



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111663002 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 11

(21) 申请号 202010672153.6

C12Q 1/6809 (2018.01)

(22) 申请日 2020.07.14

G12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G16B 20/30 (2019.01)

申请公布号 CN 111663002 A

G16B 30/10 (2019.01)

(43) 申请公布日 2020.09.15

审查员 刘晓晨

(73) 专利权人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市仓山区上下店路15号福建农林大学

(72) 发明人 张积森 刘蕾 王恒波 王刚  
窦梅杰

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

专利代理师 饶文君 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

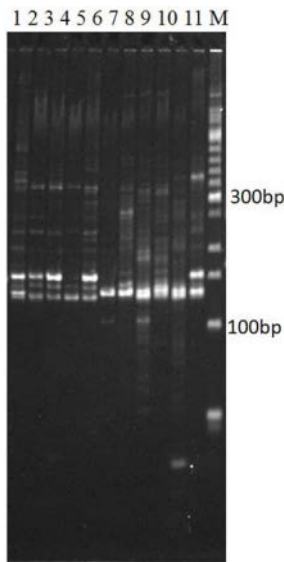
权利要求书1页 说明书5页  
序列表2页 附图5页

## (54) 发明名称

一种区分甘蔗种间二号染色体遗传背景的SSR标记与应用

## (57) 摘要

本发明公开了一种区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体遗传背景的微卫星分子标记及应用,包括四对位于甘蔗高贵种二号染色体的SSR分子标记核心引物对,研究基于甘蔗高贵种和割手密种全基因组数据,设计、合成SSR标记引物,并在5份高贵种材料、4份割手密种材料、2份栽培种材料中进行聚丙烯酰胺凝胶电泳验证。筛选出的4对引物具有扩增结果稳定、电泳条带清晰可辨的特点,可以分清SSR所在甘蔗高贵种和割手密种的染色体位置,证实所述SSR标记重复性和多态性较高,可用于甘蔗遗传分析和品种鉴定。



1. 一种区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体遗传背景的SSR分子标记引物,其特征在于,包括4对特异性引物,其引物核苷酸序列如下:

So.2A.Ss (AATCT) 8上游引物如SEQ ID NO.1所示;

So.2A.Ss (AATCT) 8下游引物如SEQ ID NO.2所示;

So.2E.Ss (GAG) 6上游引物如SEQ ID NO.3所示;

So.2E.Ss (GAG) 6下游引物如SEQ ID NO.4所示;

So.2G.Ss (TA) 62上游引物如SEQ ID NO.5所示;

So.2G.Ss (TA) 62下游引物如SEQ ID NO.6所示;

So.2G.Ss (TA) 49上游引物如SEQ ID NO.7所示;

So.2G.Ss (TA) 49下游引物如SEQ ID NO.8所示。

2. 如权利要求1所述的SSR分子标记在甘蔗高贵种和割手密种遗传分析和鉴定中的应用,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 基于已通过测序组装得到的甘蔗高贵种和割手密种全基因组数据,设计、合成权利要求1所述的SSR分子标记引物;

(2) 提取不同甘蔗属的基因组DNA,用合成的SSR分子标记引物对提取的基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物;

(3) 对步骤(2)得到的扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳实验,根据条带位置进行分析;

所述的PCR扩增反应体系为:总体系20 $\mu$ L,其中25 ng/ $\mu$ L DNA样品0.5 $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L正向、反向引物各0.5 $\mu$ L、2 $\times$  Taq Master Mix 10 $\mu$ L,最后用ddH<sub>2</sub>O补足20 $\mu$ L;

所述的PCR扩增反应的程序为:94 $^{\circ}$ C预变性1min30s;94 $^{\circ}$ C变性20S,59.5 $^{\circ}$ C退火20S,72 $^{\circ}$ C延伸30 S,共34个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。

## 一种区分甘蔗种间二号染色体遗传背景的SSR标记与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于甘蔗分子育种技术领域,特别涉及一种区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体遗传背景的微卫星分子标记与应用。

### 背景技术

[0002] 甘蔗(*Saccharum hybrids*)是世界上重要的糖料作物,也是我国南方主要的经济作物之一,甘蔗榨糖约占世界总糖产量的 80%,同时甘蔗榨糖后的副产品中,甘蔗渣约有 50%的纤维可以用来造纸,甘蔗渣中的纤维素可转化为糖,制成酒精,全球40%的酒精都是甘蔗生产而来。甘蔗属(*Saccharum*)包含热带种(*S. officinarum*)、中国种(*S. sinense*)、印度种(*S. barberi*)、大茎野生种(*S. robustum*)以及割手密种(*S. spontaneum*)等原始野生种和栽培种。

[0003] 现代栽培甘蔗是多倍体种间杂种,而且整合了甘蔗热带种的高含糖量与割手密耐寒性,抗病性和自发再生性的特征,实现了甘蔗育种史上的重大突破,也产生了十分复杂的甘蔗遗传背景。现代甘蔗栽培品种绝大多数都是由热带种(*S. officinarum* L.,  $2n = 80$ ,  $x = 10$ )和割手密(*S. spontaneum* L.,  $2n = 40\sim 128$ ,  $x = 8$ )种间杂交而来,且与热带种进行了多次回交,其染色体数目在  $2n = 100\sim 130$  之间,其中 80%~90%的染色体来自于热带种,10%~20%来自于割手密,而染色体的 5%~17%为两个种间的染色体重组类型。甘蔗每条染色体都携带不同的遗传信息,分清现代甘蔗栽培种中高贵种不同染色体及其对应的割手密种染色体血缘背景,对现代甘蔗起源及扩大现代甘蔗育种的应用遗传资源研究具有重要指导意义。

[0004] SSR(Simple Sequence Repeat, SSR) 即简单重复序列,又叫微卫星标记,它是指基因组中存在的由1-6个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列,广泛分布于真核生物基因组。由于串联重复序列的不同重复次数就产生了等位基因之间的多态性,两端多为相对保守的单拷贝序列,通过设计引物可以进行扩增,经聚丙烯酰胺凝胶电泳实验或毛细管电泳实验即可显示不同基因型个体在某个 SSR 位点上的多态性。SSR标记是一种理想的分子标记,具有共显性、多态性高、数量丰富、分布均匀、易于检测等优点,被广泛应用于许多作物的基因定位和分析、指纹、品种鉴定以及分子标记辅助育种等领域。

[0005] 近年来,SSR分子标记在甘蔗上的应用逐步展开,但是可公开获得的甘蔗SSR分子标记数量有限、多态性低,无法满足甘蔗分子标记辅助育种和遗传作图等工作要求。传统的SSR标记开发方法存在诸多缺点,如耗费人力、物力、且效率低下,尤其是对于多倍体的甘蔗,开发难度更加大。不过随着目前甘蔗基因组序列测定的完成,将使得甘蔗实施分子育种策略成为可能,本发明基于我们破译的甘蔗全基因组序列,利用生物信息学手段来分析SSR的分布特点和规律,设计、合成甘蔗高贵种和割手密种种间特异性SSR引物,通过实验验证引物的多态性进而开发相关的标记,这显然是效率最高、费用最低的一种方法。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有技术中缺乏甘蔗全基因组扫描开发SSR标记引物的不足,提供一组与甘蔗高贵种二号染色体位置相关联的、尤其适合于甘蔗属的资源遗传分析和品种鉴定的SSR标记引物组及其应用。具体为分清SSR所在高贵种、割手密种基因组染色体的位置,进而分清甘蔗高贵种和割手密种的遗传背景,对现代甘蔗起源及扩大现代甘蔗育种的应用遗传资源提供技术支撑。

[0007] 为了实现上述目的,本发明提供的技术方案为:

[0008] 第一方面,提供一种区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体(对应高贵种)遗传背景的的SSR分子标记,包括4对多态性引物,其引物核苷酸序列及所在高贵种、割手密种染色体位置如下:

[0009] 引物对1:

[0010] So.2A.Ss (AATCT) 8-F:5' -GATGAAGTCCACACGCACAG-3' ;SEQ ID NO .1,

[0011] So.2A.Ss (AATCT) 8-R:5' -TCATAGGAAGCCGCATGAAT-3' ;SEQ ID NO .2,

[0012] 所在染色体位置:高贵种2号染色体/割手密2号染色体。

[0013] 引物对2:

[0014] So.2E.Ss (GAG) 6-F:5' -TCACCCGCTTGTTTCTATTT-3' ;SEQ ID NO .3,

[0015] So.2E.Ss (GAG) 6-R:5' -GTATACGCTACCACGACGCC-3' ;SEQ ID NO .4,

[0016] 所在染色体位置:高贵种2号染色体/割手密2号染色体。

[0017] 引物对3:

[0018] So.2G.Ss (TA) 62-F:5' -TTTTGTCCGTCTTCTCTGG' ;SEQ ID NO .5,

[0019] So.2G.Ss (TA) 62-R:5' -TTCTAACTCGTATGAGCACGG-3' ;SEQ ID NO .6,

[0020] 所在染色体位置:高贵种2号染色体/割手密8号染色体。

[0021] 引物对4:

[0022] So.2G.Ss (TA) 49-F:5' -ACCAAGATGGCAGGAATCAG-3' ;SEQ ID NO .7,

[0023] So.2G.Ss (TA) 49-R:5' -TCATAGATCCTTTGCCCTACG-3' ;SEQ ID NO .8,

[0024] 所在染色体位置:高贵种2号染色体/割手密4号染色体。

[0025] 第二方面,提供一种开发能区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体(对应高贵种)遗传背景的微卫星分子标记的方法,包括以下步骤:

[0026] (1) 基于已经完成测序的甘蔗高贵种和割手密种全基因组数据开发SSR引物,使用MISA 软件包中的 Perl 脚本分别进行批量扫描甘蔗高贵种和割手密种基因组的SSR 位点。

[0027] (2) 利用SSR位点信息从基因组上截取SSR起始终止位点前后各150 bp 的侧翼序列,将候选的SSR序列与全基因组序列进行BLASTN比对,筛选出的命中序列即为本研究中的候选SSR位点。

[0028] (3) 采用批量引物设计软件Primer3对候选SSR位点设计两侧引物,引物设计完成后将引物提取出并将重复的引物去除。

[0029] (4) 将高贵种设计好的引物在自身基因组上进行e-PCR 模拟扩增,同时也在割手密基因组上进行e-PCR 模拟扩增;后对割手密种设计好的引物也做相同处理。筛选甘蔗高贵种和割手密种均存在但片段大小存在差异的SSR即甘蔗高贵种和割手密种种间特异性

SSR能够区分其遗传背景。

[0030] (5) 选择有代表性的5份甘蔗高贵种、4份割手密种材料、2份栽培种材料,提取其基因组DNA,用甘蔗种间特异性SSR引物对提取的基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物。

[0031] (6) 将得到的扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行验证。

[0032] 本发明的有益效果是:

[0033] 本发明提供了4对区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体(对应高贵种)遗传背景的微卫星分子标记,可明确分清SSR所在基因组染色体的位置,进而分析甘蔗高贵种和割手密种的遗传背景,从分子标记的角度分析现代甘蔗的起源进化过程,为现代甘蔗的进化分析提供新的思路和依据。

## 附图说明

[0034] 图1为四对SSR标记两侧基因的G0项富集。

[0035] 图2 So.2A.Ss (AATCT) 8引物在11个甘蔗材料上的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果图,其中1-5为甘蔗高贵种、6-9为割手密种、10-11为栽培种材料,M为50 bp DNA Ladder。

[0036] 图3 So.2E.Ss (GAG) 6引物在11个甘蔗材料上的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果图,其中1-5为甘蔗高贵种、6-9为割手密种、10-11为栽培种材料,M为50 bp DNA Ladder。

[0037] 图4 So.2G.Ss (TA) 62引物在11个甘蔗材料上的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果图,其中1-5为甘蔗高贵种、6-9为割手密种、10-11为栽培种材料,M为50 bp DNA Ladder。

[0038] 图5 So.2G.Ss (TA) 49引物在11个甘蔗材料上的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果图,其中1-5为甘蔗高贵种、6-9为割手密种、10-11为栽培种材料,M为50 bp DNA Ladder。

## 具体实施方式

[0039] 实施例1

[0040] 1. 甘蔗高贵种和割手密种全基因组序列中SSR序列的查找和SSR引物的设计及验证

[0041] 1.1 SSR 位点扫描

[0042] 利用 Micro Satellite identification tool-MISA 软件包中的 Perl 脚本进行批量扫描甘蔗基因组的SSR 位点,本研究设定是否为 SSR 的标准为:1) 一单元至少十次重复,二单元至少七次重复,三单元至少六次重复,四单元至少五次重复,五单元至少四次重复,六单元至少四次重复。2) 两个 SSR 之间距离小于 100 bp 时组合为一个复合SSR。

[0043] 1.2 序列截取

[0044] 计算每个SSR位点在基因组序列上的物理位置,利用SSR位置信息从甘蔗基因组上截取SSR起始终止位点前后各150 bp 的侧翼序列,将候选的SSR序列与全基因组序列进行BLASTN搜索(E取值 $1e^{-5}$ ),序列相似度100%,侧翼序列长度100%对齐,筛选出的命中序列即为本研究中的候选SSR位点。

[0045] 1.3 引物设计

[0046] SSR位点两侧引物设计采用的是批量引物设计软件Primer3,该软件可以在网站[http://frodo.wi.mit.edu/cgi.bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi.bin/primer3/primer3_www.cgi)下载。设置参数为:引物长

度18-23bp,最佳为20bp,最大、最小GC含量分别为60%、40%,产物目标片段大小在100-300bp,引物设计时要确保产物序列中包括SSR位点。引物设计完成后将引物提取出并将重复的引物去除。高贵种有63415个SSR设计到引物,割手密种有68214个设计到引物。

[0047] 1.4 引物验证

[0048] 利用 Electronic PCR (<https://www.animalgenome.org/bioinfo/resources/manuals/ePCR.html>) 将设计好的引物在基因组上进行电子 PCR 模拟扩增,将能够在基因组上扩增出特异性片段的引物提取出来作为甘蔗 SSR的储备引物。最终高贵种获得44048个引物,割手密获得45412个引物。之后将高贵种获得的引物比对到割手密种,同时将割手密种获得的引物比对到高贵种,筛选甘蔗高贵种和割手密种均存在但片段大小存在差异的SSR即甘蔗高贵种和割手密种种间特异性SSR进行验证。

[0050] 2. 甘蔗高贵种和割手密种种间特异性SSR引物的筛选

[0051] 2.1 提取基因组DNA

[0052] 选择有代表性的5份甘蔗高贵种、4份割手密种、2份栽培种材料(表1),用于检测甘蔗全基因组SSR标记的扩增效率及种间特异性,采用CTAB法提取基因组DNA。

[0053] 表1 11份甘蔗材料信息

序号	名称	类型
1	Badila	高贵种
2	Black Cheribon	高贵种
3	Crystalina	高贵种
4	Loethers	高贵种
5	LA Purple	高贵种
6	SES-208	割手密
7	福 89-1-1	割手密
8	广东 21	割手密
9	四川 79-2011	割手密
10	POJ-2878	栽培种
11	ROC-22	栽培种

[0054]

[0055] 2.2 PCR扩增

[0056] 采用合成的引物,在11份材料的基因组DNA进行扩增,根据扩增结果,筛选出扩增

结果稳定、种间特异性高及多态性丰富的引物。PCR反应体系20 $\mu$ L,其中25 ng/ $\mu$ L DNA样品0.5 $\mu$ L、10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 正向、反向引物各0.5 $\mu$ L、2 $\times$  Taq Master Mix 10 $\mu$ L,最后用ddH<sub>2</sub>O补足20 $\mu$ L。PCR扩增程序为94 $^{\circ}$ C预变性1min30s;94 $^{\circ}$ C变性20S,59.5 $^{\circ}$ C退火20S,72 $^{\circ}$ C延伸30S,共34个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。2 $\times$  Taq Master Mix试剂购自铂尚生物科技有限公司。

[0057] 2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0058] 所有PCR产物在9%的聚丙烯酰胺凝胶中进行分离,160V恒压下,电泳2h30min,电泳结束后,采用核酸染料(GelStain,购自北京全式金生物技术有限公司,货号:GS101-01),泡染法进行染色、拍照及保存。

[0059] 根据11个甘蔗属材料的条带情况,筛选出4对位于高贵种二号染色体的带型清晰且明显存在种间特异性的目标引物,表2为目标引物序列SEQ ID NO .1-SEQ ID NO .8及其所在染色体位置。后根据染色体位置寻找SSR标记两侧基因,G0富集显示(附图1),这些SSR两侧的基因主要富集到细胞组成、生物合成和代谢通路上。

[0060] 表2 4对SSR引物所在染色体位置及序列

编号	引物名称	标记所在染色体位置	引物序列-上游	引物序列-下游	重复单元
1	So. 2A. S <sub>s</sub> (AATCT)8	高贵种 2 号染色体/割手密 2 号染色体	GATGAAGTCCACAGCAG	TCATAGGAAGCCGATGAAT	(AATCT)8
2	So. 2E. S <sub>s</sub> (GAG)6	高贵种 2 号染色体/割手密 2 号染色体	TCACCCGCTGTCTTAATT	GTATACGCTACCAGAGGCC	(GAG)6
3	So. 2G. S <sub>s</sub> (TA)62	高贵种 2 号染色体/割手密 8 号染色体	TTTTGTCCGCTTCTCTGG	TTCTAACTCGTATGAGCAGG	(TA)62
4	So. 2G. S <sub>s</sub> (TA)49	高贵种 2 号染色体/割手密 4 号染色体	ACCAAGATGCCAGGAATCAG	TCATAGATCCTTTGCCCTACG	(TA)49

[0062] 筛选获得4对引物其电泳结果如图2-5,从电泳图中可看到在甘蔗高贵种和割手密种中存在共显性标记,即两个品种均存在条带,且条带对应片段大小存在差异;在栽培种中可能存在其中一种条带,或者两种类型条带均存在,可以辅助验证,由此可知,4对引物是可以区分甘蔗高贵种和割手密种遗传背景的SSR分子标记,且能够分清现代甘蔗栽培种中高贵种和割手密种的染色体血缘背景。聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果显示,通过生物信息学得到的种间特异性SSR与实验结果完全一致,证明此研究确实提高了开发SSR标记的效率。

[0063] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 福建农林大学
- [0003] <120> 一种区分甘蔗高贵种和割手密种二号染色体遗传背景的微卫星分子标记与应用
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 8
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] gatgaagtcc acacgcacag 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 20
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] tcataggaag ccgcatgaat 20
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <400> 3
- [0024] tcaccgcgtt gtttctattt 20
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <400> 4
- [0030] gtatacgcta ccacgacgcc 20
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 20
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <400> 5
- [0036] ttttgtccgt cttcctctgg 20
- [0037] <210> 6

- 
- [0038] <211> 21  
[0039] <212> DNA  
[0040] <213> 人工序列  
[0041] <400> 6  
[0042] ttctaactcg tatgagcacg g 21  
[0043] <210> 7  
[0044] <211> 20  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> 人工序列  
[0047] <400> 7  
[0048] accaagatgg caggaatcag 20  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 21  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> 人工序列  
[0053] <400> 8  
[0054] tcatagatcc tttgccctac g 21

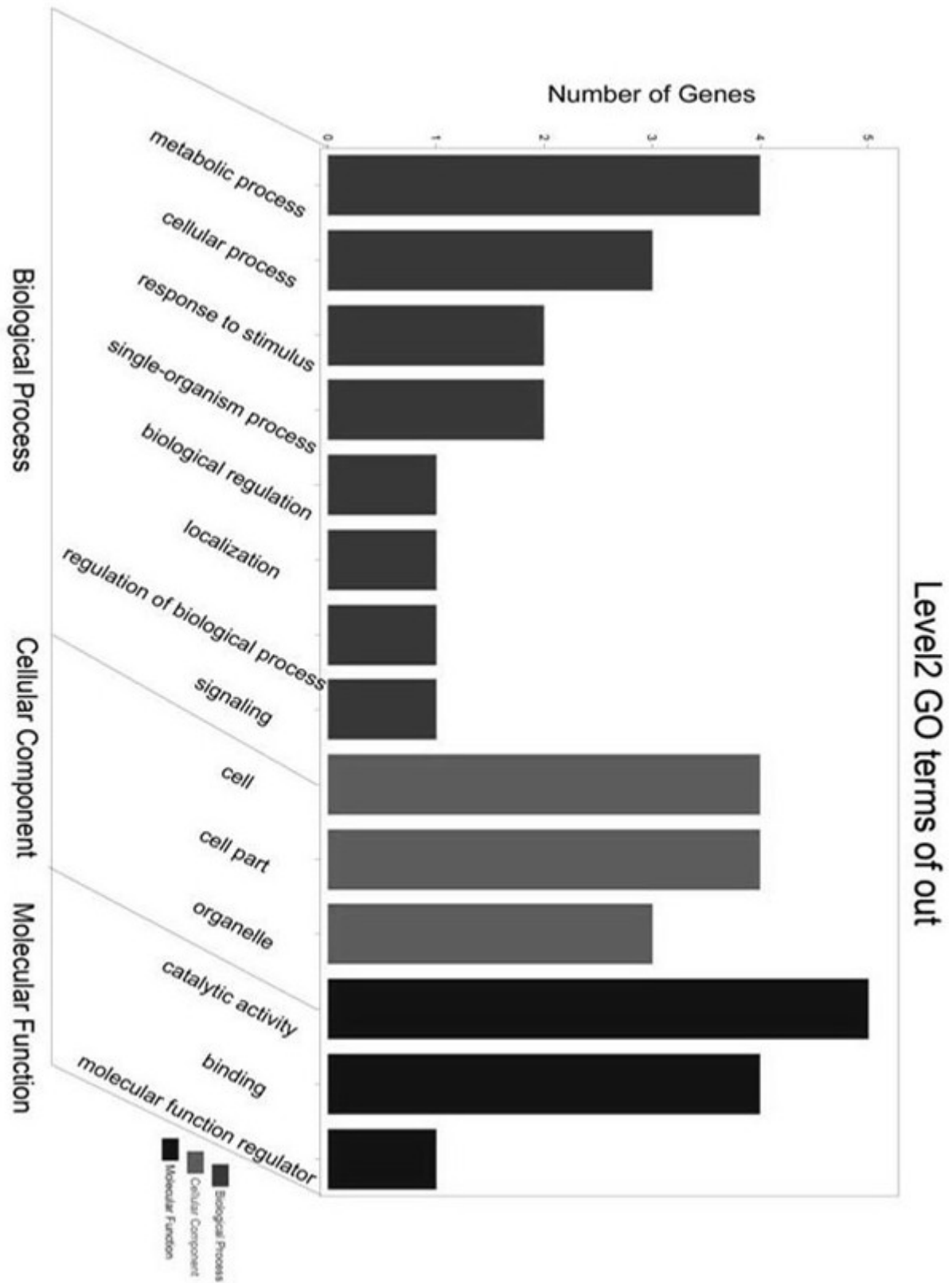


图1

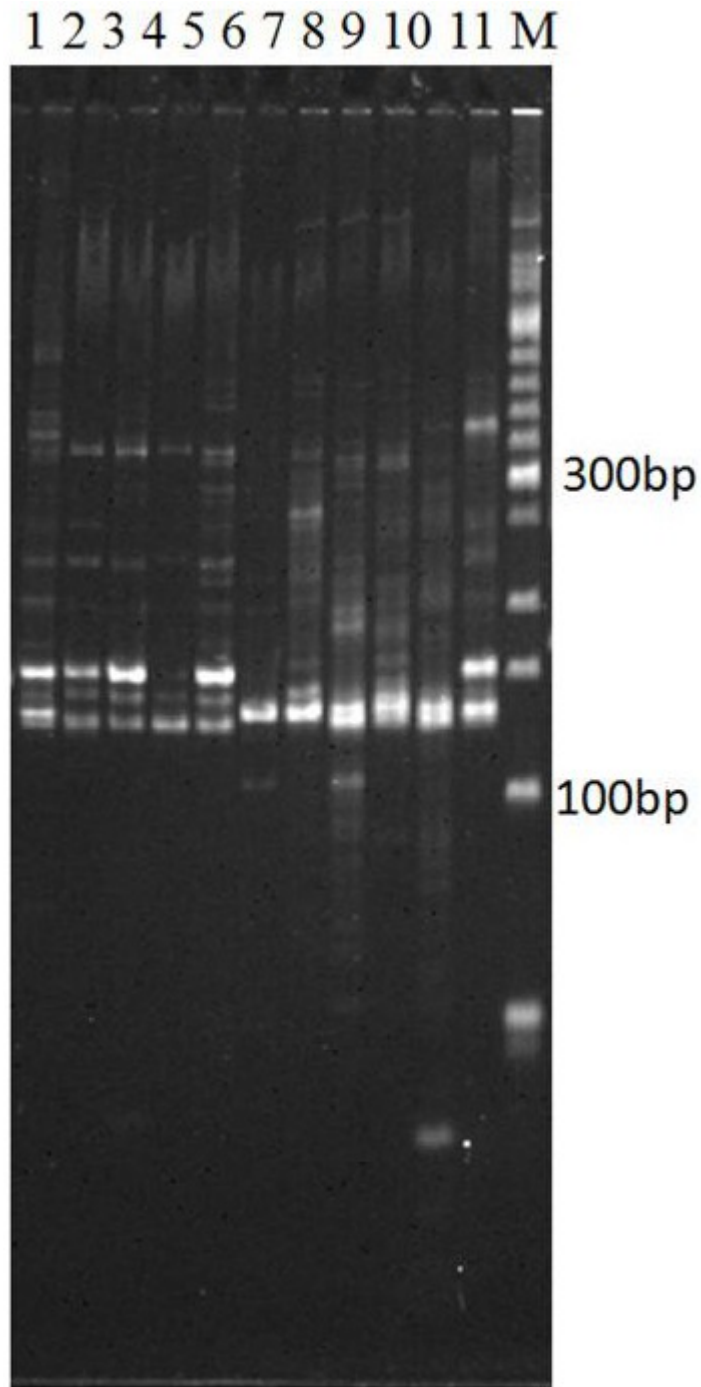


图2

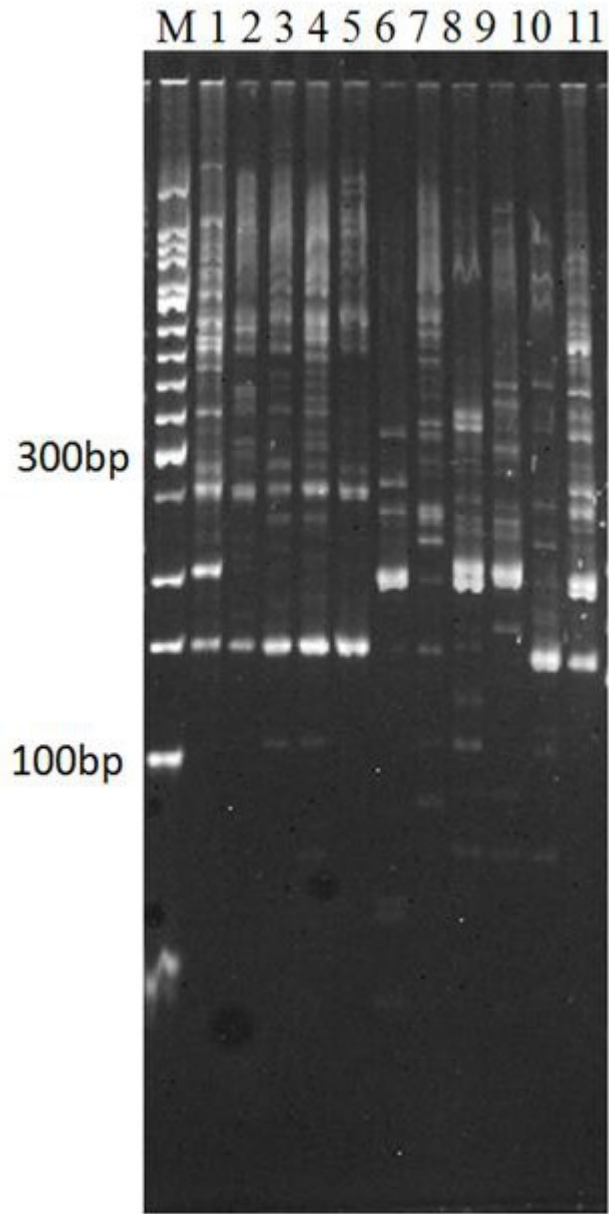


图3

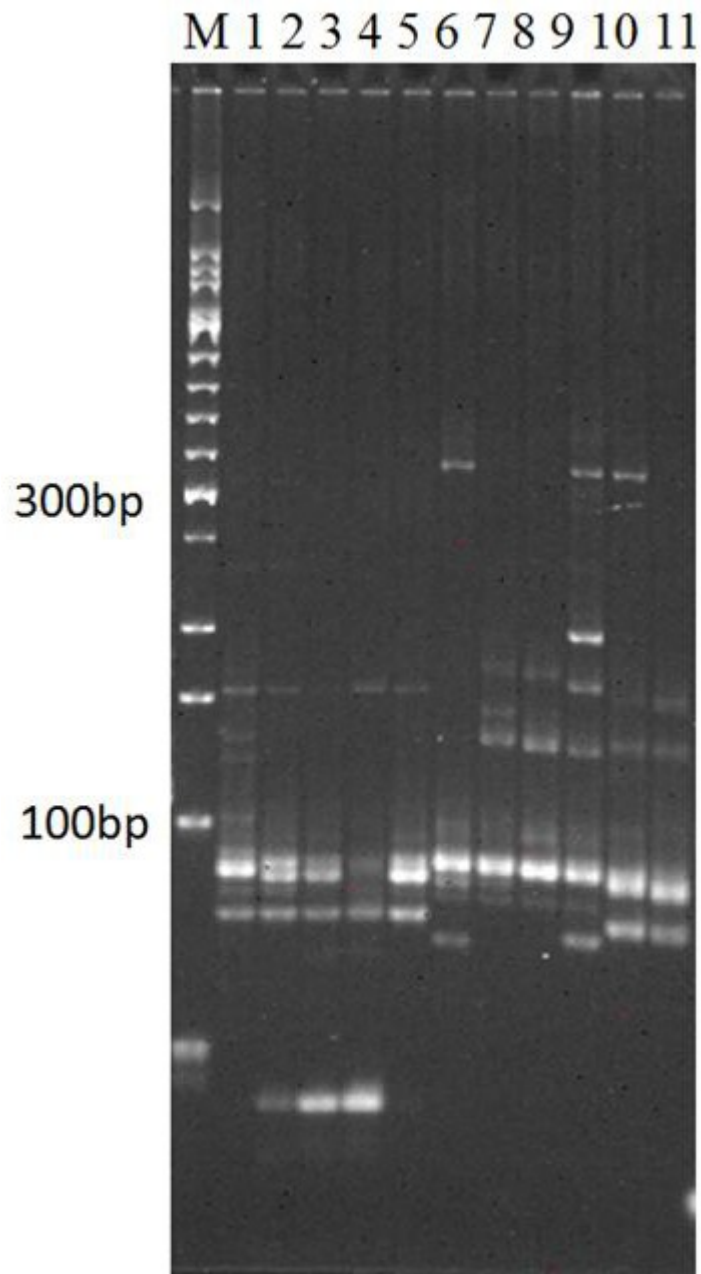


图4

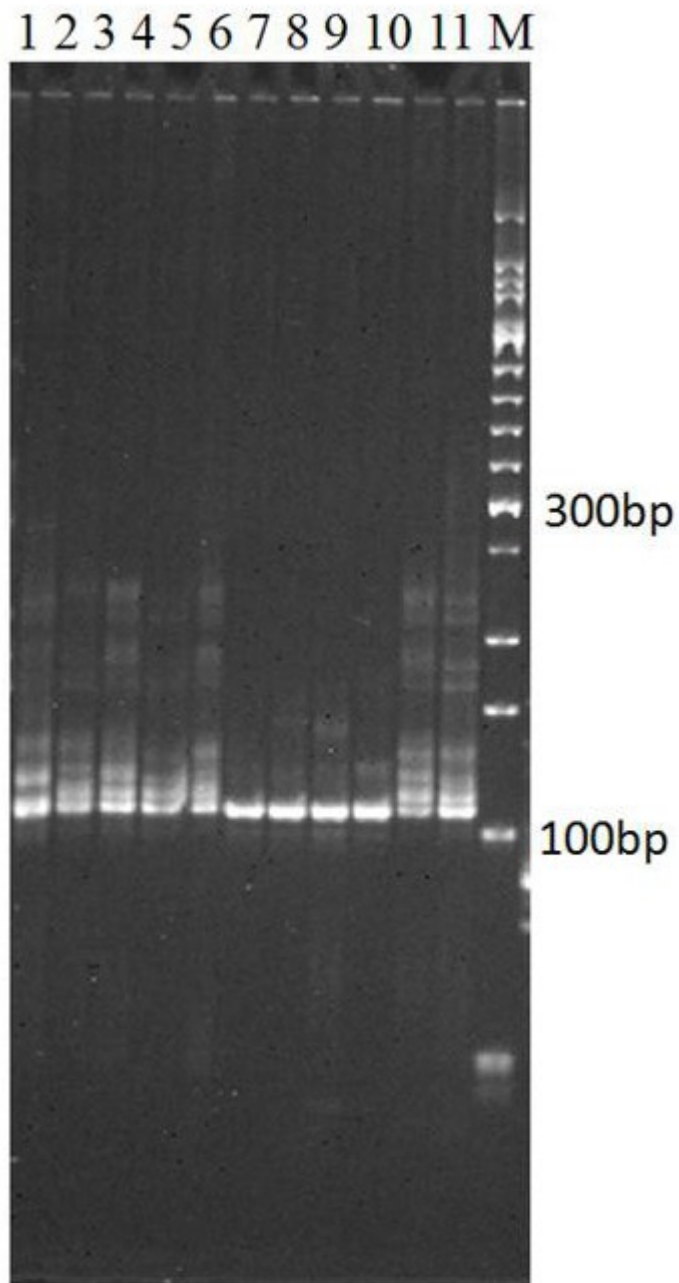


图5