



(21) 申请号 202010353339.5

CN 109593875 A, 2019.04.09

(22) 申请日 2020.04.29

CN 103160599 A, 2013.06.19

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111394502 A

CA 2690561 A1, 2008.11.13

(43) 申请公布日 2020.07.10

赵丽梅等. RN型大豆细胞质雄性不育系统研究及应用进展概述.《内蒙古民族大学学报(自然科学版)》. 2019, (第02期),

(73) 专利权人 吉林省农业科学院  
地址 130033 吉林省长春市净月高新开发区生态大街1363号

张井勇. 大豆RN不育胞质不育与恢复类型的研究.《大豆科学》. 2010, 第29卷(第4期),

(72) 发明人 张春宝 林春晶 赵国龙 张井勇  
闫昊 王鹏年 丁孝羊 赵丽梅  
彭宝 张伟

李永宽等. 大豆RN型细胞质雄性不育育性恢复抑制基因Rf-I的遗传分析与定位.《农业生物技术学报》. 2020, (第05期),

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司 22100  
专利代理师 陈宏伟

贾顺耕. 大豆细胞质雄性不育育性恢复基因Rf3 的定位.《植物遗传资源学报》. 2021, 第22卷(第5期),

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/6895 (2018.01)  
C12Q 1/686 (2018.01)

Pallavi Sinha. Association of nad7a Gene with Cytoplasmic.《THE PLANT GENOME》. 2015, 第8卷(第2期),

郭凤兰. 大豆细胞质雄性不育恢复基因.《植物遗传资源学报》. 2022, 第23卷(第2期),

(56) 对比文件  
KR 20170008711 A, 2017.01.24  
CN 104004853 A, 2014.08.27

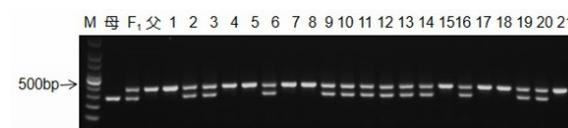
审查员 陈丹

权利要求书1页 说明书7页  
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称  
鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法

的途径。

(57) 摘要  
本发明提供一种鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法;该InDel分子标记用于检测是否含有恢复基因Rf-rn的恢复系;也可用于大豆RN型细胞质雄性不育含Rf-rn基因的恢复基因系的分子标记辅助选育。该方法包括如下步骤,提取大豆组织基因组DNA;用InDel标记InDel-16-111对大豆基因组进行聚合酶链式反应扩增;扩增后的PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,通过对PCR产物的特定长度和数量进行观察,从而确定大豆材料是否含有恢复基因Rf-rn及其基因型;为鉴定大豆CMS种质资源中的恢复系及含有Rf-rn基因的新恢复系的辅助选育提供方便快捷



1. 一种InDel-16-111分子标记鉴定大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因的方法,其特征在于其引物序列为:

上游引物序列:GCATCAAATTCAGTTAGCAAGA,

下游引物序列:TTCACCAAACCCCAAGGA;

具体包括以下步骤:

(1) 提取大豆组织基因组DNA,此DNA作为PCR扩增模板;

(2) 用InDel-16-111分子标记的引物序列对大豆基因组DNA进行检测,进行PCR扩增,体系为:6 $\mu$ L的2 $\times$ Es Taq Master mix,将上述上游引物、下游引物各加入0.5 $\mu$ L,1 $\mu$ L大豆DNA,加入2 $\mu$ L的ddH<sub>2</sub>O;PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性4min;94 $^{\circ}$ C变性30s,54 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C30s,共30个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10min;用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,成像并记录条带数量和大小;

(3) 扩增后的PCR产物在含纯合显性恢复基因*Rf-rn Rf-rn*、含纯合隐性*rf-rn rf-rn*、含杂合恢复基因*Rf-rn rf-rn*的大豆基因型中长度和数量是不同的,PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,通过获得不同数量和长度大小的条带进行是否含有恢复基因大豆材料基因型的准确区分;

所述的InDel-16-111分子标记对应的PCR扩增产物,经琼脂糖凝胶电泳检测,含纯合显性恢复基因的*Rf-rn Rf-rn*的大豆基因型扩增片段长度为367bp;含纯合隐性恢复基因*rf-rn rf-rn*即不含恢复基因*Rf-rn*的大豆基因型扩增片段长度为268bp;含杂合恢复基因*Rf-rn rf-rn*的大豆基因型扩增片段有两条,分别为长度为367bp和268bp。

## 鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法,涉及鉴定大豆RN型细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility,CMS)恢复基因的插入缺失标记(insertion-deletion,InDel)鉴定方法,涉及大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*的InDel分子标记鉴定方法,用于检测育种材料是否为含有恢复基因*Rf-rn*的恢复系或含*Rf-rn*基因的育种材料,属于农作物分子标记检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 大豆细胞质雄性不育“三系”由不育系、保持系和恢复系组成,雄性不育细胞质的载体是不育系,RN型雄性不育细胞质不育系是吉林省农业科学院(孙寰等,1993)利用栽培大豆和野生大豆间杂交、回交育成的不育系材料,于1995年在世界上首先利用RN型雄性不育细胞质育成了大豆CMS“三系”,于2000年获得中国发明专利(“细胞质雄性不育大豆及生产大豆杂交种的方法”,专利号:ZL 97112173.7),采用此方法于2002年并育成并审定了世界上第一个大豆杂交种杂交豆1号(孙寰等,2003)并获得了农业部植物新品种保护(品种权号:CNA20090143.5),截至2019年利用RN型不育细胞质雄性不育系统已审定17个杂交大豆品种。育性的遗传信息表明,RN型雄性不育细胞质不育系统为单基因配子体不育(赵丽梅,2003),育性恢复受1对显性基因恢复基因控制。赵丽梅等首次利用SSR 标记,将恢复基因定位16号染色体的Satt547附近(赵丽梅,2007)。Wang 等(2010)进一步将恢复基因缩小至ScTT\_011 和Satt547 之间。之后,任良真(2012)、王鹏年(王鹏年,2016)均以RN 型材料为亲本将恢复基因均定位在16 号染色体上,定位区间在500 kb 左右。

[0003] 本发明涉及的InDel 标记,即插入/缺失(Insertion-Deletion)标记,它是指在同一物种或亲缘关系较近的物种的不同个体间同源序列的等位基因位点上插入或缺失一定的核苷酸片段的分子标记(杨洁等,2016; Jander et al., 2002)。碱基插入/缺失(InDel)在基因组中的分布密度仅次于SNP且易于基因型分型,成为分子标记开发的主要来源(洪晓如,2020)。InDel 标记由于其高稳定性和高准确性,目前已经逐渐应用到水稻、黄瓜、辣椒、小麦、甘蓝、白菜等作物中(洗俊龙等,2013; 郭广君等,2015; 吉康娜等,2019)。本发明提供了一种鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法,涉及鉴定大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因的插入缺失标记(InDel)鉴定方法,涉及大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*的InDel分子标记鉴定方法,用于检测育种材料是否为含有恢复基因*Rf-rn*的恢复系或含*Rf-rn*基因的育种材料。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法,实现了用于辅助鉴定大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*。

[0005] 本发明提供的一种鉴别大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*的InDel分子标记的方法,解决方案如下:

[0006] (1) 提取大豆种子或者叶片的基因组DNA; 选用大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-rn* 的 InDel 标记, InDel 标记名称代号为 InDel-16-111;

[0007] (2) 用 InDel 标记的 InDel-16-111 的大豆基因组DNA进行 PCR (Polymerase chain reaction) 扩增; 其中引物序列如下:

[0008] 上游引物序列 (5' → 3'): GCATCAAATTCAGTTAGCAAGA;

[0009] 下游引物序列 (5' → 3'): TTCACCAAACCCCAAGGA;

[0010] (3) 扩增后的 PCR 产物在含纯合显性恢复基因 (*Rf-rn Rf-rn*)、含杂合型恢复基因 (*Rf-rn rf-rn*)、含纯合隐性恢复基因 (*rf-rn rf-rn*) 即不含 *Rf-rn* 基因的大豆基因型中, 长度和条带数量是不同的。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 通过获得不同长度和数量的条带, 进行大豆材料是否含有恢复基因或含有恢复基因的基因型的准确区分;

[0011] (4) 对应的 PCR 扩增的片段大小等特征如下所述:

[0012] 其中 InDel 标记 InDel-16-111 的 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 含纯合显性恢复基因的 (*Rf-rn Rf-rn*) 大豆基因型扩增片段长度为 367bp; 含纯合隐性恢复基因 (*rf-rn rf-rn*) 即不含恢复基因 *Rf-rn* 的大豆基因型扩增片段长度为 268bp; 含杂合型恢复基因 (*Rf-rn rf-rn*) 的大豆基因型扩增片段有两条, 分别为长度为 367bp 和 268bp。

[0013] 含纯合隐性恢复基因 (*rf-rnrf-rn*) 的大豆基因型扩增片段为一条, 长度 268bp, 碱基序列如: SEQ ID NO:1 所示:

[0014] 含纯合显性恢复基因的 (*Rf-rnRf-rn*) 的大豆基因型扩增片段为一条, 长度 367bp, 碱基序列如: SEQ ID NO:2 所示:

[0015] 含杂合型恢复基因 (*Rf-rnrf-rn*) 的大豆基因型扩增片段有两条, 长度分别为 367bp 和 268bp, 碱基序列如: SEQ ID NO:1 所示及如: SEQ ID NO:2 所示:

[0016] 本发明提供的 InDel 分子标记, 实现了含有大豆 RN 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-rn* 大豆品种、种质资源的快速鉴定; 做到了随时可以提取大豆种子或叶片 DNA 进行检测, 避免了传统方法需要进行田间种植, 在开花期与不育系测验种进行杂交, 在  $F_1$  代种子收获后在第二年进行种植, 在  $F_2$  植株开花期, 利用花粉染色法检测花粉育性, 判断是否为恢复系, 所耗费两个生长周期的弊端; 本发明还可用于导入 *Rf-rn* 基因的优异品种或种质资源后代的分子标记辅助选育, 缩短含 *Rf-rn* 新恢复系的育成时间, 加快大豆杂交品种的选育进度。本发明所提供的方法检测快速、耗时短, 从提取 DNA 到电泳检测, 0.5 个工作日内即可完成; 检测准确, 利用低浓度的琼脂糖凝胶电泳即可在紫外灯或者蓝光灯下观察鉴别; 检测所用的仪器和药品为常规的分子生物学实验室具备; 检测过程无复杂操作技术, 普通的实验室技术人员即可完成, 非常方便。

[0017] 本发明中的 InDel 标记稳定, PCR 产物在经过电泳检测后, 含纯合显性恢复基因的 (*Rf-rn Rf-rn*) 的大豆基因型扩增片段长度为 367bp; 含纯合隐性恢复基因 (*rf-rn rf-rn*) 即不含恢复基因 *Rf-rn* 的大豆基因型扩增片段长度为 268bp; 含杂合恢复基因 (*Rf-rn rf-rn*) 的大豆基因型扩增片段有两条, 分别为长度为 367bp 和 268bp。各基因型中的片段长度差异在 100bp 左右, 通过低浓度 1% 的琼脂糖电泳就可以明显区分。

[0018] 本发明的积极效果在于:

[0019] 利用 InDel 标记 InDel-16-111 来区别大豆材料中是否含有大豆 RN 型雄性不育恢复系是否含有恢复基因 *Rf-rn* 或含有 *Rf-rn* 基因的基因型, 将为鉴定大豆 CMS 种质资源中的恢

复系及含有*Rf-rn*基因的新恢复系的辅助选育提供方便快捷的途径。通过发明的InDel标记引物进行PCR扩增,可以通过琼脂糖凝胶电泳后观察扩增的产物片段大小及数量鉴别所检测大豆材料是否为含有恢复基因*Rf-rn*的恢复系或含有*Rf-rn*基因的基因型的育种材料,检测快速,条带清晰,操作简单,重复性好,可靠性强。

#### 附图说明

[0020] 图1、利用InDel-16-111标记检测JLCMS9A×吉恢500的F<sub>2</sub>分离群体的部分单株DNA的琼脂糖凝胶电泳检测图(M:100bp ladder,父为吉恢500,母为JLCMS9A,F<sub>1</sub>为杂交种,1-21为不同单株的PCR扩增产物);

[0021] 图2、本发明实施例的大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*与InDel分子标记InDel-16-111的连锁图,其标记与恢复基因*Rf-rn*之间的距离为0.6cM;

[0022] 图3、利用标记检测24份种质资源(见表1)单株DNA的琼脂糖凝胶电泳图(M:100bp ladder,1-24为不同单株的PCR扩增产物);

[0023] 图4、利用标记检测HH43×吉恢500的F<sub>2</sub>分离群体的部分单株DNA的琼脂糖凝胶电泳检测图(M:100bp ladder,父为吉恢500,母为HH43,F<sub>1</sub>为杂交种,1-42为不同后代单株的PCR扩增产物)。

#### 具体实施方式

[0024] 通过以下实施例进一步举例描述本发明,并不以任何方式限制本发明,在不背离本发明的技术解决方案的前提下,对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

[0025] 实施例1

[0026] 一、试验材料

[0027] 以下是一种大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*的InDel分子标记发明方法,其具体实施步骤如下:

[0028] 大豆RN型细胞质雄性不育恢复基因*Rf-rn*的F<sub>2</sub>分离群体:以配子体不育系JLCMS9A为母本,恢复系吉恢500为父本杂交获得F<sub>1</sub>,再由F<sub>1</sub>自交种子繁殖,获得161株F<sub>2</sub>分离单株;开花期经花粉育性鉴定,在F<sub>2</sub>分离群体中共有85株可育表型单株,76株杂合半育表型单株这两种表型符合1:1的分离比( $\chi^2=0.625, P=0.429$ ),*Rf-rn*基因符合以配子体不育细胞质为背景的单基因显性遗传模式;

[0029] 二、InDel分子标记开发

[0030] (1)根据F<sub>2</sub>分离群体中20个可育单株和20个半育单株的花苞混池转录组测序和差异分析结果,得到*Rf-rn*基因目标区段;在大豆基因组网站上(<http://www.soyomics.com>)下载上述区间的核苷酸序列,其序列位于16号染色体上;然后对亲本测序序列和序列(Williams82)进行比对分析,和父本含恢复基因*Rf-rn*的恢复系相比,发现母本和参考基因组序列都有99个碱基序列的缺失,利用Primer Premier 5.0软件设计InDel分子标记,命名为InDel-16-111,并合成引物,其序列如下:

[0031] 上游引物序列(5'→3'):GCATCAAATTCAGTTAGCAAGA;

[0032] 下游引物序列(5'→3'):TTCACCAAACCCCAAGGA;

## [0033] 三、分子标记验证

[0034] (1) 提取大豆样本基因组DNA: 以大豆叶片或种子为材料, 利用植物基因组DNA提取试剂盒提取对应叶片DNA, 详细步骤如下:

[0035] a. 取植物组织约100 mg, 加入液氮充分研磨;

[0036] b. 将研磨后的粉末收集到离心管(自备)中, 加入400  $\mu$ l Buffer LP1和6 $\mu$ l RNase A溶液(10mg/ml), 旋涡震荡1min, 室温放置10min, 使其充分裂解;

[0037] c. 加入130  $\mu$ l Buffer LP2, 混匀, 旋涡震荡1min;

[0038] d. 12000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心5min, 将上清转入一新的离心管中;

[0039] e. 加入600  $\mu$ l Buffer LP3, 充分混匀(使用前检查是否已加入无水乙醇);

[0040] f. 将步骤e中所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中; 12000 rpm离心1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;

[0041] g. 向吸附柱中加入500  $\mu$ l Buffer GW2(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm离心1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;

[0042] h. 可重复步骤g;

[0043] i. 12000 rpm离心2min, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温10min, 以彻底晾干;

[0044] j. 将吸附柱置于一个新的离心管(自备)中, 向吸附柱的中间部位悬空加入100 $\mu$ l Buffer GE, 室温放置5min, 12000 rpm离心1分钟, 收集DNA溶液,  $-20^{\circ}\text{C}$ ; 保存DNA;

[0045] (2) 分子标记的扩增和电泳检测

[0046] a. PCR体系:

	2 $\times$ Es Taq Master mix(Dye)	6 $\mu$ l	} 10 $\mu$ l 体系
	上游引物 (InDel16-111F)	0.5 $\mu$ l	
[0047]	下游引物 (InDel16-111R)	0.5 $\mu$ l	
	大豆 DNA	1 $\mu$ l	
	ddH <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l	

[0048] b. PCR反应程序

	94 $^{\circ}\text{C}$	4min	} 30cycle
	94 $^{\circ}\text{C}$	30s	
[0049]	54 $^{\circ}\text{C}$	30s	
	72 $^{\circ}\text{C}$	30s	
	72 $^{\circ}\text{C}$	10min	
	12 $^{\circ}\text{C}$	保存	

[0050] (3) 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用Super GelRed核酸凝胶染料染色, 成像, 观察, 记录;

[0051] (4) 结果分析

[0052] 通过对JLCMS9A $\times$ 吉恢500的F<sub>2</sub>分离群体的161个单株DNA进行PCR扩增, 其产物在

电泳中呈现2种带型(图1),即基因型为*Rf-rn Rf-rn*的恢复系吉恢500的纯合型,电泳片段一条,长度为367bp;基因型为*Rf-rn rf-rn*的杂种F<sub>1</sub>的杂合型带型,电泳片段两条,长度分别为367bp和268bp;以及对照不育系JLCMS9A的*rf-rn rf-rn*基因型,电泳片段一条,长度268bp。通过对F<sub>2</sub>分离群体的连锁分析,并用Joinmap 4.0软件作图,发现所筛选到的标记与雄性不育恢复基因紧密连锁,遗传距离仅有0.6 cM(图2);因此,通过紧密连锁标记的PCR扩增能准确区分恢复基因*Rf-rn*位点的不同基因型,达到含*Rf-rn*基因恢复系的InDel分子标记鉴定及新导入*Rf-rn*基因恢复系InDel分子标记辅助选育的目的。

[0053] 实施例2

[0054] 以下是利用InDel分子标记,进行含*Rf-rn*基因恢复系鉴定的方法。其具体实施步骤如下:

[0055] 一、引进品种和种质资源DNA提取

[0056] 以24份引进品种和种质资源种子为材料(详见表1),利用植物基因组DNA提取试剂盒提取对应种子的基因组DNA,详细步骤同实施例1(三)所述;

[0057] 表1 24份引进品种和资源情况

泳道编号	名称	泳道编号	名称	泳道编号	名称
1	合丰 34	9	选 3	17	合 95-1009
2	绥农 4	10	吉育 58	18	JP-S
3	绥农 8	11	黑河 43	19	吉农 402-5172
4	吉林 47	12	九 94-99	20	辽 82-5243
5	珍珠塔	13	东农 90581	21	公 96205-6
6	合丰 29	14	合 95-996	22	威廉姆斯 82
7	绥农 14	15	衣大 12938	23	公 96234-3
8	斯坦 3260	16	合 93-1003	24	绥 94-335

[0059] 二、大豆材料InDel分子标记鉴定

[0060] InDel标记为InDel-16-111。PCR体系为:总体系为10 $\mu$ L,包括5 $\mu$ L的2 $\times$ Es Taq Master mix,上游引物、下游引物各加入 0.5 $\mu$ l,1 $\mu$ L大豆DNA,加入3 $\mu$ L的ddH<sub>2</sub>O。

[0061] 其中引物序列如下:

[0062] 上游引物序列(5'  $\rightarrow$  3'):GCATCAAATTCAGTTAGCAAGA;

[0063] 下游引物序列(5'  $\rightarrow$  3'):TTCACCAAACCCCAAGGA;

[0064] PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性4min; 94 $^{\circ}$ C变性30s,54 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C复性30s,共30个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10min;用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,成像并记录条带大小;

[0065] 经琼脂糖凝胶电泳检测,含有*Rf-rnRf-rn*基因型的恢复系,电泳片段一条,长度为367bp;含纯合隐性恢复基因(*rf-rnrfrf-rn*)即不含*Rf-rn*恢复基因的大豆材料,电泳片段一条,长度268bp,碱基序列如:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2所示;因所选用材料为品种或稳定种质资源,不存在杂合基因型(*Rf-rn rf-rn*)电泳条带类型。

[0066] 三、含有*Rf-rn*基因材料的恢复功能验证

[0067] 通过InDel标记的鉴定,证实种质资源材料JP-S含有纯合显性*Rf-rn*基因(图3)。利

用RN型细胞质雄性不育系JLCMS9A为母本,以种质资源材料JP-S为父本,温室种植,开花期进行杂交,收获 $F_1$ 种子, $F_1$ 种子在温室种植,正常结实,成熟期可收获种子。证实JLCMS9A不育性状被种质资源材料JP-S恢复,JP-S为含有*Rf-rn*恢复基因的恢复系,今后可用于作为父本,与RN型细胞质雄性不育系进行杂交组配,用于大豆杂交种的创制。

#### [0068] 实施例3

[0069] 以下是利用Indel分子标记,进行含*Rf-rn*基因新恢复系分子标记辅助选育的方法。其具体实施步骤如下:

[0070] 一、含*Rf-rn*恢复基因 $F_2$ 分离后代种子的获得

[0071] 以不含恢复基因*Rf-rn*基因型的大豆品种黑河43(HH43)为母本,以含恢复基因*Rf-rn*的大豆RN型细胞质雄性不育恢复系吉恢500为父本,温室种植,开花期进行杂交,收获 $F_1$ 种子。 $F_1$ 种子继续种植于温室,收获 $F_2$ 种子;

[0072] 二、 $F_2$ 种子DNA提取

[0073] 以 $F_2$ 种子为材料,种脐背面钻孔磨粉,利用植物基因组DNA提取试剂盒提取DNA,详细步骤详细步骤同实施例1(三)所述;

[0074] 三、 $F_2$ 种子Indel分子标记的扩增和电泳

[0075] Indel标记为InDel-16-111。PCR体系为:总体系为10 $\mu$ L,包括5 $\mu$ L的2 $\times$ Es Taq Master mix,上游引物、下游引物各加入 0.5 $\mu$ l,1 $\mu$ L大豆DNA,加入3 $\mu$ L的ddH<sub>2</sub>O;

[0076] 其中引物序列如下:

[0077] 上游引物序列(5'  $\rightarrow$  3'):GCATCAAATTCAGTTAGCAAGA;

[0078] 下游引物序列(5'  $\rightarrow$  3'):TTCACCAAACCCCAAGGA;

[0079] PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性4min; 94 $^{\circ}$ C变性30s,54 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C复性30s,共30个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10min;用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,成像并记录条带大小;

[0080] 经琼脂糖凝胶电泳检测,含纯合显性恢复基因的(*Rf-rnRf-rn*)的大豆基因型扩增片段长度为367bp;含纯合隐性恢复基因(*rf-rnrfrf-rn*)即不含恢复基因*Rf-rn*的大豆基因型扩增片段长度为268bp;含杂合型恢复基因(*Rf-rnrfrf-rn*)的大豆基因型扩增片段有两条,分别为长度为367bp和268bp,碱基序列如:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2所示。

[0081] 四、回交转育及*Rf-rn*基因逐代检测

[0082] 以通过Indel分子标记InDel-16-111检测含有纯合显性恢复基因的(*Rf-rn Rf-rn*)的 $F_2$ 种子(图4)为母本,连续利用HH43做父本进行回交,每一个回交子代 $F_1$ 种子按实施例3中(2)~(3)方法检测是否含有纯合显性*Rf-rn*基因,连续回交五代以上,获得HH43为遗传背景且含有纯合显性恢复基因(*Rf-rn Rf-rn*)的稳定遗传材料,命名为HH43R。

[0083] 五、含有恢复基因*Rf-rn*的新恢复系的育成

[0084] 利用RN型细胞质雄性不育系JLCMS9A为母本,以HH43R为父本,温室种植,开花期进行杂交,收获 $F_1$ 种子, $F_1$ 种子在温室种植,正常结实,成熟期可收获种子。证实JLCMS9A不育性状被HH43R恢复,HH43R为含有纯合显性恢复基因*Rf-rn*的新恢复系,今后可用于作为父本,与RN型细胞质雄性不育系进行杂交组合配制,用于大豆杂交种的选育。

[0085] 本发明通过筛选恢复系材料及回交转育,育成一个新恢复系“吉恢500”(品种权申请号:20181608.0),其含有的恢复基因与上述已定位的恢复基因,在定位区间和恢复能力上均不相同,命名为*Rf-rn*。通过用RN型不育系JLCMS9A与吉恢500杂交,构建 $F_2$ 分离群体,进

行*Rf-rn*基因的分子标记定位,根据父母本基因组重测序结果开发*Rf-rn*基因紧密连锁的InDel分子标记,可以用来检测引进大豆品种或资源中,是否含有恢复基因*Rf-rn*。含有*Rf-rn*基因的材料可以用于作为父本的恢复系,与母本RN型不育系进行杂交,生产F<sub>1</sub>杂交种。也可用于以含有*Rf-rn*的恢复系为测交亲本与不含此恢复基因的优异品种或资源进行杂交,在回交转育含*Rf-rn*基因的新恢复系过程中,以InDel分子标记进行快速检测含*Rf-rn*基因后代材料,实现InDel分子标记辅助选育。基于以上,本发明创造了与大豆RN型雄性不育细胞质的恢复基因*Rf-rn*的紧密连锁的InDel分子标记。可以用来鉴定含有恢复基因*Rf-rn*的恢复系或含*Rf-rn*基因的育种材料。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 吉林省农业科学院
- [0003] <120> 鉴定大豆RN型CMS恢复基因的InDel标记及方法
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 268
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 大豆(大豆)
- [0010] <400> 1
- [0011] gcatcaaatt cagttagcaa gagtttattt taggtttgag aataatgtgt tctcattgat 60
- [0012] attttttttt caaaattaat atctctttcc taaaaaaagt gttagggata acgtgactga 120
- [0013] catataagaa attgatggag gtcatatgta gttcaactat tttgtgatta ttaaagttta 180
- [0014] aaataacagt ttttcttaga actttttctt caaatatata acttctcttg tttagggcaa 240
- [0015] atataacttc tccttggggt ttggtgaa 268
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 367
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> 大豆(大豆)
- [0020] <400> 2
- [0021] gcatcaaatt cagttagcaa gagtttattt taggtttgag aataatgtgt tctcattgat 60
- [0022] attttttttt caaaattaat atctctttcc taaaaaaagt gttagggata acgtgactga 120
- [0023] catataagaa aggtttgaga ataatgtgtt ctctattgata ttttttttc aaaattaata 180
- [0024] tctctttcct aaaaaaagtg ttagggataa agtgacttac atataagaaa ttgatggagg 240
- [0025] tcatatgtag ttcaactatt ttgtgattat taaagtttaa aataacagtt tttcttagaa 300
- [0026] ctttttcttc aaatatataa cttctcttgt ttagggcaaa tataacttct ccttgggggtt 360
- [0027] tgggtgaa 367
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 22
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 上游引物(大豆)
- [0032] <400> 3
- [0033] gcatcaaatt cagttagcaa ga 22
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 18
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 下游引物(大豆)
- [0038] <400> 4

[0039] ttcaccaaac cccaagga 18

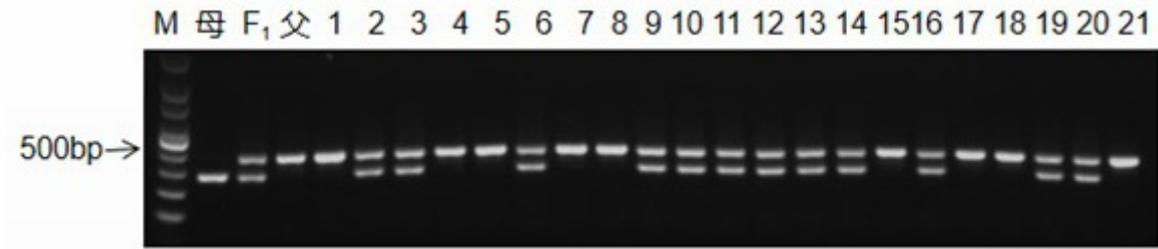


图1



图2



图3

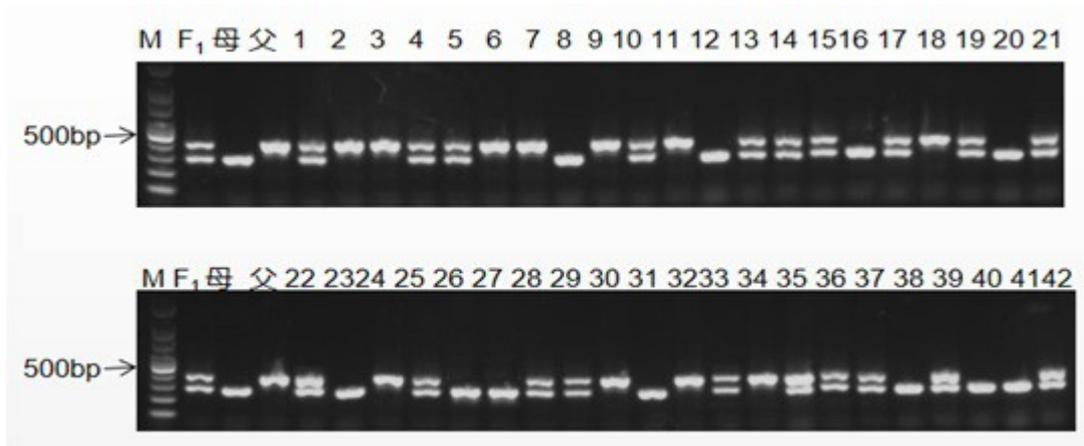


图4