

刘欣, 程瑞, 徐兵划, 等. 基于 KASP 技术的 SNP 标记用于西瓜品种指纹图谱构建和种子纯度检测[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1348-1356.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.022

基于 KASP 技术的 SNP 标记用于西瓜品种指纹图谱构建和种子纯度检测

刘欣, 程瑞, 徐兵划, 白甜, 许文钊, 张朝阳, 罗德旭, 赵建锋, 张兴平, 孙玉东

(江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所/淮安市设施蔬菜重点实验室, 江苏 淮安 223001)

摘要: 随着 SNP 标记在育种工作中的应用, KASP 技术因其低成本、高通量、高准确性等优势, 在作物指纹图谱构建及种子纯度检测等方面具有很高的应用价值。已报道的西瓜品种分子鉴定和指纹图谱多采用 SSR 标记, 试验过程较为繁琐, 效率较低。本研究利用 32 对核心 SNP 标记, 采用 KASP 技术对 54 份包括野生型、东亚型和美洲型等不同农艺性状的西瓜自交系材料和 25 份西瓜杂交种进行了基因分型, 明确了自交系材料之间遗传距离和遗传背景, 为西瓜育种提供了方向, 并构建了苏梦和苏创系列西瓜品种的指纹图谱。从 32 对引物中筛选出的 2 对引物可用于苏梦 5 号、苏梦 6 号、苏梦 7 号、苏梦 9 号、苏创 3 号、苏创 4 号和苏创 5 号的种子纯度检测, 这为西瓜品种及种子纯度鉴定提供了简便、快捷、高效的方法。

关键词: KASP; SNP; 西瓜; 指纹图谱; 种子纯度

中图分类号: S651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1348-09

Application of SNP markers based on KASP technology in fingerprint construction and seed purity detection of watermelon varieties

LIU Xin, CHENG Rui, XU Bing-hua, BAI Tian, XU Wen-zhao, ZHANG Chao-yang, LUO De-xu, ZHAO Jian-feng, ZHANG Xing-ping, SUN Yu-dong

(Huaiyin Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Huainan, Key Laboratory for Facility Vegetables, Huai'an 223001, China)

Abstract: With the application of SNP markers in breeding, KASP technology is of great value in crop fingerprint construction and seed purity detection due to its low cost, high throughput and high accuracy. SSR markers are commonly used for molecular identification and fingerprint of watermelon varieties, but the test process is complicated and inefficient. Fifty-four watermelon inbred lines including wild type, East Asian type and American type, and 25 watermelon hybrids with distinct agronomic traits were genotyped using KASP technology and 32 pairs of core SNP markers. The genetic distance and genetic background between the inbred lines were revealed, which provided a direction for watermelon breeding, and the

fingerprints of Sumeng and Suchuang brand watermelon varieties were constructed. Two pairs of primers screened from 32 pairs of primers could be used for seed purity detection of Sumeng No. 5, Sumeng No. 6, Sumeng No. 7, Sumeng No. 9, Suchuang No. 3, Suchuang No. 4 and Suchuang No. 5, a simple, fast and efficient method for variety identification and seed purity testing of watermelon.

Key words: KASP; SNP; watermelon; fingerprint; seed purity

收稿日期: 2022-02-07

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-25); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201717); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目[JBGS(2021)072]; 淮安市外国专家工作室项目(HAP202122); 淮安市农业科学研究院科技发展基金项目(HNY202026)

作者简介: 刘欣(1991-), 女, 宿迁宿城人, 博士, 助理研究员, 主要从事西瓜瓜种质创新及遗传育种工作。(E-mail) lxin1211@163.com

通讯作者: 孙玉东, (E-mail) sunyudong@jaas.ac.cn

随着测序技术的进步,分子标记技术在遗传与育种研究中的应用越来越普及。已有分子标记主要分为四大类:(1)基于 DNA-DNA 杂交的分子标记,比如 RFLP 标记;(2)基于 PCR 的分子标记,比如 RAPD 标记、SCAR 标记和 SSR 标记等;(3)基于 PCR 与限制性酶切技术结合的分子标记,比如 AFLP 标记和 CAPS 标记;(4)基于单核苷酸多态性的分子标记,比如 SNP 标记。其中 SNP 标记分布广、多态性高、可靠性高,在遗传多样性研究、遗传图谱构建和分子标记辅助选择等方面被广泛应用^[1-6]。竞争性等位基因特异性 PCR (Kompetitive allele specific PCR, KASP) 是一种新型高通量 SNP 分型技术,该技术准确度高,可以实现自动化操作,简单便捷,并且将使用 SNP 标记的成本降至最低^[7],是目前最理想的基因分型技术。

指纹图谱是指利用 DNA 分子标记对作物品种进行检测,并根据不同品种的每个标记的基因型而建立的图谱,据此可以有效避免品种的同名异物及同物异名的问题,有利于种业的健康发展。目前,已有许多品种利用基于 KASP 技术的 SNP 标记完成了指纹图谱的构建。王富强等^[8]利用 KASP 技术将 22 个高质量 SNP 标记用于 76 份葡萄品种的指纹图谱构建。李志远等^[4]利用筛选获得的 50 个核心 SNP 标记,构建了 59 份市场上主要推广的甘蓝品种指纹图谱。魏庆镇等^[9]筛选了 34 个高质量 SNP 标记,并构建了 6 个浙茄品种的指纹图谱。目前,在西瓜中,大部分种质资源及品种的指纹图谱由 SSR 标记构建^[10-12],其缺点是多态性低,操作步骤繁琐,不能实现自动化,对于大批量样品检测,耗费时间长,人工成本高。因此,建立基于 KASP 技术的 SNP 标记用于西瓜品种鉴定和种子纯度检测是非常必要的。

本研究利用 Yang 等^[6]开发的 32 个核心 SNP 标记,采用 KASP 技术对 79 份西瓜杂交种及自交系材料进行基因分型,根据分型数据以及多态性信息,筛选获得 30 个核心 SNP 标记,用于构建苏梦和苏创系列西瓜品种的指纹图谱,同时,筛选出具有多态性和分型较好的标记,用于种子纯度检测,为鉴定西瓜品种的真实性提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究的试验材料如表 1 所示。每份材料播种

5 粒于 72 孔穴盘中,放置于 25 ℃、16 h(光)/8 h(暗)环境中,正常水肥管理,保证出芽和成苗。待幼苗长出 2~3 片真叶时,取嫩叶 0.1 g 于 1.5 ml 离心管中,用于提取 DNA 进行 PCR 反应。种子纯度检测所用的苏梦 5 号、苏梦 6 号、苏梦 7 号、苏梦 9、苏创 3 号、苏创 4 号和苏创 5 号西瓜种子均取自制种棚,制种参考西瓜杂交制种技术^[13],随机选取收获的杂交种子 90 粒播种于穴盘,编号 Z1~Z90,待 2 片真叶展平后取 1 片真叶于 1.5 ml 离心管中,用于提取 DNA 进行 PCR 反应,待幼苗伸蔓后,按照每个杂交种的编号(Z1~Z90)定植在塑料大棚中,行距 2.6 m,株距 30.0 cm,爬地栽培,正常水肥管理,待结果后进行田间纯度鉴定。

1.2 DNA 提取

将取好的样品放入液氮罐中速冻,用组织研磨器[天根生化科技(北京)有限公司产品]研磨至粉末状,采用北京华越洋生物科技有限公司提供的试剂盒(0418-50BB 型)提取 DNA,最后用蒸馏水洗脱和溶解 DNA。取 2 μ l DNA 用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测,无拖带且条带单一即可进行下一步试验。利用 Nanodrop 2000 测定吸光值 OD_{260}/OD_{280} 及 OD_{260}/OD_{230} ,测定值为 1.8~2.0 时表示 DNA 质量较好。测定每份 DNA 样品的浓度,并稀释质量浓度至 60 ng/ μ l 进行 PCR 反应。

1.3 PCR 反应

根据 Yang 等^[6]开发的 40 个核心 SNP 标记信息合成引物,在每组引物中的正向引物(Forward 1)的序列 5'端加上接头序列 GAAGGTGACCAAGTTCATGCT,在正向引物(Forward 2)序列的 5'端加上接头序列 GAAGGTCGGAGTCAACGGATT,反向引物序列不用改变,用蒸馏水溶解稀释引物浓度至 100 μ mol/L,按照如下体系配置引物混合物(Primer Mix):正向引物 Forward1 和 Forward2 各 12 μ l,反向引物 30 μ l,加蒸馏水至 100 μ l,配置完成后保存于 -20 ℃ 备用。每个 PCR 反应孔的体系配置如下:DNA 模板 1.20 μ l,Primer Mix 0.14 μ l,2 \times KASP Mix(北京嘉程生物科技有限公司产品)5.00 μ l,蒸馏水 3.50 μ l,配置完成后封膜,每个 96 孔反应板中加入 2 个阴性对照(NTC)。PCR 反应板和封板膜由爱思进生物技术(杭州)有限公司提供。将加样完成的 PCR 板放入荧光定量检测仪器(Applied Biosystems /7500 型定量 PCR 仪)中进行荧光定量 PCR 反应,反应程序如下:94 ℃ 预变性 15 min; 94 ℃ 变性 20

s, 61~55 ℃复性和延伸 1 min, 10 个循环, 每循环一次降低 0.6 ℃; 94 ℃变性 20 s, 55 ℃继续扩增 60 s, 26 个

循环。PCR 反应结束后读取数据, 若分型不充分, 则继续扩增, 每 3 个循环查看分型情况, 不超过 40 个循环。

表 1 供试西瓜种质资源

Table 1 Watermelon germplasm resources used in this study

编号	材料名称	属性	果型	编号	材料名称	属性	果型
Wm1	2012WMH0262	纯合自交系	大	Wm41	1206WME052	纯合自交系	小
Wm2	2011WH0022	纯合自交系	大	Wm42	2011WH0122	纯合自交系	小
Wm3	2012WMH0238	纯合自交系	大	Wm43	W01(F101)	纯合自交系	小
Wm4	2012WMH0249	纯合自交系	大	Wm44	2011WMH0010	纯合自交系	小
Wm5	2012WMH0264	纯合自交系	大	Wm45	G46	纯合自交系	小
Wm6	2012WMH0265	纯合自交系	大	Wm46	苏梦 8 号	杂交种	小
Wm7	2012WMH0275	纯合自交系	大	Wm47	2012WMH0088	纯合自交系	小
Wm8	2012WMH0960	纯合自交系	大	Wm48	2011WH0107	纯合自交系	小
Wm9	2011WMH0006	纯合自交系	大	Wm49	2103WMH0051	纯合自交系	小
Wm10	1807WME004	纯合自交系	大	Wm50	2102WME0006	杂交种	小
Wm11	1807WME005	纯合自交系	大	Wm51	2012WMH0103	纯合自交系	小
Wm12	1807WME006	纯合自交系	大	Wm52	小兰	杂交种	小
Wm13	2012WMH0980	纯合自交系	小	Wm53	京彩 1 号	杂交种	小
Wm14	1807WME007	纯合自交系	小	Wm54	2007WMH0070	纯合自交系	小
Wm15	2007WMH0238	纯合自交系	小	Wm55	2011WH0115	纯合自交系	小
Wm16	苏梦 4 号	杂交种	小	Wm56	2103WMH0064	纯合自交系	小
Wm17	G27	纯合自交系	小	Wm57	2012WMH0077	纯合自交系	小
Wm18	2012WMH0111	纯合自交系	小	Wm58	1506WME052	纯合自交系	小
Wm19	2102WME0005	纯合自交系	小	Wm59	G8	纯合自交系	中
Wm20	2012WMH0231	纯合自交系	小	Wm60	苏创 4 号	杂交种	中
Wm21	苏梦 5 号	杂交种	小	Wm61	苏创 2 号	杂交种	中
Wm22	苏梦 9 号	杂交种	小	Wm62	G10	纯合自交系	中
Wm23	早春红玉	杂交种	小	Wm63	G12	纯合自交系	中
Wm24	京美 2k	杂交种	小	Wm64	G15	纯合自交系	中
Wm25	2011WH0083	纯合自交系	小	Wm65	G21	纯合自交系	中
Wm26	G31	纯合自交系	小	Wm66	G22	纯合自交系	中
Wm27	G33	纯合自交系	小	Wm67	2012WMH0301	纯合自交系	中
Wm28	2012WMH0113	纯合自交系	小	Wm68	2012WMH0364	纯合自交系	中
Wm29	G37	纯合自交系	小	Wm69	2012WMH0365	纯合自交系	中
Wm30	G35	纯合自交系	小	Wm70	1712WME135	纯合自交系	中
Wm31	苏梦 7 号	杂交种	小	Wm71	苏创 1 号	杂交种	中
Wm32	2007WMH0038	杂交种	小	Wm72	苏创 3 号	杂交种	中
Wm33	G38	纯合自交系	小	Wm73	苏创 5 号	杂交种	中
Wm34	G42	纯合自交系	小	Wm74	早佳	杂交种	中
Wm35	2012WMH0935	纯合自交系	小	Wm75	美都	杂交种	中
Wm36	2011WH0110	纯合自交系	小	Wm76	京嘉 102	杂交种	中
Wm37	苏梦 1 号	杂交种	小	Wm77	苏蜜 1667	杂交种	中
Wm38	苏梦 2 号	杂交种	小	Wm78	2011WH0134	纯合自交系	中
Wm39	苏梦 3 号	杂交种	小	Wm79	嘉年华 5 号	杂交种	中
Wm40	苏梦 6 号	杂交种	小				

1.4 KASP 基因分型

荧光定量 PCR 结束后,使用 Real-Time PCR Software V2.4 软件进行分型及分析。

1.5 数据统计及分析

根据引物信息、荧光信号和分型结果,统计每个 SNP 位点基因型。聚类分析采用 MEGA X 软件版本,将位点信息转化为序列信息,运用近邻法 (Neighbor-Joining method) 和 JTT 矩阵模型来进行计算^[14-15],重复计算次数为1 000次。

2 结果与分析

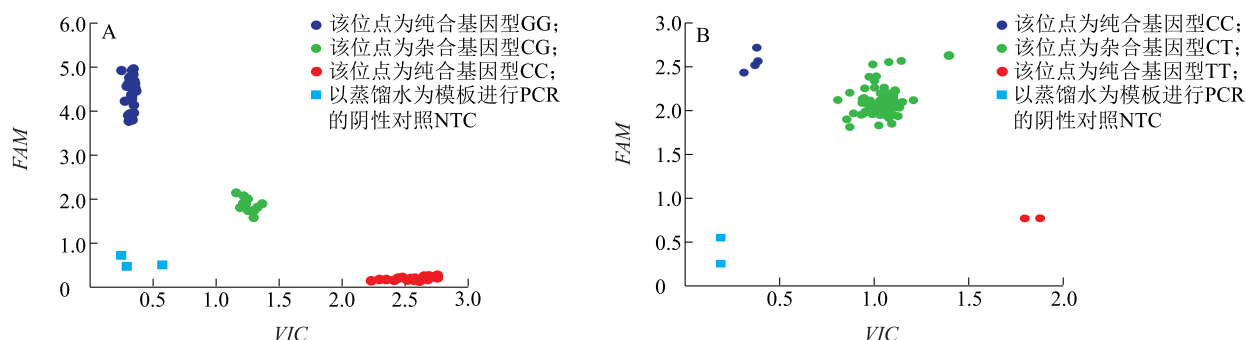
2.1 KASP 分型

根据 KASP 的分型结果进行数据统计,结果(图 1)显示,用 32 个核心标记对所有材料进行 KASP 分型,有 2 个标记分型失败,分别是 *WmSNP178* 和 *WmSNP192*。其余 30 个标记虽然在所有材料中存在分型数据缺失的情况,但每个材料缺失标记数量都不超过 3 个,因此,这 30 个标记能够成功分型(图 1),用于遗传背景分析和指纹图谱构建。标记 *WmSNP47* 在大部分材料中是杂合位点,杂合基因型占比 87.5%。标记 *WmSNP151* 在所有材料中均是纯合位点,基因型为 C 或者 T。

2.2 遗传背景分析

根据 KASP 分型结果,我们将荧光信号转换成不同位点的基因型,运用 MEGA 软件对 79 份材料

进行进化树分析,结果见图 2。苏梦系列小果型品种苏梦 2 号 (Wm38)、苏梦 5 号 (Wm21)、苏梦 6 号 (Wm40)、苏梦 7 号 (Wm31) 被聚类在一个分支上,属于一个类型,说明这些品种遗传关系相近,而在人工选育时,这些品种选择的育种方向都是红瓤,中心糖度高,果皮韧性较强,耐裂^[16],并且苏梦 5 号、苏梦 6 号和苏梦 7 号的父本相同,因此这 3 个品种在遗传背景上具有相似性。Wm13 和 Wm14 是 2 个野生种,与杂交种在性状上存在较大差异:野生种瓤色为白色,且具有苦味,种子颜色为灰绿色无覆纹或红褐色有斑点状覆纹,与杂交种种子的棕色和黑色不同。从图 2 中可以看出,其与苏梦系列品种亲缘关系较远,分属不同分支,属于不同类型。苏梦 3 号 (Wm39) 与苏梦 4 号 (Wm16) 分别属于不同分支,二者瓤色不同,前者为红瓤,后者为黄瓤,且苏梦 4 号果肉风味独特,推测二者在某些位点具有遗传多样性。苏梦 9 号 (Wm22) 与苏梦 6 号 (Wm40) 也属于不同分支,苏梦 6 号果皮覆纹形状为窄齿条状,而苏梦 9 号齿条较宽,并且其果形比苏梦 6 号稍大。苏梦 7 号亲本 Wm29 和 Wm33 的遗传距离为 0.43,二者遗传距离较远,农艺性状测定结果显示其杂交一代苏梦 7 号的品质高于双亲,尤其是在果皮韧性方面,其双亲果皮分别为易裂和中等硬度,但苏梦 7 号表现出韧性强的特点^[16]。



A: 标记 *WmSNP140* 在 79 份材料中的基因分型; B: 标记 *WmSNP92* 在苏创 4 号种子纯度检测中的基因分型。FAM、VIC 表示探针的荧光值。

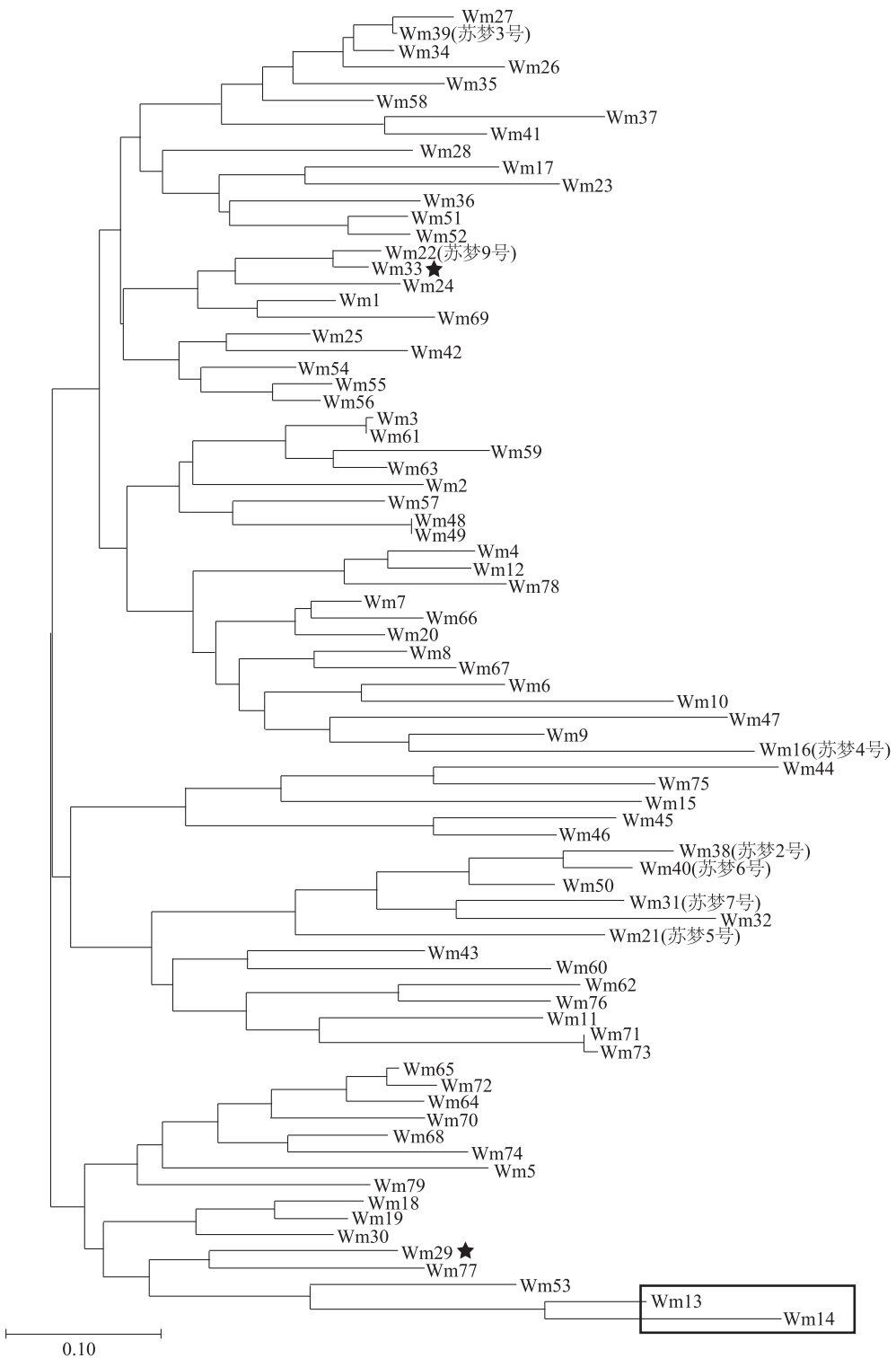
图 1 典型 KASP 基因分型图

Fig.1 Genotyping graph based on KASP

2.3 指纹图谱构建

我们利用 KASP 分型成功的 SNP 标记构建了苏梦和苏创系列西瓜品种的指纹图谱,位点和基因型数据如表 2 所示。在 30 个 SNP 标记中,*WmSNP162* 在 15 份西瓜品种中基因型 (GG) 全部一致,为纯合位

点。*WmSNP226* 在苏梦 8 号中的基因型 (AG) 为杂合,其他品种该位点基因型均为纯合 (AA)。*WmSNP92* 在苏梦 8 号中是纯合基因型 (CC),在苏梦 1 号中未检出,其余品种该位点基因型 (TC) 均为杂合。通过 *WmSNP1*、*WmSNP29*、*WmSNP60*、*WmSNP66*、*Wm-*



图中的材料见表 1。方框中的材料表示 2 个野生种材料;带星号的材料表示苏梦 7 号的亲本。

图 2 79 份材料的 SNP 聚类分析图

Fig.2 Clustering analysis dendrogram based on SNP makers for 79 watermelon materials

SNP140 和 WmSNP156 共 6 个 SNP 标记即可将所有 苏梦和苏创系列西瓜品种区分开。根据位点基因型 信息,将每个品种指纹图谱转化为二维码,方便品种 的真实性鉴定和推广(图 3)。

表 2 苏梦和苏创系列西瓜品种指纹图谱

Table 2 Fingerprint of Sumeng and Suchuang brand watermelon varieties

品种	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w	x	y	z	al	bl	cl	dl	
苏创1号	AG	AT	TC	GT	CA	GG	AA	TC	AG	CC	TC	AG	TC	TT	AT	TC	TC	AA	AA	GG	TT	CC	AA	GG	TC	AG	AA	AA	AA	GT	CC
苏创2号	AG	AA	TT	GT	AA	GG	AA	TC	AG	CC	TT	AG	TC	TT	AA	TC	TC	AA	AA	GG	TT	CC	GG	GG	CC	AG	AA	AA	AA	TT	GG
苏创3号	GG	AT	TC	GG	GG	GG	AG	TT	GG	CC	TT	GG	TC	TC	TT	TC	CC	AA	AA	GG	TT	CC	AA	GG	TT	AA	AA	AA	AA	TT	CC
苏创4号	AG	AA	TC	GG	GA	GG	AG	TC	AA	TC	TT	AG	TT	TT	AT	TC	TC	AA	AA	CG	TT	CC	AG	GG	TC	AA	AA	AA	AA	TT	GG
苏创5号	AG	AA	TC	NN	GA	GG	AG	TT	AA	CC	TT	AG	TC	TT	AT	TC	TT	AA	AA	GG	TT	CC	AG	GG	TC	AA	AA	AA	AA	TT	NN
苏梦1号	GG	AT	TC	TT	AA	GG	NN	TC	AG	TT	CC	GG	TT	TT	NN	NN	TC	AA	AA	CC	CT	CC	AA	GG	TC	AG	TT	AA	AA	NN	CC
苏梦2号	GG	AA	TC	TT	AA	GG	AG	TC	AG	TC	TC	AG	TT	TT	NN	TC	CC	AA	AA	CG	CT	CC	GG	GG	CC	AA	TA	AA	AA	GT	CC
苏梦3号	GG	AA	TT	TT	AA	GG	AG	CC	GG	CC	TC	GG	TT	TT	AT	TC	CC	AA	AA	CG	TT	TT	AG	GG	CC	AA	AA	AA	AA	TT	CC
苏梦4号	AG	AT	TC	TT	AA	GG	GG	CC	AG	TC	CC	AG	TC	TT	TT	TC	CC	CA	AA	CG	TT	TT	AG	GG	TT	GG	TA	AA	AA	GT	GG
苏梦5号	GG	AA	TT	TT	AA	GG	AG	TC	AG	TC	TT	AG	TT	TT	TT	TC	CC	AA	AA	CG	TT	TT	AG	GG	TC	AA	TA	AA	AA	GT	CC
苏梦6号	AG	AA	TC	TT	AA	GG	AG	TC	AG	TC	TC	AG	TT	TT	TT	TC	CC	AA	CC	CG	CT	CC	GG	GG	CC	AA	TA	AA	AA	GT	CC
苏梦7号	GG	AA	TC	TT	AA	GG	GG	TC	AG	TC	TT	AG	TC	NN	TT	TC	CC	AA	NN	CG	TT	TT	AA	GG	CC	AA	TA	AA	AA	GT	CC
苏梦8号	AA	AT	TT	TT	AA	AG	AG	TT	AG	CC	TC	AA	CC	TC	AT	CC	TC	CC	CA	CG	CT	TT	AA	GG	TC	NN	TT	AG	NN	CC	CC
苏梦9号	GG	AA	TT	TT	AA	AG	AG	TC	AG	TC	TT	AG	TT	TT	TT	TC	CC	AA	AA	GG	TT	TT	AG	GG	TC	AA	TA	AA	AA	GT	CG
苏梦10号	AG	AA	CC	TT	AA	GG	GG	TC	AG	TC	TT	AG	TC	TT	TT	TC	CC	AA	AA	CG	CT	CC	AG	GG	CC	AA	AA	AA	AA	GT	CC

a: WmSNP1; b: WmSNP5; c: WmSNP23; d: WmSNP28; e: WmSNP29; f: WmSNP41; g: WmSNP47; h: WmSNP51; i: WmSNP56; j: WmSNP60; k: WmSNP66; l: WmSNP69; m: WmSNP73; n: WmSNP75; o: WmSNP89; p: WmSNP92; q: WmSNP105; r: WmSNP123; s: WmSNP131; t: WmSNP140; u: WmSNP142; v: WmSNP151; w: WmSNP156; x: WmSNP162; y: WmSNP166; z: WmSNP194; al: WmSNP207; bl: WmSNP226; cl: WmSNP227; dl: WmSNP239。NN 表示基因型未检出。

2.4 种子纯度检测

根据 KASP 分型结果,筛选可以对苏梦 5 号、苏梦 6 号、苏梦 7 号、苏梦 9 号、苏创 3 号、苏创 4 号和苏创 5 号西瓜品种种子进行纯度检测的标记。结果显示,标记 *WmSNP5* 在苏创 3 号的双亲中是纯合位点,且呈现多态性,在苏创 3 号中是杂合位点,可以用来对苏创 3 号种子的纯度和真实性进行检测。利用同样的分析方法,我们筛选到标记 *WmSNP92* 可以用来检测苏梦 5 号、苏梦 6 号、苏梦 7 号、苏梦 9 号、苏创 4 号、苏创 5 号 6 个西瓜品种种子的纯度(图 1 B)。通过标记 *WmSNP5* 和 *WmSNP92*,利用 KASP 技术对上述 7 个西瓜品种进行种子纯度鉴定,同时进行田间种植鉴定,鉴定指标包括叶片形态、果皮花色、果型、种子大小及颜色等,结果如表 3 所示,田间鉴定结果与分子标记鉴定结果一致,因

此,标记 *WmSNP92* 和 *WmSNP5* 可用于苏梦 5 号、苏梦 6 号、苏梦 7 号、苏梦 9 号、苏创 4 号、苏创 5 号和苏创 3 号种子纯度和真实性的检测。

表 3 苏梦和苏创系列西瓜品种种子纯度鉴定结果
Table 3 Seed purity identification of Sumeng and Suchuang brand watermelon varieties

品种	种子纯度(%)		所用标记
	田间鉴定	KASP 鉴定	
苏创 3 号	97.8	97.8	<i>WmSNP5</i>
苏创 4 号	97.8	97.8	
苏创 5 号	97.8	97.8	
苏梦 5 号	98.9	98.9	<i>WmSNP92</i>
苏梦 6 号	100.0	100.0	
苏梦 7 号	98.9	98.9	
苏梦 9 号	98.9	98.9	

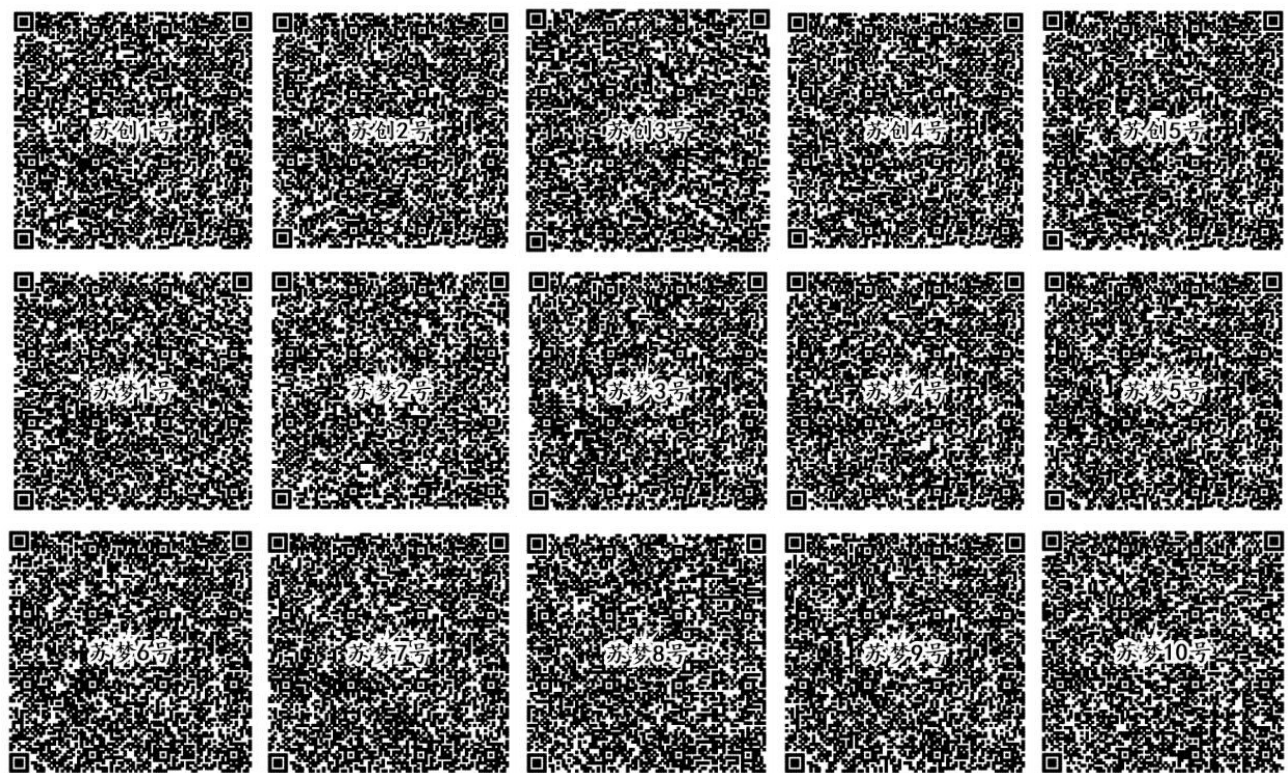


图 3 苏梦和苏创系列西瓜品种指纹图谱二维码
Fig.3 Fingerprint QR code of Sumeng and Suchuang brand watermelon varieties

3 讨论与结论

对于育种工作者来说,明确种质资源和育种材料的遗传背景,鉴定商品品种种子纯度及种子的真

实性非常重要,传统的鉴定方法主要是从植株表型观察鉴定。随着分子生物学和基因组学的发展,人们开发的分子标记可以在基因水平上直接反映植物的遗传多态性,因此分子标记已经成为植物遗传多

样性研究的主要方法^[17-19]。KASP 技术是目前最为经济有效的 SNP 标记分型技术^[20]。利用以 KASP 技术为基础的 SNP 标记研究种质资源的遗传背景,构建品种指纹图谱以及鉴定品种的真实性是未来发展的趋势。冯子珊等^[21]通过 KASP 技术,对浙蒲 9 号父本、母本以及 92 份 F_1 材料进行基因分型,进而鉴定 F_1 材料的种子纯度,结果与田间种子纯度鉴定结果一致,且该方法准确性高,成本低。Shen 等^[22]利用 SNP 标记对 372 份青花菜种质的遗传多样性和亲缘关系进行了分析与评价,最终筛选出 28 个 KASP 标记对青花菜种质进行基因分型,用于种子鉴定和品种鉴定。Mulugeta 等^[23]利用 37 个基于 KASP 技术的 SNP 标记对 48 个埃塞俄比亚蚕豆进行了遗传多样性和亲缘关系的分析,发现其遗传多态性较高,有利于培育优良品种。

本研究利用 32 个核心 SNP 标记对 79 份西瓜材料(包括 54 份自交系和 25 份 F_1 杂交种)进行 KASP 分型和遗传背景分析,通过聚类分析及遗传距离分析发现,不同自交系间的遗传距离不同,因此,我们可以通过选择遗传距离较远的自交系进行杂交配组,筛选高优势组合,进而为选育优质和高优势品种奠定基础。通过分析我们还发现苏梦系列不同品种其遗传背景有差异,这也从 DNA 水平上解释了不同品种间性状差异的原因。但是在进行 KASP 分型时,有 2 个标记分型不成功,推测这是因为 79 份材料不能涵盖西瓜的所有品种,这 2 个位点基因型不呈现多态性,因此导致分型失败。本研究针对苏梦和苏创系列西瓜,利用筛选出来的 30 个 SNP 标记构建指纹图谱,为西瓜品种鉴定和保护提供了技术支撑。通过筛选出来的 WmSNP5 和 WmSNP92 标记,对江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所培育的苏梦 5 号、苏梦 6 号、苏梦 7 号、苏梦 9 号、苏创 3 号、苏创 4 号、苏创 5 号 7 个西瓜品种^[24-26]进行种子纯度鉴定,构建了以 KASP 技术为基础的种子纯度检测体系,具有高效、简单、便捷等特点,方便了种子生产销售中种子纯度的鉴定。

致谢:感谢中国计量大学徐沛研究员对本论文提供指纹图谱构建方面的帮助!

参考文献:

[1] CHEN H D, XIE W B, HE H, et al. A high-density SNP genoty-

ping array for rice biology and molecular breeding [J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(3):541-553.

[2] TINA H L, WANG F G, ZHAO J R, et al. Development of maizeSNP3072, a high-throughput compatible SNP array, for DNA fingerprinting identification of Chinese maize varieties [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35(6):136.

[3] CAVANAGH C R, CHAO S M, WANG S C, et al. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(20):8057-8062.

[4] 李志远,于海龙,方智远,等. 甘蓝 SNP 标记开发及主要品种的 DNA 指纹图谱构建[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(14):2771-2788.

[5] DU H S, YANG J J, CHEN B, et al. Target sequencing reveals genetic diversity, population structure, core-SNP markers, and fruit shape-associated loci in pepper varieties [J]. *Bmc Plant Biology*, 2019, 19(1):578.

[6] 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*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.09.004>.

[7] SEMAGN K, BABU R, HEARNE S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 33(1):1-14.

[8] 王富强,张 建,温常龙,等. 基于 KASP 标记的葡萄品种鉴定 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54(13):2830-2846.

[9] 魏庆镇,王五宏,胡天华,等. 浙茄类型茄子品种 DNA 指纹图谱构建[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(11):1863-1870.

[10] 范建光,张海英,宫国义,等. 西瓜 DUS 测试标准品种 SSR 指纹图谱构建及应用[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(5):892-899.

[11] 赵胜杰,朱红菊,路绪强,等. 无籽西瓜品种 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(6):1142-1146.

[12] 徐彦刚,姚协丰,李良俊,等. 西瓜核心种质遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(1):305-317.

[13] 鲁福成,张雪来,樊文义,等. 设施条件下西瓜杂交制种技术 [J]. *长江蔬菜*, 2016(1):45-47.

[14] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6):1547-1549.

[15] JONES D T, TAYLOR W R, THORNTON J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences [J]. *Bioinformatics*, 1992, 8(3):275-282.

[16] 程 瑞,徐兵划,许文钊,等. 苏梦系列西瓜果皮硬度相关性状分析[J]. *中国瓜菜*, 2021, 34(6):20-27.

[17] 蒋正宁,赵仁慧,陈甜甜,等. 分子标记辅助选育兼抗赤霉病、白粉病和黄花叶病毒病的小麦新品系 [J]. *江苏农业学报*,

- 2021, 37(5):1100-1107.
- [18] 邓 磊,潘金卫,杨文鹏,等. 利用分子标记辅助选择技术创制耐铝玉米种质[J].南方农业学报,2021,52(4):908-915.
- [19] 陈 越,陈 玲,丁明亮,等. 基于 InDel 分子标记的云南地方稻籼粳属性与表型性状相关分析[J].南方农业学报,2020,51(4):758-766.
- [20] 王君婵,吴旭江,胡文静,等. 扬麦系列品种(系)重要性状功能基因的 KASP 检测[J].江苏农业学报,2019,35(6):1271-1283.
- [21] 冯子珊,吴晓花,李艳伟,等. 基于 KASP 标记快速鉴定瓠瓜杂种 F_1 纯度的方法[J].分子植物育种,2022(13):1-8.
- [22] SHEN Y S, WANG J H, RANJAN K, et al. Development of GBTS and KASP panels for genetic diversity, population structure, and fingerprinting of a large collection of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) in China [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:655254.
- [23] MULUGETA B, TESFAYE K, KENENI G, et al. Genetic diversity in spring faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes as revealed by high-throughput KASP SNP markers [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2021, 68(5):1971-1986.
- [24] 顾 妍,张兴平,张朝阳,等. 西瓜设施栽培新品种‘苏梦 5 号’的选育[J].中国果树,2019(6):88-90.
- [25] 江 蛟,孙玉东,张朝阳,等. 西瓜新品种苏梦 6 号的选育[J].中国蔬菜,2018(11):75-77.
- [26] 孙玉东,张朝阳,徐兵划,等. 西瓜新品种‘苏梦 7 号’[J].园艺学报,2020,47(1):197-198.

(责任编辑:陈海霞)