

基于 SCoT 分子标记的 61 份加工型黄瓜种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建

王宏利¹, 赵久成¹, 赖 淼¹, 卢家仕², 凌启昌¹, 肖锦华³, 张 华⁴, 付鑫锋¹

(1. 广西农业科学院钦州分院·钦州市农业科学研究所 广西钦州 535000;

2. 广西农业科学院花卉研究所 南宁 530007; 3. 钦州市钦南区那彭镇农业农村服务中心 广西钦州 535015;

4. 钦州市浦北县北通镇农业农村服务中心 广西浦北 535321)

摘 要:为探明加工型黄瓜种质资源的亲缘关系及遗传多样性,为新品种选育提供理论依据,采用目标起始密码子多态性标记(SCoT)技术,以 61 份加工型黄瓜种质资源为试验材料,进行遗传多样性分析并构建 DNA 指纹图谱。结果表明,从 100 条 SCoT 引物中筛选出 8 条扩增条带清晰、多态性高且重复性好的引物;利用筛选出的引物对 61 份黄瓜种质基因组 DNA 进行 PCR 扩增,共扩增出 238 个位点信息,其中多态性位点 227 个,平均多态性位点百分比为 95.38%;采用 NTSYS-pc 2.1 软件计算得出供试的 61 份材料间的遗传相似系数分布在 0.588~0.920 之间,遗传相似系数最小的材料分别是 34 号与 55 号,二者在瓜色、叶片形状及果实形状方面存在较大差异,说明两者亲缘关系最远。基于遗传相似系数对其进行 UPGMA 聚类分析和树状图绘制,在相似系数 0.735 处,可将其划分为 7 个类群,说明 61 份黄瓜种质材料背景存在差异,但多数地域来源相近、生境相似地区的种质被聚在同一类群。利用 2 对特异性较大的引物 SCoT 12 和 SCoT 83 构建的 DNA 指纹图谱可单独鉴别出 61 份黄瓜种质资源,该图谱可为黄瓜分类与鉴定提供科学依据。

关键词: 黄瓜; SCoT 分子标记; 亲缘关系; 遗传多样性; DNA 指纹图谱

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)04-036-10

Genetic diversity analysis and DNA fingerprinting construction of 61 processed cucumber germplasm resources based on SCoT markers

WANG Hongli¹, ZHAO Jiucheng¹, LAI Miao¹, LU Jiashi², LING Qichang¹, XIAO Jinhua³, ZHANG Hua⁴, FU Xinfeng¹

(1. Qinzhou Branch of Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Qinzhou Institute of Agricultural Sciences, Qinzhou 535000, Guangxi, China; 2. Institute of Flowers, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China; 3. Agricultural and Rural Service Center of Napeng Town, Qinnan District, Qinzhou 535015, Guangxi, China; 4. Agriculture and Rural Service Center of Beitong Town, Pubei County, Pubei 535321, Guangxi, China)

Abstract: In order to find out the genetic diversity of germplasm resources of processed cucumber and provide theoretical basis for the breeding of new varieties, the genetic diversity of 61 processed cucumber germplasm resources was analyzed and DNA fingerprinting was constructed using SCoT technique. The results showed that 8 primers with clear amplification bands, high polymorphism and good repeatability were selected from 100 SCoT primers. A total of 238 loci of 61 cucumber germplasm genomic DNA were amplified by PCR using the selected primers, of which 227 were polymorphic loci, and the average percentage of polymorphic loci was 95.38%. NTSYS-pc 2.1 software was used to calculate the distribution of genetic similarity coefficients among the 61 tested materials between 0.588 and 0.920, and the material with the smallest genetic similarity coefficients was 34 and 55, respectively. There were great differences in melon color, leaf shape and fruit shape, indicating that the two were most loosely related. Based on the genetic similarity coefficient, UPGMA cluster analysis and tree diagram were performed. At the similarity coefficient 0.735, they could be divided into 7 groups. The results indicated that 61 cucumber germplasm material backgrounds were different, but most of the germ-

收稿日期: 2023-12-07; 修回日期: 2023-12-22

基金项目: 广西壮族自治区科技先锋队“强农富民”“六个一”专项行动项目(桂农科盟 20230505)

作者简介: 王宏利, 男, 农艺师, 研究方向为黄瓜、百香果栽培及育种。E-mail: whl@gxaas.net

通信作者: 付鑫锋, 男, 高级农艺师, 主要从事黄瓜、百香果栽培与育种研究工作。E-mail: xfengf@gxaas.net

plasm sources were similar, and germplasm from similar habitats were grouped together in the same group. Sixty-one cucumber germplasm resources could be identified by DNA fingerprinting of SCoT 12 and SCoT 83, which could provide scientific basis for classification and identification of cucumber.

Key words: Cucumber; SCoT molecular marker; Genetic relationship; Genetic diversity; DNA fingerprinting

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是世界上主要蔬菜之一,也是我国保护地栽培面积最大的蔬菜作物,含有丰富的矿质营养和维生素,具有较高的食用价值、营养价值和药用价值,深受消费者的喜爱^[1]。加工型黄瓜指主要用于腌制加工的黄瓜,以白皮或黄皮黄瓜为主,特点是瓜条顺直油亮、大小中等、色泽好。广西北部湾地区种植加工型黄瓜历史悠久,桂南地区的钦州市、北海市以得天独厚的自然条件,加工黄瓜种植面积常年维持在 1 万 hm² 以上,其中尤以钦州市最具规模,种植面积占比可达 70%。由于用于腌制加工的黄瓜没有专用品种,生产上主栽品种以农家自留种为主,造成多数种质资源的遗传背景不明确,品种同质化严重。且随着复种指数的提高,传统种植区域连作障碍凸显,退化变异严重,导致雌花率低、产量低、品相差、抗病性弱等问题突出,严重制约了加工型黄瓜产业的健康可持续发展。因此,建立快速有效的加工型黄瓜种质资源创新评价体系,发掘优异基因,是亟待解决的关键问题。

黄瓜新品种培育一般通过形态学鉴定,从大量种质资源中选择具有优良性状的亲本,通过杂交的方式培育新品种。黄瓜属于雌雄同株异花授粉植物,杂交后代中存在着较多的遗传变异,因此,只采用形态学、细胞学等传统方法分析黄瓜的遗传结构及亲缘关系具有一定的局限性,也无法直接全面解释其所具有的遗传多样性。随着分子标记技术的出现和发展,极大地加速了植物科学分子层面的研究,多种标记已被广泛用于作物种质遗传多样性研究^[2],为更好地研究黄瓜分子作用机制提供了新方法、新思路。目前,已有多种分子标记在黄瓜上得到了应用。Sahoo 等^[3]以 11 对 ISSR 引物对 14 个黄瓜基因型进行分子鉴定和遗传多样性分析,结果表明,14 个黄瓜基因型间遗传相似性介于 0.36~0.83 之间,种间差异较大;Manohar 等^[4]使用 23 条 RAPD 引物和 18 条 ISSR 引物对印度卡纳塔克邦 39 份黄瓜种质资源的遗传多样性进行分析,筛选出 CSC 83 和 CSC 71 两份优质材料;Innark 等^[5]使用 20 个 ISSR 标记对 40 份黄瓜种质资源进行分析,系统发育树和主成分分析揭示黄瓜霜霉病与种质来源存在相关性;Mliki 等^[6]使用 RAPD 标记对来自阿尔及利亚、埃及、埃塞俄比亚、肯尼亚和利比亚等 5 个非

洲国家的 26 份黄瓜种质资源的遗传多样性进行分析,认为类群一中的埃及种质具有独特的遗传变异;刘亚婷等^[7]以 48 份黄瓜种质资源为材料,利用 SRAP 分子标记对其进行鉴定,得出了形态学标记和 SRAP 分子标记的聚类结果存在较大差异的结论。姚丹青等^[8]利用 SNP 标记对市场上销售的 71 份黄瓜品种进行遗传多样性分析,证明 30 个 SNP 位点的基因分型数据信息可以将 71 份黄瓜品种区分开来;史建磊等^[9]以 48 份黄瓜自交系为试材,利用 37 对 SSR 引物对其进行聚类分析和指纹图谱构建,以探究华南型黄瓜种质的遗传多样性及亲缘关系。目标起始密码子多态性标记(start codon targeted polymorphism, SCoT)由 Collard 等于 2009 年首次提出,是近年来广泛用于种质鉴定和亲缘关系分析的新型分子标记,具有稳定性强、多态性高、成本低廉及引物通用性高等优势,在葡萄、核桃、铁皮石斛、柠檬等多种经济作物中得到了应用^[10-14],但在加工型黄瓜中尚未见到此类报道。笔者以加工型黄瓜主产区广西钦州市及从山东省青岛市、福建省福州市和厦门市等地收集来的 61 份优质种质资源作为研究对象,首次在加工型黄瓜上使用 SCoT 分子标记进行种质资源遗传多样性分析和亲缘关系鉴定,旨在从分子生物学水平揭示加工型黄瓜种质资源遗传多样性信息,以为加工型黄瓜种质资源分类、鉴定、保护和开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

笔者从广西钦州市、山东青岛市及福建福州市和厦门市等黄瓜种植基地收集了 61 份加工型黄瓜种质材料,于 2023 年 2 月 10 日在广西钦州市农业科学研究所久隆试验基地种质资源圃内进行穴盘(72 孔,53 cm×27 cm)育苗,后移植于温室大棚内,每份材料各定植 20 株,定植间距 50 cm,垄台高度 15 cm,定植后,浇足定植水后 3 d 内禁止浇水,3 d 后浇 1 次缓苗水,温室大棚内白天温度控制在 24~28 ℃,晚上温度控制在 13~15 ℃。在黄瓜结瓜期,每份材料采集植株嫩叶,液氮速冻后-80 ℃保存。黄瓜种质来源地及田间表型性状特征见表 1。

表 1 61 份加工型黄瓜种质资源收集地及其主要表型性状
Table 1 Germplasm sources of 61 processed cucumbers and their main phenotypic characters

编号 ID	品种编码 Species code	品种类型 Type of species	种质来源地 Germplasm source	表型性状 Phenotypic characters
1	S2016-1-3-2-1-2-5-2	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
2	S2016-5-1-2-1-1-1-1	纯系 Pure line	山东省青岛市 Qingdao, Shandong	中长棒, 白绿, 雌性强 Medium to long rod shape, white with green in the middle, strong in females
3	S2016-6-1-h-1-h-3-2	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 白绿, 雌性强 Medium to long rod shape, white with green in the middle, strong in females
4	S2016-8-3-1-5-1-1-2	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
5	S2016-10-h-1-5-1-3-1	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短棒, 黄白 Short rod shape, yellow with white in the middle
6	S2016-11-3-h-2-1-1-3	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短圆筒形, 黄绿, 早熟 Short cylindrical, yellow with a green tint, early maturing
7	S2017-1-h-1-2-1-3	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短圆筒形, 黄绿, 早熟 Short cylindrical, yellow with a green tint, early maturing
8	S2017-2-h-1-3-1-5	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
9	S2017-3-2-1-4-1-1	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短棒, 黄绿 Short rod shape, yellow with a green tint
10	S2017-5-1-4-1-2-2	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 白绿, 雌性强 Medium to long rod shape, white with green in the middle, strong in females
11	S2017-6-1-1-3-2-1	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
12	S2017-7-2-1-2-2-3	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
13	S2017-8-1-1-2-1-1	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短棒, 黄白 Short rod shape, yellow with white in the middle
14	S2017-9-5-2-1-5-1	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
15	S2017-10-2-1-6-2-2	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
16	S2017-12-1-4-1-2-1	杂交种 Hybridize	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄白, 雌性强 Medium to long rod shape, yellow with white stripes, strong in females
17	S2018-2-2-1-3	杂交种 Hybridize	广西玉林市 Yulin, Guangxi	中长棒, 黄绿, 雌性强 Medium length rod shape, yellow with green in the middle, strong in females
18	S2018-3-5-2-1	杂交种 Hybridize	江西省丰城市 Fengcheng, Jiangxi	长棒, 白绿, 雌性强 Long rod shaped, white with a green tint, strong in femals
19	S2018-5-2-1-1	杂交种 Hybridize	福建省福州市 Fuzhou, Fujian	中长棒, 黄绿, 雌性强 Medium length rod shape, yellow with green in the middle, strong in females
20	S2018-6-1-3-2	杂交种 Hybridize	福建省厦门市 Xiamen, Fujian	中长棒, 黄白, 雌性强 Medium to long rod shape, yellow with white stripes, strong in females
21	S2018-7-1-1-3	杂交种 Hybridize	广西横州市 Hengzhou, Guangxi	长棒, 黄白, 雌性强 Long rod shaped, yellow with white stripes, strong in femals
22	S2019-1	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄白, 雌性强 Medium to long rod shape, yellow with white stripes, strong in females
23	S2019-2	纯系 pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
24	S2019-4	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
25	S2019-5	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
26	S2019-7	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	长棒, 黄白 Long rod shape, yellow with white in the middle

表 1(续)
Table 1(Continued)

编号 ID	品种编码 Species code	品种类型 Type of species	种质来源地 Germplasm source	表型性状 Phenotypic characters
27	S2019-9	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
28	S2019-10	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
29	S2019-11	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短棒, 黄绿, 雌性弱 Short rod shaped, yellow with a green tint, weak in females
30	S2019-16	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
31	S2019-19	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
32	S2019-23	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
33	S2020-2	杂交种 Hybridize	广西玉林市 Yulin, Guangxi	长棒, 黄白 Long rod shape, yellow with white in the middle
34	S2020-3	杂交种 Hybridize	广东省深圳市 Shenzhen, Guangdong	长圆筒形, 黄白, 雌性强 Long cylindrical, yellow with a white tint, strong in females
35	S2020-4	杂交种 Hybridize	山西省晋中市 Jinzhong, Shanxi	中长棒, 黄绿, 雌性强 Medium to long rod shaped, yellow with a green tint, strong in females
36	S2020-5	纯系 Pure line	广西桂林市 Guilin, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
37	S2020-7	纯系 Pure line	广西桂林市 Guilin, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
38	S2020-8	纯系 Pure line	广西桂林市 Guilin, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
39	S2020-9	纯系 Pure line	广西桂林市 Guilin, Guangxi	短棒, 黄绿 Short rod shape, yellow with a green tint
40	S2020-10	纯系 Pure line	广西桂林市 Guilin, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
41	S2020-11	纯系 Pure line	广西桂林市 Guilin, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
42	S2021-2	纯系 Pure lines	广西柳州市 Liuzhou, Guangxi	中长棒, 黄白 Medium to long rod shape, yellow with white stripes
43	S2021-3	纯系 Pure line	广西柳州市 Liuzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
44	S2021-5	纯系 Pure line	广西柳州市 Liuzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
45	S2021-6	纯系 Pure line	广西柳州市 Liuzhou, Guangxi	短棒, 黄白 Short rod shape, yellow with white in the middle
46	S2021-7	杂交种 Hybridize	广东省阳春市 Yangchun, Guangdong	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
47	S2021-8	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
48	S2021-9	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
49	S2021-10	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	短棒, 黄白 Short rod shape, yellow with white in the middle
50	S2021-11	杂交种 Hybridize	安徽省合肥市 Hefei, Anhui	长棒, 黄绿 Long rod shaped, yellow with a green tint
51	S2022-2	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
52	S2022-3	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle

表 1(续)
Table 1(Continued)

编号 ID	品种编码 Species code	品种类型 Type of species	种质来源地 Germplasm source	表型性状 Phenotypic characters
53	S2022-4	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
54	S2022-6	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
55	S2022-7	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄白, 雌性强 Medium to long rod shape, yellow with white stripes, strong in females
56	S2022-8	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
57	S2022-9	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
58	S2022-10	纯系 Pure line	广西北海市 Beihai, Guangxi	短圆筒形, 黄绿 Short cylindrical, yellow with a green tint
59	S2022-11	纯系 Pure line	山东省济南市 Jinan, Shandong	中长棒, 黄白, 雌性强 Medium to long rod shape, yellow with white stripes, strong in females
60	S2022-13	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle
61	S2022-14	纯系 Pure line	广西钦州市 Qinzhou, Guangxi	中长棒, 黄绿 Medium length rod shape, yellow with green in the middle

1.2 黄瓜材料DNA基因组提取

使用天根多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN, Germany)从上述冻存的 61 份黄瓜叶片样本中分别提取 10 μg 总 DNA,以 DNA 浓度、纯度及完整性为主要参考指标,使用 Agilent2100 bioanalyzer 对其进行质检,质检合格后,于-20 °C冰箱保存备用。

1.3 引物筛选及 SCOT-PCR 扩增

试验采用由北京擎科生物科技有限公司合成的 100 对 SCoT 通用引物序列,选用表型性状差异较大的黄瓜种质 DNA 对其进行筛选,以扩增条带清晰、多态性高、稳定性强为标准,筛选出特异性好质量高的引物对所有供试样品进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.4 μL,cDNA 模板 1.0 μL,2×SG Green qPCR Mix 10.0 μL,ROX 0.4 μL,ddH₂O 7.8 μL。扩增程序:95 °C预变性 5 min;95 °C变性 20 s,55 °C退火 15 s,60 °C复性 30 s,72 °C延伸 5 min,共 35 个循环。扩增产物放置于 4 °C冰箱中保存。取 10 μL PCR 扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测,使用 Bio-Rad 全自动免染凝胶成像分析系统进行扫描拍照。

1.4 数据处理

对扩增后的 SCoT 条带的有无进行标注统计,在同一迁移水平下,有 DNA 扩增条带或弱带的赋值为 1,没有条带的赋值为 0,构建二进制数据矩阵。将数据矩阵导入分子生物学统计软件 NT-

SYS-pc 2.1 进行遗传相似系数计算、UPGMA 聚类分析及绘制树状图。根据聚类结果,筛选出可鉴别供试材料的引物,使用该引物组合的二进制数据矩阵,手动构建 DNA 指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

Agilent2100 bioanalyzer 平台质检结果显示,提取的黄瓜 DNA 质量浓度在 55~90 ng·μL⁻¹之间,纯度较高,无蛋白质和 RNA 污染,无拖尾现象,质量符合 SCoT 分子标记试验要求(图 1)。

2.2 引物筛选与 PCR 扩增

采用表型性状差异较大的 34 号和 55 号 2 份黄瓜基因组 DNA 对 100 对 SCoT 通用引物进行初步筛选,最终得到 8 对扩增效果较理想的引物(表 2),利用该引物分别对所有黄瓜供试材料进行 PCR 扩增,扩增条带分子质量范围为 100~5000 bp。共统计到清晰条带 238 条,其中多态性条带 227 条,多态性比率为 95.38%;每对 SCoT 引物扩增条带变化范围在 21~39 条,平均为 29.75 条,多态性条带变化范围 18~39 条,平均为 28.375 条,每对 SCoT 引物扩增多态性百分率变幅为 85.71%~100.00%。扩增条带数最多的引物为 SCoT 12,共扩增出 39 条条带,最少的为 SCoT 28,仅扩增出 21 条条带。以上结果说明筛选出的 SCoT 引物多态性检测效率高且供试材料间的异质性较高,遗传多样性丰富,可

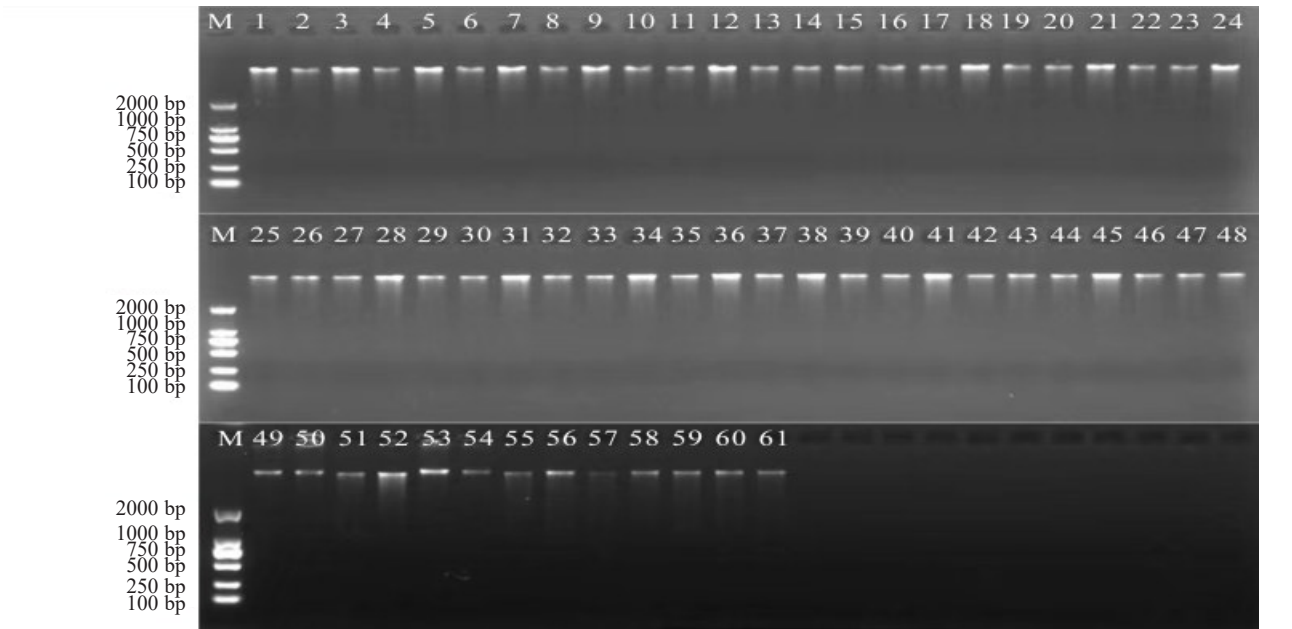


图1 61份黄瓜种质 DNA 电泳结果

Fig. 1 DNA electrophoresis results of 61 cucumber germplasm resources

表2 适用于61份加工型黄瓜材料的SCoT引物的扩增结果

Table 2 Amplification results of SCoT primers applicable to 61 processed cucumber materials

引物 ID Primer ID	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物序列 Primer sequence(3'-5')	条带大小 Size /bp	总条带数 TNB	多态性条带数 NPB	多态性比率 Polymorphic rate/%
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	TGCTGTACCGCTGGTTGC	230~5000	39	39	100.00
SCoT28	ACGACATGGCGACCCACT	TGCTGTACCGCTGGGTGA	250~3000	21	18	85.71
SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG	GGTACCGATGGTGGCCGC	230~5000	33	31	93.94
SCoT40	ACGACATGGCGACCACGT	TGCTGTACCGCTGGTGCA	150~3000	24	24	100.00
SCoT67	ACCATGGCTACCAGCGGC	TGGTACCGATGGTCGCCG	200~3500	25	23	92.00
SCoT74	CCATGGCTACCACCGGCA	GGTACCGATGGTGGCCGT	200~5000	34	31	91.18
SCoT83	ACGACATGGCGACCAGCG	TGCTGTACCGCTGGTCGC	100~3000	37	37	100.00
SCoT88	ACGACATGGCGACCACGT	TGCTGTACCGCTGGTGCA	400~4300	25	24	96.00
合计 Total				238	227	95.38
平均 Average				29.75	28.375	94.85

用于对供试的黄瓜种质材料进行遗传多样性分析。图2为SCoT12引物对所有供试材料DNA的PCR扩增结果。

2.3 黄瓜遗传多样性分析

利用8条引物扩增的条带建立61份黄瓜种质资源的遗传相似系数矩阵,计算获得不同黄瓜种质材料的遗传相似系数在0.588~0.920之间,平均为0.754,其中,34号与55号种质材料的遗传相似系数最小,为0.588,他们在瓜色、叶片形状及果实形状方面存在较大差异,说明其亲缘关系最远。而46号与47号种质的相似系数最大,为0.920,他们在形态上较相似,说明其亲缘关系相近。

2.4 61份黄瓜材料亲缘关系分析

为了更直观地展示不同品种的亲缘关系,在获

得遗传相似系数矩阵后,利用SHAN模块中的UP-GMA对61份供试材料进行聚类分析,并通过Tree plot模块生成聚类树状图。由图3可知,8对SCoT引物的扩增结果在遗传相似系数为0.735处将61份黄瓜种质聚为7个类群,A类群为34号;B类群为16号;C类群为29号;D类群为6号和7号;E类群为2、3和10号;F类群为13和49号;G类群为其他材料。A类群只有一份34号黄瓜材料,单独聚为一类,该材料为从广东省深圳市引进的优质栽培种,在田间农艺性状表现为果实长圆筒形,果皮黄白色,叶缘呈全缘状且具有强雌性,与其余种质材料表现出明显的差异。2、3和10号聚为一类,其亲缘关系可能较近。2号为从山东省青岛市城阳区收集的材料,与3和10号材料中长棒果形和白

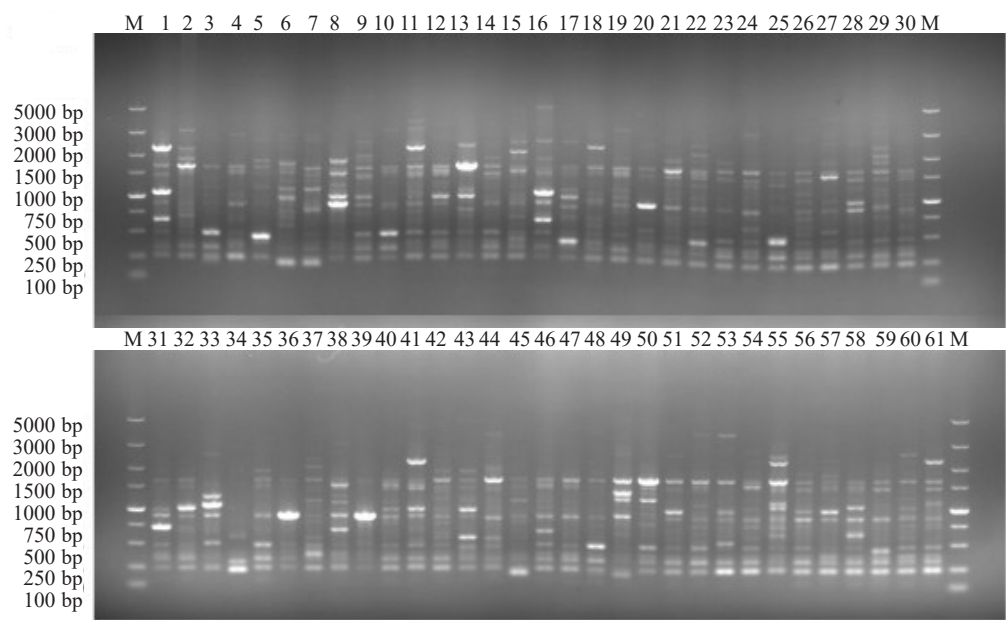


图 2 SCoT12 引物对 61 份供试材料的扩增结果
Fig. 2 Amplification result of 61 test materials by SCoT12 primer

绿色果色的外观保持一致。16、29 和 34 号单独聚为一类,与其余 58 份黄瓜种质亲缘关系较远。在遗传相似系数为 0.765 处将 G 类群 51 份种质聚为 3 个亚类,a 亚类包括 6 份种质,为 1、4、5、15、17 和 37 号,b 亚类仅有 1 份种质,编号为 18,c 亚类包括 44 份黄瓜种质。其中,46 号和 47 号材料遗传相似系数最大,可合理推断在广西灵山县佛子镇龙渊村种植的黄瓜品种为市场购买商品种而非广西钦州市本地自留种,且可能与阳江市农村农资店售卖的种子为同一品种。从总体聚类结果来看,地域来源相近、生境相似地区的广西原产黄瓜种质资源遗传关系较近,它们大部分被聚在同一类群内,具有一定的地域分布规律。

2.5 61 份黄瓜种质构建 DNA 指纹图谱

通过筛选出的 8 对 SCoT 引物对 61 份黄瓜种质的扩增,结果表明,结合特异性引物的条带分辨率及重复性高低,比对发现引物 SCoT 12 和 SCoT 83 均可单独鉴别出 61 份加工黄瓜种质资源。以黑色表示该位点有条带,无色表示该位点无条带,使用引物 SCoT 12 和 SCoT 83 绘制该供试材料的 DNA 指纹图谱(图 4 和图 5)。其指纹图谱反映了供试的每份种质都有唯一的扩增谱带,通过其指纹图谱可快速地区分黄瓜种质类型并将其准确鉴定出来。

3 讨论与结论

广西钦州市是全国加工型黄瓜的发源地,也是

全国主要种植集中地,种质资源地方特征明显,品种混杂,如何对当地主栽优质品种进行分类、鉴定且有效利用所蕴藏的优异基因,开展分子设计育种,从而快速定向对其进行品种改良及创新,是当前黄瓜育种工作的方向。

DNA 分子标记技术能有效地结合作物的表型和基因型对物种间的遗传多样性进行鉴定,且比传统的表型性状更科学准确,是检测种质资源遗传多样性的有效工具,可显著提高育种效率。目前用于辅助育种和种质资源遗传多样性评价较为广泛的分子标记有 RFLP、RAPD、SSR、ISSR、SCAR、IPBS、AFLP 和 SCoT 等^[15-18]。SCoT 是一种基于翻译起始点位的新型目的基因分子标记,他不仅能获得与性状联系紧密的目的基因,而且能对性状进行跟踪。同其他类型的遗传标记相比,SCoT 标记具有操作简单、成本低廉、多态性高、引物通用性强等优点,能有助于更好地从分子水平上揭示不同种质资源的遗传背景及种间的亲缘关系^[19]。在笔者的研究中,使用 SCoT 分子标记分析了 61 份黄瓜种质资源,结果表明,8 对 SCoT 引物共扩增出 238 条清晰的条带,其中 227 个具有多态性,多态性条带比率为 95.38%,高于前人利用其他分子标记对黄瓜相关种质进行遗传多样性评价的结果。张桂华等^[20]以 23 份不同来源的黄瓜材料进行 AFLP 分析,多态性条带比率为 19.5%;王惠哲等^[21]对 4 种不同类型 28 份黄瓜种质材料利用 49 对 SRAP 引物进行遗传差异分析,多态性条带比率为 46.5%;金庆敏等^[22]

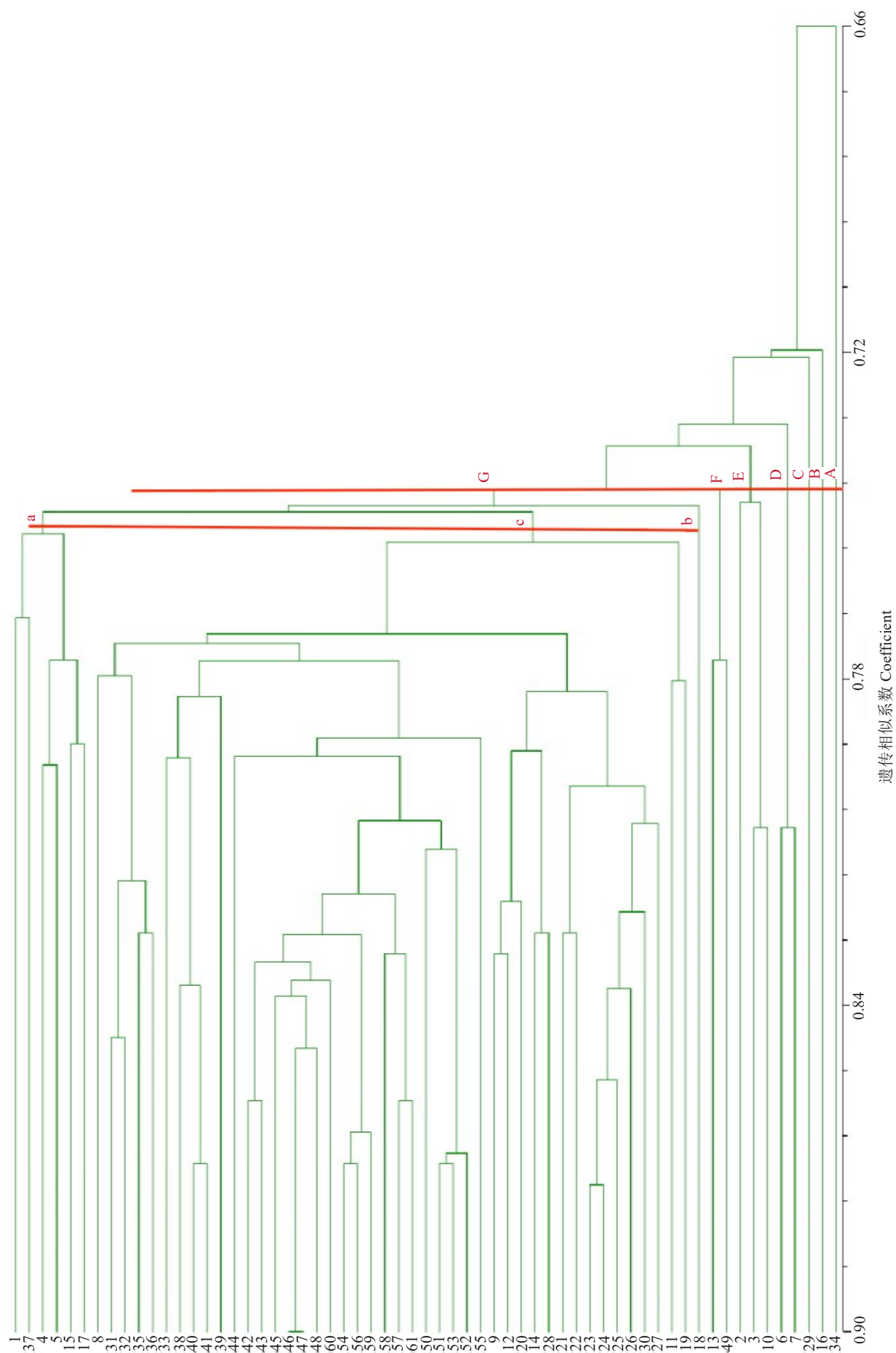


图3 基于SCoT分析的61份供试材料的UPGMA聚类图
Fig. 3 UPGMA clustering diagram of 61 test materials based on SCoT analysis

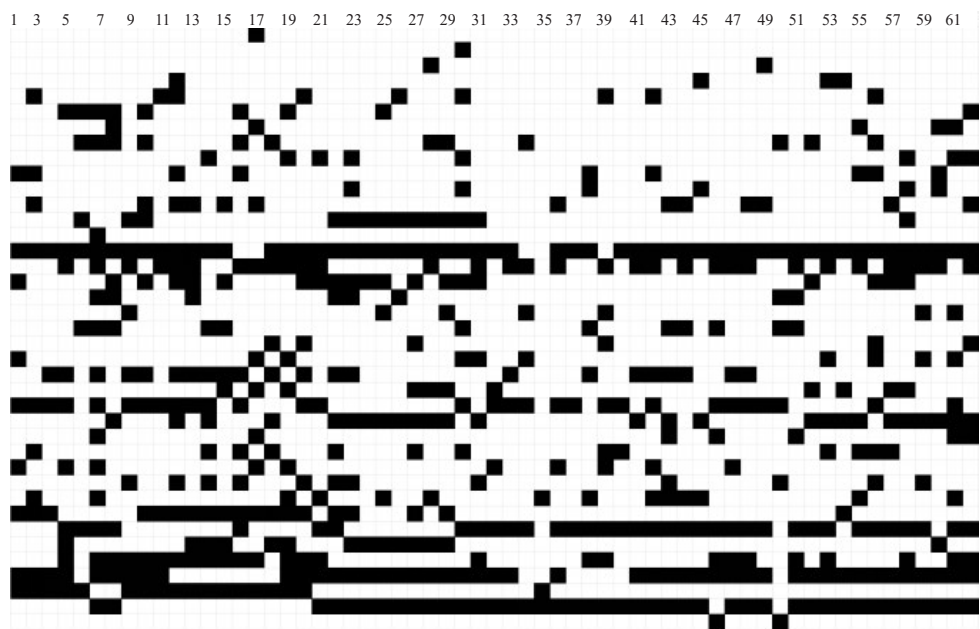


图 4 利用引物 SCoT 12 构建的 61 份黄瓜种质资源 DNA 指纹图谱

Fig. 4 DNA fingerprinting of 61 cucumber germplasm resources constructed by primer SCoT 12

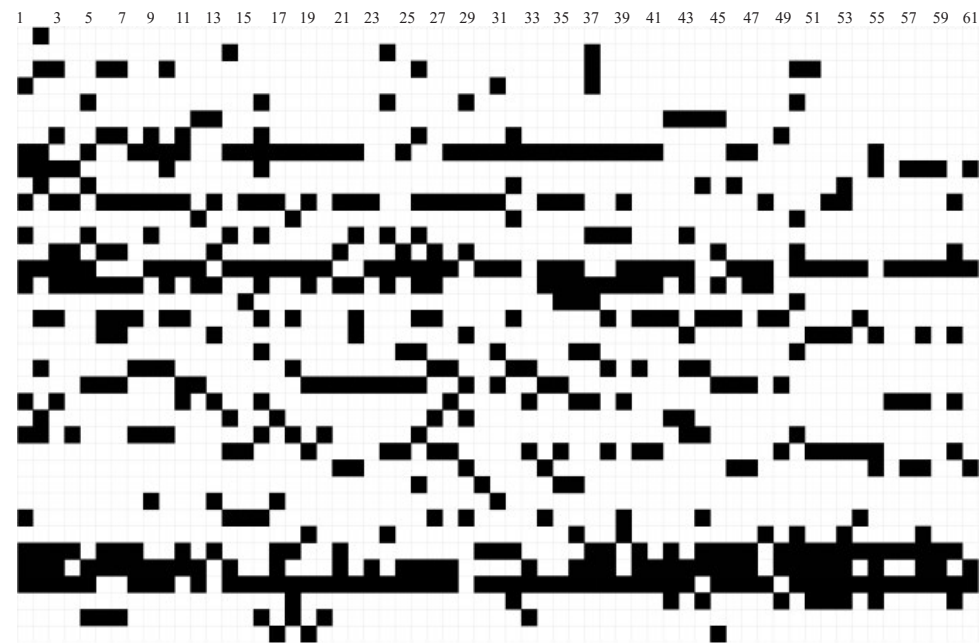


图 5 利用引物 SCoT 83 构建的 61 份黄瓜种质资源 DNA 指纹图谱

Fig. 5 DNA fingerprinting of 61 cucumber germplasm resources constructed by primer SCoT 83

以 50 份来自全国各地的黄瓜核心种质资源为试验材料,利用 32 对 SSR 引物进行遗传多样性分析,多态性条带比率值为 77.1%。以上结果说明与其他类型分子标记相比,SCoT 分子标记应用在黄瓜种质上具有丰富的多态性,检测出多态性位点较丰富,能为黄瓜种质的初步鉴定、遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建等研究奠定基础。

种质资源是种业原始创新的物质基础,突破性新品种的育成多来自于特异优良遗传资源的发现和利用。有研究认为生态环境的差异会导致作物

种质在长期进化过程中逐步演化出不同的种群和变异种^[23]。笔者研究的种质资源采集于自然气候条件差异较大的不同省份,气候的多样化和地形的错综复杂可能促使黄瓜种质具有更高的遗传多样性。聚类结果表明,从国内不同区域收集来的 61 份黄瓜种质材料可划分为七大类群,种质资源间的遗传相似系数分布在 0.588~0.920 之间。王蕾等^[24]对来源不同的 32 份黄瓜栽培品种使用 17 对多态性高、条带清晰的 SSR 引物进行遗传多样性分析,遗传相似系数分布在 0.560~0.947 之间;姚丹青等^[8]

基于 SNP 标记对 71 份黄瓜品种进行遗传多样性分析,遗传相似系数分布在 0.403 2~0.983 9 之间;卢霞等^[25]利用 InDel 标记对 48 份黄瓜自交系进行遗传多样性分析,遗传相似系数分布在 0.44~1.00 之间。笔者的研究结果与以上 SSR、SNP 及 InDel 3 种分子标记分析结果大体一致,都表明黄瓜种质资源间遗传多样性较为丰富。因此,在进行黄瓜种质资源创新利用时,为拓宽遗传基础的范围,应从华南和华北黄瓜主栽区气候条件差异较大的区域内开展优异种质的引进,充分挖掘和利用多样化地方品种和引进的外来优异种质,从而为黄瓜优良种质的筛选和改良提供种源支撑。

DNA 指纹图谱集精确、简单快速和受时空条件限制小等优点,是鉴别作物品种、品系的有力工具,已广泛应用于多种作物的品种资源多样性和纯度鉴定研究。目前植物 DNA 指纹图谱的构建有引物组合法、单引物法和特征谱带法 3 种方式^[26]。由于黄瓜种质资源具有较为复杂多样的遗传背景,基于黄瓜瓜色、瓜型和雌性强弱的传统形态学鉴定方法往往难以区分不同种质之间的遗传差异。笔者从 8 对扩增引物中筛选出 SCoT 12 和 SCoT 83 两对遗传多态性较高的 SCoT 引物,使用特征谱带法构建了 61 份黄瓜种质的 DNA 指纹图谱,每份种质都有其唯一对应的 DNA 指纹图谱。指纹图谱能有效地对黄瓜种质资源进行精准鉴定和评价,有助于发掘和利用黄瓜种质资源的遗传多样性,从而提高其品种选育的效率和成功率。

综上所述,笔者的研究明确了 61 份加工型黄瓜种质资源的遗传变异相近程度,使用的 8 对 SCoT 引物,共扩增出 238 个位点信息,其中多态性位点 227 个,具有较多的遗传信息,构建的指纹图谱能快速准确地鉴定不同黄瓜品种材料。研究结果为加工型黄瓜种质资源评价、鉴定和新品种选育奠定了重要基础。

参考文献

- [1] 李亚航,施艳娥,丁卓,等. 黄瓜主要农艺性状分子标记研究进展[J]. 中国瓜菜, 2023, 36(10): 1-9.
- [2] 吴仕蔓,娄兵海,陈传武,等. 应用 SSR 荧光标记法构建 22 个柚类品种的分子身份证[J]. 果树学报, 2023, 40(4): 605-614.
- [3] SAHOO T R, SINGH D K, SINGH N K. Genetic diversity analysis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) genotypes based on ISSR markers[J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2020, 9(2): 2131-2136.
- [4] MANOHAR S H, HOSAKATTE N M, RAVISHANKAR K V. Genetic diversity in a collection of *Cucumis sativus* L. assessed by RAPD and ISSR markers[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2012, 22(2): 241-244.
- [5] INNARK P, RATANACHAN T, KHANOBDEE C, et al. Downy mildew resistant/susceptible cucumber germplasm (*Cucumis sativus* L.) genetic diversity assessment using ISSR markers[J]. Crop Protection, 2014, 60: 56-61.
- [6] MLIKI A, STAUB J E, ZHANGYONG S, et al. Genetic diversity in african cucumber (*Cucumis sativus* L.) provides potential for germplasm enhancement[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50: 461-468.
- [7] 刘亚婷,罗英,曾仁杰,等. 黄瓜种质资源形态学标记和 SRAP 标记的遗传多样性分析[J]. 中国农学通报, 2017, 33(18): 35-41.
- [8] 姚丹青,楼坚锋,朱文莹,等. 基于 SNP 标记的黄瓜遗传多样性分析[J]. 上海农业学报, 2017, 33(1): 21-30.
- [9] 史建磊,陈先知,王克磊,等. 华南型黄瓜种质遗传多样性的 SSR 分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(6): 2440-2449.
- [10] COLLARD B C Y, MACKILL D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27(1): 86-93.
- [11] 马玉姣,何西堂,吴玉森,等. 基于 SCoT 分子标记的 37 份葡萄种质遗传多样性分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2023(4): 18-23.
- [12] 万雯,潘鸿,马涛,等. 基于 SCoT 分子标记的广西山核桃种质资源遗传多样性和群体遗传结构分析[J/OL]. 分子植物育种, [2023-03-29]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230329.1029.006.html>.
- [13] 高曼熔,杨天为,黄诗宇,等. 广西野生铁皮石斛 SCoT 体系优化及遗传多样性分析[J/OL]. 分子植物育种, [2023-08-30]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.s.20230830.0912.002>.
- [14] 葛聪聪,王亚娜,李鸾翔,等. 香水柠檬×白花柠檬群体子代表型及遗传变异分析[J]. 果树学报, 2022, 39(2): 169-183.
- [15] 李欢,张文洋,田志强,等. 高通量分子标记检测方法的研究进展[J]. 玉米科学, 2022, 30(3): 1-9.
- [16] 孙蕾倩,马燕,李哲,等. iPBS 分子标记研究进展[J]. 分子植物育种, 2022, 20(1): 232-238.
- [17] 张珺,孔维鹏,刘丽平,等. ISSR 分子标记在果蔬资源上的应用及研究进展[J]. 现代农业科技, 2019(4): 45-47.
- [18] 杨梦婷,黄洲,干建平,等. SSR 分子标记的研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2019, 18(4): 429-436.
- [19] 龙治坚,范理璋,徐刚,等. SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 336-343.
- [20] 张桂华,韩毅科,杨瑞环,等. 黄瓜种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 21-24.
- [21] 王惠哲,李淑菊,管炜. 应用 SRAP 标记分析黄瓜的遗传差异[J]. 生物技术通报, 2009(12): 76-79.
- [22] 金庆敏,林毓娥,吴廷全,等. 50 份黄瓜核心种质的 SSR 标记筛选与聚类分析[J]. 广东农业科学, 2023, 50(9): 39-48.
- [23] 高刚. 国产披碱草属植物的系统与进化研究[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2016.
- [24] 王蕾,王福全,尹惠萍,等. 基于 SSR 标记的黄瓜栽培品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 分子植物育种, 2021, 19(8): 2668-2677.
- [25] 卢霞,刘梦华,邓志军,等. 基于 InDel 标记的黄瓜种质资源遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(1): 49-54.
- [26] 王风格,赵久然,田红丽,等. 农作物品种 DNA 指纹库构建研究进展[J]. 分子植物育种, 2015(9): 2118-2126.