



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102534026 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201210031778. X

A01H 1/02(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 13

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

US 7973212 B2, 2011. 07. 05,

审查员 李康琦

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路 1 号院
2 号

(72) 发明人 朱保葛 任海红 周国安 李素坤
杨瑞 潘毅

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 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1页

(54) 发明名称

辅助鉴定大豆百粒重相关位点的一种方法及其专用引物

(57) 摘要

本发明公开了辅助鉴定大豆百粒重相关位点的一种方法及其专用引物。本发明提供了辅助筛选具有高百粒重性状的大豆的一种方法,包括如下步骤:以待测大豆的基因组 DNA 为模板,用序列 1 和序列 2 所示 DNA 组成的 GNE070a 引物对进行 PCR 扩增,检测扩增产物,扩增产物中具有一个特异 DNA 片段的待测大豆为候选的具有高百粒重性状的大豆;所述特异 DNA 片段的大小为 275bp-285bp。本发明的方法克服了常规育种中因表型选择易受环境因素干扰而导致育种效率低等问题,可以利用专用引物对大豆高百粒重相关位点进行早期世代选择鉴定而缩短育种周期,从而快速筛选出籽粒较大的高产大豆材料。本发明可应用于大豆高产育种,以提高育种效率和大豆产量水平。

1. 一种辅助鉴定大豆高百粒重性状的方法,包括如下步骤:以待测大豆的基因组 DNA 为模板,用 GNE070a 引物对进行 PCR 扩增,检测扩增产物,扩增产物中具有一个特异 DNA 片段的待测大豆具有高百粒重的性状;所述 GNE070a 引物对为序列表的序列 1 所示 DNA 和序列表的序列 2 所示 DNA 组成的引物对;所述特异 DNA 片段的大小为 275bp-285bp;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

2. 序列表的序列 1 所示 DNA 和序列表的序列 2 所示 DNA 组成的引物对。

3. 权利要求 2 所述引物对在制备辅助鉴定大豆高百粒重性状的试剂盒中的应用。

4. 包括权利要求 2 所述引物对的试剂盒。

5. 权利要求 1 所述方法在大豆育种中的应用。

6. 如权利要求 5 所述的应用,其特征在于:将具有所述高百粒重性状的大豆用于所述育种。

7. 权利要求 2 所述引物对或权利要求 4 所述试剂盒在大豆育种中的应用。

辅助鉴定大豆百粒重相关位点的一种方法及其专用引物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种辅助鉴定大豆百粒重相关位点的一种方法及其专用引物。

背景技术

[0002] 基于表型选择的常规育种方法存在选择效率低和育种周期长等缺点,迫切需要注意现代分子技术手段,辅之于高效率地基因型定向选择,才能快速高效地培育出优异大豆新品种。随着分子生物学和基因组学的迅速发展,分子标记技术的应用更加广泛。基于 PCR 的分子标记如微卫星或 SSR(simple sequence repeat) 等具有多态率高、相对稳定、检测方法简便快速及易于操作等特点而被广泛的应用。由于分子标记辅助选择不受环境因素影响和性状显隐性干扰等,可以从分子水平定向选择目标性状基因(或称胶上选择),同时还有可能打破不利基因之间的连锁而高效率地聚合多个优良基因于一体。通常所说的分子标记既包括目标基因的连锁标记也包括目标基因自身功能标记。分子标记辅助多基因聚合育种技术已经成为大豆等作物育种研究的一种发展趋势,运用该技术能否有效地将优质、多抗和高产等基因聚合到少数骨干品种中,关键在于能否获得足够多的与目标性状基因或主效 QTL 紧密连锁的实用分子标记。

[0003] 大豆籽粒产量=单位面积株数×单株粒数×粒重。因此,荚粒数、粒大小(粒长、粒宽)、单株荚数/粒数及单株粒重等均与籽粒产量密切相关。大豆产量构成因素都是由许多微效基因或 QTL 控制的复杂数量性状,遗传力大都较低。但大豆百粒重(是指 100 粒大豆种子的重量,其数值的高低直接反映籽粒体积的大小)在产量构成因素中是一个确定的重要数量性状,品种之间差异明显,遗传力比较高(55%左右),以加性遗传效应为主,在产量性状中其遗传规律相对简单,主要受少数主基因与若干微效基因共同控制。

[0004] 在大豆荚粒数性状方面,朱保葛等通过诱变方法筛选到个发生单位点突变的多粒荚(即 4 粒荚)突变系,使得复杂的数量遗传性状转变为简单的质量遗传性状,便于分子标记与定位分析,并利用所创造的近等基因系 NIL(near isogenic line) 材料研究表明,该位点能使大豆植株的 4 粒荚比率至少提高 15%,并发现与突变位点相连锁的 4 个 SSR 标记(位于其两侧),两侧标记 Sat_107 和 Satt491(3.2cM 和 4.2cM) 已经成功地用于高产材料的辅助选择。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供辅助鉴定大豆百粒重相关位点的一种方法及其专用引物。

[0006] 本发明提供的辅助筛选具有高百粒重性状的大豆的方法,包括如下步骤:以待测大豆的基因组 DNA 为模板,用 GNE070a 引物对进行 PCR 扩增,检测扩增产物,扩增产物中具有一个特异 DNA 片段的待测大豆为候选的具有高百粒重性状的大豆;所述 GNE070a 引物对为序列 1 所示 DNA 和序列 2 所示 DNA 组成的引物对;所述特异 DNA 片段的大小为 275bp-285bp;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0007] 所述方法可用于大豆育种。具体来说,可将所述候选的具有高百粒重性状的大豆

用于所述育种。

[0008] 本发明还提供了一种辅助鉴定大豆高百粒重性状的方法,包括如下步骤:以待测大豆的基因组 DNA 为模板,用 GNE070a 引物对进行 PCR 扩增,检测扩增产物,扩增产物中具有一个特异 DNA 片段的待测大豆具有高百粒重的性状;所述 GNE070a 引物对为序列表的序列 1 所示 DNA 和序列表的序列 2 所示 DNA 组成的引物对;所述特异 DNA 片段的大小为 275bp-285bp;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0009] 所述方法可用于大豆育种。具体来说,可将具有所述高百粒重性状的大豆用于所述育种。

[0010] 本发明还保护序列表的序列 1 所示 DNA 和序列表的序列 2 所示 DNA 组成的引物对 (GNE070a 引物对)。

[0011] 所述引物对的功能为如下 (a) 和 / 或 (b) :

[0012] (a) 辅助鉴定大豆百粒重性状;

[0013] (b) 辅助筛选具有高百粒重性状的大豆;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0014] 从实际应用角度出发,所述 (a) 中,GNE070a 引物对主要用于辅助鉴定大豆的高百粒重性状;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0015] 所述引物对在制备试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。

[0016] 所述试剂盒的功能为如下 (a) 和 / 或 (b) :

[0017] (a) 辅助鉴定大豆百粒重性状;

[0018] (b) 辅助筛选具有高百粒重性状的大豆;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0019] 从实际应用角度出发,所述 (a) 中,所述试剂盒主要用于辅助鉴定大豆高百粒重性状;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0020] 本发明还保护一种试剂盒,包括所述引物对。

[0021] 所述试剂盒的功能为如下 (a) 和 / 或 (b) :

[0022] (a) 辅助鉴定大豆百粒重性状;

[0023] (b) 辅助筛选具有高百粒重性状的大豆;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0024] 从实际应用角度出发,所述 (a) 中,所述试剂盒主要用于辅助鉴定大豆高百粒重性状;所述高百粒重性状为籽粒百粒重 ≥ 25.0 克的性状。

[0025] 由于大豆的百粒重性状与大豆产量密切相关,所述方法、所述引物对和所述试剂盒均可应用于大豆育种 (如高产大豆育种)。

[0026] 本发明同时发现一个控制大豆百粒重性状的相关位点 (hsw1),被定位于大豆分子遗传图谱的 A2 连锁群,与 EST-SSR 功能标记 GNE070a 之间的遗传距离为 2.8cM。

[0027] 本发明发现,GNE070a 引物对可用于选择大豆的百粒重相关位点,并且得到了一个百粒重相关位点 (高百粒重相关位点, hsw1),通过该位点可以辅助筛选高百粒重性状的大豆材料。从而,应用 GNE070a 引物对可以辅助筛选大豆的百粒重性状 (特别是高百粒重性状) 和不同百粒重性状 (特别是高百粒重性状) 的大豆。因此,本发明的引物对可以应用于培育具有高产性状的大豆品种。

[0028] 本发明的方法克服了常规育种中因表型选择易受环境因素干扰而导致育种效率低等问题,可以利用 GNE070a 引物对大豆高百粒重相关位点进行早期世代选择而缩短育种周期,从而较快地筛选出籽粒较大的高产大豆材料。本发明可应用于大豆高产育种,以提高育种效率和大豆产量水平。

附图说明

[0029] 图 1 为大豆百粒重性状相关位点 hsw1 的定位情况。

具体实施方式

[0030] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0031] 实施例 1、大豆百粒重相关位点(高百粒重相关位点)hsw1 的获得

[0032] 一、引物合成

[0033] GNE070 引物对序列获自 SOYBASE 数据库;上游正向引物序列为:5'-TGCTTCTCTATTGGTTGT-3';下游反向引物序列为:5'-TCTTCTCTGATCCATCACC-3',委托北京奥赛博生物公司合成。

[0034] 二、双亲基因组扩增检测

[0035] 用于创建大豆重组自交系(recombinant inbred line,RIL)群体的双亲分别是中黄 4(国家大豆种质资源库)和中品 661(国家大豆种质资源库)。中黄 4 为母本,其籽粒体积较大(22.0-26.5 克/百粒);中品 661 为父本,其籽粒体积较小(17.7-19.5 克/百粒)。

[0036] 采用 CTAB 法提取双亲叶片的基因组 DNA,以 GNE070a 引物对进行扩增实验。PCR 反应体系(20 μ l):10 $\times$ Buffer 2 μ l(含 Mg^{2+}),dNTP 0.4 μ l(10mM),上游正向引物(5 μ M)和下游反向引物(5 μ M)各 2 μ l,基因组 DNA(40ng/ μ l)1 μ l,Taq 酶(5U/ μ l)0.5 μ l,其余为 ddH₂O,滴加一滴矿物油覆盖。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 60s,53.5 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 60s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。

[0037] PCR 扩增产物用 9% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,快速银染法染色并在紫外灯下观察拍照。结果显示,GNE070a 引物对的扩增产物在双亲基因组之间呈现多态性。

[0038] 三、群体扩增检测及连锁分析定位

[0039] 用以上两个亲本进行杂交,得到杂种 F₁,通过“单粒传”法构建群体,获得 475 个 F₁₂ 代重组自交系。

[0040] “单粒传”法步骤如下:在父母本杂交当代从母本植株上收获的一粒种子种植后长成一个 F₁ 代单株,其自交(即自花授粉)结实收获 1 株 F₂ 代种子,后者种植长成一个包含分离性状的 F₂ 代株行,它的每一单株自交结实收获 F₃ 代种子,将分离的同类性状植株单收并脱粒装袋,每株种子次年单独种植一个 F₃ 株行,自交结实收获 F₄ 代种子,……,直至各家系内不同植株之间的性状完全稳定一致。像这样最初由单粒种子经过连续多代自交、分离、纯化、种植、选育及鉴定等程序,最终发展成一个由数百个甚至数千个重组自交系构成的大群体,即为“单粒传”法构建群体。其特征是各家系内不同植株之间的性状稳定一致,而家

系间的性状差异较大。

[0041] 用 GNE070a 引物对逐一扩增群体中所有株系的基因组 DNA, 结合计算机作图软件 (MAPMAKER/EXP VER 3.0 和 WINQTL CART VERSION 2.5) 分析, 确定了一个百粒重性状相关位点, 将其命名为 hsw1, 被定位于大豆分子遗传图谱的 A2 连锁群, 与其连锁标记 GNE070a 间的遗传距离为 2.8cM (见图 1)。

[0042] 实施例 2、GNE070a 引物对的扩增产物与粒重性状的相关性验证

[0043] 实验样本为 48 份大豆植物材料 (纯合品种或品系)。

[0044] 采用 CTAB 法分别提取每份大豆植株叶片的基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板采用 GNE070a 引物对进行 PCR 扩增实验。PCR 反应体系 (20 μ l): 10 $\times$ Buffer 2 μ l (含 Mg^{2+}), dNTP (10mM) 0.4 μ l, 上游正向引物 (5 μ M) 和下游反向引物 (5 μ M) 各 2 μ l, 基因组 DNA (40ng/ μ l) 1 μ l, Taq 酶 (5U/ μ l) 0.5 μ l, 其余为 ddH₂O, 滴加一滴矿物油覆盖。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 60s、53.5 $^{\circ}$ C 60s、72 $^{\circ}$ C 60s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

[0045] PCR 扩增产物用 9% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 快速银染法染色并在紫外灯下观察。回收 PCR 扩增产物并测序。

[0046] 也可以采用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物, 观察相应的特异片段。

[0047] 对 48 份植株所结的籽实进行百粒重称量 (设置三次重复试验, 结果取平均值), 该 48 份大豆根据籽实的百粒重可以划分为两组: 36 份为大粒组 (百粒重 ≥ 25.0 克), 12 份为小粒组 (百粒重 ≤ 17.3 克), 详见表 1。

[0048] 表 1 大粒组与小粒组大豆材料的百粒重和 PCR 扩增产物测序得到的大小

[0049]

大粒组 ($\geq 25.0\text{g}/\text{百粒}$)				小粒组 ($\leq 17.3\text{g}/\text{百粒}$)			
材料编号	材料名称	百粒重 g	测序结果 bp	材料编号	材料名称	百粒重 g	测序结果 bp
5	8502 ^a	31.4	282	9	97-126 ^a	16.2	300
7	9602-1 ^a	31.6	280	12	E-182 ^a	14.2	302
8	9702 ^a	26.8	275	24	PEKING [*]	11.7	310
15	J23Y-6-3 ^a	31.8	276	33	汾豆 62 号 [*]	12.8	312
23	LT126 ^a	31.2	279	39	高丰 1 号 [*]	14.4	308
25	T117-119 ^a	33.2	280	54	灰布支 [*]	9.4	<u>281</u>
70	科丰 14 号 [*]	27.0	281	72	科丰 14-3 ^a	15.2	<u>280</u>
71	科丰 14-2 ^a	28.2	280	75	科丰 1 号 [*]	13.4	315
73	科丰 15 号 [*]	29.3	282	80	科丰 37 号 [*]	17.3	315
74	科丰 17 号 [*]	28.2	282	89	鲁豆 4 号 [*]	16.6	314
77	科丰 34 号 [*]	32.2	281	94	潍科 928 [*]	15.2	316
78	科丰 35 号 [*]	28.8	281	115	中品 661 [*]	16.2	312
79	科丰 36 号 [*]	27.5	<u>299</u>	共计 12 个小粒样本			
83	科绿 1 号 ^a	29.6	281				
84	科台 75 [*]	34.0	280				
96	特大粒 1 号 [*]	36.7	280				
101	延引 1 号 ^a	29.0	280				
102	诱处 4 号 ^a	27.5	281				
116	中作 975 [*]	25.2	<u>302</u>				
121	9304 ^a	28.5	282				
122	8803-8 ^a	32.0	<u>301</u>				
123	9007Y-2-1-5 ^a	28.6	280				
124	Z58-13-20 ^a	28.0	280				
125	新六青 ^a	27.2	280				
126	阜 9363 [*]	30.2	279				
128	京引科选 1 号 ^a	28.6	284				
129	京豆 2 号 [*]	26.8	284				
130	徐豆 9313 [*]	25.0	<u>304</u>				
131	豫豆 16 [*]	25.8	280				
132	光黑大豆 [*]	28.4	280				
133	滑 20 [*]	27.5	281				
134	中作 91-6014 [*]	25.6	279				
135	ZP-172 ^a	25.7	280				
136	ZP-252 ^a	25.8	281				
137	ZP-337 ^a	27.9	281				
138	ZP-379 ^a	25.4	285				
共计 36 个大粒样本							

[0050] * 获自国家大豆种质资源库；^a 购自北京科遗农业科技有限公司。

[0051] 结合 PCR 扩增实验的结果和百粒重测量的结果（表 1），分析如下：供试大豆样本中大多数都存在一个特异 DNA 片段（275bp-285bp 之间），该 DNA 片段所代表的平均百粒重为 28.1 克（平均百粒重是将所有具有该片段的样本的百粒重取平均数得到的）；在全部 36

份大粒材料有 32 份能检测到该特异 DNA 片段,符合率达到 88.89%;而在 12 份小粒组材料中只有 2 份检测到该特异 DNA 片段。因此,GNE070a 引物对的靶序列是与百粒重性状位点 hsw1 相关的 EST-SSR 标记,可用于大豆分子辅助育种以提高产量水平。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院遗传与发育生物学研究所

<120> 辅助鉴定大豆百粒重相关位点的一种方法及其专用引物

<130> CGGNAY122086

<160> 2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

tgctttcctc tattggttgt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

tctttctctg atccatcacc

20

LGA2

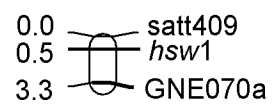


图 1