



(21) 申请号 202410493530.8

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.23

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102226189 A, 2011.10.26

申请公布号 CN 118389727 A

CN 107794261 A, 2018.03.13

(43) 申请公布日 2024.07.26

审查员 汪豪杰

(73) 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430000 湖北省武汉市武昌区徐东二
路2号

(72) 发明人 王新发 王汉中 师家勤 赵雪杨
孙庆斌 林欣怡

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通
合伙) 42001

专利代理师 龚莹莹

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种与油菜每角粒数主效QTL-qSN.C9紧密
连锁的分子标记及应用

(57) 摘要

本发明属于分子生物学及遗传育种技术领域,公开了一种与油菜每角粒数主效QTL-qSN.C9紧密连锁的分子标记及应用。利用油菜DH群体201个株系定位到的每角粒数主效QTL位点为qSN.C9,与其紧密连锁的峰值SNP标记为seq-new-rs45691,位于油菜DarmorV4.1参考基因组C09染色体的第47,898,234位碱基处,平均可解释24.7%的表型方差,平均加性效应为-2.31。利用该SNP设计的PARMS标记对其余DH系进行检测,发现其操作简便且分型清晰,而且对油菜每角粒数有良好的选择效果。

1. 检测甘蓝型油菜C09染色体第47,898,234位碱基基因型的试剂在每角粒数选择育种中的应用,所述的甘蓝型油菜的基因组的版本号是Darmor-bzh Version 4.1。

2. 根据权利要求1所述的应用,所述的试剂为引物。

3. 根据权利要求2所述的应用,所述的引物为:qSN.C9F:TATTATCAAGAAATCTGCAACCATG;qSN.C9Rt:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGTGAGTTGAGTCTCACAATTGTTT;qSN.C9Rc:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGTGAGTTGAGTCTCACAATTGTTC。

4. 一种甘蓝型油菜每角粒数筛选育种的方法,所述的方法包括检测甘蓝型油菜C09染色体第47,898,234位碱基,所述的检测的方法包括:测序法、TaqMan探针法、AS-PCR法、分子信标法、高分辨率溶解曲线法、CAPS法、SNaPshot法、KASP法、PARMS法、基因芯片法或质谱法,所述的甘蓝型油菜的基因组的版本号是Darmor-bzh Version 4.1。

一种与油菜每角粒数主效QTL-qSN.C9紧密连锁的分子标记及应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学及遗传育种技术领域,具体涉及一种与油菜每角粒数主效QTL-qSN.C9紧密连锁的分子标记及应用。

背景技术

[0002] 在相同种植密度下,油菜单产取决于单株产量,而单株产量直接决定于全株角果数、每角粒数和粒重三个构成因子。研究表明,单株角果数和产量相关性最高但遗传力低,粒重遗传力高但和产量相关性低。油菜每角粒数不仅和产量相关性高而且遗传力也高,这说明通过增加每角粒数来提高产量是一条非常有效的途径(Shi等,2015)。我国近年来育成的油菜品种每角粒数平均只有20粒左右(赵永国等,2015),远低于种质资源中每角40粒以上的最高水平(何晓莹等,2018),这说明油菜品种每角粒数的提升还有很大空间。然而,油菜品种的每角粒数若要大幅度提升,除了常规育种还需借助分子育种手段,而这有赖于对其遗传基础的全面解析以及优异等位基因的进一步发掘和利用。

[0003] 随着分子标记技术的不断发展,其在作物中的应用越来越广泛。Grodzicker等(1974)创立了限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记技术。RFLP是第一代分子标记,具有数量丰富、稳定遗传、专一性、重复性好、共显性等特点。但是,该标记需要的DNA量比较大;且操作程序繁琐、耗时费力、周期长;还需要使用放射性同位素对探针进行标记,这些因素都局限了RFLP标记的广泛使用。AFLP标记结合了PCR和RFLP标记技术,在作物遗传多样性研究、细胞学研究、品种纯度鉴定和抗病等研究中得到广泛的应用(宋顺华等,2006;袁素霞,2009;王雪,2004)。但AFLP标记也存在一些缺点:成本较高,过程复杂,技术难度大;标记大多为显性标记;对DNA质量和限制性内切酶质量要求较高。SSR标记,也叫微卫星DNA标记(microsatellite DNA),已经被广泛应用于作物的基因定位、分子标记辅助选择、DNA指纹图谱、品种纯度鉴定、种质资源的保存及利用和遗传多样性分析等研究中(陈烨丽,2010;缪体云,2007;荆赞革,2010;王冬梅,2011)。SSR标记具有数量丰富、多态性高、操作简单、成本较低等优点,但难以实现高通量批量化的检测。近十年来,随着测序技术的持续进步,使得基于基因组序列信息的分子标记开发成为可能,如SNP标记和InDel标记(Hyten等,2010)。目前,全基因组选择育种芯片还只在水稻中开始尝试(Yu等,2014),油菜等其他作物仍以分子标记辅助选择为主。目前SNP检测方法主要分为两大类:一大类是以单链构象多态性(SSCP)、变性梯度凝胶电泳(DDGE)、酶切扩增多态性序列(CAPS)、等位基因特异性PCR(AS-PCR)等为代表的以凝胶电泳为基础的传统检测方法,另一大类是以直接测序、DNA芯片、变性高效液相色谱(DHPLC)、质谱检测技术、高分辨率溶解曲线(HRM)等为代表的高通量、自动化程度较高的检测方法。这两类方法各有优缺点,目前已有将两者结合起来的检测方法如KASP(Lister等,2013)和PARMS(Lu等,2020)等,不但操作简便、成本低廉而且能实现高通量的检测。

[0004] 每角粒数是一个典型的由多基因控制的复杂数量性状,表型连续分布而且容易受

环境条件的影响。利用连锁作图(linkage mapping)和关联作图(association mapping)的方法,在油菜中已定位了数以千计的QTL,涉及许多重要性状如产量、株型、品质和抗性等(Hu等,2017)。截至目前,油菜19条染色体上已定位到一百多个每角粒数QTL Radoev等,2008;Shi等,2009;王峰等,2010;Ding等,2012;Shi等,2013;Cai等,2014;Qi等,2014;Shi等,2015;Wang等,2010;Yang等,2016;Zhang等,2011;Zhang等,2012;孙程明等,2020;Zhu等,2020),而A1、A6、A7、A8、C1和C9染色体上检测到了少数几个主效QTL,如qSN.A6(Shi等,2015;Yang等,2016)、qSN.A8(Jiao等,2021)和qSS.C9(Li等,2015)。

[0005] 本发明利用油菜DH群体对每角粒数进行多环境QTL定位分析,旨在找到对油菜每角粒数具有改良效应的新的主效位点,并据此开发实用的高通量低成本的分子标记,用于对油菜每角粒数进行选择。

发明内容

[0006] 本发明的目的是在于提供了检测甘蓝型油菜C09染色体上第47,898,234位碱基的试剂在甘蓝型油菜每角粒数筛选育种中的应用。

[0007] 本发明的另一个目的在于提供了检测甘蓝型油菜C09染色体上第47,898,234位碱基的引物在甘蓝型油菜每角粒数筛选育种中的应用。

[0008] 本发明的最后一个目的在于提供了甘蓝型油菜每角粒数筛选育种的方法。

[0009] 为了达到上述目的,本发明采取以下技术措施:

[0010] 油菜每角粒数主效QTL-qSN.C9位点紧密连锁PARMS标记的获得:

[0011] (1)从本实验室构建的油菜关联群体中挑选3S1181和3S1235作为亲本进行去雄杂交,对杂种F1进行小孢子培养和秋水仙素加倍获得360个DH系。

[0012] (2)从上述360个DH系中随机挑选201个利用油菜50K-SNP芯片进行基因型分析,获得31920个SNP标记并进行统计分析,去掉亲本基因型缺失或无多态性、群体基因型缺失或杂合频率高、次要等位基因频率过低的SNP标记。将剩下的高质量SNP标记导入Join map4.0软件进行连锁作图分析,构建了一个含有2111个bin(包括8905个标记)的高密度遗传连锁图谱。

[0013] (3)将上述360个DH系分别种植于2017荆州、2017襄阳和2017阳逻(代号为17JZ,17XY,17YL)三个环境,成熟期每个小区收获10个代表性单株考种。

[0014] (4)基于上述高密度遗传连锁图谱、201个DH系的基因型以及每角粒数的表型数据,利用QTLCart2.5软件进行QTL定位,最终在油菜DarmorV4参考基因组C09染色体上获得主效QTL位点-qSN.C9,其峰值SNP标记seq-new-rs45691位于第47,898,234位碱基处(碱基为T/A或C/G),可以在三个环境中被重复检测到。

[0015] (5)提取油菜C09染色体第47,898,234位碱基上下游各100bp的序列,按照引物设计原则获得PARMS检测引物序列:qSN.C9F:TATTATCAAGAAATCTGCAACCATG;qSN.C9Rt:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGAGTTGAGTCTCACAATTGTTT;qSN.C9Rc:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTGAGTTGAGTCTCACAATTGTTC。

[0016] 本发明的保护范围包括:

[0017] 检测甘蓝型油菜C09染色体上第47,898,234位碱基的试剂在甘蓝型油菜每角粒数筛选育种中的应用。

[0018] 以上所述的试剂,优选的,为引物。

[0019] 以上所述的引物,优选的为本发明提供的PARMS检测引物。

[0020] 一种甘蓝型油菜每角粒数筛选育种的方法,包括利用本领域的常规方案检测甘蓝型油菜C09染色体第47,898,234位碱基,所述的常规方案包括但不限于:测序法、TaqMan探针法、AS-PCR法、分子信标法、高分辨率溶解曲线法、CAPS法、SNaPshot法、KASP法、PAR MS法、基因芯片法、质谱法。

[0021] 本发明中使用的甘蓝型油菜基因组的版本号是Darmor-bzh (Version 4.1) <https://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0023] (1) 本发明获得了油菜每角粒数主效QTL位点qSN.C9,且可被重复检测,平均可解释24.7%的表型方差,平均加性效应为-2.31,增效等位基因来自第二个亲本3S1235。

[0024] (2) 本发明获得qSN.C9紧密连锁的PARMS标记,其检测方法简便而且成本低廉,可对每角粒数连锁的区域进行高通量筛选,提高选择效率和准确性。

附图说明

[0025] 图1为油菜201个DH系在三个环境中的每角粒数表型的频率分布。

具体实施方式

[0026] 本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规技术;所述试剂或材料,如未特别说明,均来源于商业渠道。本发明中使用的甘蓝型油菜基因组的版本号是Darmor-bzh (Version 4.1) <https://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>。

[0027] 实施例1:

[0028] 油菜每角粒数主效QTL-qSN.C9紧密连锁SNP标记的获得:

[0029] (1) 从本实验室构建的油菜关联群体中挑选3S1181和3S1235作为亲本(Li等, 2020)进行去雄杂交,对杂种F1进行小孢子培养和秋水仙素加倍获得360个DH系。从DH群体360个株系中随机挑选201个,采集叶片后用CTAB法提取总DNA,利用油菜50K-SNP芯片对每个样本进行基因型分析(<https://www.greenfafa.com/index.php?a=lists&catid=48>),获得31920个SNP标记并进行统计分析,过滤掉亲本基因型缺失或无多态性、群体基因型缺失比例或杂合度高、次要等位基因频率低的标记。

[0030] (2) 将剩下的高质量SNP标记导入Joinmap4.0软件作图,获得了一张高密度遗传连锁图谱:包含19个连锁群,总长1715.7cM;包括2111个bin和8905个SNP标记;标记密度为3.37bin和14.2SNP/Mb。

[0031] (3) 将360个DH系分别于2017荆州、2017襄阳、2017阳逻三个环境种植(代号为17JZ, 17XY, 17YL)。成熟期从每个小区中挑选10个代表性单株收获晾干,将主序上将所有有效角果计数并脱粒,用SC-G型自动考种仪进行数粒和称重,计算出平均每角粒数。对上述201个DH系四个环境的每角粒数进行统计分析,发现各环境中的每角粒数均表现很大的变异幅度而且呈正态分布(图1),可直接用于后续的QTL定位。

[0032] (4) 基于DH群体的基因型、SNP标记遗传图谱和每角粒数,利用QTL Cart 2.5软件进行QTL连锁分析,在C09染色体获得每角粒数主效QTL位点qSN.C9(表一),可以在三个环境中

被重复检测到,其峰值SNP标记seq-new-rs45691位于DarmorV4.1参考基因组第47,898,234位碱基(T/A或C/G),平均可解释24.7%的表型方差,平均加性效应为-2.31,理论上两种纯合基因型每角粒数的差值有4.62。

[0033] 表一、每角粒数主效QTL-qSN.C9的信息

环境	遗传位置 (cM)	LOD值	加性效应	贡献率 (%)
17JZ	72.21	8.4	-1.79	17.2
17XY	55.61	11.5	-1.82	24.2
17YL	68.81	10.4	-3.33	32.9

[0035] 实施例2:

[0036] 一种与每角粒数紧密连锁的PARMS标记的开发:

[0037] 实施例1中所获得的连锁标记为来源于SNP芯片,只有用于分子杂交的探针序列信息。油菜SNP芯片一次可以检测数以万计的位点,但其操作比较繁琐而且需要用到特殊设备。另外,若用油菜SNP芯片对大量的育种中间材料进行检测则成本昂贵,因此需要将其转化为操作简单而且成本低廉的基于PCR扩增的检测方法,如PARMS (Penta-primer Amplification Refractory Mutation System,五引物扩增受阻突变系统) 标记。该标记系统包括一对荧光通用引物 (FAM和HEX作为报告荧光)、一对SNP等位基因特异引物及一条反向共用引物,可快速简单地进行SNP等位基因型检测。

[0038] (1) 针对与qSN.C9紧密连锁的峰值SNP标记seq-new-rs45691,提取油菜DarmorV4.1参考基因组C09染色体第47,898,234位碱基上下游各100bp的序列。按照引物设计原则获得PARMS标记检测引物序列为:

[0039] qSN.C9F:TATTATCAAGAAATCTGCAACCATG;

[0040] qSN.C9Rt:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGAGTTGAGTCTCACAATTGTTT;

[0041] qSN.C9Rc:GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGTGAGTTGAGTCTCACAATTGTTC。

[0042] (2) 以油菜DH联群体的基因组DNA为模板,利用上述引物进行荧光定量PCR扩增,采用Tecan F200扫描FAM和HEX信号并输出结果,最后转换成基因型。

[0043] 利用上述引物,在3S1181中扩增出的序列是:TATTATCAAGAAATCTGCAACCATGGA AGCGAGAGACTTGAACAATTGTGAGACTCAACTCACA

[0044] 在3S1235中扩增出的序列是:TATTATCAAGAAATCTGCAACCATGGAAGCGAGAGACTTAAACAATTGTGAGACTCAACTCACA。

[0045] 实施例3:PARMS标记在油菜每角粒数选择中的应用

[0046] 上述360个DH系中除201个用于QTL定位以外还余159个,以实施例2提供的PARMS标记qSN.C9检测出基因型为AA/TT的材料有101份,基因型为GG/CC的为49份(表二)。AA和GG两种基因型的每角粒数的差异在所有三个环境中均达到极显著水平,差值从4.16到5.63,均值为4.72。

[0047] 表二、PARMS标记qSN.C9两种基因型在DH群体每角粒数和每角粒数的表型

基因型	17JZ	17XY	17YL
AA(n=101)	14.4	12.8	14.3

[0049]	GG(n=49)	10.0	8.6	8.7
	AA-GG	4.37	4.16	5.63
	Pt-test	7.5E-08	2.4E-09	2.0E-11

[0050] 以上结果说明制备的PARMS分子标记qSN.C9对油菜的每角粒数有较大效应,具有很好的筛选效果。

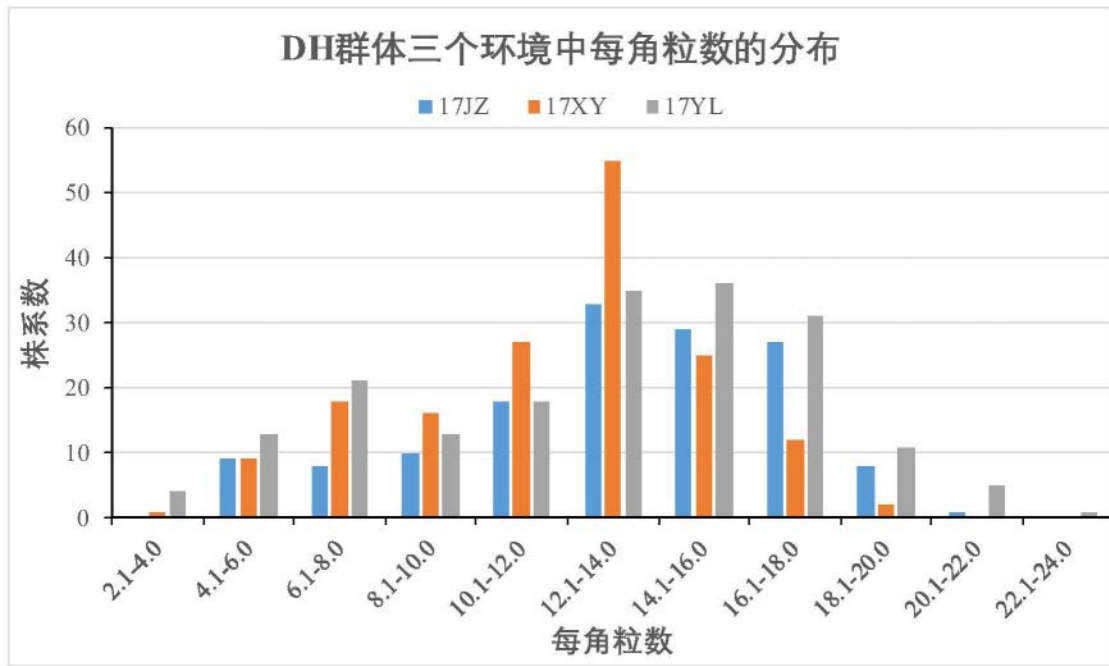


图1