

利用 SSR 标记鉴定西瓜杂交种新喜 3 号纯度

任艺慈¹, 刘喜存¹, 王文英¹, 高展¹, 王向东¹, 郭春江¹, 李江伟²

(1. 新乡市农业科学院 河南新乡 453000; 2. 新乡市农产品质量安全检测检验中心 河南新乡 453000)

摘要: 为了提高杂交种筛选效率, 从 23 对西瓜简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 引物中筛选适用于西瓜杂交种新喜 3 号及其亲本的特异性引物并进行种子纯度鉴定。结果表明, 1 对引物 BVWS00208 在亲本间具有多态性且在杂交后代中兼具双亲条带, 属于共显性标记。将该引物在 98 个杂交后代中进行验证, 纯度鉴定结果为 98.9%, 通过传统田间纯度鉴定结果为 98.0%, 二者误差 $\leq 1\%$ 。综上, SSR 引物 BVWS00208 能够作为特异引物对西瓜杂交种新喜 3 号进行种子纯度鉴定, 且该方法便捷经济, 能为该品种的制种和推广提供技术支持。

关键词: 西瓜; 新喜 3 号; SSR 分子标记; 纯度鉴定

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)08-131-05

Identification of seed purity of watermelon hybrid Xinxi 3 by SSR marker

REN Yici¹, LIU Xicun¹, WANG Wenying¹, GAO Zhan¹, WANG Xiangdong¹, GUO Chunjiang¹, LI Jiangwei²

(1. Xinxian Academy of Agricultural Sciences, Xinxian 453000, Henan, China; 2. Xinxian Agricultural Products Quality and Safety Testing and Inspection Center, Xinxian 453000, Henan, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of hybrid screening, this study screened specific primers suitable for the watermelon hybrid Xinxi 3 and its parents from 23 pairs simple sequence repeat (SSR) primers in watermelon. The results showed that one pair of primers BVWS00208 showed polymorphism between parents and had both parental bands in hybrid offspring, belonging to codominant marker. The primer was validated in 98 hybrid individuals, and the purity identification result was 98.9%. The traditional field test showed the purity was 98.0%, with an error of $\leq 1\%$ between them. This indicates that the primer BVWS00208 can serve as a specific primer for seed purity detection of watermelon hybrid Xinxi 3. The identification is convenient and economical, which can provide technical support for the seed production and promotion of this variety.

Key words: Watermelon; Xinxi 3; SSR molecular marker; Purity test

西瓜 (*Citrullus lanatus*) 属葫芦科一年生植物, 含有果糖、番茄红素、瓜氨酸等营养成分, 是深受消费者青睐的水果之一。经过长期的栽培和育种, 中国已有成百上千个西瓜品种问世^[1]。通过保护地或者热带种植, 西瓜已实现周年化生产, 全年供应。FAO 统计数据表明, 2022 年世界西瓜栽培面积为 291.64 万 hm^2 , 中国的西瓜栽培面积为 139.19 万 hm^2 , 占比 47.73%; 2022 年全球西瓜总产量为 9 995.75 万 t, 中国的西瓜总产量为 6 054.22 万 t, 占比 60.57%, 中国的西瓜栽培面积和

产量均居于世界首位。

随着西瓜产业的不断发展, 市面上西瓜种子行业竞争也日渐激烈。种子质量是影响果实品质、产量、种植者和种子企业经济效益的关键因素^[2]。杂交育种是最基本的育种方法之一, 其后代兼具双亲优势性状, 世界范围内主要作物的优良品种大多通过杂交育种的方法获得^[3]。在杂交种生产过程中, 气候环境、隔离区选择、制种工人操作时机和认真程度等均会影响种子纯度。为保证种子质量、市场占有率以及农户的生产安全, 种子纯度鉴定工作尤为重

收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-06-16

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (222102110361)

作者简介: 任艺慈, 女, 研究实习员, 主要从事西瓜甜瓜育种工作。E-mail: ycamy14@163.com

共同第一作者: 刘喜存, 男, 副研究员, 主要从事西瓜甜瓜育种及病虫害防治工作。E-mail: lxc78zll79@126.com

通信作者: 李江伟, 男, 高级农艺师, 主要从事农业技术推广应用工作。E-mail: lijiangwei8855@126.com

要^[4]。以形态学标记进行纯度鉴定会因作物遗传背景相对狭窄、环境差异等因素而受限制,逐渐不能满足实际生产需要。为了更加准确地鉴定品种纯度,提高鉴定效率,通过 DNA 鉴定的方法越来越受到重视。

DNA 分子标记是能够反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段,是基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的分子标记,结果可靠、重复性好,不仅在大田作物和蔬菜育种中得到应用^[5],在食用菌^[6]、果树^[7]、花卉^[8]中也有广泛应用。西瓜的 DNA 分子标记主要包括随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、插入或缺失 DNA 标记(InDel)、简单重复序列标记(SSR)、相关序列扩增多态性标记(SRAP),基于单核苷酸多态性(SNP)开发的酶切扩增多态性标记(CAPS)等,涉及西瓜的品种选育、种子纯度鉴定、遗传多样性分析、抗病虫

性等研究内容。其中,SSR 分子标记具有共显性、准确性强、对 DNA 质量要求低、检测成本低等优势^[4]。

笔者从 23 对西瓜 SSR 引物中筛选适用于西瓜杂交种新喜 3 号及其亲本的特异性引物并进行种子纯度鉴定,借助分子标记鉴定种子纯度,提高鉴定效率,降低检测成本,以期新品种的开发与推广提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以新乡市农业科学院选育的大果型西瓜品种新喜 3 号(杂交一代)及其亲本为试验材料,新喜 3 号为浅绿色果皮,覆较窄的绿齿条带,果皮坚韧,果实呈椭圆形;母本为圆形果实,浅绿果皮上覆齿条;父本为椭圆形,浅绿果皮覆网状条带(图 1)。



图 1 新喜 3 号(杂交一代)及其亲本
Fig. 1 Xinxì 3(F₁) and parents

1.2 材料培育

2023 年 3 月 25 日,选择新喜 3 号种子 100 粒及其亲本种子各 20 粒,将种子在 55 °C 温水中浸种 6 h,使用 50 孔穴盘(54 cm×28 cm×85 cm)进行播种,选用瓜类专用灭菌基质育苗。材料长至 3 叶 1 心时,于 2023 年 4 月 27 日定植于塑料大棚内,爬地栽培,常规管理。

1.3 西瓜基因组 DNA 提取及检测

待植株长至 2 叶 1 心时,每株取 1 cm² 的嫩叶,编号后液氮速冻带回实验室并存入 -80 °C 超低温冰箱。使用冷冻研磨仪将样品充分研磨,按照改良的 CTAB 法提取 DNA 样本^[9],借助微量核酸蛋白检测仪检测 DNA 质量及浓度,并将样品稀释至 50 ng·μL⁻¹,放置在 -20 °C 冰箱内备用。

1.4 分子鉴定

试验用 23 对 SSR 引物来自张慕月^[10]。PCR 反应体系:DNA 模板 0.5 μL,正、反向引物各 0.5 μL, 2×PCR Mix 5.0 μL,ddH₂O 补齐至 10.0 μL。PCR 反应程序:94 °C预变性 5 min;94 °C变性 30 s,根据不同引物设置退火温度,退火 30 s,72 °C延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C延伸 10 min,放于 4 °C保存。利用 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,采用银染法借助胶片观察灯观察条带^[2]。

1.5 纯度鉴定

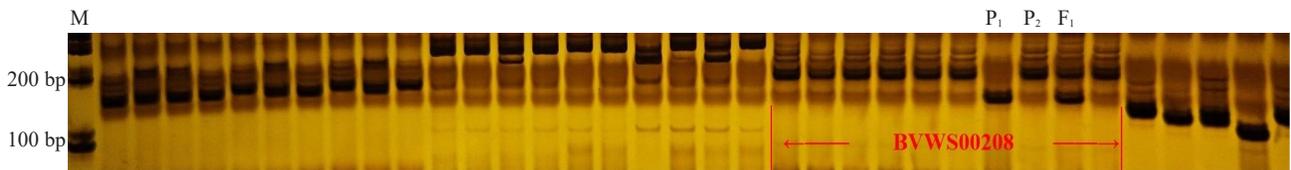
定植后对新喜 3 号进行日常栽培管理,于 2023 年 7 月 2 日在果实成熟期统计果实皮色、果实形状、果肉颜色等农艺性状,通过形态学标记判断杂

交种纯度。结合筛选出的具有特异性的 SSR 引物,通过 DNA 分子标记技术鉴定种子纯度,同时显现双亲的条带类型即视为真杂种。

2 结果与分析

2.1 特异性引物筛选

选取 23 对西瓜 SSR 引物在新喜 3 号及其亲本材料中进行多态性筛选。有一对引物 BVWS00208 (上游引物序列:GCAAAGATTGTCTATGAAGCAGCA;下游引物序列:GCTCATTGGCTTCTTGAATCTGTT)在双亲中呈现单条带,且具有显著差异,在杂交种中呈现双亲条带,具有互补性和共显性,详见图 2。初步判断该引物可作为



注:M代表 500 bp DNA Marker;P₁为父本;P₂为母本;F₁为新喜 3 号杂交种单株。

Note: M represents 500 bp DNA Marker; P₁ represents male; P₂ represents female; F₁ represents Xinxin 3 individual of hybrids.

图 2 引物 BVWS00208 对新喜 3 号亲本及杂交种的电泳鉴定

Fig.2 Primer BVWS00208 was used to identify the purity of Xinxin 3 and its parents

新喜 3 号品种的特异性引物,进行纯度鉴定。

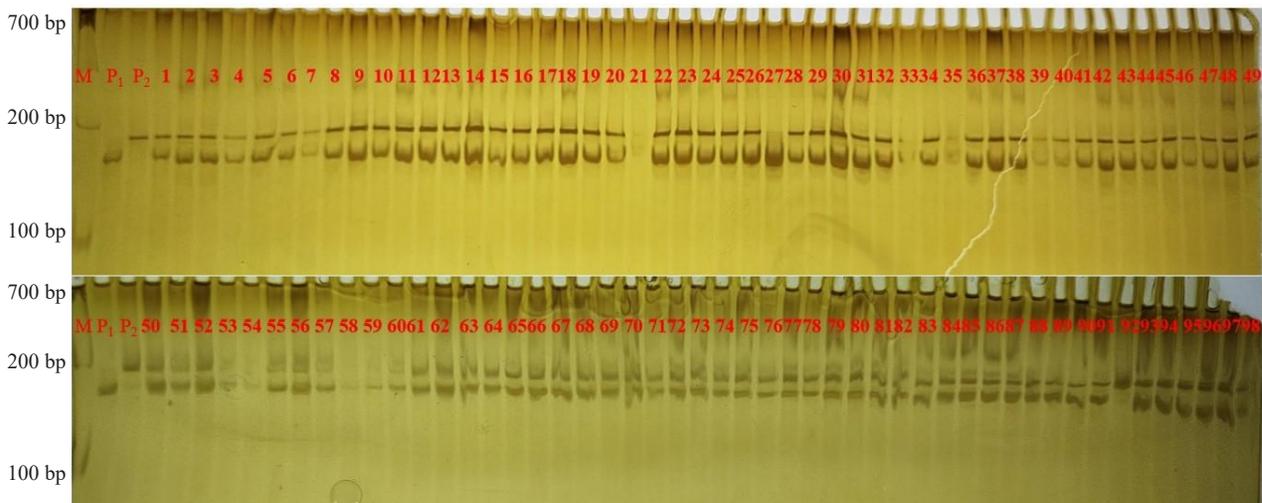
2.2 多态性引物的重复性检验

利用引物 BVWS00208 对 98 份 F₁代新喜 3 号进行种子纯度鉴定,扩增条带如图 3 所示,除去不明显的 5 份材料(编号 21、35、54、58、59),其余 92

份材料的条带大小一致,具有双亲的条带特征,1 份材料(编号 92)的条带表现与母本(P₂)一致,纯度鉴定结果为 98.9%。

2.3 形态学鉴定

在果实成熟期利用形态学标记对品种纯度进



注:M代表 500 bp DNA Marker;P₁为父本;P₂为母本;1~98 为新喜 3 号杂交种单株。

Note: M represents 500 bp DNA Marker; P₁ represents male; P₂ represents female; 1-98 represents Xinxin 3 individual of hybrids.

图 3 引物 BVWS00208 对新喜 3 号的纯度鉴定

Fig.3 Purity identification of Xinxin 3 by primer BVWS00208

行田间鉴定,发现西瓜的果实外观、瓤质瓤色一致性较好,表现为浅绿色果皮覆较窄的绿齿条带,果皮坚韧,果实呈椭圆形。仅有2株果实性状与母本特征相似,表现为圆形果实,浅绿果皮上覆绿齿条,由此可得杂交种纯度为98.0%。

3 讨论与结论

目前依托传统形态学标记的植物特异性、一致性、稳定性测试受主观或者环境因素影响,对育种材料或品种间的差异描述逐渐不能满足实际需要^[10]。西瓜、甜瓜作为非主要农作物,进行品种保护、种子经营需要向农业农村部申请新品种保护或登记。为了有效管理已登记的品种,自2021年起,向日葵、黄瓜、甜瓜登记品种利用DNA分子鉴定技术进行了清退相似品种的工作,已连续开展三批,以后将会在其他作物中应用^[2]。不论是育种者个人还是公司、检测机构,均会逐步完善遗传背景的描述,防止恶意竞争,维护育种者的知识产权不受侵害。

SSR标记具有检验速度快、成本低、标记分布均匀、准确性高的特点,在种子纯度鉴定方面发挥了重要作用。何玉等^[13]在28对SSR标记中筛选出了5对多态性好的SSR,并利用BVWS00839标记检验西瓜品种W1806的纯度。尤佳琪等^[14]利用SSR标记对黑津和申蜜968这两个西瓜品种进行纯度检测,鉴定结果高效准确,弥补了大田纯度鉴定耗时长、易受环境影响的不足。杨会会等^[15]利用双重以及三重PCR纯度鉴定体系鉴定西瓜品种锦霞八号杂交种的纯度,提高了检测的准确性。程维舜等^[16]采用荧光标记SSR鉴定西瓜品种武农8号杂交种的纯度,峰值清晰,避免了凝胶电泳图结果辨别困难的问题。笔者在本研究中利用SSR标记BVWS00208对西瓜品种新喜3号进行纯度鉴定,分子标记鉴定与形态学鉴定结果一致。筛选到的特异性标记,加深了对育种材料间差异关系的了解,为该品种制种及推广开发有一定的助力作用。

随着测序技术的发展,三代分子标记SNP在作物遗传育种中的应用逐渐增多。其中竞争性等位基因特异性PCR(KASP)、靶向测序基因型检测(GBST)技术都具有准确性高、成本较低的优势^[11]。KASP适宜检测大量样本SNP位点;GBST技术是对靶向位点进行测序和基因型检测,依托其开发的基于GenoBaits的液相芯片可以更深层次探究遗传

多样性和不同材料的精细差异。目前该技术已在玉米、水稻、大豆等作物上应用,未来有望实现资源共享与开源育种^[17]。Park等^[18]使用Fluidigm基因分型开发了一组核心SNPs,用以韩国西瓜商业品种的鉴定和新品种开发的所有权保护。Yang等^[1]在前人研究的基础上,筛选出241个SNPs对247个中国西瓜品种基因型进行鉴定与多样性分析,将西瓜品种分为5个亚群,并选择了32个核心SNPs,通过KASP标记可实现高效低成本的西瓜品种精准鉴定,有助于开展西瓜品种保护管理工作。徐云碧等^[19]通过分析世界各国主要作物品种保护经验,建议建立专家咨询委员会,完善DUS评价和实质性派生品种评价体系,建立品种保护数据库,提供查询对比服务,进而推动种业创新和新品种保护。

综上所述,SSR标记BVWS00208能对新喜3号品种纯度进行有效鉴定,纯度达98.9%,与形态学鉴定结果一致,研究结果为其他西瓜品种的纯度鉴定和新品种保护提供了借鉴。品种的培育、开发与推广离不开基础研究与市场化运作,借助分子技术辅助西瓜育种是必然趋势。育种者应合理利用技术手段,提高西瓜品质和品种适应性,充分利用DNA指纹图谱对品种纯度进行鉴定和新品种保护,维护育种人员的合法权益,从而推动西瓜产业绿色发展。

参考文献

- [1] YANG J J, ZHANG J, DU H S, et al. Genetic relationship and pedigree of Chinese watermelon varieties based on diversity of perfect SNPs[J]. Horticultural Plant Journal, 2022, 8(4): 489-498.
- [2] 莫龙飞,孙建磊,高超,等. SSR标记对甜瓜杂交种‘玉贵人’纯度的鉴定[J]. 分子植物育种, 2024, 22(9): 2959-2964.
- [3] 金庆敏,林毓娥,王瑞,等. 基于SSR分子标记的‘粤秀3号’黄瓜杂交种子纯度及真实性鉴定[J]. 广东农业科学, 2023, 50(9): 49-58.
- [4] 王恒炜. 西瓜杂交种纯度鉴定技术研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2020(10): 83-87.
- [5] 赵光伟,欧点点,贺玉花,等. SSR标记对甜瓜杂交种‘众天翠雪’纯度的鉴定[J]. 中国农学通报, 2017, 33(9): 37-40.
- [6] 张玉铎,郭永杰,张东雷,等. 不同香菇品种拮抗反应-ISSR标记与农艺性状分析[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(2): 40-44.
- [7] 杜朝金,张汉尧,罗心平,等. 分子标记在荔枝和龙眼应用中的研究进展[J]. 中国果树, 2024(1): 1-10.
- [8] 王秀军,赵彦贝,王静,等. 基于SSR分子标记的175份蜡梅种质遗传多样性和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 252-268.
- [9] 李霖华,杨永,马新力,等. 基于SSR分子标记对西瓜杂交种早佳8424纯度的高通量鉴定[J]. 新疆农业科学, 2020, 57(3):

- 464-469.
- [10] 张慕月.基于SSR标记和表型性状的西瓜种质资源遗传多样性分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [11] 李超,杨英,陈伟,等.西州密系列甜瓜SSR指纹图谱构建及聚类分析[J].园艺学报,2022,49(3):622-632.
- [12] 佚名.向日葵“仿种子”清理任务基本完成[J].中国农技推广,2023,39(12):10.
- [13] 何玉,杨坤.利用SSR技术鉴定西瓜甜瓜种子纯度[J].中国瓜菜,2020,33(1):13-17.
- [14] 尤佳琪,李超汉,杨红娟,等.基于SSR标记的西瓜新品种‘黑津’和‘申蜜968’的纯度鉴定[J/OL].分子植物育种,1-9[2021-09-09].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210909.1305.016.html>.
- [15] 杨会会,李贺威,赵永威,等.利用多重PCR鉴定西瓜杂交种纯度[J].中国瓜菜,2020,33(2):17-21.
- [16] 程维舜,罗茜,洪娟,等.利用荧光标记SSR鉴定西瓜杂交种的纯度研究[J].中国果菜,2020,40(12):36-41.
- [17] 徐云碧,杨泉女,郑洪建,等.靶向测序基因型检测(GBTS)技术及其应用[J].中国农业科学,2020,53(15):2983-3004.
- [18] PARK J Y, JANG Y J, JUNG J K, et al. Development of SNP markers for the identification of commercial korean watermelon cultivars using fluidigm genotyping analysis[J]. Horticultural Science and Technology, 2022, 40(1): 75-90.
- [19] 徐云碧,王冰冰,张健,等.应用分子标记技术改进作物品种保护和监管[J].作物学报,2022,48(8):1853-1870.