

利用 InDel 标记鉴定汴早九号 大白菜杂交种纯度

冯健起¹, 王培云¹, 蔡亚平², 丁 聪¹, 王惠云³, 生园园¹

(1. 河南省开封市农林科学研究院 河南开封 475004; 2. 河南省开封市种业发展中心 河南开封 475004;
3. 河南省开封市农业农村发展服务中心 河南开封 475004)

摘 要: 为了准确高效地鉴定大白菜汴早九号杂交种的纯度, 从已公布的基于大白菜全基因组开发的 32 对 InDel 核心引物中筛选获得了 InDel 引物 BrID90029, 在汴早九号父母本间呈互补带型且易辨别。利用该 InDel 引物对 288 份汴早九号杂交种 F₁ 进行纯度鉴定, 与田间形态的鉴定结果吻合度高达 99.29%, 表明 InDel 引物 BrID90029 可用于大白菜汴早九号杂交种的纯度鉴定。该结果为规模化检测大白菜杂交种汴早九号的纯度提供了技术依据, 具有重要的应用价值。

关键词: 大白菜; 汴早九号; 杂交种; 纯度鉴定

中图分类号: S634.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2023)12-033-06

Hybrid purity identification of Chinese cabbage Bianzao No. 9 by InDel marker

FENG Jianqi¹, WANG Peiyun¹, CAI Yaping², DING Cong¹, WANG Huiyun³, SHENG Yuanyuan¹

(1. Kaifeng Academy of Agriculture and Forestry, Kaifeng 475004, Henan, China; 2. Kaifeng Seed Industry Development Center, Kaifeng 475004, Henan, China; 3. Kaifeng Agricultural and Rural Development Service Center, Kaifeng 475004, Henan, China)

Abstract: To identify seed purity of Chinese cabbage (*Brassica rapa*) Bianzao No. 9 accurately and efficiently, 32 pairs of published InDel core primers based on the whole genome of Chinese cabbage were used. The InDel primer BrID90029 was selected to identify the seeds purity of Bianzao No. 9. The bands showed diversity between parents and were complementary with high clarity. Based on the primer, 288 Chinese cabbage F₁ hybrids Bianzao No. 9 were identified for purity. Molecular detection matched field phenotypic identification with 99.29% consistency. Therefore, the InDel primer BrID90029 can be applied to accurately and efficiently identify the purity of Chinese cabbage hybrid Bianzao No. 9. This study provides a technical basis for large-scale detection of the purity of Bianzao No. 9, and has a significant application value.

Key words: Chinese cabbage; Bianzao No. 9; F₁ hybrid; Purity identification

大白菜(*Brassica rapa*)是起源于我国的一种重要传统蔬菜,在平衡稳定我国“菜篮子”中起着重要作用。随着我国城镇化的发展以及蔬菜多元化的需求,大白菜的消费倾向于优质、小型、软叶率高的品种,汴早九号正是以此为选育出来的新品种,2018年该品种在农业农村部完成非主要农作物品种登记,编号为 GPD 大白菜(2018)410957,适合黄淮海流域推广种植,已在河南、河北、安徽、山东等地推广,田间高抗病毒病,抗霜霉病以及软腐病。

种子纯度是种子主要的质量指标,在农业生产中,种子纯度不合格易造成巨大的经济损失^[1]。目

前,杂交种的纯度鉴定通常采用田间形态学、蛋白质电泳和 DNA 分子标记鉴定法。田间形态学鉴定法存在诸如周期长、易受环境影响、重复性差等问题,其准确性难以把握^[2]。而分子标记技术因不受组织特异性及外界环境的影响,且具有鉴定准确、快速、重复性强等特点,已成为检测作物杂交种纯度真实且可靠的方法^[3]。钟开勤等^[1]利用相关序列扩增多态性 SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) 标记技术,快速且准确鉴定福春 1 号大白菜的纯度。宋顺华等^[4]采用扩增片段长度多态性 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 技

收稿日期: 2023-10-24; 修回日期: 2023-11-27

基金项目: 河南省重点研发专项(221111110100)

作者简介: 冯健起,男,副研究员,研究方向为大白菜遗传育种与栽培。E-mail: ks6918@163.com

术,准确检测 2 个大白菜品种(北京新 2 号、京夏王)的纯度。杨晓云等^[9]利用简单序列重复 SSR (Simple Sequence Repeats)共显性分子标记 P₃ 鉴定青研早 9 号、青研桔 15 和青研春白一号 3 个大白菜杂交种的纯度。赵新等^[6]应用 SSR 分子标记及高分辨率溶解曲线 HRM(High-Resolution Melting)技术筛选出用于大白菜杂交种纯度鉴定的复合 SSR 位点,能对秋绿 75、津秋 78 和秋绿 60 等 10 份大白菜杂交种进行纯度鉴定;张庶等^[7]利用 3 对 EST-SSR 引物(BRE28、BRE121 和 BRE131)可快速、准确地对 13 个大白菜品种进行纯度鉴定;Zhang 等^[8]利用在大白菜 10 条染色体上均匀分布的 36 个 SSR 标记,随机选取其中的 1~2 个 SSR 标记对大白菜杂交种进行纯度鉴定,并结合田间形态学鉴定验证了结果的可靠性;和禹廷等^[9]利用 2 对 SSR 引物(SSRA 07-1 和 SSRA 07-2)可以快速鉴定大白菜陕秋白 3 号种子纯度;魏小春等^[10]基于自交不亲和 S 单元型多态性设计引物(BrCI 和 BrCII),建立一种广适应性大白菜杂交种纯度分子鉴定方法;薛银鸽等^[11]利用 InDel(Insertion and Deletion)标记引物组合 BrID90107 和 BrID10667,可将豫新四号与其亲本完全区分开来,能有效鉴别豫新四号大白菜杂交种纯度;刘栓桃等^[12]使用 4 对 InDel 引物能有效鉴定大白菜品种牛牌 19 杂交种纯度;王祥

等^[13]利用 InDel 标记可有效鉴定大白菜农大 Q210 及农大 Q212 种子纯度。然而,目前仍缺乏对汴早九号大白菜杂交种纯度进行高效、准确分子鉴定的方法。

笔者从大量已公布的基于大白菜全基因组开发的 InDel 引物中筛选获得了 InDel 引物 BrID90029,并利用该引物对汴早九号杂交种 F₁ 进行纯度鉴定,与田间形态的鉴定结果高度一致,为大白菜杂交种汴早九号的纯度鉴定及良种的安全使用提供分子标记依据和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 时间和地点

InDel 分子标记鉴定试验于 2023 年 6 月在河南省农业科学院蔬菜研究所分子生物学实验室进行;育苗、大田种植试验于 2023 年 7—10 月在开封市蔬菜科学研究所试验基地进行。

1.2 材料

试验材料大白菜(*Brassica rapa*)杂交种汴早九号、母本 P₁(早 85)、父本 P₂(345×东二)由开封市蔬菜科学研究所十字花科研究室提供,植株表型如图 1 所示。塑料大棚内育苗,采用 72 孔穴盘,根据天气情况适时加盖遮阳网(遮光率 40%),待幼苗长至 3 叶 1 心期采摘嫩叶提取 DNA。



注:左侧为汴早九号,右上方为父本,右下方为母本。

图 1 汴早九号及其亲本

Fig. 1 Banzhao No. 9 and its parents

1.3 方法

1.3.1 DNA提取与定量 采用CTAB大量法提取大白菜基因组DNA,具体方法参照魏小春^[10]等并略有改动。提取的基因组DNA用1.2%琼脂糖凝胶进行电泳检测,利用凝胶成像系统(Tanon 2500,上海天能)进行凝胶成像分析DNA完整性,运用核酸

定量仪(Nano-300,杭州奥盛)测定DNA浓度,将DNA模板原液用ddH₂O稀释为工作液(质量浓度为50 ng·μL⁻¹),保存备用。

1.3.2 InDel引物来源 选用已公布的基于大白菜全基因组(<http://www.brassicadb.cn>)^[14]开发的32对InDel引物,具体的引物信息见表1。

表1 引物信息

Table 1 Primer information

编号	引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
1	BrID10291	GGTTGACATAACCAACCAAG	TCAAGTAAGAAGTCTCTGATGC
2	BrID10329	AACCTGGATAAAGACTGCAT	TCTTCGTCAACTCACTTCTCT
3	BrID10375	TAGAACATGTTGTCCTGAA	GGTAGATTGGTTGATCCTG
4	BrID10395	GCTGACATGTACCTTTTGAA	CATCTAAGACCGAGTCAAGC
5	BrID10401	GTCGGATTTCTTTCTACACG	TGAACCTATCTTCTCAACG
6	BrID10415	GACTGAACTCAGCCTATTGC	GGAACAAAATTGCAGAAGAC
7	BrID10417	AACTTCGTCTATCCACATC	TGAAAGTTTCCACACACTG
8	BrID10433	CGTCACTTATACGGTTCACA	AACCCACTACTCGCTCTTCT
9	BrID10437	CCCTCCTATGATTTGGAGTT	TTGGGTCAAGAAAGATATGG
10	BrID10447	CACCTGCTCAGGAGTATTTT	ATTGACTGCAGATGTCACC
11	BrID10523	TATCACAGCCCTTTCATCTC	CTAATGCTGCTACTTATGCG
12	BrID10531	GATAGGTTACGGAAAACAG	CAGTTAGCAAGTCTTTGGG
13	BrID10667	TTCCGTGGAGTATCAGAGAT	GAAACTAGGGATTCGTTTCT
14	BrID10715	TGCTCTCTGCCTACTTCTTG	ACCGATTACCAGCTAATGAC
15	BrID10911	AACCAACCAAAAAGTGTTC	AGTATGATGAGGCTCGATGT
16	BrID10941	CAGAGTTTTGTTGTTTTGG	TATCTTTTCGTTGTCTCGC
17	BrID90005	GCCATATGTCTGCAAAAAGAAA	TCTAATCCATTGCCACAAA
18	BrID90029	TGTTCAATTGTTAGATAATGTTTTTGAA	TGGTCAACATAGATTTGCACG
19	BrID90039	TTTTTGGCTAACAAAAGTGAAGG	TTGAGAAAAGCTTAAAATTGCCAC
20	BrID90105	GAAATACTACACATTTTCCAAAACAAA	TCGATAGGTAGGGTGCATTTTC
21	BrID90107	TCCGTCGGTTTTCTAGTTCAAA	TTGTTGTGGTCCATTATGACG
22	BrID90137	AACAGCCACACGCTCTAACC	GCTCAGATCCGAAGGAGATG
23	BrID90147	CGTCCCTCTTAAAGTTGCGT	AAGCCGACGTTTACAAGATAATTT
24	BrID90277	TGAAACAAAATGAAAAATTCACGA	CAGGAACGCATTAACGTGATTA
25	BrID90367	TTCCATTGCTACCAGAGCC	GAAGTCGTGTCCATGCTTCA
26	BrID10101	GAGTCAAACCATACATAGCAG	GCTCATCAACGCATTAATCT
27	BrID101121	CAATCCAGATCCGAGAGTC	GCCAAGATGTTTTATGACCT
28	BrID101149	AGAGATAACACAGCACAGCA	CTTTCCGATGTTCTTCGAT
29	BrID101163	CAACTCATCATGTGGTTCAC	GGCTGGACAAGTAAGATACAA
30	BrID101175	GGTCAATGAAGGAGCTTGT	GAAGAAGAGACAAATCTACGGA
31	BrID101179	GAGAGAGGGACTGAACTGG	GCTTCCAAACATCACCGT
32	BrID101183	ATAGAACTACCCTCACACC	AAGACGAACACTAGCAGACG

1.3.3 PCR扩增 采用优化后的PCR反应体系,包括10 μL GenFQ Taq Master Mix(济凡生物科技(北京)有限公司),上、下游引物(浓度为10 μmol·L⁻¹)各1 μL,模板DNA 2 μL, ddH₂O 6 μL。

PCR反应条件:95 °C条件预变性5 min;95 °C变性1 min,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,35个循

环;72 °C延伸7 min,10 °C条件下保存。

1.3.4 InDel引物筛选及PCR扩增产物检测 InDel引物筛选:以汴早九号杂交种的2个亲本(P₁和P₂)DNA为模板,利用表1中所列的32对引物进行PCR扩增,具体参见1.3.3部分,筛选出父母本间呈互补带型、特异性好、易于辨别的清晰条带的分子

标记用于后期杂交种纯度鉴定。

基于筛选试验获得 1 对理想的 InDel 引物,用于汴早九号大白菜杂交种纯度的分子鉴定。

PCR 产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行检测分析。

1.3.5 InDel 分子标记鉴定 将汴早九号大白菜杂交种 F₁ 种子进行催芽和育苗(共 288 株汴早九号大白菜植株),待幼苗长至 2~3 叶期时,分别进行单株采集幼嫩叶片用于 DNA 提取,并采用 InDel 引物 BrID90029 分别进行 PCR 检测。种子纯度/%=(供检株数-杂株数量)/供检株数×100。同时,将已采样的幼苗在大田定植,进行田间种植鉴定。

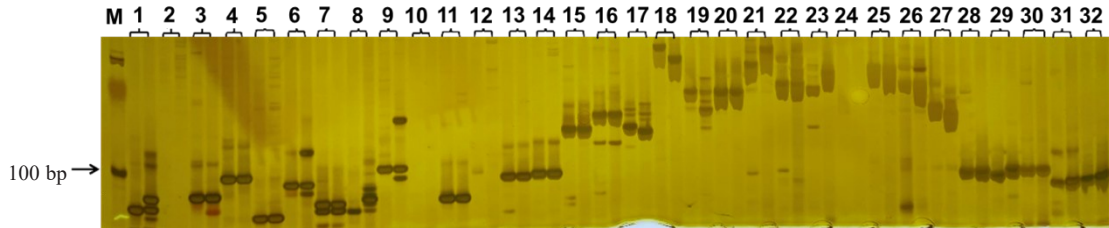
1.3.6 田间纯度鉴定方法 自苗期至采收期,观察并统计植株田间表型性状进行纯度鉴定。根据

植株生长习性、生长势、叶面茸毛、外叶形状、叶色、叶面皱缩情况、抱合方式、球形、球心色等表型特征判定是否为异型株。每隔 3~5 d 观察 1 次并记录。田间纯度/%=(供检株数-异形株数)/供检株数×100。

2 结果与分析

2.1 汴早九号多态性引物筛选

对汴早九号的父本、母本各选择 10 株,建立 DNA 混合池,然后进行引物多态性筛选,结果如图 2 所示。从已公布的基于大白菜全基因组开发的 32 对 InDel 核心引物中筛选获得了 1 对在汴早九号杂交种亲本间具有多态性、带型稳定、易于辨别的 InDel 引物 BrID90029,编号为 18。



注:M. Marker。1~32 代表 InDel 引物编号,依次为 1. BrID10291;2. BrID10329;3. BrID10375;4. BrID10395;5. BrID10401;6. BrID10415;7. BrID10417;8. BrID10433;9. BrID10437;10. BrID10447;11. BrID10523;12. BrID10531;13. BrID10667;14. BrID10715;15. BrID10911;16. BrID10941;17. BrID90005;18. BrID90029;19. BrID90039;20. BrID90105;21. BrID90107;22. BrID90137;23. BrID90147;24. BrID90227;25. BrID90367;26. BrID10101;27. BrID101121;28. BrID101149;29. BrID101163;30. BrID101175;31. BrID101179;32. BrID101183。同一引物的两个点样孔,前面的为母本 P₁,后面为父本 P₂。

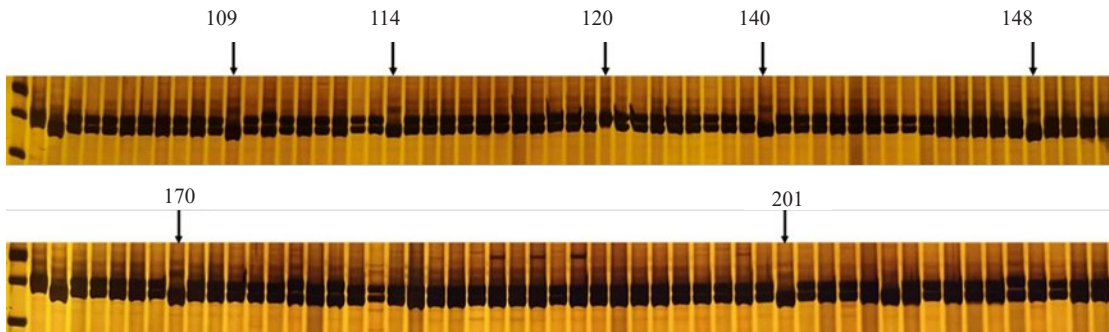
图 2 汴早九号亲本鉴定多态性分子标记筛选结果

Fig. 2 The results of InDel markers screening in the parents of Bianzao No. 9

2.2 大白菜杂交种汴早九号纯度的鉴定

利用筛选的 InDel 引物 BrID90029 对汴早九号杂交种进行纯度鉴定,结果如图 3 所示,在汴早九号苗期鉴定的 288 株中,编号为 109、114、120、140、148、170、201 的 PCR 产物中只有父本带或者母本

带,为非杂交种。样本编号为 109、114、140、148、170、201 的植株 PCR 产物中缺少母本特异条带,编号为 120 的植株缺少父本特异条带。其余的 281 株,同时具有父母本特异条带,为杂交种子。分子标记鉴定其杂交种纯度为 97.57%。



注:M 为 Marker。图中数字代表所检测杂交种的编号(编号顺序为田间采样顺序)。

图 3 汴早九号分子标记纯度鉴定结果

Fig. 3 The results of purity identification of Bianzao No. 9 using the InDel marker

2.3 田间杂交种纯度鉴定

对汴早九号的288个单株进行田间表型鉴定(图4),其中发现编号为109、114、140、170、201的

5株为异形株,田间表型鉴定纯度为98.26%。经计算,田间表型鉴定与分子标记鉴定的吻合度为99.29%(表2)。



注:(A)红色方框内为114号苗期异形株;(B)红色方框内为170号苗期异形株;(C)田间表现。

图4 汴早九号植株表型

Fig. 4 Phenotypes of Bianzao No. 9 plants

表2 汴早九号InDel标记与田间纯度鉴定结果对比

Table 2 Comparison of the results from InDel marker and field identification analyses in Bianzao No. 9

方法	异形株编号	异形株数量/株	纯度/%	吻合度/%
分子标记	109、114、120、140、148、170、201	7	97.57	99.29
田间鉴定	109、114、140、170、201	5	98.26	

注:吻合度/%=分子标记鉴定纯度/田间表型鉴定纯度×100。

3 讨论与结论

随着大白菜育种技术的进步,新品种数量逐年增加。种子纯度鉴定能够保障种子优良遗传特性被充分利用,是防止良种混杂、提高种子质量的重要手段。在生产实践中,种子纯度不合格可能给农业生产造成巨大的经济损失^[1]。

对大白菜杂交种进行纯度鉴定,传统方法是田间形态学鉴定,这一方法通常是当年收获种子,秋季进行田间鉴定,种子第二年才可销售,而且容易受天气等环境因素的影响,耗时长且繁琐,工作量大。随着分子生物技术的发展,分子标记技术越来越

多地应用于杂交种的纯度鉴定。基于 AFLP、SRAP、RAPD、SSR 和 InDel 等分子标记鉴定各种白菜品种和亲本纯度的研究表明,分子鉴定结果是可靠的^[15-16]。共显性 DNA 分子标记技术的优点在于多态性好、易于辨别、操作简单、稳定可靠。因此,基于 DNA 分子标记技术能更加有效地鉴别不同的甚至近亲的基因型,该技术在杂交种纯度鉴定等方面具有广阔应用前景。

与 SSR 标记相比,InDel 标记的多态性较低、分布较密、带型简单,在遗传分析中的重现性、准确性都相对较高^[17],在十字花科蔬菜如大白菜^[11-13]、乌菜^[18]、萝卜^[19]等品种纯度鉴定中应用广泛。利用 In-

Del 标记进行杂交种纯度鉴定可实现规模化检测,具备广阔的应用前景,有望成为种子纯度鉴定的发展方向。大白菜杂交种汴早九号品质优良,已广泛应用于我国黄淮海流域。为了准确、高效地鉴定汴早九号的种子纯度,保障其品质和生产实践,急需开发适用于汴早九号杂交种纯度鉴定的 InDel 分子标记检测方法。

笔者从已公布的基于大白菜全基因组开发的 32 对 InDel 核心引物中筛选获得了 1 对谱带差异大且稳定的双亲互补型 InDel 引物(BrID90029)进行汴早九号杂交种的纯度鉴定,对 288 份材料的鉴定结果与大田调查结果高度吻合,分子标记鉴定结果与田间形态学鉴定结果相比,差异仅为 0.69%,结果偏差 $\leq 2\%$,符合误差允许范围^[20-21],检测结果快速、准确。刘栓桃等^[12]使用 4 对 InDel 引物对大白菜品种牛牌 19 杂交种进行了有效鉴定。王祥等^[13]利用 InDel 标记有效鉴定农大 Q210 及农大 Q212 大白菜种子纯度。可见,针对不同的大白菜品种杂交一代种子纯度鉴定可开发特异性的 InDel 标记,利用所获得的 InDel 标记进行分子鉴定,可快速有效地鉴定大白菜杂交种纯度。笔者的研究结果表明,单一 InDel 引物 BrID90029 可对大白菜杂交种汴早九号杂交种纯度进行有效鉴定,极大提高了检测效率,解决了田间形态学鉴定种子纯度所面临的难题,可为大白菜种子纯度及真实性鉴定提供新的标记方法。

参考文献

- [1] 钟开勤,曾小玲,朱朝辉,等.‘福春 1 号’大白菜一代杂种纯度的 SRAP 鉴定[J].中国农学通报,2017,33(20):50-54.
- [2] 田雷,彭瑞迪,王辉,等.应用 SSR 技术进行白菜品种纯度鉴定的研究[J].北京农业,2010(12):23-28.
- [3] 林春晶,张春宝,董英山.DNA 分子标记在作物杂交种纯度鉴定中的应用[J].分子植物育种,2015,13(3):702-710.
- [4] 宋顺华,郑晓鹰.AFLP 分子标记鉴别大白菜品种[J].分子植物育种,2005,3(3):381-387.
- [5] 杨晓云,田术美,张清霞,等.青研系列大白菜杂交种及亲本指纹图谱构建和杂交种纯度鉴定[J].分子植物育种,2013,11(1):107-112.
- [6] 赵新,王永,兰青阔,等.基于复合 EST-SSR 标记的大白菜种子纯度鉴定及 SNP 位点获取[J].中国蔬菜,2013(14):31-38.
- [7] 张庶,周新成,李利斌,等.利用 EST-SSR 标记鉴定大白菜杂交种纯度的研究[J].天津农业科学,2010,16(6):1-4.
- [8] ZHANG X X, TANG X B, LIU Y, et al. Establishment and application of molecular ID in the main inbred lines of Chinese cabbage[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(1): 116019144.
- [9] 和禹廷,何琼,张妮南,等.大白菜新品种陕秋白 3 号种子纯度的分子鉴定[J].种子,2022,41(5):1-4.
- [10] 魏小春,原玉香,赵艳艳,等.一种新的广适性大白菜杂交种纯度分子鉴定方法的研究[J].中国瓜菜,2023,36(2):19-28.
- [11] 薛银鸽,原玉香,张晓伟,等.利用 InDel 标记鉴定大白菜杂交种豫新四号种子纯度[J].农业生物技术学报,2014,22(4):449-456.
- [12] 刘栓桃,张志刚,王立华,等.大白菜杂交新组合 ZF006 未成熟杂交种纯度分子标记快速鉴定[J].山东农业科学,2020,52(1):31-36.
- [13] 王祥,罗双霞,宋利军,等.利用 InDel 标记鉴定大白菜‘农大 Q210’和‘农大 Q212’种子纯度[J/OL].分子植物育种,[2023-09-27].<https://link.cnki.net/urlid/46.1068.s.20230926.1626.006>.
- [14] WANG Y, SUN S L, LIU B, et al. A sequence-based genetic linkage map as a reference for *Brassica rapa* pseudochromosome assembly[J]. BMC Genomics, 2011, 12:239.
- [15] 林春晶,张春宝,董英山.DNA 分子标记在作物杂交种纯度鉴定中的应用[J].分子植物育种,2015,13(3):702-710.
- [16] 刘小愿,孟艳,张妮南,等.利用 SSR 分子标记鉴定‘陕秋白 2 号’大白菜种子纯度[J/OL].分子植物育种,[2022-02-09].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220209.1345.008.html>.
- [17] 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.
- [18] 马福萌,王明霞,刘童光,等.安徽乌菜 DNA 提取与 InDel 引物筛选[J].中国瓜菜,2014,27(2):36-38.
- [19] 方小雪,张铨锋,吴新胜.InDel 标记在萝卜杂交种圆都 1 号纯度鉴定中的应用[J].中国瓜菜,2022,35(12):27-32.
- [20] 焦荻,商纪鹏,高素燕,等.西瓜品种‘蜜多’种子纯度 SSR 标记鉴定[J].中国瓜菜,2019,32(7):19-22.
- [21] 范伟强,王超楠,黄志银,等.青梗菜速俊 109 杂交种纯度 SSR 分子标记鉴定[J].种子,2020,39(8):146-148.