

黄瓜杂交种纯度鉴定 InDel 分子标记开发

田浩然 李强 顾丽婧 王英*

唐山师范学院生命科学系, 中国·河北 唐山 063000

摘要: 作为现代设施农业里的关键栽培种类, 黄瓜杂交种, 其种子纯度直接影响到生产效益和作物性状稳定性的高低。传统的纯度鉴定措施面临操作时间漫长、准确性低等困境, 已很难契合现代种业发展的诉求。论文以黄瓜杂交种分子纯度鉴定技术为核心, 凭借插入缺失 (InDel) 分子标记开展研究工作。通过对不同黄瓜亲本的全基因组数据开展对比分析, 筛选出呈现明显多态性且易于测定的 InDel 位点, 定制特异性引物进而构建标记体系。实验得出的结果表明, 该标记可以稳定鉴别亲本与 F1 代, 在实际种子群体中可精确检测杂合比例与混杂情形, 精准度达 95% 以上。本研究不只为黄瓜种子纯度的管控提供技术支持, 也为其余瓜类作物杂交种的识别提供了有效借鉴。

关键词: 黄瓜; 杂交种; InDel 标记; 纯度鉴定; 分子育种

Inheritance of Hybrid Purity and Development of InDel Molecular Markers in Cucumis Hybrid

Haoran Tian Qiang Li Liqiang Gu Ying Wang*

Department of Life Sciences, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei, 063000, China

Abstract: As a key cultivation type in modern facility agriculture, the seed purity of hybrid cucumber varieties directly impacts production efficiency and the stability of crop traits. Traditional purity assessment methods, which are time-consuming and inaccurate, no longer meet the demands of modern seed industry development. This study focuses on molecular purity assessment techniques for hybrid cucumber varieties, utilizing InDel molecular markers. By comparing the whole genome data of different cucumber parents, we identified InDel sites with significant polymorphism and ease of detection, customizing specific primers to construct a marker system. The experimental results show that this marker can reliably distinguish between parental and F1 generations, accurately detecting the hybridization ratio and mixing scenarios in actual seed populations with an accuracy rate exceeding 95%. This research not only provides technical support for controlling cucumber seed purity but also offers valuable insights for identifying hybrid varieties of other melon crops.

Keywords: cucumber; hybrid; InDel marker; purity identification; molecular breeding

0 前言

在现代农业对高产、优质作物需求不断攀升的背景下, 主流育种模式如今已是杂交种。然而, 杂交种商品种子的纯度直接关乎其商品性状、抗逆能力和田间表现情况, 把控种子纯度已是种业生产与监管的关键一环。虽然传统的田间性状观察法应用广泛, 只是存在周期偏长、主观判断强、准确程度低等弊端。分子标记技术。尤其是插入缺失标记 (InDel), 因稳定性高、检测简单且成本不高, 正日益被关注。论文把黄瓜当作研究对象, 探究基于 InDel 标记的杂交种纯度鉴定手段, 从技术原理、当前的问题点以及推广应用策略等维度展开系统性分析, 期望为黄瓜种业的分子质量控制给出可靠的技术方案。

1 InDel 分子标记技术在黄瓜育种中的应用概述

一类基于基因组序列中插入、缺失变异的分子标记被称作 InDel 标记, 于植物基因组里普遍存在, 有着多态性明显、实验操作方便、结果易于分辨等优点。在黄瓜杂交育种工作里, 基于亲本遗传背景的差别, 可经由基因组序列比对

找出稳定的 InDel 位点, 从而研发出可实现亲本区分与 F1 代检测的特异性标记^[1]。跟 SNP、SSR 等标记对比, InDel 标记的检测无需借助昂贵仪器, 采用普通 PCR 与琼脂糖电泳即可开展检测, 尤其适配中小种子企业进行推广运用。依靠构建包含若干高多态性 InDel 位点的标记群组, 可对黄瓜杂交种群体进行高流通、低成本的纯度鉴别, 为种子生产阶段提供坚实可靠的分子工具。

2 当前黄瓜杂交种纯度检测中存在的 key 问题

2.1 传统纯度检测依赖田间种植与性状观察

多数企业和科研单位进行黄瓜杂交种纯度检测, 依旧主要借助传统的田间种植方式。即于隔离田间实施 F1 种子的种植, 依靠观察它的表型性状判断纯度。然而, 此方法的周期不短, 一般要耗费 40~60 天时长, 而且人为管理与自然环境因素 (如温度、光照、水分等) 对它的影响不容小觑, 易引发性状判断上的差错。某些杂交种之间, 性状差异微弱至极。依靠肉眼准确辨认其是否杂合或混杂并非易事, 进而引发纯度判定结果失真。田间测试一般会关联大量人力与土

地这两类资源,引起种子企业检验成本的上扬,引起工作效率的降低。

2.2 育种单位分子检测基础薄弱, 标记资源不足

虽说已证实分子标记辅助鉴定在若干作物品种里有显著优势,但于黄瓜育种的实际生产工作中,相当一部分种业公司、基层育种单位及中小科研组织,尚未能有效搭建起稳定的分子检测平台^[2]。他们于技术方面存在显著障碍,像缺少分子生物学专业的专门人才、标准化实验室及检测仪器,致使分子技术落地陷入困境。可拿来做黄瓜纯度鉴定的高效分子标记资源很稀缺,公开数据库内可采用的 InDel 或 SNP 标记数量有限,且时常欠缺针对性与组合效果,不适合做大规模推广。此类资源短缺与能力不足的双重情形,对分子技术在实际育种中的渗透程度以及普及的速率影响极大。

2.3 亲本遗传背景相近导致标记识别困难

在黄瓜杂交育种的过程里,亲本材料间一般存在着较为靠近的遗传背景,尤其在目标性状优异基因呈现集中态势,或特定品系实施杂交时,该亲缘关系过近现象将造成它们之间基因差异极微弱。基于这样的背景,哪怕是采用常规的诸如 SSR 或部分 SNP 的分子标记,也可能因多态性缺乏、引物特异性不佳等难题,难以达成清晰的基因型分辨,由此无法有效鉴定亲本和 F1 代的纯度情形。这一问题造成大量现有的分子标记技术在实践当中陷入“叫好不叫座”境地,也就是理论层面可行,实际推广应用却困难重重。

3 基于 InDel 标记的黄瓜杂交种纯度控制策略

3.1 加强分子标记开发

为应对黄瓜杂交种纯度检测时所面临的标记资源不足、区分效率低下问题,首要之务是从根源抓起,依靠黄瓜高质量参考基因组实施系统性 InDel 标记开发工作。具体可采用对常用亲本材料开展全基因组重测序或特定区域靶向测序的方式,通过生物信息学手段来完成序列比对与差异位点挖掘,从中挑选出带有较大插入/缺失片段(通常为 5~30bp)的 InDel 位点,优先选定分布于功能相关基因区域或非重复序列区域当中的标记,为增强特异性及扩增稳定性。筛选出的高多态性 InDel 位点可进一步进行聚合 PCR (Multiplex PCR) 或荧光标记的 Capillary Electrophoresis (毛细管电泳) 检测开发,以提高检测的通量和自动化程度^[3]。

为使鉴定效率与实用性得到进一步提升,构建标记组合或标记矩阵是不可或缺的一步。虽然单一标记可反映一定遗传差别,鉴定准确率以及适用范围均有局限。采用多个标记的合理组合方式,可覆盖到更多遗传变异位点,完成复杂杂交组合的精准识别。此种标记组合体系不仅能削减重复检测,增强工作成效,还可有效杜绝因单个标记失效所致的鉴定差错,不同育种单位或检测平台可凭借矩阵化标记设计。依照自身品系特点灵活选用组合方案,顺应多样化纯度检测的要求。具备高通用性、扩增清晰、判读简易的标记体系,

不但提升了检测精确、稳定的水平,还为标记技术的推广与应用铺就了坚实基础。

3.2 构建标准化分子检测流程

基于标记资源开发这一前提,构建科学、规范、可操作性强的分子检测操作流程这一整套体系,是高效实施黄瓜杂交种纯度检测的关键。此流程需涉及从样本采集、DNA 提取、PCR 扩增、结果审定到数据管理的全环节流程。明确样本采集的相关标准:涵盖取样的量、取样的时期及其部位,保障样品既具代表性又可保存。针对 DNA 提取方法而言,要兼顾基层条件以及高通量的要求,推荐采用快速 DNA 提取试剂套装,同时把操作步骤及浓度控制标准化,减少因操作差异而出现的误判或扩增失败情形。

优化 PCR 体系为分子检测技术的顺利实施构成核心环节之一,与扩增结果的特异性、稳定性、可重复性直接挂钩。在设立黄瓜杂交种 InDel 分子标记检测流程的时段,必须对 PCR 反应体系中的关键参数予以全面的调试及优化,包括引物浓度、模板 DNA 浓度、反应体系体积的设定、退火温度、延伸的时间范围、循环数等方面。引物设计需保证特异性强,不存在自互补与发夹结构情况。要开展体外扩增验证,找出能在不同品系中呈现清晰条带的优质引物组合,一般推荐将引物浓度在 0.1~0.5 $\mu\text{mol/L}$ 之间进行梯度试验,以此选定最佳条件。

对模板 DNA 浓度的把控同样极为关键。若浓度过低,也许会引起扩增产物缺乏,过高的浓度或许会引发非特异性扩增或是引物二聚体的形成,一般建议把该值控制在 10~100ng/ μL 的区间内,需结合品种及样本提取的情况做恰当调整。在设置退火温度之际,要根据引物的 T_m 值开展梯度 PCR 流程,探索理想的温度区间,防止产生非特异性扩增,同时提升 PCR 特异性以及条带的清晰效果。针对多重 PCR 这一体系,尤其应留意各引物间的兼容性以及产物长度区分状况,保障多标记并行检测过程中彼此无干扰^[4]。

进一步来看,在数字化管理和数据集成方面,建议搭建一个统一的分子检测数据平台,针对每次检测得到的样品编号、检测时间、结果图片、PCR 原始数据等进行标准化的归档与管理操作。该平台可作为针对种子质量的电子追溯体系,还可为育种材料的分子信息档案供给基础数据支撑,达成从实验室到田间全环节的数据跟踪。基于这样的基础,可进一步开发移动端应用或云端界面,让育种人员或者种子质量管理人员在任何时候任何地方都能查看种子批次的分子纯度报告,增进检测服务的便利与信息的透明。

3.3 推动技术平台共建共享与基层推广

以分子标记和技术流程成熟条件为基础,持续推进资源共建与共享、平台协同运用,是助力分子检测技术在黄瓜种业体系高效落地的关键要素。要鼓励科研机构跟种子企业一起建设区域性“分子检测中心”或“种子分子质量控制实验室”,对人员、数据与设备资源开展整合,增进服务水

平。该类平台可给地方企业提供检测服务、开展技术训练、共享平台资源与给予数据管理支持,实现检测资源的集中化利用,降低中小种子企业进入应用的门槛。

行业方面需强化种业监管以及技术推广的政策扶持。例如,农业农村主管部门不妨把分子纯度检测纳入种子质量抽检领域,制订纯度分子检测的标准及技术规程,且给予技术认证、财政补贴、样品检测补助等相关政策的扶持,引导基层单位积极引入新技术手段。对种子公司这一主体而言,可利用分子检测手段为产品质量背书加码,夯实品牌竞争根基,实现从“卖种子”到“数据及服务销售”的价值跨越。

在推动黄瓜 InDel 分子标记技术广泛普及应用的阶段中,基层育种人员及一线技术操作人员能力建设具有关键意义。当前,基层目前还未普遍掌握分子育种相关知识,普遍表现出实验技能和数据判读能力弱,极大地阻碍了分子标记检测技术在制种、繁种及种子质检等环节的切实应用。应系统推进针对基层育种人员的培训事宜,采取线下集中训练、远程网络教学、典型事例展示、实际操作指引等不同样式,助力其深入弄懂 InDel 标记的生物学原理、实验流程、判读要点及应用功效^[9]。可利用“以干代训”“送教下乡”“一对一帮扶”等方式达成,让更多基层人员借实践掌握技术,破除技术藩篱,取得“一人掌握、辐射周边”的实效。

此外,还需建立培训成果考核与持续跟踪机制,推动实现从“教会本领”到“合理运用”的转变,保障培训切实转化为实际生产力。借助教育赋能与技术下沉,带动分子检测技术真正为乡村及育种一线所用,辅助增强基层种子生产的科技含量及质量保障水平。依靠科研单位供给技术源头活水、企业进行转化推广实践、基层单位执行实施落地操作、市场凭反馈调节需求,构建由科研、企业、基层、市场共同组成的种业协同创新生态架构,驱动中国黄瓜种业达成科技

赋能下的高质量、可持续发展方向。

4 结语

基于 InDel 分子标记的黄瓜杂交种纯度鉴定技术体现出高效、精准、操作不复杂等好处,符合现代种子质量把控的技术需要。经由系统开展特异性 InDel 标记开发、优化检测工作流程、构建技术标准体系,且通过企业与科研的合作实施推广,有机会全面提升黄瓜种子纯度检测的效率及育种的精确水平。未来可把高通量测序跟信息化管理技术配合起来,创建种子生产全程可追溯的分子质量把控体系,助力黄瓜种业朝着智能化、高质量的发展路径前行。

参考文献:

- [1] T/CROPSSC 002-2023 玉米品种纯度鉴定:InDel分子标记法[S].
- [2] 宋兆建,冯紫旖,屈天歌,等.四倍体水稻恢复二倍体品系的籼粳属性鉴定和杂种优势利用初探[J].作物学报,2023,49(8):2039-2050.
- [3] 张璐.多重PCR检测甜瓜品种纯度和甜瓜F2代群体果实性状的遗传分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2023.
- [4] 张向歌,程珊,陈晨,等.基于全基因组重测序的油莎豆InDel位点鉴定及分子标记开发[J].种子,2024,43(8):52-59.
- [5] 张雪姣,季木灯,王丽媛,等.花生全基因组变异的鉴定和InDel标记的开发及应用[J].植物遗传资源学报,2024,25(12):2136-2148.

通讯作者:王英(1982-),女,中国河北唐山人,博士,副教授,从事蔬菜遗传育种与教学研究。

基金项目:唐山师范学院校级科研(学科建设)项目“黄瓜杂交种纯度鉴定 InDel 分子标记开发”(项目编号:20254129056);河北省农业科技成果转化资金项目“优质广适唐山秋瓜新品种‘多喜一号’的中试与示范”(项目编号:2025JNZ-B02)。