



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106811508 A

(43) 申请公布日 2017. 06. 09

(21) 申请号 201510859916. 7

(22) 申请日 2015. 12. 01

(71) 申请人 深圳华大农业与循环经济科技有限
公司

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山道
146 号北山工业区综合楼科技园
604

申请人 深圳华大基因研究院

(72) 发明人 倪雪梅 蔡雪梅 雷雪静 雍建朋
彤君

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

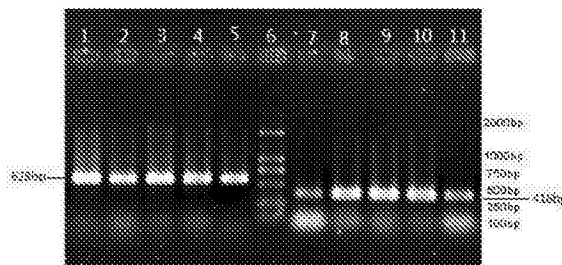
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记
SVmc3

(57) 摘要

本发明属于分子生物学领域,涉及一种分子
标记,具体地,涉及一种与谷子米粒颜色基因紧密
连锁的分子标记,该分子标记含有 SEQ ID NO:1
所示序列。本发明还涉及扩增该分子标记的引物
对、该分子标记的检测方法、该分子标记或者该引
物对在谷子辅助育种或者谷子米粒颜色基因定位
或检测中的用途、谷子辅助育种方法、筛选该分
子标记的方法。本发明所提供的分子标记将基因
组 DNA 序列与谷子米粒颜色基因联系起来,有利
于谷子分子标记辅助育种体系的建立;所述分子
标记与谷子米粒颜色基因的遗传紧密连锁距离为
1. 2cM。本发明的分子标记及分子标记扩增引物可
以简便、快速、高通量地应用于谷子育种实践和资
源及品种鉴定。



1. 一种与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记,其特征在于,所述分子标记含有 SEQ ID NO:1 所示序列;优选地,所述分子标记为 SEQ ID NO:1 所示序列。

2. 一种扩增与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记的引物对,其特征在于,所述引物对的引物 1 含有 SEQ ID NO:2 所示序列,引物 2 含有 SEQ ID NO:3 所示序列;优选地,引物 1 为 SEQ ID NO:2 所示序列,引物 2 为 SEQ ID NO:3 所示序列。

3. 一种与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记,其特征在于,所述分子标记是由权利要求 2 所述的引物对以黄色米粒的谷子基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增得到的。

4. 如权利要求 3 所述的分子标记,其特征在于,所述分子标记为 SEQ ID NO:1 所示序列。

5. 一种谷子米粒颜色基因定位的方法,其特征在于,所述方法包括使用权利要求 1、3、4 中任一项所述的分子标记或者权利要求 2 所述的引物对的步骤。

6. 权利要求 1 所述的分子标记的检测方法,其特征在于,包括步骤:根据权利要求 1 所述的分子标记的核苷酸序列设计引物,以被检测谷子基因组 DNA 为模板进行扩增,并判断扩增产物中是否存在该分子标记。

7. 如权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于,所述引物为权利要求 2 所述的引物对。

8. 权利要求 1、3、4 中任一项所述的分子标记或者权利要求 2 所述的引物对在谷子辅助育种或者谷子米粒颜色基因定位或检测中的用途。

9. 一种谷子辅助育种方法,其特征在于,所述方法包括检测权利要求 1、3、4 中任一项所述的分子标记或者用权利要求 2 所述的引物对进行检测的步骤。

10. 一种筛选权利要求 1 所述的分子标记的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 获得纯合型父本、母本基因组;
- (2) 分别通过测序获得父本、母本基因组序列;
- (3) 比较父本、母本基因组序列,获得差异位点;
- (4) 构建遗传群体并收集表型数据;
- (5) 对群体中的个体进行基因型分析;
- (6) 结合基因型和表型数据,将谷子米粒颜色基因定位在基因组上;
- (7) 在靠近目标基因的区段选择候选的分子标记。

与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记 SVmc3

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,涉及一种分子标记,具体地,涉及一种与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记。本发明还涉及该分子标记的引物、该分子标记在谷子米粒颜色基因定位或谷子遗传育种中的用途、一种谷子米粒颜色基因定位方法、以及一种谷子育种方法。

背景技术

[0002] 谷子 (*Setaria italica* (L.) Beauv.) 起源于中国,是传统的优势作物、主食作物和抗旱耐瘠作物。谷子抗旱耐瘠、水份利用效率高、适应性广,不仅在目前旱作生态农业中有重要作用,而且针对日益严重的水资源短缺,谷子还是重要的战略储备作物。谷子去壳后的小米营养丰富且各种成分平衡,是具有营养保健作用的粮食作物,对人体有重要作用的食用粗纤维是大米的 5 倍,是近年来兴起的世界性杂粮热的主要作物。同时谷子秸秆粗蛋白含量在 8% 左右,饲草谷子秸秆粗蛋白含量在 15% 以上,是禾本科中最优质的饲草,在畜牧业发展中有重要作用。

[0003] 因此,加速谷子育种进程尤为重要。由于谷子属于小粟类作物,在遗传理论研究方面落后于玉米、小麦、水稻等禾谷类作物。如何应用先进科学的研究手段指导谷子育种是一个严峻的问题。随着分子生物学的发展,分子标记技术的出现,为谷子的遗传研究及育种开辟了新的思路和方法。开发与重要性状基因紧密连锁的分子标记并进行分子标记辅助选择育种,能显著提高我国谷子育种水平。

[0004] 随着生活水平的提高,大家在关注谷子产量的同时,更加注重其品质。米粒颜色与谷子的营养保健功效密切相关。但目前还没有文献报道谷子米色相关基因的定位研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术之缺陷,提供一种与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记、一种扩增与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记的引物对、一种谷子米粒颜色基因定位的方法、上述分子标记的检测方法、上述分子标记和引物对在谷子辅助育种或者谷子米粒颜色基因定位或检测中的用途、一种谷子辅助育种方法以及一种筛选上述分子标记的方法。

[0006] 本发明所提供的一种与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记,其含有 SEQ ID NO:1 所示序列;优选地,所述分子标记为 SEQ ID NO:1 所示序列。

[0007] 本发明所提供的一种扩增与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记的引物对,其引物 1 含有 SEQ ID NO:2 所示序列,引物 2 含有 SEQ ID NO:3 所示序列;优选地,引物 1 为 SEQ ID NO:2 所示序列,引物 2 为 SEQ ID NO:3 所示序列。

[0008] 本发明还提供了另一种与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记,其是由上述引物对以黄色米粒的谷子基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增得到的。

[0009] 具体地,上述另一种分子标记为 SEQ ID NO:1 所示序列。

[0010] 本发明所提供的一种谷子米粒颜色基因定位的方法,其包括使用上述任一种分子标记或者上述引物对的步骤。

[0011] 本发明所提供的上述分子标记的检测方法,其包括步骤:根据上述分子标记的核苷酸序列设计引物,以被检测谷子基因组 DNA 为模板进行扩增,并判断扩增产物中是否存在该分子标记。

[0012] 进一步地,上述检测方法中的引物为上述引物对。

[0013] 本发明还提供了上述分子标记或者上述引物对在谷子辅助育种或者谷子米粒颜色基因定位或检测中的用途。

[0014] 本发明所提供的一种谷子辅助育种方法,其包括检测上述分子标记或者用上述引物对进行检测的步骤。

[0015] 本发明所提供的一种筛选上述分子标记的方法,其包括以下步骤:

[0016] (1) 获得纯合型父本、母本基因组;

[0017] (2) 分别通过测序获得父本、母本基因组序列;

[0018] (3) 比较父本、母本基因组序列,获得差异位点;

[0019] (4) 构建遗传群体并收集表型数据;

[0020] (5) 对群体中的个体进行基因型分析;

[0021] (6) 结合基因型和表型数据,将谷子米粒颜色基因定位在基因组上;

[0022] (7) 在靠近目标基因的区段选择候选的分子标记。

[0023] 本发明具有以下有益效果:

[0024] 本发明提供了与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记,该分子标记将基因组 DNA 序列与谷子米粒颜色基因联系起来,有利于谷子分子标记辅助育种体系的建立;所述分子标记与谷子米粒颜色基因的遗传紧密连锁距离为 1.2cM。本发明的分子标记及分子标记扩增引物可以简便、快速、高通量地应用于谷子育种实践和资源及品种鉴定。

附图说明

[0025] 图 1 为利用分子标记引物 (SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3) 对父本、母本、RIL 群体 281 个单株进行扩增的扩增产物的部分电泳检测结果图。其中,泳道 1-5 为重组自交系 RIL 群体中 5 株米粒为黄色的谷子单株的 PCR 扩增产物;泳道 7-11 为重组自交系 RIL 群体中 5 株米粒为黑色的谷子单株的 PCR 扩增产物。泳道 6 为 marker,其分子量包括:2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp。

具体实施方式

[0026] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品,例如可以采购自 Illumina 公司。

[0027] 实施例 1:谷子 RIL 群体的构建

[0028] 父本:JZG,黄米。母本:MJG,黑米。父本和母本杂交得到 F1, F1 代通过单粒传法

得到 281 个重组自交系 RIL 株系 (F6 代)。

[0029] JZG、MJG、F1、重组自交系谷子种子均可在深圳华大农业与循环经济科技有限公司和张家口农科院谷子研究所购买。

[0030] 实施例 2 :基因组 DNA 的提取

[0031] 针对实施例 1 中获得的谷子 RIL 群体,用 CTAB 法分别提取父母本及 RIL 群体单株的基因组 DNA,具体方法如下:

[0032] (1) 称取 1.0g 新鲜叶片,剪碎放入研钵,用液氮研磨后加入 3mL 1.5×CTAB,研磨成匀浆转入 15mL 的离心管中,然后往研钵中加入 1mL 1.5×CTAB 冲洗再转入离心管中。混匀后于 65℃水浴 30min,期间不时缓慢摇匀。

[0033] 其中 1.5×CTAB 配方如下 (1L):

[0034]

CTAB	15g
1mol/L 的 Tris.Cl (pH 为 8.0)	75mL

[0035]

0.5mol/L 的 EDTA	30mL
NaCl	61.4g

[0036] 加去离子水定容至 1L,使用前加入终浓度为 0.2% (2ml) 的巯基乙醇。

[0037] (2) 待冷却至室温,加入等体积氯仿 / 异戊醇 (24:1),轻轻混匀,至下层液变为深绿色。

[0038] (3) 4200rpm 离心 10min,将上层水相移到新的 15mL 离心管,加 2 倍体积预冷的无水乙醇,混合静止 5min。于 -20℃放置 30min 沉淀 DNA。

[0039] (4) 4200rpm 离心 10min,弃掉上清,加入 1mL 75%乙醇洗涤沉淀 1 次,倒置离心管干燥 DNA,加入 200 μL TE 溶解 DNA。

[0040] (5) 用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测基因组 DNA。

[0041] (6) 将得到的父母本及 RIL 群体单株的基因组 DNA 存于 -20℃备用。

[0042] 实施例 3 :基因定位和分子标记开发

[0043] (1) 遗传图谱构建

[0044] 针对实施例 2 中获得的 RIL 个体的基因组 DNA,基于 RAD-seq 的基因分型技术 (http://www.bion.com.cn/server/show_product.asp?id=12291) 对 RIL 群体的个体进行基因分型,获得 RIL 群体的基因型数据。

[0045] 用 MapMaker 3.0 软件 (Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0, S Lincoln, M Daly, E Lander—Cambridge, MA:Whitehead Institute, 1992,通过参照将其全文并入本文) 进行遗传连锁图谱绘制,得到遗传连锁图。

[0046] (2) 基因定位

[0047] 针对实施例 1 中获得的 RIL 群体,将 RIL 群体的个体表型,与父本型性状相似的记为 a,与母本型性状相似的记为 b,性状居于父本和母本之间的记为 h。得到全部个体的表型数据,将个体的表型数据与之前得到的基因型数据进行比较,从而将谷子米粒颜色基因

定位在遗传连锁图谱上。结果显示,谷子米粒颜色基因定位在 6 号染色体 34656385bp 至 34732860bp 区间内,长度约为 76475bp。

[0048] (3) 分子标记开发

[0049] 将父本和母本分别进行全基因组重测序 (10X),然后根据 RAD-seq 的测序结果,利用 SOAP 软件比对测序 reads,然后用 SOAPsv 寻找父母本基因组片段差异较大的分子标记,便于用凝胶电泳区分鉴别。

[0050] 结果,选择靠近谷子米粒颜色基因所在区段的标记 SVmc3 (SEQ ID NO:1 所示的核酸序列) 作为候选。

[0051] SVmc3 的核苷酸序列如下 (207bp) :

[0052] CTCGCTTCTCGCTTTTCGCTTCTCGTAGTTCAAATCGTTGAAGCGGCTTACCACATAAGCGAGAATCGG TGGAAATAAGCAAAGCGTTTGGCGGGATTCTTGCTTATTTCCACCGATAAGCCGCTTATAAGCGGATACAAACGGGG CCTCTGTCTGCGTGCAACTTCATTTTCAGCTGAAGATAGTCTCTGTTTCATCGCGCGATCGT (SEQ ID NO:1)。

[0053] 实施例 4 :分子标记的米粒颜色相关性验证

[0054] 对实施例 3 中确定的谷子米粒颜色相关分子标记 SVmc3 (SEQ ID NO:1 所示的核酸序列) 进行验证,具体如下 :

[0055] 在实施例 3 制得的遗传连锁图谱的基础上,根据与谷子米粒颜色基因的遗传连锁距离,在与谷子米粒颜色基因的遗传紧密连锁距离为 1.2cM 的位置确定了分子标记引物对 (SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3),并找到对应的父本序列位置,上下游引物之间的序列即包含了分子标记,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0056] 针对上述分子标记设计引物,引物序列如下所示 :

[0057] 正向引物 :5' -GGATGATTACTGACGAACC-3' (SEQ ID NO:2) ;

[0058] 反向引物 :5' -TGTACCATGCATCGTCAATA-3' (SEQ ID NO:3)。

[0059] 利用上述引物,通过 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测来验证该标记的多态性和扩增稳定性。

[0060] 具体地,以实施例 2 中提取的父本、母本、RIL 群体单株的基因组 DNA 为模板,利用上述扩增引物进行 PCR 扩增,其中,

[0061] PCR 反应体系如下 :

[0062]

无菌水	20.2 μ l
10*Buffer (含 Mg^{2+})	2.5 μ l
dNTPs (25mM)	0.15 μ l
Taq 酶 (5U/ μ l)	0.15 μ l
正向引物 (10 μ mol/L)	0.5 μ l
反向引物 (10 μ mol/L)	0.5 μ l
模板	1.0 μ l

总体积	25 μ l
-----	------------

[0063] PCR 反应程序如下：

[0064] 94℃预变性 5 分钟；94℃变性 30 秒，60℃退火 30 秒，72℃延伸 40 秒，运行 35 个循环；最后 72℃延伸 3 分钟。PCR 扩增产物经纯化后于 4℃下保存。

[0065] 接着，将各 PCR 扩增产物取部分进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图 1。如图 1 所示，米粒黄色的单株均扩增出 623bp 的条带，米粒黑色的单株均扩增出 416bp 的条带。由此证明该分子标记 SVmc3 (SEQ ID NO:1 所示的核酸序列) 在父母本之间具有多态性，该分子标记与谷子米粒颜色性状紧密连锁。

[0066] 然后，利用 3730 测序仪对各扩增产物进行测序，结果，父本及 RIL 群体中米粒黄色的单株扩增条带，与母本及 RIL 群体中米粒黑色的单株扩增条带相比增加了一些序列，该序列即为分子标记 SVmc3 (SEQ ID NO:1 所示的核酸序列)。

[0067] 此外，利用上述扩增引物 (SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3) 扩增含有该米粒颜色位点的其它群体，米粒黄色的单株均扩增出 623bp 的条带，米粒黑色的单株均扩增出 416bp 的条带。由此证明该分子标记使用于含有该米粒颜色位点的其它群体。

[0068] 黄色米粒扩增产物的核苷酸序列如下 (623bp)：

[0069] GGATGATTACTGACGAACC AACTGTTTGATGTGGTGACGTGCGGTAGTTTCTCTTGAATC
CGTGTCTCCATGCAGCATGTTGTTTGCTTGAGCTTTTCTTTCTGAATTCTGAGATTTAACGTGACTGCAA
TTGAACGACTCTGATCCTATTTGTATACACTTTTTCTAGCCACGCTTAGATTATAATCTAAGCGAAGATT
TT CTCGCTTCTCGCTTTTCGC
TTCTCGTAGTTCAAATCGTTGAAGCGGCTTACCACATAAGCGAGAATCGGTGAAATAAGCAAAGCGTTT
GGCGGGATTCTTGCTTATTTCCACCGATAAGCCGCTTATAAGCGGATACAAACGGGGCCTCTGTCTGCGTG
CAACTTCATTTAGCTGAAGATAGTCTCTGTTTCATCGCGCGATCGT TGCTCAAGCTTAAGCTGACCCCATT
TTAGAAGGGCATTAAAGAACAAGTGGGCAGTCGTTGACTGAAAAACACGGTGACATTGTCAATGCAATTCTAGTGTTG
CGAAATGCTCCATCCGATTCAGAATGCACGTCAGTTTGGGATTCTCAGCGCTCAAGCTCTTTAATCATCAACCTAT
AAAAAGAGTTACGCA TATTGACGATGCATGGTACA (SEQ ID NO:4)。

[0070] 黑色米粒扩增产物的核苷酸序列如下 (416bp)：

[0071] GGATGATTACTGACGAACC AACTGTTTGATGTGGTGACGTGCGGTAGTTTCTCTTGAATCCGTGTCT
CCATGCAGCATGTTGTTTGCTTGAGCTTTTCTTTCTGAATTCTGAGATTTAACGTGACTGCAATTGAACGACTCTGA
TCCTATTTGTATACACTTTTTCTAGCCACGCTTAGATTATAATCTAAGCGAAGATTTTGGCTCAAGCTTAAGCTGAC
CCCATTTTAGAAGGGCATTAAAGAACAAGTGGGCAGTCGTTGACTGAAAAACACGGTGACATTGTCAATGCAATTCTA
GTGTTGCGAAATGCTCCATCCGATTCAGAATGCACGTCAGTTTGGGATTCTCAGCGCTCAAGCTCTTTAATCATCA
ACCTATAAAAAGAGTTACGCA TATTGACGATGCATGGTACA (SEQ ID NO:5)。

[0072] 上述核苷酸序列中，斜体下划线部分为引物设计区段，粗体下划线部分为分子标记的序列。分子标记 SVmc3 与谷子米粒颜色基因的遗传紧密连锁距离为 1.2cM。

[0073] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

序列表

<110> 深圳华大农业与循环经济科技有限公司, 深圳华大基因研究院

<120> 与谷子米粒颜色基因紧密连锁的分子标记 SVMc3

<130> P2015-1-0088. CN

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 207

<212> DNA

<213> 谷子(*Setaria italica* (L.) Beauv.)

<400> 1

ctcgettetc gcttttcgct tctcgtagtt caaatcgttg aagcggctta ccacataagc 60

gagaatcggg ggaaataagc aaagcgtttg gcgggattct tgcttatttc caecgataag 120

ccgcttataa gcggatacaa acggggcctc tgtctgegtg caattcatt teagetgaag 180

atagtctctg tttcatcgcg cgategt 207

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ggatgattac tgacgaacc 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<400> 3

tgtaccatgc atcgtcaata 20

<210> 4

<211> 623

<212> DNA

<213> 谷子(*Setaria italica* (L.) Beauv.)

<400> 4

ggatgattac tgacgaacca actgtttgat gtggtgacgt gcggtagttt ctettgaate 60

cgtgtctcca tgcagcatgt tgtttgcttg agcttttett tctgaattct gagatttaac 120

gtgactgcaa ttgaacgact ctgacctat ttgtatacac ttttctage cacgcttaga 180

ttataateta agcgaagatt ttctccttc tgcctttctg cttctcgtag ttcaaategt 240

tgaagcgget taccacataa gcgagaatcg gtggaaataa gcaaagcgtt tggcgggatt 300

cttgettatt tccaccgata agcccttat aagcggatac aaacggggcc tctgtctgeg 360

tgeaacttca tttcagctga agatagtctc tgtttcctcg cgcgatcgtt gctcaagctt 420

aagctgacce catttttagaa ggcaattaag aacaagtggg cagtcgttga ctgaaaaaca 480

cggtgacatt gtcaatgcaa ttctagtgtt gcgaaatgct ccatcctgatt cagaatgcac 540

gtcagtttgg gattctcage gctcaagctc ttttaateat caacctataa aaagagttac 600

geatattgac gatgcatggt aca 623

<210> 5

<211> 416

<212> DNA

<213> 谷子(*Setaria italica* (L.) Beauv.)

<400> 5

ggatgattac tgacgaacca actgtttgat gtggtgacgt gcggtagttt ctettgaate 60

cgtgtctcca tgcagcatgt tgtttgcttg agcttttett tctgaattct gagatttaac 120

gtgactgcaa ttgaacgact ctgacctat ttgtatacac ttttctage cacgcttaga 180

ttataateta agcgaagatt ttgtctcaag cttaagctga ccccatitaa gaagggcatt 240

aagaacaagt gggcagtcgt tgactgaaaa acacggtgac attgtcaatg caattctagt 300

[0003]

gttgcgaaat gctccatccg attcagaatg cacgtcagtt tgggattctc agcgctcaag	360
ctcttitaat catcaacctt taaaaagagt tacgcatatt gaegatgcat ggtaca	416

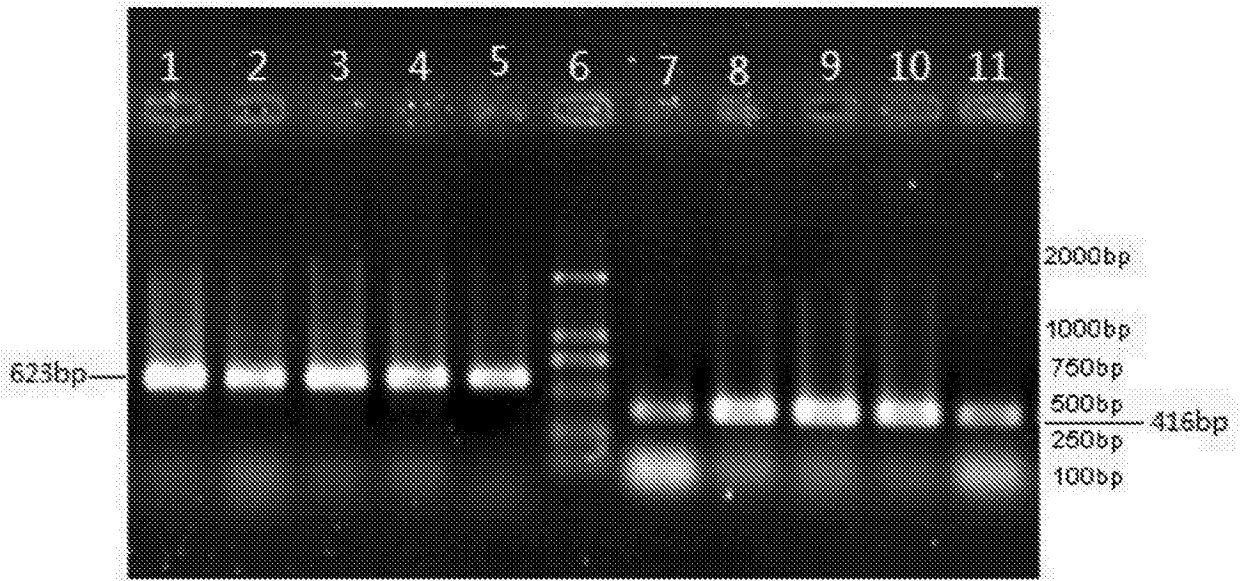


图 1