

美洲南瓜全基因组 InDel 标记的开发与应用

董佳美^{1,2}, 杨永照², 孙柳清², 卢秋晨², 陈宛露², 武喆¹,
段颖², 雷逢进³, 王长林², 薄凯亮²

(1. 山西农业大学园艺学院 山西太谷 030801; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所·
蔬菜生物育种全国重点实验室 北京 100081; 3. 山西农业大学棉花研究所 山西运城 044000)

摘要:美洲南瓜(*Cucurbita pepo* L.)遗传多样性丰富、用途广泛,是具有较高经济价值的重要蔬菜作物之一。为系统开发其全基因组 InDel 标记,对属于不同亚种的 2 份美洲南瓜种质 Jin-GL(*C. pepo* ssp. *texana*)和 HM-S2(*C. pepo* ssp. *pepo*)进行了 Denovo 测序,在每条染色体上筛选并成功验证了 5 个多态性 InDel 位点,共计开发了 100 个标记。利用 81 份南瓜材料对上述标记进行多态性检测,结果显示,供试种质遗传背景较为广泛(香农遗传多样性指数平均为 1.00),标记多态性较高(多态性信息含量平均为 0.56)。利用非加权组平均法(UPGMA)将 81 份材料在遗传相似系数为 0.65 时分为 4 个类群,第 I 类包含 45 份材料,主要为 ssp. *texana* 的蔓生观赏类型美洲南瓜种质;第 II 类包含 34 份材料,为 ssp. *pepo* 的栽培类型美洲南瓜种质;第 III 类为 1 份野生南瓜种质;第 IV 类为 1 份印度南瓜种质。从 100 个多态性 InDel 标记中选取 10 个多态性最高的标记构建了指纹图谱。最后利用 100 对引物对 237 份美洲南瓜商品种(组合)进行了聚类分析,结果表明,在遗传距离为 0.08 时,籽用类型呈现出独立成群的趋势;此外,无论是肉用类型还是籽用类型品种(组合),大部分均呈现出遗传背景较为狭窄的趋势。本研究结果为美洲南瓜种质资源的遗传多样性分析以及新品种选育提供了理论依据。

关键词:美洲南瓜; InDel 标记; 遗传多样性; 指纹图谱

中图分类号: S642.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)12-009-14

Genome-wide InDel marker development and application of *Cucurbita pepo* L.

DONG Jiamei^{1,2}, YANG Yongzhao², SUN Liuqing², LU Qiuchen², CHEN Wanlu², WU Zhe¹, DUAN Ying², LEI Fengjin³, WANG Changlin², BO Kailiang²

(1. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Beijing 100081, China; 3. Institute of Cotton Research, Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044000, Shanxi, China)

Abstract: Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) is an important vegetable crops with rich genetic diversity, diverse use, and high economic value. To systematically develop genome-wide InDel markers, two accessions from different subspecies-Jin-GL (*C. pepo* ssp. *texana*) and HM-S2 (*C. pepo* ssp. *pepo*)-were subjected to resequencing. Five polymorphic InDel loci were selected and successfully validated on each chromosome, resulting in a total of 100 pairs primers. Polymorphism evaluation using 81 pumpkin germplasms revealed broad genetic backgrounds among the tested material, with an average Shannon's genetic diversity index of 1.00, and high marker polymorphism, as indicated by an average polymorphism information content (PIC) of 0.56. Cluster analysis via the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) classified the 81 germplasms into four groups at a genetic similarity coefficient of 0.65. Group I comprised 45 accessions, primarily vining ornamental types of ssp. *texana*. Group II contained 34 accessions, representing cultivated types of ssp. *pepo*. Group III contained one wild accession of *C. foetidissima* and group IV consisted of one *C. maxima* accession. Ten mark-

收稿日期: 2025-06-23; 修回日期: 2025-08-17

基金项目: 国家自然科学基金(32372709); 北京市设施蔬菜创新团队(BAIC01); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IVF-CAAS)

作者简介: 董佳美, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为南瓜遗传育种。E-mail: 903448820@qq.com

通信作者: 雷逢进, 男, 研究员, 研究方向为西葫芦遗传育种。E-mail: sxnky@126.com

王长林, 男, 研究员, 研究方向为南瓜遗传育种。E-mail: wangchanglin@caas.cn

薄凯亮, 男, 研究员, 研究方向为南瓜遗传育种。E-mail: bokailiang@caas.cn

ers with the highest polymorphism were selected from 100 polymorphic InDel markers to construct a fingerprinting. Finally, cluster analysis was performed on 237 commercial *C. pepo* varieties (and hybrids) using the 100 pairs of primers. The results showed that at the genetic distance of 0.08 did seed-types exhibit a tendency to form a distinct group. Furthermore, most varieties (hybrids) of both flesh-type and seed-type exhibit a trend of narrow genetic background. This study provides a theoretical basis for the genetic diversity analysis of *C. pepo* germplasm resources and the development of new cultivar.

Key words: *Cucurbita pepo* L.; InDel marker; Genetic diversity; Fingerprinting

我国是南瓜生产与消费大国,播种面积和产量均居世界前列,2023年我国南瓜栽培面积约40.11万hm²,产量约742.33万t,分别占世界总量的25.84%和31.35%,南瓜栽培面积和产量均居世界第一位(FAO)。美洲南瓜(*Cucurbita pepo*),俗称西葫芦,通常认为包括3个亚种(*ssp. pepo*、*ssp. texana*和*ssp. fraterna*),遗传多样性丰富,在果实形态方面多样性丰富,不但其果实、种子和花等器官均可食用,还可用于园林绿化、造型布景以及雕刻、装饰等用途,是具有较高经济价值的重要蔬菜作物之一^[1-6]。目前,以京葫36号等系列国产冬温室美洲南瓜品种在耐低温弱光、产量、商品性等关键指标上已超越了原有的进口品种,打破了进口品种的垄断地位^[7-8];金无壳、金平果等无壳类型,金苹果AA、瑞丰9号及晶莹、晶板系列等光板类型籽用美洲南瓜品种也已在生产中大面积推广应用^[9]。随着美洲南瓜育种工作的深入,遗传背景狭窄、品种趋同性强的趋势日益明显^[10]。对美洲南瓜种质资源及不同品种/组合进行亲缘关系分析,将有利于育种者了解种质资源间及不同品种/组合间亲缘关系的远近,以便调整组合配制方案,提高选育优良品种的效率。

利用分子标记分析美洲南瓜种质间遗传关系的研究已有较多报道,张颖等^[11]利用SSR标记对48份籽用种质进行了分析;营彩媛等^[12]利用11个SSR标记对36份籽用种质进行了地理来源分析;郑勇民等^[13]利用7个ISSR标记对28份美洲南瓜进行分类研究;刘星等^[14]利用SRAP标记证实了金丝瓜为美洲南瓜的一个变种。但应用分子标记对美洲南瓜种质及商品品种/组合进行大规模亲缘关系分析的研究报道较少。近年来,InDel标记以其共显性好、稳定性高和成本低、效率高的特点,被广泛用于不同作物的亲缘关系分析中^[15-18]。

笔者在对不同亚种的2份美洲南瓜材料Jin-GL和HM-S2进行重测序的基础上,在全基因组范围内开发了100个多态性良好的InDel分子标记,对81份育种材料及237份商品品种/组合进行了遗传关系分析,以探明不同育种材料及不同品种/组合间的遗传距离,以期为美洲南瓜种质资源创制

及优良新品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用2份不同亚种的美洲南瓜种质Jin-GL(*C. pepo ssp. texana*)和HM-S2(*C. pepo ssp. pepo*)用于重测序,材料来源于中国农业科学院蔬菜花卉研究所;选用81份南瓜种质材料用于遗传多样性分析,包括41份观赏美洲南瓜种质、16份肉用美洲南瓜种质、11份美洲南瓜金丝瓜种质、11份美洲南瓜籽用种质,此外还包含1份野生型种质(C40, *Cucurbita foetidissima*)和1份印度南瓜种质(C73, *Cucurbita maxima*)作为外群进行聚类分析。以上材料于2023年春季在北京市顺义区杨镇试验基地纱网棚种植,每份材料种植8株。供试材料果实形状和果皮颜色比较丰富,涵盖了大部分的商品品种类型。表1是81份南瓜种质的来源信息。选用237份短蔓肉用品种/组合(RY,128份)和籽用(ZY,109份)品种/组合,用于遗传多样性的分析,表2是237份南瓜商品种来源信息。以上品种于2023年3—8月在山西省运城市新绛县大棚种植,每份材料种植8株。

1.2 美洲南瓜基因组测序

将Jin-GL和HM-S2叶片样品送至北京百迈客生物科技有限公司进行Denovo测序,基因组组装完成后,以Jin-GL基因组作为参考基因组序列对HM-S2进行分析比对,基于比对结果进行InDel检测和注释。InDel检测使用GATK软件,使用Picard过滤冗余reads,然后使用HaplotypeCaller算法进行InDel的变异检测,过滤后得到最终的变异位点集,最后使用SnpEff对InDel进行注释。

1.3 InDel标记设计与筛选

本研究设计引物使用的是Jin-GL的参考基因组,根据测序数据检测出的InDel位点,筛选插入或缺失碱基数之差至少大于5的位点。设计时避开了上下游引物之间含有其他插入/缺失的区间,寻找质量值QUAL较高的位点。利用Primer 3.0(<https://primer3.ut.ee/>)设计引物,引物退火温度在54~60℃

表 1 81 份南瓜种质资源具体信息
Table 1 Specific information of 81 *Cucurbita pepo* L. germplasm resources

序号 No.	编号 ID	种质名称 Germplasm name	生长习性 Growth habit	拉丁学名 Latin name	用途 Use	种质来源 Seed source
1	C3	白蛋-1482 Baidan-1482	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
2	C5	白色迷你 Baisemini	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
3	C7	丑小鸭-1487 Chouxiaoya-1487	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
4	C8	丑小鸭-1488 Chouxiaoya-1488	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
5	C10	多翅-1490 Duochi-1490	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
6	C12	飞碟-1492 Feidie-1492	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
7	C13	佛手-1493 Foshou-1493	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
8	C14	1409	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
9	C16	疙瘩-1496 Geda-1496	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
10	C17	疙瘩-1497 Geda-1497	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
11	C18	疙瘩-1498 Geda-1498	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
12	C31	鸳鸯梨(烟台) Yuanyangli (Yantai)	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
13	C33	1418	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
14	C34	玉女-1514 Yunü-1514	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
15	C35	玉女-1516 Yunü-1516	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
16	C37	1385	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
17	C38	景甘露 Jin-GL	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
18	C39	HM-S2	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	IVF
19	C40	臭瓜 Chougua	蔓生 Vine	<i>C. foetidissima</i>	无 None	IVF
20	C41	飞碟西葫芦 Feidixihulu	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
21	C43	弯颈西葫芦 Wanjingxihulu	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
22	C49	发财鱼翅瓜 Facaiyuchigua	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	IVF
23	C50	花佛手 Huafoshou	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
24	C51	绿佛手 Lüfoshou	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
25	C52	飞碟 Feidie	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
26	C53	白佛手 Baifoshou	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	KP
27	C54	丑小鸭 1 Chouxiaoya 1	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
28	C55	丑小鸭 2 Chouxiaoya 2	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
29	C56	麦克风 Maikefeng	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
30	C57	梨形瓜 Lixinggua	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
31	C58	1411	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
32	C59	No. 5	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
33	C60	1414	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
34	C61	瓜皮(烟台)Guapi (Yantai)	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
35	C62	1413	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
36	C63	贵南二号-1 Guinan No. 2-1	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
37	C64	贵南二号-2 Guinan No. 2-2	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
38	C66	多翅 Duochi	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
39	C67	1412	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
40	C68	子孙满堂 Zisunmantang	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
41	C69	290 KLEINE	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
42	C70	金蝉脱壳 Jinchantuoqiao	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
43	C71	绿凸珠 Lütuzhu	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
44	C73	1395	蔓生 Vine	<i>C. maxima</i>	无 None	IVF
45	C75	1410	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	观赏 Ornamental	IVF
46	C77	KN-24	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

序号 No.	编号 ID	种质名称 Germplasm name	生长习性 Growth habit	拉丁学名 Latin name	用途 Use	种质来源 Seed source
47	C78	DTZU-100	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX
48	C79	玉珠二号 Yuzhu No. 2	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX
49	C80	黑宝石四号 Heibaoshi No. 4	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX
50	C81	金剑 Jinjian	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX
51	C82	皇冠 Huangguan	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX
52	C83	德丰六号 Defeng No. 6	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	TG
53	C84	德丰三号 Defeng No. 3	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	TG
54	C85	德丰四号 Defeng No. 4	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	TG
55	C86	德丰五号 Defeng No. 5	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	TG
56	C87	元葫 17160 Yuanhu 17160	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	SX
57	C88	1140	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	IVF
58	C89	1207	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	IVF
59	C90	1261	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	肉用 Meat-type	IVF
60	C91	拍砸一号 Paiza No. 1	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	XZ
61	C92	拍砸二号 Paiza No. 2	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	XZ
62	C93	拍砸抗病三号 Paizakangbing No. 3	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	XZ
63	C94	金丝搅瓜-1 Jinsijiaogua-1	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	BG
64	C95	金丝搅瓜-2 Jinsijiaogua-2	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SG
65	C96	JS-3	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SH
66	C97	JS-4	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SH
67	C98	24A12-3A7	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SH
68	C99	24A12-1A9	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SH
69	C100	24A13-A10	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SH
70	C101	24A13-A11	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	金丝瓜 Spaghetti squash	SH
71	C102	瑞丰九号 Ruifeng No. 9	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
72	C103	丽智 3.0 Lizhi 3.0	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
73	C104	希望 3000 Xiwang 3000	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
74	C105	丽智金甲 Lizhijinjia	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
75	C106	丽智 2.0 Lizhi 2.0	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
76	C107	无壳大元帅 Wukedayuanshuai	半蔓生 Semi-vine	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
77	C108	金苹果十号 Jinpingguo No. 10	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
78	C109	金苹果 301 Jinpingguo 301	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
79	C110	金苹果瑞丰九号 Jinpingguoruifeng No. 9	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
80	C111	24-GM1	短蔓 Bush	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW
81	C112	小美人甲 Xiaomeirenjia	蔓生 Vine	<i>C. pepo</i>	籽用 Seed-type	WW

注: IVF. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所; KP. 开平市津农农业有限公司; SX. 山西瑞恒农业股份有限公司; TG. 太谷县德丰种业科技有限公司; XZ. 徐州邳蔬农业科技有限公司; BJ. 北京凤鸣雅世科技发展有限公司; SG. 寿光欣欣然园艺有限公司; SH. 上海曹野农业发展有限公司; WW. 武威金苹果农业股份有限公司。

Note: IVF. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences; KP. Kaiping Jinnong Agricultural Co., LTD; SX. Shanxi Ruiheng Agricultural Co., LTD; TG. Taigu Defeng Seed Co., LTD; XZ. Xuzhou Pizhou Agricultural Technology Co., LTD; BJ. Beijing Fengmingyashi Agricultural Technology Co., LTD; SG. Shouguang Xinxinran Horticulture Co., LTD; SH. Shanghai Caoye Agricultural Development Co., LTD; WW. Wuwei Jinpingguo Agricultural Co., LTD.

表 2 237 份美洲南瓜商品种来源信息
Table 2 Source information of 237 *Cucurbita pepo* commercial varieties

编号 ID	种质来源 Germplasm source
ZY01~100,RY01~05、07~25、27、28、59、60、96~129	山西农业大学棉花研究所 Cotton Research Institute, Shanxi Agricultural University
ZY101~104	北京兄弟农产种子有限公司 Beijing Xiongd Agricultural Seeds Co., LTD.
ZY105~107、RY29~31	山西晋黎来种业有限公司 Shanxi Jinlilai Seed Industry Co., LTD.
ZY108~109	敦煌市高峰种业有限公司 Dunhuang Gaofeng Seed Industry Co., LTD.
RY06、26、33、61、62	东方正大种子有限公司 Dongfang Zhengda Seeds Co., LTD.
RY32、34~36、63	潍坊市农业科学院 Weifang Academy of Agricultural Sciences
RY37~41	京研益农(寿光)种业科技有限公司 Jingyan Yinong (Shouguang) Seed Technology Co., LTD.
RY42~50	济南天瑞种子销售有限公司 Jinan Tianrui Seed Sales Co., LTD.
RY51、52	太谷区德丰种业科技有限公司 Taigu Defeng Seed Co., LTD.
RY53~58	华盛农业集团股份有限公司 Huasheng Agricultural Group Co., LTD.
RY64、65	中国农业科学院蔬菜花卉研究所 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences
RY67~69、92	酒泉农禾农业农民专业合作社 Jiuquan Nonghe Agricultural Farmers' Cooperative
RY70~76	寿光市天硕种业有限公司 Shouguang Tianshuo Seed Co., LTD.
RY77~91	平顶山尤尼特种业有限公司 Pingdingshan Unique Seeds Co., LTD.
RY92~95	山西民丰种业股份有限公司 Shanxi Minfeng Seed Co., LTD.

范围内,上下游引物 Tm 值接近,引物长度 18~25 bp,GC 含量保持在 40%~60%。所有引物合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 InDel 标记有效性验证

PCR 扩增反应体系为 10 μL,具体为:DNA 模板 1.0 μL,ddH₂O 3.0 μL,上下游引物各 0.5 μL,3G Taq Master Mix for PAGE (Red Dye) (Vazyme) 5.0 μL。

PCR 扩增程序为:95 ℃:5 min(预变性);95 ℃:15 s(变性),55 ℃:15 s(退火),72 ℃:30 s(延伸),共 30~35 个循环;72 ℃继续延伸 5 min;12 ℃停止反应。

全基因组 InDel 标记以 Jin-GL、HM-S2 及其 F₁ 为模板进行扩增,筛选扩增产物大小与条带大小一致、特异性好、容易读取且多态性良好的标记。以 81 份南瓜种质资源的 DNA 为模板进行 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,将结果拍照记录。

1.5 数据整理及分析

利用 MG2C_v2.1 (mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/) 绘制染色体上 InDel 标记的物理位置示意图。利用 Microsoft Excel(2019)软件整理数据并对每个 In-Del 标记的多态性条带的存在(1)或不存在(0)作出评价,统计有效等位基因数(effective number of al-

leles per loci, Ne),计算 InDel 标记在供试材料上的等位基因频率,并进行香农多样性指数(shannon diversity index, SHDI)和多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)^[19]的计算;开发全基因组 InDel 标记,并对多态性不好的标记进行替换,最终使每条染色体均匀含有 5 对多态性良好的标记。

对电泳结果进行整理后,构建(0,1)矩阵,利用 NTSYS pc(2.10e)软件 Similarity 模块中的 Qualitative data 程序,使用 Dice 系数对数据进行遗传相似性分析,然后在 SAHN 程序中,使用非加权组平均法(UPGMA)对相似性矩阵构建树状图^[20]。使用 MEGA 7 软件输出遗传距离矩阵,并进行了重复 1000 次的 bootstrap 分析,用以支撑分支成立^[21]。利用平均距离法计算 2 个类群中两两个体的平均值即为两类群间的遗传距离。

利用 Microsoft Excel(2019)软件整理数据,根据每个分子标记在 81 份种质中的多态性差异,依次选择多态性最高的标记对 81 份种质进行条带有无的记录,最终以最少的标记数目实现对 81 份种质的有效区分,并按照特定的引物顺序进行排列,即构建这些种质的特定“指纹”。

2 结果与分析

2.1 基因组测序结果

对 Jin-GL 和 HM-S2 进行基因组测序,获得的数据量为 20.87 Gbp 的 Clean Data, Q20 均达到 97%以上,Q30 均达到 93%以上。HM-S2 基因组与 Jin-GL 参考基因组平均比对率为 97.12%,平均覆盖深度为 18X,基因组覆盖度为 74.38%(至少 1 个碱基覆盖),表明基因组测序数据具有较高的可信度。

2.2 美洲南瓜全基因组 InDel 变异分布特征

基于美洲南瓜种质 Jin-GL 和 HM-S2 的基因组

测序比对数据,对 2 个材料间的 InDel 位点进行了统计整理。在全基因组共检测到 743 685 个 InDel,包括 365 685 个插入(49.2%),378 000 个缺失(50.8%);1~20 号染色体插入数量为 12 522~34 439 个,缺失数量为 13 226~35 482 个,每条染色体上 InDel 数量为 25 748~69 921 个,其中 Chr19 的 InDel 数量最少,仅占总数的 3.5%,Chr01 的 InDel 数量最多,占总数的 9.39%;InDel 变异密度最高的染色体是 Chr01,平均 1 kb 有 3.18 个变异,InDel 变异最为保守的染色体为 Chr13,平均 1 kb 仅有 1.54 个变异(表 3)。

表 3 染色体上 InDel 数量统计
Table 3 Statistics of InDel number on chromosomes

染色体 Chromosome	长度 Length/kb	插入数量 Insertion number	缺失数量 Deletion number	InDel 数量 InDel number	InDel 占比 InDel proportion/%	InDel 密度 InDel density/(No.·kb ⁻¹)
Chr01	21 962	34 439	35 482	69 921	9.39	3.18
Chr02	15 875	22 792	23 461	46 253	6.21	2.91
Chr03	18 928	24 287	24 930	49 217	6.61	2.60
Chr04	14 308	22 243	22 512	44 755	6.01	3.13
Chr05	18 529	18 656	18 805	37 461	5.00	2.02
Chr06	17 735	17 829	18 024	35 853	4.82	2.02
Chr07	13 610	17 582	18 384	35 966	4.83	2.64
Chr08	16 904	18 752	19 505	38 257	5.14	2.26
Chr09	16 048	18 287	19 238	37 525	5.04	2.34
Chr10	18 491	18 502	19 945	38 447	5.20	2.08
Chr11	15 644	15 915	16 778	32 693	4.40	2.09
Chr12	16 562	18 930	19 468	38 398	5.20	2.32
Chr13	18 325	13 792	14 405	28 197	3.80	1.54
Chr14	13 601	13 538	13 770	27 308	3.70	2.01
Chr15	11 189	16 032	16 561	32 593	4.40	2.91
Chr16	17 097	16 286	16 689	32 975	4.40	1.93
Chr17	14 776	14 786	15 343	30 129	4.00	2.04
Chr18	12 889	14 671	15 131	29 802	4.00	2.31
Chr19	13 093	12 522	13 226	25 748	3.50	1.97
Chr20	12 543	15 844	16 343	32 187	4.30	2.57
Scaffold	24 827	265	410	675	0.10	0.03
总计 Total	342 949	365 685	378 000	743 685	100.00	

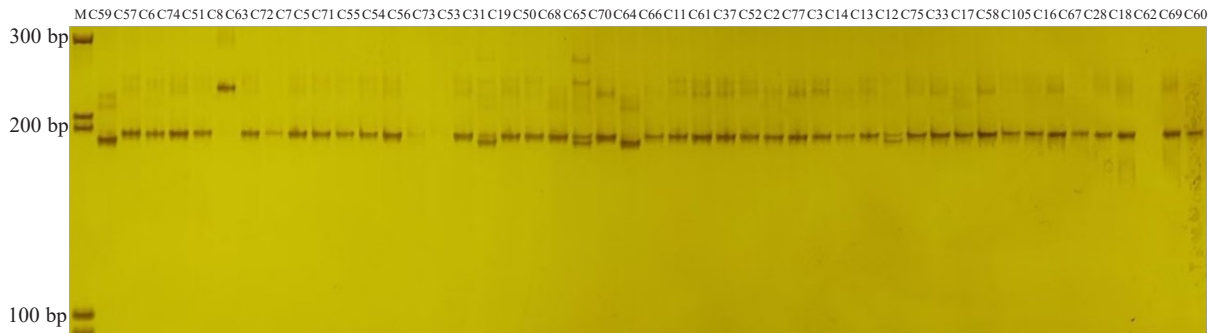
2.3 美洲南瓜全基因组 InDel 标记的开发与筛选

对 InDel 位点进行筛选后设计引物,利用 Jin-GL 和 HM-S2 美洲南瓜材料进行 PCR 检测后,得到扩增产物有效的引物。共设计了 164 对引物,最终每条染色体均匀选择 5 对多态性良好的 InDel 标记,共计 100 个 InDel 标记用于试验,图 1 为引物 D050 在部分材料上的 PCR 扩增结果。由图 2 可以看出,每条染色体上标记之间的物理距离为 2.5~4.5 Mb。InDel 标记的具体物理位置及序列信息如

表 4 所示。

2.4 InDel 标记的遗传多样性参数分析

根据 100 对 InDel 标记在 81 份南瓜种质上的扩增条带的统计结果,其主等位基因频率(major allele frequency)为 0.33~0.88,平均为 0.57;基因型数(Ne)为 3~8,平均为 3.84;等位基因数为 2~5,平均为 2.53;香农多样性指数(SHDI)为 0.39~1.58,平均 1.00,表明供试的 81 份种质遗传背景较为广泛,其中引物 D009、D036 均为 1.58,表明 2 对引物在种质



注:M 代表 Maker,M 后的泳道为所用的南瓜材料及其种质名称。

Note: M represents Maker, and the lanes following M represent the pumpkin materials were used and their germplasm names.

图 1 引物 D050 对 46 份南瓜种质的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of 46 pumpkin materials with InDel marker D050

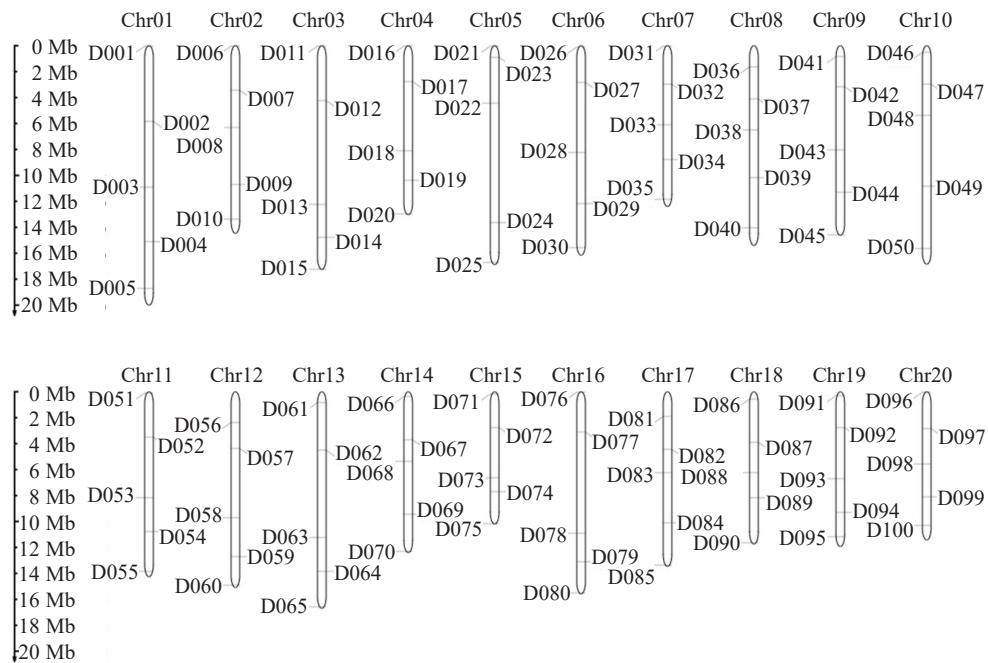


图 2 InDel 标记染色体分布信息

Fig. 2 InDel marker distribution information on chromosome

间具有较高的区分性;多态性信息含量(PIC)为 0.21~0.76,平均为 0.56,PIC 均大于 0.2,表明 100 对 InDel 标记的多态性较好(表 5)。

2.5 InDel 标记在美洲南瓜种质资源鉴定中的应用

根据 MEGA 7 软件产生的遗传距离矩阵计算出不同类群内和不同类群间的遗传距离(表 6),结合图 3 的聚类分析结果,在遗传相似系数为 0.65 处将 81 份南瓜种质分为四大类。

Cluster I 包含 45 份材料,主要为蔓生观赏类型美洲南瓜种质,共计 40 份,且 Ia 和 Ib 分支中观赏类型种质数量较为集中,其中 Ia 主要为多翅类型(皇冠型)观赏种质,遗传距离仅有 0.20,共计 16 份

种质;Ib 主要成员为具楞或条纹的扁圆形小果类型观赏种质,其遗传距离为 0.21,包括 15 份种质;Id 分支由 4 份金丝瓜类型种质和 1 份籽用类型种质组成。

Cluster II 中包含 34 份材料,为肉用、籽用和金丝瓜种质。生长类型为短蔓,遗传距离为 0.34,表明 Cluster II 中种质间的变异范围较小,果实为圆球形、短筒形或长筒形,果型 3 较大,具有一定的食用价值。其中 IIa 和 IIb 分支中商品种数量较为集中,IIa 为金丝瓜种质和籽用类型种质,其类群间遗传距离为 0.21,共 16 份种质;IIb 大多为肉用类型种质,遗传距离为 0.23,共 16 份种质。

表4 100个 InDel 标记的相关信息
Table 4 Information about 100 InDel markers

编号 ID	染色体 Chromosome	物理位置 Physical location	正向引物序列 5'-3' Forward primer sequence5'-3'	反向引物序列 5'-3' Reverse primer sequence5'-3'
D001	Chr01	28 760	TGGTACTCATTTCATGTTAGCCAC	TGGCCGAAATCCAAATGCAA
D002	Chr01	6 545 761	GCAGAACTGGAATTGACGCA	GAGAGGCCAACAAACGGAAC
D003	Chr01	12 273 489	CTTTGAAGGGCAGAGGAAGC	GGCTCCCCGTCTGAAGAATA
D004	Chr01	16 966 234	TGCATCCAACCCTACTTCGA	CAAAACCTCGAAAATTGGGTCA
D005	Chr01	21 020 501	AACGACGATACATAACGGGC	TGCCACCATCAAACATCCAC
D006	Chr02	40 662	TCGGATAAACAGGCACCCAT	AATGATCCATCCCCCTCCTGG
D007	Chr02	3 894 158	GGGTCGTATTACAGTGTTACCA	TCCTCTTCTCCAACAACCGT
D008	Chr02	7 063 805	CCAGAGCACTCATCATATCATCT	TGAGCTCGGGAAGGAATACA
D009	Chr02	12 054 339	CTGGGTCTCTACTTGGCAGA	AAATGCGAGCCTTGGGAATT
D010	Chr02	15 058 894	AAGACCATCCCCAAGCATCA	GCGCTTCTCTATCTGCAACC
D011	Chr03	71 221	ATTACACCAACAATCCTCTCTCG	CGTGGATGTTCTGTTGTTCT
D012	Chr03	4 769 408	GTACTCGTTCAAGCTCACCG	ATTGAGTCCCAGCGTCTCT
D013	Chr03	13 774 632	CGTGTGCCATCATCATCATGT	TACTACCGGCTCAGTCAGAC
D014	Chr03	16 578 886	AGCAGTGAACAAAGGACCAC	TCTGCTAGTACGCCCTTTT
D015	Chr03	19 354 316	GCTTCCTCATTTCAATTTGGCC	TTTGGAGTGGAGTGGAGTGG
D016	Chr04	50 110	AACAAAAGATAAGGGTGGCCT	TCCATCTTTTATCCACGCCT
D017	Chr04	3 099 342	GATGTTCTCTGTTGCCACC	GCGGACTAGAAAGAAGCTCG
D018	Chr04	9 134 037	GGGAGAGAGACGGGCATAAA	GTCTGTGTCAAGCTTCGCAA
D019	Chr04	11 669 842	TAGTGTAGCTTTCGTGGCCT	CAGAACAGCAAAATCGTTGAAGG
D020	Chr04	14 601 829	GAATGTTGGTTGGGCGGTAG	TTGTTGATTGTCCGCCACTC
D021	Chr05	57 725	AACAATGCTGCGAGGAATCC	GCCACCTGCCAACAAATACAA
D022	Chr05	1 014 008	CCACACAAGTTCGACCCATC	GCCTCATTCCTGCTCCAAAG
D023	Chr05	4 992 533	AACCGACCCCACTAACCAA	GGGATGTTCTCACCTGTGCT
D024	Chr05	15 323 066	GCACCTACTTCCCTCGAAA	TTTGCTCGATATTGGCCTGC
D025	Chr05	18 754 383	TTAATGCCGGTGGTGGAGAT	TCAAACCCGTGACTCTCTCA
D026	Chr06	127 479	CACTTCCAACCCAACCCCTG	AAGAGACAAGGGAGCTGGTG
D027	Chr06	3 179 861	TGGTCTGTGATGGGCTCTTT	TGCAAAGTTCTCGCACTGAT
D028	Chr06	9 231 233	ATTACCTGCCCCCTCTCCCTA	TCAACCCCTCTCGTTCAATCCA
D029	Chr06	13 724 057	CCTTAAACCATGGGCCAAC	GGAAAACGAAAACGAGGGCT
D030	Chr06	17 482 299	AGGACCTCAACCCTCCATG	AGCGTTCTTTGGTTTGTGAGT
D031	Chr07	17 714	CTCTCGGTTTGCGGATTGTA	CGTTCCTTGCTTCTTCACC
D032	Chr07	3 363 337	GAGGCTCAAACAACCCCTG	AGAGAGACGTTTCGGCTTTCT
D033	Chr07	6 864 802	TGTTGACTTCACTCCATGGAA	TGAAGAGAGAGTTTGTGTGGGA
D034	Chr07	9 828 327	TCTCTTACCAGCAAAGCAGA	AGGGATTGGAAGAAAGAGGGA
D035	Chr07	13 306 910	CACACCAACGGAGGGAGTAT	CCTCCGCAATATGACCATGT
D036	Chr08	1 830 439	ACAAGAGCAGGGAGAAGACC	GAAGACAGTGAGGCAAGCAG
D037	Chr08	4 599 762	TGATAGTGAAATGGCGCCTC	CGCACTCCCAATAATAATCTCA
D038	Chr08	7 340 488	CCTCTGACCTGCACCTACG	AGGGTCAGCATCATTATCGGA
D039	Chr08	11 406 536	CAAGCAGCCACATCTTACGT	GCTTGAGTTCATCTTTGCAGC
D040	Chr08	15 812 127	AATAGCATGGCGTTGTCCC	TGTCGTAGCATGGAGAAGAAGA
D041	Chr09	962 895	CCGCATGTCATTAAGTCGCA	CAGCCAACATTGCGAAAACG
D042	Chr09	3 552 585	CAATCCCCAACGAACCCATT	AGCTTGGTTTGGTAAGTCTGT
D043	Chr09	9 068 500	ACAGTTGACCTTCTCGTTACG	GCAACCACTCGAAGACACTC
D044	Chr09	12 739 551	TTTGACCTTAGCGTGCGTTC	GCCACATGTCAACCTACGAC
D045	Chr09	16 390 646	CTGTTTGTTCACCTCGCA	GGTCTTTTAGAGCACGCCC
D046	Chr10	586 775	TGTTGATACTGTACAGGCAC	TCATTGGGAGGAGCAAGGG
D047	Chr10	3 307 434	CTCGCTCTAATCGCTCCTA	AAGGGAACAGACAGCTTGGT
D048	Chr10	6 005 239	CGAGCCGAGTCTGGAAGAAGA	GAAGACGTTGACCTCCCAAG
D049	Chr10	12 183 218	AAGATCCAACCTGCTCCGC	ATGCCCTCTGTTTCTCAATAC
D050	Chr10	17 617 886	TGGTCACAAAGGTTACAAGTTG	GGAGGAGATGTCGAAATAAGAGG
D051	Chr11	92 020	ACTTGCGTTGTTATCCTTGCT	CCTTTCTCTCCCTCCTCAC

表 4 (续)
Table 4 (Continued)

编号 ID	染色体 Chromosome	物理位置 Physical location	正向引物序列 5'-3' Forward primer sequence 5'-3'	反向引物序列 5'-3' Reverse primer sequence 5'-3'
D052	Chr11	3 967 228	CGATGCGTAAACCTCTCCCT	TGGTACCATAGACAATCATGCA
D053	Chr11	9 215 892	ATCGAACGGGCTGAAAACAG	AATTCGAATTTCCAGCGCGT
D054	Chr11	12 083 577	GTTCCAGTCTCCAAGCTCCT	GCGGTGGGTATGAGTAGTGA
D055	Chr11	15 558 396	TTGTGATCTACCGCTGAGCT	TGTTGTTAGCGTTTTAGGGTGT
D056	Chr12	2 663 765	ATCTCCTCTCCTCTGCAACC	TCGTCTTTCCTCCGCCATAG
D057	Chr12	4 948 693	AACCTCCACGCTAGCACATA	GTCGGGTGTGTGAAAGTCC
D058	Chr12	10 921 122	CGACCCAATTAGTCCGTCT	CTTGCTTGTGGAGTGATTCTGA
D059	Chr12	14 277 999	CGGCCAAATATGACAGGGAC	CCACCATCTCCTATGACTTTGC
D060	Chr12	16 765 106	TCCTCGTATGTTGAAGGCGA	TCGGTGAGTGATAGAGTGACG
D061	Chr13	948 785	TGGTCACCCTATGCACATTTCTG	CAAGTTGCAGTGGTTCGAAGT
D062	Chr13	5 051 073	AGGGCTCATCTTGTGTGTTCA	GGGGTTTGGTTGGGATCCA
D063	Chr13	12 629 225	TGCATGAACAAAGCGGTAGG	GTCAATCACGCCCCAATTGT
D064	Chr13	15 555 578	AACCCAATCGTTGAACAATTCTT	TCAATAATGGTCTGTTTTGGCTC
D065	Chr13	18 632 310	TCCATCTCCAAACCCACTCC	CCGACACCATCAAAACCAGG
D066	Chr14	435 882	TCTCCTCCGCTGAACAAAAGT	TTCGTTTCGTTGATGTGGGC
D067	Chr14	4 147 188	AGAAGTTTCCCTCTCCAACA	CACCCTATCATTCAACCGACAC
D068	Chr14	6 069 034	AGTGAAGCAAGTTGTGGCAG	CGTGTGGCTGCTGTGATTTA
D069	Chr14	10 640 790	ATGGAATCATTGGCGGTCAC	AGGGCTCTTGAGAACGAACA
D070	Chr14	13 808 346	TACACAACAAGCAACAACGC	ACTTTTGCCTCATAACATAGGC
D071	Chr15	165 426	CGAACCCCTATGCAAAACTGT	GGAGAATGGAATGGAGTGCG
D072	Chr15	3 106 268	GGCTACTGGTCAATCACTATTGT	TAGGTCTGGAGGTTGCTCAC
D073	Chr15	7 490 567	AAATCTAACGCGGCAATTCG	GGGAGCCTAGATACTGATGCA
D074	Chr15	8 655 801	CCGTAACTTCTTGCACTGGG	GTCTCTCCACAAAAGAACTCCA
D075	Chr15	11 426 992	GGGTGGCCTACTCGTGTTAT	TGTTGAACCTCTGCCTACCA
D076	Chr16	73 430	TCCCTCTCATGTCAAATTCACA	CGAAACCAACGACCAAATTTCT
D077	Chr16	3 399 020	GGATTCTAAAGGTCTGCACGT	TCAAAACCTTACCGCAGCAA
D078	Chr16	12 235 424	TCGAGGGAGAGAGACCAACT	AGTAAGGACGAGGAAGCAGC
D079	Chr16	14 743 156	TGTGGCGTTGAATGTGTGTT	ACATGGACAAGTGTAGGTGGT
D080	Chr16	17 471 060	ACAAAGACGAGGACACCACT	TGCTGCCTGAAACTGAAACC
D081	Chr17	2 101 506	GGATGTGCAACTTTGAGCAAC	TGCTTCGATGGGCCTTACTT
D082	Chr17	5 019 983	TAATGTCCGACCCATACCCG	ACCTGCATAGAGTACTCCAATCA
D083	Chr17	7 017 278	TCCGAACCTGGGACGTTTG	AGCCTGATCGTTCTTCCAA
D084	Chr17	11 383 228	ACCTCCCTTGGCATCTCTTT	TGACATGACTAAGTTAAGGGCA
D085	Chr17	15 071 822	GTCTGGTTTTGGTTCGGGAT	TCCGTAAAGCAACAGCGAAC
D086	Chr18	631 958	TGACACGTCTACACCCACA	TTTGCTGGGAAATGTCGTGG
D087	Chr18	4 417 677	TTCATACGCGGGAGTCATT	ATGCTGTACTGAAGGCTACT
D088	Chr18	7 038 098	GAGCCTAAGAAACTCACACCA	TGTGTTAATACCTGCTTCTGGA
D089	Chr18	9 204 906	GGCATTTTACCATCACCCACA	TGATGTGGAAGGCAGCATTG
D090	Chr18	13 058 566	TGAAGTTGGGGATGGTATGTTG	TCGTCACCTACTTTTCCCCT
D091	Chr19	337 530	CGGTGGATGAGGGTTGGAAA	AGAATCCCCATCCACGTAACA
D092	Chr19	3 137 511	CCCCTACCCACCACTTCAAT	TGTTGAGATGATCGGAGGCA
D093	Chr19	7 508 381	TCGTTCCGGGTACATGGAAGT	AAGCACTCTCAGCAGCAGTA
D094	Chr19	10 461 848	CCACTCTCGGGTACAACACT	GCGTCTCATCCAGCATCCTT
D095	Chr19	12 570 309	CTCCACTATGCCATGTTTCCA	ACCTTTGCACTGACCATGAA
D096	Chr20	179 77	TGGGTATGTTGGATTACGTGC	ACCACTTTTCTTTGTCTGTCTGG
D097	Chr20	3 200 738	AGGGGTATGTGTGCTTACTCT	AAAATTCCTCCGGCCAAAA
D098	Chr20	6 291 801	GCTGTATCCTCCGGTACAT	GGCCACCCCTAGATGAGATAG
D099	Chr20	9 142 741	TCTCGTTCTGTTCGCTCTCT	CGCGCCCACTAGACATTTTA
D100	Chr20	11 557 328	TACATTGAATGCGGGCACAC	TTGAATGGATGTGGTCTGCG

表 5 100 对 InDel 标记的多态性信息
Table 5 Polymorphism information of 100 pairs InDel markers

编号 ID	Allele No.	Ne	MAF	SHDI	PIC	编号 ID	Allele No.	Ne	MAF	SHDI	PIC
D001	2	3	0.45	1.04	0.61	D051	3	4	0.63	0.99	0.54
D002	2	3	0.65	0.86	0.50	D052	2	3	0.56	0.96	0.56
D003	2	3	0.60	0.99	0.56	D053	3	3	0.42	1.13	0.64
D004	2	2	0.87	0.39	0.23	D054	3	4	0.51	1.07	0.62
D005	3	4	0.36	1.15	0.67	D055	3	6	0.73	0.89	0.44
D006	2	3	0.50	0.79	0.52	D056	3	3	0.65	0.93	0.52
D007	2	3	0.57	0.92	0.54	D057	3	3	0.45	1.13	0.63
D008	2	3	0.58	0.90	0.54	D058	2	3	0.40	1.14	0.65
D009	4	7	0.33	1.58	0.76	D059	2	3	0.68	0.89	0.49
D010	4	7	0.39	1.49	0.71	D060	3	3	0.48	1.04	0.61
D011	2	3	0.88	0.42	0.21	D061	2	3	0.49	0.90	0.56
D012	3	4	0.43	1.12	0.63	D062	2	3	0.58	0.95	0.55
D013	2	3	0.62	0.93	0.54	D063	2	3	0.62	1.02	0.55
D014	2	3	0.58	0.89	0.54	D064	2	3	0.50	1.03	0.59
D015	2	3	0.62	0.88	0.53	D065	3	3	0.85	0.57	0.27
D016	2	3	0.43	1.02	0.62	D066	2	3	0.76	0.75	0.39
D017	3	3	0.71	0.84	0.45	D067	4	6	0.54	1.33	0.64
D018	2	3	0.71	0.83	0.45	D068	4	5	0.44	1.17	0.66
D019	2	3	0.60	0.73	0.49	D069	2	3	0.49	1.09	0.63
D020	3	4	0.48	1.36	0.68	D070	2	3	0.79	0.74	0.37
D021	2	3	0.54	0.91	0.56	D071	2	3	0.61	0.99	0.55
D022	3	3	0.62	1.01	0.55	D072	2	3	0.61	1.00	0.56
D023	2	4	0.39	1.07	0.65	D073	2	3	0.51	0.99	0.58
D024	3	6	0.58	1.24	0.61	D074	3	4	0.55	0.89	0.54
D025	3	4	0.46	1.21	0.65	D075	2	3	0.61	0.94	0.55
D026	4	4	0.45	1.25	0.67	D076	3	6	0.58	1.22	0.60
D027	3	4	0.49	1.02	0.60	D077	3	4	0.54	1.01	0.57
D028	3	4	0.48	1.05	0.61	D078	3	4	0.60	0.98	0.55
D029	2	3	0.61	0.91	0.54	D079	2	3	0.68	0.91	0.49
D030	2	3	0.49	1.07	0.62	D080	2	3	0.57	0.91	0.55
D031	2	3	0.52	0.97	0.59	D081	2	3	0.54	1.02	0.59
D032	2	3	0.46	0.96	0.59	D082	2	3	0.46	1.03	0.61
D033	3	4	0.45	1.04	0.61	D083	3	4	0.45	1.23	0.66
D034	3	4	0.54	0.95	0.56	D084	2	2	0.60	0.93	0.54
D035	2	3	0.55	0.96	0.57	D085	2	3	0.67	0.89	0.50
D036	5	8	0.52	1.58	0.69	D086	2	3	0.36	1.15	0.65
D037	3	4	0.55	1.04	0.58	D087	3	3	0.48	1.13	0.62
D038	2	3	0.74	0.78	0.42	D088	3	7	0.56	1.12	0.59
D039	2	3	0.71	0.79	0.45	D089	4	6	0.46	1.31	0.66
D040	2	4	0.81	0.71	0.33	D090	4	7	0.69	1.02	0.49
D041	3	4	0.62	0.95	0.54	D091	2	3	0.46	0.82	0.53
D042	3	3	0.68	0.94	0.49	D092	3	7	0.61	1.21	0.59
D043	2	3	0.50	1.09	0.62	D093	2	3	0.61	0.84	0.52
D044	3	4	0.42	1.18	0.66	D094	2	3	0.46	1.03	0.61
D045	3	4	0.55	1.08	0.60	D095	2	3	0.55	1.02	0.58
D046	3	3	0.79	0.70	0.36	D096	2	3	0.60	0.97	0.56
D047	3	4	0.51	1.04	0.61	D097	2	3	0.56	1.03	0.59
D048	2	3	0.60	1.00	0.57	D098	2	3	0.83	0.69	0.34
D049	2	3	0.64	0.94	0.53	D099	3	4	0.80	0.71	0.35
D050	2	3	0.64	0.99	0.53	D100	3	4	0.63	0.97	0.53

表 6 不同类群内和类群间的遗传距离

Table 6 Genetic distance values within and between the different groupings

类群 Cluster	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	IIa	IIb	IIc	IId	I	II	III	IV
Ia	0.20														
Ib	0.24	0.21													
Ic	0.23	0.27	0.10												
Id	0.23	0.28	0.30	0.28											
Ie	0.28	0.29	0.33	0.35	—										
If	0.28	0.33	0.30	0.35	0.31	0.22									
Ig	0.32	0.43	0.40	0.42	0.45	0.43	0.24								
IIa	0.42	0.50	0.44	0.51	0.46	0.46	0.42	0.21							
IIb	0.50	0.51	0.40	0.48	0.37	0.38	0.43	0.18	0.23						
IIc	0.44	0.56	0.48	0.53	0.48	0.45	0.43	0.36	0.28	—					
IId	0.50	0.43	0.42	0.45	0.43	0.43	0.45	0.27	0.34	0.42	—				
I	—	—	—	—	—	—	—	0.50	0.43	0.42	0.50	0.43			
II	0.50	0.51	0.48	0.40	0.37	0.37	0.43	—	—	—	—	0.44	0.34		
III	0.46	0.57	0.55	0.60	0.55	0.54	0.42	0.51	0.48	0.54	0.49	0.52	0.48	—	
IV	0.52	0.60	0.58	0.56	0.64	0.66	0.61	0.64	0.65	0.64	0.60	0.56	0.65	0.60	—

注：—表示不存在。

Note: — represents non-existence.

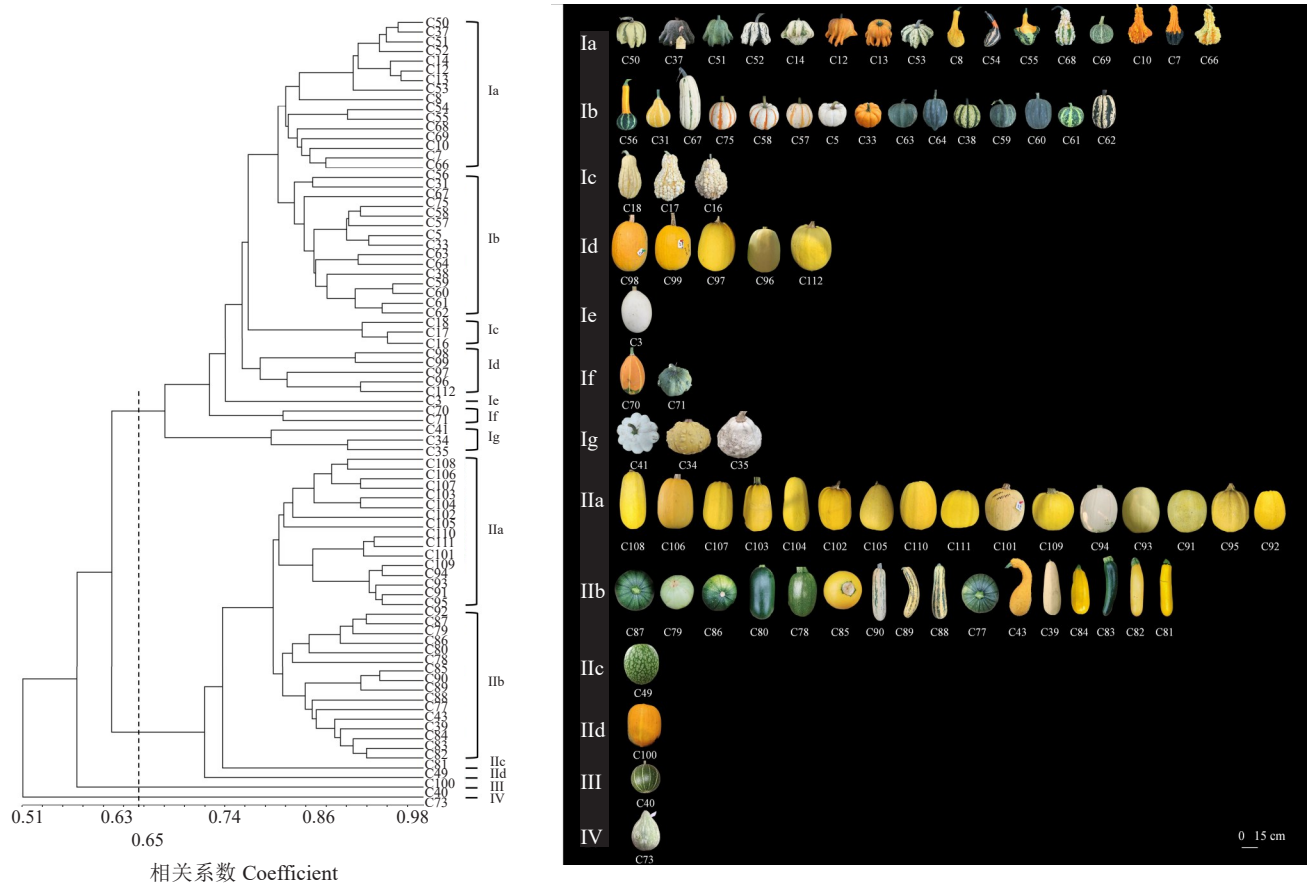


图 3 81 份南瓜材料 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA clustering analysis of 81 pumpkin materials

Cluster III 只有 1 种材料,为南瓜野生种。
Cluster IV 与其他类的遗传距离均大于 0.5,为印度南瓜种质。

2.6 InDel 标记在构建美洲南瓜 DNA 指纹图谱中的应用

从 100 对 InDel 标记中最终筛选出 10 对多态性信息含量高的 InDel 标记,等位基因数 4~8,PIC 指数 0.58~0.76,以扩增条带的大小对 81 个南瓜材

料进行区分,10 对 InDel 标记能将 81 份种质完全区分开。图 4 是按照 D009、D010、D020、D024、D025、D026、D036、D037、D067、D068 的顺序及其扩增产物大小依次展开构建的指纹图谱,此处有条带标记为黑色,无条带为白色。图谱表明 C73 材料在 D009、D067 标记处均没有扩增出片段,在 D068 的 270~280 bp 处仅 C108 种质有产物被扩增出来。



图 4 DNA 指纹图谱
Fig. 4 DNA PCR-fingerprinting

2.7 InDel 标记在美洲南瓜商品种同质性鉴定中的应用

对来自不同单位的 237 份美洲南瓜品种/组合,利用 100 对标记进行 UPGMA 聚类分析(图 5),其遗传距离处于 0.004 和 0.554 之间,平均为 0.183,表明大部分种质遗传背景接近;219 份材料被聚到同一类(遗传距离为 0.100),且材料间果实外观没有很大的差异,大部分材料具有相似的性状,表明参试品种/组合中同质性较高。

根据聚类结果,在遗传距离 0.08 时,肉用南瓜品种(◇)与籽用南瓜品种(◆)基本被分为两个类群,肉用南瓜品种外形特征绝大多数为长筒形,嫩瓜颜色较为接近(浅绿色),少数具有短筒形果形

(RY67、RY68、RY69)及深绿色果皮(RY29、RY69);而籽用南瓜品种有长筒形、短筒形、圆球形,果实外观变异稍显丰富。

3 讨论与结论

在遗传多样性研究领域,种质材料的聚类分析结果是揭示遗传关系的重要依据。美洲南瓜观赏材料的聚类分析结果与 Wang 等^[3]SSR 标记聚类结果相一致,表明 InDel 标记与 SSR 标记在遗传多样性分析中均能代表基因差异,从不同角度反映种质材料的遗传特征;与前者不同的是,本研究结果表明观赏南瓜的聚类分辨率更高,如 Ia 类群中,多翅类型的南瓜还被分为 2 个小簇,为扁圆形和梨形,

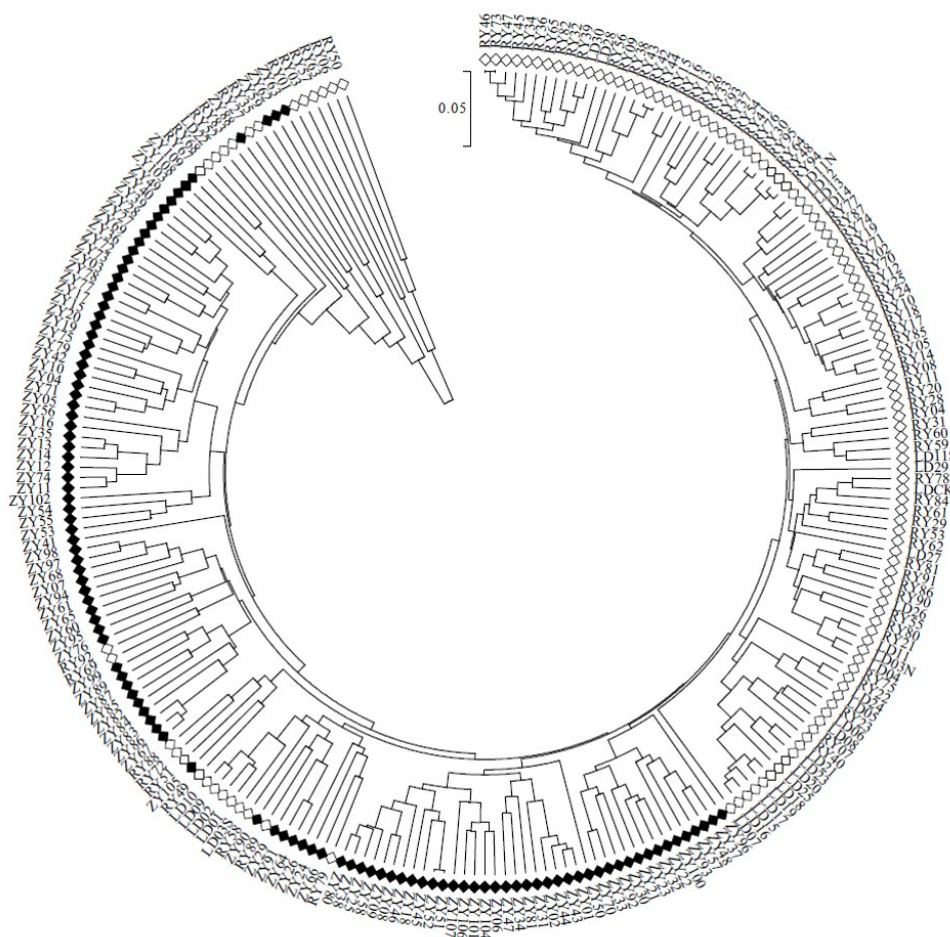


图5 237份美洲南瓜商品种聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of 237 commodity varieties of *C. pepo*

且扁圆形瓜居于类群内部;1b类群中,以扁圆形小瓜为主,橙色、白色、橙色条纹白瓜与深绿色、深绿色条纹白瓜、浅绿色条纹绿瓜可以区分开,且绿色居于类群内部。以上结果表明扁圆形果形、深绿色果皮性状在美洲南瓜的长期进化中被自然选择得以留存下来。Gong等^[22]利用134个SSR和4个SCAR标记,对104份美洲南瓜种质展开全面遗传分析,研究结果表明,肉用、籽用、金丝瓜等类型倾向于占据聚类图谱的外围区域,这与本研究所得出的结论基本吻合。因设计引物过程是完全随机进行的,因此聚类结果也略有不同,若想扩大种质范围或进行遗传背景更小的种质聚类,需要在InDel变异丰富的染色体上,有针对性地加大分子标记的密度,以此来提升准确性与分辨率,为深入探究种质材料的遗传特性提供更有力的数据支撑。

从本研究的聚类结果可知,在遗传距离0.08处,籽用类型和肉用类型基本被分为2个类群,说

明籽用类型和肉用类型亲缘关系较近,但随着人工定向选择的持续积累,籽用类型有从肉用类型中独立成另一类群的趋势;此外,无论是籽用类型还是肉用类型的大部分品种(组合)间的遗传距离小于0.08,说明现在大部分商业品种间同质化严重,遗传背景狭窄。这一结果也表明今后应加大种质资源的搜集和创制工作,以拓宽种质资源的遗传背景;如果能定期利用分子标记监测肉用、籽用类型种质资源的遗传多样性,将有助于避免出现品种同质化现象以及重复选育导致的资源浪费。

参考文献

- [1] PARIS H. Paintings (1769 - 1774) by A. N. Duchesne and the history of *Cucurbita pepo*[J]. *Annals of Botany*, 2000, 85 (6): 815-830.
- [2] PARIS H S. Germplasm enhancement of *Cucurbita pepo*(pumpkin, squash, gourd: Cucurbitaceae): Progress and Challenges[J]. *Euphytica*, 2016, 208: 415-438.
- [3] WANG W Q, SHI Y Z, LIU Y, et al. Genetic relationships

- among *Cucurbita pepo* ornamental gourds based on EST-SSR markers[J]. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2021, 57(4): 125-139.
- [4] NINČEVIĆ G A, RIMAC B S, BADANJAK S M, et al. Carotenoid content and profiles of pumpkin products and by-products[J]. Molecules, 2023, 28(2): 858.
- [5] KAUR N, KISHORE L, FAROOQ S A, et al. *Cucurbita pepo* seeds improve peripheral neuropathy in diabetic rats by modulating the inflammation and oxidative stress in rats[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, 30(36): 85910-85919.
- [6] CHE J N, TENG X H, JI J L. Extraction and application of pumpkin peel colorants for natural textile dyeing[J]. AATCC Journal of Research, 2023, 10(3): 153-162.
- [7] 李海真, 张帆, 张国裕, 等. 西葫芦新品种‘京葫36’的选育[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(1): 59-61.
- [8] 李海真, 张帆, 张国裕, 等. 西葫芦新品种京葫42的选育[J]. 中国蔬菜, 2024(3): 125-127.
- [9] 魏照信, 陈荣贤, 殷晓燕, 等. 中国籽用南瓜产业现状及发展趋势[J]. 中国蔬菜, 2013(9): 10-13.
- [10] 史玉滋, 马玮, 孙廷珍, 等. 籽用南瓜育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 2019(8): 13-20.
- [11] 张颖, 王萍, 李二娜, 等. 籽用美洲南瓜种质遗传多样性分析及SSR指纹图谱构建[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(6): 9-15.
- [12] 菅彩媛, 闻金光, 郭晓霞, 等. 36份籽用西葫芦种质资源遗传多样性SSR标记分析[J/OL]. 分子植物育种, 1-13[2024-02-23]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240222.1552.010>.
- [13] 郑勇民, 张旭业, 徐秉良, 等. 美洲南瓜种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(6): 76-82.
- [14] 刘星, 祁建民, 朱忠南, 等. 应用SRAP标记分析金丝瓜(*Cucurbita pepo* L.)种质资源遗传多样性与亲缘关系[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6): 1172-1178.
- [15] 郭广君, 孙茜, 刘金兵, 等. 基于辣椒基因组重测序的InDel标记开发及应用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1400-1406.
- [16] 洪晓如, 吴智明, 陈汉才, 等. 基于重测序的芥蓝(*Brassica al-boglabra*)全基因组InDel标记开发[J]. 分子植物育种, 2021, 19(4): 1190-1201.
- [17] 张辉, 李鑫, 王志敏, 等. 基于核心InDel标记樱桃番茄种质资源的遗传多样性分析与应用[J]. 中国蔬菜, 2023(10): 26-36.
- [18] 尤园园, 王帅, 方莹莹, 等. 茄子全基因组InDel变异特征及分子标记开发和应用[J]. 园艺学报, 2024, 51(3): 520-532.
- [19] BOTSTEIN D R, WHITE R L, SKOLNICK M H, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [20] SUN M. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems[J]. American Journal of Botany, 1997, 84(2): 224.
- [21] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [22] GONG L, PARIS H S, NEE M H, et al. Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(5): 875-891.