

# InDel 标记在萝卜杂交种圆都 1 号纯度鉴定中的应用

方小雪, 张铨锋, 吴新胜

(宁波微萌种业有限公司 浙江宁波 305101)

**摘要:** 为准确高效鉴定萝卜杂交种的种子纯度, 在萝卜杂交种圆都 1 号亲本全基因组重测序的基础上, 利用亲本间的差异性位点设计特异插入/缺失引物, 通过 InDel 标记开展高效准确的圆都 1 号杂交种纯度鉴定。试验选定引物 L-4, 其亲本带型互补、清晰度高、分离速度快, 以此对 358 株萝卜杂交种圆都 1 号进行纯度鉴定, 检测出母本或异花粉杂株 5 株, 纯度为 98.60%。InDel 标记的分子检测结果与田间表型鉴定结果对比显示有 355 株萝卜的鉴定结果完全一致, 吻合度高达 99.16%。因此, 应用 InDel 标记引物 L-4 能够对萝卜杂交种圆都 1 号进行高效准确的纯度鉴定。

**关键词:** 萝卜; InDel 标记; 杂交种; 纯度鉴定

中图分类号: S631.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2022)12-027-06

## Application of InDel marker in purity identification of radish hybrid Yuandu No.1

FANG Xiaoxue, ZHANG Chengfeng, WU Xinsheng

(Ningbo Weimeng Seed. Co., Ltd., Ningbo 305101, Zhejiang, China)

**Abstract:** Accurate and efficient identification of hybrid purity is of great significance for the seed propagation and extension of radish hybrid. The insertion/deletion (InDel) primer L-4 is designed to identify the purity of Yuandu No.1 based on the genome resequencing and different Insertion/Deletion locus of the parents of Yuandu No.1. The primer L-4 was selected in the experiment. Its parental bands were complementary, with high clarity and fast separation speed. Based on this primer, 358 radish hybrids Yuandu No.1 were identified for purity. Five female parents or heteropollens were detected, with a purity of 98.60%. The results of molecular detection and field phenotypic identification showed that 355 radish plants have the same identification results, with 99.16% consistency. Therefore, the indel primer L-4 can be used to efficiently and accurately identify the purity of radish hybrid Yuandu No.1.

**Key words:** Radish; InDel markers; Hybrids; Purity identification

萝卜(*Raphanus sativus* L.)属十字花科,一年或二年生草本植物,主要以膨大的肉质直根作为产品器官,富含糖、维生素和萝卜硫素等营养物质,具有一定的药用食疗价值<sup>[1]</sup>。我国萝卜种植区域遍布南北各省,常年种植面积达 120 万 hm<sup>2</sup>,总产量约 4000 万 t,是主要的大宗蔬菜作物之一<sup>[2]</sup>。萝卜杂交品种兼具抗病性强、商品性好和产量高等优点,有良好的经济效益,是目前我国栽培萝卜的主要类型。圆都 1 号萝卜是由宁波微萌种业有限公司在 2018 年培育的杂交新品种,具有肉质脆甜爽口、不易糠心和耐抽薹等特点。至 2021 年,圆都 1 号萝卜种子销售量逐年增长,在浙江、江苏、上海、安徽等地均有种植。萝卜杂交种圆都 1 号的进一步推

广需要更多优质种子作为保障,同时也需要高效精准的种子检测技术作为支撑。

杂种优势在生物界普遍存在,是指杂合体在一种或多种性状上优于两个亲本的现象<sup>[3]</sup>。杂种优势利用作为遗传应用的典型代表,已在水稻、玉米和小麦等作物中取得了丰硕成果<sup>[4-6]</sup>。近年来,萝卜的杂种优势利用逐渐受到重视,已有多个性状优良的萝卜杂交新品种上市。在萝卜杂交制种过程中,常因混入亲本自交种子或其他品种种子等生物学混杂问题而降低种子纯度,进而影响作物的产量和品质。因此,种子纯度鉴定是保证萝卜杂交种质量的必要检测流程,也是萝卜杂交种优质高产的坚实保障。目前,我国萝卜种子纯度鉴定主要以田间表型鉴定为主,该鉴

收稿日期:2022-03-03;修回日期:2022-08-30

基金项目:宁波市“科技创新 2025”重大专项(2019B10002);浙江省农业(蔬菜新品种选育)重大科技专项(2021C02065-5-5)

作者简介:方小雪,女,农艺师,从事蔬菜育种及生物技术研究工作。E-mail:961935710@qq.com

通信作者:吴新胜,男,农艺师,从事蔬菜育种及生物技术研究工作。E-mail:wxs@nbweimeng.com

定方法极易受环境因素干扰,存在田间表型特征不易把握和耗时过长等问题<sup>[7]</sup>。根据种子纯度鉴定的发展方向,结合现有的技术手段,急需建立一种能快速精准鉴定萝卜杂交种种子纯度的方法。

InDel (Insertion/Deletion, InDel)多态性分子标记是基于插入或缺失位点两侧的序列来设计特异性引物并进行PCR扩增的标记<sup>[8]</sup>。过去,SSR分子标记作为主要的分子标记技术,早已在黄瓜、甜瓜和萝卜等作物的纯度鉴定中成功应用<sup>[9-11]</sup>。但应用SSR分子标记做纯度鉴定的工作相对繁琐,需要从大量的引物库中筛选,会耗费大量时间和精力。相比SSR标记,InDel标记不仅设计引物的工作量明显减少,而且扩增产物的带型清晰简单,稳定性和分离效果更佳<sup>[12]</sup>。近年来,InDel标记已成功应用于青梗菜、甘蓝等作物的种子纯度鉴定,检测速度和准确性均得到验证<sup>[13-14]</sup>。由此可知,应用InDel标记开展萝卜杂交种的纯度鉴定工作是可行的。

笔者基于萝卜全基因组数据(Raphanus sativus (assembly Rs1.0))对萝卜杂交种圆都1号亲本(父本:2348M832,母本:V01A107238)进行全基因组重测序,通过对比分析父本与母本的重测序结果,利用二者间的差异性位点设计InDel标记引物,以此进行圆都1号萝卜的纯度鉴定。通过与田间表型鉴定结果相互验证,以期开发出具有实用性的InDel分子标记,为以后开展大规模萝卜杂交种纯度鉴定奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为圆都1号萝卜种子,由宁波微萌种业有限公司杂交制种后所得;父本2348M832由福建省福州市闽侯县的地方萝卜品种原白萝卜经5代自交分离、纯化后所得;母本V01A107238由浙江省上虞县地方品种湖田萝卜经4代自交分离、纯化后所得。

### 1.2 器材与试剂

器材:离心管(规格:2.0 mL、1.5 mL)、钢珠(直径:2 mm)、多组织研磨仪、水浴锅、离心机、移液枪、PCR板、PCR仪、电泳仪、电泳槽、BIO-RAD凝胶成像仪。试剂:CTAB DNA提取液、NaHSO<sub>3</sub>、异戊醇、CHCl<sub>3</sub>、ddH<sub>2</sub>O、异丙醇、75%乙醇、琼脂粉、电泳液、2×Taq Master Mix、Maker I。

### 1.3 方法

1.3.1 田间小区种植 2021年11月20日将圆都1号杂交种播种于宁波微萌种业有限公司邱隘农场设

施大棚内,父、母本各种25株,株距和行距分别为15 cm和20 cm,栽培面积约60 m<sup>2</sup>,共计360株。植株生长期间有2株缺失,剩余358株作为试验对象。

1.3.2 田间纯度鉴定方法 田间358株圆都1号萝卜植株播种后35 d开始观察植株田间表型性状,3~5 d观察1次,共3次。

1.3.3 DNA提取 于2022年1月10日,随机选取圆都1号萝卜及其父、母本植株各10株,用打孔器在植株新展开功能叶上取样,获得萝卜圆都1号及其父、母本的混合样品,并置于装有钢珠(直径2 mm)的2 mL离心管内。离心管置于多样品组织研磨仪内,设置60 Hz并运行90 s获得样品匀浆。匀浆中加入700 μL含有NaHSO<sub>3</sub>(NaHSO<sub>3</sub>浓度10.4 g·L<sup>-1</sup>)的CTAB溶液,并以65 °C水浴30 min。水浴后,加入700 μL CHCl<sub>3</sub>和异戊醇混合液(CHCl<sub>3</sub>与异戊醇的体积比为24:1)并离心(8000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min),提取400 μL上清液置于1.5 mL离心管。上清液加入预冷异丙醇(IPA)300 μL并离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min),倒出上清液留底,以75%乙醇漂洗后风干,用ddH<sub>2</sub>O溶解获得DNA水溶液,即混合基因池。

于2022年1月23日,从待测的358株圆都1号萝卜的新叶上取样,以CTAB法提取DNA,纯度检测后以ddH<sub>2</sub>O溶解稀释至100~200 ng·μL<sup>-1</sup>,存放于-20 °C冰箱内备用。

1.3.4 全基因组重测序及InDel位点筛选 父、母本混合基因池送到天津诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组重测序,获得原始数据(raw data)。原始数据去除接头序列和数据质控后获得clean data,并通过BWA软件比对萝卜全基因组数据,对父、母本变异位点进行对比和筛选,其结果用SAMTOOLS软件去除重复并检测InDel位点,软件ANNOVAR对InDel位点进行基因注释<sup>[15]</sup>。

1.3.5 引物设计 根据重测序预测到的InDel位点,选取父本缺失、母本无变异的InDel > 40 bp的位点,利用Primer Premier 5.0软件在差异位点两侧保守区设计引物。为确保扩增的特异性,引物设计参数特别考虑GC含量40%~50%,退火温度50~60 °C,引物片段长度17~25 bp,引物PCR扩增产物长度200~300 bp。

1.3.6 PCR体系和电泳 PCR扩增采用近岸蛋白质科技有限公司的2×Taq Master Mix。PCR体系为20 μL:DNA模板1.5 μL(DNA质量浓度100~200 ng·μL<sup>-1</sup>),正反向引物各1.5 μL(引物质量浓度

10 ng · μL<sup>-1</sup>), 2×*Tap* Master Mix 10 μL, 超纯水 5.5 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 20 s, 51.5 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 40 s, 循环 35 次, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。采用 A3-1 大型凝胶电泳系统, 设置 350 V 电压和 500 mA 电流, 以 4% 琼脂糖凝胶电泳 50 min, 最后通过 BIO-RAD 凝胶成像系统获取图像。

1.3.7 计算公式 纯度/%=(检测总量-杂株数量)/检测总量×100; (1)

吻合率/%=(室内结果/田间结果)×100。 (2)

## 2 结果与分析

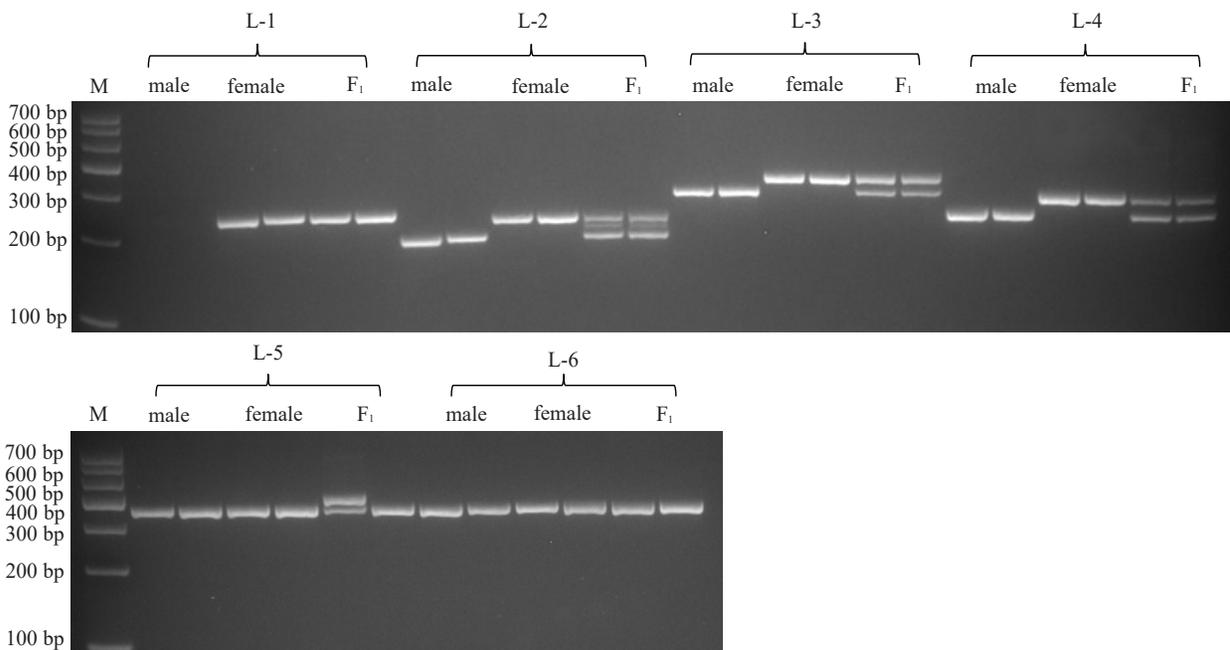
### 2.1 引物筛选

通过对圆都1号萝卜亲本进行全基因组重测序, 筛选 InDel 位点并设计出 6 对引物(表 1)。6 对引物对圆都1号萝卜及其父、母本的 DNA 样品进行 PCR 扩增, 其琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。根据电泳结果, 引物 L-1 父本扩增不出条带被淘汰; 引物 L-5 和 L-6 亲本间扩增条带无多态性被淘汰。引物 L-2、L-3 和 L-4 在父本和母本间的扩增条带都存在

表 1 6 对萝卜 InDel 标记信息

引物编号	引物序列	父本扩增片段大小/bp	母本扩增片段大小/bp	InDel 片段
L-1	F CAGCAGAACCAAATACGCC R GGGTTTCGTTTGGGATTTG	189	231	AGTAAACAGCCAAATAATGGCTTCTCAGAGAACACCCATCTC
L-2	F AGTTCAATCTTTATGCGA R AACACCTCCTGAGTTTCT	181	216	TATCAGCTTTCCTGCAGTATTTAGATATTCAAGAG
L-3	F AGTCGAGTTTGGTGTGACTT R ACAGTAGCTAATAAAAAACC	272	311	TCCAAAGTCGTTGTCTTCGAAAAAAAAAAGCGTCCAAAG
L-4	F TAAATGAGTGCTGAAAATAA R TTTTCTGTTTTAGTTTTTTT	254	297	TAATTTTGGTTTGGTTTGGGTTTTGGATTGGCTTTTATGTTTT
L-5	F CAATTCACAACCTCCATAC R TGGCTTTTATTGTATGAGTA	352	393	AATGGCTAAGTTCAAAAAAAAAAAAATAATAATTCGATGAATG
L-6	F ACCGTTTATGACTCTCTT R AGCAACAGATAGAGACAA	347	382	TTTTTTTTTTTTGAATGATAACGGGACAAAAGATT

注: F 为正向引物(5'~3'), R 为反向引物(3'~5')。



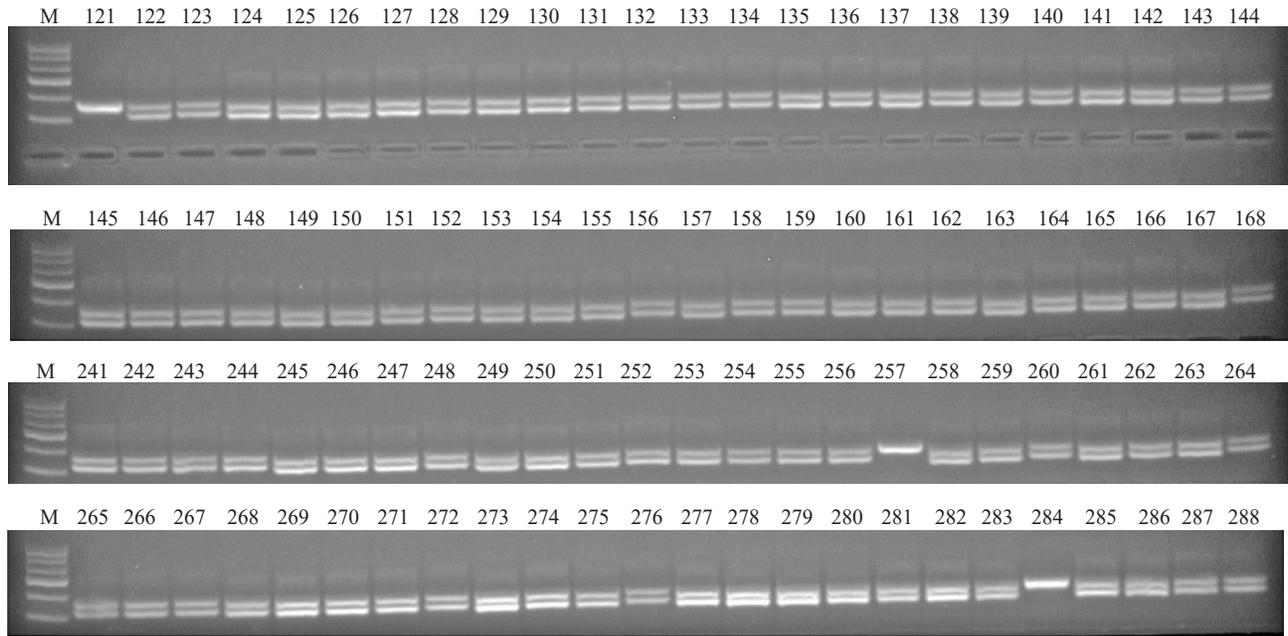
注: M 为 DNA MaKer I, male 为父本 2348M832, female 为母本 V01A107238, F<sub>1</sub> 为圆都 1 号。6 个样品对应 1 个引物, 共 6 列, 前两列为父本, 中间两列为母本, 最后两列为 F<sub>1</sub>。

图 1 不同引物对圆都 1 号萝卜及其父、母亲本 DNA 样品的琼脂糖凝胶电泳

特异性,杂交种圆都1号可扩增出父、母本2个条带;但引物L-3父本和母本间的扩增条带差异较小,电泳检测时间长;引物L-2在杂交种圆都1号存在非特异性扩增条带,只有引物L-4带型清晰且电泳检测时间合理。因此,试验最终选定引物L-4用于萝卜杂交种圆都1号的纯度鉴定,其父本和母本扩增片段大小分别为254 bp和297 bp。

### 2.2 引物L-4检测圆都1号萝卜植株纯度

利用引物L-4对田间358株圆都1号萝卜进行纯度检测,其中编号为26、85、121、257、284的萝卜植株均只扩增出母本条带,其余353株萝卜均为F<sub>1</sub>型双条带,其中编号121~168与241~288萝卜植株的琼脂糖凝胶电泳结果如图2所示。因此,通过纯度鉴定计算,可以获得该批圆都1号萝卜的纯度为98.60%。



注:M为DNA MaKer I,121~168和241~288为圆都1号萝卜植株对应编号。

图2 引物L-4检测圆都1号萝卜部分植株的琼脂糖凝胶电泳结果

### 2.3 田间表型鉴定圆都1号萝卜植株纯度

圆都1号萝卜杂交种植株的田间表型为叶丛半直立、叶色绿、株幅大、裂刻中;萝卜圆都1号母本植株的田间表型为叶丛半直立、叶色深绿、株幅小、裂刻中;二者的肉质根皮色和肉色均为白色。异花粉杂株无特定的田间表型性状,需要与F<sub>1</sub>在叶色、株幅和肉质根颜色等表型性状上全面比较。通过对田间358株萝卜植株的长势、叶色和株幅等性

状进行鉴定,有8株因长势较弱、叶色深绿、株幅小等特点被鉴定为母本或异花粉杂株,获得纯度为97.77%。图3中,白框内的萝卜相比其他植株叶色更深和株幅更小,因此被鉴定为杂株。

### 2.4 InDel标记检测与田间表型鉴定纯度结果对比

通过引物L-4分子检测与田间表型鉴定对358株萝卜植株开展纯度检测,纯度结果如表2所示。引物L-4分子鉴定有5株母本或异花粉杂株,纯度



注:图片框内植株为同一母本植株。

图3 圆都1号萝卜与亲本杂株田间表型鉴定

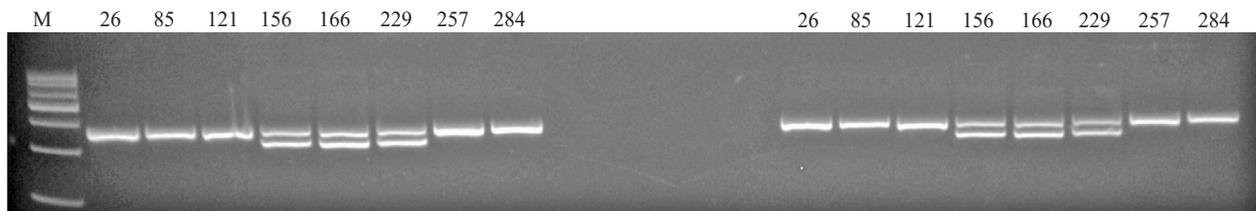
表2 圆都1号萝卜 InDel 标记与田间表型观察鉴定纯度结果对比

检测方法	检测杂株编号	杂株数	纯度/%	吻合度/%
分子检测	26、85、121、257、284	5	98.60	99.16
田间鉴定	26、85、121、156、166、229、257、284	8	97.77	

注:样品数 358 株。

为 98.60%;田间表型鉴定有 8 株杂株,纯度为 97.77%。引物 L-4 分子鉴定与田间鉴定的结果对比,编号为 156、166、229 的 3 株植株鉴定结果存在差异,其余 350 株圆都 1 号杂交种和 5 株杂株的检测结果一致,吻合度高达 99.16%。

### 2.5 InDel 标记与田间表型鉴定结果差异分析



注: M. DNA Maker I;第一次取样(左);第二次取样(右)。

图4 InDel 标记对田间鉴定母本杂株的验证

## 3 讨论与结论

种子纯度是杂交种质量的关键指标,直接影响着农作物的产量和品质。纯度鉴定作为保障种子纯度的必要流程,目前主要以田间表型鉴定和分子标记等方式对种子纯度做出鉴定<sup>[16]</sup>。

在田间表型鉴定过程中,需要在植株不同生长阶段进行多人多次鉴定,从而降低人为主观臆想和环境变化等因素对鉴定结果带来的误差。笔者试验中,编号 156、166、229 植株因长势弱、叶色较深被鉴定为母本或异花粉杂株,与分子检测结果不同。在实际萝卜栽培中,无法为每个植株提供相同且适宜的生长环境,局部的土壤肥力缺失或病虫害胁迫均会影响圆都 1 号萝卜的正常生长。已有大量的研究表明,不适宜的生长环境或胁迫条件下植株的生长会受到抑制,其叶面积大幅减小,叶色加深<sup>[17-18]</sup>。因此,可能是因局部不利的生长环境造成编号 156、166、229 萝卜植株的表型性状与母本相似,从而影响田间表型的鉴定判断。

SSR 分子标记因引物广谱性好、操作简单和成本低等特点,一直是重要的 DNA 分子标记技术,已在水稻、油菜、西瓜和棉花等作物的种子纯度鉴定中被广泛应用<sup>[19]</sup>。随着全基因组测序技术的发展,InDel 标记逐渐被人所熟知,并成功应用于青梗菜、甘蓝等蔬菜作物的纯度鉴定。InDel 标记的多态性

对编号为 156、166、229 的 3 株植株再通过引物 L-4 分子检测,结果如图 4 所示,扩增出父本和母本 2 条条带。同时,留存编号 156、166、229 植株继续生长以待后续继续观察,3 周后其表型开始与 F<sub>1</sub> 一致。因此,引物 L-4 能够代替田间表型鉴定对圆都 1 号萝卜做纯度鉴定。

相比 SSR 标记要低,其带型简单、分布较密,在遗传分析或基因诊断中的重现性、准确性和分辨率大大提高<sup>[20]</sup>。目前,SSR 分子标记已成功应用于北斗 75 和七星萝卜品种的杂交种纯度鉴定<sup>[21-22]</sup>,但应用 InDel 标记开展萝卜杂交种纯度鉴定尚未见相关报道。笔者在圆都 1 号萝卜全基因组重测序的基础上,利用父母本间的 InDel 位点设计引物,以此利用 InDel 分子标记对萝卜杂交种进行纯度鉴定。结果显示,InDel 标记检测与田间表型鉴定结果吻合度高达 99.16%,且检测结果直观快速,无人为主观臆想和环境因素的干扰。因此,InDel 标记能够应用于萝卜杂交种圆都 1 号的纯度鉴定,并兼具高效性和准确性等优点。

高效准确的 InDel 标记纯度检测有助于圆都 1 号萝卜的快速推广,并显著减少公司在纯度鉴定中所需的时间和精力。在实际应用中,考虑到分子标记纯度鉴定需要高通量快速进行,设计 InDel 引物时应综合考量扩增产物的质量、稳定性和分离速度。笔者从引物设计、引物筛选、大规模检测、田间表型鉴定结果比对和再验证等流程出发,对如何应用 InDel 标记开展萝卜杂交种圆都 1 号鉴定工作进行了系统性阐述,也为今后其他杂交种应用 InDel 标记提供了借鉴。

### 参考文献

[1] 余如刚.萝卜肉质直根膨大相关基因与 microRNAs 鉴定[D].

- 南京:南京农业大学,2015.
- [2] 邱正明,黄燕,矫振彪,等.萝卜硫代葡萄糖苷的研究进展[J].中国瓜菜,2021,34(2):1-7.
- [3] 周天宇,李姜玲,杨澜,等.基于亲本对条锈病敏感性预测小麦杂交种的抗性[J].中国农业科学,2020,53(9):1806-1819.
- [4] 赵午斌.两个栽培稻部分种间杂交种农艺性状杂种优势的全基因组关联分析[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [5] 周培禄,任红,齐华,等.氮肥用量对两种不同类型玉米杂交种物质生产及氮素利用的影响[J].作物学报,2017,43(2):263-276.
- [6] 王琳琳,王平,王振林,等.小麦亲本及其杂交后代苗期氮代谢相关指标的遗传与表达差异[J].中国农业科学,2014,47(12):2300-2312.
- [7] 周会.利用分子生物学技术鉴定农作物品种真实性和纯度[D].成都:四川农业大学,2012.
- [8] 王梦梦,杨迎霞,谢添羽,等.利用 InDel 标记鉴定花椰菜“津品70”种子真实性与纯度[J].分子植物育种,2022,20(9):3002-3010.
- [9] 周胜军,张鹏,朱育强,等.黄瓜“浙秀1号”种子纯度的 SSR 鉴定[J].分子植物育种,2013,11(5):557-561.
- [10] 武婷,郭诚,巫水钦,等.应用 SSR 标记鉴定甜瓜流星翡翠的种子纯度[J].浙江农业科学,2020,61(5):841-842.
- [11] 邱杨,李锡香,李清霞,等.利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证[J].植物遗传资源学报,2014,15(3):648-654.
- [12] 杨洁,赫佳,王丹碧,等. InDel 标记的研究和应用进展[J].生物多样性,2016,24(2):237-243.
- [13] 王群,刘洁,赵道松,等.利用 InDel 标记对青梗菜新品种 15039 进行纯度鉴定[J].浙江农业科学,2021,62(5):933-936.
- [14] 杨双娟,原玉香,魏小春,等.利用 InDel 标记鉴定“豫甘3号”结球甘蓝种子纯度[J].分子植物育种,2018,16(8):2519-2524.
- [15] 陈正杰,宛永璐,钟文娟,等.基于大豆基因组重测序的 InDel 标记开发及应用[J].植物遗传资源学报,2021,22(3):815-833.
- [16] 尹祥佳,焦珍珠,赵慧军,等.利用 SSR 荧光标记鉴定玉米杂交种纯度的研究[J].中国种业,2018(9):56-63.
- [17] 边敏.化控剂对冷害下春玉米生长发育及产量形成的调控效应[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2021.
- [18] 董小云.白菜型冬油菜抗冻蛋白的分离及 BrAFP1 基因克隆与功能分析[D].兰州:甘肃农业大学,2019.
- [19] 余香.白菜薹杂种一代种子生产技术的研发及纯度鉴定[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [20] 冯芳君,罗利军,李荧,等.水稻 InDel 和 SSR 标记多态性的比较分析[J].分子植物育种,2005,3(5):725-730.
- [21] 范伟强,张胜雪,郑思宇,等.“北斗75”青萝卜杂交种纯度 SSR 分子标记鉴定[J].分子植物育种,2021,19(6):1-12.
- [22] 王超楠,黄志银,李梅,等.SSR 标记技术在“七星”青萝卜杂交种纯度鉴定中的应用[J].种子,2019,38(3):132-134.