



(21) 申请号 201611026273.9

(22) 申请日 2016.11.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106319087 A

(43) 申请公布日 2017.01.11

(73) 专利权人 河北省农林科学院粮油作物研究所

地址 050035 河北省石家庄市高新区恒山街162号

(72) 发明人 闫龙 张孟臣 陈强 杨春燕

刘兵强 邸锐 张梅申 史晓蕾

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2002157143 A1, 2002.10.24

陈强等. 大豆百粒重QTL定位及多样性评价. 《中国农业科学》. 2016, (第09期),

审查员 任爱琳

权利要求书1页 说明书9页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

鉴定大豆籽粒密度的方法及与大豆籽粒密度相关的QTL

(57) 摘要

本发明公开了鉴定大豆籽粒密度的方法及与大豆籽粒密度相关的QTL。本发明公开的鉴定大豆籽粒密度的方法,包括以待鉴定大豆、冀豆12和黑豆ZDD03651的基因组DNA为模板,用序列1和序列2组成的引物对(分子标记Sat_215)进行PCR扩增,通过电泳检测所得到的PCR产物:与冀豆12的PCR产物带型相同的大豆的籽粒密度大于黑豆ZDD03651,与黑豆ZDD03651的PCR产物带型相同的大豆的籽粒密度小于冀豆12,含有冀豆12与黑豆ZDD03651的PCR产物带型的大豆的籽粒密度处于黑豆ZDD03651与冀豆12之间。实验证明,分子标记Sat_215与大豆的籽粒密度相关,可用于检测大豆籽粒密度。

1. 鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法,包括:分别以待鉴定大豆、冀豆12和黑豆ZDD03651的基因组DNA为模板,用名称为X1的PCR引物对进行PCR扩增,通过电泳检测所得到的PCR产物,按照下述方法确定所述待鉴定大豆籽粒密度:

将冀豆12的PCR产物的带型命名为A,将黑豆ZDD03651的PCR产物的带型命名为B,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为所述A,所述待鉴定大豆为AA基因型大豆,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为所述B,所述待鉴定大豆为BB基因型大豆,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为H带型,所述H带型为含有所述A带型和所述B带型的带型,所述待鉴定大豆为AB基因型大豆;

AA基因型的待鉴定大豆的籽粒密度分别大于AB基因型的待鉴定大豆和BB基因型的待鉴定大豆,BB基因型的待鉴定大豆的籽粒密度分别小于AB基因型的待鉴定大豆和AA基因型的待鉴定大豆;

所述X1由序列表中SEQ ID No.1所示的单链DNA和序列表中SEQ ID No.2所示的单链DNA组成;

所述待鉴定大豆选自冀豆12×黑豆ZDD03651的杂种后代中的F2及其以后世代的家系。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述电泳为非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述待鉴定大豆选自冀豆12×黑豆ZDD03651的杂种后代中的F2及其以后世代的家系。

4. 下述任一应用:

M1、权利要求1-3中任一所述的方法在下述1)或2)中的应用:

- 1) 预测或辅助预测大豆籽粒密度;
- 2) 鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度;

M2、权利要求1中所述X1在下述a)、b)或c)中的应用:

- a) 预测或辅助预测大豆籽粒密度;
- b) 制备鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的产品;
- c) 鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度。

鉴定大豆籽粒密度的方法及与大豆籽粒密度相关的QTL

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域中鉴定大豆籽粒密度的方法及与大豆籽粒密度相关的QTL。

背景技术

[0002] 粒重是产量构成因素之一,其主要受籽粒体积和密度的影响。籽粒体积的变异程度较大,较易被育种家利用,以期通过增加籽粒体积来提高粒重,所以籽粒大小及粒形相关研究较多。但是随着籽粒体积的增大,往往会引起籽粒外观和加工品质的下降。因此,籽粒密度即是产量构成因子之一,也是衡量种子质量的重要指标,影响了加工品质及种子活力。近年来,籽粒物理性状(粒重、粒长、粒宽、粒厚、体积、密度等)越来越受到育种家和遗传学者的关注。这些性状均属于多基因控制的数量性状,不仅遗传基础复杂,还受到环境条件等因素的影响。

[0003] 在玉米中,张丽等通过对多个优异玉米品种授粉后玉米籽粒的干比重、鲜比重等测定,探讨玉米籽粒比重在籽粒灌浆过程中的建成动态及其与籽粒灌浆特性的关系,发现籽粒灌浆快增持续期是干比重形成的关键时期,该时期影响籽粒灌浆会显著影响干比重的大小。白光红等以综3和87-1构建的294个玉米F9:10家系为材料,研究了玉米籽粒比重的遗传变异情况,并采用复合区间作图法在两年中共检测到了籽粒比重相关QTL位点7个。黄婧等对杂交水稻籽粒比重与其他穗粒性状的相关性和遗传进行了分析,认为基于籽粒比重选择的杂交水稻育种方法具有巨大潜力和可行性。小麦中,董连生等利用由和尚麦和豫麦8679杂交后代构建的RIL群体(包括129个家系)为材料,研究了调控油菜素内酯活性的关键基因BAS1和小麦千粒重、籽粒密度两个产量性状的关系。BAS1位点等位变异分别与千粒重和籽粒密度呈显著(0.178*)和极显著(0.327***)正相关,揭示了BAS1基因位点等位变异与小麦粒重、籽粒密度间的密切联系。马晓红等研究了不同来源的大豆比重差异,并研究发现大豆的百粒重与体积呈显著的正相关;子粒比重与百粒重呈不显著负相关;子粒比重和体积呈显著和不显著的负相关,体积大的品种,其比重则较轻,干物质积累少,种子的质量不如小粒大豆。

[0004] 而限于测量手段、测量效率、结果准确性等因素,有关大豆子粒比重的研究较少,未有相关QTL位点的报道。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是如何鉴定大豆籽粒密度。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法。

[0007] 本发明所提供的鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法,包括:分别以待鉴定大豆、冀豆12和黑豆ZDD03651的基因组DNA为模板,用名称为X1的PCR引物对进行PCR扩增,通过电泳检测所得到的PCR产物,按照下述方法确定所述待鉴定大豆籽粒密度:

[0008] 将冀豆12的PCR产物的带型命名为A,将黑豆ZDD03651的PCR产物的带型命名为B,

如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为所述B,所述待鉴定大豆籽粒密度小于或候选小于冀豆12,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为所述A,所述待鉴定大豆籽粒密度大于或候选大于黑豆ZDD03651,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为H带型,所述H带型为含有所述A带型和所述B带型的带型,所述待鉴定大豆籽粒密度处于或候选处于黑豆ZDD03651与冀豆12之间;

[0009] 所述X1由P1和P2组成;

[0010] 所述P1为如下a1)至a4)中的任一种单链DNA:

[0011] a1) 序列表中SEQ ID No.1所示的单链DNA;

[0012] a2) 在a1)的5'端和/或3'端添加一个或几个核苷酸得到的单链DNA;

[0013] a3) 与a1)或a2)限定的单链DNA具有85%以上的同一性的单链DNA;

[0014] a4) 在严格条件下与a1)或a2)限定的单链DNA杂交的单链DNA;

[0015] 所述P2为如下b1)至b4)中的任一种单链DNA:

[0016] b1) 序列表中SEQ ID No.2所示的单链DNA;

[0017] b2) 在b1)的5'端和/或3'端添加一个或几个核苷酸得到的单链DNA;

[0018] b3) 与b1)或b2)限定的单链DNA具有85%以上的同一性的单链DNA;

[0019] b4) 在严格条件下与b1)或b2)限定的单链DNA杂交的单链DNA。

[0020] a2) 所述在a1)的5'端和/或3'端添加一个或几个核苷酸得到的单链DNA可为在SEQ ID No.1所示的单链DNA的5'端和/或3'端添加一至十个核苷酸得到的单链DNA。b2) 所述在b1)的5'端和/或3'端添加一个或几个核苷酸得到的单链DNA可为在SEQ ID No.2所示的单链DNA的5'端和/或3'端添加一至十个核苷酸得到的单链DNA。

[0021] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的SEQ ID No.1或SEQ ID No.2所示的核苷酸序列具有85%或更高,或90%或更高,或95%或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0022] 所述严格条件是在 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中,在 68°C 下杂交并洗膜2次,每次5min,又于 $0.5 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中,在 68°C 下杂交并洗膜2次,每次15min;或, $0.1 \times \text{SSPE}$ (或 $0.1 \times \text{SSC}$)、0.1% SDS的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

[0023] 上述85%以上同一性,可为85%、90%或95%以上的同一性。

[0024] 为解决上述技术问题,本发明还提供了检测大豆基因型的方法。

[0025] 本发明所提供的检测大豆基因型的方法,所述基因型为AA基因型、BB基因型和AB基因型,所述方法包括:

[0026] 分别以待鉴定大豆、冀豆12和黑豆ZDD03651的基因组DNA为模板,用所述P1和所述P2进行PCR扩增,通过电泳检测所得到的PCR产物,按照下述方法确定所述待鉴定大豆的基因型:

[0027] 将冀豆12的PCR产物的带型命名为A,将黑豆ZDD03651的PCR产物的带型命名为B,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为所述A,所述待鉴定大豆为AA基因型大豆,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为所述B,所述待鉴定大豆为BB基因型大豆,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为H带型,所述H带型为含有所述A带型和所述B带型

的带型,所述待鉴定大豆为AB基因型大豆。

[0028] 其中,所述AA基因型大豆的籽粒密度分别大于所述AB基因型大豆和所述BB基因型大豆,所述BB基因型大豆的籽粒密度分别小于所述AB基因型大豆和所述AA基因型大豆。

[0029] 上述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法和检测大豆基因型的方法中,所述电泳均可为非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。所述非变性聚丙烯酰胺凝胶的浓度具体可为6%。

[0030] 上述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法和检测大豆基因型的方法中,所述PCR扩增中的引物退火温度均可可为55°C。

[0031] 上述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法和检测大豆基因型的方法中,所述PCR扩增中的引物退火条件均可可为55°C,30s。

[0032] 上述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法和检测大豆基因型的方法中,所述PCR扩增的条件具体可为:94°C5min;94°C30s,55°C30s,72°C30s,35个循环;72°C5min;4°C保存。

[0033] 上述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法和检测大豆基因型的方法中,进行所述PCR扩增的体系中所述P1和所述P2的浓度均可可为0.15μM。所述体系可含有dNTP、DNA聚合酶和/或PCR缓冲液。所述PCR缓冲液具体可为10×PCR Buffer。所述DNA聚合酶具体可为rTap酶。所述体系具体可含有所述P1、所述P2、10×PCR Buffer、dNTPs、rTap酶、所述待鉴定大豆基因组DNA和水。所述体系具体可为:所述P1(10μM)0.3μL、所述P2(10μM)0.3μL、10×PCR Buffer 2μL、dNTPs(2.5mM)1.5μL、rTap酶(5U/μL)0.2μL、模板DNA(20ng/μL)5μL和ddH₂O 10.7μL。其中,10×PCR Buffer、rTap酶和dNTPs均可可为宝生物工程(大连)有限公司产品。

[0034] 上述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法和检测大豆基因型的方法中,所述待鉴定大豆均可选自冀豆12×黑豆ZDD03651的杂种后代中的F₂及其以后世代的家系。

[0035] 为解决上述技术问题,本发明还提供了鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的引物对。

[0036] 本发明所提供的鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的引物对,为所述X1。

[0037] 其中,所述P1和所述P2独立包装。所述P1和所述P2的摩尔比可为1:1。

[0038] 为解决上述技术问题,本发明还提供了鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的系统。

[0039] 本发明所提供的鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的系统,包括所述X1。

[0040] 上述系统可包括所述X1、进行PCR扩增所需的试剂和/或仪器、和/或进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的试剂和/或仪器。

[0041] 所述进行PCR扩增所需的试剂可为dNTP、DNA聚合酶和/或PCR缓冲液。所述PCR缓冲液具体可为10×PCR Buffer。所述DNA聚合酶具体可为rTap酶。10×PCR Buffer、rTap酶和dNTPs均可可为宝生物工程(大连)有限公司产品。所述进行PCR扩增所需的仪器可为PCR仪。

[0042] 上述系统中,所述X1、所述进行PCR扩增所需的试剂以及进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的试剂均可独立包装。所述X1的两条单链DNA均可独立包装。进行PCR扩增所需的各试剂和进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的各试剂均可独立包装。

[0043] 上述系统也可为仅含有所述X1、所述进行PCR扩增所需的试剂和/或所述进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的试剂的试剂或试剂盒。

[0044] 为解决上述技术问题,本发明还提供了与大豆籽粒密度相关的主效数量性状位点qSD-8-1。

[0045] 本发明所提供的与大豆籽粒密度相关的主效数量性状位点qSD-8-1,定位于第8号

染色体上,为Sat_215。

[0046] 其中,所述P1和P2分别为可特异识别所述分子标记为Sat_215的上游和下游引物序列。

[0047] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述任一应用:

[0048] M1、所述鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的方法或所述检测大豆基因型的方法在下述1)或2)或3)中的应用:

[0049] 1) 大豆育种;

[0050] 2) 预测或辅助预测大豆籽粒密度;

[0051] 3) 鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度;

[0052] M2、所述X1,或所述的系统,或所述与大豆籽粒密度相关的主效数量性状位点qSD-8-1在下述a)、b)、c)或d)中的应用:

[0053] a) 大豆育种;

[0054] b) 预测或辅助预测大豆籽粒密度;

[0055] c) 制备鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的产品;

[0056] d) 鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度;

[0057] M3、所述与大豆籽粒密度相关的主效数量性状位点qSD-8-1在制备鉴定或辅助鉴定大豆籽粒密度的分子标记中的应用。

[0058] 为解决上述技术问题,本发明还提供了大豆育种方法。

[0059] 本发明所提供的大豆育种方法,包括按照所述检测大豆基因型的方法鉴定大豆的基因型,选择AA或AB基因型的大豆作为亲本进行育种。

[0060] 本发明中,所述大豆可选自冀豆12×黑豆ZDD03651的杂种后代中的F2及其以后世代的家系。所述育种可为分子标记辅助育种。

[0061] 实验证明,在2011年,186个家系中AA基因型大豆的籽粒密度为1.223-1.355g/ml,平均为1.291g/ml,BB基因型大豆的籽粒级别为1.202-1.340g/ml,平均级别为1.272g/ml,AB基因型大豆的籽粒密度为1.244-1.301g/ml,平均级别为1.282g/ml;在2013年,186个家系中AA基因型大豆的籽粒密度为1.216-1.379g/ml,平均为1.315g/ml,BB基因型大豆的籽粒密度为1.209-1.371,平均为1.299,AB基因型大豆的籽粒密度为1.279-1.332g/ml,平均为1.304g/ml。表明,AA基因型大豆的籽粒密度大于BB基因型大豆,AB基因型大豆的籽粒密度位于AA基因型大豆与BB基因型大豆之间。表明,大豆的AA基因型、BB基因型和AB基因型与大豆的籽粒密度相关,可通过检测大豆的基因型检测大豆籽粒密度。

[0062] 本发明以高世代重组自交系为材料,通过不同浓度蔗糖水溶液配置的密度梯度,将各家系材料按照籽粒密度大小分级,研究籽粒密度的遗传和变异,并定位到籽粒密度相关QTL位点,为分子标记辅助育种提供指导。

附图说明

[0063] 图1为大豆籽粒密度测定示意图。

[0064] 图2为F6:8(2011年)和F6:9(2013年)各家系表型分布。

[0065] 图3为F6:8(2011年)和F6:9(2013年)大豆籽粒密度QTL qSD-8-1似然比图谱。

[0066] 图4为冀豆12×黑豆ZDD03651后代材料PCR产物检测结果。

具体实施方式

[0067] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0068] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0069] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0070] 下述实施例中的黑豆(ZDD03651),记载于“陈强,闫龙,冯燕,等.大豆百粒重QTL定位及多样性评价.中国农业科学,2016年09期”公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。黑豆(ZDD03651)为陕西省地方品种,在石家庄的百粒重为7g。

[0071] 下述实施例中的大豆品种冀豆12:记载于“陈强,闫龙,杨春燕,等.冀豆12遗传背景下3个回交组合高低蛋白含量后代品系SSR标记分析.中国农业科学,2014年02期”,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。冀豆12是河北省农林科学院粮油作物研究所育成的大粒品种,在石家庄的百粒重为22g。

[0072] 下述实施例中所用到的已知的SSR标记名称及其引物的序列信息来自数据库www.soybase.org。

[0073] 实施例1、大豆籽粒密度的鉴定及与大豆籽粒密度相关的QTL

[0074] 1、实验材料

[0075] 本研究以冀豆12×黑豆ZDD03651得到的重组自交系为材料。将冀豆12×黑豆ZDD03651得到F8代和F9代各188个重组自交系(即188个家系)分别于2011年和2013年播种于石家庄,田间采用3m行长,3行区,随机区组试验设计,行距50cm,株距10cm。材料自然成熟后脱粒,并通风晾干到籽粒含水量约为13%时测定籽粒密度。

[0076] 2、籽粒密度测定划分方法如下:

[0077] 按表1中配制8个不同浓度的蔗糖水溶液,100ml水中加入蔗糖分别为45-80g,对应蔗糖水溶液的密度为1.202-1.412g/ml。每家系随机选取籽粒,每5粒一组分别置于不同浓度蔗糖水溶液中,观察籽粒悬浮情况,确定籽粒的密度,每个家系重复测定三次。确定籽粒密度的方法如下:如籽粒在编号为n-1的蔗糖水溶液中全部沉于溶液底部(图1中①),且在编号为n+1的蔗糖水溶液中全部浮于溶液表面(图1中③),则籽粒的密度为编号为n的蔗糖水溶液的密度,n为2-7中的一个自然数。

[0078] 表1、蔗糖水溶液密度表

蔗糖水溶液编号	100ml 水中蔗糖含量 (g)	密度 (g/ml)
1	45	1.202
2	50	1.229
3	55	1.258
[0079] 4	60	1.286
5	65	1.316
6	70	1.347
7	75	1.379
8	80	1.412

[0080] 两年中,各家系籽粒密度表型变异及分布见表2和图2。双亲间籽粒密度差异较大,

冀豆12籽粒密度较大,为1.363-1.368g/ml,黑豆ZDD03651籽粒密度较小,为1.253-1.262g/ml。群体各家系籽粒密度变异范围较大,2011年变异范围为1.202-1.379g/ml,2013年为1.202-1.379g/ml,双因素方差分析显示其受环境影响极显著($P < 0.01$)。籽粒密度的广义遗传力为77.66%。两年中群体表型均为正态分布。

[0081] 表2、双亲及群体各家系籽粒密度(g/ml)变异分析

年份	亲本		群体					
	冀豆 12	黑豆 ZDD03651	最大值	最小值	均值	SD ^a	偏度	峰度
2011	1.368±0.009	1.253±0.016	1.379	1.202	1.308	0.034	-0.163	-0.091
2013	1.363±0.016	1.262±0.008	1.379	1.202	1.295	0.038	-0.433	0.179

[0083] ^aSD标准差

[0084] 采用WinQTL Cartographer V.2.5软件的复合区间作图法(CIM)对各环境下百粒重相关QTL进行检测,经300次Permutation计算,选用全基因组显著性水平 $P < 0.05$ 为阈值,检测每个环境下的QTL效应,临近位点间图距小于5cM,认定是同一个QTL。采取MCCOUCH等方式进行QTL命名。结果显示,将与大豆籽粒密度相关的主效QTL(命名为qSD-8-1)定位到8号染色体Satt424-Satt341分子标记区间内,为Sat_215。该QTL在2011年和2013年两年中贡献率分别为8.60%和7.23%,家性效应分别为0.34和0.33,增效基因来自于冀豆12(表3)。大豆籽粒密度QTL qSD-8-1似然比图谱如图3所示。

[0085] 表3、籽粒密度相关QTL位点信息

QTL	染色体/连锁群	连锁标记	遗传位置 cM	世代	LOD 值	R^2 (%)	加性效应
qSD-8-1	8/A2	Sat_215	53.75	F6:9(2013年)	4.03	8.60	-0.34
				F6:8(2011年)	3.07	7.23	-0.33

[0087] 3、基因型鉴定

[0088] 按照如下方法分别测定冀豆12、黑豆ZDD03651以及F6:8(2011年)的186个家系与F6:9(2013年)的186个家系的基因型:

[0089] 提取大豆基因组DNA,以大豆基因组DNA为模板,用鉴定大豆籽粒密度的引物对X1进行PCR扩增,X1为分子标记Sat_215,由P1和P2组成,P1为序列表中SEQ ID No.1所示的单链DNA,P2为序列表中SEQ ID No.2所示的单链DNA。

[0090] PCR扩增的反应体系如表4所示。

[0091] 表4、PCR扩增的反应体系

序号	体系成分	体积	来源
1	P1 (10 μ M)	0.3 μ L	上海生工生物工程有限公司制备
2	P2 (10 μ M)	0.3 μ L	上海生工生物工程有限公司制备
3	10 \times PCR Buffer	2 μ L	宝生物工程(大连)有限公司
[0092] 4	dNTPs (2.5mM)	1.5 μ L	宝生物工程(大连)有限公司
5	rTap 酶 (5U/ μ L)	0.2 μ L	宝生物工程(大连)有限公司
6	模板 DNA (20ng/ μ L)	5 μ L	
7	ddH ₂ O	10.7 μ L	
总体积		20 μ L	

[0093] PCR扩增的反应条件为:94 $^{\circ}$ C5min;94 $^{\circ}$ C30s,55 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C30s,35个循环;72 $^{\circ}$ C5min;4 $^{\circ}$ C保存。

[0094] 用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对PCR反应产物进行电泳,按照下述方法确定大豆基因型:

[0095] 将冀豆12的PCR产物的带型命名为A(图4),将黑豆ZDD03651的PCR产物的带型命名为B(图4),如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为A,待鉴定大豆为AA基因型大豆,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为B,待鉴定大豆为BB基因型大豆,如果待鉴定大豆的PCR产物在电泳中的带型为H带型(图4),H带型为含有A带型和B带型的带型,待鉴定大豆为AB基因型大豆。

[0096] 依据步骤2的方法测得的大豆的籽粒密度与依据步骤3的方法测得的大豆的基因型如表5所示。

[0097] 表5、大豆基因型与籽粒密度的关系

家系编号/ 大豆名称	籽粒密度		基因型
	F6:8(2011年)	F6:9(2013年)	
冀豆 12	1.368±0.009	1.363±0.016	AA
黑豆 ZDD03651	1.253±0.016	1.262±0.008	BB
1	1.301	1.340	AA
2	1.309	1.332	AA
3	1.324	1.332	BB
4	1.301	1.294	AA
5	1.317	1.340	AA
6	1.301	1.316	AA
7	1.294	1.340	BB
8	1.258	1.272	BB
9	1.286	1.340	BB

家系编号/ 大豆名称	籽粒密度		基因型
	F6:8(2011年)	F6:9(2013年)	
93	1.301	1.318	BB
94	1.294	1.332	AA
95	1.294	1.272	AA
96	1.244	1.309	BB
97	1.237	1.279	BB
98	1.301	1.347	AA
99	-	1.301	AA
100	1.309	1.332	AA
101	1.272	1.332	BB
102	1.309	1.371	BB
103	1.280	1.272	AA

[0098]

[0099]

10	1.347	1.355	AA	104	1.265	1.301	AA
11	1.294	1.287	AA	105	1.244	1.309	BB
12	1.280	1.316	BB	106	1.244	1.251	BB
13	1.324	1.316	AA	107	1.272	1.265	BB
14	1.287	1.316	AA	108	-	1.340	AA
15	1.348	1.317	AA	109	1.244	1.265	BB
16	1.272	1.272	AA	110	1.223	1.216	AA
17	1.324	1.367	BB	111	1.294	1.301	AA
18	1.294	1.340	AA	112	1.301	1.332	AA
19	1.229	1.272	AA	113	1.265	1.340	AA
20	1.209	1.258	BB	114	1.288	1.301	-
21	1.272	1.251	BB	115	1.272	1.317	AA
22	1.347	1.347	AA	116	1.309	1.332	AA
23	-	1.279	AA	117	1.251	1.301	BB
24	1.301	1.301	AA	118	1.272	1.324	AA
25	1.301	1.332	BB	119	1.340	1.371	BB
26	1.258	1.309	AA	120	1.301	1.317	BB
27	1.265	1.309	AA	121	1.237	1.280	AA
28	1.309	1.348	BB	122	1.301	1.347	AA
29	1.287	1.332	AA	123	-	1.363	AA
30	1.316	1.317	AA	124	1.265	1.309	AA
31	1.280	1.324	BB	125	1.294	1.317	BB
32	1.258	1.309	AA	126	1.244	1.244	BB
33	1.301	1.301	AB	127	1.316	1.363	AA
34	1.279	1.316	BB	128	-	1.371	AA
35	1.332	1.332	BB	129	1.202	1.223	BB
36	1.202	1.209	BB	130	1.301	1.340	AA
37	1.317	1.265	-	131	1.229	1.294	BB
38	1.301	1.348	BB	132	1.316	1.324	BB
39	1.244	1.279	BB	133	1.294	1.324	BB
40	1.258	1.301	AA	134	1.294	1.294	BB
41	1.265	1.280	BB	135	1.244	1.279	AB
42	1.294	1.355	AA	136	1.258	1.265	AA
43	1.202	1.309	BB	137	1.244	1.279	AA
44	1.272	1.332	AA	138	1.294	1.287	BB
45	1.265	1.309	AA	139	1.244	1.272	AA
46	1.347	1.347	AA	140	1.258	1.294	-
47	1.258	1.251	BB	141	1.272	1.287	BB
48	1.316	1.324	BB	142	1.286	1.286	AA
49	1.316	1.347	AA	143	1.280	1.324	BB
50	1.258	1.309	AA	144	1.237	1.272	BB
51	1.251	1.316	AA	145	1.301	1.316	BB
52	1.272	1.294	BB	146	1.244	1.273	BB
53	1.340	1.332	AA	147	1.301	1.332	AB
54	1.324	1.348	AA	148	1.279	1.316	AA
55	1.355	1.363	AA	149	-	1.348	AA
56	1.332	1.355	AA	150	1.309	1.347	AA

[0100]	57	1.294	1.316	BB	151	1.273	1.251	AA
	58	1.294	1.286	AA	152	1.280	1.301	-
	59	1.272	1.301	AA	153	1.301	1.287	AA
	60	1.265	1.286	BB	154	1.301	1.309	BB
	61	1.294	1.295	AA	155	1.294	1.316	AA
	62	1.332	1.332	AA	156	1.258	1.309	BB
	63	1.229	1.258	BB	157	1.316	1.309	BB
	64	1.237	1.251	AA	158	1.294	1.279	AA
	65	1.265	1.301	AA	159	1.294	1.324	-
	66	1.273	1.258	BB	160	1.316	1.286	AA
	67	-	1.309	AA	161	1.301	1.347	BB
	68	1.332	1.355	BB	162	1.301	1.287	AA
	69	1.309	1.265	AA	163	1.229	1.332	BB
	70	-	-	BB	164	1.244	1.265	BB
	71	1.309	1.324	AA	165	1.316	1.332	AA
	72	1.265	1.363	BB	166	1.244	1.294	AA
	73	1.265	1.301	BB	167	1.316	1.317	BB
	74	1.301	1.348	AA	168	1.229	1.309	AA
	75	1.309	1.340	BB	169	1.272	1.324	AA
	76	1.317	1.363	-	170	1.309	1.309	AA
	77	1.237	1.230	BB	171	1.272	1.317	BB
	78	1.347	1.379	AA	172	1.265	1.294	-
	79	1.229	1.237	BB	173	1.272	1.332	AA
	80	1.202	1.272	BB	174	1.316	1.340	AA
	81	1.265	1.279	AA	175	-	1.216	BB
	82	1.301	1.316	BB	176	1.244	1.265	BB
	83	1.280	1.332	AA	177	1.316	1.316	AA
	84	1.251	1.280	BB	178	1.286	1.294	AA
	85	1.316	1.348	AA	179	1.294	1.309	AA
	86	1.258	1.309	AA	180	1.258	1.265	BB
	87	1.316	1.280	AA	181	1.301	1.294	AA
	88	1.317	1.309	AA	182	1.237	1.340	AA
	89	1.301	1.355	-	183	1.272	1.332	AA
	90	1.258	1.317	BB	184	1.324	1.348	AA
	91	1.301	1.363	AA	185	1.332	1.316	BB
	92	1.272	1.309	AA	186	1.294	1.265	AA

[0101] 结果显示,在2011年,186个家系中AA基因型大豆的籽粒密度为1.223-1.355g/ml,平均为1.291g/ml,BB基因型大豆的籽粒级别为1.202-1.340g/ml,平均级别为1.272g/ml,AB基因型大豆的籽粒密度为1.244-1.301g/ml,平均级别为1.282g/ml;在2013年,186个家系中AA基因型大豆的籽粒密度为1.216-1.379g/ml,平均为1.315g/ml,BB基因型大豆的籽粒密度为1.209-1.371g/ml,平均为1.299g/ml,AB基因型大豆的籽粒密度为1.279-1.332g/ml,平均为1.304g/ml。表明,AA基因型大豆的籽粒密度大于BB基因型大豆,AB基因型大豆的籽粒密度位于AA基因型大豆与BB基因型大豆之间。表明,大豆的AA基因型、BB基因型和AB基因型与大豆的籽粒密度相关,可通过检测大豆的基因型检测大豆籽粒密度。

- [0001] <110> 河北省农林科学院粮油作物研究所
- [0002] <120> 鉴定大豆籽粒密度的方法及与大豆籽粒密度相关的QTL
- [0003] <160> 2
- [0004] <170> PatentIn version 3.5
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 24
- [0007] <212> DNA
- [0008] <213> 人工序列
- [0009] <220>
- [0010] <223>
- [0011] <400> 1
- [0012] gcgtagcaac aaagcaatct acag 24
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 29
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <220>
- [0018] <223>
- [0019] <400> 2
- [0020] gcgtccatt ttattccaca ctatgtaat 29



图1

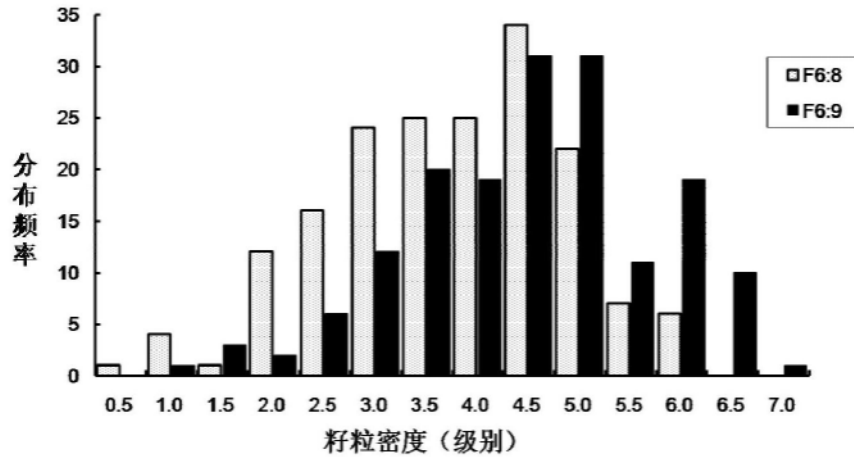


图2

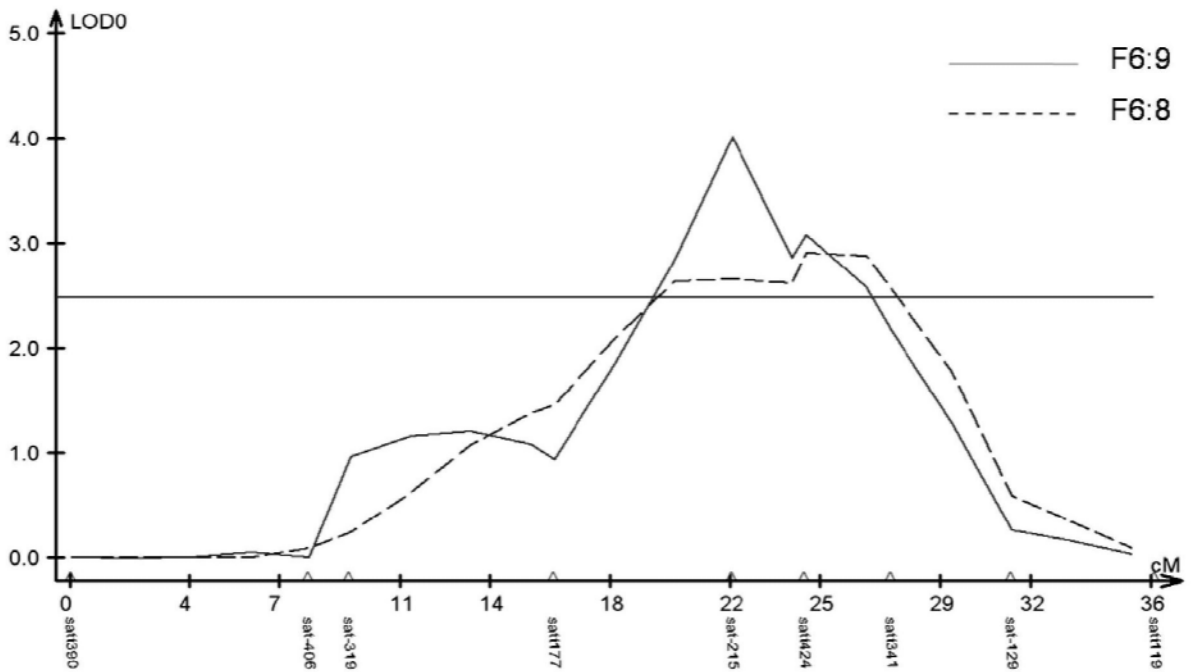


图3

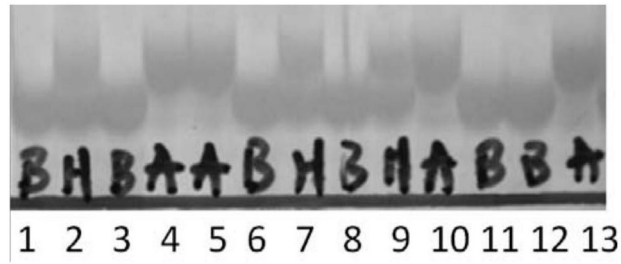


图4