



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106755483 B

(45)授权公告日 2020.07.17

(21)申请号 201710040798.6

(22)申请日 2017.01.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106755483 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(66)本国优先权数据
201610849403.2 2016.09.26 CN

(73)专利权人 山西省农业科学院果树研究所
地址 030031 山西省太原市小店区龙城大街79号

专利权人 山西省农业科学院生物技术研究中心
山西省农业科学院农业资源与经济研究所

(72)发明人 肖蓉 曹秋芬 张春芬 侯丽媛
聂园军 邓舒 李倩 王晓清

(续)

(74)专利代理机构 太原晋科知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 14110

代理人 王瑞玲

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6895(2018.01) (续)

(56)对比文件
CN 104531844 A, 2015.04.22,
Z. Galli等. Using SSR Markers to Distinguish Apple Cultivars. 《Acta Horticulturae》. 2006, 第669-672页.
张春芬等. 苹果花药培养再生植株的倍性鉴定及SSR分析. 《园艺学报》. 2015, 第2580页. (续)

审查员 贺巧巧

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II及其应用

(57)摘要

本发明属植物遗传育种和苹果种质创新研究领域,具体一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II及其应用,在检测过程中同时使用,分子标记为3号和11号染色体上连锁的SSR分子标记,以苹果基因组DNA为PCR扩增模板,分别以SSR分子标记为引物对,进行PCR扩增及产物检测,用于遗传连锁鉴定、花药培养植株鉴定、品种来源鉴定。首次用SSR分子标记对鉴定材料所处苹果连锁群进行鉴定,同时公开了与苹果3号和11号染色体连锁的SSR分子标记;该分子标记是共显性标记,可快速、准确对嘎拉苹果遗传连锁群、花药培养植株及嘎拉来源植株进行鉴定;也为下一步加快嘎拉苹果与重要农艺性状连锁基因的利用及苹果纯合植株遗传育种提供了分子水平的支持。

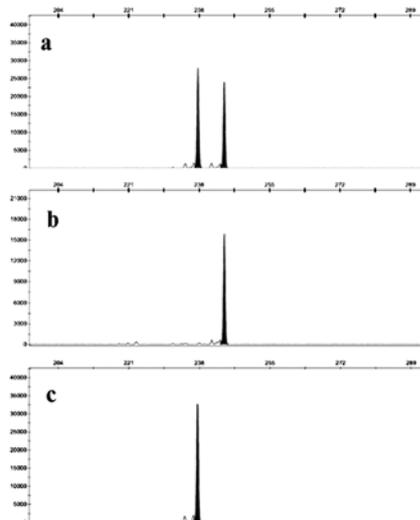


图 LG3-CH03g07

CN 106755483 B

[接上页]

(72)发明人 温鑫 秦永军

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

E. Silfverberg-Dilworth等

.Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome.

《Tree Genetics & Genomes》.2006,第2卷(第4期),第202-224页.

Aide Wang等. EST contig-based SSR linkage maps for *Malus X domestica* cv Royal Gala and an apple scab resistant accession of *M. sieversii*, the progenitor species of domestic apple.《Molecular Breeding》.2011,第29卷(第2期),第379-397页.

1. 一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II的应用,其特征是包括以下步骤:

(1) 以苹果基因组DNA为PCR扩增模板,以嘎拉苹果基因组DNA为PCR扩增模板,分别使用SSR分子标记II的两对引物,进行PCR扩增,反应体系为15 μ L,其中含10 \times PCR Buffer 1.5 μ L、2.5 mM dNTPs mixture 1.2 μ L、10ng/ μ L Primers F 1.5 μ L、10ng/ μ L Primers R 1.5 μ L、5U Taq 聚合酶0.15 μ L、100ng/ μ L DNA模板0.75 μ L,去离子水补足至15 μ L;

(2) 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min 30 s,94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C10 min,4 $^{\circ}$ C保存备用;

(3) PCR产物检测,用8%非变性聚丙烯酰胺电泳,将PCR的每个反应产物加入1/2的非变性Loading Buffer,混匀,150V恒定电压150min,冰醋酸固定,AgNO₃ 染色拍照;

(4) 用于花药培养植株鉴定时,待测苹果能扩增出上述SSR分子标记II的两对引物中相对应的单独的一条特异性条带,说明待测苹果植株为纯合材料,如出现两条条带,则待测苹果植株不是纯合材料;

所述SSR分子标记II由LG3 标记CH03g07、LG11 标记Hi16d02组成,SSR分子标记II的两对引物在检测过程中同时使用,所述引物的序列为:

LG3 标记CH03g07:

上游:5'- AATAAGCATTCAAAGCAATCCG -3'

下游:5'- TTTTCCAAATCGAGTTTCGTT -3'

LG11 标记Hi16d02:

上游:5'- AACCCAACTGCCTCCTTTTC -3'

下游:5'- GTTTCGACATGATCTGCCTTG -3'。

一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物遗传育种和苹果种质创新研究领域,具体为一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II及其应用。

背景技术

[0002] 苹果(*Malus domestica* Borkh.)生态适应性强,果品营养价值高,是世界上栽培面积广、消费量大、经济效益较好的果树树种之一。我国是苹果栽培面积最广、总产量最高的国家之一。尤其在我国北方,苹果是栽培面积最大的果树树种,其产量和面积均居全国水果之首。这种产业已成为我国许多省市的支柱产业,它们在提高农民收入、促进地方经济发展中起着越来越重要的作用。苹果属自花不孕植物,生产中的苹果品种均为杂合二倍体品种,苹果基因组高度杂合,遗传背景十分复杂,加之其童期漫长,使得常规杂交育种周期长,效率低。

[0003] 利用纯合基因型种质育种则可以大大提高定向育种效率。花药培养可以获得单倍体植株,经过染色体加倍后可以迅速得到纯合的二倍体种质。由于苹果是高度杂合的二倍体品种,通常在单一位点由复等位基因控制,即同一位点含有两种不同的等位基因,而单倍体品种只含一种基因。通过花药培养所获得植株,如果其为单倍体起源,应只具有其亲本之一的一种等位基因。通过花药培养可以得到纯合的二倍体种质,还可以直接获得性状优良的隐性基因材料和诱变育种材料,这些材料对苹果遗传育种研究有重要意义。

[0004] 分子标记技术已经在苹果主要农艺性状的早期选择中得到应用,如红肉、红皮、黑星病、苹果绵蚜和火疫病等,参与完成苹果基因组测序工作并联合开发了8 K(CHAGNÉ D等, Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple[J]. PLoS ONE, 2012, 7: e31745. doi:10.1371/journal.pone.0031745)和20 K(BIANCO L等, Development and validation of a 20K Single Nucleotide Polymorphism(SNP)whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh) [J]. PLoS One ,2014,9(10): e110377. doi:10.1371/journal.pone.0110377)的苹果SNP芯片,第1次在世界苹果育种项目中使用基因组选择(GS)方法来代替表型筛选加快育种步伐。

[0005] 简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 是一类 1-6bp 核苷酸基序构成重复序列,广泛分布于真核生物基因组的编码区、非编码区,SSR 标记利用简单序列重复的侧翼保守序列设计引物,经过PCR扩增,根据条带的大小来反映DNA序列的多态性。与其它分子标记如 RFLP、AFLP、ISSR 等相比,SSR 标记具有多态性高、共显性遗传、重复性好、特异性强等特点,近年来成为遗传多样性研究、遗传作图、重要功能基因定位、分子辅助育种等领域应用最多的一种标记。

[0006] SSR标记因其具有良好的稳定性和可传递性,在果实品质性状标记筛选、品种鉴定和遗传连锁图谱构建中被广泛使用(Liu, 等. Identification of apple cultivars on the basis of simple sequence repeat markers. Genet Mol Res, 2014, 13 (3) :

7377-7387; Moriya, 等. Aligned genetic linkage maps of apple rootstock cultivar 'JM7' and *Malus sieboldii* 'Sanashi 63' constructed with novel EST - SSRs. *Tree Genet Genomes*, 2012, 8 (4) : 709-723.)。

[0007] 到目前为止,对于嘎拉苹果花药培养植株的SSR分子标记还未见报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II及其应用。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II,在检测过程中同时使用,所述分子标记为具有如下所示核苷酸序列的2对SSR引物:

[0010] LG3 标记CH03g07:

[0011] 上游:5'- AATAAGCATTCAAAGCAATCCG -3'

[0012] 下游:5'- TTTTCCAAATCGAGTTTCGTT -3'

[0013] LG11 标记Hi16d02:

[0014] 上游:5'- AACCCAACTGCCTCCTTTTC -3'

[0015] 下游:5'- GTTTCGACATGATCTGCCTTG -3'。

[0016] 一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II的应用,包括以下步骤:

[0017] (1)以嘎拉苹果基因组DNA为PCR扩增模板,分别以上述SSR分子标记为引物对,进行PCR扩增,反应体系为15 μ L,其中含10 \times PCR Buffer 1.5 μ L、2.5 mM dNTPs mixture 1.2 μ L、10ng/ μ L Primers F 1.5 μ L、10ng/ μ L Primers R 1.5 μ L、5U Taq 聚合酶0.15 μ L、100ng/ μ L DNA模板0.75 μ L,去离子水补足至15 μ L;(2)扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min 30 s,94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C保存备用;(3)PCR产物检测,用8%非变性聚丙烯酰胺电泳,将PCR的每个反应产物加入1/2的非变性Loading Buffer,混匀,150V恒定电压150min,冰醋酸固定,AgNO₃ 染色拍照;(4)用于遗传连锁鉴定时,待测苹果能扩增出上述2对SSR引物相对应的任意一条特异性条带,说明待测苹果种质中含有的遗传物质位于相应的遗传连锁群,反之,则待测苹果种质含有的遗传物质不存在相应的遗传连锁群;(5)用于花药培养植株鉴定时,待测苹果能扩增出上述2对SSR引物中相对应的单独的一条特异性条带,说明待测苹果植株为纯合材料,如出现两条条带,则待测苹果植株不是纯合材料;(6)用于品种来源鉴定时,待测苹果能扩增出上述2对SSR引物相对应的任意一条特异性条带,说明待测苹果植株来源于嘎拉苹果,如无特异性条带扩增出来,则待测苹果植株不是嘎拉苹果培育的后代品种。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0019] 1、本发明在国内外首次报道了用SSR分子标记对鉴定材料所处苹果连锁群进行鉴定,同时也报道了苹果的3号和11号染色体上连锁的SSR分子标记;

[0020] 2、本发明所述分子标记是共显性标记,可以快速、准确对嘎拉苹果遗传连锁群、花药培养植株及嘎拉培育后代品种进行鉴定;

[0021] 3、这些研究结果为下一步加快嘎拉苹果与重要农艺性状连锁基因的利用及苹果纯合植株遗传育种提供了分子水平的支持;

[0022] 4、为快速鉴定嘎拉培育植株进行分子水平验证提供了方法。

[0023] 本发明通过对嘎拉苹果花药培养植株的3号和11号染色体上连锁的2对SSR分子标

记鉴定,不仅可以系统准确地了解嘎拉苹果基因型类型及其遗传多样性,为丰富与发展苹果等位基因体系奠定基础,也为今后科学利用嘎拉苹果提供理论依据,而且也为鉴定嘎拉苹果花药培养植株的基因型,及其纯合性进行了佐证。本发明对于苹果新品种选育及分子标记辅助育种都具有积极的推动作用。同时,本发明筛选出的2对SSR分子标记也为嘎拉苹果后代品种从分子水平上进行来源验证提供了支持。

附图说明

[0024] 图1为LG3 标记CH03g07的毛细管电泳图谱;;图2为LG11 标记Hi16d02的毛细管电泳图谱。

具体实施方式

[0025] 纯合基因型对于高等植物遗传机理研究和育种应用均具有十分重要作用 (Murovec, 等. Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Abdurakhmonov I (ed) Plant Breeding: 2012: 87-106.)。苹果是基因组高度杂合的果树树种,利用单倍体基因组可以大大降低基因组的组装难度 (Dunwell. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol J,2010,8 (4) : 377-424.)。苹果属多年生草本植物,生殖周期长,加之自交不亲和,导致通过多代自交获得纯合植株的方法难以实现。利用花药培养诱导产生胚状体获得纯合基因型株系,对基因型高度杂合的苹果育种及遗传分析有重要意义 (Germanà. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. Plant Cell Rep, 2011,30 (5) : 839-857;Maria. Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2006, 86:131-146.)。通过花药培养诱导产生胚状体获得再生植株,并对获得的再生植株倍性以及来源进行准确鉴定,对创新种质遗传分析具有重要意义。为更好地利用这些种质材料,本发明对嘎拉苹果及其花药培养获得的植株进行连锁群和基因型鉴定,为加快嘎拉苹果与重要农艺性状连锁基因的利用及苹果纯合植株遗传育种提供了分子水平的支持。

[0026] 一、嘎拉苹果花药培养

[0027] 4月上旬嘎拉苹果现蕾后,采取混合采样的方法,选取生长健壮的嘎拉苹果成年树,采集发育良好的花蕾,用密封袋封好置于冰箱4℃冷藏室进行低温预处理。低温处理后,将花蕾在超净工作台内用0.1%次氯酸钠灭菌,然后用镊子从花蕾内取出花药接种于胚状体诱导培养基,25℃下暗培养,3~5个月后待胚状体长至8~10mm,转移至再生培养基上进行植株再生,并进行继代培养后经继代培养、生根培养、驯化、室内移栽获得再生植株。

[0028] 二、SSR分子标记分析

[0029] 基因组总DNA提取

[0030] 选取嘎拉苹果和嘎拉花药培育再生植株6株,采用CTAB法(曹秋芬等,2003)分别提取花药的总DNA。从HiDRAS网站和Okada等构建的苹果高密度微卫星遗传图谱上,选取分布于苹果3号和11号染色体的2对SSR引物,再生植株连锁群HIDRAS 标记见表1;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

[0031] 表1:

[0032]

连锁群	SSR标记	上游引物	下游引物	扩增范围	荧光标记
LG	SSR markers	Forward primer	Reverse primer	Primers Range(bp)	Labeling fluorescence dye
3	CH03g07	AATAAGCATTCAAAGCAATCCG	TTTTTCCAAATCGAGTTTCGTT	119-171	TAM
11	Hi16d02	AACCCAACTGCCTCCTTTTC	GTTTCGACATGATCTGCCTTG	144-177	FAM

[0033] PCR扩增

[0034] PCR反应体系总体积为15 μ L,由其中含10 \times PCR Buffer 1.5 μ L、2.5 mM dNTPs 1.2 μ L、10ng/ μ L Primers F 1.5 μ L、10ng/ μ L Primers R 1.5 μ L、5U Taq 聚合酶0.15 μ L、100ng/ μ L DNA模板0.75 μ L,去离子水补足至15 μ L;扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min 30 s,94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0035] PCR产物检测

[0036] 用8%非变性聚丙烯酰胺电泳,将PCR的每个反应产物加入1/2的非变性Loading Buffer,混匀,150V恒定电压150min左右,冰醋酸固定,AgNO₃染色拍照。

[0037] 对8%非变性聚丙烯酰胺电泳获得的条带,进行筛选,对在嘎拉及其花药培养植株中产生多态性的标记进行分析,统计。选取在嘎拉苹果中两个等位基因/位点都扩增出条带,而在嘎拉苹果花药培养植株中只有一个等位基因/位点扩增出来条带的引物。在引物CH03g07 (LG 3) 中,扩增产物有109 bp和118 bp的特异性条带;在引物Hi16d02 (LG 11) 中,扩增产物有139 bp和147 bp的特异性条带;结果表明,筛选出分布于第3和第11条染色体上的2对SSR分子标记,在嘎拉苹果及其花药培育植株中扩增出等位基因位点。

[0038] 三、再生株系的染色体倍性分析:取再生植株叶片在500 μ L 裂解液中用刀片切碎,静置2 min后过滤于EP管中,PI染色后用BD Accuri C5 流式细胞仪分析叶片中的DNA含量。以茎尖培养获得的杂合二倍体“嘎啦”试管苗叶片为倍性鉴定的参考标准。

[0039] 采用流式细胞仪对成活再生株系进行染色体倍性鉴定。以杂合二倍体“嘎啦”供体为对照,结果表明:Gala6- Gala10再生株系均为二倍体。

[0040] 再生株系的基因型鉴定:

[0041] 基因组DNA的提取:采用改良CTAB法提取叶片总DNA后,经核酸蛋白仪(Bio-Rad)检测DNA浓度,再经1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和质量。

[0042] 对筛选得到引物的5'端TAM、FAM、HEX荧光标记,进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μ L,含dNTP mixture (10 mM) 0.5 μ L、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 2.0 μ L、rTaq酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L、DNA模板 (100 ng/ μ L) 1 μ L、去离子水 17.8 μ L。PCR反应程序为:第一步95 $^{\circ}$ C 预变性3min;第二步94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,10个循环;第三步95 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,20个循环;第四步72 $^{\circ}$ C充分延伸6 min,4 $^{\circ}$ C保存。反应板每孔先加入9.9 μ L 去离子甲酰胺和 0.1 μ L ROX500或LIZ500 分子量内标,再吸取加入50 pg扩增产物加入样品孔中。98 $^{\circ}$ C变性 5 min,急速冷却,置放于 ABI 3730XL DNA分析仪上。使用Gene Mapper 软件分析扩增片段峰型并读取相应数据。

[0043] SSR 鉴定嘎啦再生植株基因型结果见表2,结果显示,连锁群上的2个SSR标记显示杂合体为两个峰,而再生株系只有其中的一个峰。证明,嘎啦再生株系Gala6- Gala10均为纯合基因型植株。

表 2. SSR 鉴定嘎啦再生植株基因型

line	SSR marker	
	CH03g07	H16d02
	LG3	LG11
SSR PCR size (bp)		
Gala	119/128	141/151
Gala6	128	141
Gala7	119	141
Gala8	128	141
Gala9	128	151
Gala10	128	151

[0044] 再生株系植物学观察:对再生植株试管苗进行植物学特征调查。再生植株植物学观察结果见表3,表3结果显示嘎啦杂合供体株高为5.67 cm (n=1)和纯合二倍体平均株高 $2.96 \text{ cm} \pm 0.44 \text{ cm}$ (n=28)。同时我们也观察到纯合二倍体长势相对于嘎啦杂合供体较弱。不同二倍体纯合植株的植物学特征也存在差异,Gala7叶片变小、变厚,叶柄变短且基部宽大,叶色深且有很强的光泽度。

[0046] 表3:

再生株系	株高	叶数	叶长宽比
Regenerated Plants	Plant height(cm)	leaf number	ratio of length to breadth
嘎啦杂合供体	5.67 ± 0.25	18.67 ± 5.69	1.79 ± 0.22
再生植株单倍体	2.53 ± 0.15	12.33 ± 1.53	1.72 ± 0.19
再生植株二倍体	2.96 ± 0.44	15.33 ± 0.78	1.78 ± 0.52

[0047] 四、结果与分析

[0049] 单倍体育种是获得优势亲本供体材料的最有效方法之一。花药的花药壁是杂合体细胞,同时也可能诱导成杂合二倍体的再生植株,所以获得的二倍体植株并非一定为纯合体。通过鉴定再生植株的等位基因就可以把花药培养再生植株的杂合二倍体和纯合二倍体区分开。以前的技术包括同工酶标记、S等位基因及SSR分子标记应用于花药再生植株的纯合性鉴定。本发明也采用了SSR鉴定方法。首先选用的SSR标记(来自HIDRAS数据库(<http://www.hidras.unimi.it/>))对所有的再生植株进行PCR,筛出可区分再生植株为纯合的SSR标记。为了进一步区分再生植株的基因型,我们又筛选出分布于苹果3号和11号染色体上连锁群的SSR标记。这个SSR标记能明确标记“嘎啦”苹果不同的植株,为今后进行“嘎啦”苹果的基因型鉴定提供了技术指标。

[0050] 亲本蕴含的等位基因在花药培养来的植株中能检测到,但是花药培养来的植株中只有一个等位基因/位点扩增出来。这表明花药培养来的植株其基因型是纯合的,即来源于亲本的单倍体。

[0051] 五、结论

[0052] 通过花药培养还可获得倍性丰富的纯合体植株,这为今后开展苹果倍性遗传育种研究提供了丰富的试材。

[0053] 本发明获得的再生株系以及SSR鉴定体系对分析鉴定“嘎啦”优良性状基因研究,田间嫁杂交育种,以及表型-基因型关联分析具有重要意义。

[0054] 下一步结合嘎拉苹果全基因组测序结果,在基因组范围内对亲本及其花药培养植

株进行更为彻底的分析 and 比较,以便解析嘎拉苹果重要性状(特性)的分子机制。

- [0001] 序列表
- [0002] 〈110〉山西省农业科学院果树研究所、山西省农业科学院生物技术研究中心、山西省农业科学院农业资源与经济研究所
- [0003] 〈120〉一种鉴定嘎拉苹果后代植株的SSR分子标记II及其应用
- [0004] 〈160〉4
- [0005] 〈210〉1
- [0006] 〈211〉22
- [0007] 〈212〉DNA
- [0008] 〈213〉人工序列
- [0009] 〈220〉
- [0010] 〈223〉LG3 标记CH03g07的上游引物
- [0011] 〈400〉1
- [0012] AATAAGCATTCAAAGCAATCCG
- [0013] 〈210〉2
- [0014] 〈211〉22
- [0015] 〈212〉DNA
- [0016] 〈213〉人工序列
- [0017] 〈220〉
- [0018] 〈223〉LG3 标记CH03g07的下游引物
- [0019] 〈400〉2
- [0020] TTTTCCAAATCGAGTTTCGTT
- [0021] 〈210〉3
- [0022] 〈211〉20
- [0023] 〈212〉DNA
- [0024] 〈213〉人工序列
- [0025] 〈220〉
- [0026] 〈223〉LG11 标记Hi16d02的上游引物
- [0027] 〈400〉3
- [0028] AACCCAACTGCCTCCTTTTC
- [0029] 〈210〉4
- [0030] 〈211〉22
- [0031] 〈212〉DNA
- [0032] 〈213〉人工序列
- [0033] 〈220〉
- [0034] 〈223〉LG11 标记Hi16d02的下游引物
- [0035] 〈400〉4
- [0036] GTTTCGACATGATCTGCCTTG

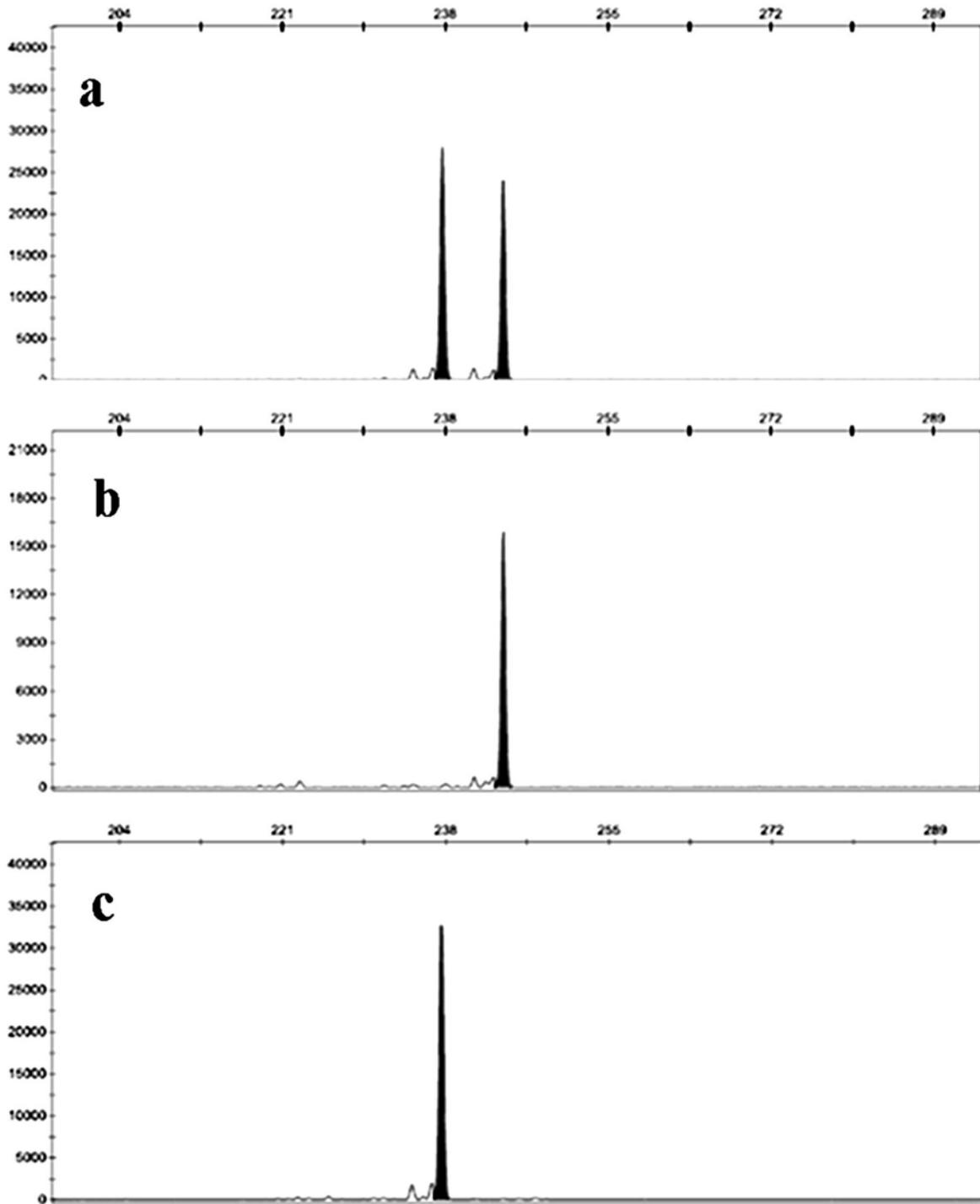


图 LG3-CH03g07

图1

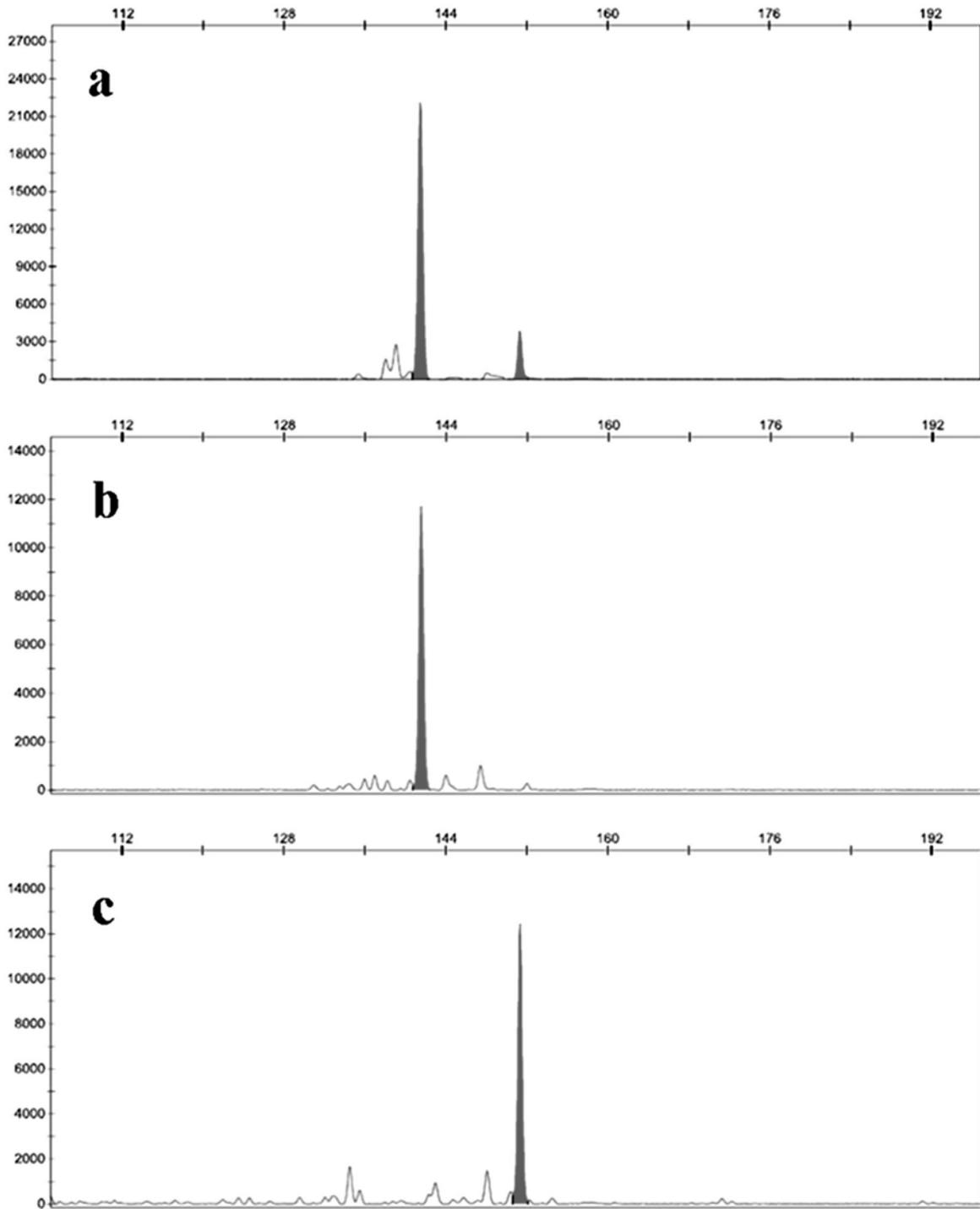


图 LG11-Hi16d02

图2