

基于SCoT标记分析籽用南瓜的遗传多样性

王丰丰, 王萍*, 杨静, 代彩玲

内蒙古农业大学农学院, 内蒙古野生蔬菜种质资源与创新重点实验室, 呼和浩特010019

摘要: 利用SCoT分子标记对44份籽用南瓜品种进行遗传多样性分析。从62个引物中筛选出24个有多态性的引物来对44份籽用南瓜品种进行PCR扩增, 得到了228个位点, 其中具有多态性的位点有168个, 占总位点数的73.68%。应用POPGENE 32分析得到, 44个籽用南瓜品种的平均Nei's基因多样性系数为0.3055, 平均Shannon's信息指数是0.4425。利用NTSYS Version 2.1软件分析得, 所有籽用南瓜品种的相似系数在0.522~0.934之间; 进行非加权组平均法(UPGMA)聚类分析得出树状图, 将44份籽用南瓜品种完全的区分开来, 并在相似系数0.724处, 分为8类。从得到的一系列遗传相关系数可说明, SCoT分子标记技术可以很好地应用于籽用南瓜材料的遗传多样性分析。

关键词: 籽用南瓜; SCoT标记; 遗传多样性

籽用南瓜是葫芦科南瓜属中食用种子的栽培品种的总称, 是南瓜属中一类经济价值高、营养价值丰富的蔬菜作物。到目前为止, 主要利用的是其种子, 一部分幼嫩果实也可作为淡季蔬菜来食用。在学术上可将其主要划分为美洲南瓜、印度南瓜和中国南瓜三个栽培种。作为商品类型可分为光板(美洲南瓜)、毛边(中国南瓜)、雪白(印度南瓜)和黄厚皮(印度南瓜)四个类型(屈淑平等2013)。在我国, 籽用南瓜已被大范围种植, 主要集中在黑龙江、内蒙古、甘肃、陕西等地区。

近年来, 由于地区间相互引种、农户及种子公司自繁自育等现象导致籽用南瓜品种之间关系愈加混杂, 为种质资源的收集和育种工作的开展带来了巨大的困难。为了解决这一问题, 学者们从最初的植物学性状多样性分析发展到细胞学标记和分子标记这一层次上, 再到后期1种、2种乃至多种生物标记技术相结合的遗传多样性分析上, 初步解决了籽用南瓜品种中“同名异物”或“同物异名”亲缘关系混杂的问题。张岩等(2010)对18份籽用南瓜的36个植物学性状进行了遗传多样性分析及亲缘关系的研究。刘超(2012)将形态学标记与SSR分子标记结合起来对76个籽用南瓜品种进行了遗传多样性研究。卢丽芳(2015)利用SRAP和SSR分子标记结合起来对85份不同的南瓜种质进行了亲缘关系的研究。

随着各种分子标记技术在籽用南瓜上的成功应用, 对于籽用南瓜亲缘关系的研究越来越系统化, 各品种之间的分类也越来越规范化, 极大地方便了育种工作的进行。SCoT (start codon targeted polymorphism)分子标记, 即目标起始密码子多态

性标记(Collard和Mackill 2009), 是一种依据植物基因中的ATG翻译起始位点侧翼序列的保守性, 设计单引物并对基因组进行扩增的新型目的基因分子标记。近些年以其易操作、重复性好、成本低、引物通用性强等多方面优势逐渐被专家学者所青睐。从2009年被开发, 到现在已被成功应用在柑橘、玄参、柿、丝瓜等植物材料上(韩国辉等2011; 陈大霞等2012; 夏乐晗等2014; 蒋雅琴等2014)。但对于籽用南瓜这一形态变异较大、皮色较为丰富的经济作物来说, 仅仅依靠植物形态学来分类是远远不够的, 这就需要更多新型的分子标记方法去对其进行遗传多样性分析。因此, SCoT标记技术在籽用南瓜材料上的应用势在必行。本研究利用SCoT分子标记方法, 通过对44份不同品种的籽用南瓜材料进行遗传多样性分析和亲缘关系研究, 探讨其亲缘关系的远近, 为籽用南瓜种质资源的科学分类和品种鉴定提供参考依据, 大大加快籽用南瓜品种改良和选育的进程。

材料与amp;方法

1 试验材料

试验中所使用的籽用南瓜44份品种来源于6个不同的地区, 种植于内蒙古农业大学示范区。DNA模板提取使用籽用南瓜的幼嫩真叶。44

收稿 2017-05-18 修定 2017-07-25

资助 内蒙古科技计划项目(20090707、20100704、20110711和20120212)和内蒙古高寒地区高产安全蔬菜生产的研究与创新项目(NDPYTD2013-3)。

* 通讯作者(E-mail: wangping@imau.edu.cn)。

份籽用南瓜品种中有美洲南瓜(*Cucurbita pepo* L.) 29个, 印度南瓜(*Cucurbita maxima* D.) 11个, 中国南瓜(*Cucurbita moschata* Duch.) 4个(表1)。供试材

料中具有代表性的瓜形及老瓜皮色见图1。SCoT引物序列来自于Collard等(2009)的报道, 由上海生物工程工程有限公司合成。

表1 44份籽用南瓜品种的基本信息

Table 1 The basic information on 44 seed-used pumpkin accessions

编号	品种	类型	来源	瓜形及老瓜皮色
1	‘桦南多籽角瓜’	美洲南瓜	中国黑龙江	椭圆形、橙黄色
2	‘PI 370459’	印度南瓜	美国	椭圆形、白色
3	‘美洲南瓜 03’	美洲南瓜	中国内蒙古	长颈圆筒、墨绿色
4	‘Grif 15151’	美洲南瓜	美国	长筒形、棕黄色
5	‘美洲南瓜 57’	美洲南瓜	中国内蒙古	椭圆形、橙红色
6	‘美洲南瓜 86’	美洲南瓜	中国内蒙古	近圆形、橙黄色
7	‘印度南瓜 1号’	印度南瓜	中国内蒙古	近圆形、黄褐色
8	‘美洲南瓜 19’	美洲南瓜	中国内蒙古	长弯圆筒、橙黄色
9	‘印度南瓜 2号’	印度南瓜	中国黑龙江	扁圆形、黄褐色
10	‘美洲南瓜 48’	美洲南瓜	中国内蒙古	椭圆形、墨绿色
11	‘美洲南瓜 30’	美洲南瓜	中国内蒙古	长颈圆筒、深绿色
12	‘神仙拐’	中国南瓜	中国内蒙古	长弯圆筒、黄褐色
13	‘绿栗F1’	印度南瓜	中国内蒙古	盘形、深绿色
14	‘美洲南瓜 54’	美洲南瓜	中国内蒙古	椭圆形、黄色
15	‘印度南瓜 3号’	印度南瓜	中国内蒙古	梨形、墨绿色
16	‘PI 344358’	美洲南瓜	美国	长筒形、棕黄色
17	‘Ames 21651’	美洲南瓜	美国	扁圆形、黄色
18	‘美洲南瓜 01’	美洲南瓜	中国内蒙古	长颈圆筒、橙黄色
19	‘美洲南瓜 61’	美洲南瓜	中国内蒙古	近圆形、棕黄色
20	‘金苹果AA’	美洲南瓜	中国甘肃	扁圆形、橙红色
21	‘美洲南瓜 42’	美洲南瓜	中国内蒙古	近圆形、墨绿色
22	‘中国南瓜8号’	中国南瓜	中国内蒙古	盘形、棕黄色
23	‘美洲南瓜 26’	美洲南瓜	中国内蒙古	椭圆形、深绿色
24	‘印度南瓜 L5’	印度南瓜	中国内蒙古	近圆形、墨绿色
25	‘蜜本南瓜’	中国南瓜	中国内蒙古	哑铃形、深绿色
26	‘印度南瓜莫达’	印度南瓜	中国内蒙古	盘形、橙红色
27	‘托克托黑皮窝瓜’	中国南瓜	中国内蒙古	长把梨形、墨绿色
28	‘阿荣旗南瓜’	印度南瓜	中国内蒙古	扁圆形、墨绿色
29	‘梅亚牌角瓜’	美洲南瓜	中国黑龙江	近圆形、橙黄色
30	‘大板多籽南瓜’	印度南瓜	中国黑龙江	盘形、深绿色
31	‘印度南瓜L2’	印度南瓜	中国内蒙古	盘形、墨绿色
32	‘PI 615102’	美洲南瓜	美国	近圆形、橙红色
33	‘印度南瓜9号’	印度南瓜	中国内蒙古	近圆形、深绿色
34	‘PI 169449’	美洲南瓜	美国	近圆形、黄色
35	‘多籽角瓜’	美洲南瓜	中国内蒙古	近圆形、橙黄色
36	‘美洲南瓜 73’	美洲南瓜	中国内蒙古	长颈圆筒、黄色
37	‘美洲南瓜 47’	美洲南瓜	中国内蒙古	近圆形、橙黄色
38	‘PI 508465’	美洲南瓜	美国	椭圆形、橙黄色
39	‘京成7091’	美洲南瓜	中国北京	近圆形、橙黄色
40	‘超级金丰光板’	美洲南瓜	中国甘肃	长颈圆筒、橙红色
41	‘金苹果光板1号’	美洲南瓜	中国甘肃	椭圆形、橙黄色
42	‘晶莹118’	美洲南瓜	中国山西	椭圆形、黄色
43	‘绿星九号F1’	美洲南瓜	中国内蒙古	长筒形、黄色
44	‘金大地’	美洲南瓜	中国甘肃	椭圆形、橙黄色



图1 供试材料具有代表性的瓜形及老瓜皮色

Fig.1 The typical fruit shape and skin color of tested materials

2 试验方法

2.1 DNA提取与检测

液氮研磨籽用南瓜幼嫩真叶至粉末, 使用植物基因组DNA提取试剂盒提取DNA样品, 1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度, 超微量分光光度计检测DNA浓度, 保存于 -20°C 条件下。

2.2 SCoT-PCR扩增

采用已优化好的 $20\ \mu\text{L}$ PCR体系, 其中 Mg^{2+} $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板DNA $30\ \text{ng}$, 引物 $1.00\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 $0.5\ \text{U}$, dNTPs $0.40\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (王丰丰等2017)。扩增程序为: 预变性 94°C $4\ \text{min}$; 变性 94°C $30\ \text{s}$, 复性退火 47.7°C $30\ \text{s}$, 延伸 72°C $1\ \text{min}$, 这一系列循环35次; 再 72°C 延伸 $5\ \text{min}$ 。扩增完成后, 取 $4\ \mu\text{L}$ 扩增产物与 $2\ \mu\text{L}$ $6\times$ loading buffer混合均匀后琼脂糖凝胶(用Geiview核酸染料染色)电泳, 紫外凝胶成像系统拍照保存。

2.3 多态性引物及退火温度筛选

从全部引物中筛选出条带清晰、多态性好的引物, 并对筛选出的引物设置温度梯度进行退火温度的筛选(表2)。与44份籽用南瓜品种模板DNA按照上述优化体系结合, PCR扩增后凝胶电泳拍照保存, 得到所需的多态性好的群体条带。每一引物凝胶电泳均须进行3次以上重复, 来保证所得扩增条带的稳定性和结果的准确性。

2.4 数据分析

对已得到的凝胶图片上的条带进行统计, 采用“0-1”统计条带方法来记录, 有条带的位置记为“1”, 无条带的则记为“0”, 最终得到籽用南瓜品种的“0-1”矩阵排列表。在此基础上, 使用POPGENE 32软件分析得出扩增产物的多态位点数、多态位点百分率、Nei's基因多样性系数等能够衡量遗传

多样性的指标值; 使用NTSYS (Numerical taxonomy and multivariate analysis system) Version 2.1软件 (Rohlf 2000)对所得数据进行UPGMA聚类分析和遗传相似系数分析, 构建树状聚类图。

实验结果

1 SCoT标记的多态性分析

从62个引物中筛选出多态性好的引物24个, 共扩增出有效的DNA位点228个, 其中具有多态性的位点有168个, 多态位点百分率为73.68%, 说明所用籽用南瓜种质遗传多样性比较丰富。所有DNA位点在条带中的分布范围为 $200\sim 2\ 200\ \text{bp}$ 之间, 集中分布在 $300\sim 2\ 100\ \text{bp}$ 之间。多态性最好的引物为SC13, 该引物中有多态性的条带占全部条带的92.31%; 多态性最低的引物为SC22, 其多态率为50.00%。24个引物扩增出的条带数介于7~13条之间, 所有引物的条带平均数为9.5条, 具有多态性的条带平均数为7条(引物SC25、SC54的扩增结果见图2)。经过POPGENE 32软件分析“0-1”原始矩阵得出, 44份籽用南瓜品种的平均Nei's基因多样性系数为0.3055, 平均Shannon's信息指数是0.4425, 有多态性的有效位点占全部位点的73.68%, 与人工统计结果相同, 更加验证了南瓜种质资源在分子水平上的遗传多样性, 说明了SCoT分子标记方法在籽用南瓜材料中进行遗传多样性研究也是适用的。

2 相似性系数分析

将24个引物扩增的条带对应的原始数据导入NTSYS Version 2.1软件分析得出44份籽用南瓜材料之间的相似系数值, 所有籽用南瓜供试材料之间的相似系数范围在 $0.522\sim 0.934$ 之间。相似系数

表2 SCoT引物多态性信息及其退火温度

Table 2 Polymorphic information and annealing temperatures of SCoT primers

引物序号	引物序列(5'→3')	扩增条带数/个	多态性条带数/个	多态位点比例/%	退火温度/°C
SC1	CAACAATGGCTACCACCA	9	7	77.78	49.6
SC4	CAACAATGGCTACCACCT	11	9	81.82	50.0
SC5	CAACAATGGCTACCACGA	7	5	71.43	50.9
SC8	CAACAATGGCTACCACGT	11	9	81.82	50.5
SC9	CAACAATGGCTACCACGT	8	7	87.50	50.9
SC11	AAGCAATGGCTACCACCA	8	6	75.00	53.8
SC12	ACGACATGGCGACCAACG	9	7	77.78	54.2
SC13	ACGACATGGCGACCATCG	13	12	92.31	53.1
SC16	ACCATGGCTACCACCGAC	10	7	70.00	50.9
SC17	ACCATGGCTACCACCGAG	11	9	81.82	50.0
SC18	ACCATGGCTACCACCGCC	13	11	84.62	53.1
SC19	ACCATGGCTACCACCGGC	10	7	70.00	50.9
SC21	ACGACATGGCGACCCACA	13	10	76.92	50.9
SC22	AACCATGGCTACCACCAC	12	6	50.00	51.7
SC25	ACCATGGCTACCACCGGG	7	6	85.71	48.4
SC27	ACCATGGCTACCACCGTG	8	5	62.50	50.5
SC29	CCATGGCTACCACCGGCC	10	6	60.00	53.1
SC35	CATGGCTACCACCGGCC	8	6	75.00	50.9
SC39	AACCATGGCTACCACCGC	8	5	62.50	51.7
SC47	ACAATGGCTACCCTGCC	8	6	75.00	51.7
SC54	ACAATGGCTACCACCAGC	7	6	85.71	49.6
SC55	ACAATGGCTACCCTACC	9	5	55.56	50.0
SC60	ACAATGGCTACCACCACA	9	5	55.56	50.0
SC61	CAACAATGGCTACCACCG	9	6	66.67	50.9
总计		228	168	73.68	

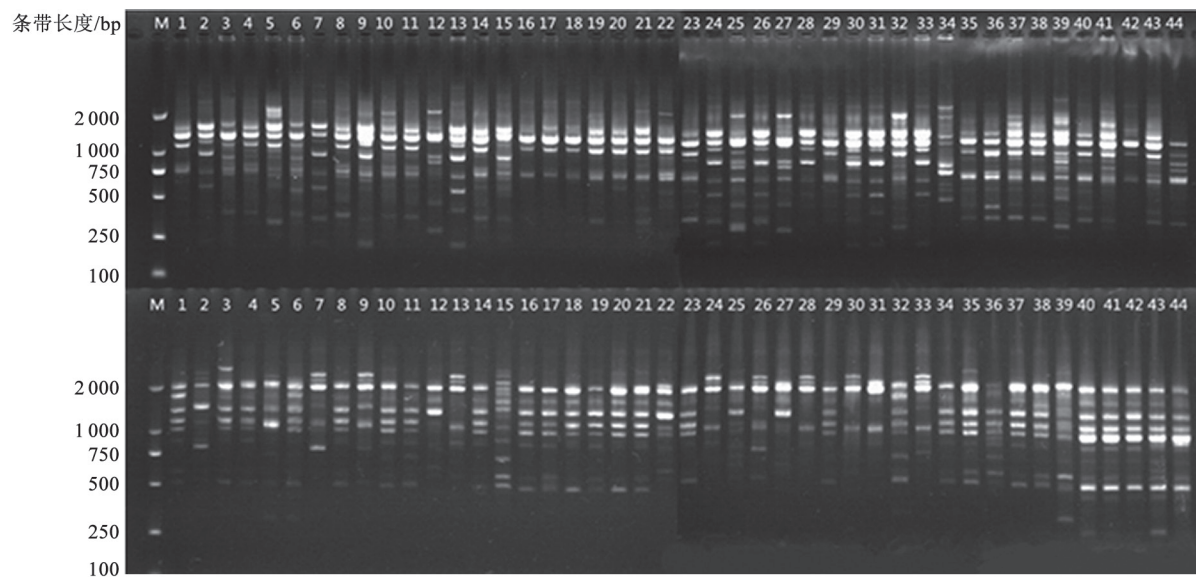


图2 引物SC25、SC54对所有供试材料的扩增结果

Fig.2 Amplification results of SCoT primers SC25 and SC54 in all tested materials

1~44: 供试材料对应编号; M: DL2000 marker.

最大的两个品种为41号‘金苹果光板1号’和42号‘晶莹118’,两者均是美洲南瓜,为0.934;相似系数最小的两个品种为2号‘PI 370459’和20号‘金苹果AA’,还有18号‘美洲南瓜 01’和30号‘大板多籽南瓜’,这两组最小相似系数分别是由美洲南瓜和印度南瓜所生成的,相似系数为0.522。同时也说明了‘金苹果光板1号’和‘晶莹118’两个籽用南瓜品种之间的亲缘关系最近,而‘PI 370459’和‘金苹果AA’,‘美洲南瓜 01’和‘大板多籽南瓜’两者之间的亲缘关系最远。从所有供试材料之间的相似系数反映出了籽用南瓜品种之间的亲缘关系较近不易区分,但可以通过SCoT分子标记可以将其完全区分开来,表明该分子标记可以较好地籽用南瓜遗传多样性分析中应用。

3 聚类分析

通过NTSYS Version 2.1软件对“0-1”原始矩阵数据代入分析,进行UPGMA聚类分析得到了籽用南瓜44份品种的树状聚类图。由聚类图(图3)可知,在相似系数为0.590水平时,可将44份籽用南瓜品种分为两大组,第一大组包括I组(29份美洲南瓜品种)和II组(4份中国南瓜品种),第二大组包括III组(11份印度南瓜品种)。这一分类验证了前人所得结果:美洲南瓜和中国南瓜的亲缘关系较近,两者与印度南瓜的亲缘关系相对较远(赵福宽等2006)。在相似系数为0.800水平时,可将供试籽用南瓜品种分为8组,为A组(1、16、17、18、19、20、14、23、3、8、4、10、11、29、35、36、37、38、40、21、41、42、43、44、34)、B组

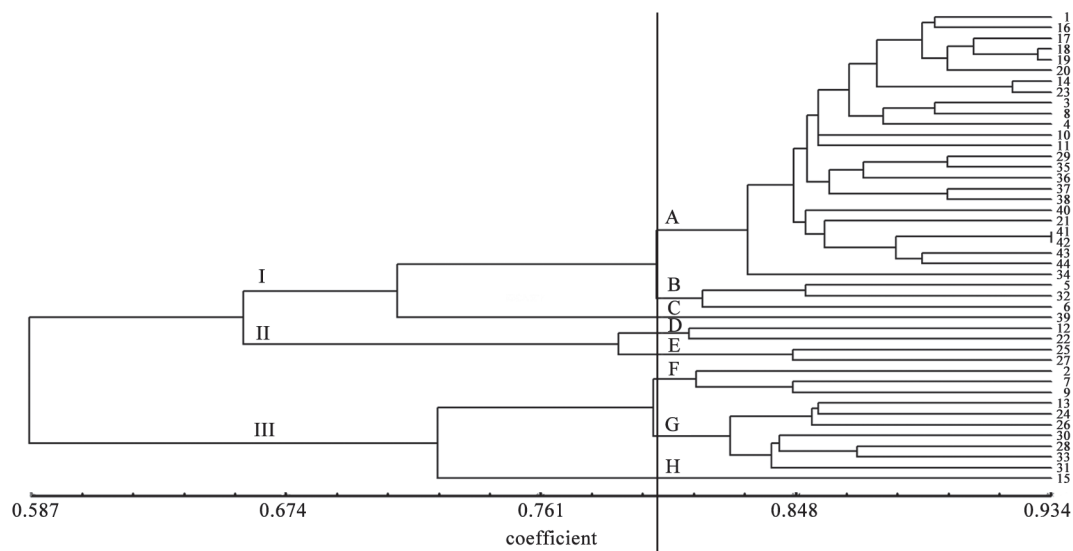


图3 44份籽用南瓜材料的SCoT树状聚类图

Fig.3 Dendrogram of 44 seed-used pumpkin accessions by SCoT molecular marker

(5、32、6)、C组(39)、D组(12、22)、E组(25、27)、F组(2、7、9)、G组(13、24、26、30、28、33、31)和H组(15)。其中, A组包含了供试材料的一大部分品种,还可以将其再细分。A组、B组和C组籽用南瓜材料均属于美洲南瓜,而D、E两组属于中国南瓜, F组、G组和H组则属于印度南瓜。从聚类图中可以看出, C组中的39号和H组中的15号籽用南瓜品种,分别独立地从美洲南瓜和印度南瓜中区分出来,说明了它们本身有区别于其所属类群的其他品种,具体区别有待进一步研究。

讨 论

SCoT标记,即目标起始密码子多态性标记是一种新型的分子标记方法,学者多将其与PCR扩增结合进行科研试验,扩增前就要考虑PCR扩增体系问题。也可以说应用SCoT分子标记到某一植物材料上,就要先进行PCR体系优化(龙治坚等2015)。由于已有前人建立并优化了南瓜的SCoT-PCR反应体系,所以本研究是在此体系基础上进行了SCoT分子标记在籽用南瓜材料上的进一步研究。在此之前,该标记方法已被应用到了多个植

物材料上。陈香玲等(2012)对36份菠萝品种进行了SCoT-PCR扩增,筛选出了18条多态性好的引物,多态性条带所占比率为64.99%,证明了SCoT标记在菠萝种质上得到了成功应用。林清等(2013)从70条SCoT引物中筛选出21条多态性较好的引物,扩增的条带多态性比率为70%,并利用UPGMA聚类分析,将46份芥菜种质资源完全区分开来;又从中选出了5个引物的16条多态性谱带成功构建出了所有供试材料的指纹图谱,完成了SCoT标记在植物材料上更进一步地应用。可以看出,作为一种新兴的分子标记方法,SCoT标记的应用还仅仅只是停留在初始阶段。而其他出现较早的分子标记已从遗传多样性的研究发展到了基因差异表达、定位以及克隆等更深层次。要想将SCoT分子标记更深层次的应用到科研中,就要在应用范围广泛的基础上,尽可能地做到与其他先进的研究方法相结合,勇于创新,开发出更多的引物,循序渐进地充分发挥出它自身的价值(谭行之等2010)。

供试材料所选用的籽用南瓜品种是来自6个不同地区的,其中大部分来源于内蒙古自治区。SCoT聚类结果从地区这一方面来看,有的材料虽然属于同一栽培种,来自同一地区,但没聚到一块;有的材料虽然聚到了一起,但其实相距的距离却是遥远的。由此可以看出,籽用南瓜品种之间有着十分复杂的亲缘关系。出现这种现象的原因可能是籽用南瓜根系较发达,抗逆性较强,对栽培环境没有太严格的要求(刘宜生等2008),很多地区都去引进经济效益高的籽用南瓜品种种植,由于各种籽用南瓜品种的相互引进,交流频繁,使得品种之间的名称混乱(吴雪霞等2012);加上相同的小范围的种植环境,使得产生的遗传变异差别不明显,进而导致“同物异名”现象的产生。SCoT聚类结果从植物学性状这一方面来看(见表1和图1),有的瓜形相同、大小相似的品种没聚到一起,有的外观形态各不相同的品种却聚到了一起。由此可以看出,通过地区来源和植物学性状来判断品种间亲缘关系远近是不准确的,这一点恰恰和罗聪的SCoT标记在芒果种质上遗传多样性分析中所得的结论相一致(Luo等2010),充分说明了使用分子标记对籽用南瓜种质资源的遗传多样性分析是非常有必要的。

本研究成功地将SCoT分子标记应用到籽用

南瓜材料上,对其进行遗传多样性分析和亲缘关系的研究。经NTSYS Version 2.1软件分析得出,44份籽用南瓜品种的相似系数范围为0.522~0.934,相似系数范围跨度相对较大;而且在类群划分上还是不够精细,有的品种单独被聚到了一类。导致这些问题出现的原因可能是本身品种之间具有其较高的遗传多样性,且个别品种有不同于其他品种的特征;或者是琼脂糖凝胶电泳的原因,今后可采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测进一步试验,两者结合分析(侯思宇等2011)。将多种分子标记方法、多种试验方法应用到籽用南瓜材料遗传多样性分析上是为了更加全方面、多层次地对其亲缘关系远近、遗传信息相似度进行精确定位,为籽用南瓜品种的鉴别、分类、保存和利用提供可靠的理论依据。

参考文献

- Chen DX, Zhang X, Wang Y, Li LY (2012). Genetic diversity of *Scrophularia ningpoensis* based on SCoT analysis. *Chin J Chin Mater Med*, 37 (16): 2368–2372 (in Chinese with English abstract) [陈大霞, 张雪, 王钰, 李隆云(2012). 应用SCoT标记分析玄参种质资源的遗传多样性. *中国中药杂志*, 37 (16): 2368–2372]
- Chen XL, Su WQ, Liu YQ, Ren H, Lu YY (2012). Analysis on genetic diversity of 36 pineapple collections by SCoT markers. *Southwest Chin J Agric Sci*, 25 (2): 625–629 (in Chinese with English abstract) [陈香玲, 苏伟强, 刘业强, 任惠, 陆玉英(2012). 36份菠萝种质的遗传多样性SCoT分析. *西南农业学报*, 25 (2): 625–629]
- Collard BCY, Mackill DJ (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Mol Biol Rep*, 27: 86–93
- Han GH, Xiang SQ, Wang WX, Jia ZG, Hong QB, Liang GL (2011). Establishment and application of SCoT molecular marker system for Citrus. *Acta Hort Sin*, 38 (7): 1243–1250 (in Chinese with English abstract) [韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 贾志刚, 洪棋斌, 梁国鲁(2011). 柑橘SCoT分子标记技术体系的建立及其在遗传分析中的应用. *园艺学报*, 38 (7): 1243–1250]
- Hou SY, Sun CX, Shen J, Wang YG, Han YB (2011). Genetic variation among thirty *Ziziphus jujuba* Mill. cultivars as revealed by ISSR marker assays. *Plant Physiol J*, 47 (3): 275–280 (in Chinese with English abstract) [侯思宇, 孙朝霞, 申洁, 王玉国, 韩渊怀(2011). 30个枣树种质资源遗传多样性的ISSR分析. *植物生理学报*, 47 (3): 275–280]
- Jiang YQ, Li Y, Li WJ, Wu YG, Wang YK, Kang DX (2014). Application of SCoT markers on genetic diversity analysis of *Luffa* Mill. *J Southern Agric*, 45 (12): 2117–2122 (in Chinese with English abstract) [蒋雅琴, 黎炎, 李文嘉, 吴永官, 王益奎, 康德贤(2014). SCoT分子标记技术在丝瓜上的应用. *南方农业学报*, 45 (12): 2117–2122]

- Lin Q, Long ZJ, Han GH, He Q, Xiang SQ, Fan YH, Tang JJ, Liang GL (2013). Genetic diversity and fingerprint based on SCoT markers in *Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss. *Chin Veget*, 6 (12): 31–39 (in Chinese with English abstract) [林清, 龙治坚, 韩国辉, 何桥, 向素琼, 范永红, 唐佳佳, 梁国鲁(2013). 基于SCoT标记的芥菜种质遗传多样性与指纹图谱. *中国蔬菜*, 6 (12): 31–39]
- Liu C (2012). Studies on genetic diversity of seed-used pumpkin germplasm resources (Master's thesis). Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese with English abstract) [刘超(2012). 籽用南瓜种质资源遗传多样性研究(硕士论文). 哈尔滨: 东北农业大学]
- Liu YS, Lin DP, Sun XW, Wang CL (2008). Advances on the cucurbit industry and cucurbit science and technology of in China. *Chin Cucur Veget*, (6): 4–9 (in Chinese with English abstract) [刘宜生, 林德佩, 孙小武, 王长林(2008). 我国南瓜属作物产业与科技发展的回顾和展望. *中国瓜菜*, (6): 4–9]
- Long ZJ, Fan LZ, Xu G, Hu SL, Han GH (2015). Application advance of SCoT molecular markers in plants. *J Plant Genet Res*, 16 (2): 336–343 (in Chinese with English abstract) [龙治坚, 范理璋, 徐刚, 胡尚连, 韩国辉(2015). SCoT分子标记在植物研究中的应用进展. *植物遗传资源学报*, 16 (2): 336–343]
- Lu LF (2015). Analysed the genetic diversity in Squash by SRAP and ISSR Markers (Master's thesis). Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [卢丽芳(2015). 南瓜种质资源遗传多样性SRAP和ISSR分析(硕士论文). 福州: 福建农林大学]
- Luo C, He XH, Chen H, Qu SJ, Gao MP (2010). Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. *Biochem Syst Ecol*, 38: 1176–1184
- Qu SP, Liu C, Ge Y, Wang DJ, Li X, Cui CS (2013). Morphological diversity analysis of seed-used pumpkin germplasm resources. *J Northeast Agric Univ*, 44 (10): 67–75 (in Chinese with English abstract) [屈淑平, 刘超, 葛宇, 王冬杰, 李雪, 崔崇士(2013). 籽用南瓜种质资源形态学多样性分析. *东北大学学报*, 44 (10): 67–75]
- Rohlf FJ (2000). NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.11x. New York: Exeter Software
- Tan XZ, Cui CS, Qu SP (2010). Advances in marker-assisted breeding of cucurbita squash. *Chin Cucur Veget*, 23 (3): 37–40 (in Chinese with English abstract) [谭行之, 崔崇士, 屈淑平(2010). 南瓜作物分子标记辅助育种研究进展. *中国瓜菜*, 23 (3): 37–40]
- Xia LH, Yang TT, Yang Y, Xia HY, Zhang YF, Wang RZ (2014). System optimization of SCoT-PCR and analysis on genetic diversity of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 34 (3): 473–480 (in Chinese with English abstract) [夏乐哈, 杨婷婷, 杨勇, 夏宏义, 张永芳, 王仁梓(2014). 柿SCoT-PCR体系优化及品种遗传多样性分析. *西北植物学报*, 34 (3): 473–480]
- Wang FF, Wang P, Shi L, Yang J, Yang Q (2017). Orthogonal optimization of SCoT-PCR system and primer screening in pumpkin. *Chin Cucur Veget*, 30 (1): 12–17 (in Chinese with English abstract) [王丰丰, 王萍, 石磊, 杨静, 杨琴(2017). 南瓜SCoT-PCR反应体系的优化与引物筛选. *中国瓜菜*, 30 (1): 12–17]
- Wu XX, Zha DS, Zhu ZW, Xu S (2012). Genetic diversity of salt-tolerant eggplant cultivars by SRAP and ISSR markers. *Plant Physiol J*, 48 (8): 789–794 (in Chinese with English abstract) [吴雪霞, 查丁石, 朱宗文, 许爽(2012). 茄子耐盐种质资源遗传多样性的SRAP和ISSR分析. *植物生理学报*, 48 (8): 789–794]
- Zhang Y, Wang P, Zhao QY, Yang Y (2010). Study of agronomic traits diversity and genetic relationship on germplasm resources of seed-used pumpkin. *J Inner Mongolia Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 31 (4): 34–39 (in Chinese with English abstract) [张岩, 王萍, 赵清岩, 杨燕(2010). 籽用南瓜种质资源农艺性状遗传多样性及亲缘关系研究. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 31 (4): 34–39]
- Zhao FK, Li HY, Zhao XM (2006). Genetic diversity analysis of squash germplasm resources with RAPD. *Mol Plant Bre*, 4 (3): 45–50 (in Chinese with English abstract) [赵福宽, 李海英, 赵晓萌(2006). 南瓜种质资源亲缘关系的RAPD分析. *分子植物育种*, 4 (3): 45–50]

Analysis of genetic diversity based on SCoT markers in seed-used pumpkin germplasm

WANG Feng-Feng, WANG Ping*, YANG Jing, DAI Cai-Ling

Key Laboratory of Wild Vegetable Germplasm Resources and Innovation, College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China

Abstract: SCoT markers were used to study genetic diversity and relationship of 44 seed-used pumpkin accessions. Twenty-four primers were screened from 62 SCoT primers and then used to amplify the genomic DNAs of all the accessions. Totally 228 SCoT loci were produced, including 168 polymorphic loci, with a polymorphism rate of 73.68% obtained by POPGENE 32 software. The average Nei's gene diversity (H) and Shannon's information index (I) were 0.3055 and 0.4425, respectively. The Jaccard genetic similarity coefficients among the accessions were calculated with NTSYS Version 2.1 software and the values were between 0.522 and 0.934. UPGMA cluster analysis was used to draw the dendrogram, and the 44 seed-used pumpkin accessions were completely separated from each other. All test materials were divided into 8 groups at the similarity coefficient of 0.724. The results obtained from a series of genetic correlation coefficients showed that the SCoT molecular marker technique can be used to analyze the genetic diversity of seed-used pumpkin.

Key words: seed-used pumpkin; SCoT marker; genetic diversity

Received 2017-05-18 Accepted 2017-07-25

This work was supported by Inner Mongolia Science and Technology Project (Grant Nos. 20090707, 20100704, 20110711 and 20120212), and Research and Innovation Project of High Yield and Safe Vegetable Production in Alpine Region of Inner Mongolia (Grant No. NDPYTD2013-3).

*Corresponding author (E-mail: wangping@imau.edu.cn).