



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115725770 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 03

(21) 申请号 202210966661.4

(22) 申请日 2022.08.11

(71) 申请人 辽宁省经济林研究所

地址 116031 辽宁省大连市甘井子区中华
西路31号

(72) 发明人 刘枫 赵宝军 贺有超 宫永红
刘振盼 尤文忠 李冬生 王克瀚
郝家臣

(74) 专利代理机构 北京博尔赫知识产权代理事
务所(普通合伙) 16045

专利代理师 王灿

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

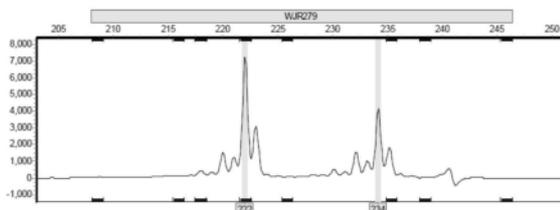
权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法,涉及植物遗传育种技术领域。本发明提供了特异性引物在鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代中的应用,以及一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法,操作简单、重复性好、稳定性高、不受外界环境影响,本发明有效提高核桃品种间杂交后代真实性的判别、提高杂种后代的早期选择效率、缩短育种周期和提高育种效率。



1. 特异性引物在鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代中的应用,其特征在於,所述特异性引物包括WJR003、WJR076、WJR078、WJR089、WJR150、WJR163、WJR191、WJR258、WJR279、WJR281、ZMZ3、ZMZ5、ZMZ6、ZMZ14、ZMZ27、ZMZ28、ZMZ30、ZMZ33、ZMZ39和ZMZ46中的一个或多个的组合;

所述WJR003、WJR076、WJR078、WJR089、WJR150、WJR163、WJR191、WJR258、WJR279、WJR281、ZMZ3、ZMZ5、ZMZ6、ZMZ14、ZMZ27、ZMZ28、ZMZ30、ZMZ33、ZMZ39和ZMZ46的特异性引物对的核苷酸序列如SEQ ID No.1~40所示。

2. 一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法,其特征在於,包括以下步骤:以待测样本的基因组DNA为模板,利用权利要求1所述应用中的特异性引物进行PCR扩增,利用PCR扩增产物判断杂交子代真实性,当同一个SSR位点的两个等位基因,同时遗传了父母本各一个等位基因,则为两亲本杂交子代。

3. 根据权利要求2所述方法,其特征在於,所述基因组DNA提取自新鲜叶片。

4. 根据权利要求2所述方法,其特征在於,所述特异性引物包括WJR003和WJR279, WJR003的引物对核苷酸序列如SEQ ID No.1~2所示, WJR279的引物对核苷酸序列如SEQ ID No.17~18所示。

5. 根据权利要求2所述方法,其特征在於,所述PCR扩增的反应体系以20 μ L计,包括:2 \times Taqmastermix 10 μ L,模板DNA1.0 μ L,F-primer 0.3 μ L,R-primer 0.3 μ L和余量的ddH₂O。

6. 根据权利要求2或5所述方法,其特征在於,所述PCR扩增的反应程序,包括:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,95 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共20个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

7. 根据权利要求2所述方法,其特征在於,在所述PCR扩增后,还包括将PCR扩增产物进行毛细管电泳检测,并利用分析软件Genemarker 2.2.0对得到的原始数据进行基因型分析,当存在AA \times BB、AB \times CD、AB \times CC、AA \times BC型标记时,可判断是否为两亲本的杂交子代。

8. 根据权利要求2或4所述方法,其特征在於,当利用WJR279进行PCR扩增时,PCR扩增产物同时存在218bp和226bp、218bp和234bp、222bp和226bp、222bp和234bp其中的一组条带时,表示所述待测样本为核桃和河北核桃种间杂交子代。

一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物遗传育种技术领域,具体涉及一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法。

背景技术

[0002] 核桃(*J.regia* L.)属核桃科核桃属多年生落叶乔木,是我国重要的生态经济林树种之一。我国目前培育的核桃品种大多都是在核桃种内通过选种或杂交培育出来的,其抗寒性不高,在我国北方核桃产区生产中屡屡遭受霜冻及冬季绝对低温危害。河北核桃(*J.hopeiensis* Hu)为核桃与核桃楸的天然杂交种,食用价值不高,但核桃楸是核桃属中最抗寒的一个种,河北核桃作为核桃与核桃楸的杂交种,蕴涵着许多优良基因,是抗寒、抗病核桃选育的优良亲本。通过核桃与河北核桃种间杂交,培育抗寒性强、坚果品质优的核桃新品种,是解决我国北方核桃栽培区核桃幼树需防寒,进一步扩大核桃栽培区域的主要途径。

[0003] 核桃与河北核桃种间杂交子代早期物种特征性状不明显,通过传统形态学方法,以杂种苗定植后从叶片、花、果实等较为稳定的性状变异中,鉴别杂交子代的真实性周期较长,通常需要5-8年,栽植杂交子代需要大面积的土地资源,育种成本较高,因此核桃与河北核桃种间杂交子代真实性的早期鉴定较为重要和迫切。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了特异性引物在鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代中的应用,所述特异性引物包括WJR003、WJR076、WJR078、WJR089、WJR150、WJR163、WJR191、WJR258、WJR279、WJR281、ZMZ3、ZMZ5、ZMZ6、ZMZ14、ZMZ27、ZMZ28、ZMZ30、ZMZ33、ZMZ39和ZMZ46中的一个或多个的组合;

[0007] 所述WJR003、WJR076、WJR078、WJR089、WJR150、WJR163、WJR191、WJR258、WJR279、WJR281、ZMZ3、ZMZ5、ZMZ6、ZMZ14、ZMZ27、ZMZ28、ZMZ30、ZMZ33、ZMZ39和ZMZ46的特异性引物对的核苷酸序列如SEQ ID No.1~40所示。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法,包括以下步骤:以待测样本的基因组DNA为模板,利用上述应用中的特异性引物进行PCR扩增,利用PCR扩增产物判断杂交子代真实性,当同一个SSR位点的两个等位基因,同时遗传了父母本各一个等位基因,则为两亲本杂交子代。

[0009] 优选的是,所述基因组DNA提取自新鲜叶片。

[0010] 优选的是,所述特异性引物包括WJR003和WJR279,WJR003的引物对核苷酸序列如SEQ ID No.1~2所示,WJR279的引物对核苷酸序列如SEQ ID No.17~18所示。

[0011] 优选的是,所述PCR扩增的反应体系以20 μ L计,包括:2 \times Taqmastermix10 μ L,模板

DNA1.0 μ L,F-primer 0.3 μ L,R-primer 0.3 μ L和余量的ddH₂O。

[0012] 优选的是,所述PCR扩增的反应程序,包括:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,95 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共20个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0013] 优选的是,在所述PCR扩增后,还包括将PCR扩增产物进行毛细管电泳检测,并利用分析软件Genemarker 2.2.0对得到的原始数据进行基因型分析,当存在AA \times BB、AB \times CD、AB \times CC、AA \times BC型标记时,可判断是否为两亲本的杂交子代。

[0014] 优选的是,当利用WJR279进行PCR扩增时,PCR扩增产物同时存在218bp和226bp、218bp和234bp、222bp和226bp、222bp和234bp其中的一组条带时,表示所述待测样本为核桃和河北核桃种间杂交子代。

[0015] 与现有技术相比,本发明提供了特异性引物在鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代中的应用,以及一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法具备以下有益效果:

[0016] 本发明操作简单、重复性好、稳定性高、不受外界环境影响,本发明有效提高核桃品种间杂交后代真实性的判别、提高杂种后代的早期选择效率、缩短育种周期和提高育种效率。

附图说明

[0017] 图1为WJR279在‘辽宁7号’上的扩增结果;

[0018] 图2为WJR279在‘艺核1号’上的扩增结果;

[0019] 图3为WJR279在部分杂交子代上的扩增结果。

具体实施方式

[0020] 为实现上述技术目的,本发明提供如下技术方案:

[0021] 本发明提供了特异性引物在鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代中的应用,所述特异性引物包括WJR003、WJR076、WJR078、WJR089、WJR150、WJR163、WJR191、WJR258、WJR279、WJR281、ZMZ3、ZMZ5、ZMZ6、ZMZ14、ZMZ27、ZMZ28、ZMZ30、ZMZ33、ZMZ39和ZMZ46中的一个或多个的组合;

[0022] 所述WJR003、WJR076、WJR078、WJR089、WJR150、WJR163、WJR191、WJR258、WJR279、WJR281、ZMZ3、ZMZ5、ZMZ6、ZMZ14、ZMZ27、ZMZ28、ZMZ30、ZMZ33、ZMZ39和ZMZ46的特异性引物对的核苷酸序列如SEQ ID No.1~40所示。

[0023] 本发明所述SSR引物均为SSR引物,其引物对信息如表1所示。利用本发明所述SSR引物可特异性鉴定待测样本是否为核桃和河北核桃种间杂交子代。

[0024] 表1 SSR引物信息

[0025]

引物编号	序列	SEQ ID NO	重复单元数
WJR003-F	AAGCGAGAATCAGAGGAGGA	1	(AT) _n
WJR003-R	ATTGCCCTGATAGCCATTTG	2	
WJR076-F	CATTTGGATCGGACCATCTT	3	(AT) _n

[0026]

WJR076-R	AATCATGTTTCCAGTGCGAAG	4	
WJR078-F	CCACATCCGGAAGTAGTCCT	5	(ATT) _n
WJR078-R	GAAGAGGGCGGAAGAATCTC	6	
WJR089-F	CCCTGGGATGTGTGATCCTA	7	(AG) _n
WJR089-R	AGATGCAGCTCCGATCTGTT	8	
WJR150-F	GATCCACATAACCAACTTGCC	9	(TA) _n
WJR150-R	ATGCCACCTCATCTTCAAGC	10	
WJR163-F	GCCGCTGCTATTTACTCC	11	(AAG) _n
WJR163-R	TCCTTTGTTGGCATGATTGA	12	
WJR-191-F	GGTGTTCGTGAATTAGGCGT	13	(GA) _n
WJR191-R	AAAGTCGTCGCCTTCTTGAG	14	
WJR258-F	TGCGAAACATTATGGGAATTT	15	(AT) _n
WJR258-R	TCTCCGTCTATTTGCACGAA	16	
WJR279-F	TTCATTACGTGGGGAAAAGC	17	(GA) _n
WJR279-R	TCTTGGCTCCCATTATCTGC	18	
WJR281-F	TTCCATGGCTCTCTACCACA	19	(TC) _n
WJR281-R	ATGGAGCTGGTTCCTGACAC	20	
ZMZ3-F	GAGTATGTCAGTTTCAGGGCA	21	(AGA) ₇

[0027]

ZMZ3-R	AGTAAAATAGGTACAGGGTCG	22	
ZMZ5-F	GGCTTCCTTCCTTCTAT	23	(AACGCC) ₄
ZMZ5-R	GCTGCTTCTGCTTGTCTT	24	
ZMZ6-F	TTCTTCGTCCATAACCACC	25	(TC) ₂₂
ZMZ6-R	ACCCATTAGCGACCTTTA	26	
ZMZ14-F	AACACAAGGAAAGCCGAATG	27	(CAGCAC) ₄
ZMZ14-R	CAGGACGCCCAAGAAATACA	28	
ZMZ27-F	GGAAGGATGAGTGGGTGA	29	(GA) ₁₃
ZMZ27-R	TGAGAAGGTCGGAATTGG	30	
ZMZ28-F	CGATTGAAGAGTGCGAGAGAC	31	(CCT) ₇
ZMZ28-R	GGGTGCTTTGCGAGATTATAG	32	
ZMZ30-F	AAATCCCAAACCCCGAA	33	(CCT) ₇
ZMZ30-R	AGGCACCAACCCAGACC	34	
ZMZ33-F	AATTCACCTCTCCGTCTCCC	35	(TC) ₁₀
ZMZ33-R	AAGTCTTCCTTCAGTGCCCC	36	
ZMZ39-F	GGAGTGAAGACGACGACAGA	37	(AT) ₉
ZMZ39-R	AAAACAAACCACACGCAGAT	38	
ZMZ46-F	AACAAACCACACGCAGATGG	39	(AT) ₉

[0028]	ZMZ46-R	GAGTGAAGACGGCGACAGAT	40	
--------	---------	----------------------	----	--

[0029] 本发明还提供了一种鉴定核桃和河北核桃种间杂交子代的方法,包括以下步骤:以待测样本的基因组DNA为模板,利用上述应用中的特异性引物进行PCR扩增,利用PCR扩增产物判断杂交子代真实性,当同一个SSR位点的两个等位基因,同时遗传了父母本各一个等位基因,则为两亲本杂交子代。

[0030] 本发明所述基因组DNA优选提取自新鲜叶片。本发明对所述基因组DNA的提取方法并没有特殊限定,优选利用试剂盒法,实施例中以PlantZol试剂盒法提取,但不能将该方法认定为本发明的全部保护范围,还可以利用其他的方法,如CTAB法等。

[0031] 本发明利用表1所示的引物进行PCR扩增,所述PCR扩增的反应体系以20 μ L计,优选包括:2 \times Taqmastermix 10 μ L,模板DNA1.0 μ L,F-primer 0.3 μ L,R-primer 0.3 μ L和余量的ddH₂O。本发明所述PCR扩增的反应程序,优选包括:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,95 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共20个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0032] 本发明利用PCR扩增产物判断杂交子代真实性,优选包括毛细管电泳法,如利用WJR279进行PCR扩增时,PCR扩增产物同时存在218bp和226bp、218bp和234bp、222bp和226bp、222bp和234bp其中的一组条带时,表示所述待测样本为核桃和河北核桃种间杂交子代,当只存在母本特征条带或存在其他父本特征条带时,表示所述待测样本为自交子代或假杂交子代,不属于核桃和河北核桃种间杂交子代。

[0033] 本发明还可以利用基因型判断杂交子代真实性,具体的包括在所述PCR扩增后,将PCR扩增产物进行毛细管电泳检测,并利用分析软件Genemarker2.2.0对得到的原始数据进行基因型分析,当存在AA \times BB、AB \times CD、AB \times CC、AA \times BC型标记时,可判断是否为两亲本的杂交子代。而AA \times AB、AB \times BB、AB \times BC、AC \times BC型标记,因双亲间存在1个相同等位基因位点,不能完全鉴定是否为杂交子代,需要进一步验证。本发明对所述毛细管电泳检测的方法并没有特殊限定。

[0034] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0035] 实施例1

[0036] 1、实验材料

[0037] 试验样品采自与辽宁省大连市金普新区炮台街道松木岛村辽宁省经济林研究所科研示范基地。采集用于杂交亲本‘辽宁7号’(核桃)和‘艺核1号’(河北核桃)的新发叶片,带回实验室,-20 $^{\circ}$ C保存备用,每个品种5次重复。

[0038] 2、基因组DNA的提取

[0039] 采用PlantZol试剂盒法提取。取新鲜叶片100mg,加入液氮充分研磨后,置于一干净离心管中。加入400 μ LPlantZol,振荡均匀,使样品完全悬浮。加入7.5 μ L RNaseA到上述裂解液中,充分混匀。55 $^{\circ}$ C孵育15min。加入等体积酚-氯仿,振荡混匀,12000 \times g离心5min。小心吸取上层水相于干净的离心管中,加入等体积异丙醇,充分颠倒混匀。12000 \times g离心5min,去上清。加入500 μ L70%的乙醇,涡旋震荡5s,12000 \times g离心5min,去上清。再次离心1-

2min,吸净残留液体。晾干DNA沉淀,加入50-200 μ L TE,65 $^{\circ}$ C孵育10min-1h溶解DNA,期间轻弹数次助落。

[0040] 3、PCR扩增

[0041] PCR反应体系(20 μ L):2 \times Taqmastermix 10 μ L,模板DNA1.0 μ L,F-primer 0.3 μ L,R-primer 0.3 μ L,ddH₂O 8.4 μ L。正向引物上进行荧光标记,PCR反应程序程序:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,95 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共20个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。扩增完成后置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。实验所用引物信息如表1。

[0042] 4、毛细管电泳检测

[0043] 取PCR产物0.3 μ L、分子量内标0.5 μ L和去离子甲酰胺9.5 μ L混合加入PCR板,95 $^{\circ}$ C变性5min,4 $^{\circ}$ C冷却后离心,1 \times Buffer缓冲液上机检测。利用分析软件Genemarker 2.2.0对得到的原始数据进行分析,按位点导出峰图、EXCEL位点信息表。

[0044] 5、不同引物对基因DNA扩增效果

[0045] 20对引物在‘辽宁7号’和‘艺核1号’样品中均有扩增结果,20对引物在亲本中的基因型见表2,表2中NN表示没有条带。其中,AA \times BB、AB \times CD、AB \times CC、AA \times BC型标记,理论上可直接鉴定是否为杂交子代,而AA \times AB、AB \times BB、AB \times BC、AC \times BC型标记,因双亲间存在1个相同等位基因位点,不能完全鉴定是否为杂交子代,需要进一步验证。

[0046] 表2 20对引物在亲本中的基因型

引物	基因型		引物	基因型	
	辽宁7号	艺核1号		辽宁7号	艺核1号
WJR003	BB	AA	ZMZ3	AB	BB
WJR076	BB	AA	ZMZ5	AA	BB
WJR078	AD	BC	ZMZ6	BC	AC
WJR089	AB	AB	ZMZ14	BC	AA
WJR150	AB	AA	ZMZ27	AA	BB
WJR163	BC	AB	ZMZ28	AA	AA
WJR191	BC	AA	ZMZ30	BC	AB
WJR258	AA	NN	ZMZ33	AB	AB
WJR279	AB	CD	ZMZ39	AB	CD
WJR281	AA	AA	ZMZ46	AA	BC

[0047]

[0048] 实施例2

[0049] 1、实验材料

[0050] 试验样品采自与辽宁省大连市金普新区炮台街道松木岛村辽宁省经济林研究所科研示范基地。采集‘辽宁7号’和‘艺核1号’的杂交子代60株，选择WJR003和WJR279，2对引物对杂交子代的真实性进行重复鉴定。采集杂交子代新发叶片，带回实验室，-20℃保存备用。

[0051] 2、基因组DNA的提取

[0052] 采用PlantZol试剂盒法提取。取新鲜叶片100mg，加入液氮充分研磨后，置于一干净离心管中。加入400μL PlantZol，振荡均匀，使样品完全悬浮。加入7.5μL RNaseA到上述裂解液中，充分混匀。55℃孵育15min。加入等体积酚-氯仿，振荡混匀，12000×g离心5min。小心吸取上层水相于干净的离心管中，加入等体积异丙醇，充分颠倒混匀。12000×g离心5min，去上清。加入500μL 70%的乙醇，涡旋震荡5s，12000×g离心5min，去上清。再次离心1-2min，吸净残留液体。晾干DNA沉淀，加入50-200μL TE，65℃孵育10min-1h溶解DNA，期间轻弹数次助落。

[0053] 3、PCR扩增

[0054] PCR反应体系(20μL)：2×Taqmastermix 10μL，模板DNA1.0μL，F-primer 0.3μL，R-

primer 0.3 μ L, ddH₂O 8.4 μ L。正向引物上进行荧光标记, PCR反应程序程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增完成后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

[0055] 4、毛细管电泳检测

[0056] 取 PCR 产物 0.3 μ L、分子量内标 0.5 μ L 和去离子甲酰胺 9.5 μ L 混合加入 PCR 板, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 4 $^{\circ}$ C 冷却后离心, 1 \times Buffer 缓冲液上机检测。利用分析软件 Genemarker 2.2.0 对得到的原始数据进行分析, 按位点导出峰图、EXCEL 位点信息表。

[0057] 5、杂交子代真实性鉴定

[0058] 采用引物 WJR003 和 WJR279 对 ‘辽宁 7 号’ 和 ‘艺核 1 号’ 共 60 株杂交子代进行鉴定, 其中 WJR279 在 ‘辽宁 7 号’ 上的扩增结果如图 1 所示; WJR279 在 ‘艺核 1 号’ 上的扩增结果如图 2 所示; WJR279 在部分杂交子代上的扩增结果如图 3 所示, 结果显示 18 个单株同时遗传了父母本各一个等位基因, 鉴定为真实杂交子代, 42 个单株指遗传了母本一个等位基因或遗传的两个等位基因一个遗传自母本, 另一个不是遗传自父本, 鉴定为假杂交子代。

[0059] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

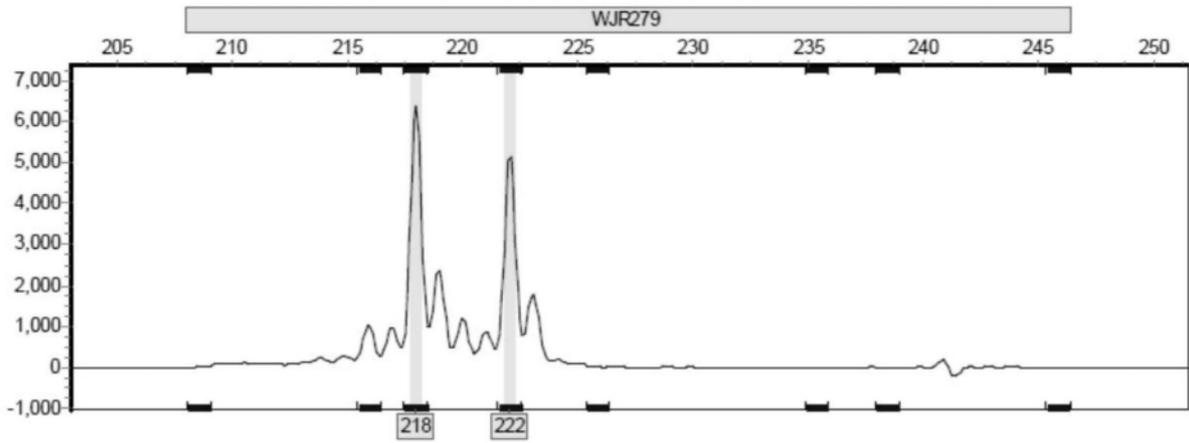


图1

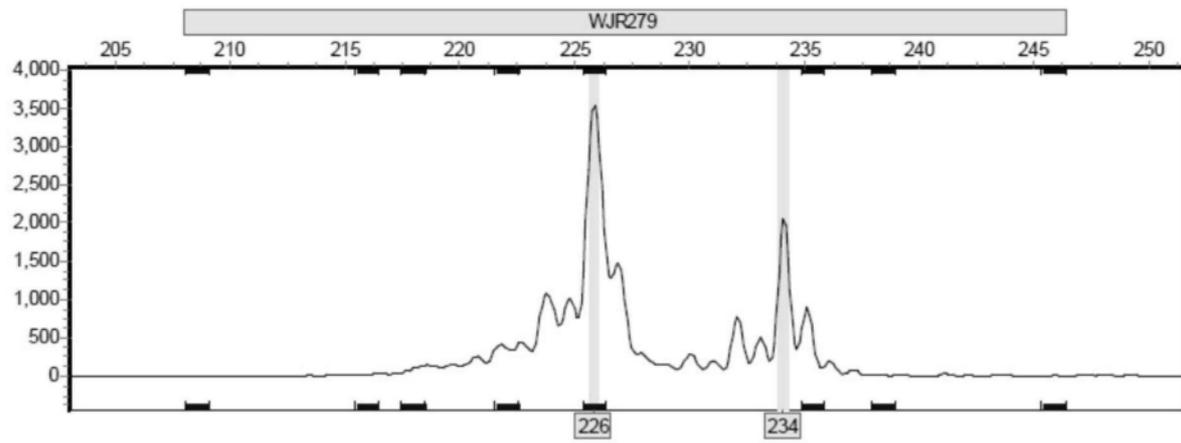


图2

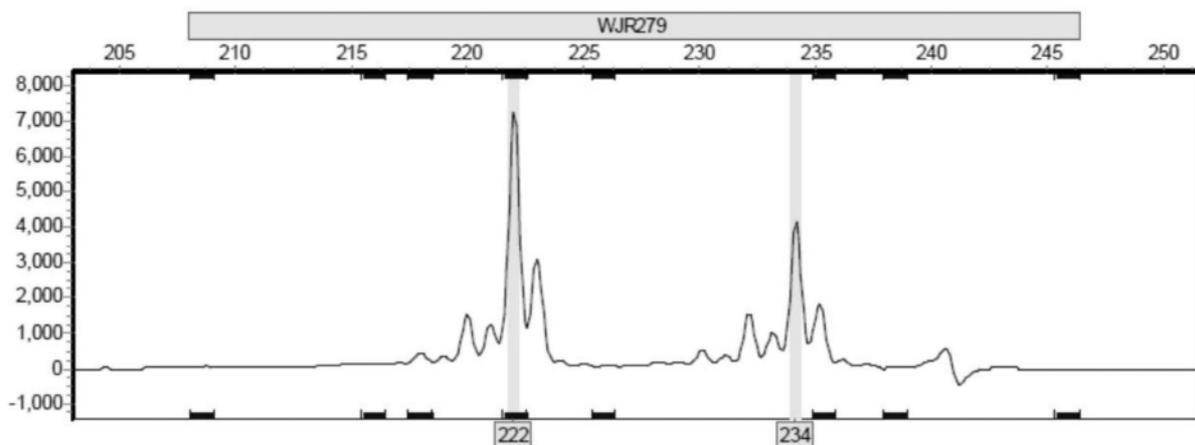


图3