DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2024.0808

利用 InDel 分子标记鉴定新乡小包 23 大白菜种子纯度

徐世静[1],王晓玲[1],肖　艳[1],原让花[1],杨　晨[2],姬可盈[2]

(1.新乡市农业科学院　河南新乡　453000;　2.新乡工程学院　河南新乡　453000)

摘　要:为快速检测新乡小包 23 越冬制种基地受冻害地块杂交种纯度,确保流入市场的种子质量达标,维护消费者权益,同时提高杂交种筛选效率,从 12 对大白菜 InDel 引物中筛选能够区分大白菜杂交种新乡小包 23 及其父母本的特异性引物并进行种子纯度鉴定。结果表明,有 3 对引物表现出共显性,其中 1 对引物能够将新乡小包 23 与另外 3 个相似品种有效区分开。将该引物在 108 个杂交后代中进行验证,纯度鉴定结果为 93.5%,与田间鉴定结果基本一致。综上,研究筛选的 InDel 标记 BrID90105 可用于新乡小包 23 种子纯度的快速鉴定,促进种业良性发展。

关键词:大白菜;新乡小包 23;InDel 分子标记;种子纯度鉴定

中图分类号:S634.1　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1673-2871(2025)07-049-05

The seed purity identification of Chinese cabbage Xinxiangxiaobao 23 by InDel molecular marker

XU Shijing[1], WANG Xiaoling[1], XIAO Yan[1], YUAN Ranghua[1], YANG Chen[2], JI Keying[2]

(1. Xinxiang Institute of Agricultural Sciences, Xinxiang 453000, Henan, China; 2. Xinxiang Institute of Engineering, Xinxiang 453000, Henan, China)

Abstract: To rapidly detect the purity of hybrid seeds from frozen damaged plots in the overwintering seed production base of Xinxiangxiaobao 23, ensure that the quality of seeds entering the market meets standards, protect consumers rights, and improve the efficiency of hybrid seed screening, specific primers were selected from 12 pairs of InDel primers for Chinese cabbage to distinguish Xinxiangxiaobao 23 and its parents, and seed identification was carried out. The results showed that three pairs of primers exhibited co-dominance, among which one pair could effectively distinguish Xinxiangxiaobao 23 from the other three similar varieties. This primer was verified in 108 hybrid progenies, and the purity identification result was 93.5%, which was basically consistent with the field identification result. In conclusion, the InDel marker BrID90105 selected in this study can be used for rapid identification of seed purity in Xinxiangxiaobao 23, promoting the healthy development of the seed industry.

Key words: Chinese cabbage; Xinxiangxiaobao 23; InDel molecular marker; Seed purity identification

大白菜(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)属于十字花科芸薹属植物,在我国广泛种植,年种植面积多达 180 万 hm^2,北方地区,如山东、河北、河南等地成为大白菜的主产区。这些地区的种植规模较大,且以连片种植为主,机械化程度较高。南方地区,如云南、贵州、四川等地凭借独特的气候差异,可实现错季种植,填补市场空白[1]。大白菜营养价值较高,富含维生素 C、胡萝卜素,钙、铁、钾等矿物质,以及膳食纤维等,能增强免疫力,有益健康。大白菜在我国经济体系中具有重要价值,主产区规模化种植收益可观,可有效带动农资、运输等相关产业,为农民创造更多就业与增收机会。同时,其产量大、价格亲民,能在蔬菜价格波动时稳定市场。在加工领域,大白菜作为原料推动了酸菜、泡菜、脱水蔬菜等产业发展,延伸产业链,创造大量就业岗位,提升产品附加值,促进地方经济繁荣[2]。

种子纯度直接影响着大白菜的生长表现、产量以及品质。高纯度的种子能够确保大白菜在田间

收稿日期:2024-12-12;**修回日期:**2025-02-20

基金项目:河南现代农业产业技术体系(HARS-22-07-G3);河南省农业良种联合攻关项目(2022010504);河南省科技攻关项目(252102110313)

作者简介:徐世静,女,助理研究员,主要从事大白菜抗病抗逆等研究工作。E-mail:xushijing0621@163.com

通信作者:原让花,女,研究员,主要从事大白菜遗传育种等研究工作。E-mail:yuanranghua123@163.com

生长整齐一致，植株在形态、生长周期、抗逆性等诸多方面呈现出较为稳定的特征，从而便于进行统一的栽培管理，并且能够实现较为理想的产量和品质，满足市场需求以及种植户的期望[3]。相反，纯度较低的种子可能会导致田间出现杂株，这些杂株在生长习性、外观特征等方面与目标品种存在差异，不仅会破坏田间植株的整齐度，增加管理难度，还会降低其商品价值。随着现代农业的不断发展，对于大白菜种子纯度的要求也日益提高。因此，制定一套能够快速鉴定杂交种的方法，对有效提高种子纯度，并且大幅缩短杂交种的检测周期有着极为重要的意义。

近年来，与传统的田间种植鉴定方法相比，InDel 分子标记技术不受环境因素影响，结果更准确可靠，而且检测速度快，可在较短时间内完成大量种子样本的检测，大大提高了检测效率。InDel 标记因等位基因位点插入或缺失短核苷酸序列，产生长度多态性变异[4]。目前，InDel 标记已广泛应用到多种农作物种子纯度鉴定中[5]。方小雪等[6]利用 InDel 标记鉴定了青梗菜杂交种纯度；潘伟芹等[7]对杂交籼稻中的杂株进行了鉴定；杜晓芬等[8]利用 InDel 标记鉴定了优质高产谷子杂交种纯度；苏晓梅等[9]筛选到了 3 对可用于鉴定樱桃番茄杂交种纯度的 InDel 引物；方小雪等[10]利用 InDel 标记准确高效鉴定了萝卜杂交种的种子纯度；梁紫越等[11]利用 20 对 InDel 分子标记对玉米杂交种纯度进行了鉴定；王梦梦等[12]从 12 对 InDel 引物中，筛选到了 1 对引物可用于鉴定花椰菜津品 70 种子纯度。在白菜中，冯健起等[13]从 28 对 InDel 引物中筛选到 1 对可用于大白菜品种汴早九号种子纯度的鉴定；王祥等[14]利用 3 个 InDel 分子标记分别对 2 个大白菜新品种杂交种纯度进行了鉴定。薛银鸽等[15]从 104 对 InDel 引物中筛选到 3 对可用于鉴定大白菜品种豫新四号种子纯度的引物；刘栓桃等[16]从 20 对 InDel 标记中筛选到了 8 对在双亲间具有多态性的引物。虽然众多研究已表明 InDel 标记在多种作物种子纯度鉴定中的有效性，但用于鉴定不同品种种子纯度的引物具有特异性，而针对新乡小包 23 杂交种纯度鉴定的研究尚未见报道，且新乡小包 23 在市场上存在相似品种，易造成混淆。基于此，笔者以新乡小包 23 为对象，开展特异性 InDel 引物筛选及纯度鉴定。

新乡小包 23 为新乡市农业科学院选育的生育期 70 d 左右、矮桩叠抱、结球紧实、品质优良、高抗干烧心的大白菜品种[17]。繁种一般于 9 月下旬进行穴盘育苗，10 月下旬移栽到大田，进行露地越冬制种。制种田要求四周 2000 m 范围内不能种植其他大白菜品种以及小白菜、芜菁等亲缘关系近的作物，以防止生物学混杂。该品种在河南、河北、山西、陕西等多地均有种植。2023 年冬季持续低温，造成部分制种田块冻害严重，导致父母本比例失调。收获后为快速鉴定制种纯度，笔者以新乡小包 23 为研究试材，筛选杂交种特异性的 InDel 引物，从而建立快速鉴定新乡小包 23 杂交种纯度的方法，保证生产种子纯度。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用材料大白菜新乡小包 23 父本和母本分别是 1305 和陕 5201，杂交种为 2023 年秋季播种、2024 年 5 月收获的豫北制种基地受冻害影响的亲本比例失调的部分地块的种子，相似品种新科小包 26、新科佳丽、新科佳美与新乡小包 23 含有同一母本陕 5201，所用材料均为新乡市农业科学院自主选育。

2024 年 8 月份种植于新乡市农业科学院研发中心基地，进行穴盘育苗，待长到 3 叶 1 心时进行单株编号及取样。1305 和陕 5201 各取 6 株，杂交一代新乡小包 23 取 108 株。取健康嫩叶 100 mg 左右放于 2.0 mL 的离心管中，保存于−70 ℃超低温冰箱备用。9 月进行大田定植、单株编号和性状观测。

1.2 DNA提取和检测

将样品放在上海静信冷冻研磨仪中研磨成粉末状，采用 Solarbio 植物基因组 DNA 试剂盒进行 DNA 提取并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性，放于−20 ℃冰箱备用。

1.3 PCR反应体系和扩增程序

12 对 InDel 引物序列来源于文献[11]，引物序列见表 1，引物由上海生工生物有限公司合成，对亲本 1305 和陕 5201 进行 PCR 扩增筛选特异性引物。PCR 体系总体积为 15 μL，包括 Takara Premix *Taq* 酶 7.5 μL，ddH_2O 5 μL，DNA 模板 1 μL，10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 正、反向引物各 0.75 μL。PCR 扩增程序：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，共 32 个循环，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。

1.4 电泳检测

扩增产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测。电泳条件为 140 V，120 mA，时间 60 min。采用硝酸银显色法进行染色，使用北京六一胶片观

表1　12对InDel引物编号及序列

Table 1　12 pairs of InDel primers number and sequence

编号 No.	引物名称 Primer name	正向引物（5′-3′）Forward primer（5′-3′）	反向引物（5′-3′）Reverse primer（5′-3′）
1	BrID10667	TTCCGTGGAGTATCAGAGAT	GAAACTAGGGATTCGTTTCT
2	BrID10715	TGCTCTCTGCCTACTTCTTG	ACCGATTACCAGCTAATGAC
3	BrID10911	AACCAACCAAAACTGTGTTC	AGTATGATGAGGCTCGATGT
4	BrID10941	CAGAGTTTTGTTGGTTTTGG	TATCTTTTCGTTGTTCTCGC
5	BrID90005	GCCATATGTCTGCAAAAGAAA	TCTAATCCATTGCCCACAAA
6	BrID90029	TGTTCATTGTTAGATAATGTTTTTGAA	TGGTCAACATAGATTTGCACG
7	BrID90039	TTTTTGGCTAACAAAGTGTAAGG	TTGAGAAAGCTTAAAATTGCCAC
8	BrID90105	GAAATACTACACATTTTCCAAAACAAA	TCGATAGGTAGGGTGCATTTTC
9	BrID90107	TCCGTCGGTTTCTAGTTCAAA	TTGTTGTGGTCCATTATGCAG
10	BrID90137	AACAGCCACACGCTCTAACC	GCTCAGATCCGAAGGAGATG
11	BrID90147	CGTCCCTCTTAAAGTTGCGT	AAGCCGACGTTTACAAGATAATTT
12	BrID90277	TGAAACAAAATGAAAAATTCACGA	CAGGAACGCATTAACGTGATTA

察灯（WD-9406）拍照记录。

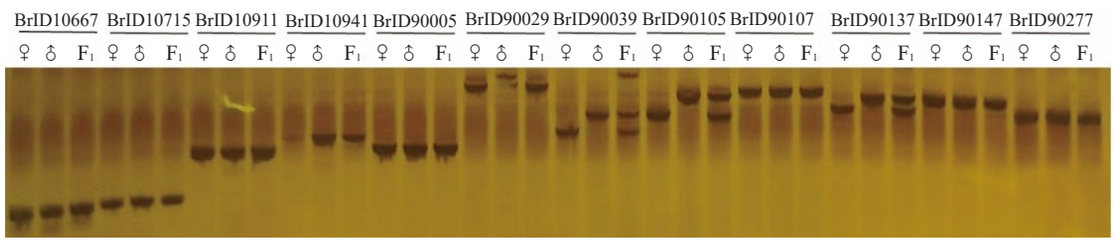
2　结果与分析

2.1　新乡小包23多态性引物的筛选

用12对大白菜InDel引物对新乡小包23的父本、母本、杂交一代的DNA进行PCR扩增，结果如图1所示，有3对引物的扩增产物在双亲间具有多态性，且带型稳定、易于辨别，在杂交种中表现共显性，3对引物分别为BrID90039、BrID90105、BrID90137，编号分别为7、8、10。

2.2　新乡小包23与同类型品种的鉴定

用筛选到的新乡小包23的3对引物对新科小包26、新科佳丽、新科佳美共3个品种的父母本进行鉴定（图2），结果表明，引物BrID90039对新科佳丽父母本的扩增结果与新乡小包23一致，对新科小包26和新科佳美父母本的扩增结果与其不一致，说明该引物也可以区分新科佳丽的父母本。引物BrID90105对新科小包26、新科佳丽、新科佳美父



注：♀. 母本；♂. 父本；F_1. 新乡小包23杂交一代单株。

Note: ♀. Female parent; ♂. Male parent; F_1. Individual plant F_1 hybrid of Xinxiangxiaobao 23.

图1　新乡小包23亲本鉴定多态性分子标记筛选结果

Fig. 1　The results of InDel markers screening in the parents of Xinxiangxiaobao 23

注：X. 新乡小包23；1 新科小包26；2. 新科佳丽；3. 新科佳美。

Note: X. Xinxiangxiaobao 23; 1. Xinkexiaobao 26; 2. Xinkejiali; 3. Xinkejiamei.

图2　利用BrID90039（A）、BrID90105（B）、BrID90137（C）引物鉴定同类型大白菜品种的电泳图谱

Fig. 2　The electrophoresis patterns of other three Chinese cabbage varieties identified with BrID90039 (A), BrID90105 (B), BrID90137 (C) primers

母本的扩增结果与新乡小包 23 的扩增结果均不一致，说明该引物可以将新乡小包 23 与新科小包 26、新科佳丽、新科佳美区分开。引物 BrID90137 对新科佳美父母本的扩增结果与新乡小包 23 的扩增条带一致，对新科小包 26、新科佳丽的扩增条带与新乡小包 23 的不一致，说明该引物还可以区分新科佳美的父母本，同时可以将新乡小包 23 与新科小包 26、新科佳丽区分开，但不能与新科佳美区分开。以上结果表明，引物 BrID90105 可以特异性将新乡小包 23 与相似品种新科小包 26、新科佳丽、新科佳美区分开。

2.3　新乡小包23杂一代纯度的鉴定

用特异性引物 BrID90105 对 108 株新乡小包 23 杂交种（1305×陕 5201）DNA 进行扩增。结果表明（图 3），在新乡小包 23 杂交种中，鉴定出了母本 5 株（编号 2、32、38、66、96），父本 2 株（编号 25、49），新乡小包 23 杂交种的杂交率为 93.5%，田间表型鉴定有 6 株杂株，纯度为 94.4%，其中分子鉴定为母本（编号 38）的植株，田间表型鉴定为杂交种，其他植株的检测结果与分子鉴定结果一致。

注：♀. 新乡小包 23 母本；♂. 新乡小包 23 父本；1~108. 新乡小包 23 杂交种单株。

Note: ♀. Female parent of Xinxiangxiaobao 23; ♂. Male parent of Xinxiangxiaobao 23; 1-108. Xinxiangxiaobao 23 individual plant of hybrids.

图 3　引物 BrID90105 对新乡小包 23 的纯度鉴定

Fig. 3　Purity identification of Xinxiangxiaobao 23 by primer BrID90105

3　讨论与结论

在农业领域，种子是整个农业产业链中最前端也是极为重要的一环。优质的种子是获得高产、优质农产品的关键前提。而种子纯度是衡量种子品质的一个重要指标，对保障农业生产、植物繁育以及相关产业发展都至关重要。鉴定种子纯度的方法主要有田间种植鉴定法和 DNA 分子标记鉴定法，田间种植鉴定法优点是最接近种子实际生长表现，结果直观可靠，能综合考察多个农艺性状，是一种被广泛认可的鉴定方法。缺点是鉴定周期长，往往需要经历一个完整的生长季节，耗时费力，并且受环境因素如气候、土壤等影响较大。而利用分子标记可在苗期进行种子纯度检测，多态性高、重复性好、准确性高。

分子标记作为一种常用的遗传标记，在樱桃番茄[9]、黄瓜[18]、南瓜[19]等众多蔬菜作物品种鉴定研究中被广泛应用。在本研究中，与冯健起等[13]、王祥等[14]、薛银鸽等[15]一样，均采用 InDel 标记，而唐昊等[20]采用的是 KASP 标记，管志坤等[21]、刘小愿等[22]、Zhang 等[23]采用的是 SSR 标记。笔者从 12 对 InDel 引物中筛选出 3 对能够快速区分新乡小包 23 杂种一代与父母本，这 3 对引物对新乡小包 23 的杂交育种工作具有重要意义。

开展同类型品种种子鉴定研究，能有效防止品种混杂，保障种子纯度，维护市场秩序，让农民免受假种子侵害。与刘小愿等[22]的研究相似，用新乡小包 23 的 3 对特异扩增引物对同类型的其他 3 个品种进行了鉴定，结果表明，其中 1 对引物 BrID90105 展现出了良好的特异性，能够将新乡小包 23 与新科小包 26、新科佳丽、新科佳美 3 个品种明确区分开，有效避免了新乡小包 23 与其他同类型品种混淆而导致的种子质量问题，保障种子的真实性。但只对 3 个相似品种新科小包 26、新科佳丽、新科佳美进行了鉴定，对于市场上众多可能与新乡小包 23 混淆的大白菜品种而言，覆盖范围较窄。

InDel 分子标记已在青梗菜[24]、乌菜[25]、花椰菜[12]、甘蓝[26]等十字花科作物中用于种子纯度鉴定，笔者从 12 对 InDel 引物中筛选出 1 对具有明显共显性分离的引物，对新乡小包 23 的 108 株单株 InDel 分子纯度检测结果比田间鉴定结果稍低，这与

何鸟飞等[27]对春油菜、冯健起等[13]对汴早九号大白菜的研究结果相似，而刘小愿[22]对定陕秋白2号大白菜、方小雪等[6]对典湖1号青梗菜的研究中分子纯度检测结果和田间鉴定结果一致。分子鉴定和田间鉴定结果不一致可能是因为田间鉴定结果易受环境条件影响，如土壤肥力、气候、病虫害等，这些因素可能导致植株性状表现不稳定，使一些性状不能正常表达，从而与不受环境干扰的分子鉴定结果产生差异。

笔者从12对大白菜InDel引物中，筛选出3对在新乡小包23杂交种及其亲本间呈共显性的引物。其中，BrID90105引物能有效区分新乡小包23与3个相似品种，对108株杂交1代纯度鉴定为93.5%。以上结果表明该引物可用于新乡小包23种子纯度鉴定，能够缩短鉴定周期、提高效率。

参考文献

[1] 张凤兰，于拴仓，余阳俊，等.“十三五”我国大白菜遗传育种研究进展[J].中国蔬菜，2021(1)：22-32.

[2] 张凤兰.中国大白菜产业发展现状及品种需求分析[J].中国果菜，2009(5)：9-11.

[3] 李逸龙.种子纯度研究现状与发展[J].长江蔬菜，2011(18)：6-10.

[4] JANDER G，NORRIS S R，ROUNSLEY S D，et al.*Arabidopsis* map- based cloning in the post- genome era[J]. Plant Physiology，2002，129(2)：440-450.

[5] 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.

[6] 方小雪，韦银兰，张铖锋，等.利用InDel标记鉴定典湖1号杂交种纯度[J].浙江农业科学，2024，65(5)：1120-1125.

[7] 潘伟芹，马卉，许学，等.利用InDel分子标记鉴定杂交籼稻中籼粳交杂株[J].中国农学通报，2023，39(33)：107-113.

[8] 杜晓芬，钱枰励，王智兰，等.基于InDel标记的优质高产‘长杂谷466’的纯度鉴定[J/OL].分子植物育种，1-9[2023-08-25]. http://link.cnki.net/urlid/461068.s.20230824.1844.005.

[9] 苏晓梅，李静，刘淑梅，等.樱桃番茄美小红杂交种子纯度的InDel标记鉴定[J].中国瓜菜，2023，36(6)：28-31.

[10] 方小雪，张铖锋，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.

[11] 梁紫越，刘志浩，马世鹏，等.基于双平台的InDel标记玉米杂交种纯度鉴定方法[J].玉米科学，2022，30(3)：32-39.

[12] 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.

[13] 冯健起，王培云，蔡亚平，等.利用InDel标记鉴定汴早九号大白菜杂交种纯度[J].中国瓜菜，2023，36(12)：33-38.

[14] 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，1- 16[2023- 09- 27]. http://link.cnki.net/urlid/461068.s.20230926.1626.006.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 原连庄，卞高中，原让花，等.抗干烧心大白菜-新乡小包23[J].长江蔬菜，1999(2)：34.

[18] 金庆敏，林毓娥，王瑞，等.基于SSR分子标记的粤秀3号黄瓜杂交种子纯度及真实性鉴定[J].广东农业科学，2023，50(9)：49-58.

[19] 邓竹根，夏伟伟，徐甜甜，等.印度南瓜贝栗7号杂交种子纯度SSR分子标记鉴定[J].中国瓜菜，2020，33(2)：37-41.

[20] 唐昊，杨双娟，张晓伟，等.利用KASP标记鉴定吉美8号大白菜种子纯度[J].分子植物育种，2024，22(14)：4583-4589.

[21] 管志坤，罗双霞，李艳霞，等.利用SSR标记鉴定油绿3号大白菜品种纯度[J].种子，2011，30(9)：34-35.

[22] 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，1-7[2022-02-09]. http://link.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220209.1345.008.html.

[23] 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)：l16019144.

[24] 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.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 何鸟飞，赵绪涛，李开祥.基于InDel标记的春油菜品种指纹图谱构建和杂交种纯度鉴定[J/OL].草业科学，1-15[2024-05-11]. http://link.cnki.net/urlid/62.1069.S.20240511.0939.002.