



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115058536 B

(45) 授权公告日 2024.09.20

(21) 申请号 202210669198.7

C12Q 1/6858 (2018.01)

(22) 申请日 2022.06.14

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115058536 A

(56) 对比文件

Zhu Yingchun等.Mapping and functional verification of leaf yellowing genes in watermelon during whole growth period.Frontiers in Plant Science.2022,第1-17页.

(43) 申请公布日 2022.09.16

(73) 专利权人 中国农业科学院郑州果树研究所

地址 450009 河南省郑州市管城回族区未来路南端郑州果树研究所

审查员 艾超仁

(72) 发明人 朱迎春 孙德玺 王一帆 袁高鹏

刘君璞 李卫华 安国林

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限公司

41111

专利代理师 蔡少华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书1页 说明书4页

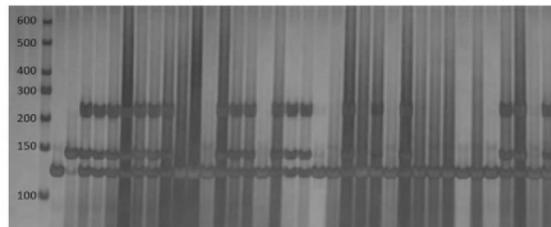
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记及其应用

(57) 摘要

本发明属于分子标记技术领域,公开了一种与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记,所述InDel分子标记的连锁基因位点开始于西瓜参考基因组97103V2版本的第2号染色体第16217471bp位碱基处,所述InDel分子标记的扩增长度为122bp和/或142bp,若扩增基因片段长度为122bp则为西瓜叶片黄化纯合单株,若扩增基因片段长度为142bp则为西瓜叶片正常绿纯合单株,若扩增基因片段长度为122bp和142bp则为西瓜叶片正常绿杂合单株。本发明开发的InDel分子标记,可以用来对品种进行初期筛选,检测方法正确可靠,达到分子标记辅助育种的目的,能够大大缩短育种周期,具有重要的理论及实践意义。



1. 与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记,其特征在于,所述InDel分子标记的连锁基因位点开始于西瓜参考基因组97103V2版本的第2号染色体第16217471bp位碱基处,所述InDel分子标记的扩增长度为122bp和/或142bp,若扩增基因片段长度为122bp则为西瓜叶片黄化纯合单株,若扩增基因片段长度为142bp则为西瓜叶片正常绿纯合单株,若扩增基因片段长度为122bp和142bp则为西瓜叶片正常绿杂合单株;扩增InDel分子标记的引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示、反向引物序列如SEQ ID NO.4所示。

2. 利用引物对鉴定西瓜叶片颜色是否黄化的方法,其特征在于,包括以下步骤:提取待测西瓜样品的基因组DNA;利用引物对对西瓜基因组DNA进行PCR扩增,所述引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示、反向引物序列如SEQ ID NO.4所示;根据PCR扩增产物的电泳条带判断西瓜叶片黄化性状的等位基因型,若只显示122bp条带则该西瓜为黄化纯合单株,若只显示142bp条带则该西瓜为正常绿纯合单株,若显示122bp和142bp两个条带则该西瓜为正常绿杂合单株。

3. 一种引物对在鉴定西瓜叶片颜色是否黄化中的应用,其特征在于,所述引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示、反向引物序列如SEQ ID NO.4所示。

4. 一种引物对在西瓜叶片颜色是否黄化的分子标记辅助育种中的应用,其特征在于,所述引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示、反向引物序列如SEQ ID NO.4所示。

5. 含有扩增与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记的引物对的试剂盒,其特征在于,所述引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示、反向引物序列如SEQ ID NO.4所示。

## 与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子标记技术领域,涉及一种与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记及其应用。

### 背景技术

[0002] 作为一种重要的葫芦科作物,西瓜(Citrulluslanatus)是人们夏季消暑解渴的重要水果,在世界园艺作物中占有非常重要的地位。中国作为世界上西瓜生产和消费第一大国,在生产栽培中,叶片颜色常常会发生突变,表现出白化、黄绿、延迟变绿、斑驳、斑点等表型。叶色突变体是研究光合作用、叶绿素合成以及叶绿体发育的理想材料,同时也是遗传和育种中重要的研究材料。

[0003] 在传统的选择育种中,因为难以确定后代的基因型,选择的依据通常是植物的表现型而不是基因型,选择时间较长,且表现型易受环境因素的影响,导致选择的不准确和效率较低。分子标记辅助育种以与目标性状紧密连锁分子标记为工具对目标性状进行筛选,通过分子标记以基因型进行种质资源的筛选,具有准确、快速、不受环境条件干扰的优点,避免了传统育种过程中性状选择的盲目性,提高了育种效率。InDel标记是对扩增产物进行分析的一种分子标记,具有高通量、简单、稳定、灵敏度高特定,是目前分子标记辅助育种工作中极具发展前景的分子标记。

[0004] 西瓜叶片黄化性状是目前发现的苗期鉴定西瓜杂交种子纯度最理想的标记性状。西瓜叶片黄化性状植株叶片全生育期均为黄化叶片,而正常绿植株叶片全生育期均为绿色。因此,黄化与一般正常绿幼苗或植株有明显的区别,最早鉴别期在子叶出土到幼苗1片真叶期间,时间在播种后7-10d。通过鉴定黄化基因,开发其紧密连锁的分子标记进行品种初期筛选,达到分子辅助育种的目的,可大大缩短育种的周期,提高育种效率。

[0005] 西瓜叶片黄化性状在苗期即能准确鉴定杂种,具有准确、直观、简便、快速、低耗等优点。但该性状是隐性的,杂交一代不表现,给选育工作带来了很大难度。叶色是西瓜重要的农艺性状,与西瓜植株的光合作用能力息息相关,因此急需深入开展西瓜叶色研究,开发可用于西瓜育种的分子标记,以缩短育种进程提高育种效率。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记及其应用,可以用来对西瓜品种进行初期筛选,检测方法确可靠,能够大大缩短育种周期。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 本发明提供一种与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记,所述InDel分子标记的连锁基因位点开始于西瓜参考基因组97103V2版本的第2号染色体第16217471bp位碱基处,所述InDel分子标记的扩增长度为122bp和/或142bp,若扩增基因片段长度为122bp则为西瓜叶片黄化纯合单株,若扩增基因片段长度为142bp则为西瓜叶片正常绿纯合单株,若扩增基因片段长度为122bp和142bp则为西瓜叶片正常绿杂合单株。

[0009] 本发明还提供扩增与西瓜叶片黄化性状相关的InDe1分子标记的引物对,所述引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示、反向引物序列如SEQ ID NO.4所示。

[0010] 本发明还提供利用上述引物对鉴定西瓜叶片颜色是否黄化的方法,包括以下步骤:提取待测西瓜样品的基因组DNA;利用引物对对西瓜基因组DNA进行PCR扩增;根据PCR扩增产物的电泳条带判断西瓜叶片黄化性状的等位基因型,若只显示122bp条带则该西瓜为黄化纯合单株,若只显示142bp条带则该西瓜为正常绿纯合单株,若显示122bp和142bp两个条带则该西瓜为正常绿杂合单株。

[0011] 本发明还提供上述引物对在鉴定西瓜叶片颜色是否黄化中的应用。

[0012] 本发明还提供上述引物对在西瓜叶片颜色是否黄化的分子标记辅助育种中的应用。

[0013] 本发明还提供含有扩增与西瓜叶片黄化性状相关的InDe1分子标记的引物对的试剂盒。

[0014] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0015] 本发明对F2群体、BC1分离群体及自然群体进行叶片黄化鉴定,发现InDe1位点开始于西瓜参考基因组97103V2版本的第2号染色体第16217471bp位碱基处,多态性表现为20bp碱基差异,并开发了与西瓜叶片黄化性状相关的InDe1分子标记;利用本发明设计的特异性InDe1分子标记,可以用来对品种进行初期筛选,检测方法正确可靠,达到分子标记辅助育种的目的,能够大大缩短育种周期,具有重要的理论及实践意义。

## 附图说明

[0016] 图1为本发明InDe1分子标记对F2分离群体的PCR扩增产物电泳图。

[0017] 图2为本发明InDe1分子标记对自然群体的PCR扩增产物电泳图。

## 具体实施方式

[0018] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限定本发明的保护范围。若未特别指明,实施例中所用技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。下述实施例中的试验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0019] 实施例一

[0020] 1) 选取供试西瓜材料,供试西瓜材料包括父本、母本、F1代、F2群体、BC1群体、自然群体。父本为叶片正常绿西瓜材料ZK;母本为叶片黄化西瓜材料w-y1,该材料叶片全生育期均黄化;F1代为父本和母本杂交获取的西瓜材料;F2群体为F1自交获得的西瓜材料;BC1群体为所述F1与母本获得的西瓜材料;自然群体为资源库中随机挑选的西瓜材料,包括叶片黄化西瓜材料和叶片正常绿西瓜材料,共计38个,如表1所示。上述各个供试材料均为中国农业科学院郑州果树研究所二倍体西瓜课题组保存的种质资源材料。

[0021] 表1自然群体挑选的西瓜材料品种及表型

实验材料	叶片表型	实验材料	叶片表型	实验材料	叶片表型	实验材料	表型
w-y/	黄化	郑抗 2 号	正常绿	品冠	正常绿	拿比特	正常绿
ZK	正常绿	中科 6 号	正常绿	裕丰金宝	正常绿	金利来	正常绿
瑞欣	正常绿	新抗 9 号	正常绿	雷玉双喜	正常绿	红翡翠	正常绿
华欣	正常绿	郑抗 10 号	正常绿	金美 2K	正常绿	京美 F1	正常绿
[0022] 超欣	正常绿	中科 182	正常绿	雪城甜王	正常绿	先正达	正常绿
越欣	正常绿	中农天冠	正常绿	百臣雷首	正常绿	S17	正常绿
甜魁	正常绿	金牌巨冠	正常绿	早春翠玉	正常绿	野力三号	正常绿
中兴红 1 号	正常绿	蜜冠	正常绿	佳丽	正常绿	西域 1 号	正常绿
郑抗 1 号	正常绿	美冠	正常绿	卓龙	正常绿		
中科 2 号	正常绿	绿冠	正常绿	美樽	正常绿		

[0023] 2) 供试材料叶片黄化性状的确定。

[0024] 采用直接观察法确定供试西瓜材料中的叶片黄化植株。西瓜叶片黄化性状具有新生子叶和叶片均为黄化叶片,而正常绿植株叶片子叶和叶片均为绿色。因此,叶片黄化与一般正常绿幼苗和植株有明显的区别。

[0025] 对正常绿亲本 ZK(父本)、黄化亲本(母本)、F1 群体的单株、1834 个 F2 分离群体单株和 233 个 BC1 分离群体进行叶片黄化性状鉴定。结果表明:(父本)、黄化亲本和 F1 的叶片黄化性状分别为正常绿、黄化和正常绿。该 F1 植株自交后获得 F2 群体,叶片黄化性状鉴定结果表明:634 个单株中有 480 个叶片正常绿单株和 154 个植株表现为叶片黄化,卡平方检验  $\chi^2 = 0.17, P = 0.68$ , 差异不显著,符合 3:1 的理论分离比例。通过 BC1 群体黄化性状进行鉴定,结果发现:70 个单株中有 32 个叶片正常绿单株和 38 个植株表现为叶片黄化,卡平方检验  $\chi^2 = 0.51, P = 0.47$ , 差异不显著,符合 1:1 的理论分离比例。综合上述双亲、F1、634 个 F2 分离群体和 70 个 BC1 分离群体单株黄化性状鉴定结果,得出西瓜叶片黄化基因为单基因控制的隐性性状。

[0026] 3) 候选 InDel 基因位点的获取。

[0027] 将 F2 群体中的叶片正常绿和叶片黄化的植株构建极端混池,进行基因组测序,通过对等位基因频率的差异进行分析,初步定位目标基因区间并获得候选 InDel 基因位点;将目标区间定位在西瓜参考基因组 97103V2 版本第 2 号染色体的 11890000-18670000bp 的一段 6.78Mb 区间内。

[0028] 4) InDel 分子标记的获得

[0029] 利用 <http://cucurbitgenomics.org/> 公布的西瓜参考基因组 97103V2 版本数据,针对候选 InDel 位点设计 InDel 分子标记,在父本、母本、F1 代、F2 群体中验证候选 InDel 基因位点,获得与西瓜叶片黄化基因 wyl 连锁的 InDel 分子标记。该 InDel 分子标记的连锁基因位点开始于西瓜参考基因组 97103V2 版本的第 2 号染色体第 16217471bp 位碱基处,InDel 分子标记的长度为 122bp 和/或 142bp,即多态性表现为 20bp 差异,122bp 的基因序列如 SEQ ID NO.1 所示,142bp 的基因序列如 SEQ ID NO.2 所示。

[0030] 5) 对父本、母本、F1代、F2群体各自的基因组DNA进行PCR扩增反应,得到各自的PCR扩增产物。扩增引物对的序列如下:

[0031] wy1-F,即正向引物:5'-TCGTACGTAAGAGCCACACA-3'(SEQ ID NO.3);

[0032] wy1-R,即反向引物:5'-CTTGGGTAAGTGGGGTTGCG-3'(SEQ ID NO.4)。

[0033] 在PCR扩增反应中,反应程序为:94°C预变性5min;94°C30s,58°C30s,72°C30s,共循环30次;72°C延伸5min;4°C保持。

[0034] 在PCR扩增反应中,PCR扩增反应体系以20 $\mu$ L计,包括10 $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCRMasterMix, 2 $\mu$ L模板DNA,正、反向引物各1 $\mu$ L和6 $\mu$ LddH<sub>2</sub>O。

[0035] 用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行多态性检测,在凝胶成像系统中拍照。图1为InDel1分子标记对F2分离群体的PCR扩增产物电泳图,图中泳道1为分子量Marker,泳道2为黄化亲本PCR产物,泳道3为绿色亲本的PCR产物,泳道4为F1代的PCR产物,其他泳道为F2分离群体部分株系PCR产物(33株)。根据PCR产物的带型判断西瓜叶片黄化性状的等位基因型,如图1所示,扩增片段西瓜叶片黄化纯合单株得到122bp条带,西瓜叶片正常绿纯合单株得到142bp条带,西瓜叶片正常绿杂合单株则显示出122bp和142bp两个条带。结果显示叶片黄化鉴定结果与标记检测结果呈现出共分离。

[0036] 6)、利用InDel1分子标记对自然群体进行验证

[0037] 利用自然群体进一步验证InDel1分子标记与西瓜叶片黄化基因wy1的连锁关系。以自然群体的基因组DNA为模板进行PCR扩增反应,得到自然群体的PCR特异片段;再将PCR特异片段进行电泳检测。具体的操作同步骤5)。

[0038] 图2为InDel1分子标记对自然群体的PCR扩增产物电泳图,图中泳道1为分子量Marker,泳道2为黄化亲本PCR产物,泳道3为绿色亲本PCR产物,泳道4为F1代PCR产物,其他泳道为36份自然群体材料。

[0039] 结果显示,36份自然群体材料的标记检测均与叶片黄化鉴定相符,统计该InDel1分子标记对资源鉴定符合率为100%。进一步证实了所设计的InDel1分子标记与西瓜叶片黄化基因wy1紧密连锁;说明该InDel1位点以及利用该InDel1位点所设计的InDel1分子标记在鉴别西瓜叶片黄化性状上有非常高的利用价值,可以有效地运用于西瓜分子辅助育种。

[0040] 以上所述之实施例,只是本发明的较佳实施例而已,仅仅用以解释本发明,并非限制本发明实施范围,对于本技术领域的技术人员来说,当然可根据本说明书中所公开的技术内容,通过置换或改变的方式轻易做出其它的实施方式,故凡在本发明的原理上所作的变化和改进等,均应包括于本发明申请专利范围内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 中国农业科学院郑州果树研究所
- [0003] <120> 与西瓜叶片黄化性状相关的InDel分子标记及其应用
- [0004] <130> 2022
- [0005] <160> 4
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 122
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] tcgtacgtaa gagccacaca accatgttac accacaatac agaaactagt ggttgtcaaa 60
- [0013] acatgggagt tatttttgagg ataatatata ttctccctc atcgcaacc cagttacca 120
- [0014] ag 122
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 142
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <400> 2
- [0020] tcgtacgtaa gagccacaca accatgttac accacaatac agaaactagt ggttgtcaaa 60
- [0021] acatgggagt tatttttgagg ataataca tcaactagta agtaacacta ttctccctc 120
- [0022] atcgcaacc cagttacca ag 142
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 20
- [0025] <212> DNA
- [0026] <213> 人工序列(wy1-F)
- [0027] <400> 3
- [0028] tcgtacgtaa gagccacaca 20
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 20
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> 人工序列(wy1-R)
- [0033] <400> 4
- [0034] cttgggtaac tggggttgcg 20

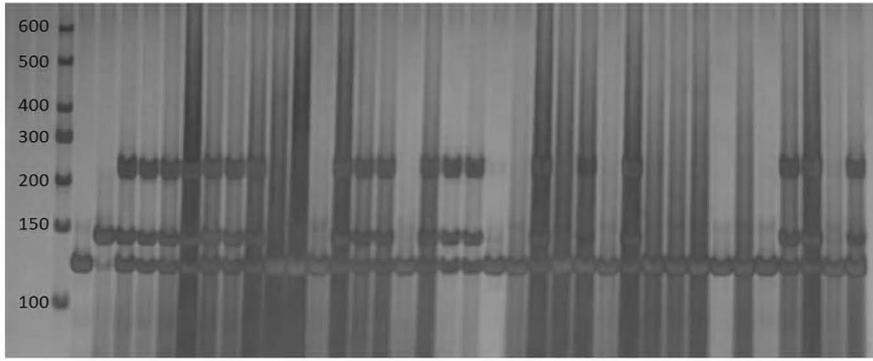


图1

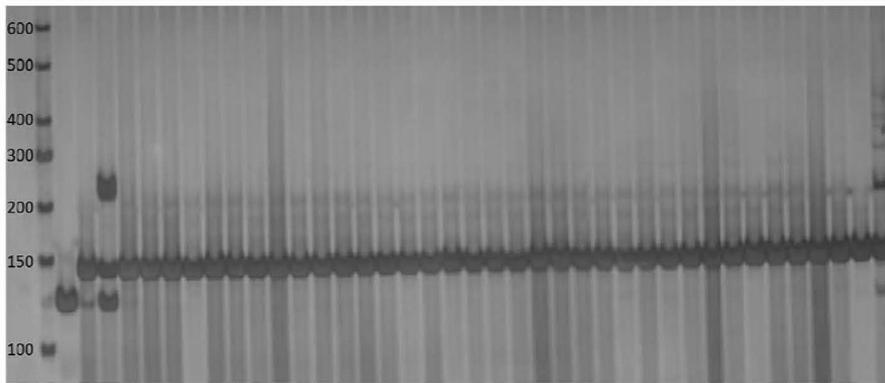


图2