



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114292954 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 30

(21) 申请号 202210105137.8

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2022.01.26

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114292954 A

CN 113322345 A, 2021.08.31

CN 107254542 A, 2017.10.17

JP 2019180282 A, 2019.10.24

US 2003041356 A1, 2003.02.27

WO 2015192566 A1, 2015.12.23

(43) 申请公布日 2022.04.08

(73) 专利权人 河南农业大学

地址 450002 河南省郑州市金水区文化路
95号

焦获等. “西瓜品种‘蜜多’种子纯度SSR 标记鉴定”. 《中国瓜菜》. 2019, 第32卷(第7期), 第19-22页.

(72) 发明人 杨路明 刘东明 朱华玉 杨森
豆峻岭 孙东玲

孙东玲. “西瓜绿花基因C1GF和“星月西瓜”基因MS的定位研究”. 《中国硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》. 2023, (第2期), 第1-46页.

(74) 专利代理机构 北京华际知识产权代理有限公司 11676

专利代理师 袁瑞红

审查员 陈咪咪

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书1页 说明书7页

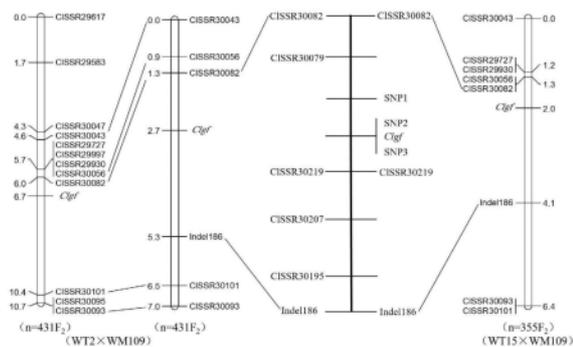
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

与西瓜绿色花瓣基因C1gf紧密连锁的分子标记及其应用

(57) 摘要

本发明公开了两对与西瓜绿花基因C1gf紧密连锁的分子标记及应用,属于生物技术领域。本发明利用亲本和F₂群体进行表型鉴定,根据BSA原理,利用SSR标记对绿花性状相关基因进行初步定位。结合亲本的重测序开发SSR、Indel标记,在父母本进行多态性筛选,用具有多态性的引物在F₂群体中进行基因型鉴定,将西瓜绿花基因C1gf定位在标记C1SSR30082和Indel186之间。本发明的分子标记可为鉴定西瓜花色提供新手段,加速西瓜育种的改良进程,提高育种的准确性和选择效率。



1. 与西瓜绿色花瓣基因*Clgf*紧密连锁的SSR分子标记引物,其特征在于,上游引物序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 与西瓜绿色花瓣基因*Clgf*紧密连锁的Indel分子标记引物,其特征在于,上游引物序列如SEQ ID NO.5所示,下游引物序列如SEQ ID NO.6所示。

3. 权利要求1或权利要求2所述的与西瓜绿色花瓣基因*Clgf*紧密连锁的分子标记引物在西瓜西瓜花瓣颜色性状分子育种中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述分子标记引物用于鉴定或辅助鉴定西瓜花瓣颜色性状。

5. 一种西瓜绿色花瓣品种的判定方法,其特征在于,所述判定方法包括如下步骤:

(1) 提取待测西瓜基因组DNA;

(2) 以步骤(1)中所提取基因组DNA为模板,利用权利要求1所述分子标记引物进行PCR扩增,对PCR扩增产物进行电泳检测和/或测序;

(3) 根据步骤(2)的电泳条带和/或测序结果进行判定,具体标准为:

如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.4所示的长度为248 bp的特征条带,则该待测品种为西瓜绿色花瓣性状的品种;如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.3所示的长度为268 bp的特征条带,则待测品种为纯合西瓜黄色花瓣性状品种;如果PCR扩增产物中既有一条如SEQ ID NO.3所示的长度为248 bp的特征条带,又有一条如SEQ ID NO.4所示的长度为268 bp的特征条带,则该待测品种为杂合西瓜黄色花瓣性状品种。

6. 一种西瓜绿色花瓣品种的判定方法,其特征在于,所述判定方法包括如下步骤:

(1) 提取待测西瓜基因组DNA;

(2) 以步骤(1)中所提取基因组DNA为模板,利用权利要求2所述分子标记引物进行PCR扩增,对PCR扩增产物进行电泳检测和/或测序;

(3) 根据步骤(2)的电泳条带和/或测序结果进行判定,具体标准为:

如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.7所示的长度为82 bp的特征条带,则该待测品种为西瓜黄色花瓣性状的品种;如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.8所示的长度为76 bp的特征条带,则待测品种为纯合西瓜绿色花瓣性状品种;如果PCR扩增产物中既有一条如SEQ ID NO.7所示的长度为82 bp的特征条带,又有一条如SEQ ID NO.8所示的长度为76 bp的特征条带,则该待测品种为杂合西瓜黄色花瓣性状品种。

7. 一种用于鉴定西瓜绿色花瓣性状的试剂盒,其特征在于,包含权利要求1或权利要求2中所述的引物对。

8. 用于检测SSR分子标记是否存在的试剂在西瓜花瓣颜色基因定位中的应用,其特征在于,所述试剂包括扩增所述SSR标记的引物对,所述引物对的上游引物序列如SEQ.ID.NO.1所示,下游引物序列如SEQ.ID.NO.2所示。

9. 用于检测Indel标记是否存在的试剂在西瓜花瓣颜色基因定位中的应用,其特征在于,所述试剂包括扩增所述Indel标记的引物对,所述引物对的上游引物序列如SEQ.ID.NO.5所示,下游引物序列如SEQ.ID.NO.6所示。

与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁的分子标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁的分子标记及其应用。

背景技术

[0002] 花色是植物遗传的重要性状,主要吸引昆虫授粉。花色可以影响蚜虫取食,生产中选育不同花色的作物品种具有降低蚜虫传病的作用,也可以维持花瓣的能量平衡,避免花器官受伤害。花色是观赏植物重要的外观性状,多样的花色不仅可以用于装饰和美化生活和工作环境,还可以丰富人们的精神生活。

[0003] 在十字花科作物中,付东辉等培育出38种颜色的油菜花色。Yang等,构建了一个来源于Y640-288(白花)和Y641-87(黄花)品系的F₂群体,将大白菜白花基因BrWF3定位在2号染色体105.6kb的区间,在第三个外显子的一个SNP缺失导致了蛋白质功能的丧失,干扰了PGs的形成,进而降低了类胡萝卜素代谢的活性和类胡萝卜素的含量。Jia等利用油菜黄花栽培种‘Zhongshuang 11’和白花自交系‘White Petal’通过转录组学和代谢组学分析了参与类胡萝卜素生物合成基因表达,发现BnNCED4b编码一种参与类胡萝卜素降解的蛋白质,在白色花瓣中有异常高的水平表达,这表明它可能在白色花瓣的形成中起着关键作用。在茄科植物中,Wang等发现茄子紫花性状由单显性基因控制,并将这个编码花青素合酶的基因SmFAS定位在8号染色体上约165.6kb的区域内,一个单碱基的突变导致FAS的过早终止,导致花瓣呈白色。

[0004] 在葫芦科作物中对花色的研究较少,西瓜花瓣通常是黄色的,但是Young-Seok Kwo等在西瓜品系Kw-695中,发现了淡绿色的花。通过研究发现Kw-695浅绿色花性状的遗传受一个隐性基因Clgf控制。Kw-695植物有大的藤蔓和大的浅绿色叶子,椭圆形的、黄绿色并带有不规则深绿色条纹的果实,黄色到橙色,不可食用的果肉,含糖量非常低,浅黄色种子。Young-Seok Kwo等对其遗传规律进行了分析,并没有进行分子水平的研究。通过前人研究我们发现,目前还没有定位到控制西瓜花瓣颜色的基因。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了两对与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁的分子标记,分别为SSR分子标记和Indel分子标记,分别采用两种标记形式对西瓜绿色花瓣基因Clgf进行定位,为西瓜花色分子标记辅助育种提供帮助。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明通过分离群体分组分析法(BSA),获得了位于第11号染色体上的具有多态性差异的12对SSR引物,通过分析,其中一个SSR分子标记与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁,扩增所述分子标记的引物对的上游引物序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 本发明还采用另外一种标记形式找到了与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁的

Indel分子标记,扩增所述分子标记的引物对的上游引物序列如SEQ ID NO.5所示,下游引物序列如SEQ ID NO.6所示。

[0009] 本发明最主要的是发明点在于采用上述与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁的分子标记在西瓜分子育种中的应用,包括用于鉴定或辅助鉴定西瓜花瓣颜色性状,判定鉴定西瓜花瓣颜色的基因型。

[0010] 其中,利用SSR分子标记对西瓜绿色花瓣品种或者基因型的判定方法,所述判定方法包括如下步骤:

[0011] (1)提取待测西瓜基因组DNA;

[0012] (2)以步骤(1)中所提取基因组DNA为模板,利用SSR分子标记的引物对(SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2)进行PCR扩增,对PCR扩增产物进行电泳检测和/或测序;

[0013] (3)根据步骤(2)的电泳条带和/或测序结果进行判定,具体标准为:

[0014] 如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.4所示的长度为248bp的特征条带,则该待测品种为西瓜绿色花瓣性状的品种(基因型Clgf/Clgf);如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.3所示的长度为268bp的特征条带,则待测品种为纯合西瓜黄色花瓣性状品种(基因型CLGF/CLGF);如果PCR扩增产物中既有一条如SEQ ID NO.3所示的长度为248bp的特征条带,又有一条如SEQ ID NO.4所示的长度为268bp的特征条带,则该待测品种为杂合西瓜黄色花瓣性状品种(基因型CLGF/Clgf)。

[0015] 利用Indel分子标记对西瓜绿色花瓣品种或基因型的判定方法,其特征在于,所述判定方法包括如下步骤:

[0016] (1)提取待测西瓜基因组DNA;

[0017] (2)以步骤(1)中所提取基因组DNA为模板,利用分子标记的引物对进行PCR扩增,对PCR扩增产物进行电泳检测和/或测序;

[0018] (3)根据步骤(2)的电泳条带和/或测序结果进行判定,具体标准为:

[0019] 如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.7所示的长度为82bp的特征条带,则该待测品种为西瓜黄色花瓣性状的品种(基因型Clgf/Clgf);如果PCR扩增产物仅有一条如SEQ ID NO.8所示的长度为76bp的特征条带,则待测品种为纯合西瓜绿色花瓣性状品种(基因型CLGF/CLGF);如果PCR扩增产物中既有一条如SEQ ID NO.7所示的长度为76bp的特征条带,又有一条如SEQ ID NO.8所示的长度为82bp的特征条带,则该待测品种为杂合西瓜黄色花瓣性状品种(基因型CLGF/Clgf)。

[0020] 另外,包含上述引物对的试剂盒,可以用来鉴定西瓜材料花瓣颜色性状,具体应用时,可以选择含有上述分子标记引物对的试剂做成试剂盒。

[0021] 用于检测SSR分子标记或Indel标记是否存在的试剂在西瓜绿花基因Clgf定位中的应用,利用本发明的分子标记,可以对西瓜绿花基因Clgf进行定位,上述这些应用均可以按照常规的方法进行。

[0022] 本发明的优点:

[0023] 本研究利用绿花材料PI482276与黄花材料WT2、WT15杂交,利用分子标记技术对西瓜绿花性状进行精细定位,找到了与绿花性状紧密连锁的SSR、Indel分子标记,该分子标记变异稳定、检测容易,可直接用于西瓜绿色花瓣材料的分子标记辅助育种。分子标记在辅助育种体系中具有简便、快速、高通量的优势,因而本发明所提供的分子标记在西瓜绿花新品

种培育中具有较好的应用价值。

附图说明

[0024] 图1为不同西瓜材质不同花瓣色泽照片,其中A为西瓜材料PI482276,B为西瓜材料WT2,C为西瓜材料WT15;

[0025] 图2为西瓜绿花基因C1gf的精细定位图;

[0026] 图3为本发明用的C1SSR30082分子标记在亲本PI482276和WT2、F₁及F₂代植株中的多态性电泳图谱;

[0027] 图4为本发明用的Indel1186分子标记在亲本PI482276和WT2、F₁及F₂代植株中的多态性电泳图谱。

具体实施方式

[0028] 下面来说下本发明的具体实施方式

[0029] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0030] 若未特别指明,实施例中所用技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。下述实施例中的试验方法,如无特别说明,均为常规方法。如无特殊说明,所采用的试剂及材料,均可以通过商业途径获得。

[0031] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0032] 生物材料

[0033] 西瓜材料PI482276,其花色呈绿色;

[0034] 西瓜材料WT2是由发明人选育的高代自交系,花色为黄色,该材料可以通过商业的途径获取或者由河南农业大学瓜类作物遗传育种课题组提供(需要解释的是,采用该材料作为研究基础,仅是实验材料获得的便捷性原因,不应理解为本申请相关技术方案的实现必须依赖于该实验材料);

[0035] 上述西瓜材料WT2,与公开号为CN110938706A的中国发明专利“与西瓜植株无卷须基因C1nt紧密连锁的分子标记及应用”中采用的正常普通有卷须西瓜材料WT2是一致的。

[0036] 西瓜材料WT15是由发明人选育的高代自交系,花色为黄色,该材料可以通过商业的途径获取或者由河南农业大学瓜类作物遗传育种课题组提供(需要解释的是,采用该材料作为研究基础,仅是实验材料获得的便捷性原因,不应理解为本申请相关技术方案的实现必须依赖于该实验材料);

[0037] 以上生物材料在申请人单位的实验室均有保存,可自申请日起二十年内向公众发放用于验证试验或者公众也可以通过购买的方式获取。

[0038] 实验过程中,亲本及构建的群体均种植于河南农业大学毛庄科教园区日光温室,种植过程为:催芽后进行穴盘育苗,采用正常的西瓜栽培管理方式,在开花当天开始对单株花瓣颜色类型进行统计。

[0039] 实验试剂和设备:

[0040] 实验过程中,PCR扩增用PCR Taq-Mix购于南京诺唯赞基因科技有限公司;其它电泳与银染相关试剂如丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、 AgNO_3 、 NaOH 和甲醛等试剂购自北京索莱宝科技有限公司;

[0041] 实验过程中的PCR扩增用引物(人工合成)及基因测序,由擎科基因组研究中心有限公司提供完成。

[0042] PCR仪为珠海黑马医学仪器有限公司Hema9600型基因扩增仪;

[0043] 电泳仪为JY300HC通用型电泳仪,由北京君意东方电泳设备有限公司生产;

[0044] 电泳槽为HT-SCZ04A高通量垂直电泳槽,由北京鸿涛基业科技发展有限责任公司生产。

[0045] 实施例1

[0046] 西瓜绿花基因位点的确定,具体步骤如下:

[0047] (1)遗传分离群体的构建

[0048] 以西瓜黄色花瓣材料WT2、WT15作为母本,以西瓜绿色花瓣材料PI482276作为父本,利用这个亲本配置了杂交组合 $\text{WT2} \times \text{PI482276}$ (QT1), $\text{WT15} \times \text{PI482276}$ (QT2)。结果表明,获得的 F_1 代植株花瓣全部表现为黄色花瓣类型。(亲本材料表型如图1所示。)

[0049] 从QT1- F_1 、QT2- F_1 代植株中选择10个单株,自交获得 F_2 代种子,用于遗传分析与基因定位。

[0050] 对 F_2 代个体的花瓣颜色表型进行鉴定,并用卡方测验进行验证。结果表明:对2021年春季种植的441株QT1- F_2 群体的花色表型调查分析显示:黄色花瓣的植株有334株,绿色花瓣的植株有107株,经过卡方检验符合3:1的分离比。对358株QT2- F_2 群体表型调查显示,黄色花瓣的植株有258株,绿色花瓣植株有100株,经过卡方分析,同样符合3:1的分离比。

[0051] 综合上述结果分析可知,西瓜绿色花瓣性状是由一个隐性单基因控制的。

[0052] (2)西瓜绿花基因的初步定位

[0053] 以亲本PI482276和WT2、WT15为模板,对本课题组已合成的SSR引物进行初步筛选,筛选出在双亲间具有多态性的引物。根据分离群体分组分析法(BSA)原理,从 F_2 群体中随机选择20株绿花植株和20株黄花植株构建混池,对初次筛选到的多态性引物进行二次筛选,共筛到12对多态性标记。根据SSR标记(本实验室之前合成)的信息,12个在双亲及混池间都具有多态性的标记均位于第11号染色体。

[0054] (4)西瓜绿花基因的精细定位

[0055] 利用Illumina Hi-seq2000高通量测序平台对三个亲本进行了 $20 \times$ 深度的高通量重测序。结合(2)中的结果,通过开发更多的SSR标记、提高 F_2 群体单株的数量,我们将西瓜绿花基因Clgf定位在11号染色体CISSR30082与CISSR30101之间。结合亲本重测序的结果,以西瓜全基因组序列在SSR标记CISSR30082与CISSR30101之间的区段作为参考序列,对这段序列进行比对,最终针对两亲本序列之间的SNPs和Indels差异,开发设计了5对SSR标记和3对Indel标记,并对3个SNP位点进行检测最终将候选基因锁定在SNP1和CISSR30219之间139.7kb的区域内(见图2)。

[0056] (4)候选区域SSR、Indel标记的开发

[0057] 本发明利用所述CISSR30082分子标记进行PCR扩增区别,引物序列设计为:

[0058] CISSR30082-F:5'-CGATTAGAGGACCTGCTTCG-3' (SEQ ID NO.1);

[0059] C1SSR30082-R:5' -TGATTTTCGCATATCAACTGC-3' (SEQ ID NO.2)。

[0060] 通过PCR扩增获得268bp的特征条带,所述268bp的特征条带的具体碱基序列如下所示:

[0061] **TGTGATTTTCGCATATCAACTGCACTACTACAAATCAATAAGTCTTCTTC
AAGAAGGTTTAAGAAAGGAAACATTAATAATAACACAACATCACAAACA
AAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAGAAAAGAAAAAAAAAGAAA
AAAAACATACAAGCACTAAAGCAACAAGAACTAAATAAAAACAAATAAAA
TATAATAATTCAGAAAAAGTTAGGAGTCCACTTAAATGCCCTCGCCTACCGT
TCGAAGCAGGTCCTCTAAT (SEQ ID NO.3);**

[0062] 通过PCR扩增获得248bp的特征条带,所述248bp的特征条带的具体碱基序列如下所示:

[0063] **TGTGATTTTCGCATATCAACTGCACTACTACAAATCAATAAGTCTTCTTC
AAGAAGGTTTAAGAAAGGAAACATTAATAATAACACAACATCACAAACA
AAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAAAAAACATACAAGCACTAAAGC
ACAAGAACTAAATAAAAACAAATAAAATATAATAATTCAGAAAAAGTTAG
GAGTCCACTTAAATGCCCTCGCCTACCGTTTCGAAGCAGGTCCTCTAAT (SEQ
ID NO.4);**

[0065] 该引物在母本(黄花)中的扩增产物大小为268bp,在父本(绿花)中的扩增产物大小为248bp,在F₂中该标记的准确率达到99.49%。

[0066] 本发明利用所述Indel186分子标记进行PCR扩增,引物序列设计为:

[0067] Indel186-F:5' -CATATCCTTGAACATTTCTG-3' (SEQ ID NO.5);

[0068] Indel186-R:5' -AGTTTCCATGCTTCTATTT-3' (SEQ ID NO.6)。

[0069] 通过PCR扩增获得82bp的特征条带,所述82bp的特征条带的具体碱基序列如下所示:

[0070] **CATATCCTTGAACATTTCTGTTTCTTTTTATTAATCCATTGAACTTCATT
CCTTTTTTGAAAATAGAAGCATGGAAA ACT (SEQ ID NO.7);**

[0071] 通过PCR扩增获得76bp的特征条带,所述76bp的特征条带的具体碱基序列如下所示:

[0072] **CATATCCTTGAACATTTCTGTTTCTTTTTCCATTGAACTTCATTCTTT
TTTGAAAATAGAAGCATGGAAA ACT (SEQ ID NO.8);**

[0073] 该引物在母本(黄花)中的扩增产物大小为82bp,在父本(绿花)中的扩增产物大小为76bp,在F₂中该标记的准确率达到97.7%。

[0074] 实施例2分子标记在育种中的应用

[0075] (1)DNA提取

[0076] 用CTAB法提取亲本、F₁及F₂分离群体的叶片总DNA:将3-5g幼嫩叶片(或冻叶)放入

真空冷冻干燥器中脱水干燥,干燥后立刻在高通量组织粉碎机上研磨成粉末状,放在2ml离心管中,加入800 μ l预热的CTAB提取缓冲液,将粉末与缓冲液充分混匀,65 $^{\circ}$ C水浴0.5-2h;加入700 μ l氯仿/异戊醇(24:1)混合液,轻轻翻转混匀用CTAB法提取亲本、F₁及F₂分离群体的叶片总DNA:取上部幼嫩叶片在液氮中快速研磨成粉末状,放于1.5ml的离心管中;加入预热的800 μ l CTAB提取缓冲液,65 $^{\circ}$ C水浴30min;加入等体积氯仿异戊醇,其中氯仿与异戊醇的体积比为24:1,混匀后12000r/min离心15min;将上清液转入新的离心管,加等体积异丙醇,轻轻混匀,冰浴1h以上;12000r/min离心15min;倒去上清液,用体积分数为75%的乙醇冲洗沉淀两次,干燥后,加入TE缓冲液200 μ l溶解后,加入10 μ g/ml的RNA酶去除RNA,37 $^{\circ}$ C水浴30min;在0.8%琼脂糖凝胶电泳,以50ng/ μ l的DNA为标准,估计所得DNA的浓度;后用TE稀释终浓度为100ng/ μ l,存于-20 $^{\circ}$ C备用;

[0077] (2) PCR扩增

[0078] 反应体系:Master Mix 5 μ L, DNA模板(30ng/ μ L) 1 μ L, F-Primer(5 μ mol/ μ L) 0.5 μ L, R-Primer(5 μ mol/ μ L) 0.5 μ L, dd H₂O₃ μ L;反应程序为:95 $^{\circ}$ C 5min(预变性);94 $^{\circ}$ C 45S(变性);6个循环68-58 $^{\circ}$ C(退火);72 $^{\circ}$ C 1min(延伸);94 $^{\circ}$ C 30S(变性);8个循环58-50 $^{\circ}$ C(退火);72 $^{\circ}$ C 1min(延伸);94 $^{\circ}$ C 30S(变性);50 $^{\circ}$ C 30S(退火);20个循环72 $^{\circ}$ C 1min(延伸);72 $^{\circ}$ C 7min(延伸);4 $^{\circ}$ C(保温)。

[0079] (3) 凝胶板准备

[0080] 玻璃板的清洗:将玻璃板清洗干净并彻底晾干后再进行组装、灌胶。

[0081] 配制工作液(两块,约80mL):29:1(Acrylamide:Bis-Acrylamide):24ml 5 \times TBE:16ml ddH₂O:40ml TEMED:60 μ l 10%AP:700 μ l将上述溶液倒入烧杯后混匀,然后立刻倒入两块玻璃板之间的空隙中,待胶液灌至底部,在灌胶口轻轻将梳子插入上下玻璃板中间,让其凝合15-30min。待胶凝结后,灌入电极缓冲液1 \times TBE于两槽中,缓慢而平衡的拔出梳子。

[0082] 点样:将PCR产物每孔加入1-2 μ l Loading dye,上样量一般为0.8-1.2 μ l,点样结束后立即连接电泳线进行电泳。

[0083] 电泳:根据PCR产物的片段大小估计电泳时间,电泳时间一般为0.5-1.5h。

[0084] 染色:配置AgNO₃染色液,称量1.2g AgNO₃加入1000ml ddH₂O中。放摇床上轻摇3-5min。

[0085] 显色:配置显色液,称量15gNaOH加入1000ml ddH₂O,再加入15ml的甲醛溶液(现用现加),染色结束后用ddH₂O清洗2次,加入显色液。摇床轻摇3-5min至DNA条带出现。

[0086] (4) 带型判读:将显影后的凝胶置于阅片台上,观察两亲本条带的位置差异,其中部分结果如图3、图4所示。

[0087] 具体地,Indel1186分子标记在育种中的应用,其应用步骤如下:

[0088] 使用Indel1186分子标记进行PCR反应以确定该分子标记在F₂群体中的基因型。检测Indel1186分子标记的两种基因型在787个F₂群体中的分布情况,如果PCR扩增产物仅有一条大小为76bp,则该待测品种为西瓜绿色花瓣性状的品种;如果PCR扩增产物仅有一条长度为82bp的特征条带,则待测品种为纯合西瓜黄色花瓣性状品种;如果PCR扩增产物中既有一条长度为76bp的特征条带,又有一条长度为82bp的特征条带,则该待测品种为杂合西瓜黄色花瓣性状品种,利用本发明的Indel1186分子标记引物(SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6)进行PCR扩增,对不同品种进行鉴定,在F₂中该标记的鉴定准确率达到97.7%。

[0089] C1SSR30082分子标记在育种中的应用,其应用步骤如下:

[0090] 使用C1SSR30082分子标记进行PCR反应以确定该分子标记在 F_2 群体中的基因型。检测C1SSR30082分子标记的两种基因型在787个 F_2 群体中的分布情况,如果PCR扩增产物仅有一条大小为248bp,则该待测品种为西瓜绿色花瓣性状的品种;如果PCR扩增产物仅有一条长度为268bp的特征条带,则待测品种为纯合西瓜黄色花瓣性状品种;如果PCR扩增产物中既有一条长度为248bp的特征条带,又有一条长度为268bp的特征条带,则该待测品种为杂合西瓜黄色花瓣性状品种,通过利用本发明的C1SSR30082分子标记引物(SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2)进行PCR扩增,对不同品种进行鉴定,在 F_2 中该标记的鉴定准确率达到99.49%。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 河南农业大学
- [0003] <120> 与西瓜绿色花瓣基因Clgf紧密连锁的分子标记及其应用
- [0004] <130> 2022
- [0005] <160> 8
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Citrullus lanatus
- [0011] <400> 1
- [0012] cgattagagg acctgcttcg 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 21
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> Citrullus lanatus
- [0017] <400> 2
- [0018] tgattttcgc atatcaactg c 21
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 268
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Citrullus lanatus
- [0023] <400> 3
- [0024] tgtgattttc gcatatcaac tgcactacta caaatcaata agtctttcttc aagaaggttt 60
- [0025] aagaaaggaa acattaaaat aatacacaac atcacaaca aaaaaaaaaa gaaaagaaa 120
- [0026] gaaaagaaga aaagaaaaaa aaagaaaaaa aacatacaag cactaaagca acaagaacta 180
- [0027] aataaaaaca aataaaatat aataattcag aaaaagttag gaggccactt aaatgccctc 240
- [0028] gcctaccggt cgaagcaggt cctctaata 268
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 248
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> Citrullus lanatus
- [0033] <400> 4
- [0034] tgtgattttc gcatatcaac tgcactacta caaatcaata agtctttcttc aagaaggttt 60
- [0035] aagaaaggaa acattaaaat aatacacaac atcacaaca aaaaaaaaaa aaagaaaaga 120
- [0036] aaagaaaaaa aacatacaag cactaaagca acaagaacta aataaaaaca aataaaatat 180
- [0037] aataattcag aaaaagttag gaggccactt aaatgccctc gcctaccggt cgaagcaggt 240
- [0038] cctctaata 248

- [0039] <210> 5
[0040] <211> 20
[0041] <212> DNA
[0042] <213> Citrullus lanatus
[0043] <400> 5
[0044] catatccttg aacatttctg 20
[0045] <210> 6
[0046] <211> 20
[0047] <212> DNA
[0048] <213> Citrullus lanatus
[0049] <400> 6
[0050] agttttccat gcttctattt 20
[0051] <210> 7
[0052] <211> 82
[0053] <212> DNA
[0054] <213> Citrullus lanatus
[0055] <400> 7
[0056] catatccttg aacatttctg tttcttttta ttaatccatt gaaacttcat tccttttttg 60
[0057] aaaaatagaa gcatggaaaa ct 82
[0058] <210> 8
[0059] <211> 76
[0060] <212> DNA
[0061] <213> Citrullus lanatus
[0062] <400> 8
[0063] catatccttg aacatttctg tttctttttc cattgaaact tcattccttt tttgaaaaat 60
[0064] agaagcatgg aaaact 76



图1

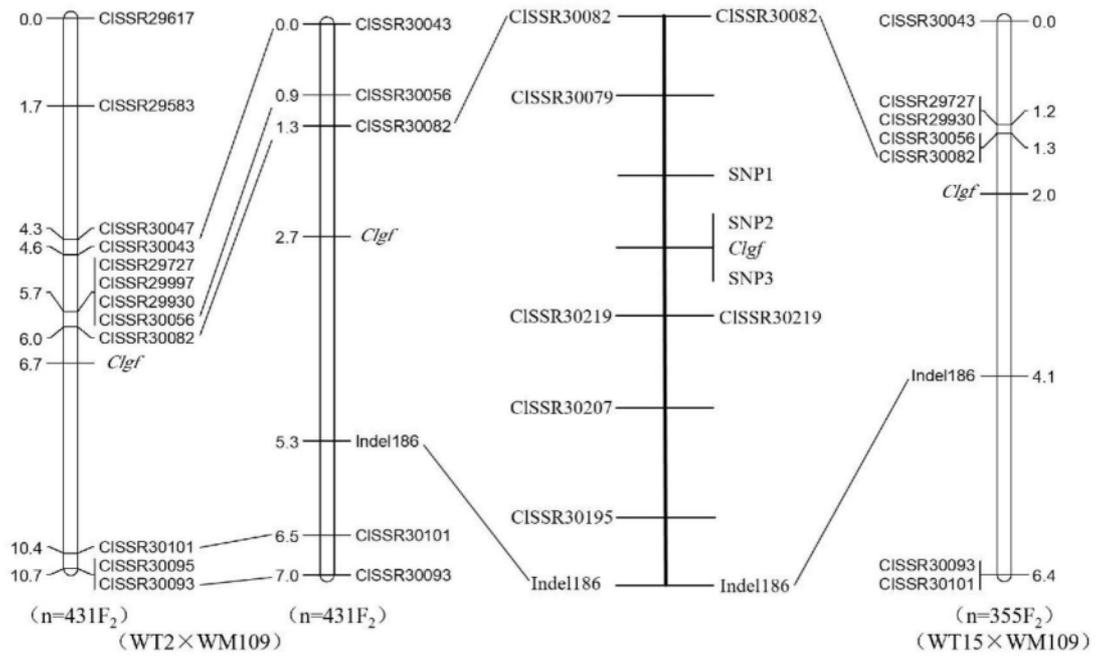


图2

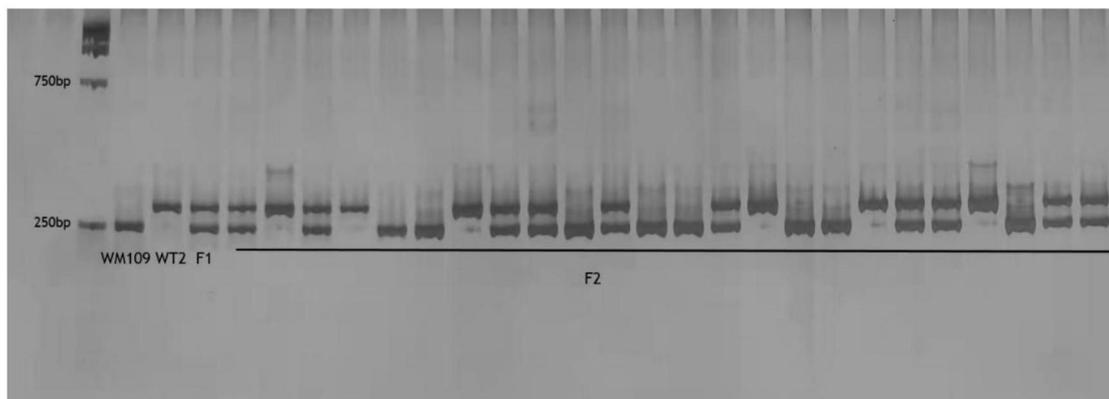


图3

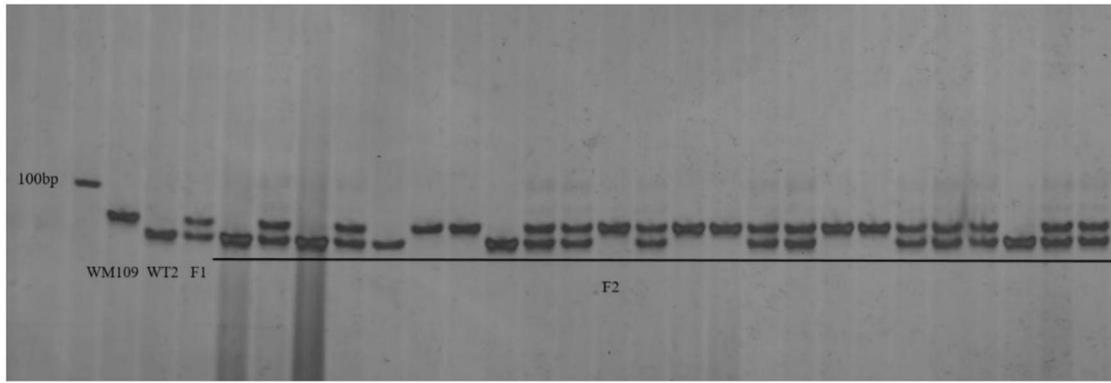


图4