



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113284551 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(21) 申请号 202110465632.5

C12Q 1/6895 (2018.01)

(22) 申请日 2021.04.28

(71) 申请人 中国农业科学院蔬菜花卉研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72) 发明人 杨树华 葛红 甘颖 闫菲
寇亚平 王晓飞 贾瑞冬 赵鑫
李秋香

(74) 专利代理机构 重庆市信立达专利代理事务
所(普通合伙) 50230
代理人 任苇

(51) Int. Cl.

G16B 20/20 (2019.01)

G16B 50/10 (2019.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

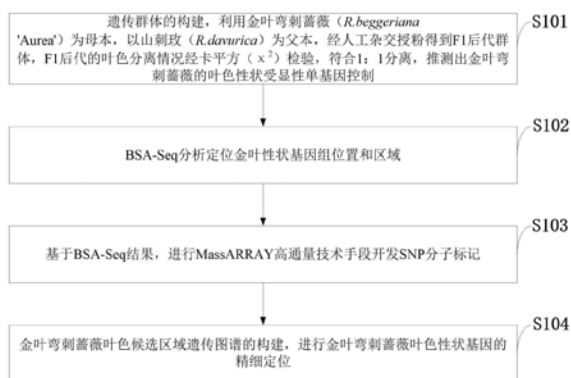
权利要求书1页 说明书7页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

一种金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法

(57) 摘要

本发明属于生物学分析技术领域,公开了一种金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,包括:遗传群体的构建,利用金叶弯刺蔷薇为母本,以山刺玫(R.davurica)为父本,经人工杂交授粉得到F1后代群体,F1后代的叶色分离情况经卡平方检验,符合1:1分离,推测出金叶弯刺蔷薇的叶色性状受显性单基因控制;BSA-Seq分析定位金叶性状基因组位置和区域;基于BSA-Seq结果,进行MassARRAY高通量测序技术手段开发SNP分子标记,进一步精细定位候选基因。本发明使用BSA-Seq开发定位区间内SNP标记,并构建定位区间的遗传连锁图谱,能够缩小叶色定位区间,筛选与叶色性状相关的候选基因。



1. 一种金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,其特征在于,所述金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法包括:

遗传群体的构建,利用金叶弯刺蔷薇为母本,以山刺玫 (*R. davurica*) 为父本,经人工杂交授粉得到F1后代群体,F1后代的叶色分离情况经卡平方检验,符合1:1分离,推测出金叶弯刺蔷薇的叶色性状受显性单基因控制;

BSA-Seq分析定位金叶性状基因组位置和区域;

基于BSA-Seq结果,进行MassARRAY高通量测序技术手段开发SNP分子标记。

2. 如权利要求1所述的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,其特征在于,所述金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法以‘金叶弯刺蔷薇’×‘山刺玫’F1分离群体作为材料,其中金色叶个体27株,绿色叶个体34株,提取新鲜叶片的基因组DNA等量混合,构建金叶、绿叶两个极端混池,对两混池的DNA质量进行检测,样品DNA合格后用于构建测序文库,文库质量检测合格后,通过Illumina HiSeqX进行基因组重测序。

3. 如权利要求1所述的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,其特征在于,所述BSA-Seq分析定位金叶性状基因组位置和区域,以中国古老月季‘月月粉’基因组RchiOBHm-V2为参考基因组,使用BWA软件,将获得的reads比对到参考基因组上,使用GATK软件检测样品与参考基因组间的SNP及InDel,提取两个样品混池之间有差异的变异位点,得到两个极端混池之间的SNP,InDel变异位点集;然后利用两亲本的SNP数据,分别计算出各混池的SNP-index,对各个混池的SNP-index进行比较,计算出 Δ SNP-index,并采用欧式距离算法对 Δ SNP-index进行拟合,最终绘制出SNP的ED值在颜色体上的分布图。

4. 如权利要求3所述的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,其特征在于,通过ED拟合算法计算与金叶性状相关的定位区域在参考基因组中国古老月季‘月月粉’基因组CM009586.1号染色体的4,040,000bp-8,850,000bp,总长度4.81Mb,这一定位区间内共有492个基因得到注释,有540个SNP被注释为非同义突变,100个InDel被注释为移码突变。

一种金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学与植物分子育种领域,具体涉及金叶弯刺蔷薇叶色性状的精密定位及高通量SNP分子标记的开发与应用。

背景技术

[0002] 弯刺蔷薇 (*Rosa beggeriana*) 属于蔷薇科 (*Rosaceae*) 蔷薇属 (*Rosa*) 植物,作为中国西北野生蔷薇资源的代表种之一,具有抗旱、抗寒、耐贫瘠等优良特性,是现代月季育种的优质种质资源。金叶弯刺蔷薇是弯刺蔷薇种子经 γ 射线辐射后,实生苗枝条上产生的芽变材料,其突变植株能够稳定保持金色叶片的特征,具有观赏期长和色彩鲜艳的特点,增加了叶色季相变化,在淡花季也能起到以叶代花的作用,具有特殊的园林用途和很高的观赏价值,弥补园林景观色彩单调的缺憾。

[0003] 基于高通量测序技术进行混合样本分组分析 (Bulk Segregant analysis by sequencing, BSA-seq) 是利用在分离群体中两组表型差异极端的个体分别构建等量混池,在两混池间开发筛选出与被测性状相关的单核苷酸多态性标记 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 和插入/缺少标记 (Insertion or Deletion, InDel), 他是一种快速获得与目标基因连锁的分子标记的有效方法。近年来,BSA-seq在各种不同植物的育性基因、抗性基因及形态、生理基因的标记筛选及基因定位方面得到了广泛的应用,但是BSA-seq只能对目标基因进行分子标记,并不能确定目标基因与分子标记之间连锁的紧密程度及其在遗传连锁图上位置。因此,我们采用BSA-seq和MassARRAY联合分析方法,首先通过BSA-seq获得与目标基因连锁的分子标记,然后使用MassARRAY对开发的分子标记在分析群体中进行标记与性状间的共分离分析,构建遗传连锁图,确定是否连锁及彼此间的遗传距离,进行基因定位。

发明内容

[0004] (1) 遗传群体的构建

[0005] 利用金叶弯刺蔷薇 (*R. beggeriana* 'Aurea') 为母本,以山刺玫 (*R. davurica*) 为父本,经人工杂交授粉得到F1后代群体,F1后代得叶色分离情况经卡平方 (χ^2) 检验,符合1:1分离,推测出金叶弯刺蔷薇的叶色性状受显性单基因控制。

[0006] 在本发明中,以'金叶弯刺蔷薇' \times '山刺玫' F1分离群体作为材料,其中金色叶个体27株,绿色叶个体34株,委托北京百迈客生物科技有限公司 (Biomarker Technologies CO, LTD) 提取新鲜叶片的基因组DNA等量混合,构建金叶、绿叶两个极端混池,对两混池的DNA质量进行检测,样品DNA合格后用于构建测序文库,文库质量检测合格后,通过Illumina HiSeq X进行基因组重测序。

[0007] (2) BSA-Seq分析定位金叶性状基因组位置和区域

[0008] 以中国古老月季'月月粉' (*R. chinensis* 'Old Blush') 基因组Rchi0BHm-V2为参考基因组,使用BWA软件,将获得的reads比对到参考基因组上,使用GATK软件检测样品与参考

基因组间的SNP及InDel,提取两个样品混池之间有差异的变异位点,得到两个极端混池之间的SNP,InDel变异位点集;然后利用两亲本的SNP数据,分别计算出各混池的SNP-index,对各个混池的SNP-index进行比较,计算出 Δ SNP-index,并采用欧式距离算法对 Δ SNP-index进行拟合,最终绘制出SNP的ED值在颜色体上的分布图,如图2所示。

[0009] 通过ED拟合算法计算与金叶性状相关的定位区域在在参考基因组中国古老月季‘月月粉’(R.chinensis ‘Old Blush’)基因组CM009586.1号染色体的4,040,000bp-8,850,000bp,总长度4.81Mb,这一定位区间内共有492个基因得到注释,有540个SNP被注释为非同义突变,100个InDel被注释为移码突变,这些位点可能与性状直接相关。

[0010] (3) 基于BSA-Seq结果,进行MassARRAY高通量技术手段开发SNP分子标记。

[0011] 结合上述的所有技术方案,本发明所具备的优点及积极效果为:本发明提供的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,利用金叶弯刺蔷薇(R.beggeriana ‘Aurea’)为母本,以山刺玫(R.davurica)为父本,经人工杂交授粉得到F1后代群体,作为遗传连锁图谱的作图群体。F1后代的叶色分离情况经卡平方(χ^2)检验,符合1:1分离,推测金叶弯刺蔷薇的叶色性状受显性单基因控制。李世超以金叶弯刺蔷薇 \times 山刺玫F1代群体为作图群体,使用AFLP分子标记将叶色性状定位于金叶弯刺蔷薇的第4连锁群上,距其上游的M3E4-1760标记位点17.4cM,距其下游的M3E1-1990标记位点18.0cM。本发明在该初定位的基础上,使用BSA-Seq开发定位区间内SNP标记,并构建了定位区间的遗传连锁图谱,能够缩小叶色定位区间,筛选与叶色性状相关的候选基因。

附图说明

[0012] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对本发明实施例中所需要使用的附图做简单的介绍,显而易见地,下面所描述的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0013] 图1是本发明实施例提供的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法流程图。

[0014] 图2是本发明实施例提供的基于BSA-Seq和MassARRAY联合分析。

[0015] 图3为本发明中部分SNP分子标记rna28536a、rna28674a、rna28757b分型结果分析图。

[0016] 图4是本发明中弯刺蔷薇金色叶性状候选区域遗传连锁图谱。

具体实施方式

[0017] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0018] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法,下面结合附图对本发明作详细的描述。

[0019] 如图1所示,本发明实施例提供的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法包括以下步骤:

[0020] S101:遗传群体的构建,利用金叶弯刺蔷薇(R.beggeriana ‘Aurea’)为母本,以山

刺玫 (*R. davurica*) 为父本, 经人工杂交授粉得到F1后代群体, F1后代的叶色分离情况经卡平方 (χ^2) 检验, 符合1:1分离, 推测出金叶弯刺蔷薇的叶色性状受显性单基因控制。

[0021] S102: BSA-Seq分析定位金叶性状基因组位置和区域。

[0022] S103: 基于BSA-Seq结果, 进行MassARRAY高通量测序技术手段开发SNP分子标记。

[0023] S104: 金叶弯刺蔷薇叶色候选区域遗传图谱的构建, 进行金叶弯刺蔷薇叶色性状基因的精细定位。

[0024] 本发明实施例提供的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法具体包括以下步骤:

[0025] (1) 遗传群体的构建, 利用金叶弯刺蔷薇 (*R. beggeriana* 'Aurea') 为母本, 以山刺玫 (*R. davurica*) 为父本, 经人工杂交授粉得到F1后代群体, F1后代的叶色分离情况经卡平方 (χ^2) 检验, 符合1:1分离, 推测出金叶弯刺蔷薇的叶色性状受显性单基因控制。

[0026] 在本发明中, 以 '金叶弯刺蔷薇' \times '山刺玫' F1分离群体作为材料, 其中金色叶个体27株, 绿色叶个体34株, 委托北京百迈客生物科技有限公司 (Biomarker Technologies CO, LTD) 提取新鲜叶片的基因组DNA等量混合, 构建金叶、绿叶两个极端混池, 对两混池的DNA质量进行检测, 样品DNA合格后用于构建测序文库, 文库质量检测合格后, 通过Illumina HiSeq X进行基因组重测序。

[0027] (2) BSA-Seq分析定位金叶性状基因组位置和区域, 以中国古老月季 '月月粉' (*R. chinensis* 'Old Blush') 基因组Rchi0BHm-V2为参考基因组, 使用BWA软件, 将获得的reads比对到参考基因组上, 使用GATK软件检测样品与参考基因组间的SNP及InDel, 提取两个样品混池之间有差异的变异位点, 得到两个极端混池之间的SNP, InDel变异位点集; 然后利用两亲本的SNP数据, 分别计算出各混池的SNP-index, 对各个混池的SNP-index进行比较, 计算出 Δ SNP-index, 并采用欧式距离算法对 Δ SNP-index进行拟合, 最终绘制出SNP的ED值在颜色体上的分布图, 如图2所示。

[0028] 通过ED拟合算法计算与金叶性状相关的定位区域在在参考基因组中国古老月季 '月月粉' (*R. chinensis* 'Old Blush') 基因组CM009586.1号染色体的4,040,000bp-8,850,000bp, 总长度4.81Mb, 这一定位区间内共有492个基因得到注释, 有540个SNP被注释为非同义突变, 100个InDel被注释为移码突变, 这些位点可能与性状直接相关。

[0029] (3) 基于BSA-Seq结果, 进行MassARRAY高通量技术手段开发SNP分子标记。

[0030] (4) 基于MassARRAY高通量技术手段对开发的分子标记在亲本和子代中进行了基因分型检测, 利用分型检测结果构建了金叶弯刺蔷薇叶色候选区域遗传连锁图谱。对金叶弯刺蔷薇叶色突变基因进行了精细定位。

[0031] 本发明提供的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法业内的普通技术人员还可以采用其他的步骤实施, 图1的本发明提供的金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法仅仅是一个具体实施例而已。

[0032] 下面结合实验对本发明的技术效果作详细的描述。

[0033] 1、实验材料: 以亲本金叶弯刺蔷薇和弯刺蔷薇各一株, F1代金色叶个体和绿色叶个体各44株为材料。实验材料种植于中国农业科学院蔬菜花卉所月季种质资源圃。

[0034] 2、基因组DNA的提取: 取100mg新鲜的金叶弯刺蔷薇及弯刺蔷薇成熟叶片在液氮中迅速研磨成粉末, 参考DNAquick Plant System快捷型植物基因组DNA提取试剂盒 (DP321) 说明书操作。用Nanodrop 2000测定总RNA在260nm、280nm处的吸光值及浓度, 并用1%琼脂糖

凝胶电泳检测DNA质量及完整性,保证DNA浓度 $>50\text{ng}/\mu\text{L}$ 。质检合格的DNA样品用于质谱检测实验。

[0035] 3、引物设计:根据SNP位点序列信息,使用sequenom公司的引物设计软件Assay design3.1,设计PCR反应和单碱基扩展引物并合成。

[0036] 4、PCR反应:采用多重PCR扩增技术,在384孔板中进行,每个孔的反应体系为 $5\mu\text{L}$,反应体系及反应条件如下:

[0037] A) PCR反应体系

试剂名称	每个反应体系 (μL)
H_2O	1.75
PCR Buffer with 15 mM MgCl_2	0.625
MgCl_2 (25mM)	0.325
dNTP Mix (25mM)	0.1
Primer Mix (0.5 μM)	1
HotStar Taq (5U/ μL)	0.2
DNA template (10ng/ μL)	1
Total	5

[0039] B) 循环参数

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (second)	Cycle
94	120	1
94	20	45
56	30	
72	60	
72	180	1
4	forever	1

[0041] SAP消化:

[0042] A) 反应体系

Reagent	Volume (μL)
H_2O	1.53
SAP Buffer (10 \times)	0.17
SAP (1.7U/ μL)	0.3
Total	2

[0044] 对于每个碱性磷酸酶处理反应孔,反应体系总体积为 $7\mu\text{L}$,其中PCR产物 $5\mu\text{L}$,SAP混合液 $2\mu\text{L}$ 。

[0045] B) 循环参数

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (minute)	Cycle
37	40	1
85	5	1
4	forever	1

[0047] 延伸反应:

[0048] A) 反应体系 (384孔PCR板+38%的试剂损耗)

Reagent	Volume (uL)
H ₂ O	0.75
iPLEX buffer plus (10×)	0.2
iPLEX terminator	0.2
Primer Mix (0.6-1.3uM)	0.80
iPlex enzyme	0.05
total	2

[0050] 对于每个反应孔,单碱基延伸反应体系包含SAP处理后PCR产物7μL及延伸反应液2μL,反应体系总体积为9μL。

[0051] B) 循环参数

Temperature (°C)	Time (minute)	Cycle	
94	30	1	
94	5	1	40
52	5	5	
80	5		
72	180	1	
4	forever	1	

[0053] A) 将反应产物 (共9uL) 稀释3倍,使用树脂进行脱盐

[0054] B) 将脱盐处理后的样品点在样品靶上,自然结晶

[0055] C) 上机进行质谱检测,并收集数据

[0056] 通过上述PCR反应体系,将上述的金叶弯刺蔷薇金叶基因定位区间内金叶个体和绿叶个体混合池测序数据可视化分析分析挖掘出的540个可能与金叶表型呈现连锁SNP中,以每隔15kb选择一个SNP原则,共选择了248个SNP做MassARRAY质谱基因分型检测,最终一共开发了248个SNP标记。

[0057] 本发明提供部分MassARRAY高通量测序技术手段开发出的弯刺蔷薇金叶性状SNP分子标记,并且还提供用于质谱检测分子标记的特异性PCR引物和单碱基延伸引物。

[0058] SEQ ID NO:1,分子标记rna28531a:GAGTAACTAAAAGGCAACAACCAAAGTCAGCTATGTGGAAAGTATGACCATATCACAAGCTTAAGGAAAAAGCAATGCCAAAAATATGGATGGAAGCACCAAATTGGAATAAAA CCAACAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTGACAGGAAACGATATAAACTTACAATCAACATATATGTTCTTTATTTCTCTGT GTCATAATCAGGAGACATACAGCGCAAACCCGGACTCCTTATAACCAGTCTCTACTTCTCCATGATTCCTTGCAACT TTACATGAGATTTCTCATCTAGACAGTCATTTTGCTCAGGTGTTGAACCAGCTCCATATGGCTTAATAAGCTGACA CAGAAAGAGATAAAATAGGACCAATAACTCTCAGTCAAAGGTGTCAGGGATAATACTGCCTAAAATTATGAAGAGG TACAAGAGAAGTAACATGATGTTTAAGGTAAGGTGAATACCGACACATCTGCAAGACTGCAACCCAGAATCCAATA GAATTT[C/T]GATAGTAAGAGCATCCCAATAGCTTCCCGTCATGAATGCATAAGTCAGCAAGTCTTGACCATCCC ATATCAACAGAATCATGGGATATTACAGGCTCCCATGAATAAACCAGCAAATAGGGATCTTAAGTTTACATGTTAAC TCAATTCAATCCCCTAGAGTACTAAGACAAAACAAATGAAAACCTTCAAAGTGCATCCAATCCAGAAAATATTGTCC TCCCATCAGGGTGGAAAGTAATTGCGCGTACTCCCCTTGTAGGCTGAAACAAGAAAAAAAAATTGTCAGACTAACT GGATGAAAGTCACATTACAAGAAAAACATAGCTACAGGAATATATGATGCTCTATCAATCTGAGTGAGAGAGAGAGA

GAGAGAAAGAGAGATATATATATATATATATATATATATATATATATCAATTAATAACATAAATTACCTCAGGCCTGCTAGATC
CAATCAGTTCAAAAGTTTCCAAATCCCAGAATTTACAGTTCTGTCTGCT

[0059] SEQ ID NO:2,PCR引物1:ACGTTGGATGTGGTTTTTCATTGTAGGAAC

[0060] SEQ ID NO:3,PCR引物2:ACGTTGGATGTAACATCCAGAATGAGGCC

[0061] SEQ ID NO:4,延伸引物方向:F(正向)

[0062] 单碱基延伸引物:GCCAGCTGGTTCTTCT

[0063] SEQ ID NO:5,分子标记rna28823a:AGTTTCCTAAAGCCACACTAACCCAGAGCTTTGATCAC
TCTCTATATATACCTAACCCACCTTCAAAACCTCctataaaaccagaaaccataAATCAGCAACACTCATTCTTT
GGTTAACACTTTTATACATGGAACCTTCTACACTCATCGGTGCAACGCCTCGGCCACCTCGGCTCTACTTCCGGT
GGTCCCCGCCGCCCTGCAGCGGCACGCTGGGCCGCCACCTGGCTCGGCGGCTGGTCGAGATTGGCGTTCATGAC
GTGTTCTCAGTCCCCGGCGACTTCAACTTGACCCTCTTGACCACCTGATCGCCGAGCCGGAGCTCAACCTCATCG
GCTGCTGCAACGAGCTCAACGCCGGCTACGCCGCCGACGGCTACGCGCGGCCAGGGGCGTCGGCGCGTGTGTCTG
AACTTTCACGGTGGGTGGGCTCAGCGTCTGAACGCCATCGCCGGTGTACAGTGAGAACTTGCCGGTGATTTGT
ATCGTC[G/A]GTGGGCCAACTCCAATGATTACGGGACCAATCGGATCCTCCACCACACGATCGGGTACCCGAT
TTCCTCAGGAGCTCCGGTGTTCAAAACCTGTTACTTGTACCAGGTAAGCTTACAGCTAAGACAGTAGAGTGT
TCTAGTCTCAAGGTCTTAAACCTCTATAATATTCTCGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTATCATTGTTAAATAT
AACATGTTTTGAATATTTTTATTTAGTATATTTCTCGATATTTGGTCACCTGTTACTATGTTATGCTCAAAGATG
TTGGATTTAATGTTGCTGAAGACATTTTCGTGCATTGTGTGACAGGCAGTGGTGAGTCATTTGGAAGATGCGCATGA
GCTTATAGACACGGCAATTTTCGACAGCATTGAAGGAGAGCAAGCCGTTTACATTAGCATAAGTTGTAATTTGCCTG
CAATTCCTCACCCACATTTGGTAGAGACCTGTTCCCTTCTTTATTGCA

[0064] SEQ ID NO:6,PCR引物1:ACGTTGGATGTGATTTGTATCGTCGGTGGG

[0065] SEQ ID NO:7,PCR引物2:ACGTTGGATGCCTGAGTGAAATCGGGTAAC

[0066] SEQ ID NO:8,延伸引物方向:F(正向)

[0067] 单碱基延伸引物:ACAATACCTTATCATACAAATTCT

[0068] SEQ ID NO:9,分子标记rna29070a:GACAACCTGCACCAATAGCACCCTACAAGTACAAAA
GATTAATTAATATCTTAAAGAATTTAAAGCTTATAAAAGTTTCTGTCTATTTTTATCACACCTTGAATTTGCAGG
ATCATCAAACCAACTAATTTGCTGGTGTACAACTTTTTGAATGTCAAGGCACGAATTCGCTCTATCAGCTTCCCA
CCTGCAATTTCAAAGAAGAAATTTGCCCTGGAATAACAAACAACCCAAAGAAACCTATACCAACATACTCCTG
CCCAAACCTTTGGAGTCTTTTCGCAGCTCATTATGCGTTTCATAGAACATCTTGATGGCTTTTGAGAGTAGTAAGCC
GAAGACAGGAAAAATCACTCCATGACCTGCTGCAGCAATAGATCCAAGCAGCAAAACTGGAAGCTCAGGTTTATTC
AAATAGGCCAGCCTTTTGATGGAACTTTTTTGCCTTGCTCCGGATCAACCTTCGTTTTACACGGTTCTCCTCAT
CTTCTT[C/T]TTCTACTTGTACTTACAATTAAGTGGAGCAGGAACACCAAAGCTAGTAATAGTGAATGAGCGCC
GACTACCTGATGAACCTTTGCTTAAAGATCTCACTGCTGAAAGTCTCTGGCTCCAGATCTACTCATTGTCTATCT
ATATTCAAACCATTATCTGGATCAGAGGGCTCTGCACCTTTTTCTTTAGCTCTTTCTTGCAGGCGGATTAGTTGGCT
ATAAGCTCCTTCTGGGTTTTGGGTCAAGTCATCATGAGTTCCTACAATACAAAACGATGATGTTACTTGAGGAACAA
GTTTATTGTACGAATGAGAATGATGGTGTACCTTATGAAAATGCTCTTACCTATTTCAACAATTTTCCCTTTATGCA
CCACAGCTATTGCATCAGCATTCTAATCGTTGTTAAGCGATGTGCAACAACCTATAGTCGTTCTATTTGACATCAAT
CTCACCAGTGCATCTTGAACAATTTCTCTCCGACTCAGCATCCAAGGCGCT

[0069] SEQ ID NO:10,PCR引物1:ACGTTGGATGTAGCTTTGGTGTTCCTGCTC

[0070] SEQ ID NO:11,PCR引物2:ACGTTGGATGCCTTCGTTTTTCACACGGTTC

[0071] SEQ ID NO:12,延伸引物方向:F(正向)

[0072] 单碱基延伸引物:ACGGTTCCTCATCTTCTT

[0073] 利用质谱分型结果对基因型频率进行计算,分子标记rna28531a,其SNP多态性为CC/CT,其中在亲本弯刺蔷薇为CC基因型,亲本金叶弯刺蔷薇为CT基因型,在F1后代中,对44个金色叶个体和44个绿色叶个体分型,绿色叶个体CT基因型占81.8%(36/44),金色叶个体CT基因型占63.6%(28/44)图3的(a)。分子标记rna28823a,其SNP多态性为AA/GA,其中在亲本弯刺蔷薇为AA基因型,亲本金叶弯刺蔷薇为GA基因型,在F1后代中,对44个金色叶个体和44个绿色叶个体分型,绿色叶个体AA基因型占84.9%(37/44),金色叶个体CT基因型占86.4%(38/44)图3的(b)。分子标记rna29070a,其SNP多态性为CC/CT,其中在亲本弯刺蔷薇为CC基因型,亲本金叶弯刺蔷薇为CT基因型,在F1后代中,对44个金色叶个体和44个绿色叶个体分型,绿色叶个体AA基因型占86.4%(38/44),金色叶个体CT基因型占70.5%(31/44)图3的(c)。

[0074] 将MassArray检测得到的114个SNP分型情况依照JoinMap 4.0软件的CP作图模式转化为<nnxnp>、<lmxl1>、<efxeg>、<hkxhk>和<abxcd>5种基因型分离方式,并将叶色表型性状“YL”转换为<nnxnp>型标记,采用Kosambi作图函数计算,选择LOD=3.0的作图组群用于图谱构建。最终用36个标记构建了一个总图距为34.4cM的遗传连锁图谱,见图3,其中金叶弯刺蔷薇的金色叶性状“YL”定位于该图谱的22.7cM处距其上游的rna28746标记0.2cM,距其下游的rna28800标记0.4cM,参考上、下游标记在参考基因组中国古老月季‘月月粉’(R.chinensis ‘Old Blush’)基因组上的物理位置,将金叶弯刺蔷薇的金色叶性状定位在‘月月粉’(R.chinensis ‘Old Blush’)基因组CM009586.1号染色体的6,290,023bp-6,581,773bp之间,区间总长度为0.28Mb。

[0075] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所
 <120> 一种金叶弯刺蔷薇叶色性状的定位方法

<160> 12

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1001

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

```

gagtaactaa aaggcaacaa ccaaagtcag ctatgtggaa agtatgacca taccacaagc 60
ttaaggaaaa agcaatgccaa aaaatatgga tggaagcacc aaattggaat aaaaccaaca 120
aaaaaaaaaa aaagttgaca ggaaacgata taaacttaca atcaacatat atgttcttta 180
tttcctctgt gtcataatca ggagacatac agcgcaaacc cggactcctt ataccagtct 240
ctacttctcc atgattcctt gcaactttac atgagatttc tcatctagac agtcattttg 300
ctcaggtggt gaaccagctc catatggctt aataagctga cacagaaaga gataaaatag 360
gaccaataac tctcagtcaa aggtgtcagg gataatactg cctaaaatta tgaagaggta 420
caagagaagt aacatgatgt ttaaggtaag gtgaataccg acacatctgc aagactgcaa 480
cccagaatcc aatagaatth cgatagtaag agcatcccaa tagcttcccg tcatgaatgc 540
ataagtcagc aagtcttgac catcccatat caacagaatc atgggatatt acaggctccc 600
atgaataaac cagcaaatag ggatcttaag ttacatggtt aactcaattc aatcccctag 660
agtactaaga caaacaatg aaaaccttca aactgtcatc caatccagaa aatattgtcc 720
tcccatcagg gtggaaagta attgcgcgta ctcccctgtg aggctggaaa caagaaaaaa 780
aaattgtcag actaactgga tgaaagtcac attacaagaa aaacatagct acaggaatat 840
atgatgctct atcaatctga gtgagagaga gagagagaga aagagagata tatatatata 900
tatatatata tattcaatta ataacataaa ttacctcagg cctgctagat ccaatcagtt 960
caaaagtttc caaatcccag aatttcacag ttctgtctgc t 1001

```

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

```

acgttggatg tggttttcat tntaggaac 29

```

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

acgttggatg taacatccag aatgaggccc 30
 <210> 4
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 4
 gccagctggt tcttct 16
 <210> 5
 <211> 1001
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 5
 agtttccetaa agccacaacta acccagagct ttgatcactc tctatatata cctaaccacc 60
 ttcaaaacct ccctaaaaac ccagaaacca taaatcagca aactcattt ctttggttaa 120
 cacttttata catggaacct tctacactca tcggtgcaac gcctcggccc acctcggctc 180
 tacttccggt ggtccccgcc gccgcctgca gcggcacgct gggccgccac ctggctcggc 240
 ggctggtcga gattggcggt catgacgtgt tctcagtccc cggcgacttc aacttgacc 300
 tcttggacca cctgatcgcc gagccggagc tcaacctcat cggtgctgc aacgagctca 360
 acgccggcta cgccgccgac ggctacgcg gcgccagggg cgtcggcgcg tgtgtcgtaa 420
 ctttcacggt ggggtgggctc agcgtcttga acgcatcgc cggtgcttac agtgagaact 480
 tgccggtgat ttgtatcgtc ggtgggcca actccaatga ttacgggacc aatcggatcc 540
 tccaccacac gatcgggta cccgattca ctcaggagct ccggtgcttc caaactgtta 600
 cttgtcacca ggtaaaagct tcacagctaa gacagtagag tgttctagtc tcaaggtctt 660
 aaacctctat aatattctcg aattttttt tttttttt ttagtatcat tgtaaatat 720
 aacatgtttt gaatatttta ttttagtata tttcctcgat attttggca cctgttacta 780
 tgttatgctc aaagatgttg gatttaatgt tgctgaagac attttcgtgc attgtgtgac 840
 aggcagtggt gactcattg gaagatgccc atgagcttat agacacggca atttcgacag 900
 cattgaagga gagcaagccg gtttacatta gcataagttg taatttgcct gcaattcctc 960
 accccacatt tggtagagac cctgttccct tctttattgc a 1001
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 6
 acgttggatg tgatttgtat cgtcgggtggg 30
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7
 acgttggatg cctgagtgaa atcgggtaac 30
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 8
 acaatacctt atcatacaaa ttct 24
 <210> 9
 <211> 1001
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 9
 gacaaccttg caccaatagc accactacaa gtacaaaaga ttaattaaat atcttaaaga 60
 atttaaagct tataaaagtt tctgtctatt tttatcacac cttgaatttg caggatcatc 120
 aaaccaacta atttgctggt gtacaacttt ttggaatgac aaggcacgaa ttcgctctat 180
 cagcttccca cctgcaattc caaagaagaa attttgcctt ggaataacaa acaacccaaa 240
 gaaacctata ccaacataca ctctgcccc aactttggag tcttttcgca gctcattatg 300
 cggttcatag aacatcttga tggcttttga gagtagtaag ccgaagacag gaaaaatcac 360
 tccatgacct gctgcagcaa tagatccaag cagcaaaact ggaagctcag gtttattcaa 420
 ataggccagc cttttgatgg aaactttttt gcgttgetcc ggatcaacct tcgttttcac 480
 acggttctcc tcatcttctt cttctacttg tacttcacaa ttaactggag caggaacacc 540
 aaagctagta atagtgatg agcgcgact acctgatgaa cttttgctta aagatctcac 600
 tgctgaaagt ctctggctcc cagatctact cattgtccta tctatattca aaccattatc 660
 tggatcagag ggctctgcac ctttttcttt agctctttct tgcaggcgga ttagttggct 720
 ataagctcct tctgggtttt gggtaagtc atcatgagtt cctacaatac aaaacgatga 780
 tgttacttga ggaacaagtt tattgtacga atgagaatga tgggtgtacct tatggaaatg 840
 ctcttaccta tttcaacaat tttcccttta tgcaccacag ctattgcac agcattccta 900
 atcgttggtta agcgatgtgc aacaactata gtcgttctat ttgacatcaa tctcaccagt 960
 gcattctttaa caattctctc cgactcagca tccaaggcgc t 1001
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 10
 acgttggatg tagctttggt gttcctgctc 30
 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

acgttggatg ccttcgtttt cacacggttc 30

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 12

acggttctcc tcattctttt 20

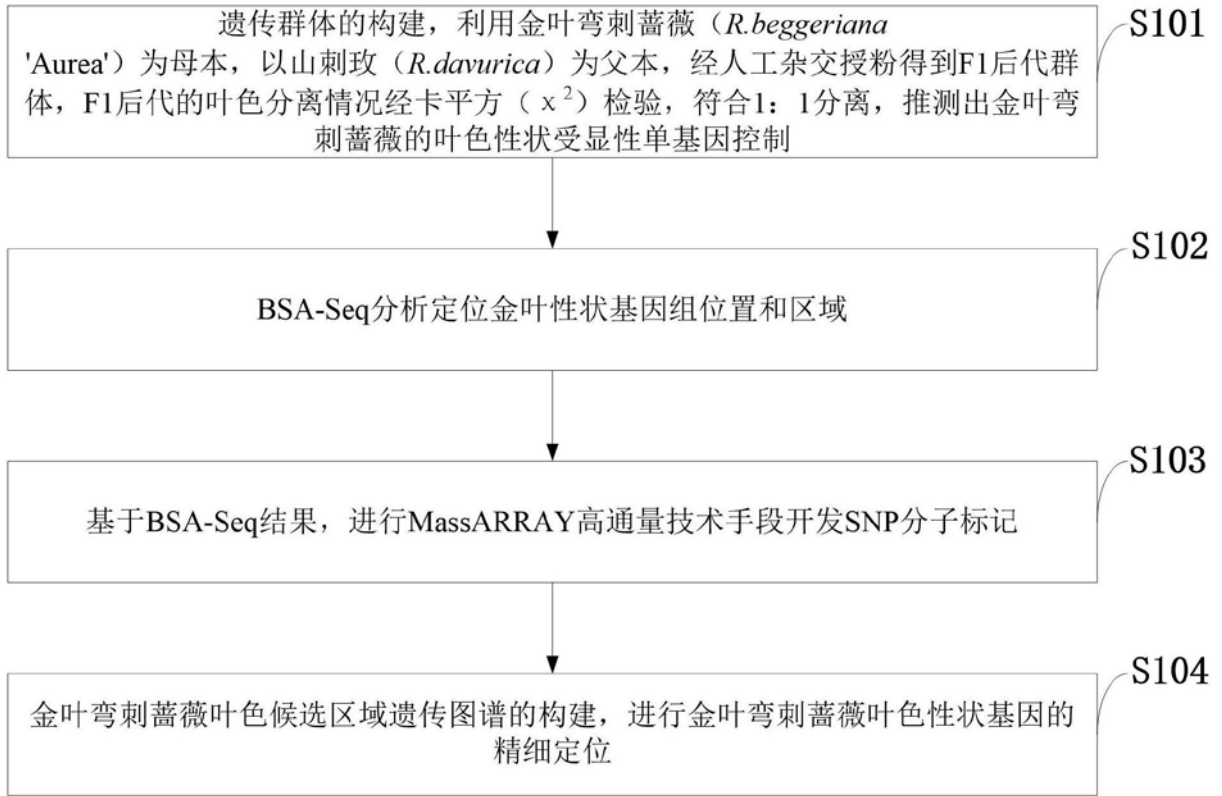


图1

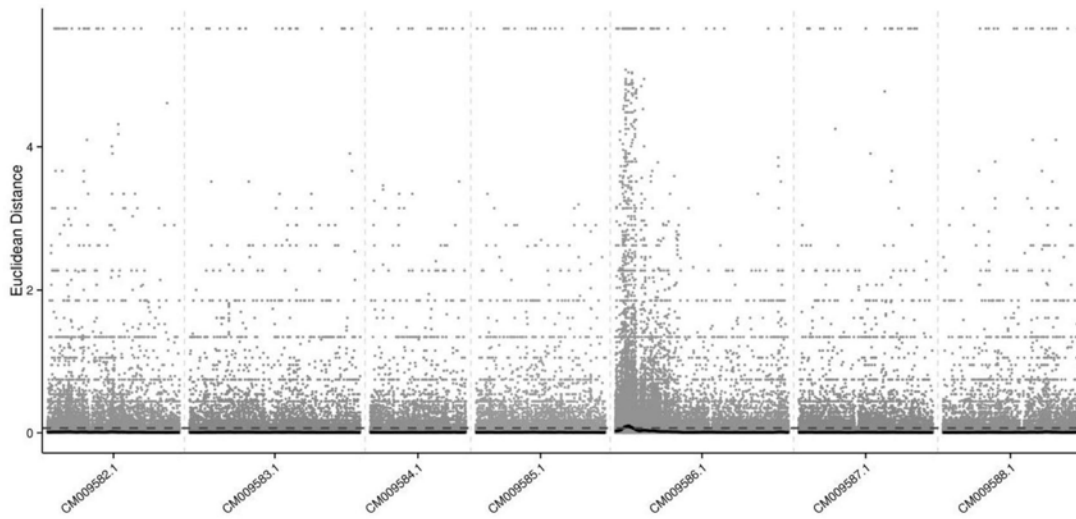


图2

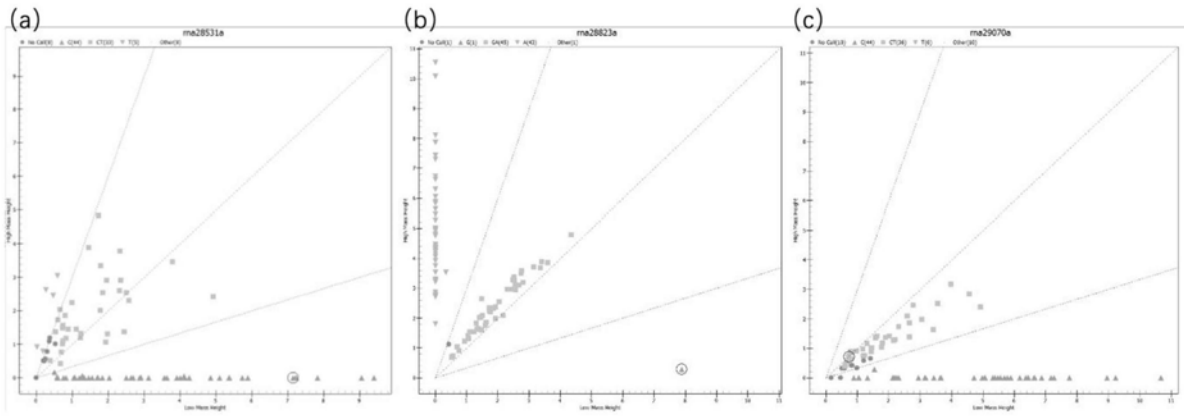


图3

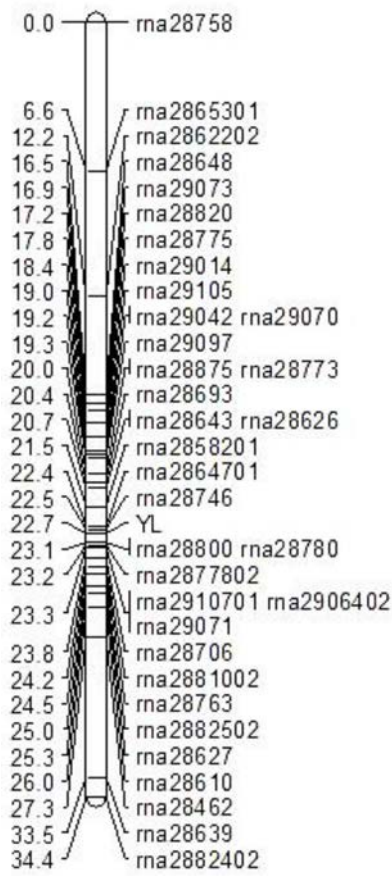


图4