



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116334300 B

(45) 授权公告日 2023.08.18

(21) 申请号 202310610769.4

(22) 申请日 2023.05.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116334300 A

(43) 申请公布日 2023.06.27

(73) 专利权人 鲁东大学
地址 264025 山东省烟台市芝罘区红旗中
路184号

(72) 发明人 秦冉 曹鸣苏 陈林渠 郭浩儒
刘志霄 史欣瑶 田赵飒爽
黄振杰 郭庆杰 崔法 赵春华
吴永振 孙晗

(74) 专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限
公司 11429
专利代理师 顾明月

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103451183 A, 2013.12.18

CN 109913573 A, 2019.06.21

马天航等. 小麦不育小穗数QTL-qSsnps-5D
遗传及育种选择效应解析.《植物遗传资源学
报》.2021,第23卷(第2期),第811-822页.

审查员 刘远

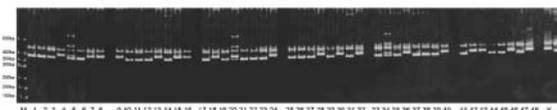
权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子
标记及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种与小麦每穗小穗数主效
QTL紧密连锁的分子标记及其应用,属于小麦育
种领域。所述分子标记为SNPS-7D10,核苷酸序
列如SEQ ID NO:3所示,可由SEQ ID NO:1所示的
上游引物和SEQ ID NO:2所示的下游引物扩
增得到,该分子标记SNPS-7D10可用于鉴定/
辅助鉴定小麦每穗小穗数性状及选育具有
增加每穗小穗数基因型的小麦。本发明有益
之处在于:分子标记SNPS-7D10充分体现了
小麦品种(系)的每穗小穗数主效QTL,用
SEQ ID NO:1所示的上游引物和SEQ ID NO:2
所示的下游引物进行PCR扩增,能精准地
判断小麦品种(系)是否具有每穗小穗数
主效QTL。



1. 引物对在鉴定小麦科农9204和京411及其子代每穗小穗数性状中的应用,所述引物对由SEQ ID NO:1所示的上游引物和SEQ ID NO:2所示的下游引物组成。
2. 引物对在选育小麦科农9204和京411及其子代中具有增加每穗小穗数小麦中的应用,所述引物对由SEQ ID NO:1所示的上游引物和SEQ ID NO:2所示的下游引物组成。

与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分子标记及其应用,具体涉及一种与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记及其在小麦辅助育种及遗传改良中的应用,属于小麦分子生物技术与育种技术领域。

背景技术

[0002] 小麦是世界上最重要的三大粮食作物之一,是人们重要的能量摄入和蛋白质来源。穗粒数、单位面积穗数和千粒重是构成小麦产量的三大要素。研究表明,穗粒数增加可为提高小麦产量做出极大贡献,将穗粒数作为小麦高产育种的主攻目标是非常有效的。每穗小穗数、每小穗粒数和可育小花数决定了穗粒数,进而显著影响小麦产量。揭示小麦小穗数形成的遗传基础,对于培育优质高产的小麦品种具有重要的理论及实践意义。

[0003] 小麦每穗小穗数是由多基因控制的复杂数量性状,受多个基因位点的共同调控且易受到环境影响,是影响小麦产量的重要因素之一。小麦常规育种效率低、时间长,育种进程缓慢,近年来随着现代分子生物学技术的快速发展,极大地提高了复杂性状遗传位点研究的准确性。对控制重要性状的基因进行定位和作图,遗传分离群体的构建和自然群体的选择及其表型与基因型的获取是开展 QTL 定位的前提。

[0004] 在以往的研究中,通过对重组自交系(RIL)群体、DH群体、 F_2 群体和回交群体中的小穗数进行遗传作图,发现许多控制小穗数的QTL几乎遍布所有染色体。Kato K 和Miura H等利用RIL群体在5A染色体上检测到三个控制总小穗数的QTL。Ma Z和Zhao D等利用RIL群体和 F_2 群体在1B、2D、3B、5A、5B、7A和7D染色体上检测到控制小穗数的QTL,并在1A、2D、3B、6A、7A和7D染色体上定位到控制可育小穗数的QTL。Chen D 和 Wu X等通过构建 $F_{2:3}$ 群体进行小穗数QTL定位,在1A、1D、4A、3D和7B染色体上分别检测到5个相关QTL位点。

[0005] 虽然目前报道了大量的的小穗数QTL位点,但与之紧密连锁的分子标记仍较少,限制了分子标记的应用。分子标记辅助育种是利用分子标记与决定目标性状位点紧密连锁的关系,通过检测分子标记进而检测目的基因的存在,从而能够快速、准确、高效、不受环境条件干扰地在育种早期选择目标性状,加快育种效率。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于:提供一种与小麦每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*紧密连锁的分子标记及其应用。

[0007] 为了实现上述目标,本发明采用如下的技术方案:

[0008] 一种与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记,所述分子标记为SNPS-7D10,其位于小麦的7D染色体上,核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,序列长度391bp,可由SEQ ID NO:1所示的上游引物和SEQ ID NO:2所示的下游引物扩增得到,所述上游引物和下游引物均为单链DNA分子。

[0009] 前述的与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记SNPS-7D10的应用包括:在

鉴定或辅助鉴定小麦每穗小穗数性状中的应用,以及在选育具有增加每穗小穗数基因型的小麦中的应用。

[0010] 前述的与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记SNPS-7D10鉴定或辅助鉴定小麦每穗小穗数性状或选育具有增加每穗小穗数基因型的小麦的方法,包括以下步骤:

[0011] 步骤1:提取待测小麦品种或品系的基因组DNA;

[0012] 步骤2:以待测小麦品种或品系的基因组DNA为模板,用SEQ ID NO:1所示的上游引物和SEQ ID NO:2所示的下游引物进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;

[0013] 步骤3:将得到的PCR扩增产物在6.0%的非变性聚丙烯酰胺凝胶上稳压电泳分离,如果出现了分子量大小为391bp的扩增片段,则该小麦品种或品系含有增加小麦每穗小穗数的等位基因,如果没有出现分子量大小为391bp的扩增片段,则该小麦品种或品系不含有增加小麦每穗小穗数的等位基因。

[0014] 优选的,在步骤2中,PCR扩增反应体系为10 μ l,具体包括:

[0015] 0.5 μ l浓度为10 μ mol/l的SEQ ID NO:1所示的上游引物;

[0016] 0.5 μ l浓度为10 μ mol/l的SEQ ID NO:2所示的下游引物;

[0017] 1 μ l浓度为50ng/ μ l的DNA模板;

[0018] 5 μ l 2 \times Taq PCR预混试剂;

[0019] 3 μ l ddH₂O。

[0020] 优选的,在步骤2中,PCR扩增程序具体如下:

[0021] 95 $^{\circ}$ C预变性5min;

[0022] 95 $^{\circ}$ C变性30s,57 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,循环34次;

[0023] 72 $^{\circ}$ C延伸5min,12 $^{\circ}$ C保存。

[0024] 优选的,在步骤3中,电泳缓冲液为1 \times TBE,电泳采用 147V恒压,电泳时间为2.5h。

[0025] 本发明的有益之处在于:

[0026] (1)本发明提供的与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记SNPS-7D10充分体现了小麦品种或品系的每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*,以待测小麦品种或品系的基因组DNA为模板,用SEQ ID NO:1所示的上游引物和SEQ ID NO:2所示的下游引物对小麦品种或品系进行PCR扩增,能精准地判断小麦品种或品系是否具有该每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*,从而能够快速筛选出具有增加小麦每穗小穗数的小麦品种或品系用于育种,加快高产优质小麦新品种的选育进程;

[0027] (2)利用本发明提供的与小麦每穗小穗数主效QTL紧密连锁的分子标记SNPS-7D10鉴定或辅助鉴定小麦每穗小穗数性状或选育具有增加每穗小穗数基因型的小麦时,只需检测PCR扩增产物的特性,就可以辨别小麦每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*基因位点的增效变异存在与否,从而预测小麦的每穗小穗数表型,用于指导小麦产量性状改良的育种工作,除(1)中所述优点外,还具有以下优点:所鉴定材料受环境影响较小,选择目标明确,节约生产成本,小麦品种或品系的选择效率和质量大大提高,直接实现了目标基因在小麦种质资源以及育种后代中鉴定的目的,为小麦育种提供更多新的每穗小穗数基因标记资源。

附图说明

[0028] 图1是小麦每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*在7D染色体上的作图区间及InDel 标记

SNPS-7D10位置图,其中,空心长方形代表染色体,染色体左侧是分子标记的名称,染色体右侧数字是分子标记在染色体上的位置,单位是Mb;图中共有两种分子标记,SNPS-7D10为InDel标记,其余为SNP标记;染色体右侧黑色的长方形分别表示每穗小穗数在不同环境下的QTL作图区间;

[0029] 图2是分子标记SNPS-7D10在KJ-RIL群体的部分家系中的PCR扩增结果图,其中,M是50bp DNA Ladder,1~48是KJ-RIL部分家系,K是科农9204,J是京411;

[0030] 图3是不同环境下基于分子标记SNPS-7D10的每穗小穗数的单标记分析结果图,其中,黑色条柱是来自科农9204的增加每穗小穗数的等位基因,白色条柱是来自京411的减少每穗小穗数的等位基因,**表示差异极显著($P<0.01$),*表示差异显著($P<0.05$)。

实施方式

[0031] 以下结合附图和具体实施例对本发明作具体的介绍。

[0032] 本发明所用小麦品种科农9204为审定品种,于2002年通过河北省农作物品种审定委员会审定,于2003年通过国家农作物品种审定委员会审定,品种审定编号为国审麦2003037。

[0033] 本发明所用小麦品种京411为审定品种,于1991年通过北京市农作物品种审定委员会审定,于1992年通过天津市农作物品种审定委员会、山西省农作物品种审定委员会和国家农作物品种审定委员会审定,京411可以从国家农作物种质资源库索取,全国统一编号为ZM020984。

[0034] 本发明所用的 $2\times$ Taq PCR预混试剂由天根生化科技(北京)有限公司生产,规格具体为KT211-02(1ml,含染料,蓝色),该预混试剂含有Taq DNA聚合酶、dNTPs、 $MgCl_2$ 、反应缓冲液、PCR反应的增强剂和优化剂以及稳定剂,具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点,可最大限度减少人为误差。

[0035] 本发明所用的质量浓度为6.0%的非变性聚丙烯酰胺凝胶的配制方法为:将5.85g丙烯酰胺和0.15g甲叉丙烯酰胺溶于100ml蒸馏水中。

[0036] 一、设计和开发与小麦每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*紧密连锁的分子标记

[0037] 设计和开发与小麦每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*紧密连锁的分子标记,具体步骤如下:

[0038] (1)以7D染色体上等位基因表现为每穗小穗数多的小麦品种科农9204为母本、以7D染色体上等位基因表现为每穗小穗数少的小麦品种京411为父本进行杂交得到杂种 F_1 , F_1 自交得到 F_2 , F_2 逐代自交形成含有188个家系的 F_8 代RIL群体。

[0039] (2)将RIL群体进行8个试验环境的田间种植及表型鉴定,分别考查不同年份、不同地点及不同氮水平处理条件下的各个株系的每穗小穗数,其中:

[0040] (i)8个试验环境分别为:

[0041] E1:2011-2012年石家庄低氮;

[0042] E2:2011-2012年石家庄高氮(常规大田管理);

[0043] E3:2012-2013年石家庄低氮;

[0044] E4:2012-2013年石家庄高氮;

[0045] E5:2012-2013年北京低氮;

- [0046] E6:2012-2013年北京高氮;
- [0047] E7:2012-2013年新乡低氮;
- [0048] E8:2012-2013年新乡高氮;
- [0049] (ii)不同氮水平处理分别为:
- [0050] LN(低氮)处理:全年不施肥;
- [0051] HN(高氮)处理:每年播种前施 $300\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 磷酸二胺和 $225\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 尿素作为底肥,拔节期施 $150\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 尿素追肥;
- [0052] (iii)小麦种植方法具体为:
- [0053] 每个系种植2行,每行播40粒;行长3m,株距7.5cm,行距25cm,正常生长及收获;
- [0054] (iv)每穗小穗数的测定方法为:
- [0055] 收获后每个株系随机选择5株,分出主茎,数出主茎每穗小穗数。
- [0056] (3)用改良的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取上述亲本和RIL群体各株系的叶片DNA,提取方法具体如下:
- [0057] (i)取钢珠和0.2g左右新鲜的叶片放入2.0ml离心管中,快速放入液氮中,摇晃磨成细粉;
- [0058] (ii)加0.8ml CTAB提取液,摇匀,65℃水浴30~60min,其间不时反转2~4次摇匀;
- [0059] (iii)将离心管放置于室温冷却,加入等体积的氯仿-异戊醇(体积比24:1)或酚-氯仿-异戊醇(体积比25:24:1),剧烈摇晃1min混匀,8000rpm离心10min;
- [0060] (iv)吸上清600 μl 至另一1.5ml离心管中,加入0.8倍体积预冷的异丙醇(-20°预冷)沉淀DNA,12000rpm离心6min;
- [0061] (v)倒掉上清,加入适量70%乙醇洗涤沉淀1~2次,离心管倾斜放置于通风橱吹干,待无酒精味后加400 μl TE缓冲液溶解,放-20℃冰箱长期保存。
- [0062] (4)对188个KJ-RIL家系和亲本DNA进行660K SNP芯片测序,获得物理位置绘制分子图谱。将8个单一环境中直接调查得到的每穗小穗数表型值及高低氮环境分别得到的BLUE值组成10组数据,按照IciMapping v4.1的BIP模块格式要求整理后进行加性QTL定位。以1Mb为步进区间,进行1000次置换检验,确定LOD阈值2.5;利用KJ-RIL遗传群体不同环境下小穗数数据进行QTL定位,结果表明,6/10组数据中均能在7D染色体区段检测到每穗小穗数主效QTL-*qSnps-7D*(表1),LOD峰值位于科农9204基因组Chr7D:211.78~253.79Mb之间,其可解释5.30~10.95%的表型变异率,LOD值为3.81~14.29,增加每穗小穗数的优异等位基因来自科农9204(表1)。
- [0063] 表1 基于KJ-RIL群体每穗小穗数初级QTL定位结果

	位置 (Mb)	左标记	右标记	LOD	PVE (%)	Add
[0064] E4	252.7876	<i>AX-111026089</i>	<i>AX-111961125</i>	10.539	8.225	0.4089
E5	253.7876	<i>AX-111026089</i>	<i>AX-111961125</i>	11.7935	10.7435	0.4263
E6	253.7876	<i>AX-111026089</i>	<i>AX-111961125</i>	14.2927	10.9451	0.4353
E8	211.7876	<i>AX-109656684</i>	<i>AX-110058085</i>	3.8148	5.3029	0.3244
HN-BLUE	229.7876	<i>AX-111021788</i>	<i>AX-109147695</i>	12.6061	10.9771	0.327
LN-BLUE	253.7876	<i>AX-111026089</i>	<i>AX-111961125</i>	7.9798	5.372	0.292

[0065] 注:由于确定LOD阈值为2.5,而E1、E2、E3和E7的LOD值均小于2.5,所以E1、E2、E3和E7的相关数据均不在表1中。

[0066] (5)根据科农9204和京411基因组重测序数据比对结果,在定位区间内Chr7D:244954628位置处开发一个InDel (Insertion-Deletion)标记SNPS-7D10,其在靶区间的位置如图1所示。相对于科农9204而言,京411基因组中有16bp的碱基缺失,根据该位点设计相应的PCR引物对,PCR引物对的序列具体如下:

[0067] 上游引物序列:GGCTCCAAACTTGTATCAT (SEQ ID NO:1);

[0068] 下游引物序列:TTCGGAATAGTTTCAAGAGG (SEQ ID NO:2)。

[0069] (6)利用上述PCR引物对科农9204和京411的叶片DNA分别进行PCR扩增,其中:

[0070] (i)PCR扩增反应体系为10 μ l,具体包括:

[0071] 0.5 μ l浓度为10 μ mol/l的SEQ ID NO:1所示的上游引物;

[0072] 0.5 μ l浓度为10 μ mol/l的SEQ ID NO:2所示的下游引物;

[0073] 1 μ l浓度为50ng/ μ l的DNA模板;

[0074] 5 μ l 2 \times Taq PCR预混试剂;

[0075] 反应体系用3 μ l ddH₂O补至总量为10 μ l。

[0076] (ii)PCR扩增程序具体如下:

[0077] 95 $^{\circ}$ C预变性5min;

[0078] 95 $^{\circ}$ C变性30s,57 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,循环34次;

[0079] 72 $^{\circ}$ C延伸5min,12 $^{\circ}$ C保存。

[0080] 将得到的PCR扩增产物用质量浓度为6.0%的非变性聚丙烯酰胺凝胶进行稳压电泳分离,每块胶需50ml质量浓度为6.0%的非变性聚丙烯酰胺凝胶,向每50ml非变性聚丙烯酰胺凝胶中再添加20 μ l四甲基乙二胺(TEMED)和200 μ l质量浓度为10%的过硫酸铵,搅拌均匀,接下来进行凝胶制备和电泳,具体步骤如下:

[0081] (i)将玻璃板水平放置,平板放下边,凹板放上面,中间放上封条,试插梳子是否合适;

[0082] (ii)用玻璃棒引流灌胶(若有气泡,则需及时敲打玻璃板将气泡赶出),灌胶完毕后将梳子插上;

[0083] (iii)待凝胶凝固后(约10min)拔下梳子,用去离子水冲洗胶孔(若胶孔有残胶,则需用注射器将残胶吸出),将凝固好的玻璃板放置于电泳槽中,凹槽朝里,用夹子夹住;

[0084] (iv)电泳缓冲液为1 \times TBE,点样后147V恒压电泳2.5h;

[0085] (v)电泳完毕后进行硝酸银染色,具体的:取下胶块,在固定液中固定3min;用去离子水快速冲洗2~3次,每次30~40s;于银染液中染色5~7min,用水快速冲洗(10s左右,不超过20s);放入显影液中显影至扩增条带出现(一般以Marker出现、颜色不再加深时止);放入去离子水中停影,拍照,得到非变性聚丙烯酰胺凝胶图片,记录带型。科农9204的PCR扩增片段的大小为391bp,京411的PCR扩增片段的大小为375bp。

[0086] 二、利用分子标记SNPS-7D10对188个KJ-RIL家系进行基因型分析

[0087] 利用上述开发的InDel标记SNPS-7D10对所述188个KJ-RIL家系进行基因型分析,获得RIL群体的基因型值。PCR扩增反应体系的组成、PCR扩增程序以及非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法均与前面相同,不再赘述。

[0088] 如前所述,科农9204的PCR扩增片段的大小为391bp,京411的PCR扩增片段的大小为375bp。经筛选,在所述188个KJ-RIL家系中,带型与科农9204相同的有86个(相应的小麦品种或品系含有增加小麦每穗小穗数的等位基因)、与京411相同的有87个(相应的小麦品种或品系不含有增加小麦每穗小穗数的等位基因),图2是分子标记SNPS-7D10在KJ-RIL群体的部分家系中的PCR扩增结果图。

[0089] 三、分析不同环境下*qSnps-7D*的每穗小穗数效应

[0090] 利用SNPS-7D10与*qSnps-7D*的连锁关系,根据第二部分的条带读取结果对所述188个KJ-RIL家系进行基因型分型,分析不同环境下*qSnps-7D*的每穗小穗数效应。利用SPSS 25.0对所述188个KJ-RIL家系的每穗小穗数进行差异显著性分析。分析结果见图3。结果表明,在大部分环境中,来自科农9204的等位基因相对于京411的等位基因可以显著增加每穗小穗数。

[0091] 以上结果说明本发明提供的分子标记SNPS-7D10可以应用于小麦每穗小穗数的分子标记辅助选择育种,例如:选育具有增加每穗小穗数基因型的小麦、鉴定或辅助鉴定小麦每穗小穗数性状等。

[0092] 需要说明的是,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而非是对本发明实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。凡属于本发明技术方案所引申出的显而易见变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

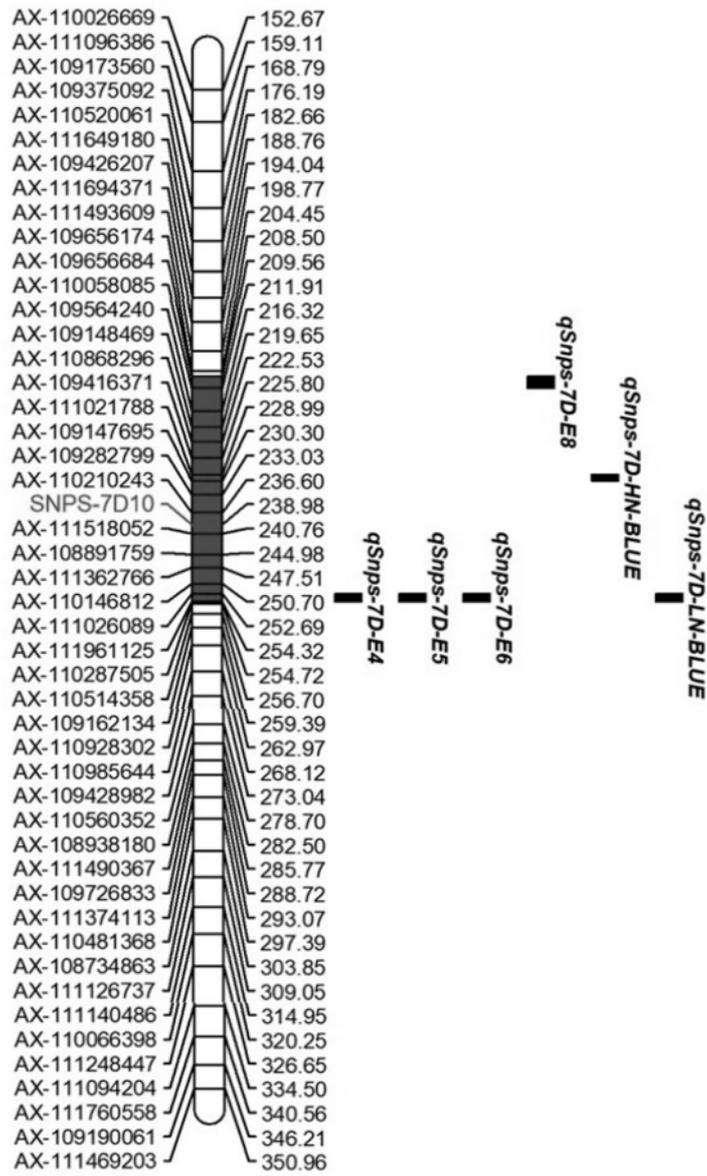


图 1

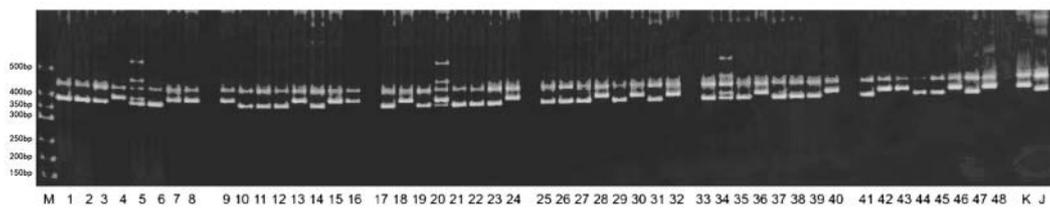


图 2

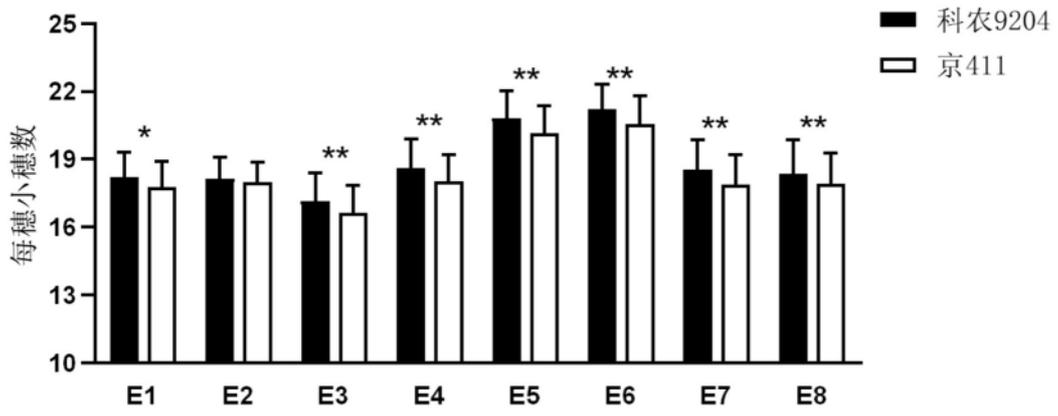


图 3