

DOI: 10.11686/cyxb2024256

http://cyxb.magtech.com.cn

冯雅琪, 陈嘉慧, 张静妮, 等. 基于重测序紫花苜蓿高蛋白、高产关联 InDel 分子标记开发. 草业学报, 2025, 34(4): 137-149.

FENG Ya-qi, CHEN Jia-hui, ZHANG Jing-ni, *et al.* Development of high-protein and high-yield associated InDel molecular markers based on re-sequencing in alfalfa. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(4): 137-149.

基于重测序紫花苜蓿高蛋白、高产关联 InDel 分子标记开发

冯雅琪¹, 陈嘉慧¹, 张静妮², 隋超¹, 陈基伟¹, 刘志鹏¹, 周强^{1*}, 刘文献^{1*}

(1. 兰州大学草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 兰州大学农业农村部草牧业创新重点实验室, 兰州大学草地农业教育部工程研究中心, 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020; 2. 克劳沃(北京)生态科技有限公司, 北京 100020)

摘要:随着高通量测序技术的迅猛发展, 测序成本大幅降低, 测序速度和数据质量均得到了显著提升, 极大地推动了紫花苜蓿基因组的深入研究, 进而也为紫花苜蓿不同性状关联的分子标记开发提供了重要基础信息。插入/缺失(insertion/deletion, InDel)多态性标记因其分布广泛、密度高、遗传稳定以及重复性强等优点而受到关注, 然而目前其在紫花苜蓿中的研究及应用仍十分有限。本研究基于国内外80份紫花苜蓿材料的基因组重测序数据, 通过与紫花苜蓿“中苜1号”参考基因组序列比对挖掘 InDel 变异位点, 开发与高蛋白和高产性状相关的 InDel 标记。结果表明, 在全基因组范围内设计的40个标记中, 经聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)验证后, 成功开发出29个多态性标记, 多态性比率达到72.5%。其中, 已开发的 InDel₂₅和 InDel₃₉标记可分别用于高产和优质紫花苜蓿材料的鉴定。本研究开发的 InDel 标记可结合传统育种方法, 有望加速高产、优质紫花苜蓿新品种的培育。

关键词:紫花苜蓿; InDel 分子标记; 产量; 品质

Development of high-protein and high-yield associated InDel molecular markers based on re-sequencing in alfalfa

FENG Ya-qi¹, CHEN Jia-hui¹, ZHANG Jing-ni², SUI Chao¹, CHEN Ji-wei¹, LIU Zhi-peng¹, ZHOU Qiang^{1*}, LIU Wen-xian^{1*}

1. State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-Ecosystems, Key Laboratory of Grassland Livestock Industry Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Engineering Research Center of Grassland Industry, Ministry of Education, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 2. Clover (Beijing) Eco-Tech Co. Ltd, Beijing 100020, China

Abstract: With the rapid development of high-throughput sequencing technology, the sequencing cost has been greatly reduced, and the sequencing speed and data quality have been significantly improved. These developments greatly promote the in-depth study of the alfalfa (*Medicago sativa*) genome, and thus provide important basic information for the development of molecular markers for the association of different traits in alfalfa. Insertion/deletion (InDel) polymorphic markers have attracted great attention because of their wide distribution, high density, genetic stability, and high reproducibility, but research about them and their application in alfalfa are still very

收稿日期: 2024-07-02; 改回日期: 2024-08-01

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项, 国家自然科学基金项目(32441032; 32271748)和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助。

作者简介: 冯雅琪(2001-), 女, 河北沧州人, 在读硕士。E-mail: 220220902570@lzu.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhouq2013@lzu.edu.cn, liuwx@lzu.edu.cn

limited. In this study, based on genome resequencing data of 80 alfalfa germplasm lines sourced from China and abroad, we explored the InDel locus by comparing with the reference genome sequence of alfalfa “Zhongmu No. 1”, and identified InDel markers related to high-protein and high-yield traits. It was found that of 40 markers identified on a genome-wide scale, 29 polymorphic markers were successfully categorised with a polymorphism ratio of 72.5% after validation by polymerase chain reaction (PCR). Notably, markers designated InDel_25 and InDel_39 are particularly useful for the identification of high-yield and high-quality alfalfa germplasm lines, respectively. It is anticipated that the InDel markers identified in this research will be applied in traditional breeding programs, thereby accelerating the development of new alfalfa varieties with enhanced yield and quality.

Key words: alfalfa; InDel molecular markers; yield; quality

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)具有优质、高产、饲用价值高、适口性好等特点,被誉为“牧草之王”,是奶牛等家畜的优质饲草。截至2021年,我国苜蓿种植面积为42.37万hm²,苜蓿草产量达到422.4万t,整体产能得到提高(数据来源:中国畜牧业协会草业分会)。尽管如此,我国优质紫花苜蓿的自给率仅为64%^[1],每年需进口大量的苜蓿干草,进口量从2008年的2万t增至2021年的178.03万t,年均增长40%左右。优质牧草不仅是我国畜牧业发展的基石,也是国家粮食安全的保障^[2-3],因此亟须加强优质高产紫花苜蓿育种研究,为我国畜牧业可持续发展提供物质保障。

截至2023年底,我国2个国家草品种审定委员会共审定通过701个草品种,其中大多数是通过常规育种方法选育的,但该方法存在耗时长、工作量大、不良基因连锁及筛选困难等缺陷,严重限制了牧草育种进程^[4-5]。随着现代育种技术的不断发展和优化,通过突变、基因定位和挖掘、转基因和基因编辑等育种手段,可以解锁和创造有利的遗传变异,并通过分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)、从头驯化等育种新方法加快育种程序,从而缩短育种周期。分子标记辅助选择主要通过利用与目标性状紧密相关的分子标记来筛选后代植株,进而获得携带理想基因变异的育种材料^[6-7]。此外, MAS技术可通过加速亲本基因组在杂交后代中的重组和恢复,已成为大豆(*Glycine max*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)等重要经济作物育种研究的有力工具。

插入/缺失(insertion/deletion, InDel)多态性标记是一种基于基因组中短序列片段的插入或缺失变异的遗传标记,具有分布广泛、密度高、遗传稳定以及重复性强等优点^[8],有助于深入理解物种的遗传结构和进化历程。在遗传多样性分析中, InDel标记能够揭示种质资源间的细微遗传差异,为种质资源的评估和保护提供科学依据。例如, Huang等^[9]分别开发了9个与冬瓜(*Benincasa hispida*)果实形状和33个与冬瓜果皮颜色相关的InDel标记,并在120个自交系中评价了这些InDel标记的有效性和应用价值,结果发现9个与果实形状相关的InDel标记的准确率为84.16%~91.66%,33个与冬瓜果皮颜色相关的InDel标记中有27个InDel标记的准确率为100%,剩余6个InDel标记的准确率为55.83%~90.00%;潘伟芹等^[10]通过18对籼粳稻间特异性的InDel标记对8个疑似串粉杂株进行籼粳属性鉴定,发现其中13对InDel标记检验结果证明了8个串粉杂株均来源于籼粳亚种间杂交,说明这13对InDel标记可用于水稻籼粳属性鉴定。此外, InDel标记也可应用于农作物育种研究。例如,王帮太等^[11]依据玉米高秆和矮秆序列多态性开发出InDel标记InDel-220在株高差异显著的58份玉米自交系中进行验证,并通过回交转育方法,利用InDel-220标记辅助选择方法选育出矮化的郑58、昌7-2、浚9058、92-6等4类种质材料。由此可见, InDel标记在新材料选育中的应用潜力较大,利用InDel标记开展牧草育种研究具有较高的可行性,但其研究进展较为缓慢。

截至目前,已有很多关于紫花苜蓿分子标记研究的相关报道,但多集中在分子标记开发、种质资源遗传多样性分析等方面^[12-13],就分子标记类型而言,主要包括SSR、EST-SSR、ILP、SCoT标记等^[14-15]。近期, Cheng等^[16]通过比较苜蓿HM017和R108的组装基因组序列,开发了318个InDel标记均匀分布在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)基因组的8个染色体上,这些标记的引物序列、大小差异和染色体定位等信息已共享在数据库中供科

研究人员使用(<https://medicago-mutant.dasnr.okstate.edu/>)。但是对于紫花苜蓿而言,还未见 InDel 标记的相关报道。因此,本研究基于前期已获得的 80 份紫花苜蓿重测序数据,拟开发与高蛋白和高产性状相关的 InDel 标记,以期为高蛋白、高产紫花苜蓿品种选育提供优异分子标记资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用到的 80 份紫花苜蓿重测序材料来源详见表 1。

1.2 紫花苜蓿粗蛋白含量及鲜重的测定

对 80 份不同的紫花苜蓿材料各选择 1 个单株于 2021 年进行扦插,2022 年夏季将扦插苗种植在甘肃省榆中县金家圈村,设置 3 个重复。分别于 2023 年 6、7、9 月初花期进行刈割取样。

鲜重(fresh weight, FW):在初花期对植株进行刈割,并立即进行称重,每个材料取 3 个重复进行称重,取平均值。粗蛋白(crude protein, CP):鲜草样品晾晒烘干至恒重,将晾干后的材料用小型粉碎机(BSY-200, 中国)磨成粉状,过孔径为 0.63 mm 的筛网,混合均匀,备用。使用近红外光谱仪(Unity SpectraStar 1400XTR, 美国)测定粗蛋白,每份材料取 3 个重复进行测定,取平均值。

1.3 分子标记开发过程

利用 DNBSEQ 测序平台对紫花苜蓿 80 份材料进行重测序;通过华大基因开发的 fastq 数据过滤软件 SOAPnuke (Version 1.5.6)^[17]对原始数据进行质控和过滤,采用序列比对工具 BWA (Burrows-Wheeler Aligner)^[18],将经过筛选的高质量数据与紫花苜蓿“中苜 1 号”参考基因组序列进行精确比对筛选插入/缺失多态性位点,利用 SnapGene 软件进行引物设计。

1.4 植物基因组 DNA 提取

在 2022 年第 3 茬植物幼苗时期,采取 80 份紫花苜蓿材料的叶片作为试验材料,使用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltriethylammonium bromide, CTAB)法提取 80 份材料基因组 DNA^[19-20]。使用超微量紫外可见分光光度计(NannoDrop-1000, 美国)测定所提取的 DNA 纯度和浓度,随后使用浓度为 1.2% 的琼脂糖凝胶,通过凝胶电泳分离结果,对提取的 DNA 进行质量检测。

1.5 InDel 引物的设计与合成

在 8 条染色体上随机选取 30 个 InDel 位点,计算位点之间相关性,统计各染色体上位点间相关性为 0 的个数,并对其排序(从大到小),在每条染色体上选取排名前 5 的 InDel 位点,共计 40 个,并利用 SnapGene 软件设计 InDel 标记引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物信息见表 2。

1.6 InDel 引物的 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测

利用基因扩增仪(ependorf, 德国)对 40 个 InDel 标记进行多态性筛选。PCR 扩增反应体系见表 3。PCR 扩增反应程序见表 4。

吸取上述 PCR 产物 3.5 μ L 点样于 3.5% 琼脂糖凝胶电泳道中,使用 bio-rad 伯乐电泳仪(PowerPac™ Basic, 美国),设置电压 100 V,电流 400 mA,电泳 2.0~2.5 h。上述所使用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.7 InDel 标记的多态性鉴定

从 80 份紫花苜蓿幼苗组织中提取总 DNA,采用表 2 设计的 InDel 引物进行 PCR 扩增。扩增得到的 PCR 片段通过琼脂糖凝胶电泳技术进行分离。通过比较待测样品的 PCR 扩增片段在凝胶上的条带模式和迁移距离,与已知参照材料的条带进行对照,确定待测样品在特定 InDel 位点的等位变异大小。

1.8 紫花苜蓿高产、高蛋白关联 InDel 标记鉴定

通过琼脂糖凝胶电泳分析,挑选 2 个经 PCR 验证显示多态性的 InDel 标记(InDel_25 和 InDel_39),结合 80 份紫花苜蓿材料鲜重和粗蛋白的测定结果及 InDel_25 和 InDel_39 两个位点上的基因型,对 10 个鲜重差异明显和 10 个粗蛋白含量差异明显的材料进行高产、高蛋白 InDel 标记鉴定。

表 1 供试紫花苜蓿材料来源信息

Table 1 Information on the source of the alfalfa used in this study

编号 Number	名称 Name	来源 Origins	编号 Number	名称 Name	来源 Origins
1	CF002724	中国 China	41	极光 Aurora	美国 United States
2	CF040681	中国 China	42	巨能 601 Magnum 601	美国 United States
3	CF049818	中国 China	43	巨能 201 Magnum 201	美国 United States
4	CF040656	中国 China	44	Wisfal	美国 United States
5	CF001084	中国 China	45	超音速 Supersonic	美国 United States
6	CF005567	中国 China	46	巨能 995 Magnum 995	美国 United States
7	CF021077	中国 China	47	WL366HQ	美国 United States
8	CF021276	中国 China	48	W6 39947	俄罗斯 Russia
9	P610831017	中国 China	49	CF031930	俄罗斯 Russia
10	P610821619	中国 China	50	CF050248	俄罗斯 Russia
11	保定 Baoding	中国 China	51	CF049817	俄罗斯 Russia
12	东苜 1 号 Dongmu No. 1	中国 China	52	CF031933	俄罗斯 Russia
13	龙引 BeZa87 Longyin BeZa87	中国 China	53	CF048291	俄罗斯 Russia
14	龙牧 803 Longmu 803	中国 China	54	CF050068	俄罗斯 Russia
15	龙牧 806 Longmu 806	中国 China	55	CF031928	俄罗斯 Russia
16	龙饲 1174 Longsi 1174	中国 China	56	CF020828	俄罗斯 Russia
17	新牧 4 号 Xinmu No. 4	中国 China	57	PI631714	俄罗斯 Russia
18	北林 201 Beilin 201	中国 China	58	英斯特 Instinct	加拿大 Canada
19	中兰 1 号 Zhonglan No. 1	中国 China	59	阿佩克斯 Apex	加拿大 Canada
20	天水 Tianshui	中国 China	60	挑战者 Challenger	加拿大 Canada
21	草原 1 号 Caoyuan No. 1	中国 China	61	SK3010	加拿大 Canada
22	草原 5 号 Caoyuan No. 5	中国 China	62	阿尔冈金 Algonquin	加拿大 Canada
23	中苜 1 号 Zhongmu No. 1	中国 China	63	CF039769	立陶宛 Lithuania
24	中苜 4 号 Zhongmu No. 4	中国 China	64	CF039770	立陶宛 Lithuania
25	图牧 2 号 Tumu No. 2	中国 China	65	CF039747	立陶宛 Lithuania
26	淮扬 4 号 Huaiyang No. 4	中国 China	66	CF040589	乌克兰 Ukraine
27	皇冠 Pnabulous	美国 United States	67	CF050058	乌克兰 Ukraine
28	耐盐之星 Salt-tolerant star	美国 United States	68	CF020824	乌克兰 Ukraine
29	康赛 Concept	美国 United States	69	CF020829	乌克兰 Ukraine
30	WL440HQ	美国 United States	70	CF040145	哈萨克斯坦 Kazakhstan
31	雷霆 Instict	美国 United States	71	CF049890	哈萨克斯坦 Kazakhstan
32	Sutter	美国 United States	72	先行者 Pioneer	法国 France
33	Common	美国 United States	73	三得利 Sanditi	法国 France
34	骑士 2 Knight No. 2	美国 United States	74	PLATO ZS	波兰 Poland
35	骑士 T Knight T	美国 United States	75	CF005594	波兰 Poland
36	前景 Vision	美国 United States	76	CF005602	匈牙利 Hungary
37	赛特 Sitel	美国 United States	77	PI632020	叙利亚 Syrian
38	WL323	美国 United States	78	CF000631	澳大利亚 Australia
39	先驱者 Forerunner	美国 United States	79	PI631977	吉尔吉斯共和国 Kirghiz Republic
40	Bara 310SC	美国 United States	80	PI634028	瑞典 Sweden

表 2 分布于 8 条染色体上的 40 对 InDel 引物信息

Table 2 Information of 40 pairs of InDel primers distributed on 8 chromosomes

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')
InDel_1	F:ATAACTTGTAATACAAGACAATAATC R:GTTATGGTTTTGTTAAGGAGTTAGTTA	InDel_21	F:GCTTCGCTACATTGAAGGTTAT R:GTAAGTGCTGACGGGCA
InDel_2	F:GCAACATGTATGCATGGTATAGCA R:TGCCAACCAATCATGCATTTCCA	InDel_22	F:TTAGAAAAATGATGAAAATTTGATATTTTG R:TATTTTTCTAATATACAAAGATAAATAATA
InDel_3	F:CTAATATTTTGTGTTTTAGACTAGGC R:ATTTGGTGTATACGACGG	InDel_23	F:GGGTGTTGAATTGCTATGTTGA R:GAATTCATTCAACCTCTCTTTCATCC
InDel_4	F:AGCTGGATACAAGGCATCTG R:AGTTTTAGTGACACACCTGAATATTG	InDel_24	F:CGGCAATAAGAAAAACCTTTGC R:CTGACAAATACCAGAGATGGACTG
InDel_5	F:CCTTTGCCTCTAGTAATTTGACTACT R:AGAATCTTAGGTGGTTTGGACATGTA	InDel_25	F:GCGGCAAATTAGTGAAGGTAAAT R:CAGAAAAGTTTGCAGGAAAAGATACT
InDel_6	F:CTTGGGTGCACTTGGGG R:GCACAAAAGAAATTGCAAACTCGC	InDel_26	F:GAAGAGTTGTAGGTGGAATGATAAAC R:CTGAAGTAGAGAACTCAAATACATAAAAGC
InDel_7	F:CGCGCTATAGCCACTATTTGAC R:GAAATTCACGGTCTTCTGTGG	InDel_27	F:GGAATACTAAAGAAAGTGACAAAGAGG R:CCAATGAAAACCATTGGCTCTAG
InDel_8	F:CGGGTGAATGAAATGGAGGAG R:ATGTGACATTTTACTGCCCAAC	InDel_28	F:CAGGCAACTCGTCATTTATGAC R:GAGCTGCTGGCCCAT
InDel_9	F:CACATTGCAATCAACTATTTACAG R:ATTTTTTAAGTATCAATTTTTATG	InDel_29	F:GATGGTTCAACCGATTTAAATTAAGA R:TTTGATTTTAAGTCGGCCCCC
InDel_10	F:CTTGGATGAATTGAAAATGCTTACTC R:ATATATAAAATGTATAATAAACATA	InDel_30	F:GAAGTTCCTGCATCAAGAATAGC R:CTTCTGAAGTCACCAAATTTTGTACTTC
InDel_11	F:GATGGAGTAGAATGACGGCG R:TCAATCGCACTTGCTTCCG	InDel_31	F:GAGTCAGAACTACATTTTTATCGTTAAAG R:CATAATTGATGACACTGTCATTTTATAAAG
InDel_12	F:CAATCGATTGGTATTTATAAAATTTAGTTT R:GTTATTGATAATATTTATTCATTTATTTTT	InDel_32	F:GGAGAAGAAAACACAAGTCATCC R:GTACTTACAATCTATCAAAGCATATTGAAC
InDel_13	F:CATTTGTTGCTATATCATGAACTCCA R:ACAGAACATGCTATAACACTAATACTAAAG	InDel_33	F:ATACTCGTTCTTGCCACAA R:AATATGTCCTTACATACTACAAAAGGG
InDel_14	F:TTAACCGGTGCTCTGGG R:TATAATATAGCATCCACT	InDel_34	F:ACCAACCCAACCACACAAA R:TTGTGTTTCCCTTTTTTTCAGATCTG
InDel_15	F:CGTTTTCTTATCACATGTTAAGTTTACT R:TTTATAACAGAAATTACATTTCCCAAATAG	InDel_35	F:ATCCCCTTACAATACCTTTCAAATCA R:GGAACCCATTTGATACTTATGTATCTTAT
InDel_16	F:TGATGTGTAAGATCAATATTTAACTCTGG R:TTGTTTCCCTTAACTAATGCCCAAAC	InDel_36	F:CAATCGTGGTTTGGTAACAAGAC R:CGTGGAGTTTGTGAAGTCTTT
InDel_17	F:TCCCCTACAATAGTCGCATC R:GCTCCTTTTTGTGTTAGACTCTC	InDel_37	F:CATGAACCTGGAGAAAATTGAAAACA R:CTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
InDel_18	F:CCAAAAATTAACATTTCCCATCTCAAAAC R:CTTTTTTGCAGGCAGTCAAAAAAG	InDel_38	F:GACTCACGTGACTAAAAAATAAATATTAG R:AAGATAAAGTCCTTAGTTTT
InDel_19	F:AAGGGAAAAACATTGGGATTTGAG R:CTAACAGATACAATTACCTCTAAATTTGT	InDel_39	F:CTCATAATTACTAATTAACCTCCATTAACC R:AATGAATATGGCTTTATTATTTGTGGAAAT
InDel_20	F:GAGATCTAATAAGCTAAAACAAATATAAGT R:TTAGACACACACTTAATCAATTAAC	InDel_40	F:AACAACACCGATGCTCTTCA R:ATCTTCTATAACTCGTCTCCCTTAATT

1.9 数据处理

利用R语言进行分析和作图。利用Excel计算部分紫花苜蓿材料鲜重及粗蛋白含量的平均值。

2 结果与分析

2.1 重测序材料多态性 InDel 标记分析

根据上述 1.3 获得的重测序结果可知,在对 80 个紫花苜蓿材料进行全基因组重测序的研究中,共获得了 817120364 个碱基对(bp)的基因组数据,其中 816867764 bp 为有效基因组大小(不包含 N 的参考序列)。样本的比率为 97.09%~98.23%,平均测序深度为 21.1587X~27.9813X。采用同源序列比较分析共检测到 12075438 个变异位点,这些位点分布在 8 条染色体上。第 1 条染色体至第 8 条染色体上的 InDel 位点分别有 1308888, 1112705, 1343355, 1222998, 1363694, 1366934, 1253732, 1190713 个(图 1A)。在 80 个样本材料中, InDel 位点的单倍型有 6 种:单一变异的 InDel 位点有 9013580 个, 749038 个双变异, 204363 个三变异, 89400 个四变异, 46735 个五变异, 59903 个六变异(图 1B)。所有 InDel 位点中,插入型(insertion)位点为 6419894 个,缺失型(deletion)位点为 5655544 个(图 1C)。在插入型位点中,插入的碱基数量从 1 到 46 个不等(图 2A),其中插入单个碱基的位点最多,有 3444792 个,占总数的 53.7%;插入两个碱基的位点有 1100339 个,占 17.1%;插入 3 个碱基的位点有 527202 个,占 8.2%;插入碱基数量超过 15 个的位点有 167078 个,占 2.6%。在缺失型位点中,缺失的碱基数量最多可达 70 个(图 2B),其中缺失单个碱基的位点有 2518049 个,占总数的 44.5%;缺失两个碱基的位点有 874563 个,占 15.5%;缺失 3 个碱基的位点有 451395 个,占 8.0%;缺失碱基数量超过 15 个的位点有 401304 个,占 7.1%。

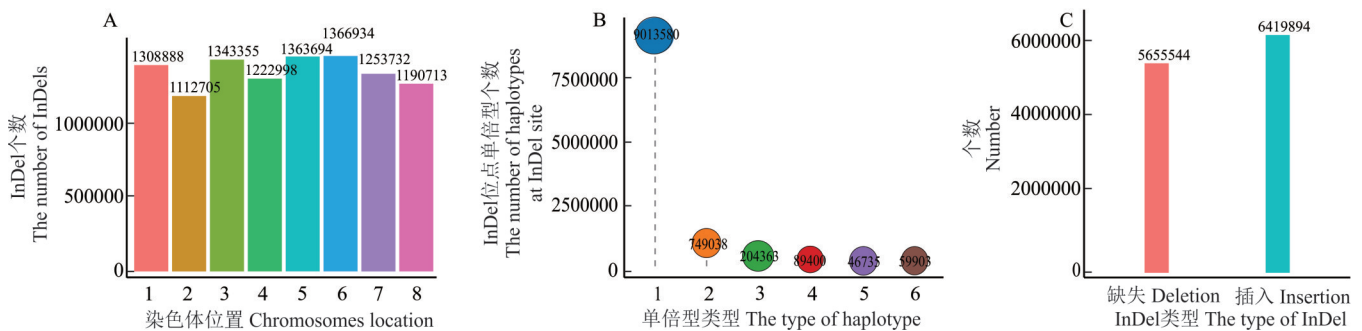


图 1 InDel 全基因组分析

Fig. 1 Analysis of the InDels at the whole genome level

2.2 InDel 分子标记在各染色体上的相关性分析

利用R语言中的ggcorrplot和ggplot 2包对 8 条染色体上各 30 个 InDel 标记进行了相关性分析。结果表明,每条染色体上的标记之间既存在正相关也存在负相关关系,且每条染色体上均有相关性为 0 的位点(图 3 和图 4)。例如,1 号染色体上,标记 Chr1_32537954 与 Chr1_34240026 的相关系数为 0.4,表现为正相关;而标记 Chr1_1580549 与 Chr1_44791369 的相关系数为 -0.2,表现为负相关(图 3A)。在 2 号染色体上,Chr2_63603094 与

表 3 PCR 扩增反应体系

Table 3 PCR amplification reaction system

组分 Components	加入试剂量 Reagent volume (μ L)
2X SanTaq PCR Mix	5.0
正向引物 Forward primer	0.5
反向引物 Reverse primer	0.5
基因组 DNA Genome DNA	1.0
ddH ₂ O	3.0

表 4 PCR 扩增反应程序

Table 4 PCR amplification reaction program

温度 Temperature ($^{\circ}$ C)	时间 Time	循环次数 Cycle times
94	4 min	0
94	30 s	0
50~56	30 s	40
72	6 s	40
72	10 min	0

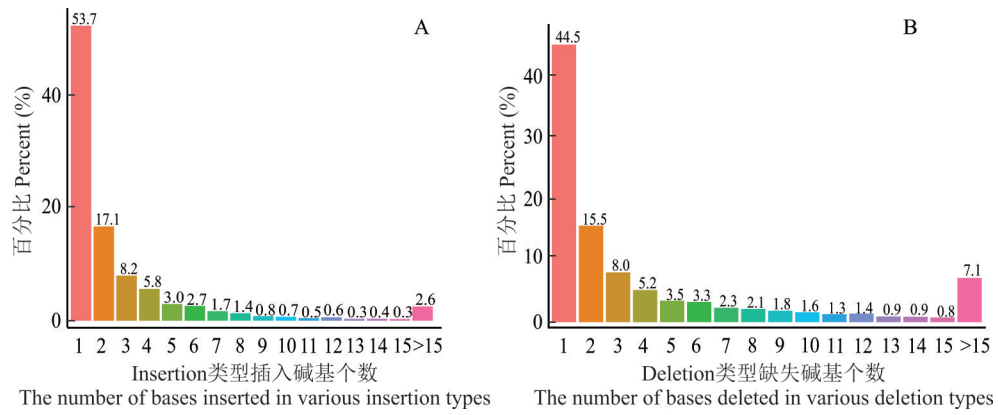


图 2 Insertion 和 Deletion 类型碱基变化个数
Fig. 2 Number of base variations of the insertion and deletion types

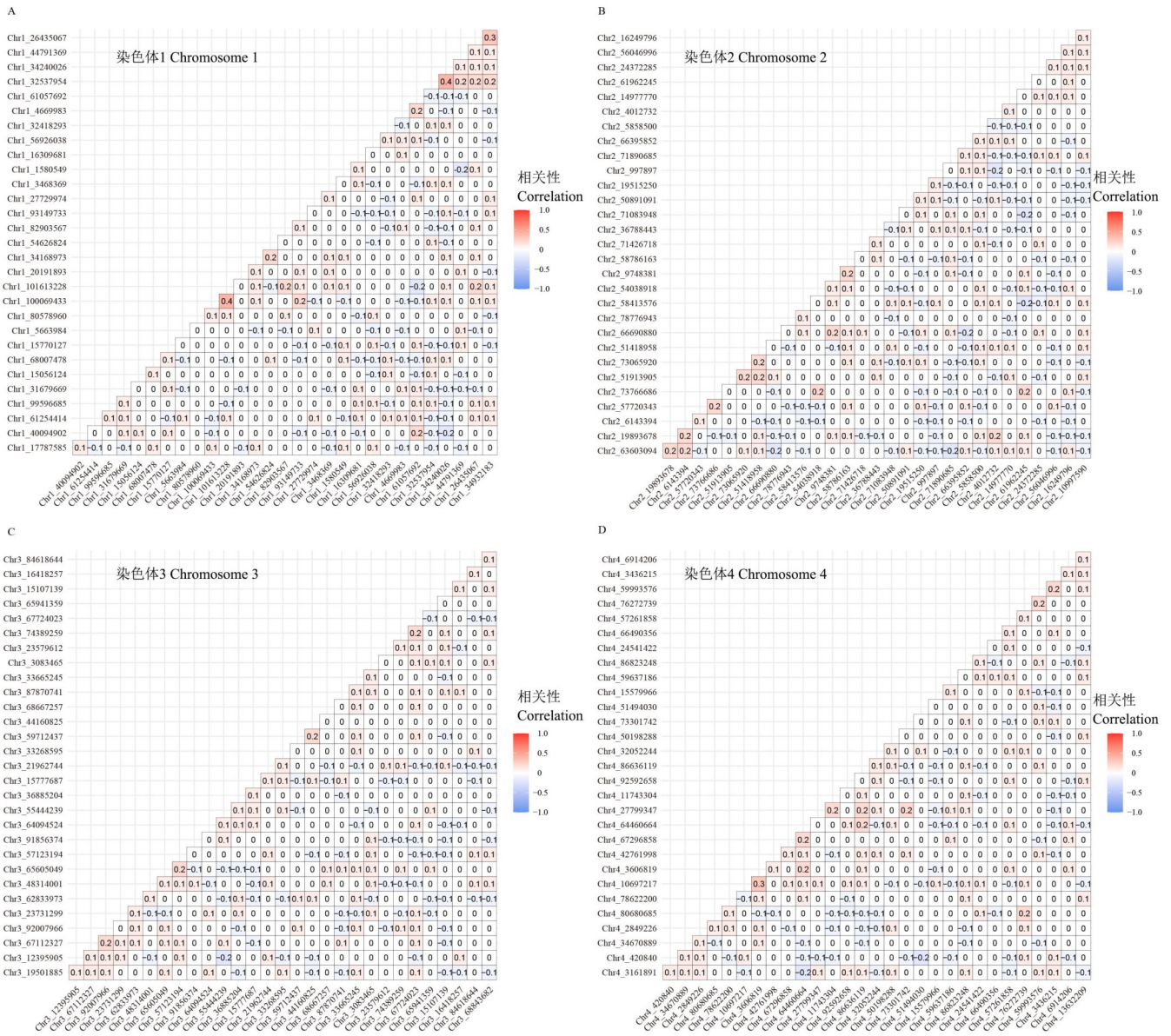


图 3 第 1-4 号染色体上 InDel 标记间的相关性
Fig. 3 The correlation among InDel markers on chromosomes 1-4
Chr: 染色体 Chromosome; 下同 The same below.

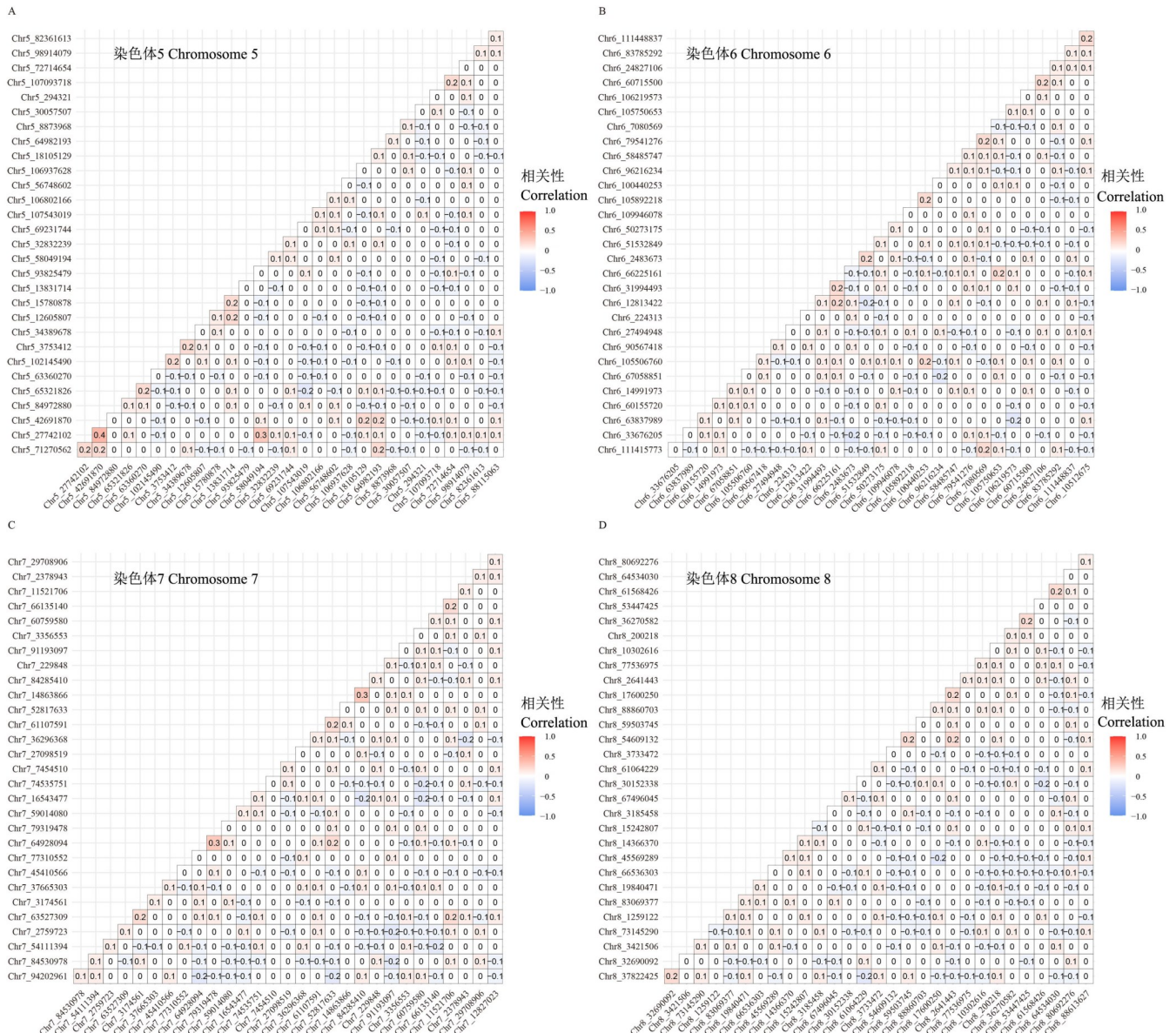


图4 第5~8号染色体上 InDel 标记间的相关性
 Fig. 4 The correlation among InDel markers on chromosomes 5–8

Chr2_6143394 的相关系数为 0.2, 显示正相关; 而 Chr2_63603094 与 Chr2_66690880 的相关系数为 -0.2, 显示负相关(图 3B)。第 3、4、6、8 号染色体上的标记间相关系数为 -0.2~0.2(图 3C, D 和图 4B, D)。

统计数据显示, 1 号染色体上共有 498 个与其他位点相关性为 0 的位点, 其中 Chr1_54626824 和 Chr1_80578960 位点上相关性为 0 的个数较多, 均为 23 个(图 3A)。在 2 号染色体上, 共计有 450 个相关性为 0 的位点, 其中 Chr2_78776943 和 Chr2_71426718 位点上相关性为 0 的个数较多, 均为 23 个(图 3B)。在第 3 号染色体上, 共有 513 个相关性为 0 的位点, 其中 Chr3_44160825 和 Chr3_68667257 两个位点上相关性为 0 的个数较多, 均为 23 个(图 3C)。在第 4 号染色体上, 共有 532 个相关性为 0 的位点, 其中 Chr4_51494030 和 Chr4_66490356 两个位点上相关性为 0 的个数均为 24 个, 为 4 号染色体上相关性为 0 数目较多的两个位点(图 3D)。在第 5 号染色体上, 共有 518 个相关性为 0 的位点, Chr5_93825479 位点上相关性为 0 的个数最多, 有 23 个(图 4A)。第 6 号染色体上, 共有 474 个相关性为 0 的位点, 其中 Chr6_224313 和 Chr6_109946078 两个位点与其他位点间相关性为 0 的个数均有 23 个(图 4B)。第 7 号染色体上, 共有 480 个相关性为 0 的位点, 其中 Chr7_77310552 和 Chr7_7454510 两个位点上

相关性为0的个数较多,均为23个(图4C)。第8号染色体上,共有478个相关性为0的位点,Chr8_53447425位点上相关性为0的个数有23个(图4D)。为了在后续筛选InDel引物时提高多态性,本研究选择了各染色体上相关性为0较多的5个位点来设计引物,并进行多样性分析。

2.3 紫花苜蓿 InDel 分子标记遗传连锁图谱构建

InDel 分子标记,作为遗传分析中不可或缺的工具,已被广泛地应用于构建作物的遗传连锁图谱。本研究针对紫花苜蓿的8条染色体,对随机选择的240个InDel位点进行了物理图谱的绘制(图5)。第1、2、4、5号染色体的末端区域InDel标记较为集中,而第3、7号染色体的下游区域则有较多的InDel标记分布。第6号染色体的InDel标记分布较为均匀,而第8号染色体的InDel标记则主要聚集在其中部及上游区域。结果表明,这些染色体特定区域具有较高的序列多样性和遗传多态性。

2.4 重测序材料多态性 InDel 标记筛选

在80份紫花苜蓿材料中,随机选择2份材料CF002724及新牧4号,通过琼脂糖凝胶电泳分析,对40对InDel引物的PCR扩增产品进行了检测。如图6所示,这些标记在CF002724与新牧4号两个材料间展现了清晰的分离条带。然而,在第9、10、14、28、37、38、40对InDel引物的PCR扩增中,扩增产物分子量大小不正确;在第5、6、8、26对InDel引物的PCR扩增中,产生了非特异性条带。最终,经去除扩增产物分子量大小不正确的7对引物及产生非特异性条带的4对引物,本研究共筛选出29对引物,其扩增效果良好且多态性比率达到72.5%。这些标记可用于后续分子标记鉴定试验。

2.5 InDel 分子标记在紫花苜蓿产量性状鉴定中的应用

为了验证上述引物在鉴定紫花苜蓿产量性状的可靠性,选取了一个经PCR验证显示多态性的InDel标记(InDel_25),并根据80份材料在该位点上对应的基因型情况,挑选10个鲜重差异明显的材料进行评价(表5)。基于PCR扩增结果(图7A)和基因型分析(图7B),使用InDel_25引物时,材料1~5呈基因型0/1,而材料6~10呈基因型0/0(表5)。基因型为0/1的材料平均鲜重为0.34 kg·株⁻¹,而基因型为0/0的材料平均鲜重为1.31 kg·株⁻¹(表5),显示基因型0/1的材料鲜重显著低于基因型0/0的材料(图7B)。这些结果表明,本研究开发的InDel分子标记能够有效地用于快速、准确地鉴定高产紫花苜蓿品种。

2.6 InDel 分子标记在紫花苜蓿粗蛋白含量鉴定中的应用

为了验证上述引物在鉴定紫花苜蓿蛋白含量性状中的可靠性,本研究根据InDel标记筛选结果及80份材料在各位点上基因型的表现情况,挑选了一个经过PCR验证显示多态性的InDel标记(InDel_39),随后对10个粗蛋

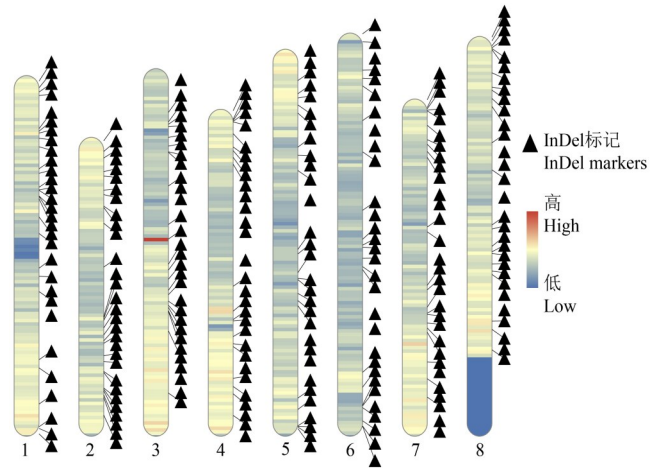


图5 基于开发的240个InDel分子标记所构建的紫花苜蓿物理图谱

Fig. 5 Physical mapping of alfalfa based on the development of 240 InDel molecular markers

1~8: 染色体1~染色体8 Chromosome 1—chromosome 8.

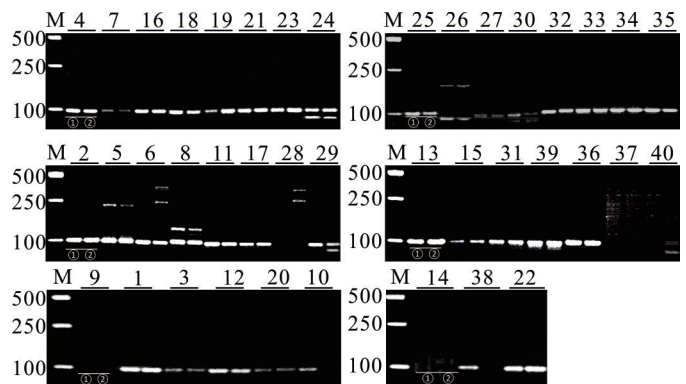


图6 紫花苜蓿40个InDel标记PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 6 Results of agarose-gel electrophoresis detection of 40 InDel-labeled PCR products of alfalfa

M: DNA marker (D2000); ①: 紫花苜蓿CF002724 Alfalfa CF002724; ②: 紫花苜蓿新牧4号 Alfalfa Xinmu No.4; 1~40: InDel_1~InDel_40标记的PCR产物 InDel_1~InDel_40 labelled PCR products; 下同 The same below.

白含量各异的材料进行评估(表6)。PCR扩增结果(图8A)和基因型分析结果(图8B)显示,利用InDel₃₉标记进行鉴定时,材料1~6为基因型0/0,材料7~10为基因型0/1(表6)。基因型0/0的材料平均粗蛋白含量为23.51%,基因型0/1平均粗蛋白含量为21.84%(表6),说明基因型0/0的材料粗蛋白含量显著高于基因型0/1的材料(图8B)。这些试验结果证实,本研究开发的InDel分子标记能够快速、准确、经济地用于高蛋白紫花苜蓿品种的鉴定。

3 讨论

由于InDel标记主要是基于来自不同个体的基因组同源序列发生核苷酸片段的插入/缺失而开发的,因此同源序列的获得是InDel标记开发的前提^[21]。随

表5 10份紫花苜蓿材料在InDel₂₅位点上的基因型及鲜重
Table 5 Genotypes and fresh weight of 10 alfalfa materials at the InDel₂₅ locus

编号 Number	名称 Name	基因型 Genotype	鲜重 Fresh weight (kg·plant ⁻¹)
1	CF020828	0/1	0.19
2	中苜4号 Zhongmu No. 4	0/1	0.25
3	耐盐之星 Salt-tolerant star	0/1	0.38
4	CF039770	0/1	0.44
5	巨能201 Magnum 201	0/1	0.44
6	CF048291	0/0	1.22
7	淮扬4号 Huaiyang No. 4	0/0	1.23
8	PLATO ZS	0/0	1.24
9	CF039769	0/0	1.44
10	皇冠 Pnabulous	0/0	1.40

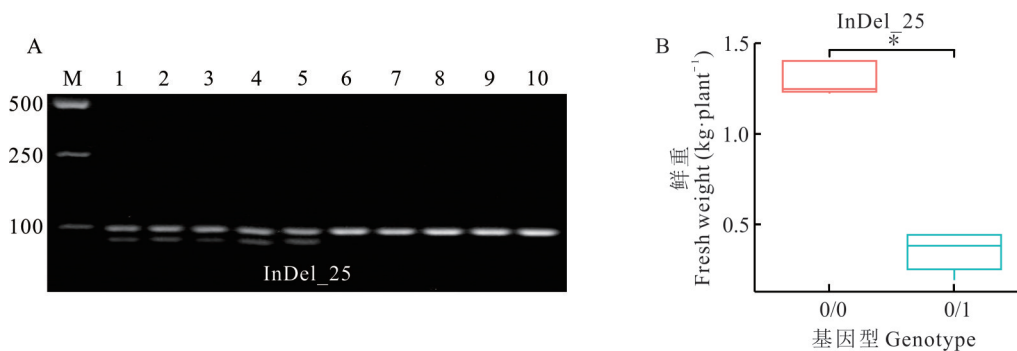


图7 利用InDel标记进行紫花苜蓿高产材料鉴定的电泳图谱和箱线图

Fig. 7 Electrophoretic profiles and box plots for the identification of high-yield varieties of alfalfa using InDel markers

*: $P < 0.05$.

着高通量测序技术的不断发展,转录组和全基因组重测序数据常被用来开发分子标记,如SSR、EST-SSR、SNP、InDel标记等^[22-24]。与转录组数据相比,全基因组重测序数据涵盖了基因CDS、内含子、启动子区域,以及基因间隔区等,用全基因组重测序数据开发的分子标记将包含更多的遗传多样性信息。本研究利用80个紫花苜蓿材料的全基因组重测序数据,共检测到12075438个InDel位点(图1A),其远大于在秋茄树(*Kandelia obovata*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)和大豆中的报道^[25-27]。为了确保后续开发的InDel标记具有较高的多态性,本研究首先在8条染色体上随机选取了240个InDel位点,并通过R语言软件分析每条染色体上30个InDel位点间的相关性(图3和图4),最终在每条染色体上选择5个相关性较小的InDel位点进行标记开发(图5),以此增加InDel标记的多样性,使其

表6 10份紫花苜蓿材料在InDel₃₉位点上的基因型及粗蛋白含量
Table 6 Genotypes and crude protein content of 10 alfalfa materials at the InDel₃₉ locus

编号 Number	名称 Name	基因型 Genotype	粗蛋白 Crude protein (%)
1	Sutter	0/0	23.65
2	天水 Tianshui	0/0	23.03
3	CF040656	0/0	23.20
4	CF020828	0/0	23.04
5	CF040145	0/0	23.84
6	P610821619	0/0	24.27
7	CF005594	0/1	21.66
8	CF049890	0/1	21.70
9	中兰1号 Zhonglan No. 1	0/1	21.89
10	赛特 Site1	0/1	22.10

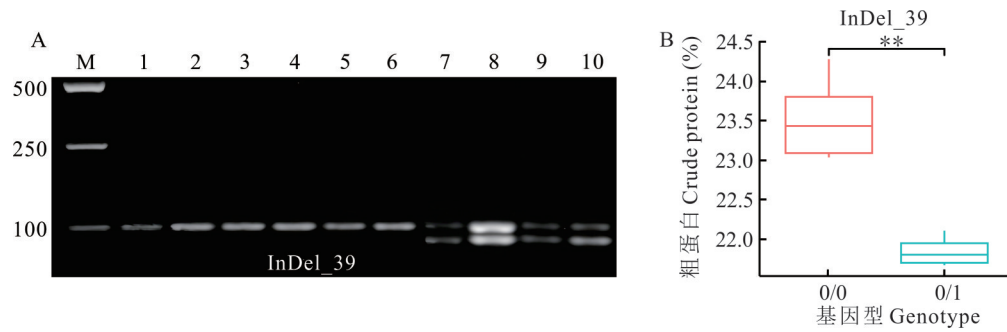


图 8 利用 InDel 标记进行紫花苜蓿高蛋白材料鉴定的电泳图谱和箱线图

Fig. 8 Electrophoretic profiles and box plots for the identification of high-protein varieties of alfalfa using InDel markers

** : $P < 0.01$.

涵盖尽可能多的遗传信息,拓宽其应用范围。

分子标记常被用于种质资源的遗传多样性分析、品种真实性鉴定,以及分子标记辅助育种研究等方面^[28]。在传统育种研究中,种质资源的产量或品质性状评价及新材料选育工作一般会在温室或田间开展,部分研究工作可能还需要多年多点评价,工作量大、耗时长,严重影响育种研究进展。随着当代分子生物学技术的发展,分子标记辅助选择已经崛起为农作物育种领域的重要手段。该方法可通过整合分子遗传标记进而加速育种进程,提高育种过程选择的准确性和效率。例如,杨瑰丽等^[29]以‘恒丰 B’、‘广 8B’为轮回亲本,结合分子标记辅助选择的定向改良缩短了优质抗性保持系的育种进程,在较短时间内获得了在稻米品质、抗病性、香味性状上均改良的新保持系,实现了‘恒丰 B’、‘广 8B’在香味性状和稻瘟病抗性方面的定向改良。在本研究开发的 29 个紫花苜蓿 InDel 标记中, InDel_25 标记可精准鉴定出高产紫花苜蓿材料, InDel_39 标记可精准鉴定出粗蛋白含量较高的紫花苜蓿材料(图 7 和图 8),这些 InDel 标记将在紫花苜蓿分子标记辅助育种研究中具有较大的应用潜力。受限于紫花苜蓿样本遗传背景的局限性,上述 InDel 标记可能只在本研究重测序的 80 个紫花苜蓿材料中具有较高精确性,然而在其他紫花苜蓿材料中的应用潜力还需进一步研究。另外,环境也是影响上述 InDel 标记应用的主要因素,虽然本研究开发的 InDel 标记已充分考虑了环境对于 InDel 标记的影响(同一年份多次表型测定),但由于不同环境(年份或地点)与 InDel 标记间相互作用的程度往往不可知,因此在应用中需慎重考虑环境与 InDel 标记间的互作^[28]。

4 结论

本研究基于 80 份紫花苜蓿基因组重测序数据,在全基因组范围内成功开发了 40 个 InDel 标记中的 29 个多态性标记,多态性比率达到 72.5%。其中, InDel_25 和 InDel_39 标记可分别用于高产和高蛋白紫花苜蓿材料的鉴定。因此,上述开发的 InDel 标记可结合传统育种方法,加速高产、优质紫花苜蓿新品种的培育。

参考文献 References:

- [1] Jin J B, Wang T, Cheng Y F, *et al.* Current situation and prospect of forage breeding in China. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2021, 36(6): 660–665.
金京波, 王台, 程佑发, 等. 我国牧草育种现状与展望. *中国科学院院刊*, 2021, 36(6): 660–665.
- [2] Nan Z B, Wang Y R, He J S, *et al.* Achievements, challenges and prospects of herbage seeds industry in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(6): 1–10.
南志标, 王彦荣, 贺金生, 等. 我国草种业的成就、挑战与展望. *草业学报*, 2022, 31(6): 1–10.
- [3] Jing H C, Wang T, Lin R C, *et al.* Strengthen the research of forage basic biology to ensure forage seed industry and national food security. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(6): 719–724.
景海春, 王台, 林荣呈, 等. 加强饲草基础生物学研究, 保障饲草种业与国家大粮食安全. *植物学报*, 2022, 57(6): 719–724.

- [4] Liu Z P, Zhou Q, Liu W X, *et al.* Some scientific issues of forage breeding in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(12): 184–193.
刘志鹏, 周强, 刘文献, 等. 中国牧草育种中的若干科学问题. *草业学报*, 2021, 30(12): 184–193.
- [5] Liu Z P, Liu W X, Yang Q C, *et al.* Progress and existing problems of forage breeding in China. *Bulletin of National Natural Science Foundation of China*, 2023, 37(4): 528–536.
刘志鹏, 刘文献, 杨青川, 等. 我国牧草育种进展及存在问题. *中国科学基金*, 2023, 37(4): 528–536.
- [6] Hasan N, Choudhary S, Naaz N, *et al.* Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2021, 19(1): 128–154.
- [7] Gupta P K, Kumar J, Mir R R, *et al.* Marker-assisted selection as a component of conventional plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 2010, 33(2): 145–217.
- [8] Du X F, Qian P L, Tang C C, *et al.* QTL mapping for plant height in foxtail millet based on InDel markers. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38(2): 217–225.
杜晓芬, 钱枰励, 唐楚楚, 等. 基于InDel标记的谷子株高QTL定位. *核农学报*, 2024, 38(2): 217–225.
- [9] Huang X, Wu W, Su L, *et al.* Development and application of InDel markers linked to fruit-shape and peel-colour genes in wax gourd. *Genes*, 2022, 13(9): 1567–1580.
- [10] Pan W Q, Ma H, Xu X, *et al.* *Indica-japonica* untypical plants among hybrid *Indica* rice: identification by InDel markers. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(33): 107–113.
潘伟芹, 马卉, 许学, 等. 利用InDel分子标记鉴定杂交籼稻中籼粳杂交株. *中国农学通报*, 2023, 39(33): 107–113.
- [11] Wang B T, Wang J, Wang Z H, *et al.* Development of dwarf functional marker InDel-220 and its breeding potential in maize. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(1): 1–9.
王帮太, 王静, 王志红, 等. 玉米矮秆功能标记InDel-220开发及育种潜势评价. *分子植物育种*, 2024, 22(1): 1–9.
- [12] Zhou Q, Chen T, Wang Y, *et al.* The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 57(4): 227–230.
- [13] Liu Z P, Chen T L, Ma L C, *et al.* Global transcriptome sequencing using the Illumina platform and the development of EST-SSR markers in autotetraploid alfalfa. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83549.
- [14] Min X, Zhang Z, Liu Y, *et al.* Genome-wide development of microRNA-based SSR markers in *Medicago truncatula* with their transferability analysis and utilization in related legume species. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(11): 2440–2452.
- [15] Zhang Z, Min X, Wang Z, *et al.* Genome-wide development and utilization of novel intron-length polymorphic (ILP) markers in *Medicago sativa*. *Molecular Breeding*, 2017, 37(7): 87–95.
- [16] Cheng X, Xie H, Zhang K, *et al.* *Medicago truncatula* forward genetics: identification of genetic crossing partner for R108 and development of mapping resources for *Tnt1* mutants. *The Plant Journal*, 2022, 111(2): 608–616.
- [17] Chen Y X, Chen Y S, Shi C M, *et al.* SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, 2018, 7(1): 1–6.
- [18] Li H, Durin R. Fast and accurate short-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754–1760.
- [19] Liao J J. Rapid extraction of plant DNA by CTAB method. *Tianjin Agricultural Sciences*, 1993, 3(1): 26.
廖俊杰. 采用CTAB法快速提取植物DNA. *天津农业科学*, 1993, 3(1): 26.
- [20] Jiang Y Q, Chen J N, Zhang S J, *et al.* Comparison of DNA extraction from different parts of two *Hemerocallis* species and optimization of the extraction method. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(168): 1–8.
蒋懿清, 陈佳妮, 张世杰, 等. 两种萱草属植物不同部位DNA提取的比较及提取方法的优化. *分子植物育种*, 2023, 21(168): 1–8.
- [21] Yue X P. Development of InDel markers based on whole genome resequencing in *Brasica napus*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
岳晓鹏. 基于甘蓝型油菜基因组重测序开发InDel标记. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [22] Shi R X, Zeng Q, Zhao D. SSR, SNP and InDel characterization of *Phoebe zhennan* based on the transcriptome sequence. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2023, 42(4): 83–87.
时如霞, 曾琴, 赵丹. 基于楠木转录组的SSR、SNP、InDel分子标记技术特征分析. *山地农业生物学报*, 2023, 42(4): 83–87.

- [23] Li J Q, Wang L H, Zhan Q W, *et al.* Transcriptome characterization and functional marker development in *Sorghum sudanense*. PLoS One, 2016, 11(5): e0154947.
- [24] Cui J J, Peng J Z, Cheng J W, *et al.* Development and validation of genome-wide InDel markers with high levels of polymorphism in bitter melon (*Momordica charantia*). BMC Genomics, 2021, 22(1): 1–9.
- [25] Jiang H, Pan G, Liu T M, *et al.* Development and application of novel InDel markers in flax (*Linum usitatissimum* L.) through whole-genome resequencing. Genetic Resources and Crop Evolution, 2022, 69(4): 1471–1483.
- [26] Liu X, Liu Y, Yang S, *et al.* Development and characterization of 29 InDel markers from the Mangrove *Kandelia obovata* genome using a resequencing dataset. Conservation Genetics Resources, 2022, 14(3): 263–266.
- [27] Song X F, Wei H C, Cheng W, *et al.* Development of INDEL markers for genetic mapping based on whole genome resequencing in soybean. G3 Genes|Genomes|Genetics, 2015, 5(12): 2793–2799.
- [28] Guo Y, Hua Q C, Hu M X, *et al.* Application and prospect of marker-assisted selection in crop breeding. Journal of Cold-Arid Agricultural Sciences, 2023, 2(9): 785–790.
郭莹, 化青春, 虎梦霞, 等. 分子标记辅助选择在作物育种中的应用及展望. 寒旱农业科学, 2023, 2(9): 785–790.
- [29] Yang G L, Zhang R X, Wang H, *et al.* Improving rice blast resistance and fragrance of rice maintainer through marker-assisted selection. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(3): 9–17.
杨瑰丽, 张瑞祥, 王慧, 等. 利用分子标记辅助选择改良水稻保持系香味和稻瘟病抗性. 华南农业大学学报, 2022, 43(3): 9–17.