(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114836560 B
(45)授权公告日 2023.09.01

(21)申请号 202210313379.6

(22)申请日 2022.03.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114836560 A

(43)申请公布日 2022.08.02

(73)专利权人 浙江省农业科学院
地址 310021 浙江省杭州市石桥路198号

(72)发明人 虞慧芳 顾宏辉 王建升 盛小光 沈钰森 赵振卿

(74)专利代理机构 成都知棋知识产权代理事务所(普通合伙) 51325
专利代理师 马超前

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6895(2018.01)
C12Q 1/6858(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)
A01H 1/04(2006.01)
A01H 1/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 108362649 A,2018.08.03
CN 114836558 A,2022.08.02
Md Abdur Rahim.Molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-related genes reveal BoTT8 associated with purple hypocotyl of broccoli (Brassica oleracea var. italica L.).Genome .2019,第62卷(第4期),第253-266页.

审查员 陈丹

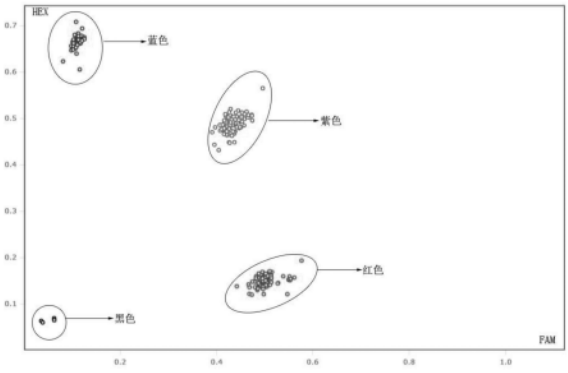
权利要求书2页 说明书5页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法

(57)摘要

本发明公开了一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法,该SNP分子标记的引物组的核苷酸序列如SEQIDNO.1、SEQIDNO.2和SEQIDNO.3所示,该SNP分子标记的位点为chr9.60229243,该位点具有G/A多态性。本发明的与西兰花下胚轴颜色连锁的SNP分子标记,能够应用于西兰花下胚轴颜色性状鉴定,检测方便,通量高。



1.一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记的引物组,其特征在于,该SNP分子标记的引物组的核苷酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示,该SNP分子标记的位点为chr9. 60229243,该位点具有G/A多态性。

2.如权利要求1所述的SNP分子标记的引物组的应用,其特征在于,该应用选自以下任意一种应用:

(1)在西兰花分子标记辅助下胚轴颜色育种方面的应用;

(2)在西兰花改良下胚轴颜色育种中的应用;

(3)在西兰花下胚轴或花蕾颜色性状鉴定中的应用;

(4)在研究西兰花下胚轴颜色性状方面的应用。

3.用于鉴定西兰花下胚轴颜色性状的KASP试剂盒,其特征在于,该试剂盒中的引物为如权利要求1所述的SNP分子标记的引物组。

4.一种鉴定西兰花下胚轴颜色性状的方法,其特征在于,该方法采用如权利要求1所述的SNP分子标记的引物组通过KASP反应检测,根据产物的基因型判断西兰花下胚轴颜色性状:

若SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为G:G或G:A,表明待检测个体下胚轴为紫色;

若SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为A:A,表明待检测个体下胚轴为绿色。

5.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,对所述KASP反应的产物进行荧光数据读取,根据荧光颜色确定基因型:

若荧光为蓝色,表示SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为G:G;

若荧光为红色,表示SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为A:A;

若荧光为紫色,表示SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为G:A。

6.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述KASP反应,反应总体系1.6 μL,其中核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的引物的终浓度为1.74 μM,核苷酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2所示的引物的终浓度均为0.69μM,KASP反应液中还含有1×KASP Master Mix。

7.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述KASP反应,Touchdown PCR反应条件为:94℃预变性15 min,1个循环;94℃变性20 s,61~55℃退火并延伸60 s,10个循环,每个循环退火及延伸的温度降低0 .6℃;第二步扩增反应,94℃变性20s,55℃退火并延伸60s,26个循环。

8.一种针对下胚轴为紫色的西兰花进行分子标记辅助改良的方法,其特征在于,该方法包含:

(1)以下胚轴为紫色的西兰花为父本,以下胚轴为绿色的西兰花为母本,在开花期进行杂交,待种荚成熟后收集种子,为F_1代;

(2)以F_1代植株为母本,以下胚轴为紫色的西兰花为父本,在开花期进行杂交,待种荚成熟后收集种子,为BC_1F_1代;

(3)提取BC_1F_1代植株的基因组DNA,采用如权利要求1中所述的SNP分子标记的引物组通过KASP反应检测,根据产物的基因型判断西兰花下胚轴颜色性状:若SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为G:G或G:A,表明待检测个体下胚轴为紫色;若SNP分子标记位点chr9. 60229243的基因型为A:A,表明待检测个体下胚轴为绿色;在BC_1F_1世代中,基因型为

A:A和G:A的单株保留,在入选的单株中选择农艺、经济性状接近下胚轴为紫色的轮回亲本的植株;

(4)将选择的农艺、经济性状接近下胚轴为紫色的轮回亲本的植株与该轮回亲本回交,获得BC_2F_1世代;

(5)对获得的BC_2F_1世代按照步骤(3)进行选择,并按照步骤(4)与轮回亲本回交,获得BC_3F_1世代,并以同样方法进行选择和回交直至BC_6F_1世代,再对其进行自交,获得遗传稳定的BC_6F_2世代,从BC_6F_2世代中筛选下胚轴绿色位点纯合的个体,为下胚轴颜色得到改良的西兰花。

9.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述父本选自西兰花'DH 16-2';所述母本选自西兰花'DH 28-4'。

一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种SNP分子标记,具体涉及一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法。

背景技术

[0002] 西兰花(Brassica oleracea var.italica L.)是十字花科芸薹属甘蓝种中以由花蕾、肉质花梗和部分茎组成的花球为食用产品的一个变种,因其富含萝卜硫素而深受人们的青睐,近年来栽培面积也随之逐年增加。

[0003] 生产中西兰花品种的花蕾有紫色、纯绿色和绿色但遇低温变紫的三种类型,然而消费者对第三种产品不太接受。因此,选育低温花蕾保持绿色的西兰花品种是西兰花新品种的选育目标之一。

[0004] 有研究表明西兰花花蕾低温颜色与下胚轴颜色紧密连锁:低温花蕾持绿的品种,其下胚轴是绿色的;低温花蕾会变紫色的品种,其下胚轴是紫色的(Rahim et al.,2019.Molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-related genes reveal BoTT8 associated with purple hypocotyl of broccoli(Brassica oleraceavar.italica L.),Genome,DOI:10.1139/gen-2018-0173)。因此,通过正向遗传学手段获得与西兰花下胚轴颜色性状紧密连锁的位点,并根据位点相关的序列开发相应的分子标记及实用性强的检测方法,对于选育出低温花蕾持绿的西兰花品种具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法,解决了西兰花下胚轴或花蕾颜色性状鉴定的问题,能够用于下胚轴或花蕾颜色性状的辅助选择,在苗期即可对育种材料进行检测,可在早期淘汰大量非目标基因型的材料,大幅减少后期工作。

[0006] 为了达到上述目的,本发明提供了一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记的引物组,该SNP分子标记的引物组的核苷酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示,该SNP分子标记的位点为chr9.60229243,该位点具有G/A多态性。

[0007] 本发明的另一目的是提供所述的SNP分子标记的引物组的应用,该应用选自以下任意一种应用:

[0008] (1)在西兰花分子标记辅助育种方面的应用;

[0009] (2)在西兰花改良育种中的应用;

[0010] (3)在西兰花下胚轴或花蕾颜色性状鉴定中的应用;

[0011] (4)在研究西兰花下胚轴颜色性状方面的应用。

[0012] 本发明的另一目的是提供用于鉴定西兰花下胚轴颜色性状的KASP试剂盒,该试剂盒中的引物为所述的SNP分子标记的引物组。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种鉴定西兰花下胚轴颜色性状的方法，该方法采用所述的SNP分子标记的引物组通过KASP反应检测，根据产物的基因型判断西兰花下胚轴颜色性状：若SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为G:G或G:A，表明待检测个体下胚轴为紫色；若SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为A:A，表明待检测个体下胚轴为绿色。

[0014] 优选地，对所述KASP反应的产物进行荧光数据读取，根据荧光颜色确定基因型：若荧光为蓝色，表示SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为G:G；若荧光为红色，表示SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为A:A；若荧光为紫色，表示SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为G:A。

[0015] 优选地，所述KASP反应，反应总体系1.6μL，其中核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的引物的终浓度为1.74μM，核苷酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2所示的引物的终浓度均为0.69μM，KASP反应液中还含有1×KASP MasterMix。

[0016] 优选地，所述KASP反应，TouchdownPCR反应条件为：94℃预变性15min，1个循环；94℃变性20s，61～55℃退火并延伸60s，10个循环，每个循环退火及延伸的温度降低0.6℃；第二步扩增反应，94℃变性20s，55℃退火并延伸60s，26个循环。

[0017] 本发明的另一目的是提供一种针对下胚轴为紫色的西兰花进行分子标记辅助改良的方法，该方法包含：

[0018] (1)以下胚轴为紫色的西兰花为父本，以下胚轴为绿色的西兰花为母本，在开花期进行杂交，待种荚成熟后收集种子，为F_1代；

[0019] (2)以F_1代植株为母本，以下胚轴为紫色的西兰花为父本，在开花期进行杂交，待种荚成熟后收集种子，为BC_1F_1代；

[0020] (3)提取BC_1F_1代植株的基因组DNA，采用所述的SNP分子标记的引物组通过KASP反应检测，根据产物的基因型判断西兰花下胚轴颜色性状：若SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为G:G或G:A，表明待检测个体下胚轴为紫色；若SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为A:A，表明待检测个体下胚轴为绿色；在BC_1F_1世代中，基因型为A:A和G:A的单株保留，在入选的单株中选择农艺、经济性状接近下胚轴为紫色的轮回亲本的植株；

[0021] (4)将选择的农艺、经济性状接近下胚轴为紫色的轮回亲本的植株与该轮回亲本回交，获得BC_2F_1世代；

[0022] (5)对获得的BC_2F_1世代按照步骤(3)进行选择，并按照步骤(4)与轮回亲本回交，获得BC_3F_1世代，并以同样方法进行选择和回交直至BC_6F_1世代，再对其进行自交，获得遗传稳定的BC_6F_2世代，从BC_6F_2世代中筛选下胚轴绿色位点纯合的个体，为下胚轴颜色得到改良的西兰花。

[0023] 优选地，所述父本选自西兰花‘DH 16-2’；所述母本选自西兰花‘DH 28-4’。

[0024] 本发明的与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法，解决了西兰花下胚轴或花蕾颜色性状鉴定的问题，具有以下优点：

[0025] (1)本发明的与西兰花下胚轴颜色连锁的SNP分子标记，SNP分子标记的位点为chr9.60229243，该位点具有G/A多态性，而且西兰花花蕾低温颜色与下胚轴颜色紧密连锁，因此根据该位点设计的引物组能够用于下胚轴或花蕾颜色性状的辅助选择；

[0026] (2)本发明的与西兰花下胚轴颜色连锁的SNP分子标记，通过基因型鉴定下胚轴颜

色。传统育种方法完全依赖于对下胚轴颜色性状的表型调查进行选择，而紫色下胚轴对绿色下胚轴为显性，表型为紫色的个体并不代表不携带有绿色下胚轴基因位点，因此利用表型绿色下胚轴时往往需要额外自交一代，需耗费大量时间；若直接淘汰下胚轴为紫色的个体，则会无意识中丢失一些其他性状优良的个体，利用本发明可针对相应位点的基因型进行鉴定，直接确定样品中是否含有绿色下胚轴的基因；

[0027] (3)本发明的与西兰花下胚轴颜色连锁的SNP分子标记，能够应用于西兰花下胚轴颜色性状鉴定，检测方便，通量高，在苗期即可对育种材料进行检测，可在早期淘汰大量非目标基因型的材料，大幅减少后期工作；

[0028] (4)本发明的与西兰花下胚轴颜色连锁的SNP分子标记，能够应用于分子标记辅助改良，利用本发明的特异引物在回交过程中进行分子标记辅助选择，从而获得遗传稳定的且下胚轴绿色位点纯合的个体。

附图说明

[0029] 图1为本发明西兰花下胚轴绿色与紫色的群体KASP鉴定图。

[0030] 注：黑色的点为阴性对照。

具体实施方式

[0031] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0032] 实施例1西兰花种质资源绿色下胚轴位点的基因型鉴定

[0033] (1)基因组DNA提取

[0034] 将西兰花种质资源播种、育苗、分单株编号，于1～2片真叶时取单株叶片，按照常规CTAB方法分别提取基因组DNA，-20℃保存，备用。

[0035] (2)KASP反应测试

[0036] 利用特异引物组合引物Fam(PrimerFam，5’端接上FAM)、引物Hex(Primer Hex，5’端接上HEX)和通用引物(Primer Common)对上述DNA分别进行KASP分析。

[0037] PrimerFam的核苷酸序列(SEQ ID NO.1)为：

[0038] 5’-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACCACCTCCTCTGATGCGTAA-3’；

[0039] Primer Hex的核苷酸序列(SEQ ID NO.2)为：

[0040] 5’-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACCACCTCCTCTGATGCGTAG-3’；

[0041] Primer Common的核苷酸序列(SEQ ID NO.3)为：

[0042] 5’-GGTCCACCAGACCTAAATGGAG-3’。

[0043] KASP反应在IntelliQube高通量基因分型平台(LGC，Biosearch Technologies)上进行。在微孔反应板上加入约5～10ng DNA样品，加入KASP反应液，PCR扩增在水浴热循环仪中完成。反应完成后利用IntelliQube对KASP反应产物进行荧光数据读取，荧光扫描的结果将自动转化成图形。

[0044] 上述KASP反应液：反应总体系1.6μL，其中Primer Common的终浓度为1.74μM，

Primer Fam和Primer Hex的终浓度均为0.69μM,1×KASP Master Mix。

[0045] 上述PCR扩增的Touchdown PCR反应条件为:94℃预变性15min,1个循环;94℃变性20sec,61℃～55℃退火并延伸60sec,10个循环,每个循环退火及延伸的温度降低0.6℃;第二步扩增反应,94℃变性20s,55℃退火并延伸60s,26个循环。

[0046] (3)标记分型数据

[0047] 根据上述检测方法,对25个重要西兰花纯和材料进行验证,25个核心材料的KASP验证结果与表型的吻合度为92%,即有2个材料下胚轴颜色是绿色的,但KASP验证显示是紫色的,KASP验证结果与表型不吻合,原因可能是这两个绿色下胚轴的材料中其它花青素合成途径的结构基因或调控基因的突变引起了花青素合成障碍。可见,本发明设计的KASP特异引物可高效、高精度检测西兰花下胚轴颜色性状。

[0048] 实施例2西兰花DH材料'DH 16-2'采用分子标记辅助性状改良

[0049] 西兰花DH材料'DH 16-2'(来源于日本野崎公司)花球单球较重,一般配合力较好,花球低温变紫,下胚轴紫色。因此,拟利用绿色下胚轴(低温花蕾持绿)的'DH 28-4'(来源于荷兰比久公司)对'DH 16-2'进行定向改良,并利用本发明中的特异引物在回交过程中进行分子标记辅助选择。

[0050] (1)'DH 28-4'和'DH 16-2'的杂交和回交

[0051] 将'DH 28-4'和'DH 16-2'种子分别播种、育苗、定植于塑料大棚。以'DH16-2'为父本,'DH 28-4'为母本开花期进行人工拨蕾杂交,待种荚成熟后收集种子,即为F_1。次年将F_1种子和轮回亲本'DH 16-2'种子分别播种、育苗、定植于塑料大棚。以F_1为母本,'DH 16-2'为父本在开花期进行人工拨蕾杂交,待种子成熟后收集种子(200粒以上),即为BC_1F_1。

[0052] (2)在BC_1F_1世代苗期分子标记辅助选择

[0053] 将收集的BC_1F_1世代种子随机播种200粒,育苗,并分单株编号,于1～2片真叶期取各单株叶片按照常规CTAB方法分别提取基因组DNA,-20℃保存,备用。

[0054] 利用实施例1中的特异引物组合Primer Fam、Primer Hex和Primer Common对上述DNA分别进行KASP分析:KASP反应在IntelliQube高通量基因分型平台(LGC,Biosearch Technologies)上进行。在微孔反应板上加入约5～10ng DNA样品,加入KASP反应液,PCR扩增在水浴热循环仪中完成,反应完成后利用IntelliQube对KASP反应产物进行荧光数据读取,荧光扫描的结果将自动转化成图形。

[0055] 上述KASP反应液:反应总体系1.6μL,其中Primer C的终浓度为1.74μM,PrimerF和Primer H的终浓度均为0.69μM,1×KASP MasterMix。

[0056] 上述PCR扩增的Touchdown PCR反应条件为:94℃预变性15min,1个循环;94℃变性20sec,61℃～55℃退火并延伸60sec,10个循环,每个循环退火及延伸的温度降低0.6℃;第二步扩增反应,94℃变性20s,55℃退火并延伸60s,26个循环。

[0057] 在该BC_1F_1世代中,显示为A的单株为含下胚轴绿色位点(即低温持绿位点)基因型的材料予以保留,显示为G&A的性状优良的单株为紫色下胚轴但含有下胚轴绿色位点(即低温会变紫但含有低温持绿位点)的基因型也予以保留,而显示为G的单株则为含有紫色下胚轴(即花球低温变紫位点)基因型的材料予以淘汰。在入选的单株中选择其它农艺、经济性状最接近轮回亲本'DH 16-2'的植株。

[0058] (3)与轮回亲本回交

[0059] 将选择的农艺、经济性状最接近轮回亲本‘DH 16-2’的植株与轮回亲本‘DH 16-2’回交，获得BC_2F_1世代。

[0060] (4)后续回交世代的选择

[0061] 对获得的BC_2F_1世代按照上述步骤(2)进行选择，进而按照步骤(3)回交获得BC_3F_1世代；并以同样方法进行选择和回交直至BC_6F_1世代，再对其进行自交，获得遗传稳定的BC_6F_2世代，从中筛选下胚轴绿色位点纯合的个体，即为下胚轴颜色得到明显改良的‘DH 16-2’。

[0062] 如图1所示，为本发明西兰花下胚轴绿色与紫色的群体KASP鉴定图，蓝色的点表示SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为G:G，表明该个体下胚轴为紫色；红色的点表示SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为A:A，该个体下胚轴为绿色；紫色的点表示SNP分子标记位点chr9.60229243的基因型为G:A，该个体下胚轴为紫色，但含有绿色下胚轴基因；黑色的点为阴性对照。

[0063] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍，但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后，对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此，本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

[0001] 序 列 表

[0002] <110> 浙江省农业科学院

[0003] <120> 一种与西兰花下胚轴颜色性状连锁的SNP分子标记及其应用和方法

[0004] <160> 3

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 42

[0008] <212> DNA

[0009] <213> Artificial Sequence

[0010] <400> 1

[0011] gaaggtgacc aagttcatgc taccacctcc tctgatgcgt aa 42

[0012] <210> 2

[0013] <211> 42

[0014] <212> DNA

[0015] <213> Artificial Sequence

[0016] <400> 2

[0017] gaaggtcgga gtcaacggat taccacctcc tctgatgcgt ag 42

[0018] <210> 3

[0019] <211> 22

[0020] <212> DNA

[0021] <213> Artificial Sequence

[0022] <400> 3

[0023] ggtccaccag acctaaatgg ag 22

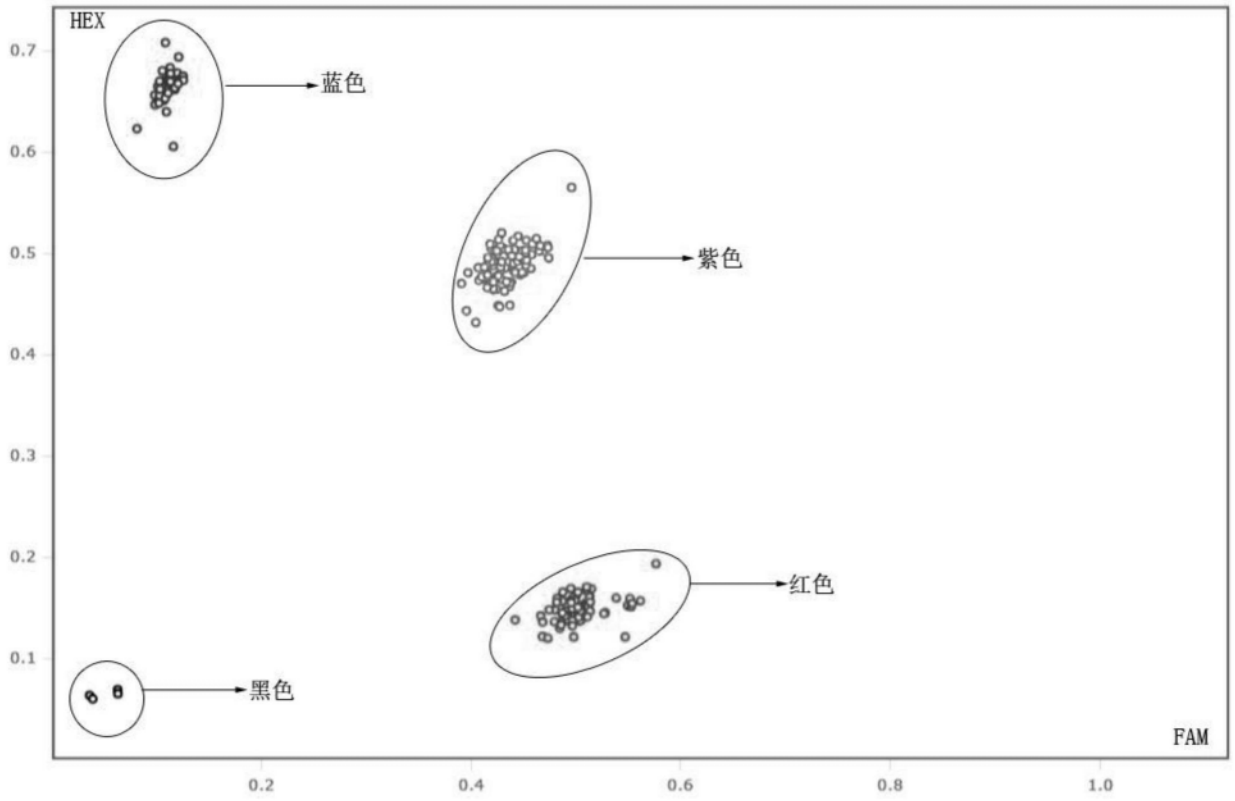


图1