



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108624711 A

(43)申请公布日 2018.10.09

(21)申请号 201810672028.8

(22)申请日 2018.06.26

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街
50号

(72)发明人 何漪 马鸿翔 张旭 姜朋 吴磊

(74)专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237
代理人 杨文晰

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

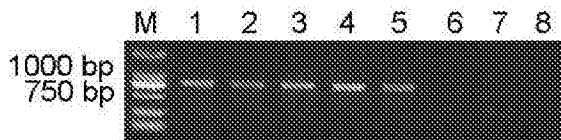
权利要求书1页 说明书3页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一对用于鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性的引物及应用

(57)摘要

本发明涉及一对用于鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性的引物及应用。该引物核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示;利用该引物对小麦基因组DNA进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后,若扩增产物中含有800 bp的条带,则说明该待测小麦品种含有宁麦9号相同的赤霉病抗性基因,具有赤霉病抗性,反之,则为易感小麦;利用该引物可以快速而直观获得小麦品种赤霉病抗性结果,适用于大规模育种筛查。



1. 一对用于鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性的引物,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

2. 如权利要求1所述引物在鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性中的应用。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,具体步骤如下:

分别以SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2为引物,以待测小麦基因组DNA为模板进行PCR扩增,并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,若

扩增产物中含有800 bp大小的条带,则判定待测小麦为含有宁麦9号抗赤霉病基因的小麦,否则为感病小麦。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述PCT扩增体系如下:

20-100ng的待测小麦基因组DNA,5 U/ μ L的 Taq酶0.25 μ L,10 μ mol/L的SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2各1 μ L,10 mmol/L的 dNTP 0.5 μ L,10 \times PCR 的Mg²⁺ Plus缓冲液2.5 μ L,以无菌蒸馏水补足至25 μ L;

PCR扩增的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,随后94 $^{\circ}$ C变性30 sec, 58 $^{\circ}$ C条件下退火30 sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸40 sec,进行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min; 在4 $^{\circ}$ C下保存。

一对用于鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性的引物及应用

技术领域

[0001] 本申请涉及小麦育种领域,特别是一对用于筛选宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗源的引物序列及其应用。

背景技术

[0002] 小麦赤霉病(Fusarium head blight,FHB)是由禾谷镰刀菌为主要致病菌引起的一种世界范围广泛流传的重大真菌病害,也是危害我国小麦产业发展的主要病害之一。我国是全球小麦赤霉病受害面积最大的国家之一,传统发病区域为长江中下游冬麦区和东北春麦区。近年来,由于气候变暖和耕作制度的改变,我国小麦赤霉病发病范围呈不断扩大趋势,目前常发区已扩展到黄淮南部麦区,黄淮北部、西南、西北麦区病害发生也明显加重。

[0003] 小麦赤霉病会导致产量下降,一般发生年份可以造成10%-30%的减产,大流行时损失更大,甚至绝收。赤霉病不仅造成小麦产量降低,还会影响小麦的品质,更为严重的是致病菌侵染后产生的次生代谢产物威胁着人畜健康。因此,积极有效地防控小麦赤霉病对粮食安全和食品安全都具有十分重要意义。

[0004] 宁麦9号是江苏省农业科学院以扬麦6号为母本、日本小麦品种“西风”为父本杂交,采用集团选择法选育而成,因具有高产、稳产和广泛的适应性、优质弱筋专用品质及抗小麦黄花叶病、赤霉病等特点,已成为我国江苏省的主栽品种。宁麦9号也是我国小麦育种的重要亲本。以该品种为亲本育成了一批适于长江中下游麦区种植的小麦新品种,如宁麦13、宁麦14、宁麦18、生选4号、生选6号、扬麦18、扬辐麦4号、镇麦5号、镇麦8号等。宁麦9号作为新一代骨干亲本,对选育高产、优质、抗病小麦新品种具有重要的价值。通过选择特异性引物并将其应用于以宁麦9号及衍生品种为亲本的抗赤霉病分子标记辅助育种中,可以有效提高小麦杂交育种早世代赤霉病抗性选择的有效性,目前,针对宁麦9号及衍生品种赤霉病抗性检测的引物尚未见报道。

发明内容

[0005] 针对上述问题,为了快速鉴定9号及其衍生品种中赤霉病抗性,本发明提供一种用于筛选宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗源的引物序列及其应用。

[0006] 本发明的目的是这样实现的:一对用于鉴定宁麦9号及其衍生品种的抗赤霉病基因的引物对,其上游引物核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0007] 本发明同时还提供了上述核苷酸序列分别为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的引物对在鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性中的应用,即以待测小麦基因组DNA为模板进行PCR扩增反应,再对扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳分离检测,若扩增产物中含有800 bp左右大小的条带,则待测小麦有宁麦9号赤霉病抗性,否则待测小麦无赤霉病抗性。

[0008] 在上述的引物序列的应用中:

PCR扩增的反应体系(25 μ L)为:20-100ng的待测小麦基因组DNA,5 U/ μ L的 Taq酶0.25 μ L,10 μ mol/L的SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2各1 μ L,10 mmol/L的 dNTP 0.5 μ L,10 \times PCR的Mg²⁺ Plus缓冲液2.5 μ L,余量为无菌蒸馏水;

PCR扩增的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,随后94 $^{\circ}$ C变性30 sec, 58 $^{\circ}$ C条件下退火30 sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸40 sec,进行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min; 在4 $^{\circ}$ C下保存。

[0009] 在上述的引物序列的应用中:

对扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳分离检测的是指:将扩增产物在质量分数为0.8%-2%的琼脂糖凝胶(含终浓度为0.5 μ g/mL的EB)中电泳分离,电压130 V,电泳时间20 min,判断扩增产物中是否含有800 bp的条带。

[0010] 本申请中,宁麦9号衍生品种是指:以宁麦9号为亲本育成的品种,优选宁麦13、宁麦14、宁麦18、生选4号、生选6号、镇麦5号、镇麦8号、扬麦18和扬辐麦4号。

[0011] 本申请中,小麦抗性评价标准参见《小麦品种赤霉病抗性鉴定规程》。

[0012] 本发明的优点在于:通过SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2对小麦基因组DNA进行PCR扩增,对扩增产物通过琼脂糖电泳进行标记的检测,不需要利用测序仪或者非变性凝胶电泳来进行检测,操作简单;以能否扩增出800 bp大小条带来判定小麦材料是否含有宁麦9号赤霉病抗性基因,非常直观,不需要通过测序或者比较条带的大小。

附图说明

[0013] 图1:利用琼脂糖电泳检测引物SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2对赤霉病抗感品种的扩增结果。

[0014] M:分子量标准DL2000;1-8泳道依次为小麦品种宁麦9号、宁麦13号、宁麦14号、生选6号、扬辐麦 4 号、安农8455、Clark、阿夫。

具体实施方式

[0015] 实施例中涉及的小麦品种、病原菌(禾谷镰刀菌FG0609)均来自江苏省农业科学院粮食作物研究所小麦研究室保藏;

DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,型号DP305。

[0016] 实施例1 涉及特异性引物

本实施例利用宁麦9号和扬麦158杂交后代重组自交系(RIL)群体对赤霉病抗性进行了QTL定位。重组自交系材料在2015-2016、2016-2017连续两个生长季种植于江苏省农科院院内试验基地,并参照《小麦品种赤霉病抗性鉴定规程》对重组自交系材料进行了赤霉病抗性鉴定。利用植物基因组DNA提取试剂盒(天根DP305)提取DNA,利用Illumina 90 k基因芯片对试验材料进行基因组扫描(具体信息参见:Wang等,2014,Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array),采用基于复合混合线性模型作图的IciMapping 4.1软件进行QTL定位分析,最终发现宁麦9号抗赤霉病主效QTL位于BS00098868_51和Tdurum_contig80344_144分子标记之间。针对上述分子标记区间位点进一步设计上下游引物分别如SEQ ID NO.1所示和SEQ ID NO.2所示,并委托南京擎科生物科技有限公司合成:

上游引物SEQ ID NO.1:

5' - ATATGGCACACGCTACATTG -3' ;

下游引物SEQ ID NO.2:

5' - TTGTTGTGGTGGTCATGTTT -3' 。

[0017] 实施例2 引物在宁麦9号及衍生品种中的特异性扩增

待测小麦品种:宁麦9号、宁麦13号、宁麦14号、生选6号、扬辐麦 4 号、安农8455、Clark、阿夫。

[0018] 检测方法:

分别以 SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2为上下游引物,以待测小麦基因组DNA(DNA提取方法参见DNA提取试剂盒说明书)为模板进行进行PCR扩增:

PCR反应体系为:20 ng的DNA,5 U/ μ L的 Taq酶0.25 μ L,10 μ mol/L的SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2各1 μ L,10 mmol/L的dNTP 0.5 μ L,10 \times PCR的Mg²⁺ Plus缓冲液2.5 μ L,然后用无菌蒸馏水补充反应体系至25 μ L;

反应程序:将反应体系在94 $^{\circ}$ C预变性5 min,随后94 $^{\circ}$ C变性30 sec, 58 $^{\circ}$ C条件下退火30 sec, 72 $^{\circ}$ C延伸40 sec,进行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min; 在4 $^{\circ}$ C下保存。

[0019] 将扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶中(含终浓度为0.5 μ g/mL的EB)电泳分离,获得的检测结果如图1。

[0020] 图1扩增产物中含有800 bp大小条带的有宁麦9号、宁麦13号、宁麦14号、生选6号、扬辐麦 4 号,证明其都含有宁麦9号的赤霉病抗性基因,为抗病品种;而安农8455、Clark和阿夫没有扩增出条带,证明其不含有该赤霉病抗性基因,为感病品种。

[0021] 实施例3 大田实验

进一步利用传统的田间抗性鉴定方法进行验证,在各小麦品种于扬花期,选取穗子中上部的一个小穗接种10 μ L含有 1×10^5 的赤霉菌孢子液(FG0609),套袋保湿3天,每个品种接种20个麦穗,于接种后21天调查各小麦品种的病小穗率。

[0022] 抗病性鉴定结果表明,上述抗病品种的病小穗率分别为20.1%(宁麦9号)、19.9%(宁麦13号)、33.1%(宁麦14号)、19.0%(生选6号)和23.6%(扬辐麦 4 号),证明其确实中抗赤霉病;而上述感病品种的病小穗率分别为89.8%(安农8455)、76.5%(Clark)和71.5%(阿夫),证明其确实不抗赤霉病,为感病品种。

[0023] 由上述实验结果可以得出:通过SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2对小麦基因组DNA进行PCR扩增,可以直接通过琼脂糖电泳,以能否扩增出800 bp大小条带来判定小麦材料是否含有宁麦9号赤霉病抗性基因,检测方法操作简单,检测结果非常直观,检测效果明显有效。

[0024] 以上已对本发明的较佳实施例进行了具体说明,但本发明并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明精神的前提下还可做出种种的等同的类型变型或替换,这些等同的变型和替换只要在权利要求限定的精神之内,也属于本发明的保护范围。

序列表

<110> 江苏省农业科学院

<120> 一对用于鉴定宁麦9号及其衍生品种赤霉病抗性的引物及应用

<141> 2018-06-26

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

atatggcaca cgctacattg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ttgttgtggt ggtcatgttt 20

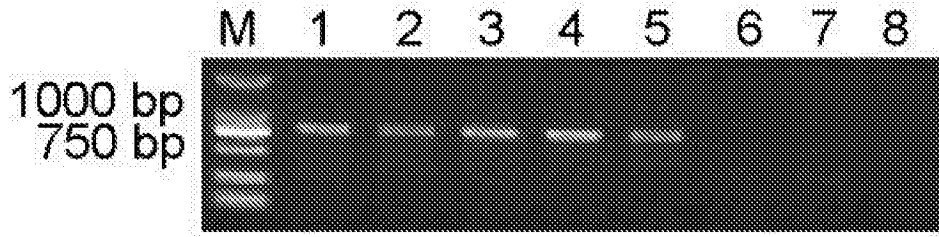


图1