



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110643731 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201911041643.X

(22)申请日 2019.10.30

(71)申请人 山西省农业科学院作物科学研究所  
地址 030031 山西省太原市小店区龙城大街81号

(72)发明人 张晓军 乔麟轶 畅志坚 李欣  
郭慧娟 张树伟 常利芳 阎晓涛  
任永康 高伟 张丽娜 候雅静

(74)专利代理机构 太原科卫专利事务所(普通合伙) 14100  
代理人 朱源 杨文艳

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12Q 1/686(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

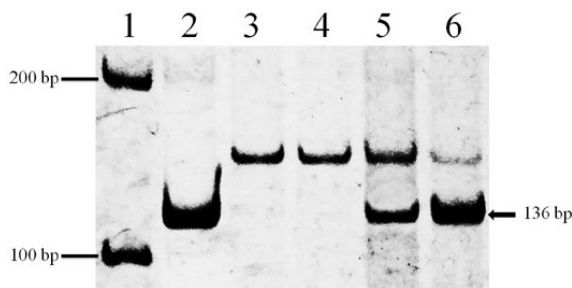
权利要求书1页 说明书5页  
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体的特异分子标记及应用

(57)摘要

本发明提供一种快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体的特异分子标记及其使用方法,解决小麦-中间偃麦草染色体工程系创制过程中快速检测6J<sup>S</sup>染色体及6J<sup>S</sup>染色体片段的问题;利用分子标记LD16-52和LD16-145中的一个或两个的引物扩增待检测植物材料,如果能够扩增到所述分子标记的目标条带,则说明该植物材料中含有中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段;本发明对于小麦遗传育种的理论研究和实际应用均有重要价值。



1. 一种快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的特异分子标记LD16-52, 它的核苷酸序列为,

AGGCAGCAGCAGTACGTAAGTGGAGGCAGCAGCGGCTGTGTGTAGAGTAATGTGCCCTGCTCTGTCCAAGGCTGCTCATCTGGCTGGACGAGATTCGTGCCAGGAGCTGCTGCTGTGTTGCACAGCAGGAAAAAAGTGCATCCACTTGCTCTGTACGGAAGAATAGATAGCTGCAGAGGAGTATAAGTGGTCAGGCAGGCAGTGCAGCCAGGAGTGTGTGTACTGTCAGTGGACGAGCAGTTTGGGTGTCTGGTGGTCGTGCATTTGCCTGTGAG;

所述分子标记的引物的核苷酸序列为:

LD16-52-F: 5'-AGGCAGCAGCAGTACGTAAG-3';

LD16-52-R: 5'-CTCACAGGCAAATGCACGAC-3'.

2. 一种快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的特异分子标记LD16-145, 它的核苷酸序列为,

CACGTACGTACCCACGCATGCATGCCGAGACCAGGCACGGCCCTGCATGCTCTGCTCGATTACGCGCTTCAC TGCTGCAGATTTTGATGGATAACAACCGCGCGTGATCCACATATATAGTGCAACACAGCCTAGGC;

所述分子标记的引物的核苷酸序列为:

LD16-145-F: 5'-CACGTACGTACCCACGCAT-3';

LD16-145-R: 5'-GCCTAGGCTGTGTTGCACTA-3'.

3. 一种快速检测植物材料中中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 提取待检测植株的基因组DNA, 以提取的基因组DNA为模板, 利用权利要求1所述的特异分子标记LD16-52引物对或权利要求2所述的LD16-145的引物对进行PCR扩增;

(2) 然后通过电泳分离扩增产物; 若扩增到所述分子标记的目标条带, 则说明待鉴定小麦材料中含有中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段。

4. 根据权利要求3所述的一种快速检测植物材料中中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的方法, 其特征在于, 选用特异分子标记LD16-52引物对进行扩增时, PCR反应体系为: 2×Taq PCR Mix预混液5 μL, 50 ng/μL的LD16-52-F为1 μL, 50 ng/μL的LD16-52-R为1 μL, 50-100 ng/μL的模板DNA为1.5 μL, 1.5 μL无菌去离子水, 反应体系总体积为10μL;

PCR扩增程序为: 94℃预变性5分钟; 94℃变性30秒, 60℃退火45秒, 72℃延伸30秒, 运行35个循环; 最后72℃延伸10分钟; PCR扩增产物可以在4℃保存。

5. 根据权利要求3所述的一种快速检测植物材料中中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的方法, 其特征在于, 选用特异分子标记LD16-145引物对进行扩增时, PCR反应体系为: 2×Taq PCR Mix预混液5 μL, 50 ng/μL的LD16-145-F为1 μL, 50 ng/μL的LD16-145-R为1 μL, 50-100 ng/μL的模板DNA为1.5 μL, 1.5 μL无菌去离子水, 反应体系总体积为10μL;

PCR扩增程序为: 94℃预变性5分钟; 94℃变性30秒, 60℃退火45秒, 72℃延伸30秒, 运行35个循环; 最后72℃延伸10分钟; PCR扩增产物可以在4℃保存。

6. 权利要求1或2所述的特异分子标记在检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段中的应用。

## 快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体的特异分子标记及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物分子遗传育种领域,具体涉及快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体的特异分子标记及应用。

### 背景技术

[0002] 小麦是世界上最重要的粮食作物之一,全世界约有三分之一的人口以小麦为主要食物。据报道,到2050年,全世界总人口将达到90亿以上。随着耕地面积的不断缩减,现有粮食产量将不足以提供日益增长的人口需求。

[0003] 自1990年代起,世界小麦单产开始出现徘徊不前的局面,其主要原因是在小麦育种中长期使用少数主栽品种作为亲本,导致遗传基础逐渐狭窄,在单产潜力提高有限的情况下,品种抗病、抗逆、抗虫等能力的下降,使现有品种抵抗灾害风险的能力降低。优异种质资源创新不仅是植物遗传育种的基础,在保障国家粮食安全、推动生物种业发展中也发挥着关键作用。基于植物分子染色体工程的作物种质创新,有利于加快栽培种之内、野生物种与栽培物种之间的基因交流,大幅度提高作物种质创新的效率,满足作物育种对优异种质资源的需求。

[0004] 中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium*,  $2n=6x=42$ , JJJ<sup>S</sup>J<sup>S</sup>SS或E<sup>e</sup>E<sup>e</sup>E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>StSt)是禾本科小麦族偃麦草属多年生草本植物。它根系发达,能够深入土层深处,耐寒性极强,能够抵抗-40℃低温。地上部分生长强势,茎叶繁茂,再生性好,可保持15-20年仍具有旺盛的生命力。对小麦白粉、条锈、叶锈、秆锈等病害免疫,高抗根腐病、叶枯病、纹枯病、赤霉病、黄矮病、条纹花叶病等,同时还具有抗寒、抗旱、耐盐碱、耐瘠薄等优良特性,是改良现有小麦品种的重要基因资源。

[0005] 自1957年前苏联学者齐津将中间偃麦草的染色体导入小麦以来,国内外学者利用普通小麦与中间偃麦草进行远缘杂交获得了许多具有偃麦草特性的部分双二倍体、附加系、代换系和易位系等种质资源,也鉴定出了许多来源于中间偃麦草的抗白粉、条锈、叶锈、秆锈、黄矮病等抗病基因,还有利用中间偃麦草增强小麦抗寒、抗旱、耐盐碱性,增加蛋白质含量,并成功选育小麦新品种的报道。但中间偃麦草所含有大量有用基因资源并没有得到充分利用,继续加强中间偃麦草种质的研究、开发和利用,发掘中间偃麦草优良基因快速导入小麦的程序和方法,对于促进小麦遗传改良、培育新品种具有重要意义。

[0006] 外源染色体的准确鉴定是研究与有效利用中间偃麦草优异基因资源的重要前提,长期以来,中间偃麦草外源染色体鉴定一直以细胞学手段包括C-带、N-带、GISH、FISH等为主,分子标记技术的发展为其分子鉴定提供了新的发展方向。但迄今为止,中间偃麦草的全基因组图谱尚未公布,人们虽根据其基因组供体种二倍体长穗偃麦草和拟鹅冠草筛选了一些分子标记,但它们的基因组与中间偃麦草存在较大差异,分子标记的识别度有限。利用基因于中间偃麦草GBS序列开发的特异分子标记可有效解决这一问题。

## 发明内容

[0007] 本发明为解决现有小麦-中间偃麦草染色体工程系创制过程中缺乏一种用于快速检测和鉴定外源染色体的特异分子标记的技术问题,提供快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体的特异分子标记。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:

[0009] 一种快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的特异分子标记LD16-52,它的核苷酸序列为,

[0010] AGGCAGCAGCAGTACGTAAGTGGAGGCAGCAGCGGCTGTGTGTAGAGTAATGTGCCCT GCTCTTGTC CAAGGCTGCTCATCTGGCTGGACGAGATTCGTGCCAGGAGCTGCTGCTGTGT TGCACAGCAGGAAAAAAGTGC ATCCACTTGCTCTGTACGGAAGAATAGATAGCTGCAGAG GAGTATAAGTGGTCAGGCAGGCAGTGCAGCCAGGAG TGTGTGTGTACTGCAGTGGACGAGC AGTTTGGGTGTCTGGTGGTCGTGCATTTGCCCTGTGAG;

[0011] 所述分子标记的引物的核苷酸序列为:

[0012] LD16-52-F:5'-AGGCAGCAGCAGTACGTAAG-3';

[0013] LD16-52-R:5'-CTCACAGGCAAATGCACGAC-3'。

[0014] 一种快速检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的特异分子标记LD16-145,它的核苷酸序列为,

[0015] CACGTACGTACCCACGCATGCATGCCGAGACCAGGCACGGCCCTGCATGCTCTGCTCGA TTACGCGC TTCACTGCTGCAGATTTTGATGGATAACAACCGCGCGTGATCCACATATATAGTGC AACACAGCCTAGGC;

[0016] 所述分子标记的引物的核苷酸序列为:

[0017] LD16-145-F:5'-CACGTACGTACCCACGCAT-3';

[0018] LD16-145-R:5'-GCCTAGGCTGTGTTGCACTA-3'。

[0019] 本发明还提供一种快速检测植物材料中中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的方法,包括以下步骤:

[0020] (1) 提取待检测植株的基因组DNA,以提取的基因组DNA为模板,利用权利要求1所述的特异分子标记LD16-52引物对或权利要求2所述的LD16-145的引物对进行PCR扩增;

[0021] (2) 然后通过电泳分离扩增产物。若扩增到所述分子标记的目标条带,则说明待鉴定小麦材料中含有中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段。

[0022] 进一步的,选用特异分子标记LD16-52引物对进行扩增时,PCR反应体系为:2×Taq PCR Mix 预混液5μL,50ng/μL的LD16-52-F为1μL,50ng/μL的LD16-52-R为1μL,50-100ng/μL的模板DNA为1.5μL,1.5μL无菌去离子水,反应体系总体积为10μL;

[0023] PCR扩增程序为:94℃预变性5分钟;94℃变性30秒,60℃退火45秒,72℃延伸30秒,运行35个循环;最后72℃延伸10分钟。PCR扩增产物可以在4℃保存。

[0024] 进一步的,选用特异分子标记LD16-145引物对进行扩增时,PCR反应体系为:2×Taq PCR Mix 预混液5μL,50ng/μL的LD16-145-F为1μL,50ng/μL的LD16-145-R为1μL,50-100ng/μL的模板DNA为1.5μL,1.5μL无菌去离子水,反应体系总体积为10μL;

[0025] PCR扩增程序为:94℃预变性5分钟;94℃变性30秒,60℃退火45秒,72℃延伸30秒,运行35个循环;最后72℃延伸10分钟。PCR扩增产物可以在4℃保存。

[0026] 本发明还提供了上述特异分子标记在检测中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段中的应用。

[0027] 与现有技术相比本发明具有以下有益效果：

[0028] 本发明新发现的中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体的2个特异分子标记，在本发明之前未见过报道，本发明属于首创。新发现的分子标记可用于中间偃麦草染色体向小麦转移过程中，所创制的小麦-中间偃麦草染色体工程系(染色体附加系、代换系、易位系和双二倍体)中6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的快速检测。本发明对于小麦遗传育种的理论研究和实际应用均有重要价值。

### 附图说明

[0029] 图1为实施例1中分子标记LD16-52引物在待测植株和亲本间的扩增结果。

[0030] 图2为实施例2中分子标记LD16-145引物在待测植株及亲本间的扩增结果。

### 具体实施方式

[0031] 以下结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0032] 下述具体实施例中，所使用的实验材料的来源如下：

[0033] 中间偃麦草Z1141可市购，也可从各育种单位或种质库引进；

[0034] 普通小麦品种中国春可市购，也可从各育种单位或种质库引进；

[0035] 普通小麦品种晋太170可市购，也可从各育种单位或种质库引进；

[0036] 小麦-中间偃麦草6J<sup>S</sup>代换系可市购，也可从各育种单位或种质库引进；

[0037] 小麦-中间偃麦草部分双二倍体TAI7047可市购，也可从各育种单位或种质库引进；

[0038] DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；

[0039] 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成；

[0040] Taq PCR Mix预混液购自生工生物工程(上海)股份有限公司,Order NO.B639295；

[0041] 其他的实验材料试剂或者仪器设备，如未作特殊说明，均表示为本领域常规市售可得。

[0042] 实施例1

[0043] 待测植株中分子标记LD16-52的检测

[0044] 检测分子标记LD16-52的引物为LD16-52-F和LD16-52-R，它们的序列如下：

[0045] LD16-52-F:5'-AGGCAGCAGCAGTACGTAAG-3'；

[0046] LD16-52-R:5'-CTCACAGGCAAATGCACGAC-3'。

[0047] 检测的过程如下：

[0048] 提取待检测植株的基因组DNA，以提取的基因组DNA为模板，以LD16-52-F和LD16-52-R为引物进行PCR扩增，扩增完成后，通过电泳分离扩增产物，能够扩增出相应的279bp的DNA条带的，即为含有中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的植物材料。

[0049] 其中，所使用的PCR反应体系如下表1所示：

[0050] 表1实施例1的PCR反应体系

[0051]

试剂	体积	规格
2×Taq PCR Mix预混液	5μL	1.0mL
LD16-52-F	1μL	50ng/μL

LD16-52-R	1 $\mu$ L	50ng/ $\mu$ L
模板DNA	1.5 $\mu$ L	50-100ng/ $\mu$ L
无菌去离子水	1.5 $\mu$ L	
总体积	10 $\mu$ L	

[0052] PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5分钟;94 $^{\circ}$ C变性30秒,60 $^{\circ}$ C退火45秒,72 $^{\circ}$ C延伸30秒,运行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。PCR扩增产物可以在4 $^{\circ}$ C保存。

[0053] PCR扩增产物的电泳检测条件如下:扩增产物加2 $\mu$ L 6 $\times$ Loading Buffer后,用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳条件为恒压220V,电泳时间为60分钟。电泳检测的结果如图1所示,图1中,各泳道从左至右依次是:1为指示条带;2为中间偃麦草Z1141;3为普通小麦中国春;4为普通小麦晋太170;5为6J<sup>S</sup>代换系CH357;6为部分双二倍体小偃麦TAI7047。箭头所指279bp条带表示含有6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段。从图1可以看出,中间偃麦草Z1141、CH357、部分双二倍体小偃麦TAI7047可以扩增出对应于279bp位置的DNA条带,中国春、晋太170无相应条带,表明,Z1141、CH357、TAI7047中含有6J<sup>S</sup>染色体。

[0054] 实施例2

[0055] 待测植株中分子标记LD16-145的检测

[0056] 检测分子标记LD16-145的引物为LD16-145-F和LD16-145-R,它们的序列如下:

[0057] LD16-145-F:5'-CACGTACGTACCCACGCAT-3';

[0058] LD16-145-R:5'-GCCTAGGCTGTGTTGCACTA-3'。

[0059] 检测的过程如下:

[0060] 提取待检测植株的基因组DNA,以提取的基因组DNA为模板,以LD16-145-F和LD16-145-R为引物进行PCR扩增,扩增完成后,通过电泳分离扩增产物,能够扩增出相应的136bp的DNA条带的,即为含有中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的植物材料。

[0061] 其中,所使用的PCR反应体系如下表2所示:

[0062] 表2实施例1的PCR反应体系

[0063]

试剂	体积	规格
2 $\times$ Taq PCR Mix预混液	5 $\mu$ L	1.0mL
LD16-145-F	1 $\mu$ L	50ng/ $\mu$ L
LD16-145-R	1 $\mu$ L	50ng/ $\mu$ L
模板DNA	1.5 $\mu$ L	50-100ng/ $\mu$ L
无菌去离子水	1.5 $\mu$ L	
总体积	10 $\mu$ L	

[0064] PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5分钟;94 $^{\circ}$ C变性30秒,60 $^{\circ}$ C退火45秒,72 $^{\circ}$ C延伸30秒,运行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。PCR扩增产物可以在4 $^{\circ}$ C保存。

[0065] PCR扩增产物的电泳检测条件如下:扩增产物加2 $\mu$ L 6 $\times$ Loading Buffer后,用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳条件为恒压220V,电泳时间为50分钟。电泳检测的结果如图2所示,图2中,各泳道从左至右依次是:1为指示条带;2为中间偃麦草Z1141;3为普通小麦中国春;4为普通小麦晋太170;5为6J<sup>S</sup>代换系CH357;6为部分双二倍体小偃麦TAI7047。箭头所指136bp条带表示含有6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段。从图2可以看出,中间偃麦草Z1141、CH357、部分双二倍体小偃麦TAI7047可以扩增出对应于136bp位置的DNA条带,中国

春、晋太170无相应条带,表明,Z1141、CH357、TAI7047中含有6J<sup>S</sup>染色体。

[0066] 由上述实施例可知,在小麦-中间偃麦草染色体工程系(染色体附加系、代换系、易位系和双二倍体)中能够扩增出279bp或136bp对应于分子标记LD16-52或LD16-145的DNA条带,即说明该植物材料中包含中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段,从而可以在利用中间偃麦草染色体向小麦转移过程中快速检测含有中间偃麦草6J<sup>S</sup>染色体或6J<sup>S</sup>染色体片段的植物材料。

[0067] *Thinopyrum intermedium* (Host) 。

<110>山西省农业科学院作物科学研究所  
<120>快速检测中间偃麦草6JS染色体的特异分子标记及应用

<160>6

<210>1

<211>279

<212>DNA

<213>中间偃麦草 (*Thinopyrum intermedium* (Host))

<220>

<223>中间偃麦草6JS染色体或6JS染色体片段的特异分子标记LD16-52

<400>1

AGGCAGCAGC AGTACGTAAG TGGAGGCAGC AGCGGCTGTG TG TAGAGTAA TGTGCCCTGC 60  
TCTTGTCCTAA GGCTGCTCAT CTGGCTGGAC GAGATTCGTG CCCAGGAGCT GCTGCTGTGT 120  
TGCACAGCAG GAAAAAAGT GCATCCACTT GCTCTGTACG GAAGAATAGA TAGCTGCAGA 180  
GGAGTATAAG TGGTCAGGCA GGCAGTGCAG CCAGGAGTGT GTGTGTACTG CAGTGGACGA 240  
GCAGTTTGGG TGTCTGGTGG TCGTGCATTT GCCTGTGAG 279

<210>2

<211>136

<212>DNA

<213>中间偃麦草 (*Thinopyrum intermedium* (Host))

<220>

<223>中间偃麦草6JS染色体或6JS染色体片段的特异分子标记LD16-145

<400>2

CACGTACGTA CCCACGCATG CATGCCGAGA CCAGGCACGG CCCTGCATGC TCTGCTCGAT 60  
TACGCGCTTC ACTGCTGCAG ATTTTGATGG ATACAACCGC GCGTGATCCA CATATATAGT 120  
GCAACACAGC CTAGGC 136

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>中间偃麦草6JS染色体或6JS染色体片段的特异分子标记LD16-52的引物LD16-52-F

<400>3

AGGCAGCAGCAGTACGTAAG

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列



<220>

<223>中间偃麦草6JS染色体或6JS染色体片段的特异分子标记LD16-52的引物LD16-52-R

<400>4

CTCACAGGCAAATGCACGAC

<210>5

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>中间偃麦草6JS染色体或6JS染色体片段的特异分子标记LD16-145的引物LD16-145-F

<400>5

CACGTACGTACCCACGCAT

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>中间偃麦草6JS染色体或6JS染色体片段的特异分子标记LD16-145的引物LD16-145-R

<400>6

GCCTAGGCTGTGTTGCACTA

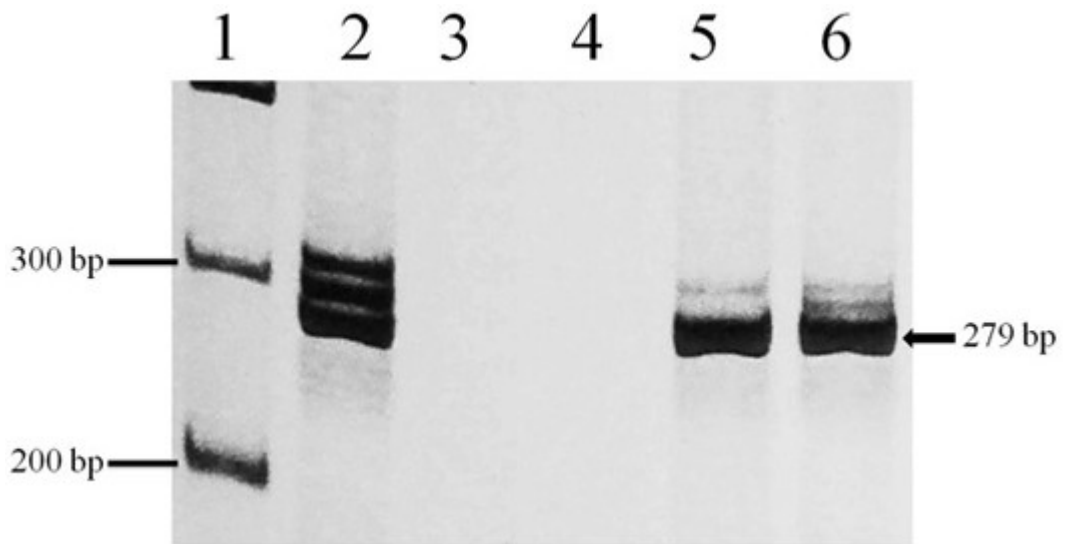


图1

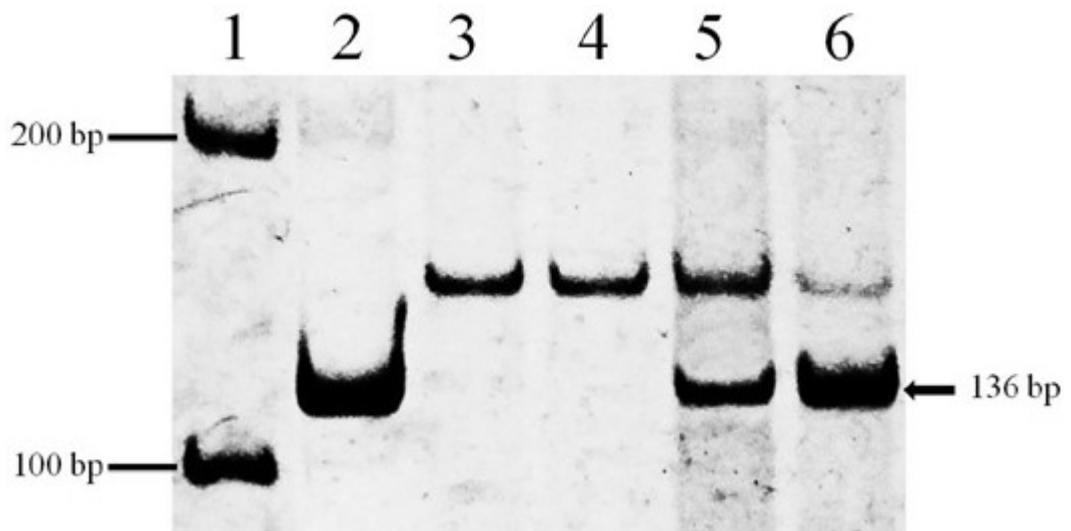


图2