



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111549172 B

(45) 授权公告日 2023.02.28

(21) 申请号 202010532717.6

C12N 15/11 (2018.01)

(22) 申请日 2020.06.12

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111549172 A

CN 103194444 A, 2013.07.10

CN 109338002 A, 2019.02.15

CN 108456684 A, 2018.08.28

(43) 申请公布日 2020.08.18

CN 108384873 A, 2018.08.10

(73) 专利权人 中国农业科学院郑州果树研究所
地址 450000 河南省郑州市航海东路未来路南端

CN 104711353 A, 2015.06.17

MX 2016016010 A, 2018.06.01

US 2017156278 A1, 2017.06.08

(72) 发明人 朱红菊 刘文革 赵胜杰 何楠
路绪强

Junling Dou 等. Genetic mapping reveals a marker for yellow skin in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). 《PLoS One》. 2018, 第13卷(第9期),

马双武 等. 西瓜叶片后绿标记性状新品系的选育与利用. 《中国瓜菜》. 2008, (第5期),

(74) 专利代理机构 西安鼎迈知识产权代理事务所(普通合伙) 61263

审查员 颜泉梅

专利代理师 李振瑞

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(51) Int. Cl.

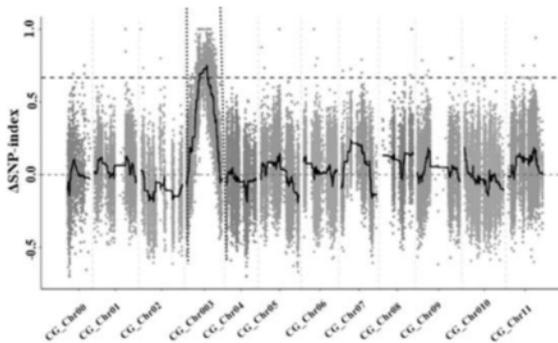
C12Q 1/6895 (2018.01)

(54) 发明名称

西瓜叶片后绿基因连锁位点及CAPS标记

(57) 摘要

本发明公开了西瓜叶片后绿基因连锁位点, 其为与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的SNP位点, 在西瓜基因组3号染色体17896014bp位置, 碱基变化为T→C, 所述西瓜叶片后绿基因连锁位点由引物对dg-F、dg-R进行PCR扩增确定。本发明采用叶片后绿和叶片正常绿西瓜植株配制F2群体, 通过BSA-seq对西瓜叶片后绿基因进行初步定位, 之后将与西瓜叶片后绿性状连锁的候选SNP位点结合分离群体验证分析及自然群体验证分析, 获取与目的性状紧密连锁的CAPS标记。本发明可应用于西瓜品种改良分子辅助育种, 为西瓜分子育种提供技术支持, 同时大大缩短了传统基因定位的时间。



1. 一种西瓜叶片后绿基因CAPS标记,其特征在于,所述CAPS标记采用引物对dg-F和dg-R进行扩增,且扩增片段经BstBI酶切,西瓜叶片后绿纯合子得到755bp的条带,西瓜叶片正常绿纯合子酶切成609p和146bp的两条带,西瓜叶片正常绿杂合子则显示出146bp、609bp和755bp的三条带;

引物dg-F的核苷酸碱基序列为5' -GAAGGATGGCACACTTCGAT-3' ;

引物dg-R的核苷酸碱基序列为5' -CAAACCTCCACTCCAGGGGTA-3' 。

2. 根据权利要求1所述的CAPS标记,其特征在于,用于扩增所述CAPS标记的反应程序为:

阶段1:94℃预变性5min;阶段2:94℃20s,60℃20s,72℃30s,共循环34次;阶段3:72℃延伸5min;阶段4:4℃保持。

3. 根据权利要求1所述的CAPS标记,其特征在于,用于扩增所述CAPS标记的反应体系以20μL计,包括10μL 2×TaqPCRMasterMix,2μL模板DNA,正、反向引物各1μL和6μL ddH₂O。

4. 根据权利要求1所述的CAPS标记,其特征在于,所述酶切反应体系以15μL计,包括0.3 μL BstBI限制酶、1.5μL buffer、3.2μL ddH₂O和10μL PCR产物,37℃酶切过夜。

5. 检测权利要求1所述西瓜叶片后绿基因CAPS标记的试剂在西瓜叶片后绿性状分子育种中的应用。

西瓜叶片后绿基因连锁位点及CAPS标记

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及性状连锁SNP位点的确定,以及基于该SNP位点的CAPS标记设计开发,具体涉及与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的SNP位点及CAPS标记。

背景技术

[0002] 作为一种重要的葫芦科作物,西瓜(Citrullus lanatus)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,目前,我国西瓜产业普遍存在品种更新滞后、结构单一的缺点,某些品种在一些地区已种植多年,难以满足市场多样性的需求。因此,培育多样化的品种,并加快育种进程成为西瓜育种家的重要目标。随着西瓜基因组时代的到来,明确西瓜重要农艺性状基因功能,并寻找控制这些性状的关键基因,将分子标记应用于育种是目前西瓜育种工作的一项重要内容。

[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。CAPS标记是对扩增产物进行酶切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] 西瓜叶片后绿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。西瓜叶片后绿性状具有新生叶由浅黄—浅黄绿—正常绿的渐变过程,而正常绿植株叶片抽生即变绿,没有这个渐变的过程。因此,后绿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。通过鉴定后绿基因,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] 西瓜叶片后绿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] 本发明的技术主旨在于对西瓜叶片后绿性状材料进行快速筛选,大大缩短育种周期,达到分子标记辅助育种的目的。基于西瓜叶片性状分子水平研究,本发明给出与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的SNP位点,并针对所述SNP位点设计开发CAPS标记。具体地,本发明提供如下的技术方案。

[0007] 西瓜叶片后绿基因(Delayed green, dg)连锁位点,其为与西瓜叶片后绿性状紧密

连锁的SNP位点,在西瓜基因组3号染色体17896014bp位置,碱基变化为T→C。

[0008] 再者,根据确定的与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的SNP位点,本发明给出一种基于所述的SNP位点开发的西瓜叶片后绿基因CAPS标记。

[0009] 如本发明说明书的实施例记载,所述CAPS标记采用引物对dg-F和dg-R进行扩增。

[0010] 所述引物dg-F的核苷酸碱基序列为5'-GAAGGATGGCACAACCTTCGAT-3'。

[0011] 所述引物dg-R的核苷酸碱基序列为5'-CAAACCTCCACTCCAGGGGTA-3'。

[0012] 进一步地,本发明给出了所述CAPS标记的开发方法为:

[0013] 采用叶片后绿西瓜材料和叶片正常绿西瓜材料配制F2群体材料;

[0014] 通过BSA-seq将西瓜叶片后绿基因进行初步定位;

[0015] 利用测序信息,对F2群体材料初步定位目标基因区间的候选SNP位点进行与叶片后绿性状的连锁分析;

[0016] 结合分离群体验证分析及自然群体验证分析,获得与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的CAPS标记。

[0017] 进一步优选地,所述CAPS标记的开发方法为:

[0018] 选取供试西瓜材料,所述供试西瓜材料包括父本、母本、F1代、F2群体、BC1群体、自然群体;

[0019] 确定所述供试西瓜材料中的叶片后绿植株;

[0020] 将所述F2群体中的叶片正常绿和叶片后绿的植株构建极端混池,进行测序,初步定位目标基因区间,获得候选SNP位点;

[0021] 在所述父本、母本、F1代、F2群体和BC1群体中验证所述候选SNP位点,获得与西瓜叶片后绿基因连锁的CAPS标记。

[0022] 作为本发明具体实施方式的优选,对所述西瓜叶片后绿基因CAPS标记的设计开发,分别对所述父本、母本、F1代、F2群体的基因组DNA进行PCR扩增,得到各供试西瓜材料的PCR扩增产物。

[0023] 所述PCR扩增所用引物包括引物对dg-F、dg-R。

[0024] 所述引物dg-F的核苷酸碱基序列为5'-GAAGGATGGCACAACCTTCGAT-3'。

[0025] 所述引物dg-R的核苷酸碱基序列为5'-CAAACCTCCACTCCAGGGGTA-3'。

[0026] 作为本发明具体实施方式的优选,对所述西瓜叶片后绿基因CAPS标记的设计开发,所述父本为叶片正常绿西瓜材料Charleston gray;所述母本为叶片后绿西瓜材料;所述F1代为所述父本和所述母本杂交获取的西瓜材料;所述F2群体为所述F1自交获得的西瓜材料;所述BC1群体为所述F1与所述母本获得的西瓜材料;所述自然群体为随机挑选的西瓜材料。

[0027] 作为本发明具体实施方式的优选,对所述西瓜叶片后绿基因CAPS标记的设计开发,采用直接观察法确定所述供试西瓜材料中的叶片后绿植株。

[0028] 还有,本发明提供了所述西瓜叶片后绿基因连锁位点在西瓜分子育种中的应用。

[0029] 还有,本发明提供了所述西瓜叶片后绿基因CAPS标记在西瓜分子育种中的应用。

[0030] 与现有技术相比,本发明所述西瓜叶片后绿基因连锁位点及CAPS标记,具有下述的有益效果或优点。

[0031] 本发明通过西瓜叶片后绿植株和西瓜叶片正常绿植株配制F2群体,通过BSA-seq

将西瓜叶片后绿基因进行初步定位;利用测序信息,对F2群体材料初步定位基因区间全部SNP位点进行与叶片后绿性状的连锁分析,获取与叶片后绿性状连锁的SNP位点。

[0032] 本发明将与叶片后绿性状连锁的候选SNP位点结合分离群体验证分析及自然群体验证分析,获取与目的性状紧密连锁的CAPS标记,可应用于西瓜品种改良分子辅助育种,为西瓜分子育种提供技术支持,同时大大缩短了传统基因定位的时间。

[0033] 本发明对F2群体、BC1分离群体及自然群体进行叶片后绿鉴定,并利用CAPS标记分子检测所述SNP位点与目的性状的连锁情况;利用本发明设计的特异CAPS标记,可以用来对品种进行初期筛选,达到分子标记辅助育种的目的,大大缩短育种周期,具有重要的理论及实践意义。

附图说明

[0034] 图1为本发明所述实施例中西瓜叶片后绿基因dg初步定位结果及SNP位点图。

[0035] 图2为本发明所述实施例中引物对dg-F和dg-R对西瓜叶片后绿和西瓜叶片正常绿亲本、F1代的PCR扩增反应条带,及该PCR扩增产物利用BstBI酶切后的结果电泳图。

[0036] 图3为本发明所述实施例中引物对dg-F和dg-R对西瓜自然群体的PCR扩增反应条带,及该PCR扩增产物利用BstBI酶切后的结果电泳图。

具体实施方式

[0037] 下面结合实施例对本发明提供的西瓜叶片后绿基因连锁位点及CAPS标记进行详细的说明。

[0038] 实施例1

[0039] 西瓜叶片后绿基因连锁位点,经测定,其为与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的SNP位点,在西瓜基因组3号染色体17896014bp位置,碱基变化为T→C。基于本实施例确定的SNP位点,利用该SNP位点设计一种CAPS标记。本实施例给出了一种CAPS标记的开发方法,包括:

[0040] 采用叶片后绿西瓜材料和叶片正常绿西瓜材料配制F2群体材料;通过BSA-seq将西瓜叶片后绿基因进行初步定位;利用测序信息,对F2群体材料初步定位目标基因区间的候选SNP位点进行与叶片后绿性状的连锁分析;结合分离群体验证分析及自然群体验证分析,获得与西瓜叶片后绿性状紧密连锁的CAPS标记。

[0041] 实施例2

[0042] 在实施例1的基础上,本实施例进一步给出一种优选的所述CAPS标记的开发方法,包括:

[0043] 1) 选取供试西瓜材料,所述供试西瓜材料包括父本、母本、F1代、F2群体、BC1群体、自然群体。所述父本为叶片正常绿西瓜材料Charleston gray;所述母本为叶片后绿西瓜材料;所述F1代为所述父本和所述母本杂交获取的西瓜材料;所述F2群体为所述F1自交获得的西瓜材料;所述BC1群体为所述F1与所述母本获得的西瓜材料;所述自然群体为资源库中随机挑选的西瓜材料,包括叶片后绿西瓜材料和叶片正常绿西瓜材料(详见表1)。上述各个供试材料均为中国农业科学院郑州果树研究所瓜类种质改良研究中心保存的种质资源材料。

[0044] 表1西瓜种质材料及表型

[0045]	实验材料	表型	实验材料	表型	实验材料	表型
	后绿	叶片后绿	陕西红籽	正常绿	梨皮	正常绿
	PI595203	正常绿	核桃纹	正常绿	宁县西瓜	正常绿
	PI164248	正常绿	尉氏西瓜	正常绿	钢皮	正常绿
	PI457916	正常绿	冻瓜	正常绿	小红籽	正常绿
	PI532722	正常绿	喇嘛瓜	正常绿	阜阳1号	正常绿
	黑皮	正常绿	青抱筋	正常绿	鸡头黑	正常绿
	偃师一号	正常绿	--	--	--	--

[0046] 2) 供试材料叶片后绿性状的确定, 本实施例优先采用直接观察法确定所述供试西瓜材料中的叶片后绿植株。

[0047] 3) 候选SNP位点的获取, 将所述F2群体中的叶片正常绿和叶片后绿的植株构建极端混池, 进行测序, 初步定位目标基因区间, 获得候选SNP位点。

[0048] 4) 针对所述的候选SNP位点设计所述CAPS标记, 在所述父本、母本、F1代、F2群体和BC1群体中验证所述候选SNP位点, 获得与西瓜叶片后绿基因连锁的CAPS标记。

[0049] 对所述西瓜叶片后绿基因CAPS标记的设计开发, 分别对所述父本、母本、F1代、F2群体的基因组DNA进行PCR扩增, 得到各供试西瓜材料的PCR扩增产物。所述PCR扩增所用引物包括引物对dg-F、dg-R, 所述引物dg-F的核苷酸碱基序列为5'-GAAGGATGGCACACTTCGAT-3', 所述引物dg-R的核苷酸碱基序列为5'-CAAACCTCCACTCCAGGGGTA-3'。

[0050] 实施例3

[0051] 在实施例1和2的基础上, 本实施例对所述CAPS标记的开发方法做详细的描述。

[0052] 所述CAPS标记的开发方法, 具体包括以下步骤:

[0053] A、供试材料选取

[0054] 所述供试材料包括父本、母本、F1代、F2群体、BC1群体、自然群体。其中,

[0055] 所述的父本为: Charleston gray, 为正常绿色叶片西瓜材料。

[0056] 所述的母本为: 叶片后绿西瓜材料, 该材料具有新生叶由浅黄—浅黄绿—正常绿的渐变过程, 即本发明所述的叶片后绿。

[0057] 所述的F1代为: 以上述为亲本进行杂交获取的西瓜材料。

[0058] 所述的F2群体为: 该F1代自交获得的F2群体。

[0059] 所述的BC1群体为: 该F1代与母本材料回交得到的西瓜材料。

[0060] 所述的自然群体材料为资源库中随机挑选的西瓜材料, 包括叶片后绿西瓜材料和叶片正常绿西瓜材料(详见表1)。

[0061] 上述各个供试材料均为中国农业科学院郑州果树研究所瓜类种质改良研究中心保存的种质资源材料。

[0062] B、供试材料叶片后绿性状的确定

[0063] 采用直接观察法确定叶片后绿西瓜植株。西瓜叶片后绿性状具有新生叶由浅黄—浅黄绿—正常绿的渐变过程, 而正常绿植株叶片抽生即变绿, 没有这个渐变的过程。因此, 叶片后绿与一般正常绿幼苗和植株有明显的区别, 在苗期和伸蔓期各进行一次鉴定, 以确保试验结果的准确性。

[0064] 对正常绿亲本Charleston gray(父本)、后绿亲本(母本)、F1群体的单株、634个F2

分离群体单株和70个BC1分离群体进行叶片后绿性状鉴定。结果表明:Charleston gray、后绿亲本和F1的叶片后绿性状分别为正常绿、后绿和正常绿。该F1植株自交后获得F2群体,叶片后绿性状鉴定结果表明:634个单株中有480个叶片正常绿单株和154个植株表现为叶片后绿,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群体后绿性状进行鉴定,结果发现:70个单株中有32个叶片正常绿单株和38个植株表现为叶片后绿,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分离群体单株后绿性状鉴定结果,得出西瓜叶片后绿基因为单基因控制的隐性性状。对所述自然群体的单株叶片后绿性状鉴定结果如表1所示。

[0065] C、候选SNP的获得

[0066] 将所述F2群体中的叶片正常绿和叶片后绿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SNP位点;将目标区间定位在西瓜基因组3号染色体的12131185bp至19615207bp的一段7.48Mb区间内。本实施例中西瓜叶片后绿基因dg初步定位结果及SNP位点图,如图1所示。所述的SNP位点为西瓜基因组3号染色体碱基位置为17896014bp处,碱基变化为T→C。

[0067] D、CAPS标记的获得

[0068] 利用<http://cucurbitgenomics.org/>公布的西瓜基因组数据,针对所述的候选SNP位点设计所述的CAPS标记,在所述的父本、母本、F1代、F2群体中验证所述的候选SNP位点,获得与西瓜叶片后绿基因dg连锁的CAPS标记。

[0069] 对所述父本、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;再对上述各自的PCR扩增产物进行酶切反应,得到各自的酶切产物。

[0070] 在所述的PCR扩增反应中,上、下游引物为以下核苷酸碱基序列:

[0071] dg-F,即上游引物:5'-GAAGGATGGCACAACCTTCGAT-3';

[0072] dg-R,即下游引物:5'-CAAACCTCCACTCCAGGGGTA-3'。

[0073] 在所述的PCR扩增反应中,反应程序为:阶段1:94℃预变性5min;阶段2:94℃20s,60℃20s,72℃30s,共循环34次;阶段3:72℃延伸5min;阶段4:4℃保持。

[0074] 在所述的PCR扩增反应中,PCR扩增反应体系以20μL计,包括10μL 2×Taq PCR MasterMix,2μL模板DNA,正、反向引物各1μL和6μL ddH₂O。

[0075] 在所述的PCR扩增反应中,酶切反应体系以15μL计,包括0.3μL限制酶、1.5μL buffer、3.2μL ddH₂O和10μL PCR产物,之后再37℃酶切过夜。

[0076] 用1%琼脂糖凝胶电泳进行多态性检测,在凝胶成像系统中拍照。图2为本实施例中引物对dg-F和dg-R对西瓜叶片后绿和西瓜叶片正常绿亲本、F1代的PCR扩增反应条带,及该PCR扩增产物利用BstBI酶切后的结果电泳图。根据所述酶切产物的带型判断西瓜叶片后绿性状的等位基因型,如图2所示,扩增片段经BstBI酶切,西瓜叶片后绿纯合子得到755bp的条带,西瓜叶片正常绿纯合子酶切成609bp和146bp的两条带,西瓜叶片正常绿杂合子则显示出146bp、609bp和755bp的三条带。

[0077] 图3为本实施例中引物对dg-F和dg-R对西瓜自然群体的PCR扩增反应条带,及该PCR扩增产物利用BstBI酶切后的结果电泳图。图3中,泳道1为分子量Marker,其他泳道为F2分离群体部分株系PCR产物及CAPS酶切产物,结果显示叶片后绿鉴定结果与标记检测结果呈现出共分离。

[0078] F、利用所述CAPS标记对所述自然群体进行验证

[0079] 利用所述的自然群体进一步验证所述的CAPS标记与西瓜叶片后绿基因dg的连锁关系。以所述自然群体的基因组DNA为模板进行PCR扩增反应,得到自然群体的PCR特异片段;再将所述PCR特异片段进行酶切反应,得到自然群体酶切产物。

[0080] 具体的操作同E中所述。经过引物对dg-F和dg-R扩增后,利用BstBI限制酶酶切,结果显示18份自然群体材料的标记检测均与叶片后绿鉴定相符,统计该CAPS标记对资源鉴定符合率为100%。进一步证实了所设计的CAPS标记与西瓜叶片后绿基因dg紧密连锁;说明该SNP位点以及利用该SNP位点所设计的CAPS标记在鉴别西瓜叶片后绿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。

[0081] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用于限制本发明,凡在本发明的技术启示和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

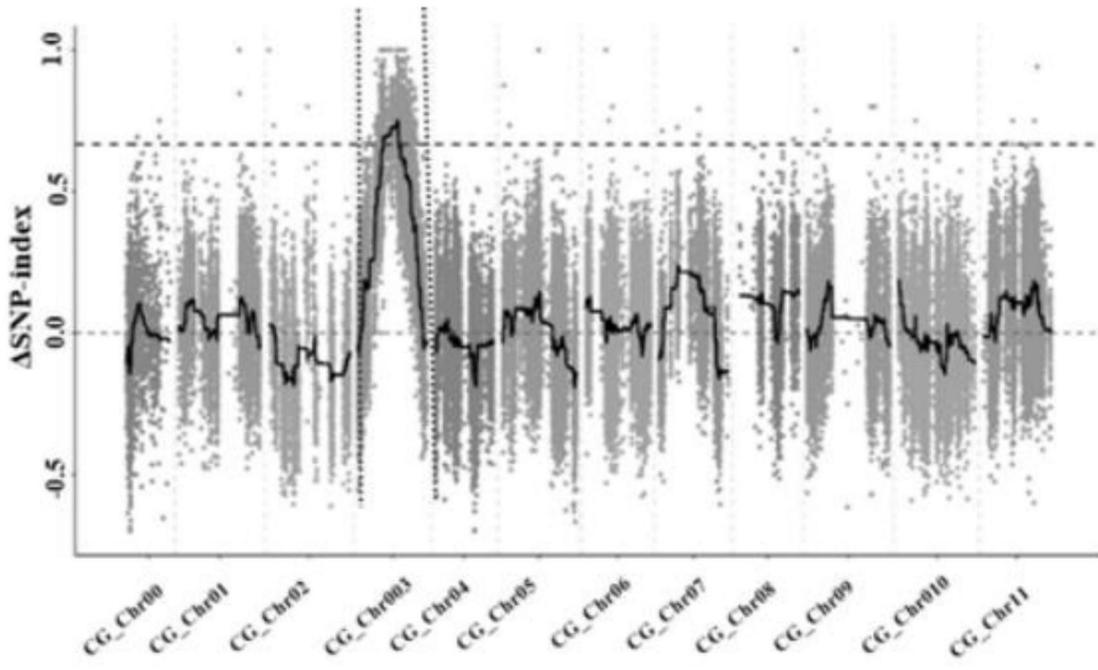


图1

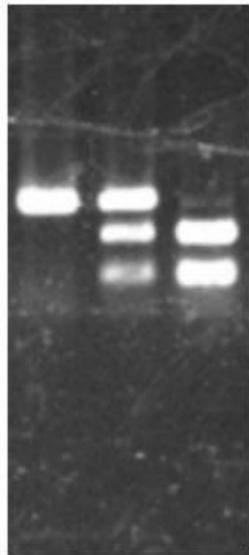


图2

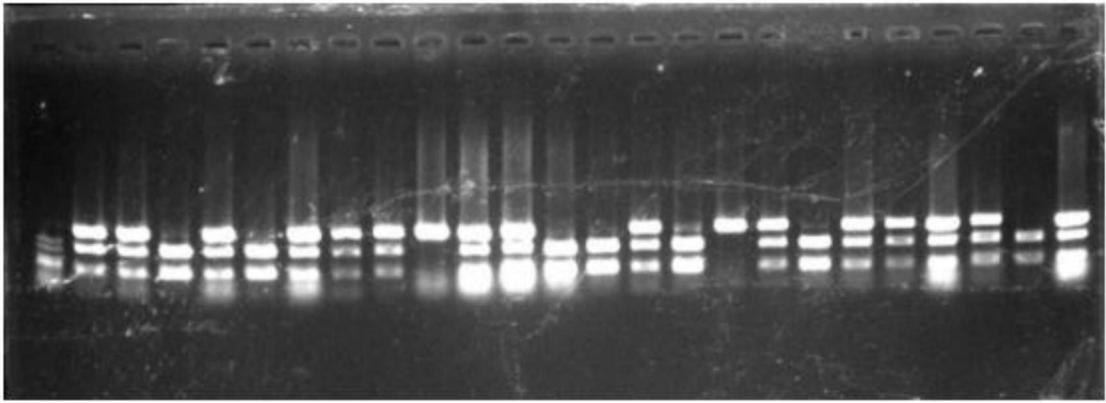


图3