

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103667495 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201310710653. 4

(22) 申请日 2013. 12. 19

(71) 申请人 广西大学

地址 530005 广西壮族自治区南宁市大学路
100 号

(72) 发明人 赵艳红 廖小芳 陈鹏 周瑞阳
周琼 周步进

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法

(57) 摘要

本发明属生物技术领域, 涉及一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法, 其步骤为: 利用 ALP (Amplified Length Polymorphism) 分子标记技术的特异性引物进行 PCR 反应, 扩增待测红麻样本的线粒体 DNA, 能扩增出与细胞质雄性不育系具有相同特异性条带的即为含红麻雄性不育细胞质的材料。所述特异性引物为核苷酸序列如 SEQID No. 3 和 4 所示的引物。本发明还提供用于红麻雄性不育细胞质分子鉴定方法的分子标记 MM509。本发明采用 ALP 分子标记技术对红麻雄性不育细胞质材料进行了分子水平多态性检测。该方法鉴定速度快、准确率高、操作简单, 非常适用于红麻细胞质雄性不育系的鉴定和分子标记辅助育种。

1. 一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法,其特征在于,具体步骤如下:

用 ALP 分子标记技术的特异性引物进行 PCR 反应,扩增待测红麻样本的线粒体 DNA,能扩增出与细胞质雄性不育系具有相同特异性条带的即为含红麻雄性不育细胞质的材料;

所述特异性引物为 atp6BQ 引物对:

正向引物 5' -TATGTTTGTAATATCACGTCTGCG-3' (如 SEQID No. 3 所示)

反向引物 5' -TTAGCAGCATAAACAAAGATGGATT-3' (如 SEQID No. 4 所示)。

2. 如权利要求 1 所述的红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法,其特征在于,其 PCR 反应体系如下:

正向引物(10 uM)	0.3uM
反向引物(10 uM)	0.3uM
10×Buffer	2ul
dNTP(10mM)	0.2 mM
DNA 样品	20-50ng
Taq plus (5U/ul)	0.2 ul

反应体系用双蒸水补足到总体积 20 μ l。

3. 如权利要求 1 所述的红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法,其特征在于,PCR 反应条件为:95℃预变性 3min;94℃ 40s,58℃ 40s,72℃ 40s,扩增 35 个循环,72℃延伸 10min。

4. 用于权利要求 1 所述红麻雄性不育细胞质分子鉴定方法的 atp6BQ 引物对,其特征在于,其为:

正向引物 5' -TATGTTTGTAATATCACGTCTGCG-3' (如 SEQID No. 3 所示)

反向引物 5' -TTAGCAGCATAAACAAAGATGGATT-3' (如 SEQID No. 4 所示)。

5. 用于权利要求 1 所述红麻雄性不育细胞质分子鉴定方法的分子标记 MM509,其为用如 SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示的引物扩增出长度为 509bp 的特异性条带。

6. 如权利要求 1-3 任一项所述的红麻雄性不育细胞质分子鉴定方法在红麻细胞质雄性不育系选育中的应用。

7. 如权利要求 4 所述的引物在鉴定红麻细胞质雄性不育系中的应用。

8. 如权利要求 5 所述的分子标记在鉴定红麻细胞质雄性不育系中的应用。

一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法。

背景技术

[0002] 红麻又称“洋麻”,是锦葵科木槿属一年生韧皮纤维作物。因其在长江流域及其以北地区不能自然留种,北方麻区每年要从华南地区调入大量种子。红麻表现出强大的杂种优势,其优势率高达 35%~40%。长期以来,红麻杂种优势利用是国内外红麻育种的主攻目标。不育系的培育是利用杂种优势的重要基础,其中细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility,简称 CMS)是常见的不育系类型。

[0003] 2008 年 9 月,广西大学周瑞阳发明的“红麻野败型细胞质雄性不育系的选育方法”获得国家发明专利(ZL200510019454.4)。按此方法已选育出了 K03A(见:桂科鉴字第[2004]152 号)、福 3A、P3A、917A、722A、763A 和 L23A(见:桂科鉴字第[2007]177 号)等 7 个细胞质雄性不育系,红麻杂种优势利用取得突破性进展。

[0004] 但在农业生产中,由单一细胞质雄性不育系组配的杂交种的大面积推广和长期利用存在某一病害大流行的风险,因为该细胞质雄性不育系组配的杂交种可能成为某一病原微生物生理小种的哺育品种。解决这一问题的基本途径是选育出多种细胞质来源的雄性不育系,并在生产中推广不同细胞质来源的三系杂交种。

[0005] 为了选育新的雄性不育细胞质,一般利用现有雄性不育保持系与现有种质资源测交的方法筛选,不但工作量很大,而且带有很大的盲目性。

[0006] 若能找到一种雄性不育细胞质的分子标记,则可利用这种标记对现有种质资源进行鉴定,以发掘出新的雄性不育细胞质资源,继而选育出新的雄性不育系。由此将极大地提高工作效率,并有利于现有雄性不育系及其杂交种的知识产权保护。

[0007] 关于红麻雄性不育细胞质分子鉴定方法,国内外均未见报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的是解决目前缺乏红麻雄性不育细胞质分子鉴定方法的问题,提供一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法。

[0009] 本发明采用的是 ALP (Amplified Length Polymorphism,扩增长度多态性)技术,是针对特定的位点设计特异引物,进行 PCR 扩增,检测得到的 DNA 多态性,以此做为分子标记的技术。

[0010] 本发明提供的一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法,具体步骤如下:

[0011] 用 ALP 分子标记技术的特异性引物进行 PCR 反应,扩增待测红麻样本的线粒体 DNA,能扩增出与细胞质雄性不育系具有相同特异性条带的即为含红麻雄性不育细胞质的材料;

[0012] 所述特异性引物为 atp6BQ 引物对:

[0013] 正向引物 5'-TATGTTTGTAATATCACGTCTGCG-3' (如 SEQID No. 3 所示)

[0014] 反向引物 5' -TTAGCAGCATAAACAAAGATGGATT-3' (如 SEQID No. 4 所示)。

[0015] 其中,所述 PCR 的反应体系如下:

[0016]

正向引物(10 uM)	0.3uM
反向引物(10 uM)	0.3uM
10×Buffer	2ul
dNTP(10mM)	0.2 mM
DNA 样品	20-50ng
Taq plus (5U/ul)	0.2 ul

[0017] 反应体系用双蒸水补足到总体积 20 μl。

[0018] 其中,PCR 反应条件为:95℃预变性 3min;94℃ 40s,58℃ 40s,72℃ 40s,扩增 35 个循环,72℃延伸 10min。

[0019] 本发明还提供用于鉴定红麻雄性不育细胞质的 atp6BQ 引物对:

[0020] 正向引物 5' -TATGTTTGTAATATCACGTCTGCG-3' (如 SEQID No. 3 所示)

[0021] 反向引物 5' -TTAGCAGCATAAACAAAGATGGATT-3' (如 SEQID No. 4 所示)

[0022] 本发明还提供用于鉴定红麻雄性不育细胞质的分子标记 MM509,其为用如 SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示的引物扩增出长度为 509bp 的特异性条带。

[0023] 本发明的还一个目的在于提供所述红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法在红麻细胞质雄性不育系选育中的应用。

[0024] 本发明的另一个目的在于提供用所述的标记或引物在鉴定红麻细胞质雄性不育系中的应用。

[0025] 本发明采用 ALP 分子标记技术对含红麻雄性不育细胞质的红麻细胞质雄性不育系材料进行了分子水平的多态性检测,从本研究的结果中可以看出,两种标记鉴定的结果条带清晰、稳定、可靠,因此本发明的方法非常适用于对含红麻雄性不育细胞质的红麻细胞质雄性不育系材料进行鉴定和进行新红麻细胞质雄性不育系材料的分子标记辅助选育。

附图说明

[0026] 图 1 为本发明实施例 1 中红麻细胞质雄性不育系 P3A 及其保持系 P3B 的 ALP 分析。图 1a 为 atp9 分子标记 MM556,其中,M:marker,泳道 1:P3A,泳道 2:P3B。图 1b 为 atp6 分子标记 MM509。其中,M:marker,泳道 1:P3A,泳道 2:P3B。

[0027] 图 2 为本发明实施例 2 中以分子标记 MM556 和分子标记 MM509 对多种红麻不育系、不育系杂交后代、保持系、恢复系检测的结果。图 2a 为分子标记 MM556 检测结果,其中,泳道 1-10 依次为:P3B、917B、722B、763B、L23B、K03B、992、PA302、F302、PA299,泳道 11-23 依次为:P3A、917A、722A、763A、L23A、K03A、F₁ (P3A/992)、F₁ (917A/992)、F₁ (722A/992)、F₂ (P3A/992),M:marker。图 2b 为分子标记 MM509 检测结果,偶数泳道依次为 P3B、917B、722B、763B、L23B、K03B、992、PA302、F302、PA299;奇数泳道依次为 P3A、917A、722A、763A、L23A、K03A、F₁ (P3A/992)、F₁ (917A/992)、F₁ (722A/992)、F₂ (P3A/992),M:marker。

[0028] 图3为本发明实施例3中以分子标记MM556对65种红麻资源材料检测的结果。其中,图3a泳道1:UG93-2-1、泳道2:UG93-2-2、泳道3:UG93-2-3、泳道4:UG93-2-4、泳道5:UG93-2-6、泳道6:UG93-2-22、泳道7:UG93-2MS-1、泳道8:UG93-2MS-2、泳道9:UG93-2MS-3、泳道10:UG93-2MS-4、Maker:DL2000;图3b泳道1:KN250、泳道2:KN250-1、泳道3:ID85、泳道4:C1-7-1、泳道5:C1-7-1-1、泳道6:MSI135、泳道7:H094、泳道8:286、泳道9:Fuhonghang5、泳道10:Y3-3-3、泳道11:CK(P3A)、泳道12:CK(P3B)、Maker:100bp plus ladder、泳道13:96、泳道14:09-154、泳道15:F₁(763B/8R)、泳道16:09-124、泳道17:09-124、泳道18:ID85、泳道19:BG52-135、泳道20:85-339;图3c Maker:DL2000、泳道1:CK(P3A)、泳道2:CK(P3B)、泳道3:P09-135-1、泳道4:P09-135-2、泳道5:P09-143-1、泳道6:P09-143-2、泳道7:P09-146-1、泳道8:P09-151-1、泳道9:P09-151-2、泳道10:P09-156-1、泳道11:P09-157-2、泳道12:P09-161-1、泳道13:P09-166-1、泳道14:P09-138-3、泳道15:P09-147、泳道16:P09-154、泳道17:P09-165、泳道18:KN142;图3d泳道1:liao34zao、泳道2:liao7435、泳道3:Iran early-maturing、泳道4:7804、泳道5:ZH01、泳道6:zhengxiaoma1、泳道7:7360A、泳道8:ID296、泳道9:ZF69、泳道10:BG154、泳道11:CK(P3A)、泳道12:CK(P3B)、泳道13:09-87、泳道14:09-89(KB2-3)、泳道15:09-90(C19-10-2)、泳道16:09-91(Yue152)、泳道17:BG155、泳道18:KN8、泳道19:K325、泳道20:Yueyin751、泳道21:ZB90、泳道22:09-7、泳道23:AS226。

[0029] 图4为本发明实施例3中以分子标记MM509检验分子标记MM556检测结果电泳图。图4a泳道1:CK(P3A)、泳道2:CK(P3B)、泳道3:UG93-2MS-1、泳道4:UG93-2MS-2、泳道5:UG93-2MS-3、泳道6:UG93-2MS-4、泳道7:UG93-2-22、泳道8:UG93-2-1、泳道9:UG93-2-2、泳道10:UG93-2-3、泳道11:UG93-2-4、泳道12:UG93-2-5、泳道13:UG93-2-6、泳道14:UG93-2-7、泳道15:UG93-2-8、泳道16:UG93-2-9、泳道17:UG93-2-11、泳道18:UG93-2-12、泳道19:UG93-2-14、泳道20:UG93-2-16、泳道21:UG93-2-17、泳道22:UG93-2-18、泳道23:UG93-2-19、Maker:DL2000;图4b泳道1:CK(P3A)、泳道2:CK(P3B)、泳道3:KN142、泳道4:P09-135-1、泳道5:P09-135-2、泳道6:P09-143-1、泳道7:P09-143-2、泳道8:P09-146-1、泳道9:P09-151-1、泳道10:P09-151-2、泳道11:P09-156-1、泳道12:P09-157-2、泳道13:P09-161-1、泳道14:P09-166-1、泳道15:P09-138-3、泳道16:P09-147、泳道17:P09-154、泳道18:P09-165、泳道19:N10-59、泳道20:N10-60、泳道21:N10-61、泳道22:N10-75、泳道23:N10-76、Maker:DL2000;图4c泳道1:CK(P3A)、泳道2:CK(P3B)、泳道3:KN250、泳道4:KN250-1、泳道5:ID85、泳道6:C1-7-1、泳道7:C1-7-1-1、泳道8:MSI135、泳道9:H094、泳道10:286、泳道11:Fuhonghang5、泳道12:Y3-3-3、泳道13:CK(P3A)、泳道14:CK(P3B)、泳道15:96、泳道16:09-154、泳道17:F₁(763B/8R)、泳道18:09-124、泳道19:09-124、泳道20:ID85、泳道21:BG52-135、泳道22:85-339、泳道23:AS226、Maker:DL2000;图4d泳道1:CK(P3A)、泳道2:CK(P3B)、泳道3:liao34zao、泳道4:liao7435、泳道5:Iran early-maturing、泳道6:7804、泳道7:ZH01、泳道8:zhengxiaoma1、泳道9:7360A、泳道10:ID296、泳道11:ZF69、泳道12:BG154、泳道13:CK(P3A)、泳道14:CK(P3B)、泳道15:09-87、泳道16:09-89(KB2-3)、泳道17:09-90(C19-10-2)、泳道18:09-91(Yue152)、泳道19:BG155、泳道20:KN8、泳道21:K325、泳道22:Yueyin751、泳道23:ZB90、Maker:DL2000。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0031] 实施例 1 红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法

[0032] 本实施例的试验材料为红麻细胞质雄性不育系 P3A 及其保持系 P3B,均为公知公用品种,具体信息如下:

[0033] P3A:又名粤丰 1 号 A,见发明专利 ZL200510019454.4 (公开号 CN100415083C) 实施例 3。

[0034] P3B:又名粤丰 1 号 B,广西大学周瑞阳老师选育的细胞质雄性不育系 P3A 的雄性不育保持系,见发明专利 ZL200510019454.4 (公开号 CN100415083C) 实施例 3。

[0035] 1、红麻总 DNA 提取及纯化

[0036] ①取 100mg 新鲜红麻幼嫩叶片于研钵中,用液氮迅速研磨成粉末。

[0037] ②将适量粉末转入 2ml 的 EP 管中,加入 1ml 预热的质量百分比为 15% 的 CTAB 提取液,颠倒混匀,于 65℃ 保温 40-60min,其间摇动 2-3 次。

[0038] ③取出 EP 管,稍冷却后,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1),颠倒混匀,4℃,12000r/min 离心 10min。

[0039] ④取上清,加入 1/10 体积的质量百分比为 10% 的 CTAB/NaCl 溶液,65℃ 保温 5-10min。加入等体积的氯仿/异戊醇(体积比为 24:1),颠倒混匀,4℃,12000r/min 离心 10min。

[0040] ⑤重复步骤④,直至两相界面不出现白色沉淀为止。

[0041] ⑥取上清,加入 2 倍体积的预冷无水乙醇,轻轻混匀,-20℃ 静置过夜(或 -70℃ 静置 30min),4℃,12000r/min 离心 15min。

[0042] ⑦弃上清,用体积百分比 75% 乙醇洗涤沉淀 1 次,室温干燥后,加入 600ul 的 ddH₂O (含终浓度 50ug/ml 的 RNase A),37℃ 保温 30-45min。

[0043] ⑧用等体积的氯仿/异戊醇(体积比为 24:1)抽提 2 次,4℃,12000r/min 离心 10min。

[0044] ⑨取上清,加入 1/10 体积 3mol/L 的 NaAc,2 倍体积的预冷无水乙醇,-20℃ 放置 30min,4℃,12000r/min 离心 10min。

[0045] ⑩弃上清,用体积百分比 75% 的乙醇洗涤沉淀 2-3 次,室温干燥后溶于 20-30ul 的 ddH₂O,-20℃ 保存备用。

[0046] 2、基于 atp9 基因分子标记和 atp6 基因的分子标记

[0047] 2.1 引物

[0048] 基于红麻细胞质雄性不育系 P3A 中 atp9 基因的 3' 端缺失 47 个碱基,在此突变区两端的保守区设计一对特异引物(已发表):

[0049] atp9BQF:ATGAATGATAAAGCGCGTGACGAGA;

[0050] atp9BQR:5' ATGAGTCACAAGGTGAATTGTAAGC。

[0051] 由此开发的红麻雄性不育细胞质的分子标记命名为 MM556。

[0052] 基于红麻细胞质雄性不育系 P3A 中 atp6 保守区缺失 30 个碱基,在此突变区两端

的保守区设计一对特异引物：

[0053] atp6BQF :TATGTTTGTAATATCACGTCTGCG ;

[0054] atp6BQR :TTAGCAGCATAAACAAAGATGGATT。

[0055] 据此开发的红麻雄性不育细胞质检测分子标记命名为 MM509。

[0056] 这两个分子标记都可以特异区别红麻雄性不育细胞质。

[0057] 2. 2PCR 反应与检测

[0058] 两个分子标记 PCR 检测的 20ul 反应体系中包括 20-50ng 的 DNA 模板, 2ul 的 10×Buffer, 0. 2mM dNTP, 0. 3uM 的上下游引物, 1U Taqplus, 然后用 ddH₂O 补足 20ul。该反应混合物首先 95℃ 预变性 3min, 然后 94℃ 40s, 58℃ 40s, 72℃ 40s, 扩增 35 个循环, 最后 72℃ 终延伸 10min, PCR 反应产物用 1% 的琼脂糖检测。

[0059] 2. 3 红麻雄性不育细胞质的特有标记

[0060] 基于红麻细胞质雄性不育系 P3A 中 atp9 基因 3' 端发现 47bp 的缺失突变, 而相应的保持系正常。因此, 在缺失突变的两端设计特异引物对 atp9BQF/atp9BQR, 开发了一个以 PCR 为基础的 ALP 分子标记, 该分子标记在红麻细胞质雄性不育系 P3A 中扩增出 556bp 条带, 故命名为 MM556, 而相应保持系 P3B 扩增出 603bp 条带(图 1a)。

[0061] 同样, 基于红麻细胞质雄性不育系 P3A 中 atp6 基因 CDS 区发现 30bp 的缺失突变, 而相应的保持系正常, 因此, 在缺失突变的两端设计特异引物对 atp6BQ, 发展一个以 PCR 为基础的 ALP 分子标记, 该分子标记在红麻细胞质雄性不育系 P3A 中扩增出 509bp 条带, 故将此分子标记命名为 MM509, 而相应保持系 P3B 扩增出 539bp 条带(图 1b)。

[0062] 实施例 2 对现有红麻雄性不育细胞质的检测

[0063] 选择与红麻细胞质雄性不育系 P3A 具有相同细胞质的其他红麻不育系, 不育系杂交后得到的 F₁ 代、F₂ 代, 以及具可育细胞质的红麻保持系、恢复系进行验证, 以 P3A, P3B 为对照。具体的试验材料如下：

[0064] (1) 红麻细胞质雄性不育系(具红麻雄性不育细胞质)

[0065] P3A : 又名粤丰 1 号 A, 见发明专利 ZL200510019454. 4 (公开号 CN100415083C) 实施例 3。

[0066] 917A : 桂科鉴字第 [2004] 第 152 号, 广西大学周瑞阳老师等选育的细胞质雄性不育系, 以 UG93 为细胞质供体, 917 为细胞核供体, 经饱和回交选育而成, 裂叶, 茎秆浅红色。

[0067] 722A : 桂科鉴字第 [2004] 152 号, 广西大学周瑞阳老师等选育的细胞质雄性不育系, 以 UG93 为细胞质供体, 722 为细胞核供体, 经饱和回交选育而成, 完全叶, 茎秆绿色。

[0068] 763A : 桂科鉴字第 [2004] 152 号, 广西大学周瑞阳老师选育的细胞质雄性不育系, 以 UG93 为细胞质供体, 泰红 763 为细胞核供体, 经饱和回交选育而成, 花为紫色, 茎秆浅红色。

[0069] L23A : 桂科鉴字第 [2007] 177 号, 广西大学周瑞阳老师选育的细胞质雄性不育系。

[0070] K03A : 桂科鉴字第 [2004] 152 号, 广西大学周瑞阳老师选育的细胞质雄性不育系, 见发明专利 ZL200510019454. 4 (公开号 CN100415083C)。

[0071] (2) 红麻细胞质雄性不育系杂交后得到的 F₁ 代、F₂ 代(理论上与亲本不育系具有相同的雄性不育细胞质)

[0072] F₁ (P3A/992) : 即以 P3A 为母本, 以 992 (又名福红 992) 为父本杂交, 得到的杂交

一代种子即 F_1 (P3A/992) 种子, 种植得到 F_1 (P3A/992) 植株。

[0073] F_2 (P3A/992): 即种植 F_1 (P3A/992) 植株, 隔离自由授粉, 收获结出的种子, 种植即得到 F_2 (P3A/992) 植株。

[0074] F_1 (917A/992): 即以 917A 为母本, 以 992 为父本杂交, 得到的杂交一代种子即 F_1 (917A/992) 种子, 种植得到 F_1 (917A/992) 植株。

[0075] F_1 (722A/992): 即以 722A 为母本, 以 992 为父本杂交, 得到的杂交一代种子即 F_1 (722A/992) 种子, 种植得到 F_1 (722A/992) 植株。

[0076] (3) 红麻保持系、恢复系(具可育细胞质)

[0077] P3B: 又名粤丰 1 号 B, 广西大学周瑞阳老师选育的细胞质雄性不育系 P3A 的雄性不育保持系, 见发明专利 ZL200510019454.4 (公开号 CN100415083C) 实施例 3。

[0078] 917B: 又名 917, 中国农业科学院麻类研究所选育的红麻品种, 为 917A 的轮回亲本(细胞核供体亲本), 917A 的相应保持系。

[0079] 722B: 又名 722, 中国农业科学院麻类研究所选育的红麻品种, 为 722A 的轮回亲本(细胞核供体亲本), 722A 的相应保持系。

[0080] 763B: 又名泰红 763, 为 763A 的轮回亲本(细胞核供体亲本), 为 763A 的相对应保持系。

[0081] L23B: L23A 的轮回亲本(细胞核供体亲本), 为 L23A 的相对应保持系。

[0082] K03B: 广西大学周瑞阳老师选育的细胞质雄性不育系 K03A 的雄性不育保持系, 见发明专利 ZL200510019454.4 (公开号 CN100415083C)。

[0083] 992: 又名福红 992, 福建农林大学选育, 2007 年 7 月通过全国麻类品种鉴定委员会鉴定, 品种鉴定编号: 国品鉴麻 2007005。

[0084] PA302: 常用红麻品种, 见《红麻野败型 CMS 胞质 SNP 分子标签的发掘》(金刚, 周瑞阳, 中国科技论文在线)。

[0085] F302: 常用红麻品种, 见《红麻野败型 CMS 胞质 SNP 分子标签的发掘》(金刚, 周瑞阳, 中国科技论文在线)。

[0086] PA299: 常用红麻品种, 见《红麻野败型 CMS 胞质 SNP 分子标签的发掘》(金刚, 周瑞阳, 中国科技论文在线)。

[0087] 1、基于分子标记 MM556 的检测

[0088] 选用分子标记 MM556, 操作方法参见实施例 1, 所用引物对为 atp9BQF/atp9BQR。

[0089] 电泳时, 泳道 1-10 依次为 P3B、917B、722B、763B、L23B、K03B、992、PA302、F302、PA299, 泳道 11-23 依次为 P3A、917A、722A、763A、L23A、K03A、 F_1 (P3A/992)、 F_1 (917A/992)、 F_1 (722A/992)、 F_2 (P3A/992), Marker 为 DL2000。

[0090] 结果见图 2a, 这些红麻品种的细胞质被区别为两种不同的类型, 即不育细胞质与可育细胞质, 其中所有不育细胞质(泳道 11-20) 与 P3A (泳道 11) 拥有相同的条带, 而所有可育细胞质(泳道 1-10) 与 P3B (泳道 1) 拥有相同的条带。而且还发现具有雄性不育细胞质的品种为不育系、不育系的杂交 F_1 代、 F_2 代, 具有可育细胞质的为保持系、恢复系。

[0091] 2、基于分子标记 MM509 的检测

[0092] 选用分子标记 MM509, 操作方法参见实施例 1, 所用引物对为 atp6BQF/atp6BQR。

[0093] 电泳时, 偶数泳道依次为 P3B、917B、722B、763B、L23B、K03B、992、PA302、F302、

PA299 ;奇数泳道依次为 P3A、917A、722A、763A、L23A、K03A、F₁ (P3A/992)、F₁ (917A/992)、F₁ (722A/992)、F₂ (P3A/992), Maker 为 DL2000。

[0094] 结果见图 2b, 这些红麻品种的细胞质被区别为两种不同的类型, 即不育细胞质与可育细胞质, 其中所有不育细胞质(奇数泳道) 与 P3A (泳道 1) 拥有相同的条带, 而所有可育细胞质(偶数泳道) 与 P3B (泳道 2) 拥有相同的条带, 而且还发现具有雄性不育细胞质的品种为不育系、不育系的杂交 F₁ 代、F₂ 代, 具有可育细胞质的为保持系、恢复系。

[0095] 分子标记 MM556 的检测 results 和分子标记 MM509 的检测 results 相互验证。

[0096] 实施例 3 对红麻品种资源的细胞质检测

[0097] 选 65 份红麻资源(10 份红麻 UG93 细胞质雄性不育系材料和 55 份红麻资源)作为材料, 具体如下:

[0098] UG93-2-1、UG93-2-2、UG93-2-3、UG93-2-4、UG93-2-6、UG93-2-22、UG93-2MS-1、UG93-2MS-2、UG93-2MS-3、UG93-2MS-4、KN250、KN250-1、ID85、C1-7-1、C1-7-1-1、MSI135、H094、286、Fuhonghang5、Y3-3-3、96、09-154、F₁ (763B/8R)、09-124、ID85、BG52-135、85-339、P09-135-1、P09-135-2、P09-143-1、P09-143-2、P09-146-1、P09-151-1、P09-151-2、P09-156-1、P09-157-2、P09-161-1、P09-166-1、P09-138-3、P09-147、P09-154、P09-165、KN142、liao34zao、liao7435、Iran early-maturing、7804、ZH01、zhengxiaoma1、7360A、ID296、ZF69、BG154、09-87、09-89 (KB2-3)、09-90 (C19-10-2)、09-91 (Yue152)、BG155、KN8、K325、Yueyin751、ZB90、09-7、AS226。

[0099] 1、基于分子标记 MM556 的检测

[0100] 选用分子标记 MM556, 操作方法参见实施例 1, 所用引物对为 atp9BQF/atp9BQR。

[0101] 对 65 份红麻资源的检测 results 显示(图 3), 有 10 份资源具有不育细胞质被筛选出来, 这 10 份资源分别包括 UG93-2ms-1、UG93-2ms-2、UG93-2ms-3、UG93-2ms-4、UG93-2-22 (图 3a), 其中 UG93-2ms-1、UG93-2ms-2、UG93-2ms-3、UG93-2ms-4 都是 UG93 雄性不育突变体株系, 而 UG93-2-22 是 UG93 野生型品种, 在田间表现为可育, 这说明了 UG93-2-22 具有恢复不育细胞质的恢复基因。另外 5 个具雄性不育细胞质资源是: KN250、KN250-1 (图 3b)、KN142 (图 3c)、ZB90、09-7 (图 3d)。以上述不育细胞质资源为母本, 以现有保持系为父本, 已成功选育出了新的雄性不育系, 由此表明分子标记 MM556 用于鉴别红麻的细胞质育性是可靠的。

[0102] 2、基于分子标记 MM509 的检测

[0103] 选用分子标记 MM509, 操作方法参见实施例 1, 所用引物对为 atp6BQF/atp6BQR。

[0104] 对 65 份红麻资源的检测 results 显示(图 4), 有 10 份资源具有不育细胞质被筛选出来, 这 10 份资源分别包括 UG93-2ms-1、UG93-2ms-2、UG93-2ms-3、UG93-2ms-4、UG93-2-22 (图 4a), 其中 UG93-2ms-1、UG93-2ms-2、UG93-2ms-3、UG93-2ms-4 都是 UG93 雄性不育突变体株系, 而 UG93-2-22 是 UG93 野生型品种, 在田间表现为可育, 这说明了 UG93-2-22 具有恢复不育细胞质的恢复基因。另外 5 个具雄性不育细胞质资源是: KN250、KN250-1 (图 4c)、KN142 (图 4b)、ZB90 (图 4d)。以上述不育细胞质资源为母本, 以现有保持系为父本, 已成功选育出了新的雄性不育系, 由此表明分子标记 MM509 用于鉴别红麻的细胞质育性是可靠的。

[0105] 综上所述, 本发明采用 ALP 分子标记技术对含红麻雄性不育细胞质的红麻细胞

质雄性不育系材料进行了分子水平的多态性检测,从本研究的结果中可以看出,分子标记 MM556 和分子标记 MM509 两种标记鉴定的结果条带清晰、稳定、可靠,因此本发明的方法非常适用于对含红麻雄性不育细胞质的红麻细胞质雄性不育系材料进行鉴定和进行新红麻细胞质雄性不育系材料的分子标记辅助选育。

[0106] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0001]

序列表

<110>	广西大学	
<120>	一种红麻雄性不育细胞质的分子鉴定方法	
<130>	KHP13116016.9	
<160>	4	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	atgaatgata aagcgcgatga cgaga	25
<210>	2	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	atgagtcaca aggtgaattg taagc	25
<210>	3	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	tatgtttgta aatatcacgt ctgcg	25

[0002]

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ttagcagcat aaacaaagat ggatt

25

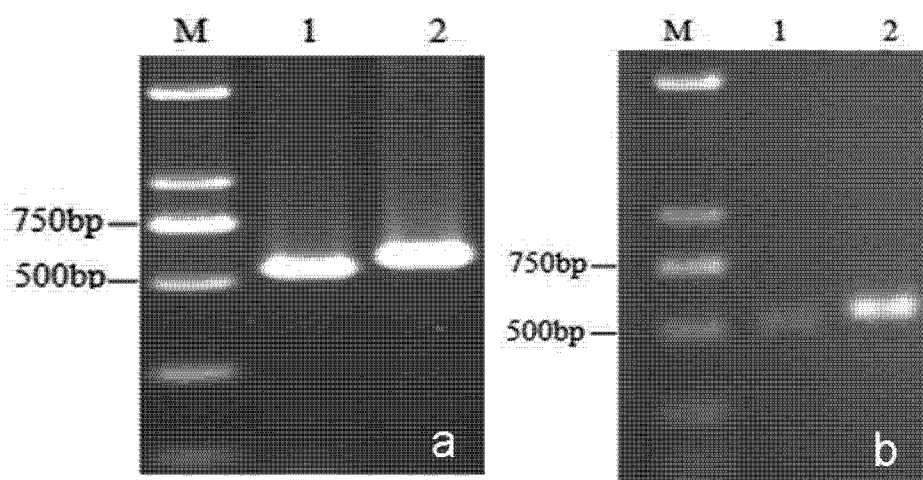


图 1

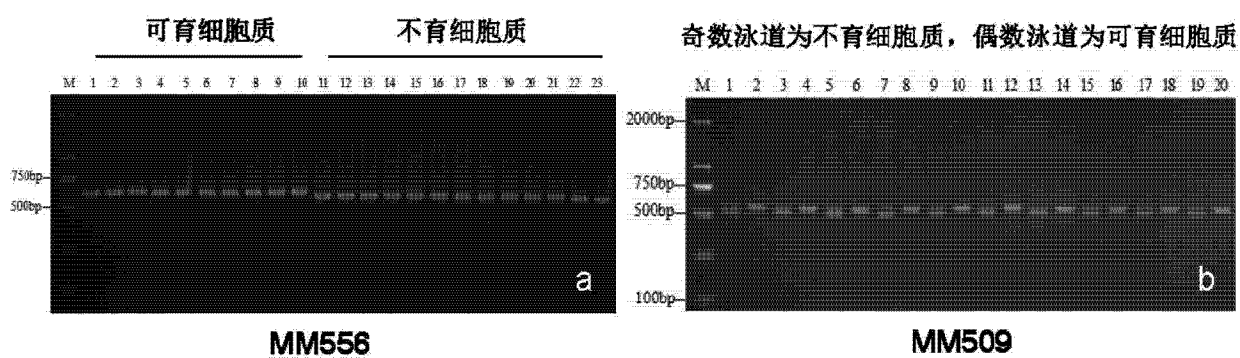


图 2

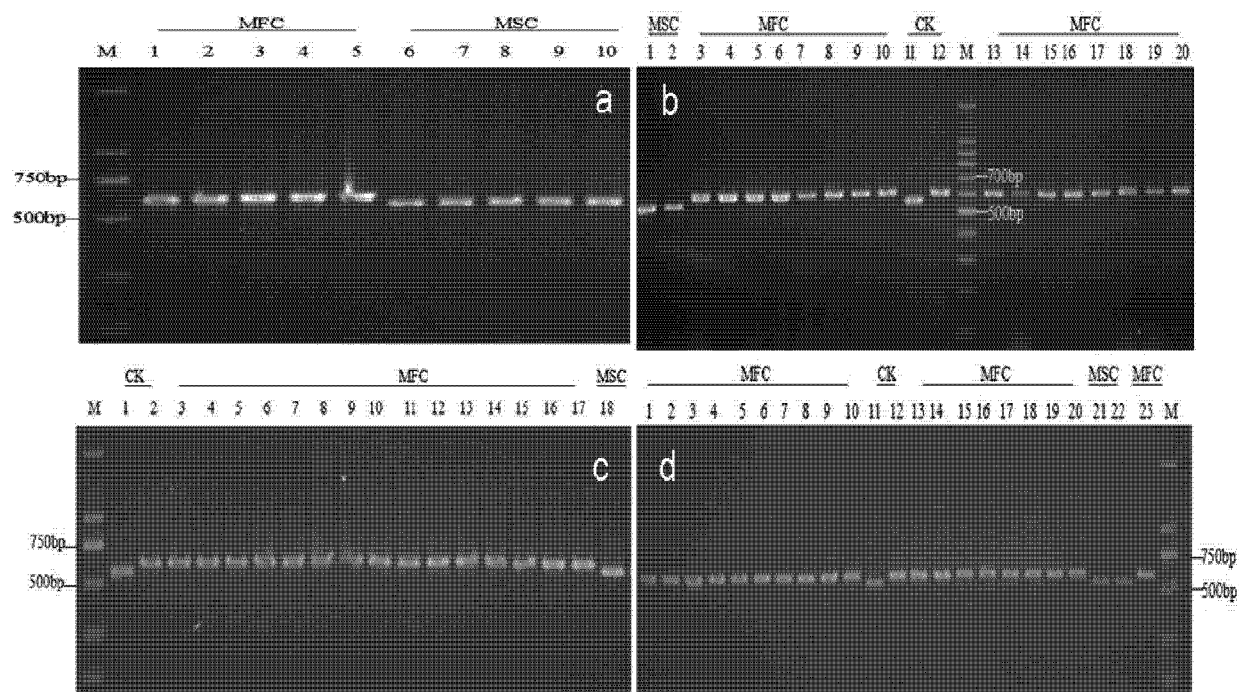


图 3

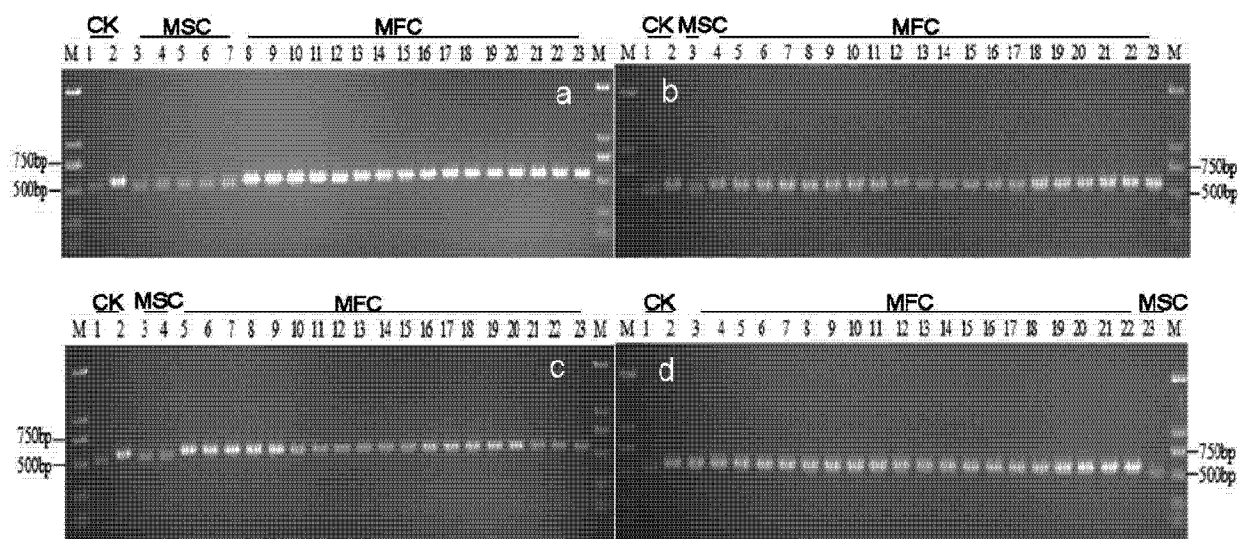


图 4