

不同类型甜瓜种质 SSR 遗传多样性及耐冷性评价

徐小军¹, 刘海英², 梁长志², 王吉明¹, 张桂兰¹, 杨路明², 胡建斌²

(¹ 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ² 河南农业大学园艺学院, 郑州 450002)

摘要: 从国家西瓜甜瓜种质中期库(郑州)和美国农业部国家种质资源中心选取厚皮、薄皮和野生甜瓜种质共 191 份, 利用在甜瓜染色体上均匀分布的 43 个 SSR 标记鉴定其基因型, 评价其遗传多样性, 并利用 4 °C 恒温条件下种质幼苗的冷害指数和低温处理前后的叶肉组织超微结构变化评价不同类型种质的耐冷性。结果显示, SSR 标记共检测到 366 个等位基因, 平均 8.512, 平均观测杂合度和期望杂合度分别为 0.074 和 0.704, 平均多态性信息含量为 0.668。UPGMA 法将所有种质聚为 4 个类群, I 类群仅有 2 份印度野生种质, II 类群包含来自印度的 34 份野生和 15 份薄皮种质, III 类群含有地理分布广泛的 51 份厚皮和 1 份野生种质, IV 类群由来自东亚的 75 份薄皮、7 份厚皮和 6 份野生种质组成。Bayesian 算法将所有种质分为 3 个亚群, 主要对应厚皮、野生和薄皮 3 类种质。通过计算 3 类种质间的分化系数和雷氏距离, 结果发现厚皮种质与薄皮种质间的分化最大, 野生种质与薄皮或厚皮种质间的分化相对较小, 不同类型种质多样性水平表现为: 野生种质 > 厚皮种质 > 薄皮种质。3 类种质幼苗的冷害指数趋向正态分布, 薄皮种质的耐冷性要优于野生和厚皮种质。叶肉组织超微观察显示, 薄皮种质蛤蟆酥 5 在低温处理前后的细胞超微结构变化不大, 其耐冷性较强, 而厚皮种质凤凰在低温处理后, 叶绿体大量解体, 细胞超微结构遭到破坏, 其耐冷性较弱。

关键词: 甜瓜; 种质资源; 遗传多样性; 耐冷性; 超微结构。

Genetic Diversity Analysis of Melon Germplasms Using SSR Markers and Tests for Chilling Tolerance

XU Xiao-jun¹, LIU Hai-ying², LIANG Chang-zhi², WANG Ji-ming¹,
ZHANG Gui-lan¹, YANG Lu-ming², HU Jian-bin²

(¹ Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009;

² College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: In order to investigate the genetic diversity of melon accessions, of 191 melon accessions including thick-skinned, thin-skinned, and wild types, which were collected from the National Mid-term Genebank for Watermelon and Melon (Zhengzhou, China) and USDA-ARS GRIN database, were analyzed with 43 chromosomally-distributed SSR markers. Furthermore, chilling tolerance was evaluated using the chilling-injury indices of melon seedlings under the constant temperature 4 °C as well as the leaf-ultrastructure changes before and after the low-temperature treatment. Totally, 366 alleles were detected by the SSR markers, with an average of 8.512 alleles per marker. Mean of observed and expected heterozygosity were 0.074 and 0.704, respectively, while mean of the polymorphism information index was 0.668. The method of UPGMA clustered all the accessions into four groups. Group I had only two genetically diverse Indian accessions. Group II included 34

收稿日期: 2019-07-29 修回日期: 2019-09-21 网络出版日期: 2019-10-09

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190729002>

第一作者研究方向为瓜类蔬菜栽培生理生化及技术研究, E-mail: xuxiaojun@caas.cn

通信作者: 张桂兰, 主要开展瓜类遗传育种研究, E-mail: zhangguilan@caas.cn

胡建斌, 主要开展蔬菜遗传育种研究, E-mail: jianbinhu@henau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872101); 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2015-ZFRI); 河南省高校科技创新人才支持计划 (20HASTIT035)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31872101), Agricultural Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2015-ZFRI), Program for Scientific and Technological Innovative Talents in Universities of Henan Province (20HASTIT035)

wild accessions and 15 thin-skinned accessions, all of which were originated from India. Group III comprised of 51 thick-skinned accessions and one wild accessions, which were collected from a wide geographic distribution. The remained 75 thin-skinned accessions, 7 thick-skinned accessions and 6 wild accessions were clustered into group IV, most of which were from East Asia. Furthermore, the Bayesian algorithm assigned the whole accession panel into three subpopulations, mostly correlated to the three germplasm types, i.e., thick-skinned, wild, and thin-skinned accessions. The coefficient of differentiation and Nei' genetic distance among the three germplasm types indicated the highest level of genetic differentiation (F_{ST}) between the thick-skinned and thin-skinned accessions, following by F_{ST} values between wild accessions and thick-skinned accessions or thin-skinned accessions. The rank of the diversity level among the germplasm types were: wild accessions>thick-skinned accessions>thin-skinned accessions. The chilling-injury indices of the three germplasm types tended to follow normal distribution; the chilling tolerance of thin-skinned accessions was largely superior to that of wild or thick-skinned accessions. Leaf ultrastructure showed a slight change observed with the seedlings of the thin-skinned accession 'Hamasu5', indicating a high level of chilling tolerance. In contrast, the thick-skinned accession 'Fenghuang' presented a heavy chloroplast destruction and an aggravated damage in cell ultrastructure, indicating a high sensitivity to chilling temperature.

Key words: melon; germplasm resource; genetic diversity; chilling tolerance; ultrastructure

甜瓜 (*Cucumis melo* L., $2n=2x=24$) 是葫芦科中一种蔓生草本植物,广泛分布于全球的热带、亚热带地区,属于世界性的园艺作物,也是葫芦科中遗传多样性最丰富的种之一^[1-2]。甜瓜种质资源丰富,变异类型众多,其植物学分类一直为国内外研究者所关注,目前学术界至少存在 10 种分类方法,尤其是对变种的划分存在较大分歧^[3-6]。Pitrat^[5]和林德佩^[6]都建议将甜瓜划分为两大亚种(长毛亚种 *C.melo* L.subsp.*melo* 和短毛亚种 *C.melo* subsp.*agrestis* (Naudin) Pangalo) 及下属的若干变种。依据甜瓜生态学特性,可将其分为厚皮类型和薄皮类型,分别对应于植物学分类中的长毛亚种和短毛亚种。一般认为,甜瓜的初生起源地在非洲,次生起源地则包括南亚(印度)、西亚(土耳其)、中亚(伊朗、乌兹别克斯坦、土库曼斯坦和中国新疆)、东亚(中国黄河和长江流域、朝鲜、日本)等广大地区^[1-2,7]。中国是栽培甜瓜的重要起源地之一,西北地区(新疆及甘肃西部)分布有大量的厚皮种质,而黄淮及长江流域以薄皮种质居多,因而也有部分学者认为中国黄淮及长江流域是薄皮甜瓜的初生起源中心^[8]。野生甜瓜主要分布在非洲、西亚和南亚,尤其以印度居多^[9]。此外,中国中部(如河南省)也分布有大量野生甜瓜,如马泡瓜。在分类上,野生甜瓜一般归为短毛亚种,但现有分类方法并未将其划为某一变种^[10]。

虽然栽培甜瓜(厚皮和薄皮类型)和野生甜瓜在形态上有较大的差异,但它们在 DNA 水平的差异并不明确。目前,有关甜瓜的遗传多样性的研究

报道较多,大多采用 RAPD^[11-12]、AFLP^[13]、SSR^[14-16] 等分子标记对某一类型或某一地区的种质进行聚类分析,以揭示其遗传变异和遗传关系,但鲜有对不同类型的种质(如厚皮、薄皮和野生种质)进行综合研究的报道。尽管印度被认为是甜瓜的次生起源中心,但其野生种质的数量远远超过甜瓜的初生起源地非洲,印度野生甜瓜是否是栽培甜瓜的祖先还不为所知。因此,探明不同类型甜瓜种质的遗传多样性差异及遗传关系,将为阐明栽培甜瓜的进化和分化提供一定的理论依据。此外,甜瓜是非冷驯化植物,对低温较为敏感,幼苗对温度的要求更为苛刻(10~13 °C 停止生长)^[17];育苗期间的低温冷害延长了苗龄,推迟了定植期,导致商品瓜延期上市。有研究表明,不同类型的甜瓜种质对低温的耐受性差异不同,薄皮甜瓜的耐冷性要优于厚皮甜瓜^[18]。因此,在明确厚皮、薄皮和野生甜瓜种质的遗传多样性的基础上,考察不同类型种质的耐冷性差异,可进一步增强这些种质在耐冷性育种中的应用。

本研究利用在甜瓜染色上均匀分布的 43 对 SSR 引物分析包含厚皮、薄皮和野生甜瓜在内的 191 份种质的遗传多样性,明确其遗传关系,并评价不同种质的耐冷性差异,旨在为甜瓜优异种质的筛选和耐冷性遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料选自国家西瓜甜瓜种质中期库(郑

州)和美国农业部 USDA 种质资源中心,共有 191 份种质,主要从中国、印度、伊朗、土耳其等甜瓜起源

地收集(表 1)。其中,厚皮种质 58 份,薄皮种质 90 份,野生种质 43 份。

表 1 试验所用甜瓜种质及其来源

Table 1 Melon germplasms used in present study and their origins

编号 No.	类型 Type	种质名称 Name	来源 Origin	编号 No.	类型 Type	种质名称 Name	来源 Origin	编号 No.	类型 Type	种质名称 Name	来源 Origin
1	厚皮	绿皮 3 号	中国河南	44	薄皮	黄妃	中国河北	87	薄皮	PI614541	印度
2	厚皮	日佩里亚尔	中国新疆	45	薄皮	棉瓜	中国山东	88	薄皮	PI614549	印度
3	薄皮	娄瓜	中国河南	46	薄皮	铁巴齿	中国安徽	89	薄皮	PI614465	印度
4	薄皮	白沙蜜	中国吉林	47	薄皮	三叶花酥瓜	中国江苏	90	薄皮	PI614523	印度
5	薄皮	冰糖罐	中国河南	48	薄皮	新玉芝麻脆	中国河南	91	薄皮	PI614548	印度
6	薄皮	花皮甜瓜	中国江苏	49	薄皮	鹅令白	中国河北	92	薄皮	PI614565	印度
7	薄皮	Juesong	马来西亚	50	薄皮	Gold 9	日本	93	薄皮	PI164774	土耳其
8	厚皮	银辉	中国台湾	51	薄皮	王谷蛋	中国黑龙江	94	薄皮	Ames21185	土耳其
9	薄皮	小翠瓜	中国河北	52	薄皮	上海瓜	中国上海	95	薄皮	PI614576	印度
10	野生	PI614410	印度	53	薄皮	白香蕉	中国黑龙江	96	野生	W-2	中国新疆
11	薄皮	Tm-1	中国广西	54	薄皮	羊角脆	中国山西	97	野生	马泡瓜	中国河南
12	薄皮	益都黄银	中国山东	55	薄皮	PI614514	印度	98	野生	PI406737	美国
13	薄皮	银选黄籽	中国河南	56	薄皮	Bazhangchang	日本	99	野生	PI536473	印度
14	薄皮	看瓜	中国江苏	57	厚皮	PI321004S2	中国台湾	100	野生	PI536476	印度
15	薄皮	江西梨瓜	中国江西	58	薄皮	刘金瓜	中国山东	101	野生	PI614173	印度
16	薄皮	平果青	中国江西	59	薄皮	合肥白瓜	中国安徽	102	野生	PI614174	印度
17	薄皮	甜菜瓜	中国浙江	60	薄皮	青皮绿瓢	中国江苏	103	野生	PI614307	印度
18	薄皮	一窝猴	中国山西	61	薄皮	白梨瓜	中国湖北	104	野生	PI614309	印度
19	薄皮	十条鲜	中国陕西	62	薄皮	留印	中国河南	105	野生	PI614325	印度
20	薄皮	西瓜混	中国河南	63	薄皮	蛤蟆酥 5	中国辽宁	106	野生	PI614328	印度
21	薄皮	PI614323	印度	64	薄皮	小花瓜	中国河南	107	野生	PI614329	印度
22	薄皮	青皮脆	中国辽宁	65	薄皮	羊角酥 S1	中国河南	108	野生	PI614330	印度
23	薄皮	金道子	中国辽宁	66	薄皮	豫甜脆	中国河南	109	野生	PI614335	印度
24	薄皮	甜香蕉	中国辽宁	67	薄皮	雪蜜	中国河南	110	野生	PI614356	印度
25	野生	PI614412	印度	68	薄皮	翠绿	中国河南	111	野生	PI614361	印度
26	薄皮	甜脆瓜	中国河北	69	薄皮	TH-5	中国河南	112	野生	PI614363	印度
27	薄皮	金巴齿	中国内蒙古	70	薄皮	白金蜜	中国河南	113	野生	PI614364	印度
28	薄皮	蒲田 1 号	中国福建	71	薄皮	长甜菜瓜	中国河南	114	野生	PI614438	印度
29	薄皮	红籽脆	中国河南	72	薄皮	脆菜瓜	中国河南	115	野生	PI614439	印度
30	薄皮	花道子	中国辽宁	73	薄皮	黄甜脆	中国河南	116	野生	PI614440	印度
31	薄皮	冰瓜	中国河南	74	薄皮	特黑皮面瓜	中国河南	117	野生	PI614441	印度
32	薄皮	呼和 3 号	中国内蒙古	75	薄皮	Little Yellow	俄罗斯	118	野生	PI614442	印度
33	薄皮	面瓜	中国安徽	76	薄皮	Ames 31282	中国河南	119	野生	PI614479	印度
34	薄皮	小棱瓜	中国江苏	77	薄皮	PI536473	印度	120	野生	PI614481	印度
35	薄皮	洋水瓜	中国江苏	78	薄皮	PI614390	印度	121	野生	PI614486	印度
36	薄皮	树树瓜	中国山西	79	薄皮	PI614391	印度	122	野生	PI614493	印度
37	薄皮	谢花甜	中国河南	80	薄皮	PI614392	印度	123	野生	PI614494	印度
38	薄皮	青香蕉	中国黑龙江	81	薄皮	PI614393	印度	124	野生	PI614514	印度
39	薄皮	八里香	中国吉林	82	薄皮	PI614395	印度	125	野生	PI614519	印度
40	薄皮	金辉	中国台湾	83	薄皮	PI614397	印度	126	野生	PI614525	印度
41	薄皮	最佳	中国黑龙江	84	薄皮	PI614398	印度	127	野生	PI614526	印度
42	薄皮	彗星	中国新疆	85	薄皮	PI614399	印度	128	野生	PI614558	印度
43	薄皮	十棱沟金瓜	中国天津	86	薄皮	PI614512	印度	129	野生	PI614565	印度

表 1(续)

编号	类型	种质名称	来源	编号	类型	种质名称	来源	编号	类型	种质名称	来源
No.	Type	Name	Origin	No.	Type	Name	Origin	No.	Type	Name	Origin
130	野生	PI614573	印度	151	厚皮	艾孜	中国新疆	172	厚皮	PI140637	伊朗
131	野生	PI614574	印度	152	厚皮	八一香梨	中国新疆	173	厚皮	PI140815	伊朗
132	野生	PI614575	印度	153	厚皮	恰尔可洪	中国新疆	174	野生	PI163219	印度
133	野生	PI140471	美国	154	厚皮	康拜尔	中国新疆	175	厚皮	PI164852	印度
134	野生	泡瓜 -1	中国河南	155	厚皮	网纹甜瓜	中国新疆	176	厚皮	美甘麻 241	中国甘肃
135	野生	泡瓜 -3	中国河南	156	厚皮	河套冬瓜	中国内蒙古	177	厚皮	92004	伊朗
136	厚皮	白皮可口奇	中国新疆	157	厚皮	PI164409	印度	178	厚皮	PI140678S1	伊朗
137	厚皮	芙蓉	中国新疆	158	厚皮	PI169320	土耳其	179	厚皮	PI165508	印度
138	厚皮	金棒子	中国新疆	159	厚皮	New Sweet 13	日本	180	厚皮	PI164320S1	印度
139	厚皮	玛纳斯瓜旦	中国新疆	160	厚皮	PI165516	印度	181	厚皮	PI164569	印度
140	厚皮	白巴登	中国新疆	161	厚皮	PI145594	印度	182	厚皮	PI169358	土耳其
141	厚皮	72-2-3	中国新疆	162	厚皮	PI169329	土耳其	183	厚皮	PI143215S1	伊朗
142	厚皮	绿皮酥	中国新疆	163	厚皮	金凤 2610	中国河南	184	厚皮	PI136223	伊朗
143	厚皮	巨大种植者	中国新疆	164	厚皮	PI163208	印度	185	厚皮	欧金	中国北京
144	薄皮	Hornesconeen	中国河南	165	厚皮	金玛丽	中国甘肃	186	厚皮	87-1	中国河南
145	厚皮	PI164610	印度	166	厚皮	PI166190	印度	187	厚皮	银香	中国河南
146	厚皮	PI163206	印度	167	厚皮	卡拉克赛	中国新疆	188	厚皮	凤选 3	中国河南
147	厚皮	PI164996	土耳其	168	厚皮	厚肉冬瓜	中国新疆	189	厚皮	新甜瓜	中国河南
148	厚皮	PI177351	土耳其	169	厚皮	New Sweet 17	日本	190	厚皮	凤凰	中国台湾
149	厚皮	PI171599	土耳其	170	厚皮	20KH.111	阿富汗	191	厚皮	鲁甜 2 号	中国山东
150	厚皮	PI381765	印度	171	厚皮	PI137852	伊朗				

1.2 SSR 标记分析

采用 CTAB 法^[19]提取各甜瓜种质幼苗叶片的 DNA,用核酸分析仪 Nanodrop 2000 检测其浓度,并用无菌 ddH₂O 将其稀释至 20 ng/μL,备用。利用 43 对共显性 SSR 引物对所有甜瓜种质 DNA 进行 PCR 扩增(表 2),其中 20 对选自 Zhu 等^[20]报道,15 对选自 Diaz 等^[21]构建的遗传图谱,剩余的 8 对为本实验室前期所开发^[22]。

PCR 扩增在基因扩增仪(BIORAD C1000™)上进行,反应体系:1.0 μL 模板 DNA,正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,2×Taq PCR Master Mix(上海生工)5.0 μL,补充 ddH₂O 至 10 μL。反应程序为:95℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 50 s,共 30 个循环;最后 72℃延伸 8 min。扩增产物采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶检测。

1.3 数据统计与分析

根据扩增产物在凝胶中迁移位置将其记录为共显性标记,根据分子量大小分别记录为 A、B、C、D……,纯合子和杂合子分别以相同字母和不同字母表示。利用在线软件 PICcalc^[23]计算不同种质某

一 SSR 位点的多态性信息含量(PIC, polymorphic information content)。采用 PopGen1.32^[24]计算不同种质间某一位点或某一种质类型的观测等位基因数(*Na*, number of observed alleles)、多样性指数(*I*, Shannon’s information index)、稀有等位基因频率(*MAF*, minor allele frequency)、期望杂合度(*He*, expected heterozygosity)和观测杂合度(*Ho*, observed heterozygosity),并计算不同类型种质间的分化系数(*F_{ST}*, pairwise genetic differentiation)和雷氏距离(*D*, Nei’s genetic distance)。基于 SSR 基因型数据,利用 MEGA6.0^[25]中的 UPGMA 法对所有甜瓜种质进行基于标准遗传距离(GD, genetic distance)的聚类分析,并用 Structure2.3.4^[26]中的基于 Bayesian 算法对其进行亚群划分,参照 Evanno 等^[27]提出的 Δ*K* 法选择最适的亚群数(*K*)。

1.4 耐冷性评价

选取饱满的甜瓜种子,采用常规方法浸种、催芽,待种子胚根破壳后播种于装有商品基质的 72 孔穴盘中,置于人工气候箱(MGC-350HP-2)中育苗,昼/夜温度为 25±2℃/16±1℃。待幼苗长至 2 叶

表 2 43 对 SSR 引物信息
Table 2 Information of the 43 SSR primers

引物名称 Name	染色体 Chr.	图位 (cM) Position	正向引物 Forward primer (5′ —3′)	反向引物 Reverse primer (5′ —3′)
CM07	1	0.861	TTTCCCGCATTGATTTTCTC	GAGAAACGCTTCCCACAAAC
CMCT505	1	16.531	GACAGTAATCACCTCATCAAC	GGGAATGTAAATTGGATATG
SSR010675	1	24.420	ACCACCACATGATGATCCCT	AAAGCGCAAAGAAAGCCATA
SSR011330	1	30.630	ACCCATATCCAACCTCTCCC	TGAAGAAATGGGTTTGGAGG
SSR012562	2	4.141	TGTTTTCATAGGGGACCTGG	AACATGGCTAAGAGCAGCGT
gSSR4959	2	6.427	AACCCAAACTCAAAC TCAAAAC	GGGAGGAAGAAGAGGAAATA
SSR013487	2	16.440	CTGCCCTTTTTCCTTCTCT	ATTGGCCTTTGTTTTCATGG
SSR014540	2	24.440	GACACATCTTTCCCACACCA	CACTGTTTTGGGTATGGCCT
SSR014660	3	1.310	CTTCTCACATGCTTCAACGC	CCCCATTCCCATTCTTTTT
SSR015784	3	16.681	TTAATCTTGCGGTGGAAGG	TTAGGGAAGGCAATCAATCG
SSR016829	3	23.889	CACCCTTCCTTACCAGGACA	GATGCTGTCTTTTTCGTCCC
HN M33	4	1.052	TTGCTTCTGCTTCGGACCTT	GGGAGATTGAATGGTGGTG
SSR018393	4	8.800	CAATGCGATCATTTAACAATGC	TGGTTTTTACCAAAGTGGA
HN M12	4	13.368	ATCTTCTGTCTTGGCCTCCG	GAAAGGGGATGAGTAAAAGTTGAG
SSR020162	4	26.321	GGGATCATGCATGGGTAAAC	AGCCCTCCAAATATGGCTAA
SSR020947	5	0.101	TTTACGCAAGGATGAAAGGG	AATGGGCGAATTAAGAAGCA
DE1557	5	10.831	CAAAGACATAAGCCCGATG	AAAAGAAAGATACAAGTTAGGGC
SSR023138	5	24.982	GGAGGACGAAAGACCAATGA	CGACCGCCATTAATCAAAAC
HN M41	6	4.571	TCTTTCCCATATGGCCTCAG	AAC TTGGCTTGGACAGGGAT
DE1103	6	12.969	CACATGACTTTTCACAAACG	GAATTCTATCTGTCTATCAAAG
SSR025990	6	21.240	TTCCCTTTCAATTGTTGTTCC	TGCCAAGGTTGAAAAGAAAC
CMAGN52	6	31.705	CCACCAACATAACACACAAC	CTCTCACACTGTTGGGAAGA
CMAGN75	7	2.403	TGGGTTTTCTTCTACTACTG	TGCTTTTACTCTCATTCAAC
gSSR22419	7	12.321	TTTAGGGTTTAGGGGCTAATA	TTCATGAATTTAGGACACAT
SSR029474	7	24.011	AACCGCAAATACGAGACCTG	TCTCCTGCATAAACCCCAAG
SSR029716	8	0.441	GCGAAATGATTCCATGTTTG	TCCACTTGCTATCTTCTCTCCA
HN M31	8	11.147	GCCGTTCTGTGCTTCTTCATT	TTCCGACTCCGTATGTTCAATC
HN M40	8	20.878	TGCAATTA AAACTTCCACCAAA	TACAACCGTCGCGGTCTCT
CMAT141	8	26.427	AAGCACACCACCACCCGTAA	GTGAATGGTATGTTATCCTTG
CMTC47	9	1.698	GCATAAAAGAATTTGCAGAC	AGAATTGAGAAGAGATAGAG
SSR033639	9	11.461	AGCAGTGGTAGCAGCAGTAGC	AAGTTTTCTCTCCCCAGGA
CMATN22	9	23.380	CGGCAATCATCTTATCTTTC	AAGATTGAAGTGGGAAAAATG
CM38	10	3.951	TAGCATCTGATCGGAAAACC	CAACTTCATCCGCCAAGAAT
CMTCN8	10	9.992	CCTCCGCCACATATTACAAT	TTCATCTTGACACGTAAGAG
HSSR010	10	17.653	GAGGTGGAGGATAAAACAAATG	GATGCTGATAGGAATACCGAGA
HSSR015	10	25.107	GATGGTTGGCAAACGAGAAAT	TATGGAGTGAGGGGCCTAATG
DM0673	11	0.561	TCTACGGACCATGTGAATC	TCAAACAAAGTTGAAATTAGG
DM0804	11	7.340	GGAGTCCTTTTGCAACAG	CAAAAAGTATTGTTAACTTAAC
SSR038372	11	17.081	GAAAAGAGTTAGGCTTCCCAA	TCCATTCTCTCTCCCTGGAT
CMGA104	11	28.770	TTACTGGGTTTGGCCGATTT	AATTCGTATTCAACTCTCC
SSR040314	12	4.421	TTTGCCACATCATATGAAA	CCCATGTTTAAGTGATTCCCA
SSR041311	12	17.749	CTTCCAACATTCCATTGGCT	TGAAAAGAGATGGGAACTTTAGTG
CMGAN80	12	25.796	ATATTGATTGCTGGGAAAGG	CTTTTTTGCTTTATTGGGTC

1 小时,置于 4 ℃恒温处理 48 h,具体方法参照周亚峰等^[28]报道。参照庄飞云等^[29]的标准对低温处理后的幼苗进行冷害级别评定,并计算不同种质幼苗的冷害指数(CII, chilling-injury index)。根据周亚峰等^[28]研究结果,当幼苗 CII<0.3 划为强耐冷,

0.3 ≤ CII<0.4 为耐冷, 0.4 ≤ CII<0.7 为中等耐冷, CII ≥ 0.7 为冷敏。

为了观测低温处理后幼苗叶片的细胞结构变化,在 4 ℃恒温处理 48 h 后选取耐冷性差异明显的幼苗第 1 片真叶,按照彭玲等^[30]的方法进

行固定、脱水、浸透、包埋,用超薄切片机(Leica EM UC7)切成 60~80 nm 超薄切片,在透射电子显微镜(HITACHI-HT7700)下观察,采集细胞超微结构图像。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

为了准确揭示甜瓜种质的遗传多样性水平,根据甜瓜染色体大小在其前端、中部、后端分别选取

3~4 对 SSR 引物,使得所选引物能均匀覆盖甜瓜基因组,共选取 43 对呈共显性变异的 SSR 引物(表 2)。对 191 份甜瓜种质的基因分型结果显示(表 3),43 对引物共检测到 366 个等位基因,每个 SSR 位点 5~16 个,平均 8.512 个;观测杂合度(H_o)变幅为 0.008~0.187,平均值 0.074,说明所检测位点的纯合度较高;期望杂合度(H_e)变幅为 0.484~0.870,平均值 0.704, PIC 值变幅为 0.456~0.864,平均值 0.668,说明所选 SSR 引物具有较高的多态性。

表 3 43 对 SSR 引物的多态性参数统计

Table 3 Statistical analysis of polymorphic parameters of 43 SSR primer pairs

标记 Marker	等位基 因数 N_a	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态性信息 含量 PIC	标记 Marker	等位基 因数 N_a	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态性信息 含量 PIC
CM07	7	0.041	0.832	0.601	CMAGN75	13	0.050	0.870	0.864
CMCT505	8	0.091	0.750	0.710	gSSR22419	6	0.041	0.679	0.629
SSR010675	7	0.101	0.663	0.592	SSR029474	5	0.031	0.763	0.723
SSR011330	9	0.115	0.732	0.696	SSR029716	9	0.021	0.783	0.754
SSR012562	9	0.122	0.712	0.683	HN31	8	0.092	0.753	0.720
gSSR4959	6	0.031	0.492	0.460	HN34	8	0.151	0.763	0.734
SSR013487	16	0.163	0.714	0.692	CMAT141	6	0.013	0.578	0.570
SSR014540	9	0.187	0.644	0.603	CMTC47	8	0.173	0.682	0.642
SSR014660	14	0.052	0.789	0.779	SSR033639	8	0.022	0.790	0.763
SSR015784	6	0.110	0.730	0.682	CMATN22	7	0.073	0.705	0.654
SSR016829	9	0.142	0.753	0.708	CM38	9	0.106	0.788	0.764
HN33	10	0.102	0.768	0.739	CMTCN8	10	0.050	0.610	0.582
SSR018393	6	0.022	0.673	0.641	HSSR010	9	0.050	0.809	0.788
HN312	11	0.108	0.834	0.808	HSSR015	10	0.011	0.718	0.722
SSR020162	5	0.052	0.602	0.546	DM0673	12	0.100	0.837	0.819
SSR020947	5	0.061	0.574	0.508	DM0804	5	0.008	0.560	0.571
DE1557	12	0.028	0.808	0.793	SSR038372	5	0.052	0.563	0.480
SSR023138	8	0.157	0.762	0.748	CMGA104	9	0.056	0.733	0.687
HN341	7	0.128	0.484	0.456	SSR040314	10	0.057	0.718	0.674
DE1103	7	0.092	0.583	0.556	SSR041311	11	0.046	0.723	0.704
SSR025990	9	0.009	0.623	0.615	CMGAN80	9	0.107	0.609	0.578
CMAGN52	9	0.022	0.723	0.705	Mean	8.512	0.074	0.704	0.668

2.2 不同类型甜瓜种质的 UPGMA 聚类分析

利用 SSR 基因型数据对 191 份甜瓜种质进行聚类分析,构建聚类图(图 1)。结果表明,所有甜瓜种质可明显分为 4 个类群。I 类群仅包含 2 份印度野生种质 PI614410 和 PI614412; II 类群包含 34 份野生种质和 15 份薄皮种质(均为变种 *C.melo* subsp. *agrestis* var. *momordica* (Roxb.) Cogn., 这些种质均来自印度,其 GD 变幅为 0.223~0.788(平均 0.646),说明印度甜瓜种质的遗传多样性十分丰富,野生和薄皮种质的遗传关系密切; III 类群以厚皮种质为

主,包含 51 份厚皮种质和 1 份野生种质(GD 变幅为 0.198~0.676,平均 0.516)。厚皮种质主要来自中国(以新疆为主)、印度、伊朗和土耳其,野生种质 PI614481 来源于印度,该野生种可能含有印度厚皮种质的血缘。根据 Pitrat 的分类标准, III 类群中的厚皮种质至少包括 5 个变种,即 *C.melo* subsp. *melo* var. *cantalupensis* Naudin、*C.melo* subsp. *melo* var. *reticulatus* Ser、*C.melo* subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.、*C.melo* subsp. *melo* var. *ameri* Gabaer 和 *C.melo* subsp. *melo* var. *chandaliak* Gabaiev; IV 类群包含 75 份薄皮

种质、7 份厚皮种质和 6 份野生种质。薄皮种质主要来自东亚(以中国为主),包括 *C.melo* subsp. *agrestis* var. *chinensis* (Pangalo) Pangalo、*C.melo* subsp. *agrestis* var. *conomon* (Thunb.) Makino、*C.melo* subsp. *agrestis* var. *makuwa* Makino 等变种,厚皮种质来自中国(3

份)、印度(3 份)和日本(1 份),野生种质来自中国(4 份)和美国(2 份)。尽管Ⅳ类群种质类型较多且来源较广,但在 DNA 水平的变异较小(GD 变幅为 0.187~0.717,平均 0.446),说明它们遗传背景较为狭窄,可能具有相似的血缘。



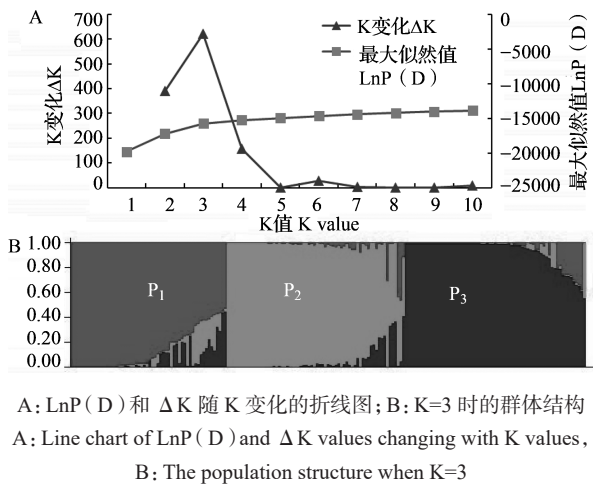
图 1 191 份甜瓜种质的邻接聚类图

Fig.1 A neighbour-joining dendrogram of 191 melon accessions based on SSR markers

2.3 基于 Bayesian 算法的群体结构分析

为了进一步验证所用甜瓜种质的群体结构,对 191 份种质进行基于 Bayesian 算法的亚群划分。图 2A 显示, ΔK 在 $K=3$ 时具有最大似然值 $\ln P(D)$, 即 191 份甜瓜种质的适宜亚群数为 3 (P_1 、 P_2 和 P_3) (图 2B)。 P_1 亚群以厚皮种质为主, 包含 48 份厚皮和 7 份薄皮种质; P_2 亚群以野生和薄皮种质

为主, 包含 39 份野生、20 份薄皮和 6 份厚皮种质; P_3 亚群是一个典型的薄皮种质池, 包含 63 份薄皮、4 份厚皮和 4 份野生种质。分析 3 个亚群所包含具体种质发现, P_1 对应邻接聚类图中的 I 和 II 类群, P_2 和 P_3 分别对应 III 和 IV 类群, 即聚类分析结果与亚群划分结果具有较好的一致性。



A: LnP(D) 和 ΔK 随 K 变化的折线图; B: K=3 时的群体结构
A: Line chart of LnP(D) and ΔK values changing with K values,
B: The population structure when K=3

图 2 191 份甜瓜种质的群体结构分析
Fig.2 Population structure of 191 melon accessions

2.4 不同类型甜瓜种质的多样性比较

由于供试甜瓜种质可根据其类型明显划分为 3 个类群,说明这些种质中存在明显的群体结构。由表 4 可知,不同类型种质间存在一定程度的遗传分化,厚皮和薄皮种质间的遗传分化较大 ($F_{ST}=0.152$, $D=0.398$),而野生种质与厚皮或薄皮种质间的分化较弱 ($F_{ST}<0.120$, $D<0.300$)。不同类型种质的多样性水平也存在差异(表 5),薄皮和野生种质的等位基因数(N_a)相差不大,且均高于厚皮种质,说明薄皮和野生种质包含更多的等位变异;野生种质的观测杂合度($H_o=0.176$)明显高于薄皮和厚皮种质,说明野生种质杂合位点较多;厚皮和薄皮种质中的稀有等位基因频率(MAF)相差不大,但明显低于野生种质($MAF=0.420$),说明野生种质中存在较多的低频率的稀有基因;反映群体多样性水平的两个指标期望杂合度(H_e)和多样性指数(I)在 3 种甜瓜类型中的表现一致,即:野生种质最高,厚皮种质次之,薄皮种质最低。综合分析 5 种遗传参数的结果表明,不同类型甜瓜种质多样性水平表现为:野生种质>厚皮种质>薄皮种质。

表 4 不同类型甜瓜种质间的遗传分化
Table 4 Genetic differentiation of different melon types

种质类型	厚皮种质	薄皮种质	野生种质
Accession type	TC	TN	W
厚皮种质 TC	—	0.398	0.278
薄皮种质 TN	0.152	—	0.291
野生种质 W	0.107	0.110	—

对角线以上为遗传距离(D),对角线以下为分化系数(F_{ST})
Nei's genetic distance (D) and pairwise F_{ST} are above and below the diagonal, respectively.
TC: thick-skinned accessions, TN: thin-skinned accessions, W: wild accessions, the same as below

表 5 不同类型甜瓜种质多样性比较
Table 5 Comparison of genetic diversity for different types of melon accessions

类型	等位基	观测杂	稀有等位	期望杂	多样性
Type	因数 N_a	合度 H_o	基因频率 MAF	合度 H_e	指数 I
厚皮种质 TC	253	0.047	0.321	0.656	1.255
薄皮种质 TN	292	0.068	0.317	0.592	1.207
野生种质 W	287	0.176	0.420	0.738	1.483

2.5 不同类型甜瓜种质的耐冷性评价

由于厚皮、薄皮和野生甜瓜的遗传背景和多样性水平差异明显,不同类型种质的耐冷性也可能存在差异。图 3 显示,3 种类型种质的冷害指数主要集中在 0.4~0.7 之间,基本呈正态分布,说明大多种质的耐冷性中等。厚皮种质的平均冷害指数最大(0.651),峰度和偏度最大,说明大多种质耐冷性较弱,但 CV 也最大,可能存在极少数耐冷材料;薄皮和野生种质的平均冷害指数较小且相差不大,说明这两类种质耐冷性基本相当,但薄皮种质的峰度、偏度和 CV 均小于野生种质(表 6),说明薄皮种质的耐冷性要总体强于野生种质,但野生种质中也存在强耐冷材料(CV 较大)。进一步统计发现,厚皮、薄皮和野生种质分别有 3.44%、7.78% 和 6.98% 的种质的冷害指数小于 0.3(强耐冷),有 1.72%、13.33% 和 2.32% 的种质冷害指数介于 0.3~0.4 之间(耐冷),说明耐冷性资源主要存在薄皮种质中。

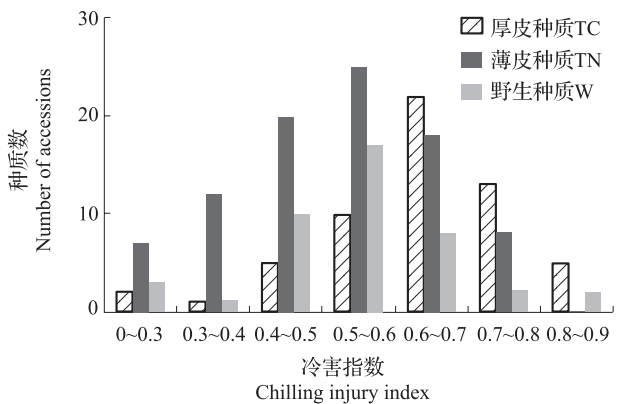


图 3 不同甜瓜种质类型冷害指数的分布
Fig.3 Distribution of chilling injury indices of different types of melon accessions

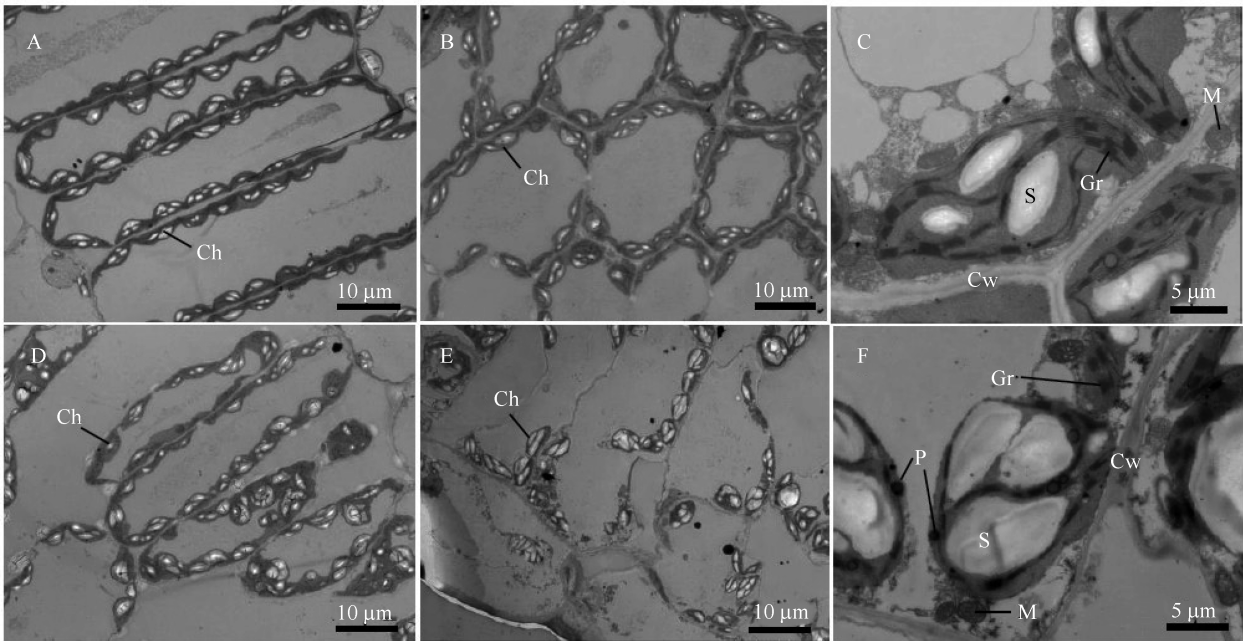
分别从薄皮和厚皮种质中挑选出耐冷种质蛤蟆酥 5 (CII<0.3) 和冷敏种质凤凰 (CII>0.8),对 4 ℃ 低温处理前后幼苗叶片细胞超微结构进行比较分析。结果发现,未经低温处理的耐冷种质蛤蟆酥 5 的叶肉细胞排列成典型的栅栏组织,细胞之间排列

表 6 不同类型甜瓜种质冷害指数的变异统计
Table 6 Variation of chilling tolerance of different types of melon accessions

种质类型	均值 ± 标准差	变幅	变异系数	峰度	偏度
Accession type	Mean ± SD	Range	(%) CV	Kurtosis	Skewness
厚皮种质 TC	0.651 ± 0.158	0.223 ~ 0.867	24.27	0.182	0.616
薄皮种质 TN	0.551 ± 0.095	0.205 ~ 0.760	17.24	-0.054	-0.043
野生种质 W	0.546 ± 0.126	0.189 ~ 0.854	23.08	0.117	-0.025

紧密(图 4A),而冷敏种质凤凰的叶肉细胞排列松散,细胞之间间隙较大(图 4D)。经低温处理后,蛤蟆酥 5 的叶肉细胞从长方形变为近圆形,排列较为紧凑(图 4B),细胞之间出现微小间隙,但质膜清晰可见,未发现质壁分离,叶绿体结构完整,嗜锶颗粒较少(图 4C);而凤凰的叶肉组织遭到破坏,部分细

胞的质膜消失,细胞间的界限不明,大量叶绿体和线粒体解体(图 4E),残存的叶绿体中淀粉颗粒快速膨胀并充斥整个叶绿体,基质急剧减少,基粒片层变得模糊,嗜锶颗粒大量增加(图 4F)。由此可见,低温处理对耐冷种质叶肉细胞结构影响较小,而对冷敏种质叶肉细胞及细胞器结构造成了明显的破坏。



A: 蛤蟆酥 5 叶片低温处理前; B、C: 蛤蟆酥 5 叶片低温处理后; D: 凤凰叶片低温处理前; E、F: 凤凰叶片低温处理后;
Ch: 叶绿体; M: 线粒体; S: 淀粉粒; Cw: 细胞壁; Gr: 基粒; P: 嗜锶颗粒
A: Leaf cells of Hamasu 5 before the low-temperature treatment, B, C: Leaf cells of Hamasu 5 after the low-temperature treatment,
D: Leaf cells of Fenghuang before the low-temperature treatment, E, F: Leaf cells of Fenghuang after the low-temperature treatment,
Ch: chloroplast, M mitochondrion, S: starch grain, Cw: cell wall, Gr: granum, P: osmiophilic granule

图 4 蛤蟆酥 5 和凤凰叶肉细胞在低温处理前后超微结构变化

Fig.4 Ultrastructure changes of leaf cells of Hamasu 5 and Fenghuang before and after the low-temperature treatment

3 讨论

对于育种而言,遗传多样性丰富的种质是宝贵的基础性育种材料。甜瓜是葫芦科中遗传多样性最为丰富的种之一,其多样性水平仅次于同科的南瓜^[8]。甜瓜的变异类型众多,不仅有各种类型的栽培种,还有大量的野生种。作为甜瓜的两大主要栽培类型,厚皮甜瓜(*C.melo* L. subsp.*melo*)被广泛

栽培于世界各地,其商业品种也最多,而薄皮甜瓜(*C.melo* subsp.*agrestis*(Naudin) Pangalo)则主要栽培于东亚,特别是中国的中东部地区。栽培甜瓜的遗传多样性研究已有大量报道,无论采用何种分子标记,大多研究都能将厚皮和薄皮甜瓜区分开,但同一种类型的种质无法根据其变异类型(如变种)加以区分。本研究也得出了相似的结果,无论是 UPGMA 聚类分析还是 Bayesian 亚群划分,厚皮种

质和薄皮种质均分别归属不同的类群,且存在明显的遗传分化($F_{ST}>0.150$),这也支持了 Pitrat^[5]和林德佩^[6]的分类方法。尽管本研究中厚皮甜瓜种质数少于薄皮种质,但其遗传多样性较高,这与厚皮甜瓜的变异类型(厚皮甜瓜有 11 个变种,而薄皮甜瓜仅有 5 个变种)和分布范围相符。与厚皮甜瓜的全球分布不同,薄皮甜瓜种质主要集中在中国的黄淮及长江流域,无论从种质的地理分布还是从 SSR 标记聚类分析结果来看,中国的薄皮甜瓜形成了一个明显的“种质池”,这与本课题组前期对中国栽培甜瓜多样性研究结果一致^[31-32]。

野生甜瓜具有果实小、种子多、果肉薄、分枝能力强等特点,由于未受到人工驯化,其遗传多样性一般高于栽培甜瓜。前人研究发现,野生甜瓜与薄皮甜瓜(特别是 *C.melo* subsp.*agrestis* var.*momordica* (Roxb.) Cogn.) 关系密切^[33]。本研究表明,印度野生甜瓜与当地薄皮甜瓜紧密聚在一起,从 USDA 种质资源中心记录的数据来看,印度薄皮甜瓜大多是一些古老的地方品种或半野生类型,且与野生甜瓜的表型相似,它们之间可能存在基因交流;印度薄皮甜瓜与东亚薄皮甜瓜归属于不同的类群,说明东亚薄皮甜瓜属于另一个分支,但其祖先有待进一步考证。与印度野生甜瓜不同的是,4 份中国野生甜瓜与东亚薄皮种质聚在一起,说明它们遗传关系紧密。Pitrat^[10]认为这些野生甜瓜可能并非真正的野生种,而是栽培甜瓜“逃逸”栽培状态而回归至野生状态。本课题组前期对国内的野生甜瓜和栽培甜瓜进行了比较分析,发现野生甜瓜与薄皮甜瓜的遗传关系紧密,且具有一些栽培甜瓜的特性(如果肉甜味、香气,黄色果皮等)^[34],因而推测国内薄皮甜瓜可能不是起源当地的野生种,如马泡瓜。

不同类型甜瓜种质对低温的耐受性大不相同。一般而言,野生甜瓜因能经受自然界恶劣气候环境而比栽培种具有更强的抗逆性^[35]。而本研究表明,在 3 种不同类型甜瓜种质中,薄皮甜瓜中的强耐冷和耐冷种质所占比例最高。生产实践也表明,原产于我国的小果型薄皮甜瓜一般具有耐低温、适应性广等特点,是早春茬甜瓜栽培的优选类型^[8]。本研究的细胞学观察也证实,薄皮甜瓜叶肉细胞的超微结构不易受到低温胁迫的影响。地处温带季风气候带的黄淮及长江流域,是薄皮甜瓜的重要驯化地,薄皮甜瓜的耐冷性可能源于该地区的多变气候特征(气温随季节显著变化)。印度作为主要甜瓜种质的分布地,属于低纬度热带气候,全年高温多雨,其甜

瓜种质(包括野生甜瓜)可能未受到低温驯化,因而耐冷性相对较弱。从种质的多样性水平来看,薄皮种质的遗传多样性明显低于野生和厚皮种质,但其耐冷性较强,说明薄皮甜瓜中可能存在特异性耐冷相关基因。因此,采用现代分子生物学手段挖掘这些基因并加以利用,有望为甜瓜的耐冷性改良提供有益的基因资源。

参考文献

- [1] Mallick M F R, Masui M. Origin, distribution and taxonomy of melons. *Scientia Horticulturae*, 1986, 28 (3): 251-261
- [2] Kerje T, Grum M. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. *Acta Horticulturae*, 2000, 510: 37-44
- [3] Kirkbride J H. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). North Carolina: Parkway Publishers, 1993: 19-21
- [4] Stepansky A, Kovalski I, Perl-Treves R. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution*, 1999, 217 (3-4): 313-332
- [5] Pitrat M. Melon, vegetables I.// Prohens J, Nuez F. Handbook of Plant Breeding: vol.1. New York: Springer, 2008: 283-315
- [6] 林德佩. 甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 种下分类专论. 中国瓜菜, 2012, 25 (5): 42-46
Lin D P. Comments on intraspecific classification of melon. *China Cucurbit*, 2012, 25 (2): 42-46
- [7] 林德佩. 中国栽培甜瓜植物的起源、分类及进化. 中国瓜菜, 2010, 23 (4): 34-36
Lin D P. Origin classification and evolution for cultivated plants of Chinese melon. *China Cucurbit*, 2010, 23 (4): 34-36
- [8] 中国农业科学院郑州果树研究所. 中国西瓜甜瓜. 北京: 中国农业出版社, 2000: 313-322
Zhengzhou Fruit Tree Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. *Chinese Watermelon and Melon*. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 313-322
- [9] Sebastian P, Schaefer H, Telford I R, Renner S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C.melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (32): 14269-14273
- [10] Pitrat M. Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). *Plant Biotechnology*, 2013, 30 (3): 273-278
- [11] López-Sesé A I, Staub J E, Gómez-Guillamón M L. Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 108 (1): 41-52
- [12] Sensoy S, Büyükalaca S, Abak K. Evaluation of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, 54 (6): 1351-1365
- [13] Danesh M, Lotfi M, Azizinia S. Genetic diversity of Iranian melon cultigens revealed by AFLP markers. *International*

- Journal of Horticultural Science and Technology, 2015, 2(1): 43-53
- [14] Raghami M, López-Sesé A I, Hasandokht M R, Zamani Z, Moghadam M R F, Kashi A. Genetic diversity among melon accessions from Iran and their relationships with melon germplasm of diverse origins using microsatellite markers. *Plant Systematics and Evolution*, 2014, 300(1): 139-151
- [15] Solmaz I, Kacar Y A, Simsek O, Sari N. Genetic characterization of Turkish snake melon (*Cucumis melo* L. subsp. *melu flexuosus* Group) accessions revealed by SSR markers. *Biochemical Genetics*, 2016, 54(4): 534-543
- [16] Wang Y L, Gao L Y, Yang S Y, Xu Y B, Zhu H Y, Yang L M, Li Q, Hu J B, Sun S R, Ma C S. Molecular diversity and population structure of oriental thin-skinned melons, *Cucumis melo* subsp. *agrestis*, revealed by a set of core SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 2018, 229: 59-64
- [17] 吴梅梅, 张显, 郑俊鸷, 杨小振. 西瓜甜瓜抗寒性研究进展. *中国瓜菜*, 2014, 27(S): 1-5
Wu M M, Zhang X, Zheng J X, Yang X Z. Advances on cold resistance of watermelon and melon. *China Cucurbit*, 2014, 27(S): 1-5
- [18] 姚雪. 甜瓜种质资源耐冷性的鉴定评价及其关联分析研究. 哈尔滨: 东北农业大学图书馆, 2018: 17-35
Yao X. Studies on identification and evaluation of chilling-tolerance and association analysis in melon germplasm. Harbin: Library of Northeast Agricultural University, 2018: 17-35
- [19] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(6): 1349
- [20] Zhu H, Guo L, Song P, Luan F, Hu J, Sun X, Yang L. Development of genome-wide SSR markers in melon with their cross-species transferability analysis and utilization in genetic diversity study. *Molecular Breeding*, 2016, 36(11): 153
- [21] Diaz A, Fergany M, Formisano G, Ziarsolo P, Blanca J, Fei Z, Staub J E, Zalapa J E, Cuevas H E, Dace G, Oliver M, Boissot N, Dogimont C, Pitrat M, Hofstede R, van Koert P, Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, Cohen S, Schaffer A, Katzir N, Xu Y, Zhang H, Fukino N, Matsumoto S, Garcia-Mas J, Monforte A J. A consensus linkage map for molecular markers and quantitative trait loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 2011, 11(1): 111
- [22] 王盼乔, 周亚峰, 许彦宾, 胡建斌, 杨路明, 孙守如. 基于多序列比对的甜瓜 SSR 标记开发及应用. *河南农业大学学报*, 2016, 50(2): 189-197
Wang P Q, Zhou Y F, Xu Y B, Hu J B, Yang L M, Sun S R. Development of SSR markers based on multiple sequence alignment and their applications in melon. *Journal of Henan Agricultural University*, 2016, 50(2): 189-197
- [23] Nagy S, Poczai P, Cernák I, Gorji A M, Hegedűs G, Taller J. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 2012, 50(9): 670-672
- [24] Yeh F C, Boyle T J. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 1997, 129: 157
- [25] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729
- [26] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003, 164(4): 1567-1587
- [27] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620
- [28] 周亚峰, 许彦宾, 王艳玲, 李琼, 胡建斌. 基于主成分-聚类分析构建甜瓜幼苗耐冷性综合评价体系. *植物学报*, 2017, 52(4): 520-529
Zhou Y F, Xu Y B, Wang Y L, Li Q, Hu J B. Establishment of a comprehensive evaluation system for chilling tolerance in melon seedlings based on principal component. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52(4): 520-529
- [29] 庄飞云, 陈劲枫, 钱春桃, 李式军, 任刚, 王志军. 甜瓜属种间杂交新种及其后代对低温的适应性反应. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 27-30
Zhuang Y F, Chen J F, Qian C T, Li S J, Ren G, Wang Z J. Responses of seedlings of *Cucumis* × *hytivus* and progenies to low temperature. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(2): 27-30
- [30] 彭玲, 郑容, 郑妹颖, 郝耀华, 谢大鹤, 王德炳. 一种临床实用的快速电镜标本制备方法. *电子显微学报*, 2006, 25(S1): 277-278
Peng L, Zheng R, Zheng S Y, Hao Y H, Xie D H, Wang D B. A clinical and practical method for the preparation of specimens of rapid electron microscope. *Journal of Electron Microscopy Society*, 2006, 25(S1): 277-278
- [31] 胡建斌, 马双武, 简在海, 王吉明, 李琼, 苏艳. 中国甜瓜种质资源形态性状遗传多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 612-619
Hu J B, Ma S W, Jian Z H, Wang J M, Li Q, Su Y. Analysis of genetic diversity of Chinese melon (*Cucumis melo* L.) germplasm resources based on morphological characters. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(4): 612-619
- [32] Hu J B, Wang P Q, Su Y, Wang R J, Li Q, Sun K L. Microsatellite diversity, population structure, and core collection formation in melon germplasm. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33: 439-447
- [33] Decker-Walters D S, Chung S M, Staub J E, Quemada H D, López-Sesé A I. The origin and genetic affinities of wild populations of melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) in North America. *Plant Systematics and Evolution*, 2002, 233(3): 183-197
- [34] Hu J B, Wang P Q, Li Q, Su Y. Microsatellite analysis of genetic relationships between wild and cultivated melons in Northwest and Central China. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(12): 7723-7728
- [35] 李永祥, 王天宇, 黎裕. 主要农作物骨干亲本形成与研究利用. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(5): 1093-1102
Li Y X, Wang T Y, Li Y. Formation, research and utilization of founder parents in major crops. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(5): 1093-1102