



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116814839 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 23

(21) 申请号 202310954909.X

C12Q 1/6858 (2018.01)

(22) 申请日 2023.08.01

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116814839 A

(56) 对比文件

CN 113308564 A, 2021.08.27

CN 114525364 A, 2022.05.24

(43) 申请公布日 2023.09.29

CN 115011728 A, 2022.09.06

(73) 专利权人 山东省农业科学院
地址 250100 山东省济南市历城区工业北路202号

JP 2004269487 A, 2004.09.30

Wan L等. Transcriptome Analysis of a New Peanut Seed Coat Mutant for the Physiological Regulatory Mechanism Involved in Seed Coat Cracking and Pigmentation. *Front. PlantSci.* 2016, 第7卷 文献号1491.

(72) 发明人 赵传志 马婧 王兴军 夏晗
潘教文 侯蕾 厉广辉 李鹏呈
赵术珍 王光浩 李长生 李爱芹

马婧. 花生彩斑调控基因的定位及分子标记开发. 中国知网. 2023, 全文.

(74) 专利代理机构 北京盛询知识产权代理有限公司 11901

专利代理师 张浩伟

审查员 毛颖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

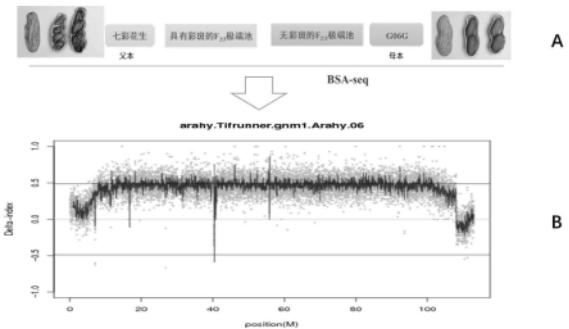
权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种与花生种皮彩色斑纹紧密连锁的分子标记AhyCs1及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种与花生种皮彩色斑纹紧密连锁的分子标记AhyCs1及其应用,属于农业生物技术领域,该分子标记AhyCs1的特异性引物对包括如SEQ ID No.1-2所示的正向引物和反向引物。本发明的分子标记AhyCs1可以用于鉴定彩色斑纹种皮的花生,可以通过检测花生的种子和叶片DNA提前确定下一代收获材料的种皮颜色,提高育种效率,一方面有助于基因的精细定位、分离与克隆,另一方面对于花生的分子育种和品质改良都具有重要的应用价值。



1. 一种利用分子标记AhyCs1的特异性引物对鉴定花生种皮颜色的方法,其特征在于,包括以下步骤:

提取待测花生叶片或种子DNA为模板,利用所述分子标记AhyCs1的特异性引物对进行PCR扩增,之后将扩增产物进行凝胶电泳检测,根据凝胶电泳结果判断待测花生的种皮颜色;

若凝胶电泳结果仅出现233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为明显的彩斑条纹皮;若凝胶电泳结果同时出现229bp和233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为颜色浅的彩斑条纹皮;若凝胶电泳结果仅出现229bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子不是彩斑条纹皮;

所述分子标记AhyCs1的特异性引物对为:

核苷酸序列如SEQ ID No.1所示的引物;

核苷酸序列如SEQ ID No.2所示的引物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述PCR扩增的PCR体系为:DNA模板1 μ L,正向引物和反向引物各0.5 μ L,dNTPmix 0.5 μ L,10 \times TaqBuffer 2.0 μ L,MgCl₂2.0 μ L,Taq酶0.20 μ L,加水至20 μ L。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述PCR扩增的PCR程序为:预变性95 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 20s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述凝胶电泳检测包括8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

5. 一种利用权利要求1中所述分子标记AhyCs1的特异性引物对在鉴定种皮彩色斑纹花生中的应用,其特征在于,利用所述分子标记AhyCs1的特异性引物对待测花生DNA进行PCR扩增,之后将扩增产物进行凝胶电泳检测,根据凝胶电泳结果判断待测花生的种皮颜色;

若凝胶电泳结果仅出现233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为明显的彩斑条纹皮;若凝胶电泳结果同时出现229bp和233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为颜色浅的彩斑条纹皮;若凝胶电泳结果仅出现229bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子不是彩斑条纹皮。

一种与花生种皮彩色斑纹紧密连锁的分子标记AhyCs1及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及农业生物技术领域,特别是涉及一种与花生种皮彩色斑纹紧密连锁的分子标记AhyCs1及其应用。

背景技术

[0002] 花生是我国重要的油料作物和经济作物,我国花生的年种植面积约为7000万亩,产量约1700万吨。花生富含脂肪酸、蛋白质,钙、铁、锌、硒等微量元素和维生素E,还富含白藜芦醇等功能活性物质,具有重要的保健作用。在我国,花生也被成为“长生果”,其功效在明代《本草纲目》、《杏林医学》、《陆川本草》、《全国中草药汇编》均有记载。在国外,大量的研究也表明花生在防治心血管疾病、治疗营养不良等方面具有显著的作用。例如,《新英格兰医学杂志》(The New England Journal of Medicine)的研究表明,每天吃坚果可以将心脏病的死亡率降低29%,甚至每周吃两次花生可以降低24%的风险(Bao et al.2013)。在非洲,以花生为主的搭配特殊配方的花生酱已成为联合国治疗儿童营养不良的主要治疗性即食营养食品。2004年至今,花生酱计划(Project Peanut Butter)已经治愈了100万营养不良儿童。

[0003] 花生种皮,也被称为花生红衣,是花生营养物质的重要载体。花生种皮富含丰富的天然色素,特别是花青素,花青素具有抑制自由基、抗氧化等多种生物学功效(张瑜芳,2003)。另外,花生种皮也被成为花生红衣,是一味传统中药具有止血、治疗血友病的作用,花生红衣色素为纯天然的色素,无毒安全,是市场上难得的抗氧化天然色素。花生的种皮颜色以粉红色和红色为主,具有彩斑种皮的花生品种较少且普遍产量不高。花生种皮的着色深浅与花青素积累密切相关,花生种皮的彩斑区富集更多的花青素。花青素具有抗氧化、抑制自由基积累等多种生物学功效。近年来,彩斑种皮花生的市场需求正在不断增加。然而目前现有的彩斑品种只有“云南七彩花生”等少数品种。在河南、山东等花生主产区也没有彩斑花生品种,现有彩斑种皮花生品种的产量与常规品种相比偏低。因此,培育高产的彩斑种皮花生是满足市场需求的根本途径。

[0004] 花生的种皮也是由珠被发育而来的,和其他性状相比,种皮颜色要在隔代才能显现(Zhao等2020)。另外,花生属于“地上开花、地下结果”的作物,需要收获后才能统计种皮的颜色。以上特性使得传统育种手段培育具有彩斑种皮的花生品种受到了很大的限制。分子标记辅助育种以基因型鉴定为主,对于彩斑种皮性状来说,通过切去种子的部分子叶,检测子叶的基因型可以提前确定下一代收获材料的种皮颜色(仇静静等,2018),也可以通过检测当代叶片的基因型提前确定当代收获材料的种皮颜色,能够加速深彩斑花生新品种培育的进程,提高育种效率。然而,目前尚未有关于花生彩斑种皮相关基因及分子标记的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种与花生种皮彩色斑纹紧密连锁的分子标记AhyCs1及其应用,以解决上述现有技术存在的问题,本发明的分子标记能有效地鉴定花生的彩色斑纹种皮颜色,可以通过检测花生的种子和叶片DNA提前确定下一代收获材料的种皮颜色,提高育种效率,并且有助于基因的精细定位、分离与克隆,也对于花生的分子育种和品质改良都具有重要的应用价值。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0007] 本发明提供一种与花生种皮彩色斑纹紧密连锁的分子标记AhyCs1,所述分子标记AhyCs1的特异性引物对包括:

[0008] 核苷酸序列如SEQ ID No.1所示的引物;

[0009] 核苷酸序列如SEQ ID No.2所示的引物。

[0010] 本发明还提供一种利用所述的分子标记AhyCs1鉴定花生种皮颜色的方法,包括以下步骤:

[0011] 提取待测花生叶片或种子DNA为模板,利用所述特异性引物对进行PCR扩增,之后将扩增产物进行凝胶电泳检测,根据凝胶电泳结果判断待测花生的种皮颜色。

[0012] 进一步地,若凝胶电泳结果出现233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为彩斑条纹皮。

[0013] 进一步地,若凝胶电泳结果仅出现233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为明显的彩斑条纹皮;若凝胶电泳结果同时出现229bp和233bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子为颜色浅的彩斑条纹皮;若凝胶电泳结果仅出现229bp大小的特征条带,则判定待测花生及其子代的种子不是彩斑条纹皮。

[0014] 进一步地,所述PCR扩增的PCR体系为:DNA模板1 μ L,正向引物和反向引物各0.5 μ L,dNTPmix 0.5 μ L,10 \times Taq Buffer 2.0 μ L,MgCl₂2.0 μ L,Taq酶0.20 μ L,加水至20 μ L。

[0015] 进一步地,所述PCR扩增的PCR程序为:预变性95 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 20s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。。

[0016] 进一步地,所述凝胶电泳检测包括8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

[0017] 本发明还提供一种鉴定花生种皮彩色斑纹的试剂盒,包含如SEQ ID No.1-2所示的特异性引物对。

[0018] 本发明还提供一种所述分子标记AhyCs1的应用,所述分子标记AhyCs1用于花生育种和/或花生品质改良中。

[0019] 进一步地,用于鉴定种皮彩色斑纹花生。

[0020] 本发明公开了以下技术效果:

[0021] 本发明提供了一种与花生彩色斑纹种皮紧密连锁的分子标记AhyCs1,可以用于鉴定彩色斑纹种皮的花生,可以通过检测花生的种子和叶片DNA提前确定下一代收获材料的种皮颜色,提高育种效率。此外,花生是异源四倍体,A和B亚基因组等位基因高度同源,很多标记难以有效地区分A和B亚基因组,而本发明的分子标记是通过多次科学的实验和摸索后筛选出来的,结果可靠,可信度高。

[0022] 本发明的分子标记是简单的PCR标记,技术要求简单,与CAPS分子标记相比,不需要经过酶切、纯化、回收等步骤,直接通过PCR扩增和电泳即可实现鉴定,对仪器操作要求也

比较低,采用常规实验的常规仪器均可操作,更加容易被人们接受。

[0023] 本发明的分子标记可以有效地鉴定花生的彩色斑纹种皮颜色,一方面有助于基因的精确定位、分离与克隆,另一方面对于花生的分子育种和品质改良都具有重要的应用价值。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0025] 图1为通过全基因组重测序结合集群分离分析法对控制花生彩斑种皮颜色的基因进行初定位;A:利用分离群体构建极端池进行BSA-seq分析;B:与彩色斑纹种皮连锁标记在花生基因组上的分布;

[0026] 图2为控制花生彩斑种皮基因的精细定位和紧密连锁分子标记的开发;

[0027] 图3为分子标记AhyCs1在不同颜色花生材料中的验证结果;

[0028] 图4为花生种子的取样,及取样后花生种子的发芽试验;A:完整种子对照;B:切割子叶后的种子;C:未切子叶的发芽情况;D:切去子叶后的发芽情况;

[0029] 图5为利用分子标记AhyCs1对杂交F1代进行真伪鉴定;方框中为真的杂交后代;

[0030] 图6为分子标记辅助轮回选择的育种流程图及通过分子标记筛选获得的部分高产彩斑种皮花生新品系。

具体实施方式

[0031] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0032] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值,以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0033] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与上述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0034] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0035] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0036] 实施例1控制花生彩色斑纹种皮颜色基因的定位及与花生彩色斑纹种皮紧密连锁的分子标记AhyCs1的设计

[0037] 为了定位控制花生彩斑种皮颜色基因,发明人利用纯色(粉红色)种皮花生品种(母本)G06G(来源于山东省农作物种质资源库)与具有彩斑种皮的花生品种(父本)七彩花生(QCHS,来源于山东省农作物种质资源库)进行杂交,构建了分离群体,遗传分析表明彩斑的有和无由单基因控制。

[0038] 通过对F2和F3代彩斑种皮的表型统计,选取30个具有显著彩斑和30个纯色(粉红色)的后代株系分别构建了彩斑种皮和粉色种皮的极端池,与亲本G06G和七彩花生一起进行全基因组重测序,对亲本和极端池的测序量分别是32Gb和92Gb(图1的A)。利用集群分离分析法(BSA)对重测序数据进行分析,并统计了候选连锁SNP位点在花生基因组上的分布,发现在6号染色体(Chr.06)存在大量的SNP位点(图1的B),表明控制花生彩斑种皮颜色的基因可能在6号染色体。

[0039] 根据BSA-seq初定位的结果,进一步在候选区间内开发标记,并在分离群体所有的株系中进行基因型检测,并构建了候选区间的局部高密度遗传连锁图谱。结合对每个株系种皮颜色的表型统计结果,通过连锁分析和比较基因组学分析,将控制花生彩色斑纹种皮颜色的关键基因定位并锁定在6号染色体24745546-49876762bp区间内(图2)。同时发明人发现标记AhyCs1与彩色斑纹种皮颜色紧密连锁,利用AhyCs1的特异性引物在不同颜色种质材料中得到了验证(图3),从图3中可知,彩斑种皮(颜色深且明显的彩斑条纹皮)花生均为233bp特征条带,中间型种皮(颜色浅的彩斑条纹皮)花生同时出现229和233bp特征条带,粉色种皮花生均为229bp特征条带。证明标记AhyCs1是判断花生种皮颜色的有效标记。

[0040] AhyCs1的特异性引物对包括正向引物:5'-GTATTGAAGAAAGCTCGGAATT-3'(SEQ ID No.1)和反向引物:5'-AGCGGTGAAGAGGAAGATGA-3'(SEQ ID No.2)。

[0041] 实施例2利用分子标记AhyCs1快速培育高产彩斑种皮花生新品种

[0042] 通过利用分子标记AhyCs1进行选择并结合回交选育的方法可以在3年左右将普通花生(轮回亲本)改良为彩斑种皮的花生新品种,并且保留轮回亲本97%以上的遗传背景,可以在保留原有花生品种绝大部分优异性状的前提下,实现种皮颜色由粉色到彩斑种皮的定向改良。

[0043] 以普通花生品种花育23(HY23,来源于山东省农作物种质资源库)作为轮回亲本,彩斑种皮花生品种七彩花生(QCHS)作为供体父本,花生彩斑种皮颜色改良的具体步骤包括:

[0044] (1) 杂交

[0045] 以HY23为母本(轮回亲本),彩斑种皮花生品种QCHS为父本,进行杂交。杂交方法如下:在母本HY23开花后几天开始去雄,一般是每天16:00以后去雄。用左手的拇指和中指捏住花蕾的基部,右手持镊子轻轻将花萼、旗瓣、翼瓣拨开,再用左手的食指和拇指压住已拨开的花瓣,然后用镊子轻压龙骨瓣的弯背处,使花蕊露出,用镊子一次或多次将8个雄蕊的花药摘除去净,不要损伤雌蕊的柱头,再用手将龙骨瓣推回原来位置。第2天早5:00-9:00对去雄的花朵进行人工授粉。授粉前先采集父本QCHS的花,然后,用镊子将父本花的花粉挤出,授粉时,用左手食指和中指托住去过雄的花朵,右手拇指或用镊子轻轻挤压龙骨瓣,使雌蕊柱头露出,再用镊子尖端蘸取花粉涂在柱头上。

[0046] (2) 杂交F₁真伪的鉴定

[0047] 利用分子标记AhyCs1对收获的杂交F₁代的真伪进行鉴定。方法如下:

[0048] 取样:收获母本植株所有的荚果,晾干后,对收获的所有种子进行编号。然后,利用手术刀去除部分种皮,然后切除部分子叶组织(大约30mg),放入1.5mL离心管中,同时放入磁珠。剩余的花生种子放到冷库中进行保存,待检测后种到大田中。通过实验,证明花生种子在切除部分组织后,发芽率不受影响(图4)。

[0049] DNA提取:提取待测花生种子的DNA,具体方法如下:

[0050] (1) 对装有花生组织的1.5mL离心管用液氮速冷,然后研磨;

[0051] (2) 在65℃水浴中预热CTAB提取液(2%CTAB,1.4mol/LNaCl,20mmol/L EDTA (pH8.0),100mmol/LTris-HCl (pH8.0),2% pvp-40);

[0052] (3) 估算样品组织的质量,每200mg样品中加700μL预热的CTAB提取液,迅速混匀,在65℃温浴10~30min,期间混匀2~5次;

[0053] (4) 加1倍体积的苯酚/氯仿/异戊醇(体积比12:12:1),混匀;

[0054] (5) 12000rpm室温离心10min;

[0055] (6) 将上清转移至一新的离心管中;

[0056] (7) 用氯仿/异戊醇(体积比24:1)重复(4)~(6)步;

[0057] (8) 加0.7倍体积-20℃预冷的异丙醇,颠倒混匀,室温放置10min;

[0058] (9) 12000rpm室温离心15min;

[0059] (10) 倒掉上清,用500μL-20℃预冷的70%乙醇洗涤沉淀2~3次;

[0060] (11) 沉淀干燥后,用50μL去离子水或TE溶解DNA,置于-20℃备用。

[0061] (12) 吸取5μL溶解的DNA,加入45μL去离子水,混匀制得花生的基因组DNA待用。

[0062] PCR反应及电泳检测:利用AhyCs1的特异性引物对(如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示)对亲本及所有的F₁杂种进行分子标记检测,根据电泳结果,包含父本和母本特异条带的为真的杂交种。

[0063] PCR扩增反应体系如下:

[0064] 扩增总体积20μL:

[0065] DNA模板20-30ng/μL 1μL,特异引物对0.5pmol/μL各0.5μL,10mM dNTP mix 0.5μL,10×Taq Buffer 2.0μL,25mM MgCl₂2.0μL,Taq酶5U/μL 0.20μL,加水至20μL。

[0066] PCR反应条件:预变性95℃3min;94℃30s,56℃30s,72℃20s,35个循环;72℃延伸5min。

[0067] PCR扩增产物检测采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=39:1)电泳。

[0068] 其中,配制8%变性聚丙烯酰胺凝胶方法如下;

[0069] 在10μL扩增产物中加入3μL的指示剂即加样缓冲液(含有50mM Tris-HCl pH 8.0,50mM EDTA,0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯青,50%甘油);

[0070] 电泳缓冲体系为1×TBE(90mM Tris-borate pH 8.3,2mM EDTA),120V电泳4h左右。

[0071] 30ml的8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配制如表1所示:

[0072] 表130ml的8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配制

[0073]	40%丙烯酰胺 (Acr : Bis = 39 : 1)	6 ml
	5×TBE	6 ml
	H ₂ O	18 ml
	20%过硫酸铵	240 μl
	TEMED	24 μl
	总体积	30 ml

[0074] 银染检测,方法如下:

[0075] a. 0.1% 硝酸银溶液500mL染色15-20min。

[0076] b. 去离子水快速漂洗15sec左右。

[0077] c. 显影液(1000mL去离子水+20g NaOH+0.5g Na₂CO₃,1.5mL甲醛现用现加)显色,不断摇动,直至DNA条带清晰可见。

[0078] d. 自来水漂洗。

[0079] e. 扫描照相。

[0080] 如图5所示,电泳检测,同时具有父本和母本条带的后代为真的杂交种。

[0081] (3) 回交和后代的筛选

[0082] 采用分子标记辅助轮回选择的育种方案,每年两季,整个周期大约需要三年加代(图6)。首先,利用普通的高产优质花生作为母本(轮回亲本,粉色种皮),真杂种F₁作为父本进行杂交,杂交的方法同上,对收获的BC₁F₁再次利用AhyCs1分子标记进行检测,保留具有父本特异条带的后代,DNA提取及分子标记检测的方法同上。连续进行4次回交和筛选,得到BC₄F₁代,然后进行自交,后选择纯和的后代,进行考种和品种登记。

[0083] 由于种皮由珠被发育而来,种皮颜色母体遗传,相比其他性状,种皮颜色要在隔代才能显现。因此,通过肉眼筛选和培育彩斑种皮花生存在很大的盲目性。利用本发明提供的标记结合回交轮回选择的方法,可以提高育种效率,在3年左右时间内实现彩斑种皮花生的种质创新(图6)。与传统方法相比,效率更高。

[0084] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

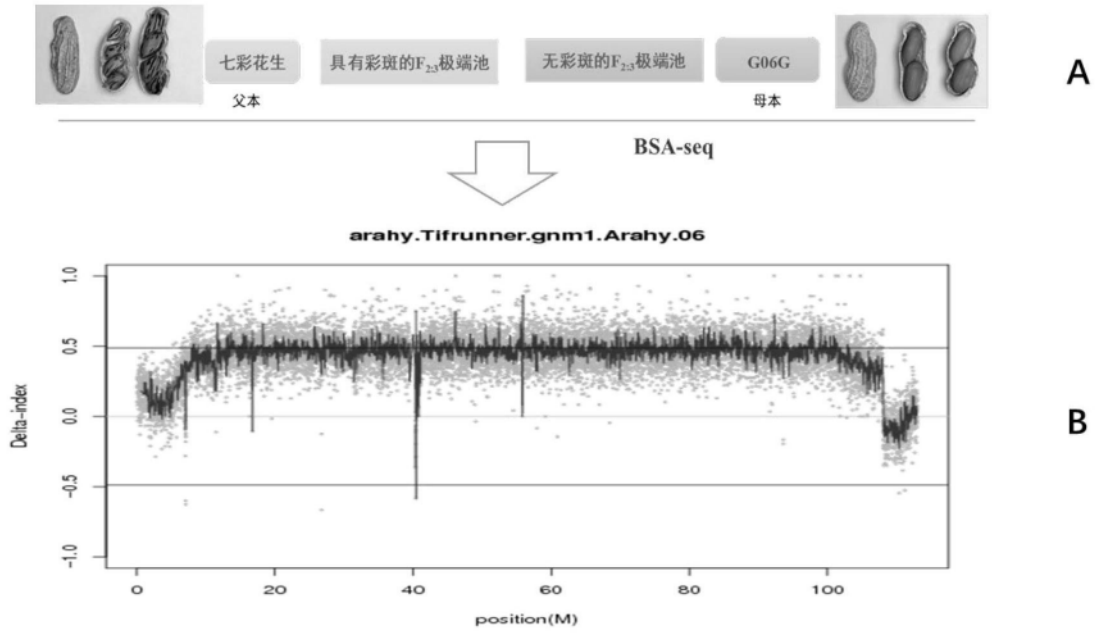


图1

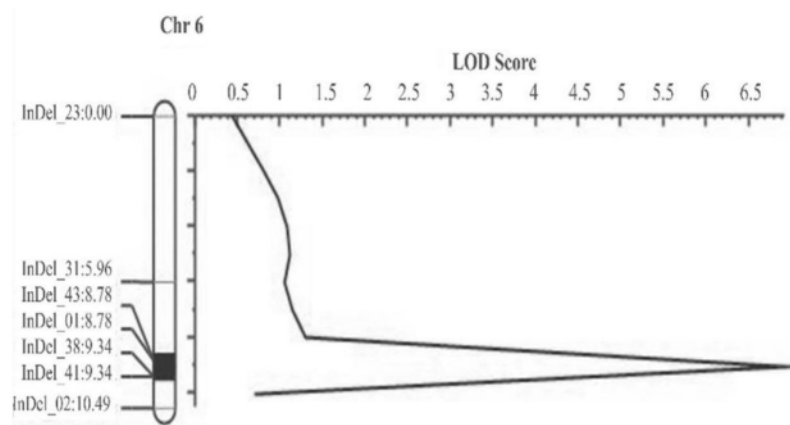


图2

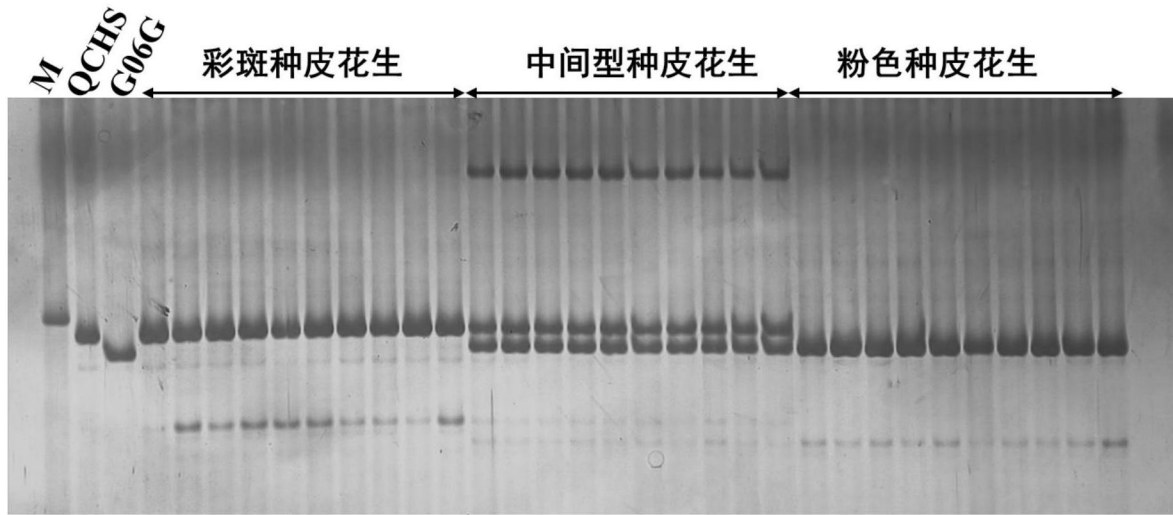


图3

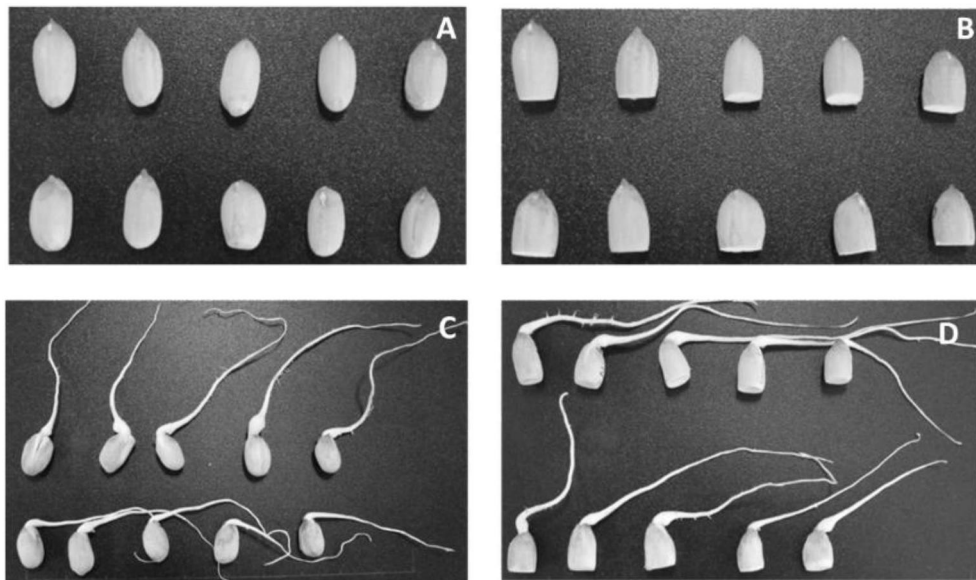


图4

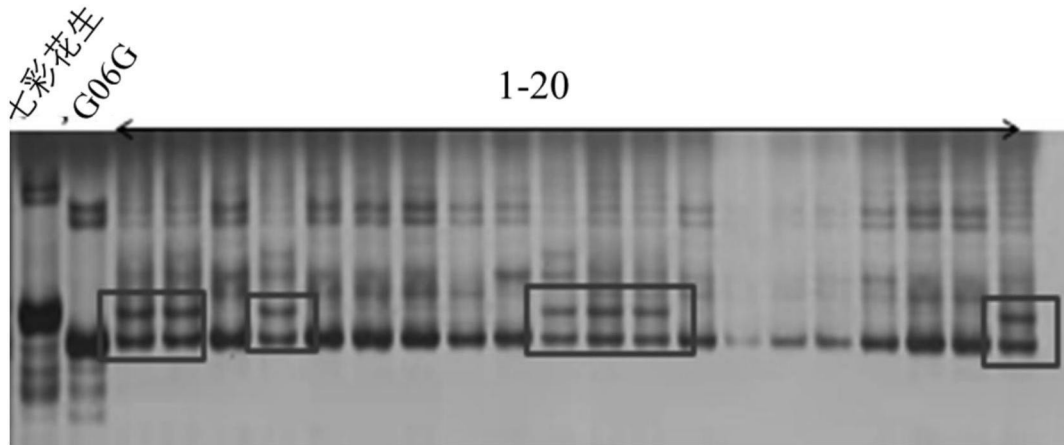


图5

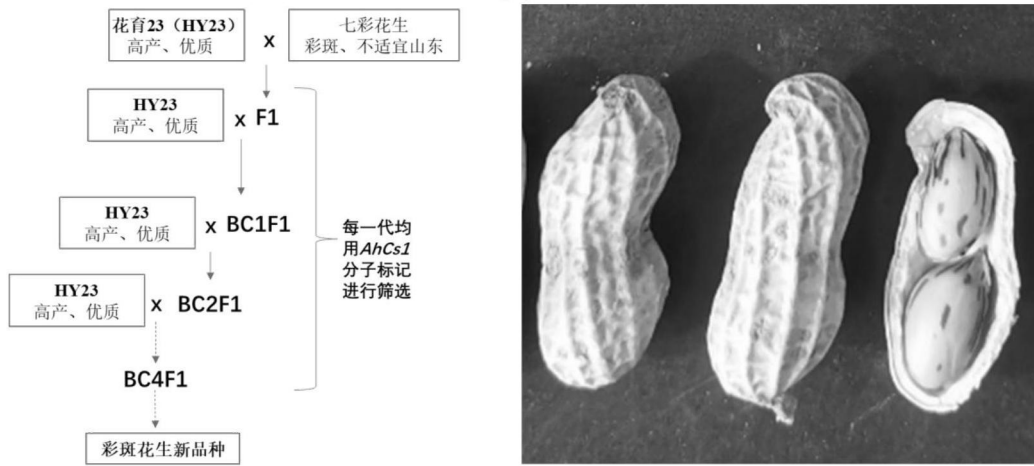


图6