

DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2025.0246

嫁接后脱去黄瓜果面蜡粉的砧用南瓜分子标记鉴定与应用

裴轶凡¹, 郑秀¹, 别之龙¹, 周玉忠², 王忠全², 成金桃¹

(1. 果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室·华中农业大学园艺林学学院 武汉 430070;

2. 青岛金妈妈种业科技有限公司 山东青岛 266611)

摘要: 为了开发应用与脱去黄瓜果面蜡粉能力密切相关的砧用南瓜分子标记, 对 18 份脱蜡粉能力不同的砧用南瓜材料进行嫁接评比。结果发现, 脱蜡粉能力强的南瓜作为砧木与黄瓜嫁接后, 接穗黄瓜的茎、叶及果实中的硅含量显著低于脱蜡粉能力弱的南瓜砧木, 说明砧用南瓜的脱蜡粉能力与其对硅元素的吸收转运能力有关。进一步使用基于硅转运蛋白基因 *CmLSi1* 的 SNP 开发的已报道分子标记 CM1-CAPS 以及本研究设计的 SNP-Sanger 测序和 Hi-Tom 测序方法, 鉴定和分析 57 份脱蜡粉能力不同的砧用南瓜材料。结果表明, 3 种鉴定方法对脱蜡粉性状的选择准确率都达到 100%, 说明该分子标记适用于脱蜡粉砧用南瓜品种选育工作, 对加速新品种选育具有重要意义。

关键词: 砧用南瓜; 黄瓜; 脱蜡粉; 分子标记; 硅转运蛋白

中图分类号: S642.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)10-039-09

Identification and application of pumpkin molecular markers on rootstock with bloom-reducing from cucumber surface after grafting

PEI Yifan¹, ZHENG Xiu¹, BIE Zhilong¹, ZHOU Yuzhong², WANG Zhongquan², CHENG Jintao¹

(1. National Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization of Fruit and Vegetable Horticultural Crops/College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; 2. Qingdao Jinmama Seed Technology Co., Ltd., Qingdao 266611, Shandong, China)

Abstract: To develop molecular markers for *Cucurbita maxima* rootstocks related to their ability to remove cucumber fruit surface's bloom, evaluated 18 different *C. maxima* materials with varying bloom removal capabilities through grafting. The results showed that when cucumber was grafted onto rootstocks with strong bloom removal abilities, the silicon content in the stems, leaves, and fruits of the scion cucumber was significantly lower compared to those grafted onto rootstocks with weak bloom removal abilities. This indicates that the bloom removal capability of *C. maxima* is associated with its ability to absorb and transport silicon. Using the previously reported molecular marker CM1-CAPS based on SNP of the silicon transporter gene *CmLSi1*, along with the SNP-Sanger sequencing and Hi-Tom sequencing methods designed in this study, we identified and analyzed 57 *C. maxima* rootstocks with varying abilities to bloom removing. The results showed that all three identification methods achieved a 100% accuracy rate for selecting the bloom removing trait, indicating that this molecular marker is suitable for breeding bloom removing rootstocks, which is of great significance to accelerate the breeding of new varieties.

Key words: Rootstock pumpkin; Cucumber; Bloom removal; Molecular marker; Silicon transporter protein

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是我国重要的蔬菜作物,在全国各地都有栽培。黄瓜果面蜡粉是影响果实外观品质的重要因素。蜡粉少、果皮光亮的黄瓜受到越来越多消费者的喜爱。黄瓜蜡粉的水分含

量较少,约占蜡粉鲜质量的 14%;干物质含量占比较高,达到 67.5%,其中 SiO₂ 占比 57.8%,CaO 占比 12.8%^[1]。研究表明,蜡粉最初是由花前幼果果皮单细胞垂直皮面分裂成毛细胞,进而分裂成柄和粒;

收稿日期:2025-03-27;修回日期:2025-06-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2300703);山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目(2022TSGC1143);青岛市创新创业共同体项目(22-7-5-gtt-6-gx);果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室委托项目(Horti-3Y-2024-014)

作者简介: 裴轶凡,男,在读硕士研究生,主要研究方向为南瓜砧木遗传育种。E-mail:1833958978@qq.com

通信作者: 成金桃,女,副教授,主要从事瓜类品质与分子生物学研究。E-mail:chengjintao@mail.hzau.edu.cn

随着花后果实的膨大,粒部细胞分裂成球状体,果实达到商品成熟时,球状体表面析出一层内含物,与球状体共同散布于果实表面,即形成白色蜡粉^[2-4]。多蜡粉黄瓜品种幼果期蜡粉球状体表面即覆盖一层硅,少蜡粉黄瓜品种蜡粉球状体表面没有硅;果实膨大至商品成熟时,少蜡粉黄瓜果面蜡粉逐渐减少,多蜡粉黄瓜果面蜡粉则散布于果实表面^[4]。也有研究认为,在黄瓜幼果时期,果皮上均覆盖有一层白色粉末状物质,随着果实的不断发育膨大,少蜡粉的黄瓜品种果皮上的蜡粉逐渐消失^[5]。应用扫描电子显微镜等技术观察黄瓜果实表面,结果表明,硅化物基本上都聚集分布在黄瓜果实表皮上蜡粉球的表面,其余部位很少观察到硅化物^[6]。在黄瓜果实发育过程中,硅含量呈先升高后降低的变化趋势,花后1~3 d的幼果中硅含量最高。大量试验结果表明,硅作为蜡粉组成的重要元素之一,对果皮上蜡粉的形成起着一定的调控作用^[7]。

嫁接技术是一种脱去黄瓜果面蜡粉和提高植物抗性的有效方法,广泛应用于黄瓜栽培中^[8]。嫁接黄瓜果皮上蜡粉含量的多少与选用的砧用南瓜品种紧密相关^[9]。祝宁等^[10]研究表明,不同南瓜砧木对嫁接黄瓜果实亮度、果皮上蜡粉含量和果皮细胞气孔的影响差异显著;费雨兰等^[11]的研究结论显示,不同砧木嫁接对黄瓜植株生长势、抗病性和果皮蜡粉量等均有一定影响。在生产中发现,部分中国南瓜作为砧木嫁接的黄瓜果实表面蜡粉含量显著降低^[12]。用黑籽南瓜作为砧木来嫁接黄瓜会引起黄瓜果皮蜡粉增多^[13],当用白籽南瓜作为砧木嫁接时,黄瓜果皮油亮光滑,蜡粉较少^[14]。双砧木嫁接对黄瓜果面蜡粉量的影响介于两个砧木之间,并趋向于蜡粉较重的砧木^[15]。不同类型砧木影响嫁接黄瓜果实表面蜡粉形成与硅吸收分配特性有关^[16],采用不同去蜡粉类型砧木嫁接的黄瓜体内硅含量存在明显差异,其中采用去蜡粉砧木嫁接的黄瓜硅吸收量明显减少^[17]。

分子标记技术在研究黄瓜蜡粉与光泽度方面发挥重要作用。Mitani等^[18]在脱蜡能力显著的南瓜砧木中克隆到硅转运蛋白基因 *CmLsi1*,其定位在细胞膜上,该转运蛋白基因编码288个氨基酸,是调控南瓜砧木硅吸收能力的主要基因之一,其726 bp处的碱基C-T突变导致该位置(第242位氨基酸)的脯氨酸(Pro)变成了亮氨酸(Leu),进而造成砧木植株硅转运能力减弱。崔健等^[19]利用 *CmLsi1* 基因片段上360 bp处的单核苷酸多态性(SNP)位点开

发了PCR-RFLP-HinP1I分子标记,选择准确率大于95%。张洪亮等^[20]利用 *CmLsi1* 基因片段上224 bp处的SNP位点开发了CAPS/HinP1I分子标记,选择准确率为95.24%。Jung等^[21]利用726 bp处的SNP位点开发了一个CM1-CAPS分子标记,并用该标记鉴定了8个砧用南瓜的基因型和脱蜡粉性状,基因型与性状的吻合度达到100%。上述研究都是围绕砧用南瓜的硅转运蛋白基因 *CmLsi1* 的多态性开发的脱蜡粉相关分子标记,崔健等^[19]和张洪亮等^[20]在360 bp和224 bp处分别开发的分子标记准确率都只有95%左右,而Jung等^[21]在726 bp处开发的分子标记鉴定的结果虽然显示准确率达到100%,但是只有8个样本,不足以确保该标记的准确性和应用范围。鉴于此,笔者拟结合实际生产扩大样本量,进一步鉴定726 bp处的SNP位点与脱蜡性状的关联性,同时对CM1-CAPS分子标记和本项目开发的二代测序法及高通量(Hi-Tom)测序法进行鉴定和比较,分析该SNP位点在砧用南瓜脱蜡粉分子标记上的实用性,以期脱蜡粉南瓜砧木分子标记的应用和推广提供有力支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于2018年春季在华中农业大学校内的国家蔬菜改良中心华中分中心人工气候室和塑料大棚内进行。嫁接所用砧用南瓜材料共19份,山东青岛金妈妈农业科技有限公司(简称金妈妈公司)提供18份(编号T1~T9、T11~T19),其中T1~T9为脱蜡粉能力强的砧木品种,嫁接后黄瓜果皮上蜡粉少,色泽明亮;T11~T19为脱蜡粉能力弱的砧木品种,市面上购买的云南黑籽南瓜砧木1份(编号为HZ),为脱蜡粉能力弱的砧木品种,嫁接后黄瓜果皮上蜡粉多,色泽灰暗。接穗黄瓜品种津绿21-10(有蜡粉)购买于天津绿丰种业有限公司。

用于脱蜡分子标记检测的植物样本共57份,其中B1~B6和BL1~BL51来自青岛金妈妈农业科技有限公司2024年选育的砧用南瓜材料,B7~B16来自华中农业大学园艺林学学院设施园艺课题组培育的砧用南瓜材料,其中编号B7~B16每个材料1次重复,其余每份材料3次重复。材料特点见表1。

1.2 方 法

1.2.1 嫁接苗的管理及取样 以上述19份砧用南瓜材料为砧木,以津绿21-10黄瓜品种为接穗分别构建不同的嫁接组合,各嫁接组合以砧木编号作为

表1 用于脱蜡粉分子标记鉴定的砧用南瓜材料

Table 1 Pumpkin materials for molecular marker identification of bloom removal

样品编号 Sample number	种质编号 Germplasm number	脱蜡粉性状 Bloom removal capability	备注 Note	样品编号 Sample number	种质编号 Germplasm number	脱蜡粉性状 Bloom removal capability	备注 Note
B1	24RW141	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL19	24RC143	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B2	24RW141	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL20	24RC143	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B3	24RW141	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL21	24RC143	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B4	24RW161	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL22	24RC145	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B5	24RW161	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL23	24RC145	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B6	24RW161	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL24	24RC145	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B7	PTYC22Z0	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL25	24RC150	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B8	PTYC22Z9	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL26	24RC150	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B9	PTYC22Z3	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL27	24RC150	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B10	PTYC22Z5	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL28	24RC155	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B11	PTYC22Z6	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL29	24RC155	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B12	PTYC22M06	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL30	24RC155	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B13	PTYC22Y6	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL31	24RC163	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B14	PTYC22Y4	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL32	24RC163	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B15	PTYC22Y7	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL33	24RC163	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
B16	PTYC22Y8	非脱蜡 Bloom	自交系 Inbred line	BL34	24RC173	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL1	24RC100	脱蜡 Bloomless	杂合 Hybrid	BL35	24RC173	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL2	24RC100	脱蜡 Bloomless	杂合 Hybrid	BL36	24RC173	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL3	24RC100	脱蜡 Bloomless	杂合 Hybrid	BL37	24RC175	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL4	24RC102	脱蜡 Bloomless	杂合 Hybrid	BL38	24RC175	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL5	24RC102	脱蜡 Bloomless	杂合 Hybrid	BL39	24RC175	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL6	24RC102	脱蜡 Bloomless	杂合 Hybrid	BL40	24RC180	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL7	24RC111	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL41	24RC180	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL8	24RC111	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL42	24RC180	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL9	24RC111	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL43	24RC182	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL10	24RC129	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL44	24RC182	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL11	24RC129	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL45	24RC182	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL12	24RC129	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL46	24RC183	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL13	24RC129	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL47	24RC183	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL14	24RC129	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL48	24RC183	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL15	24RC129	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL49	24RC193	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL16	24RC140	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL50	24RC193	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL17	24RC140	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line	BL51	24RC193	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line
BL18	24RC140	脱蜡 Bloomless	自交系 Inbred line				

各嫁接组合的简称,其中以黄瓜自嫁接(ZJ)作为对照。

种子处理参照郑秀等^[22]的方法,采用顶插接法嫁接,以黄瓜自嫁接材料为对照,将3叶1心的黄瓜嫁接苗定植于塑料大棚中,采用盆栽基质栽培,盆钵高度40 cm,直径30 cm,内装15 L的基质。每盆定植1株嫁接苗,每个嫁接组合作为1个处理,随机排列,设3次重复,每次重复10盆。采用霍格兰营养液浇灌,基质配方采用草炭、珍珠岩、蛭石体积比3:1:1。在植株开花前根据基质干湿情况浇灌浓

度为1倍的营养液1~2 L,开花结果以后每天浇灌2~3 L浓度为2倍的营养液。待嫁接黄瓜植株开花结果后,一方面对结果中期的黄瓜植株根系、砧木茎、接穗茎、叶片(最大功能叶)分别取样,一方面在黄瓜植株结果的低位(第8~10节),中节位(第11~18节),高位(第18节位以上),对嫁接黄瓜果实的不同部位(果皮、果肉)分别取样,装于信封袋内,利用鼓风机干燥恒温箱在110 °C条件下杀青20~30 min,然后于80 °C下持续烘干1~2 d至恒质量。

1.2.2 硅含量的测定 称取烘干粉碎样品约 0.5 g 放入瓷坩埚,摆放在马弗炉中,首先在 300 °C 预灰化 3 h,紧接着升温至 500 °C 灰化 5 h,待样品灰化完成后,用 5 mL 1 mol·L⁻¹ HCL 将其洗入干净的聚乙烯瓶中,然后加入 2 mL 40% 的 HF,摇床上振荡过夜,过滤后用超纯水定容至 50 mL,定容完毕后装入小白瓶保存待测。待所有的试验样品消化完毕后,每个样品各取 10 mL 放入 15 mL 的离心管中,3 次重复,统一送往湖北格林凯尔农业科技有公司旗下的科艾乐检测公司测定。

1.2.3 嫁接黄瓜果实外观品质测定 蜡粉覆盖度比较:在嫁接黄瓜结果中期每个嫁接组合选取开花时间一致、大小一致的 6 个黄瓜果实,置于黑色背景布上,观察各黄瓜果实表面蜡粉覆盖度和光泽度。

表面蜡粉量的测定:用色彩色差计(CM-5)测定果实表面的明亮度差。在果实表皮前、中、尾端各选取 3 点测定明亮度值 L_1 ,然后轻轻擦拭掉果实表面的蜡粉,测定明亮度值 L_2 ,计算 $\Delta L=(L_1-L_2)$ 值,以此值衡量果实表面蜡粉多少。重复 3 次,取平均值。

1.2.4 CAPS 标记鉴定 将提前催芽的南瓜种子播种至 50 孔穴盘,待长至 2 叶 1 心时,取各编号叶片于 2 mL 离心管中,每份材料设置 3 份重复。采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[23]。采用 2×Taq Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,P213-03)进行 PCR 扩增,反应体系为 20 μL,包含 1.0 μL gDNA 模板,正反向引物各 1.5 μL(100 μmol·L⁻¹),10 μL 2×Taq Master Mix, Inc.), ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为:95 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 15 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 3 min;PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。剩余 PCR 产物用限制性内切酶 *Hae* III 酶切(10 000 U·mL⁻¹,Time-Saver TM,NEB",伊普斯维奇,美国),反应体系为 20 μL,包含 15.0 μL PCR 产物,1.5 μL 缓冲液,0.3 μL 内切酶,ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为:37 °C 酶切 1 h。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 测序法鉴定 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增:取各编号叶片于 2 mL 离心管中,每份材料取 3 份重复。采用磁珠法^[24]或参照 M5 Hiper 超光速 mix 直接扩增最佳伴侣(北京聚合美生物科技有限公司,MF859-01)说明书提取基因组 DNA。采用 2×Taq Master Mix 进行 PCR 扩增,反应体系为

50 μL,包含 1.0 μL gDNA 模板,正反向引物各 1.5 μL(100 μmol·L⁻¹),25 μL 2×Taq Master Mix, Inc.),ddH₂O 补足至 50 μL。反应程序为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,共 34 个循环;72 °C 延伸 5 min;PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

Sanger 测序法的扩增引物为 CmoLsi1-e2F、CmoLsi1-e2R(表 2),将扩增出来的 PCR 产物送至武汉擎科生物科技有限公司进行 Sanger 测序,测序引物为 CmoLsi1-e2F,将测序结果反向互补后与参考序列(ACCTGCAATGGCAAGTGATAATTATAAAGGAC TTTGGGTGTA CTTTGTGGGCCGGTTAcAGGAA CCCTATTAGGGGCATGGTCATATAAGTTCATAC GTGCCAGTGATAAACCTGTGCACTTAATTTCTC CTCAC TCA TTTTCACTCAA ACTTCGAA) 比对,分析参考序列中小写字母 c 位置对应的碱基是 T 还是 C,如果是 T,则为脱蜡材料,如果是 C,则为非脱蜡材料。

Hi-Tom 测序法是在上述 Sanger 测序法的扩增引物前面加上测序接头,扩增引物为 H-F2、H-R2,将扩增出来的 PCR 产物送至中国水稻研究所进行 Hi-Tom 测序,测序引物为 ggagtgagtacgggtgtc,参考序列与上述 Sanger 测序法相同。将测序出来的所有 Reads 比对到参考序列上,每个样本会测出几百个 reads,通过分析这些 reads 在目标 SNP 位点出现 C 或 T 的比例来判断样本的脱蜡粉性状,C 的比值高则判断为非脱蜡样本,T 的比值高则判断为脱蜡样本。

表 2 测序法引物序列

Table 2 Primer sequences for sequencing method

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
CmoLsi1-e2F	ACCTGCAATGGCAAGTGA
CmoLsi1-e2R	TTCGAAGTTTGAGTGAAAATGA
H-F2	ggagtgagtacgggtgtc ACCTGCAATGGCAAGTGA
H-R2	gagttggatgctggatgg TTCGAAGTTTGAGTGAAAATGA

注:小写字母为测序通用引物序列。

Note: Small letters represent general primer sequence for sequencing.

1.3 数据分析

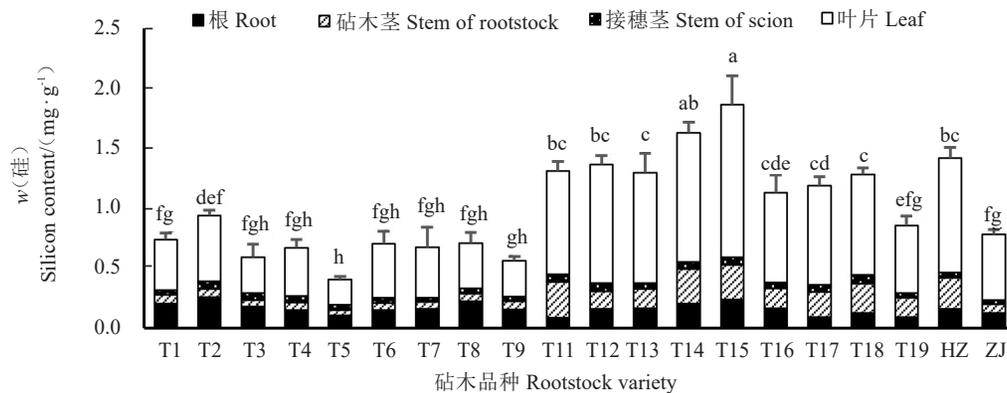
采用 Microsoft Office Excel 2016 整理试验数据和绘图,采用 DPS 软件进行方差分析,采用邓肯氏新复极差法($P<0.05$)进行多重比较分析。使用序列比对软件 DNAMAN 和分析软件 SnapGene 对 PCR 扩增产物测序结果进行序列比对。

2 结果与分析

2.1 不同南瓜砧木嫁接黄瓜后植株不同部位硅含量分析

对 19 份脱蜡粉能力不同的砧用南瓜嫁接黄瓜苗不同组织部位的硅元素含量进行分析,结果如图

1 所示,8 份脱蜡砧用南瓜(T1、T3~T9)嫁接的黄瓜苗全株的硅含量整体显著低于除 T19 以外的 9 份非脱蜡砧用南瓜(T11~T18、HZ)嫁接的黄瓜苗。从各部位来看,脱蜡砧木嫁接苗的叶片和砧木茎中的硅含量低于非脱蜡砧木嫁接苗,而根系和接穗茎中的硅含量在所有嫁接苗中差异较小。



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 不同南瓜砧木嫁接黄瓜苗单株不同部位硅含量

Fig. 1 Silicon content in different parts of single plant of grafted cucumber seedlings with different pumpkin rootstocks

2.2 不同南瓜砧木嫁接黄瓜不同节位果实中硅含量分析

为了进一步分析不同砧用南瓜嫁接黄瓜后植株上不同节位果实中的硅含量,选用 2 个脱蜡粉能力较强的砧用南瓜材料(T2 和 T3)和 3 个不具有脱蜡粉能力的砧用南瓜(T12、T13 和 HZ)作为砧木,嫁接后检测不同嫁接组合的植株不同节位(低、中、高)黄瓜果实的果皮和果肉中硅含量差异,以黄瓜自嫁接植株作为对照。结果表明,在低(图 2)、中(图

3)、高(图 4)3 个节位的果实中,脱蜡砧木 T2 和 T3 嫁接的果皮和果肉硅含量均显著低于非脱蜡砧木嫁接及自嫁接黄瓜;且同节位叶的硅含量也是脱蜡砧木嫁接显著低于非脱蜡砧木嫁接及自嫁接黄瓜。

2.3 不同砧木嫁接黄瓜后脱去黄瓜果面蜡粉的外观表型鉴定

田间观察鉴定的结果如图 5 所示,利用 T2 和 T3 作为砧木嫁接后得到的黄瓜果实果皮上蜡粉量

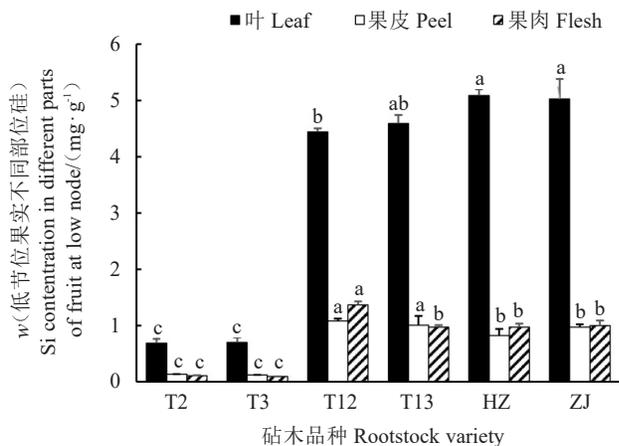


图 2 不同砧木嫁接黄瓜低节位果实不同部位硅含量

Fig. 2 Silicon content in different parts of cucumber low node fruit grafted with different rootstocks

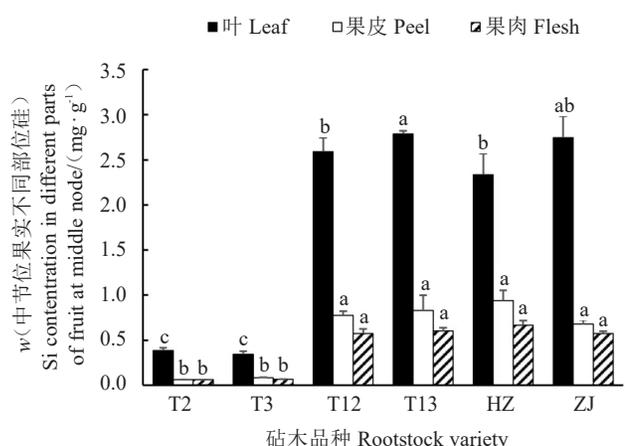


图 3 不同砧木嫁接黄瓜中节位果实不同部位硅含量

Fig. 3 Silicon content in different parts of cucumber middle node fruit grafted with different rootstocks

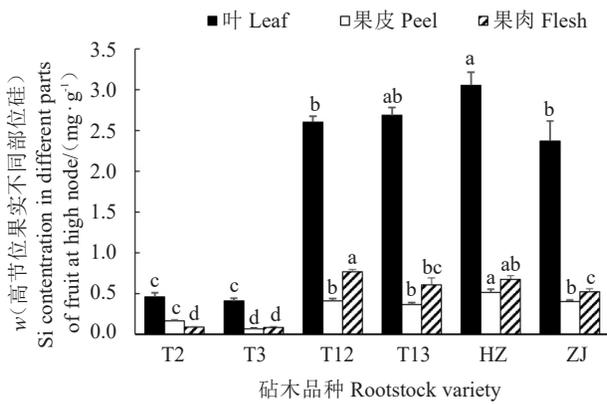


图4 不同砧木嫁接黄瓜高节位果实不同部位硅含量
Fig. 4 Silicon content in different parts of cucumber high node fruit grafted with different rootstocks

少、蜡粉层薄,果皮表现色泽明亮;而自嫁的黄瓜以及利用不具有脱蜡能力的 T12、T13 和 HZ 作为砧木嫁接后得到的黄瓜果实果皮蜡粉层厚、量多,色泽灰暗,表皮均覆盖一层白色的粉末状物质。果皮表面明亮度差值测定结果如 6 图所示, T2 和 T3 作为砧木嫁接后得到的黄瓜果实果皮明亮度差值 (ΔL) 显著低于砧木 T12、T13、HZ, 与田间试验观察结果一致。

2.4 *CmLsi1* 脱蜡粉分子标记的鉴定与应用

2.4.1 CAPS 标记的鉴定和应用 李红丽等^[12]曾经针对 *CmLsi1* 基因上 726 位的 SNP 位点开发了 1 个 CAPS 标记, 该标记用 PCR 引物 CM1-CAPS 进行扩增, 获得 201 bp 的扩增片段, 然后用限制性内切酶 *Hae* III 进行酶切, 如果片段能够被切成 140 bp 和 61 bp 两条片段, 说明该样本为不脱蜡品种, 不能切开则说明是脱蜡品种。笔者利用该 CM1-CAPS 标记位点, 鉴定了 6 个非脱蜡南瓜砧木样本和 51 个脱蜡南瓜砧木样本。结果显示, 共有 56 个样本



图5 不同南瓜砧木嫁接的黄瓜果实表面蜡粉覆盖情况比较

Fig. 5 Comparison of bloom coverage on the surface of cucumber fruits grafted with different pumpkin rootstocks

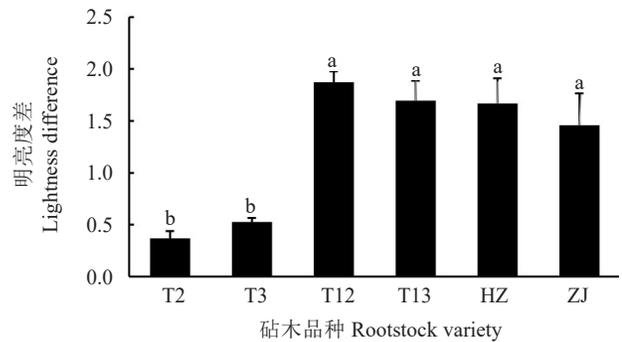


图6 不同南瓜砧木嫁接下的黄瓜果实表面明暗度差
Fig. 6 Poor surface brightness of cucumber fruits grafted with different pumpkin rootstocks

扩增出了 201 bp 的目的条带(6 个非脱蜡样本, 50 个脱蜡样本), 经过酶切后, 6 个非脱蜡样本全部被切开, 而 50 个脱蜡样本全部不能被切开(图 7), 说明该 CM1-CAPS 标记的准确率达到 100%, 可以作为鉴定脱蜡粉南瓜砧木的分子标记。另外, 非脱蜡砧木中的前 2 个样本中出现了 3 条带, 表示这 2 个

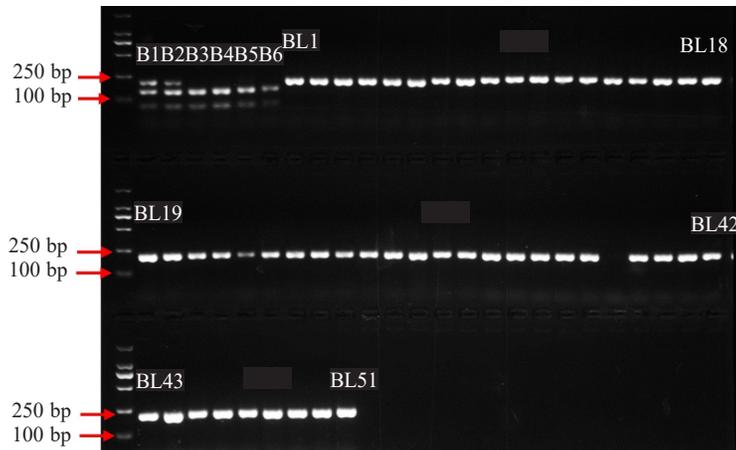


图7 限制性内切酶 *Hae* III 酶切 PCR 片段后的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 7 Agarose gel electrophoresis results after restriction enzyme *Hae* III digestion of PCR fragment

样本的植株可能同时带有脱蜡和非脱蜡的 SNP 标记,说明这 2 个样本可能是脱蜡与不脱蜡的杂合植株。

2.4.2 测序法鉴定 SNP 标记 Sanger 测序法是在 *CmLsi1* 基因上第 726 位 SNP 位点的上下游设计扩增引物,扩增出来的 DNA 片段大小为 158 bp,上述 726 bp 位点在该片段的 58 bp 位置。将带有该 158 bp 目的片段的 PCR 原液送到测序公司进行单向测序,测序引物为 CmoLsi1-e2F,测序返还的结果经过序列比对,如果测序片段 58 bp 位置的碱基为

T,则说明该样本为脱蜡样本,碱基为 C 则说明该位点为非脱蜡样本。本研究用该方法鉴定了 67 个样本,其中 51 个脱蜡样本,16 个非脱蜡样本。测序结果显示,51 个脱蜡样本的 58 bp 位置全部为 T,16 个非脱蜡样本的 58 bp 位置全部为 C(图 8),说明采用 Sanger 测序法鉴定脱蜡粉性状的准确率也可以达到 100%。

笔者采用 Hi-Tom 测序法鉴定了 24 个南瓜砧木样本,其中 18 个脱蜡样本,6 个非脱蜡样本。结果如表 3 所示,6 个非脱蜡样本的 reads 在目标 SNP

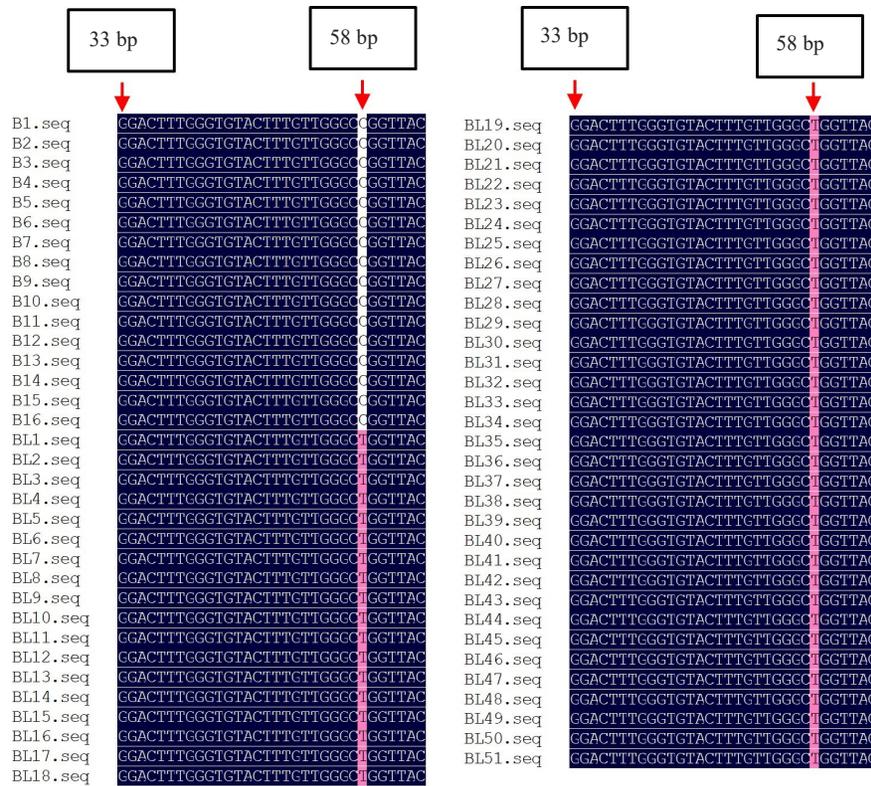


图 8 一代测序法鉴定 67 个砧用南瓜样本的脱蜡粉 SNP 标记结果

Fig. 8 SNP tagging results of bloom removal identified by first generation sequencing method on 67 pumpkin samples for rootstock

位置为 C 的比值为 100%,而 18 个脱蜡样本的 reads 在目标位置出现 T 的比例都超过 80%,其中 BL16-BL18 出现 T 的比例为 100%,说明采用 Hi-Tom 测序法鉴定脱蜡粉性状的准确率也可以达到 100%,而且根据 T 或 C 出现的比值还可以判断样本的目标性状是否纯合。

3 讨论与结论

利用具有去蜡粉特性的南瓜砧木嫁接黄瓜是目前较常用的脱去黄瓜果面蜡粉的方法^[25]。在传统南瓜砧木育种过程中,只有进行嫁接并等嫁接黄瓜

果实成熟期才能判断其是否有脱果实表面蜡粉的能力,不仅选育周期长,而且占地面积大,耗费大量人力和物力资源。近年来随着基因组测序技术的飞速发展,大量与基因紧密连锁或功能分子标记被开发,进而推动了分子标记辅助选择技术在育种中的广泛应用^[15]。

CmLsi1 在南瓜根系中负责硅的输入^[26]。由于 *CmLsi1* 上 726 bp 处的 SNP 位点与 *CmLsi1* 的硅转运功能直接关联,因此可以作为一个功能标记,功能性标记理论上可将选择准确率提高到 100%。为了验证该功能标记在更大范围的脱蜡南瓜砧木中

表3 Hi-Tom 测序法鉴定24个砧用南瓜样本的脱蜡粉 SNP 标记结果

Table 3 SNP tagging results of bloom removal identified by Hi-Tom sequencing method on 24 pumpkin samples for rootstock

样本编号 Sample number	出现 T 的比率 The ratio of T occurrence/%	出现 C 的比率 The ratio of C occurrence/%
B1	0.00	100.00
B2	0.00	100.00
B3	0.00	100.00
B4	0.00	100.00
B5	0.00	100.00
B6	0.00	100.00
BL1	96.18	3.82
BL2	93.58	6.42
BL3	94.84	5.16
BL4	95.33	4.67
BL5	95.87	4.13
BL6	95.32	4.68
BL7	90.51	9.49
BL8	92.03	7.97
BL9	90.67	9.33
BL10	94.17	5.83
BL11	92.47	7.53
BL12	91.24	8.76
BL13	91.87	8.13
BL14	89.62	10.38
BL15	89.40	10.60
BL16	100.00	0.00
BL17	100.00	0.00
BL18	100.00	0.00

的选择准确率,笔者首先通过采用 Jung 等^[21]开发的鉴定南瓜脱蜡粉砧木的 CAPS 分子标记 CM1-CAPS,对青岛金妈妈公司提供的 19 份南瓜种质资源的 57 个样本(每份种质资源采用 3 个单株样本)是否携带脱接穗黄瓜蜡粉相关性状基因进行分析,结果发现,2 份非脱蜡粉砧用南瓜资源的 6 个样本(B1~B6)被酶切成 140 bp 和 61 bp 两条带,而 17 份脱蜡粉砧用南瓜资源的 50 个样本(51 个样本中,有一个样本条带扩增失败)的 PCR 条带不能被切开,只有单一条带。根据标记鉴定出来的基因型与砧木材料是否脱蜡粉的性状准确率达到 100%。但是在杂合和纯合判断方面,标记鉴定的结果与实际存在一定的差异,比如图 7 中非脱蜡砧木中的前 2 个样本(B1 和 B2)中出现了 3 条带,表示这 2 个样本的植株可能同时带有脱蜡和非脱蜡的 SNP 标

记,说明这 2 个样本可能是脱蜡与不脱蜡的杂合植株。但是 Hi-Tom 测序结果和材料清单显示,这 2 个样本应该是纯合的非脱蜡砧木。造成这种结果的原因可能是部分样本酶切不完全。而在所有脱蜡粉砧木材料中,CAPS 标记鉴定的结果都是纯合的脱蜡粉砧木材料,材料清单中却显示其中的 BL1~BL6 应该是杂合的脱蜡粉砧木材料。造成这种结果的原因可能是杂合材料中 1 个非脱蜡粉基因型杂合的程度偏低,说明酶切法在判断纯合和杂合方面不那么准确,可能存在一些干扰因素。

针对南瓜脱蜡粉砧木的 CAPS 分子标记 CM1-CAPS 在鉴定脱蜡粉材料中遇到的问题,笔者提出利用 SNP-测序直接鉴定功能标记的方法,针对 *CmLsi1* 上 726 bp 处的 SNP 位点开发了 PCR-Sanger 测序法,验证功能标记,利用该方法分析了 16 个非脱蜡粉样本和 51 个脱蜡粉样本,结果表明,测序分析鉴定法的准确率同样高达 100%。相较于 PCR-Sanger 测序法,CAPS 标记鉴定法由于需要进行酶切鉴定,对 DNA 的提取质量要求相对较高,一般只能通过传统 CTAB 提取法,耗时较长,而且 PCR 扩增出目的条带后还需要进行酶切和电泳才能判定结果。如果 SNP 没有特别好的酶切位点,只能选用比较昂贵的内切酶进行酶切鉴定,成本也会大大提高。而 PCR-Sanger 测序法对 DNA 提取质量要求比较低,可以采用磁珠快速提取法进行大批量 DNA 提取,PCR 扩增出目的片段后即可进行测序鉴定,更方便快捷,成本也相对较低。因此,对于功能性 SNP 标记,采用 PCR-Sanger 测序法较 CAPS 标记鉴定法具有明显优势。但是 Sanger 测序法和 CM1-CAPS 标记鉴定方法一样在判断纯合和杂合材料方面准确率偏低,对于杂合程度偏低的材料,判断杂合的准确率会下降。

Hi-Tom 测序在跟踪各种突变方面具有较高的可靠性和灵敏度^[27]。针对 Sanger 测序法和 CM1-CAPS 标记鉴定方法存在的判断纯合和杂合材料方面准确率偏低的问题,笔者提出利用 Hi-Tom 测序法直接鉴定功能标记。利用该方法分析了 6 个非脱蜡粉样本和 18 个脱蜡粉样本,结果表明,6 个非脱蜡粉样本在 54 bp 处均为 C,说明其是纯合的非脱蜡砧木,与材料清单显示一致;而在脱蜡粉砧木中,BL1~BL6 在 54 bp 处有 C、T 两种 reads,说明其为杂合脱蜡材料,BL16~BL18 在 54 bp 处均为 T,说明其为纯合脱蜡材料,与材料清单显示一致;

而 BL7~BL15 在 54 bp 处均有 C、T 两种 reads,说明其是杂合脱蜡材料,但材料清单显示其为纯合脱蜡材料。结果不符的原因可能是检测过程中的气溶胶污染。Hi-Tom 测序分析鉴定法的准确率同样高达 100%,并且通过分析同一样本不同 reads 的测序结果,可以判断出所测材料基因型杂合的比例。但有时可能存在气溶胶污染的情况,导致纯合材料也会出现低比例杂合基因型。相较于上述两种方法,Hi-Tom 测序技术不仅可以准确地得出突变材料的基因型,还可以判断出所测材料基因型杂合的比例。

综上所述,脱蜡粉能力强的南瓜作为砧木与黄瓜嫁接后,接穗黄瓜的茎、叶及果实中的硅含量显著低于脱蜡粉能力弱的南瓜砧木。*CmLsi1* 上 726 bp 处的功能标记位点的准确率高达 100%。与 CM1-CAPS 标记鉴定方法相比,测序法鉴定在确保准确性和低成本的同时,还能通过 Hi-Tom 测序技术判断所测材料基因型杂合的比例,解决 CM1-CAPS 标记鉴定方法难以确定基因型杂合比例的问题。因此,针对该位点开发的鉴定标记或方法可以广泛适用于各种脱蜡砧用南瓜选育工作中,对加速南瓜新品种选育具有重要意义。

参考文献

- [1] 韩旭. 黄瓜蜡粉性状遗传及少蜡粉砧木特性[J]. 中国蔬菜, 1997(5):53-55.
- [2] 松本美枝子. キュウリ果实におけるブルーム発生機構の解明とその防止法[J]. 富山农试研报, 1980, 11:29-35.
- [3] 沈琼. 黄瓜果实表面蜡粉形成及其与硅吸收分配的关系研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2014.
- [4] 赵升. 不同砧木嫁接黄瓜果面蜡粉形成特征及差异基因筛选[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2018.
- [5] 高彦魁, 陈普红, 李欣, 等. 不同基因型砧木对黄瓜产量和果实品质的影响[J]. 长江蔬菜, 2008(18):48-50.
- [6] SAMUELS A L, GLASS A D M, EHRET D L, et al. The effects of silicon supplementation on cucumber fruit: Changes in surface characteristics[J]. *Annals of Botany*, 1993, 72(5):433-440.
- [7] 刘青. 不同砧木对嫁接黄瓜果实品质和硅分配特性的影响[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2011.
- [8] 朱进, 别之龙, 徐容, 等. 不同砧木嫁接对黄瓜生长、产量和品质的影响[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(6):668-671.
- [9] 董邵云, 曹力, 张圣平, 等. 嫁接砧木对黄瓜外观品质及果实风味物质的影响[J]. 中国蔬菜, 2013(22):44-51.
- [10] 祝宁, 于静湜, 齐长红, 等. 不同类型砧木对嫁接黄瓜果实果皮的影响[J]. 蔬菜, 2018(11):6-10.
- [11] 费雨兰, 王晶, 沈佳, 等. 不同砧木嫁接对黄瓜长势及果实品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12):147-149.
- [12] 李红丽, 王明林, 于贤昌, 等. 不同接穗/砧木组合对日光温室黄瓜果实品质的影响[J]. 中国农业科学, 2006, 39(8):1611-1616.
- [13] 丁玉梅, 谢俊俊, 张杰, 等. 黑籽南瓜的利用与研究进展[J]. 中国蔬菜, 2019(2):17-28.
- [14] 杨露. 白籽南瓜砧木嫁接导致黄瓜果面蜡粉减少的作用机制[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [15] 王铁臣, 王海荣, 赵士春, 等. 不同双砧木嫁接对黄瓜长势、产量及蜡粉性状的影响初报[J]. 中国蔬菜, 2011(6):54-57.
- [16] 沈琼, 崔健, 申太荣, 等. 嫁接黄瓜果实表面蜡粉形成与砧木的相关性及其硅吸收分配特性[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(1):254-258.
- [17] 刘青, 魏珉, 田雪梅, 等. 不同脱蜡粉类型砧木对嫁接黄瓜生长及硅吸收分配特性的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2012, 43(3):335-340.
- [18] MITANI N, YAMAJI N, AGO Y, et al. Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation[J]. *Plant Journal*, 2011, 66(2):231-240.
- [19] 崔健, 李凤梅, 张洪亮, 等. 南瓜砧木去除嫁接黄瓜表面蜡粉性状的分子标记及应用: CN201710940378.3[P]. 2024-09-28.
- [20] 张洪亮. 南瓜砧木去黄蜡粉的分子标记及对低温胁迫的响应机制[D]. 山东青岛: 青岛科技大学, 2018.
- [21] JUNG J, KIM J, JIN B, et al. Characterization of the *Lsi1* homologs in *Cucurbita moschata* and *C. ficifolia* for breeding of stock cultivars used for bloomless cucumber production[J]. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 2017, 35(3):333-343.
- [22] 郑秀, 成金桃, 王忠全, 等. 不同南瓜砧木嫁接对黄瓜植株生长、产量和果实品质的影响[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(11):22-26.
- [23] 陈学进, 郭卫丽, 姜立娜, 等. 南瓜 DNA 提取方法比较分析[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(1):17-19.
- [24] 楚海娇, 陈慧杰, 范银玲, 等. 一种磁珠法快速提取植物基因组 DNA 的提取液、试剂盒及其提取方法和应用: CN202211338297.3[P]. 2024-04-30.
- [25] 陈银根, 吕文君. 不同砧木对嫁接黄瓜品质及产量的影响[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(4):28-31.
- [26] NAMIKI M, NOKI Y, FENG J M. Silicon efflux transporters isolated from two pumpkin cultivars contrasting in Si uptake[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(7):991-994.
- [27] SUN T T, LIU Q, CHEN X, et al. Hi-TOM 2.0: An improved platform for high-throughput mutation detection[J]. *Science China(Life Sciences)*, 2024, 67(7):1532-1534.