中国和印度资源中有特异片段；SSR31399、SSR16068、SSR11043 在欧美和印度资源中有特异片段（结果未列出），23 对引物能有效区分不同地域材料。

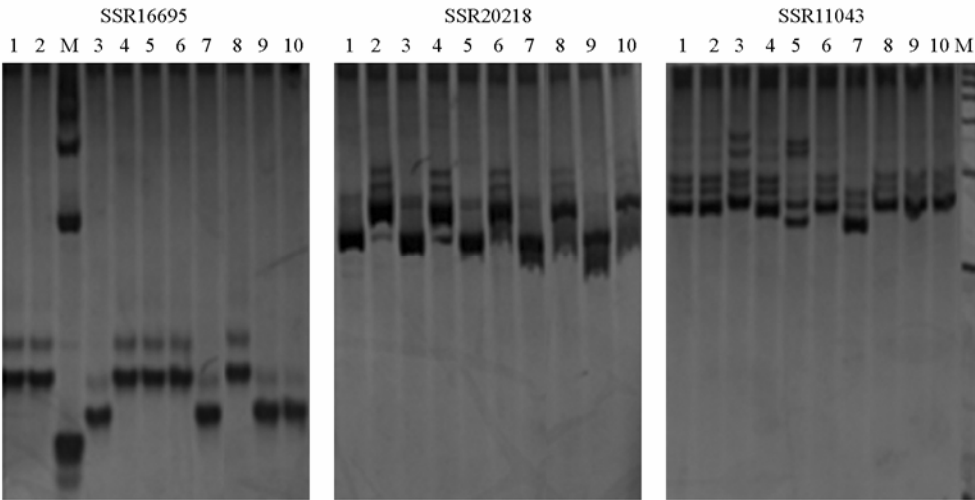


图 2 3 个 SSR 标记在欧洲黄瓜中的部分扩增情况

Fig. 2 Part results of the amplification of 3 SSR for Europe cucumber

1: Nemmet Kigyo; 2: 752; 3: Rasht; 4: SC 53-B (6); 5: National Pickle; 6: A-C-3; 7: Ames 1208; 8: N2/81; 9: Klinsky Mestnyj; 10: 9162.

表 3 SSR 引物扩增黄瓜种质位点多样性

Table 3 Alleles diversity at different SSR loci

引物编号 Locus	位点数 Number of alleles	扩增位点最短 片段长度/bp The smallest alleles	扩增位点最长片 段长度/bp The largest alleles	引物编号 Locus	位点数 Number of alleles	扩增位点最短 片段长度/bp The smallest alleles	扩增位点最长 片段长度/bp The largest alleles
SSR31399	6	183	204	SSR01738	4	123	132
SSR23220	4	293	311	SSR29620	6	350	380
SSR20852	13	108	160	SSR23370	9	160	184
SSR20218	4	231	256	SSR22653	7	395	415
SSR16226	5	260	275	SSR19998	6	327	353
SSR16068	4	357	373	SSR16056	9	127	166
SSR13787	9	280	324	SSR11340	7	373	403
SSR10018	7	94	151	SSR11043	7	201	240
SSR05125	7	235	263	SSR07543	5	119	133
SSR02895	18	200	249	SSR05723	4	289	299
SSR16695	3	174	195	SSR05012	2	207	216
SSR14861	7	368	395				

2.3 群体遗传多样性分析

23 对引物所揭示的 30 份黄瓜种质的所有位点的平均期望杂合度为 0.42。不同位点上杂合度的差异很大。SSR11043 显示的杂合度为 0.61，而 SSR05723 显示的杂合度为 0.08。所有位点的平均 PIC 值（多态性信息量）为 0.32，最高 PIC 值为 0.52（SSR11043），最低为 0.06（SSR05723）。因此，选用的引物能够有效表达种质的遗传多样性（表 4）。

表 4 表明印度黄瓜种质的大部分位点平均期望杂合度与 PIC 值均高于中国和欧美的种质。黄瓜起源于喜马拉雅山南麓的印度北部地区（Staub et al., 1997），而西双版纳黄瓜（*Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanesis* Qi et Yuan）是中国特有变种，黄瓜的次生起源中心一般认为是我国云南，其主要分布区域西双版纳州与印度西部的气候条件相同。同时供试资源中，欧美黄瓜资源的遗传背景较中国的和印度的都要狭窄。

引物 SSR01738、SSR16056 和 SSR23370 可以较高地显示中国资源的遗传多样性,引物 SSR11043 和 SSR13787 能较高水平地反应欧美资源的遗传多样性,引物 SSR22653 和 SSR23370 对于印度资源效果较好。

表 4 SSR 引物扩增不同来源地黄瓜种质的遗传多样性

Table 4 Expected heterozygosity and PIC of 23 SSR loci for cucumber germplasm from different countries or regions

引物编号 Locus	中国 China (10 份)		欧美 Europe and America (10 份)		印度 India (10 份)		平均值 Average	
	期望杂合度 Expected heterozygosity	PIC	期望杂合度 Expected heterozygosity	PIC	期望杂合度 Expected heterozygosity	PIC	期望杂合度 Expected heterozygosity	PIC
SSR01738	0.60	0.52	0.39	0.30	0.53	0.38	0.51	0.40
SSR02895	0.58	0.48	0.55	0.48	0.19	0.16	0.44	0.37
SSR05012	0.53	0.38	0.53	0.37	0.19	0.16	0.42	0.30
SSR05125	0.28	0.25	0.21	0.18	0.39	0.30	0.29	0.24
SSR05723	0	0	0	0	0.23	0.19	0.08	0.06
SSR07543	0.39	0.30	0.22	0.19	0.44	0.33	0.35	0.27
SSR10018	0.44	0.40	0.69	0.59	0	0	0.38	0.33
SSR11043	0.33	0.26	0.76	0.65	0.74	0.66	0.61	0.52
SSR11340	0.36	0.27	0.30	0.24	0.6	0.52	0.42	0.34
SSR13787	0.36	0.40	0.73	0.66	0.39	0.30	0.49	0.45
SSR14861	0.28	0.25	0.43	0.37	0.26	0.21	0.32	0.28
SSR16056	0.59	0.51	0.39	0.34	0.27	0.22	0.42	0.36
SSR16068	0.44	0.33	0.19	0.16	0.36	0.33	0.33	0.27
SSR16226	0.29	0.24	0.39	0.30	0.65	0.54	0.44	0.36
SSR16695	0.35	0.30	0.34	0.27	0.50	0.44	0.40	0.34
SSR19998	0.42	0.35	0	0	0.34	0.27	0.25	0.21
SSR20218	0.48	0.35	0.47	0.35	0.53	0.38	0.49	0.36
SSR20852	0.55	0.45	0.36	0.31	0.10	0.09	0.34	0.28
SSR22653	0.17	0.14	0	0	0.80	0.72	0.32	0.29
SSR23220	0.34	0.27	0.40	0.30	0.43	0.37	0.39	0.31
SSR23370	0.62	0.48	0.13	0.11	0.84	0.78	0.53	0.46
SSR29620	0.26	0.21	0.50	0.36	0.72	0.63	0.49	0.40
SSR31399	0.21	0.18	0.23	0.19	0.31	0.27	0.25	0.21
平均 Mean	0.39	0.32	0.37	0.29	0.51	0.36	0.42	0.32

2.4 聚类树的构建

为了检测使用引物的数量对于资源划分群体的影响, 分别选取 7 对、14 对、21 对和 23 对引物对 30 份资源进行群体聚类分析, 引物挑选时采取每条染色体上挑选相同数量的引物, 比较不同引物数量对于资源群体划分结果的影响, 结果见图 3。

用 Powermarker 软件中的 Phylogeny 程序, 选择 C. S. Chord1967 方法对 30 份资源计算遗传距离, 并用 Neighbor-Joining 法聚类。

如图 3 所示, 仅用 7 对引物构建聚类树时, 不同资源划分不清晰, 不能明显区分不同来源地的资源, 当 SSR 数逐渐增加时, 构建的聚类树能够逐渐区分出明显的 3 大类群。因此, 选用 23 对引物可以将所选资源明显分为 3 大类: 中国、欧美和印度资源, 总体划分结果与其地理划分有一定相关性。

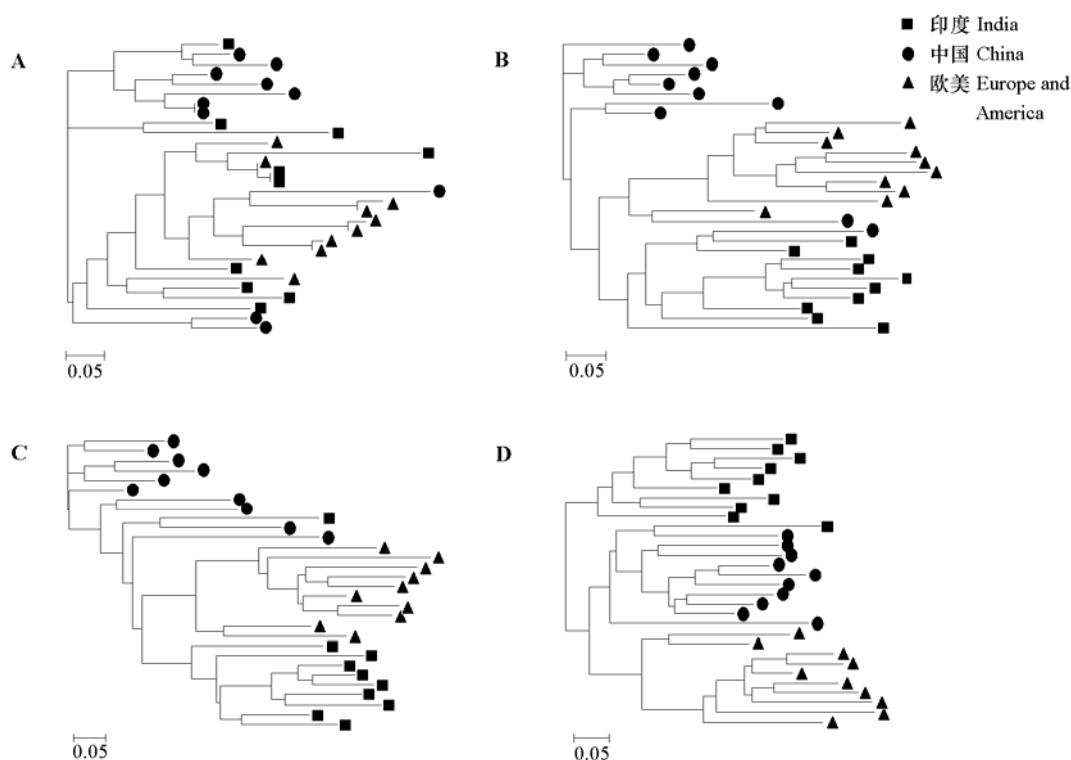


图 3 7 对 (A)、14 对 (B)、21 对 (C)、23 对 (D) SSR 引物构建的 30 份黄瓜资源聚类树比较

Fig. 3 Comparison of unrooted neighbor-joining tree based on C.S. Chord method of 30 accessions using 7 SSR (A), 14 SSR (B), 21 SSR (C) and 23 SSR (D) respectively

3 讨论

开发微卫星标记可以充分地利用已有资源, 但标记开发能否成功主要取决于 3 方面因素: 一是该物种数据库的规模; 二是数据本身的质量; 三是物种的特异性。目前对于给定物种, 有效的遗传多样性研究需要有在该物种基因组上均匀分布的高多态性引物, 随着黄瓜全基因组测序的完成以及序列信息的公开, SSR 标记已经可以大量开发利用。本试验中利用先前研究中高密度连锁遗传图谱的 995 个 SSR 引物对 11 份不同生态类型黄瓜的遗传多样性进行调查, 筛选出 23 对在黄瓜 7 条染色体上均匀分布的高多态性 SSR 引物, 可以扩增出清晰稳定单一的条带, 同时可清楚地检测出亚洲、欧美和印度群体的遗传多样性, 更客观地反映群体结构和地域性差异等信息。

前人对于黄瓜种质遗传多样性的研究包括采用 21 对同工酶引物 (Meglic et al., 1996; Staub et al., 1997)。NPGS (国家植物种质系统) 对于在 1992 年后从印度 (Staub et al., 1997) 和中国 (Staub et al., 1999) 引进收录的资源进行同工酶评价分析, 分别鉴定出两个不同的群体。2002 年 PCA (主成分分析) 研究显示近期收获的印度和中国资源形成了单一的群体。当有新的数据加入或移出资源库以用于再分析时资源之间的关系会发生改变, 同时分析中使用引物数量不同, 资源关系也会发生改变。

Staub 等 (1997) 提出中国是黄瓜多样性的次级中心, 因此有必要把中国资源同美国国家种质资源库的现有其他资源作比较。

所用的 30 份材料同前人的研究相比, 外国种质材料代表性较高, 印度黄瓜具有许多其他国家和地区黄瓜栽培品种所没有的位点, 欧洲种质也有少量特殊的位点。平均期望杂合度印度资源最高 (0.51), 中国黄瓜种质 (0.39) 高于欧美种质 (0.37), 进一步证明了中国是黄瓜多样性的演化中心

之一(李锡香 等, 2004)。

本试验结果显示所用的标记开发效率较高, 此外地域上的差异在一定程度上影响了群体上的遗传多样性, 各个地域是否可以进一步划分出亚群, 还有待于更多的遗传变异分析。高多态标记能较好地反映品种间表型多态性, 可用于黄瓜种质资源筛选和核心种质构建和育种研究, 未来研究将集中在有关驯化过程的细节上的理解和全基因组关联性研究方面。

References

- Chen Jin-feng, Zhuang Fei-yun, Lu Ming-hui, Qian Chun-tao, Ren Gang. 2003. Phylogenetic relationships in *Cucumis* (Cucurbitaceae) revealed by SSR and RAPD analyses. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 41 (5): 427 - 435. (in Chinese)
- 陈劲枫, 庄飞云, 逯明辉, 钱春桃, 任 刚. 2003. 采用 SSR 和 RAPD 标记研究黄瓜属(葫芦科)的系统发育关系. *植物分类学报*, 41 (5): 427 - 435.
- Elston R C. 2005. Polymorphism information content. *Encyclopedia of Biostatistics*.
- Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, Li L, Gu X F, Fan W, William J L, Wang X W, Xie B Y, Ni P X, Ren Y Y, Zhu H M, Li J, Lin K, Jin W W, Fei Z J, Li G C, Staub J, Kilian A, van der Vossen E A G, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z Q, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W B, Wang M W, Huang Q F, Li B, Xuan Z L, Cao J J, Asan, Wu Z G, Zhang J B, Cai Q L, Bai Y Q, Zhao B W, Han Y H, Li Y, Li X F, Wang S H, Shi Q X, Liu S Q, Cho W K, Kim J Y, Xu Y, Katarzyna H U, Miao H, Cheng Z C, Zhang S P, Wu J, Yang Y H, Kang H X, Man L, Liang H Q, Ren X L, Shi Z B, Wen M, Jian M, Yang H L, Zhang G J, Yang Z T, Chen R, Liu S F, Li J W, Ma L J, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X D, Li G Q, Li Y G, Liu D Y, Zheng H K, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang G H, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H C, Li S C, Zhang X Q, Yang H M, Wang J, Sun R F, Zhang B X, Jiang S Z, Wang J, Du Y C, Li S G. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetic*, 41: 1275 - 1281.
- Li Xi-xiang, Zhu De-wei, Du Yong-chen, Shen Di, Kong Qiu-sheng, Song Jiang-ping. 2004. Studies on genetic diversity and phylogenetic relationship of cucumber (*Cucumis sativus* L.) germplasm by AFLP technique. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 309 - 314. (in Chinese)
- 李锡香, 朱德蔚, 杜永臣, 沈 镒, 孔秋生, 宋江萍. 2004. 黄瓜种质资源遗传多样性及其亲缘关系的 AFLP 分析. *园艺学报*, 31 (3): 309 - 314.
- Liu K, Muse S V. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21 (9): 2128 - 2129.
- Meglic V, Serquen F, Staub J E. 1996. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): I. A reevaluation of the US germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43: 533 - 546.
- Mu Sheng-qi, Gu Xing-fang, Zhang Sheng-ping, Wang Xiao-wu, Wang Ye. 2008. Genetic diversity of cucumber (*Cucumis sativus* L.) germplasm by SSR. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (9): 1323 - 1330. (in Chinese)
- 穆生奇, 顾兴芳, 张圣平, 王晓武, 王 烨. 2008. 栽培黄瓜种质遗传多样性的 SSR 鉴定. *园艺学报*, 35 (9): 1323 - 1330.
- Ren Y, Zhang Z H, Liu J H, Staub J E, Han Y H. 2009. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. *PloS One*, 4: e5795.
- Shen Di, Fang Zhi-yuan, Qi Chun-zhang, Zhao Jin-yan, Song Jiang-ping, Li Quan-hui, Li Xi-xiang. 2009. Genetic diversity analyses of *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* population based on SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (10): 1457 - 1464. (in Chinese)
- 沈 镒, 方智远, 戚春章, 赵金艳, 宋江萍, 李全辉, 李锡香. 2009. 西双版纳黄瓜群体遗传多样性的 SSR 分析. *园艺学报*, 36 (10): 1457 - 1464.
- Staub J E, Serquen F C, Horejsi T, Chen J. 1999. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): IV. An evaluation of Chinese germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46: 297 - 310.
- Staub J E, Serquen F C, McCreight J D. 1997. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) III: An evaluation of India germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44: 315 - 326.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463 - 6471.
- Zhang Guang-ping, Li Xi-xiang, Xiang Chang-ping, Shen Di, Wang Wen-ling, Song Jiang-ping. 2006. Studies on the methods of establishing cucumber core collection based on RAPD analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (2): 260 - 265. (in Chinese)
- 张广平, 李锡香, 向长萍, 沈 镒, 王文玲, 宋江萍. 2006. 黄瓜种质核心样本构建方法初探. *园艺学报*, 33 (2): 260 - 265.