



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113308564 B

(45) 授权公告日 2022.04.29

(21) 申请号 202110734528.1

CN 109593876 A, 2019.04.09

(22) 申请日 2021.06.30

CN 112980996 A, 2021.06.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 110592102 A, 2019.12.20

申请公布号 CN 113308564 A

CN 108893551 A, 2018.11.27

CN 110592264 A, 2019.12.20

(43) 申请公布日 2021.08.27

KR 20120050840 A, 2012.05.21

(73) 专利权人 山东省农业科学院

Chuanzhi Zhao等.Genome-Wide Discovery of Microsatellite Markers from Diploid Progenitor Species, *Arachis duranensis* and *A. ipaensis*, and Their Application in Cultivated Peanut (*A. hypogaea*).《Frontiers in Plant Science》.2017,第8卷

地址 250100 山东省济南市历城区工业北路202号

zhangkundeng.BSA-Seq and Genetic Mapping Reveals *AhRt2* as a Candidate Gene Responsible for Red Testa of Peanut.《Research Square》.2021,第1-20页.

(72) 发明人 赵传志 王兴军 袁美 张鲲

侯蕾 厉广辉 田锐铮 夏晗

李鹏呈 赵术珍 李长生 李爱芹

潘教文

Yuhan Zhao等.Whole-genome resequencing-based QTL-seq identified *AhTc1* gene encoding a R2R3-MYB transcription factor.《Plant Biotechnology Journal》.2019,第18卷第96-105页.

(74) 专利代理机构 北京东方盛凡知识产权代理事务所(普通合伙) 11562

代理人 程小芳

审查员 陈依晗

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图2页

(56) 对比文件

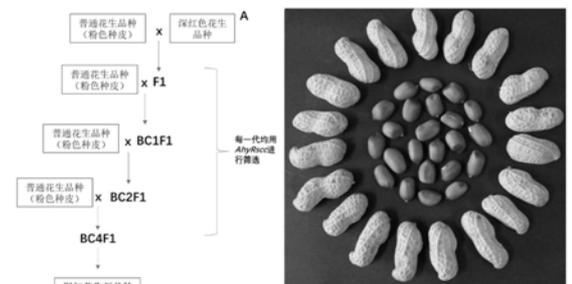
AU 2021104168 A4, 2021.08.26

(54) 发明名称

一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl及其应用,属于农业生物技术领域,该分子标记AhyRsccl的特异性引物对包括:核苷酸序列如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示的引物;本发明的分子标记可以有效的鉴定花生的深红色种皮颜色,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。



CN 113308564 B

1. 一种鉴定花生种皮颜色的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 提取花生种子或者叶片DNA;

(2) 采用分子标记AhyRsccl的特异性引物对对所提取的DNA进行PCR扩增;

(3) 经步骤(2)得到的扩增产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,若出现271bp大小的特征条带,则判定待测花生材料下代种子为深红色种皮;

所述分子标记AhyRsccl的特异性引物对包括:

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,在步骤(2)中,所述PCR扩增总体积25uL: DNA模板20-30ng/uL 1uL,特异性引物对0.5pmol/uL各0.5uL,10mM dNTP mix 0.5uL,10×Taq Buffer 2.5uL,25mM MgCl<sub>2</sub> 2.0uL,Taq酶5U/uL 0.25uL,加水至25uL。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述PCR扩增反应条件:预变性95℃4min;94℃30s,58℃30s,72℃25s,35个循环;72℃延伸5min。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

5. 一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl的应用,其特征在于,所述分子标记AhyRsccl位于12号染色体117.03-117.56Mb的区域内,所述分子标记AhyRsccl用于鉴定深红色种皮花生;

所述分子标记AhyRsccl的特异性引物对包括:

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。

## 一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl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深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl及其应用。

### 背景技术

[0002] 花生是我国重要的油料和经济作物,年种植面积7000万亩左右,产量约1700万吨。花生富含脂肪酸、蛋白质、维生素E和钙、铁、锌、硒等微量元素,还富含白藜芦醇等功能活性物质,具有重要的保健作用,民间称为“长生果”。花生种皮,特别是深红色的花生种皮,富含天然色素,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,花生种皮也被称为花生红衣,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。花生红衣色素作为抗衰老保健品功效性材料,具有诱人的市场应用前景。然而,现有的花生品种以粉红色的为主,深红色的花生品种较少,而且和常规品种相比产量偏低,难以大面积推广(孙奇泽,2015;李朝霞等,2016)。因此,提高深红色花生品种的产量是满足市场需求的根本途径。

[0003] 花生的种皮也是由珠被发育而来的,和其他性状相比,种皮颜色要隔代才能显现,这一特性使得传统育种手段培育深红色种皮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,对于深红色种皮性状来说,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,能够加速深红色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深红色种皮相关基因及分子标记的报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl及其应用,以解决上述现有技术存在的问题,该分子标记可用于花生分子育种及其品质改良,有利于快速得到新的种质资源。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0006] 本发明提供一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl,所述分子标记AhyRsccl的特异性引物对包括:

[0007] 核苷酸序列如SEQ ID No.1所示的引物;

[0008] 核苷酸序列如SEQ ID No.2所示的引物。

[0009] SEQ ID No.1:5'-GGTAATATAATGTTAACGGCC-3';

[0010] SEQ ID No.2:5'-GAAAAAGCAAAGTTGAAGGAA-3'。

[0011] 本发明还提供利用上述的与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl鉴定花生种皮颜色的方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 提取花生种子或者叶片DNA;

[0013] (2) 采用上述的特异性引物对对所提取的DNA进行PCR扩增;

[0014] (3) 经步骤(2)得到的扩增产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,若出现271bp大小的特征条带,则判定待测花生材料下代种子为深红色种皮。

[0015] 进一步地,在步骤(2)中,所述PCR扩增总体积25uL:DNA模板 20-30ng/uL 1uL,特异性引物对0.5pmol/uL各0.5uL,10mM dNTP mix 0.5 uL,10×Taq Buffer 2.5uL,25mM MgCl<sub>2</sub> 2.0uL,Taq酶5U/uL 0.25uL,加水至25uL。

[0016] 进一步地,在步骤(2)中,所述PCR扩增反应条件:预变性95°C 4 min;94°C 30s,58°C 30s,72°C 25s,35个循环;72°C延伸5min。

[0017] 进一步地,在步骤(3)中,采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

[0018] 本发明还提供一种如上述的与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记 AhyRsccl 的应用,进一步地,所述分子标记AhyRsccl位于12号染色体117.03- 117.56Mb的区域内,所述分子标记AhyRsccl用于花生育种和/或花生品质改良中。

[0019] 进一步地,用于鉴定深红色种皮花生。

[0020] 本发明公开了以下技术效果:

[0021] 本发明公开了一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl,可以用于鉴定深红色种皮的花生,花生的种皮由珠被发育而来,相比其他性状,种皮颜色要在隔代才能显现,例如,粉红种皮做母本与深红色花生父本进行杂交,F1种皮是粉红色(母本)的,F2种皮是浅红色(双亲中间型)的,F3种皮才出现性状分离。因此通过肉眼筛选和培育深红色花生存在很大的盲目性。利用本发明提供的标记,可以通过检测花生的DNA提前确定下一代收获材料的种皮颜色,提高育种效率。

[0022] 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,很多标记难以有效的区分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。

[0023] 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。

[0024] 本发明的分子标记可以有效的鉴定花生的深红色种皮颜色,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。

## 附图说明

[0025] 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。

[0026] 图1为通过全基因组重测序结合聚类分离分析法对控制花生红色种皮颜色的基因进行初定位;其中,A:利用分离群体构建极端池进行BSA-seq分析,B:与深红色种皮连锁标记在花生基因组上的分布,C:与深红色种皮紧密连锁标记在花生12号染色体上的分布;

[0027] 图2为利用BSR验证深红色种皮性状连锁区域;其中,A:控制花生深红色基因的精细定位和紧密连锁分子标记AhyRsccl的开发,B:分子标记AhyRsccl在不同颜色花生材料中的验证结果;

[0028] 图3为花生种子的取样,及取样后花生种子的发芽试验;其中,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4为分子标记辅助轮回选择的育种方案快速培育高产深红色花生品种;其中,A:分子标记辅助选择的流程,B:通过分子标记筛选获得的部分深红色花生新品系。

## 具体实施方式

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 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,用以公开和描述与所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。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 实施例1控制花生深红色种皮颜色基因的定位及与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsccl的设计

[0036] 为了定位控制花生深红色种皮颜色基因,发明人利用粉红种皮花生品种(母本)远杂9102与深红色种皮花生品种(父本)中花12号进行杂交,构建了分离群体,遗传分析表明花生的种皮颜色是由单基因控制的。

[0037] 通过对F<sub>2</sub>和F<sub>3</sub>代的表型分析,选取33个极端红色和33个极端粉色的材料分别构建了深红色和粉色的极端池,与亲本中花12号和远杂9102一起进行全基因组重测序,对亲本和极端池的测序量分别是30Gb和90Gb(图1A)。对重测序数据通过集群分离分析法(BSA)进行分析,并统计了连锁SNP位点在花生基因组上的分布,发现大部分的连锁位点都集中在12号染色体(图1B),表明控制花生深红色种皮颜色的主效基因可能在12号染色体。进一步的分析发现,这些连锁的SNP位点大多集中在12号染色体111.56-117.66Mb的区间,表明该区段与花生深红色种皮颜色紧密连锁(图1C)。

[0038] 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,将控制花生深红色种皮颜色的关键基因精细定位并锁定在12号染色体117.03-117.56Mb区间内(图2A)。同时,发明人发现标记AhyRsccl与深红色种皮颜色紧密连锁,并在不同颜色种质材料中得到了验证(图2B)。证明标记AhyRsccl是判断花生种皮颜色的有效标记。

[0039] 实施例2利用分子标记AhyRsccl快速培育高产深红色花生新品种

[0040] 通过利用分子标记AhyRsccl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)改良为深红色种皮的花生新品种,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深红色的定向改良。

[0041] 以普通花生品种丰花1号作为轮回亲本,深红色花生品种中花12号作为供体父本,花生深红色种皮颜色改良的具体步骤包括:

[0042] (1) 杂交

[0043] 以HF001为母本(轮回亲本),深红色花生品种中花12号为父本,进行杂交。杂交方法如下:在母本HF001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,再用手指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。授粉前先采集父本中花12号的花,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。

[0044] (2) 杂交F<sub>1</sub>真伪的鉴定

[0045] 利用分子标记AhyRsccl对收获的杂交F<sub>1</sub>代的真伪进行鉴定。方法如下:

[0046] 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3)。

[0047] DNA提取:提取待测花生种子的DNA,具体方法如下:

[0048] (1) 对装有花生组织的1.5mL离心管用液氮速冷,然后研磨;

[0049] (2) 在65℃水浴中预热CTAB提取液(2%CTAB,1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA (pH8.0),100mmol/L Tris-HCl (pH8.0),2% pvp-40);

[0050] (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;

[0051] (4) 加1倍体积的苯酚/氯仿/异戊醇(体积比12:12:1),混匀;

[0052] (5) 12000rpm室温离心10min;

[0053] (6) 将上清转移至一新的离心管中;

[0054] (7) 用氯仿/异戊醇(体积比24:1)重复(4)~(6)步;

[0055] (8) 加0.7倍体积-20℃预冷的异丙醇,颠倒混匀,室温放置10min;

[0056] (9) 12000rpm室温离心15min;

- [0057] (10) 倒掉上清,用500 $\mu$ l-20 $^{\circ}$ C预冷的70%乙醇洗涤沉淀2~3次;
- [0058] (11) 沉淀干燥后,用50 $\mu$ l去离子水或TE溶解DNA,置于-20 $^{\circ}$ C备用。
- [0059] (12) 吸取5 $\mu$ l溶解的DNA,加入45 $\mu$ l去离子水,混匀制得花生的基因组DNA待用。
- [0060] PCR反应及电泳检测:利用AhyRsccl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。
- [0061] PCR扩增反应体系如下:
- [0062] 扩增总体积25 $\mu$ l:
- [0063] DNA模板20-30ng/ $\mu$ l 1 $\mu$ l,
- [0064] AhyRsccl特异引物对0.5pmol/ $\mu$ l各0.5 $\mu$ l,
- [0065] 10mM dNTP mix 0.5 $\mu$ l,
- [0066] 10 $\times$ Taq Buffer 2.5 $\mu$ l,
- [0067] 25mM MgCl<sub>2</sub> 2.0 $\mu$ l,
- [0068] Taq酶5U/ $\mu$ l 0.25 $\mu$ l,
- [0069] 加水至25 $\mu$ l;
- [0070] PCR反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 25 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。
- [0071] 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。
- [0072] 其中,配制8%变性聚丙烯酰胺凝胶方法如下:
- [0073] 在10 $\mu$ l扩增产物中加入3 $\mu$ l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);
- [0074] 电泳缓冲体系为1 $\times$ TBE(90mM Tris-borate pH 8.3,2mM EDTA),120V 电泳4h左右。
- [0075] 30ml的8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配制如表1所示:
- [0076] 表1 30ml的8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配制

	40%丙烯酰胺 (Acr : Bis = 39 : 1)	6 ml
[0077]	5 $\times$ TBE	6 ml
	H <sub>2</sub> O	18 ml
[0078]	20%过硫酸铵	240 $\mu$ l
	TEMED	24 $\mu$ l
	总体积	30 ml

- [0079] 银染检测,方法如下:
- [0080] a. 0.1%硝酸银溶液500ml染色15-20min。
- [0081] b. 去离子水快速漂洗15sec左右。
- [0082] c. 显影液(1000ml去离子水+20g NaOH+0.5g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,1.5ml甲醛现用 现加)显色,不断摇动,直至DNA条带清晰可见。
- [0083] d. 自来水漂洗。
- [0084] e. 扫描照相,

[0085] (3)回交和后代的筛选

[0086] 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。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 $F_1$ 作为父本进行杂交,杂交的方法同上,对收获的 $BC_1F_1$ 再次利用AhyRscC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 $BC_4F_1$ 代,然后进行自交,后选 择纯和的后代,进行考种和品种登记。

[0087] 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深红色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年左右时间内实现深红色花生的种质创新(图4)。与传统方法相比,效率更高。

[0088] 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。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 山东省农业科学院
- [0003] <120> 一种与花生深红色种皮紧密连锁的分子标记AhyRsc<sub>c</sub>及其应用
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 21
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] ggtaatataa tgttaacggc c 21
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 21
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] gaaaaagcaa agttgaagga a 21

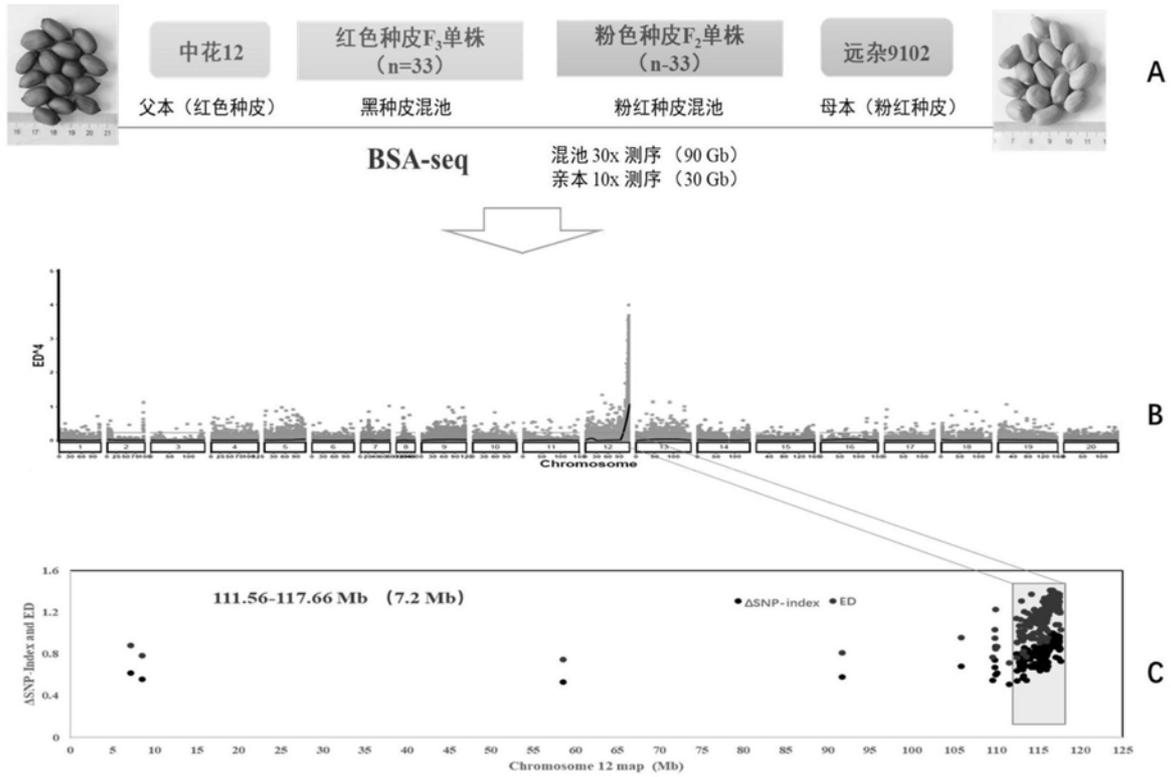


图1

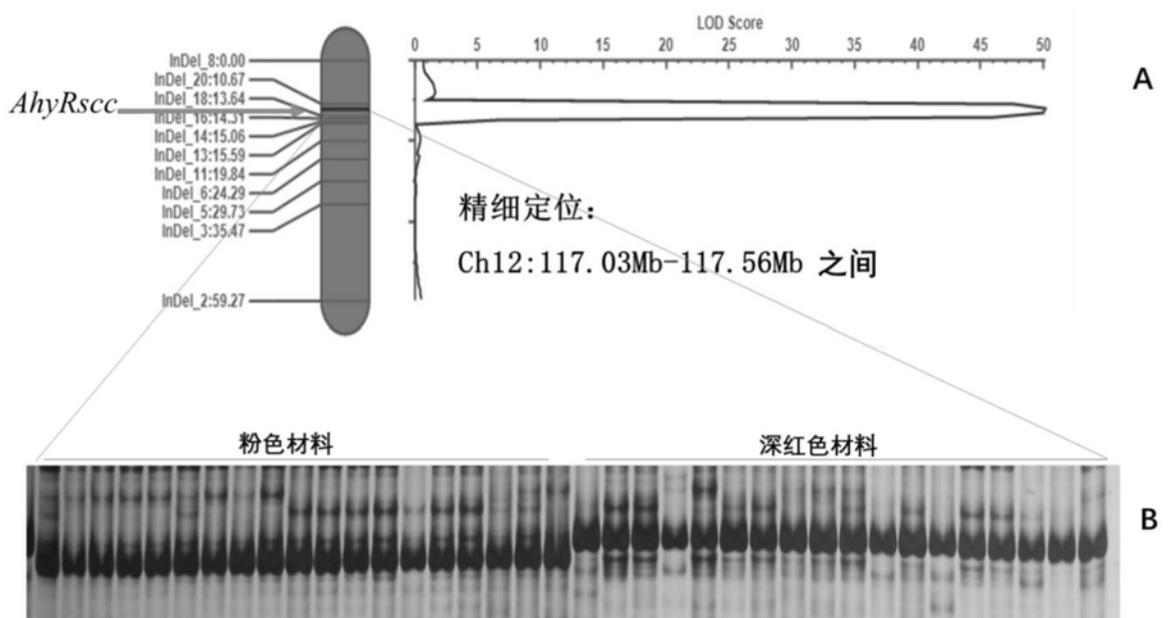


图2

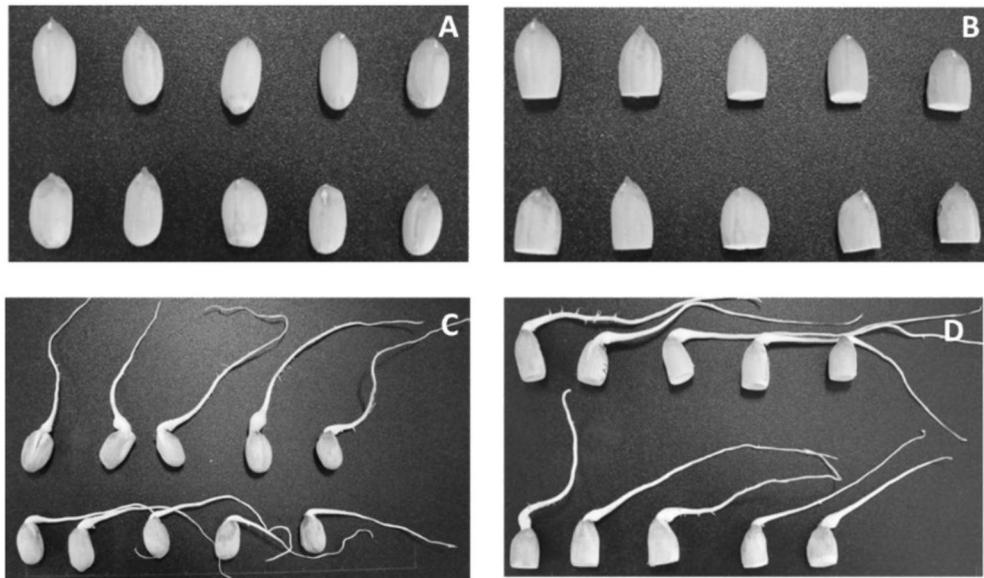


图3

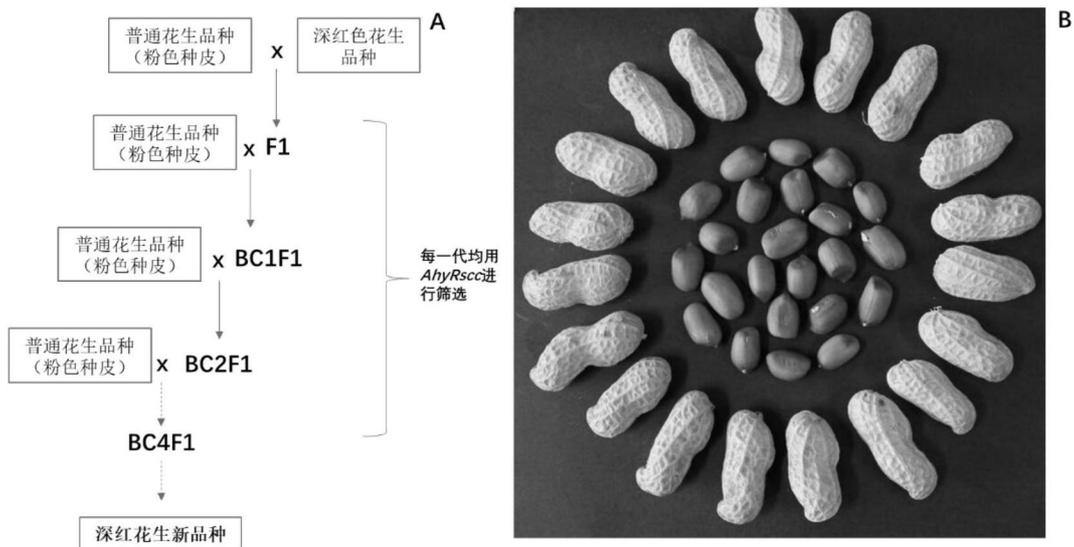


图4