



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111270003 B

(45) 授权公告日 2021. 04. 30

(21) 申请号 202010209253.5

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2020.03.23

审查员 马艳林

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111270003 A

(43) 申请公布日 2020.06.12

(73) 专利权人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区板井彰化路50号,2443信箱

(72) 发明人 温常龙 杨静静 梁毅 张建

罗江 李晓杰

(74) 专利代理机构 北京五洲洋和知识产权代理

事务所(普通合伙) 11387

代理人 荣红颖 王蔚林

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书3页 说明书22页

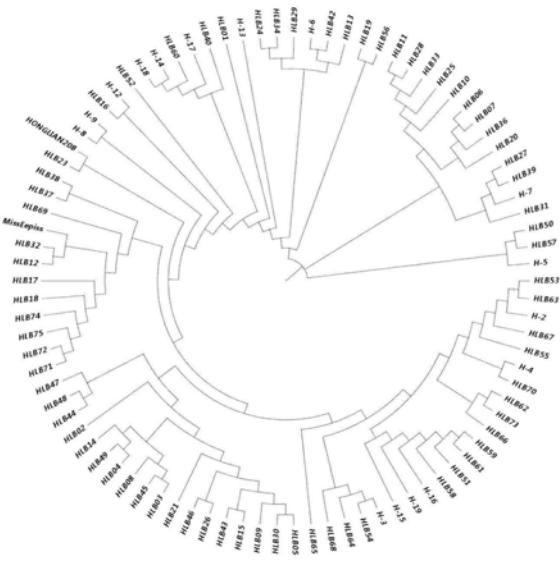
序列表8页 附图13页

(54) 发明名称

一种鉴定胡萝卜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合

(57) 摘要

本发明属于分子标记及其检测领域,具体涉及一种鉴定胡萝卜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合。鉴定胡萝卜品种真实性的SSR位点,根据胡萝卜的参考基因组Daucus carota与36份种质资源全基因组重测序数据进行数据挖掘所获得;上述SSR引物组合选自:第一SSR引物对至第二十四SSR引物对,分别用于PCR扩增上述第一SSR位点至第二十四SSR位点,分别优选为与序列表中的SEQ ID NO:1-48的核苷酸序列的同源性为85%-100%的核苷酸序列。本发明可用于对胡萝卜品种进行自种子开始的全生命周期的真实性鉴定,并为胡萝卜种质资源和新品种保护提供技术支持。



1. 鉴定胡萝卜品种真实性的SSR引物组,其特征在于,

所述SSR引物组由第一SSR引物对,第二SSR引物对,第三SSR引物对,第四SSR引物对,第五SSR引物对,第六SSR引物对,第七SSR引物对,第八SSR引物对,第九SSR引物对,第十SSR引物对,第十一SSR引物对,第十二SSR引物对,第十三SSR引物对,第十四SSR引物对,第十五SSR引物对,第十六SSR引物对,第十七SSR引物对,第十八SSR引物对,第十九SSR引物对,第二十SSR引物对,第二十一SSR引物对,第二十二SSR引物对,第二十三SSR引物对,第二十四SSR引物对组成;

所述第一SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示;

所述第二SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示;

所述第三SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示;

所述第四SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示;

所述第五SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示;

所述第六SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示;

所述第七SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示;

所述第八SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16所示;

所述第九SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示;

所述第十SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示;

所述第十一SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示;

所述第十二SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示;

所述第十三SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示;

所述第十四SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28所示;

所述第十五SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示;

所述第十六SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32所示;

所述第十七SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示;

所述第十八SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36所示;

所述第十九SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示;

所述第二十SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40所示;

所述第二十一SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42所示;

所述第二十二SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44所示;

所述第二十三SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示;

所述第二十四SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48所示。

2. 根据权利要求1所述SSR引物组,其特征在于,每对所述引物对的一条引物连接有荧光分子。

3. 根据权利要求2所述SSR引物组,其特征在于,所述荧光分子选自NED、PET、VIC、FAM。

4. 鉴定胡萝卜品种真实性的SSR试剂盒,其特征在于,所述SSR试剂盒配制为PCR反应体系;所述PCR反应体系包括:

权利要求1-3中任一项所述SSR引物组。

5. 根据权利要求4所述试剂盒,其特征在于,所述SSR引物组中的每一对的上游引物和下游引物在所述体系中浓度之比为1:1;所述上游引物和下游引物在体系中终浓度均0.25 μ

mol/L。

6. 根据权利要求4所述试剂盒,其特征在于,所述体系还包括:

dNTPs:体系中终浓度为每种0.15mmol/L,

氯化镁:体系中终浓度为2.5mmol/L,

DNA聚合酶:体系中终浓度为0.05U/ μ L,

PCR缓冲液:由体系中终浓度为10-50mmol/L的氯化钾与体系中终浓度为1-10mmol/L、pH为7.5-9.0的Tris-HCL配制而成。

7. 一种鉴定胡萝卜品种真实性的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:

步骤一:分别采用权利要求1-3中任一项所述SSR引物组中的引物对检测待测胡萝卜的24个SSR位点的基因型;

步骤二:所述待测胡萝卜的品种判定:

如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型,和胡萝卜标准品种中的某指定品种的基于24个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测胡萝卜与所述胡萝卜标准品种的该指定品种判定为相似的品种;

如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型,和胡萝卜标准品种中的某指定品种的基于24个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2,则待测胡萝卜与所述胡萝卜标准品种的该指定品种判定为不同的品种;

所述标准胡萝卜品种选自以下75个胡萝卜品种:

欧防1号,紫色胡萝卜,紫龙胡萝卜,边杆红胡萝卜,齐头黄紫色胡萝卜,五寸参,红帅一号,日本小甜脆(迷你胡萝卜),西班牙黄色奶油胡萝卜,日本武藏野的春秋鼎盛,千寻六寸,艳紫胡萝卜,兴运三红五寸参,金帝红笋胡萝卜,齐头黄,京红九寸参,三红八寸参,三红七寸参,三红七寸参胡萝卜,千红甜脆(冰糖胡萝卜),齐头黄胡萝卜,迷你胡萝卜,三红九寸参,韩育九寸参,三红八寸参二号,韩育齐头黄胡萝卜,藤原8号(红萝卜),红芯三红七寸参,法国富红八寸参,甜脆齐头黄,小顶八寸参,法兰德紫箭,丰收红,贝娅斯红福七寸,精选齐头黄(西洋黄参),三红五寸参,红星,红彩星,三红五寸胡萝卜,红胡萝卜,手指胡萝卜,红根胡萝卜(莫迪红胡萝卜),黄色胡萝卜(罗萨德胡萝卜),紫鸢胡萝卜,紫龙胡萝卜二号,黄石胡萝卜,拇指胡萝卜,艳紫新胡萝卜,玫瑰红胡萝卜,红太二号,胡萝卜杂交3号,华耐7号,红福212,胡萝卜C0-12,胡萝卜C0-13,胡萝卜C0-20,胡萝卜C0-21,华誉208,华誉218,华誉258,H1702,H1704,H1705,H1718,H1731,H1732,H1733,H1734,H1735,H1736,H1737,H1703,H1738,H1739,H1740。

8. 根据权利要求7所述检测方法,其特征在于,所述判定的结果是根据聚类分析得到的。

9. 根据权利要求7所述检测方法,其特征在于,所述检测待测胡萝卜的24个SSR位点基因型步骤包括以下分步骤:

分步骤一:分别以所述待测胡萝卜的基因组DNA和胡萝卜标准品种的基因组DNA为模板,分别采用权利要求1-3中任一项所述SSR引物组中的引物对进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;

分步骤二:对所述PCR扩增产物进行检测,获得所述待测胡萝卜和所述胡萝卜标准品种基于24个SSR位点的基因型。

10. 根据权利要求9所述检测方法,其特征在于,所述分步骤二的检测方法包括:

荧光信号检测:检测所述PCR扩增产物的荧光信号,获得所述待测胡萝卜和所述标准胡萝卜品种基于所述24个SSR位点的基因型;或:

扩增产物片段检测:检测所述PCR扩增产物的片段大小,获得待测胡萝卜和标准胡萝卜品种基于所述24个SSR位点的基因型。

11. 一种鉴定胡萝卜品种是否相同的检测方法,其特征在于,待测胡萝卜为两种未知品种的胡萝卜;

所述检测方法包括:

步骤一:分别采用权利要求1-3中任一项所述SSR引物组中的引物对检测待测胡萝卜的24个SSR位点的基因型;

步骤二:所述待测胡萝卜的品种是否相同的判定:

如果所述待测胡萝卜24个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测胡萝卜判定为相似的品种;

如果所述待测胡萝卜24个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则待测胡萝卜判定为不同的品种。

12. 权利要求1-3中任一项所述SSR引物组,或权利要求4-6中任一项所述SSR试剂盒,或权利要求7-11任一项所述检测方法,在以下X1或X2或X3中的应用:

X1:鉴定待测胡萝卜的品种是否属于标准胡萝卜品种中的某一种;

X2:鉴定待测胡萝卜的品种具体为标准胡萝卜品种中的哪一种;

X3:鉴定待测胡萝卜样本是否为相同的品种。

一种鉴定胡萝卜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合

技术领域

[0001] 本发明属于分子标记及其检测领域,具体涉及一种鉴定胡萝卜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合。

背景技术

[0002] 胡萝卜是伞形科植物,原产于中亚细亚一带,已经有四千多年的栽培历史,由汉朝张骞出使西域待会我国,在国内广泛栽培,同时胡萝卜也是一种世界性蔬菜,在全世界范围内都广受欢迎。

[0003] 胡萝卜的变种与亚种较少,在伞形科胡萝卜属里面,仅有野胡萝卜一种,栽培胡萝卜被认为是野生胡萝卜的变种,从另一个角度来说也就是胡萝卜的遗传多样性并不丰富,现今全世界范围内栽培的胡萝卜其品种间差异可能并不大,尤其是不同国家之间的引种驯化工作造成了同名异种和同种异名现象,经过多年的积累对胡萝卜种子市场已经造成了一定的负面影响,故而如何快速有效的对胡萝卜品种进行真实性鉴定成了一个刻不容缓的需要解决的问题。

[0004] 对于大部分作物来说DUS测试都是标准的真实性鉴定手段,但是胡萝卜属于根菜类植物,其主要商品部分几乎完全处于地下,DUS测试的难度较大,同时由于受到种植条件造成的影响更加显著,根菜类作物可能并不适于DUS测试,故而此时我们应该适当的抛开表型鉴定,寻找一种一种基于DNA鉴定的分子鉴定技术。

[0005] 现阶段大量的植物与动物(包括人类),真实性鉴定(亲子鉴定)都是基于SSR分子标记的,SSR标记被认为是一种稳定准确,同时简单高效的分子鉴定方法,同时其鉴定成本相对于DUS测试来说也很低。但是,目前的现有技术中尚无利用SSR标记鉴定胡萝卜品种真实性的方法。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种鉴定胡萝卜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合,可以得出稳定、高效的鉴定结果:待测胡萝卜品种是否属于标准胡萝卜品种中的某一种,以及具体是哪一种。

[0007] 本发明是通过以下的技术方案实现的:

[0008] 鉴定胡萝卜品种真实性的SSR位点,所述SSR位点选自如下第一SSR位点到第二十四SSR位点中的任1到24种:第一SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第7499095-7499106位,或其种间同源基因组片段;第二SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第36613402-36613411位,或其种间同源基因组片段;第三SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第33287904-33287919位,或其种间同源基因组片段;第四SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030386.1所述序列的第25850818-25850827位,或其种间同源基因组片段;第五SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_

030389.1所述序列的第15004822-15004839位,或其种间同源基因组片段;第六SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030384.1所述序列的第28259340-28259354位,或其种间同源基因组片段;第七SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030386.1所述序列的第29640136-29640145位,或其种间同源基因组片段;第八SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030384.1所述序列的第29264089-29264103位,或其种间同源基因组片段;第九SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第12352369-12352378位,或其种间同源基因组片段;第十SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第35393957-35393970位,或其种间同源基因组片段;第十一SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第27935052-27935061位,或其种间同源基因组片段;第十二SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第20723244-20723253位,或其种间同源基因组片段;第十三SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030386.1所述序列的第33583239-33583250位,或其种间同源基因组片段;第十四SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第25935567-25935581位,或其种间同源基因组片段;第十五SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第20936935-20936946位,或其种间同源基因组片段;第十六SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030383.1所述序列的第38294478-38294487位,或其种间同源基因组片段;第十七SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第31015109-31015118位,或其种间同源基因组片段;第十八SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030384.1所述序列的第12013711-12013722位,或其种间同源基因组片段;第十九SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030383.1所述序列的第29910830-29910855位,或其种间同源基因组片段;第二十SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030388.1所述序列的第19372226-19372235位,或其种间同源基因组片段;第二十一SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第2839462-2839471位,或其种间同源基因组片段;第二十二SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030381.1所述序列的第48784263-48784274位,或其种间同源基因组片段;第二十三SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第29461594-29461608位,或其种间同源基因组片段;第二十四SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030385.1所述序列的第1774792-1774801位,或其种间同源基因组片段;所述参考基因组为胡萝卜参考基因组Daucus carota。

[0009] 鉴定胡萝卜品种真实性的SSR引物组,所述SSR引物组用于分别扩增所述的SSR位点,所述SSR引物组包括:第一SSR引物对,用于扩增所述第一SSR位点;第二SSR引物对,用于扩增所述第二SSR位点;第三SSR引物对,用于扩增所述第三SSR位点;第四SSR引物对,用于扩增所述第四SSR位点;第五SSR引物对,用于扩增所述第五SSR位点;第六SSR引物对,用于扩增所述第六SSR位点;第七SSR引物对,用于扩增所述第七SSR位点;第八SSR引物对,用于扩增所述第八SSR位点;第九SSR引物对,用于扩增所述第九SSR位点;第十SSR引物对,用于扩增所述第十SSR位点;第十一SSR引物对,用于扩增所述第十一SSR位点;第十二SSR引物对,用于扩增所述第十二SSR位点;第十三SSR引物对,用于扩增所述第十三SSR位点;第十四

SSR引物对,用于扩增所述第十四SSR位点;第十五SSR引物对,用于扩增所述第十五SSR位点;第十六SSR引物对,用于扩增所述第十六SSR位点;第十七SSR引物对,用于扩增所述第十七SSR位点;第十八SSR引物对,用于扩增所述第十八SSR位点;第十九SSR引物对,用于扩增所述第十九SSR位点;第二十SSR引物对,用于扩增所述第二十SSR位点;第二十一SSR引物对,用于扩增所述第二十一SSR位点;第二十二SSR引物对,用于扩增所述第二十二SSR位点;第二十三SSR引物对,用于扩增所述第二十三SSR位点;第二十四SSR引物对,用于扩增所述第二十四SSR位点。

[0010] 在一些实施方式中,所述第一SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的核苷酸序列的同一性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第三SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第四SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第五SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第六SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第七SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第八SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第九SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十一SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十二SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十三SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十四SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十五SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十六SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十七SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十八SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十九SSR引物

对,与序列表中的SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二十SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二十一SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二十二SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二十三SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二十四SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;优选地,每对所述引物对的一条引物连接有荧光分子,更优选,所述荧光分子选自NED、PET、VIC、FAM。

[0011] 鉴定胡萝卜品种真实性的SSR试剂盒,所述SSR试剂盒配制为PCR反应体系;所述PCR反应体系包括:所述SSR引物组,优选地,所述SSR引物组中的每一对的上游引物和下游引物在所述体系中浓度之比为1:1;所述上游引物和下游引物在体系中终浓度均优选为0.25 μ mol/L;优选地,所述体系还包括:dNTPs:体系中终浓度为每种0.15mmol/L,氯化镁:体系中终浓度为2.5mmol/L,DNA聚合酶:体系中终浓度为0.05U/ μ L,PCR缓冲液:由体系中终浓度为10-50mmol/L的氯化钾与体系中终浓度为1-10mmol/L的Tris-HCL (pH7.5-9.0) 配制而成。

[0012] 一种鉴定胡萝卜品种真实性的检测方法,包括以下步骤:步骤一:检测待测胡萝卜的所述SSR位点的基因型;步骤二:所述待测胡萝卜的品种判定:如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型,和胡萝卜标准品种中的某指定品种的基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测胡萝卜与所述胡萝卜标准品种的该指定品种判定为相似的品种;如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型,和胡萝卜标准品种中的某指定品种的基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2,则待测胡萝卜与所述胡萝卜标准品种的该指定品种判定为不同的品种;优选地,所述判定的结果是根据聚类分析得到的。

[0013] 在一些实施方式中,所述检测待测胡萝卜的SSR位点基因型步骤包括以下分步骤:分步骤一:分别以所述待测胡萝卜的基因组DNA和胡萝卜标准品种的基因组DNA为模板,分别采用所述SSR引物组合中的引物组的进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;分步骤二:对所述PCR扩增产物进行检测,获得所述待测胡萝卜和所述胡萝卜标准品种基于24个所述SSR位点的基因型。

[0014] 在一些实施方式中,所述分步骤二的检测方法包括:荧光信号检测:检测所述PCR扩增产物的荧光信号,获得所述待测胡萝卜和所述标准胡萝卜品种基于所述24个SSR位点的基因型;或:扩增产物片段检测:检测所述PCR扩增产物的片段大小,获得待测胡萝卜和标准胡萝卜品种基于所述24个SSR位点的基因型。

[0015] 在一些实施方式中,所述标准胡萝卜品种选自以下75个胡萝卜品种:

[0016] 欧防1号,紫色胡萝卜,紫龙胡萝卜,边杆红胡萝卜,齐头黄紫色胡萝卜,五寸参,红帅一号,日本小甜脆(迷你胡萝卜),西班牙黄色奶油胡萝卜,日本武藏野的春秋鼎盛,千寻

六寸,艳紫胡萝卜,兴运三红五寸参,金帝红笋胡萝卜,齐头黄,京红九寸参,三红八寸参,三红七寸参,三红七寸参胡萝卜,千红甜脆(冰糖胡萝卜),齐头黄胡萝卜,迷你胡萝卜,三红九寸参,韩育九寸参,三红八寸参二号,韩育齐头黄胡萝卜,藤原8号(红萝卜),红芯三红七寸参,法国富红八寸参,甜脆齐头黄,小顶八寸参,法兰德紫箭,丰收红,贝娅斯红福七寸,精选齐头黄(西洋黄参),三红五寸参,红星,红彩星,三红五寸胡萝卜,红胡萝卜,手指胡萝卜,红根胡萝卜(莫迪红胡萝卜),黄色胡萝卜(罗萨德胡萝卜),紫鸾胡萝卜,紫龙胡萝卜二号,黄石胡萝卜,拇指胡萝卜,艳紫新胡萝卜,玫瑰红胡萝卜,红太二号,胡萝卜杂交3号,华耐7号,红福212,胡萝卜C0-12,胡萝卜C0-13,胡萝卜C0-20,胡萝卜C0-21,华誉208,华誉218,华誉258,H1702,H1704,H1705,H1718,H1731,H1732,H1733,H1734,H1735,H1736,H1737,H1703,H1738,H1739,H1740。

[0017] 一种鉴定胡萝卜品种是否相同的检测方法,待测胡萝卜为两种未知品种的胡萝卜;所述检测方法包括:步骤一:检测所述待测胡萝卜的所述SSR位点的基因型;步骤二:所述待测胡萝卜的品种是否相同的判定:如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测胡萝卜判定为相似的品种;如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则待测胡萝卜判定为不同的品种。

[0018] 所述SSR位点,或所述SSR引物组合,或所述SSR试剂盒,或所述检测方法,在以下X1或X₂或X₃中的应用:X1:鉴定待测胡萝卜的品种是否属于标准胡萝卜品种中的某一种;X₂:鉴定待测胡萝卜的品种具体为标准胡萝卜品种中的哪一种;X₃:鉴定待测胡萝卜样本是否为相同的品种。

[0019] 本发明相比现有技术具有以下有益效果:

[0020] 1、本发明提供了一种可以快速,准确,稳定地进行品种真实性检测的SSR分子标记鉴定方法。本发明利用胡萝卜基因组数据与多分重测序数据进行了数据挖掘,选出了大量的候选SSR标记,并通过多重条件进行了筛选和优化工作,最终获得了一套可以稳定准确,简单高效的进行胡萝卜真实性鉴定的SSR分子标记。本发明SSR引物组合可用于对胡萝卜品种在种子或幼苗期进行早期鉴定,也可以进行自种子开始的全生命周期的真实性鉴定,保证品种的真实性,可以解决国内种子种苗市场的同名异种与同种异名问题,切实保护生产者和育种家的权益,并为胡萝卜种质资源和新品种保护提供强有力的技术支持。

[0021] 2、本发明提供的方法可以鉴定得出:待测胡萝卜品种是否属于标准胡萝卜品种中的某一种,以及具体是哪一种。故此方法可以对已知品种进行真实性鉴定,也可以对有标准样品的未知胡萝卜品种进行真实性鉴定;还可以鉴定两种未知的品种是否属于相似品种。

[0022] 3、本发明提供的方法具有高通量、准确、低成本、操作简单、节约人力、物力等优点,具有十分广阔的应用前景。

[0023] 4、本发明相比现有技术中其他SSR相关技术方案还有以下区别:①首先,植物大规模测序刚兴起没几年,之前的绝大部分SSR相关技术是没有参考基因组作为数据基础的,所以只能盲选,随机选,选出来的标记完全是看运气的,其潜在鉴别能力根本无从谈起。②本发明投入的大量劳动,对24份品种进行了重测序,并以这些数据作为数据基础,与参考基因组联合使用进行大数据分析,进行了海量的数据挖掘与计算,与其现有技术引用别人文献使用过的标记或者从某些免费数据库选标记是有本质区别的。③本发明采用育种专家提供的品种作为验证材料,使SSR标记的鉴别能力有充分保障。④由于本发明使用的数据挖掘

方法,所选出的SSR标记可以非常有效的代表全基因组信息,同时采用的胡萝卜品种材料涵盖了所有市售品种的类型,故而本发明所选出的SSR标记具有非常强的潜在鉴别未知胡萝卜品种的能力。

[0024] 5、本发明还有以下特点:①快速,通过本发明进行品种鉴定的时候,可以使用幼苗甚至种子直接提取的DNA进行检测,区别于DUS鉴定必须有成熟植株才能进行鉴定,将鉴定时间从几个月缩短到几个小时。②相对于表型鉴定方法,本发明基于DNA检测的鉴定方法不受外在环境的影响,不会因环境条件的变化而变化,其结果稳定可靠。③用本发明的方法进行鉴定,在胡萝卜的各个物候期进行鉴定,其结果稳定一致。④本发明的24个SSR位点均通过Target-seq测序检测,3730荧光毛细管检测以及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,多平台检测结果的高度一致,充分证明了本发明各SSR位点的可靠性。⑤相对于DUS测试,本发明的操作不需要长时间的经验积累。

附图说明

[0025] 图1为实施例1中建立在24个引物组上的75个供试胡萝卜品种的聚类图。

[0026] 图2-图25为实施例2中24个引物组在部分供试胡萝卜品种中的SSR分型效果图。

[0027] 其中,图2:引物为DcSSR083,采用的品种为贝亚思红福7寸,图3:引物为DcSSR027,采用的品种为紫龙胡萝卜,图4:引物为DcSSR112,采用的品种为胡萝卜杂交3号,图5:引物为DcSSR072,采用的品种为藤原8号,图6:引物为DcSSR105,采用的品种为迷你胡萝卜,图7:引物为DcSSR048,采用的品种为齐头黄紫色胡萝卜,图8:引物为DcSSR073,采用的品种为法国富红8寸参,图9:引物为DcSSR049,采用的品种为五寸参,图10:引物为DcSSR085,采用的品种为丰收红,图11:引物为DcSSR092,采用的品种为玫瑰红胡萝卜,图12:引物为DcSSR024,采用的品种为华誉208,图13:引物为DcSSR089,采用的品种为红彩星,图14:引物为DcSSR078,采用的品种为小顶8寸参,图15:引物为DcSSR109,采用的品种为齐头黄,图16:引物为DcSSR020,采用的品种为胡萝卜C0,图17:引物为DcSSR038,采用的品种为红胡萝卜,图18:引物为DcSSR110,采用的品种为千寻六寸,图19:引物为DcSSR043,采用的品种为欧防1号,图20:引物为DcSSR036,采用的品种为手指胡萝卜,图21:引物为DcSSR096,采用的品种为千红甜脆,图22:引物为DcSSR017,采用的品种为H1739,图23:引物为DcSSR014,采用的品种为H1702,图24:引物为DcSSR025,采用的品种为红太二号,图25:引物为DcSSR055,采用的品种为京红九寸参。

[0028] 图26为实施例2为SSR标记个数(即SSR位点个数)与区分75个供试胡萝卜品种的差异标记图。

具体实施方式

[0029] 定义如下:

[0030] 胡萝卜品种真实性:本质上是指一个胡萝卜品种与其遗传背景的真实对应性;在实际工作中,某供检品种是否具有真实性,是该指供检品种与文件记录(如品种说明书、标签等)是否相符。

[0031] 种间同源基因组片段:是指在Daucus carota参考基因组序列之外,其他品种的胡萝卜中与Daucus carota参考基因组序列同源的基因组片段。比如,就特定基因组片段,在

本发明的75个标准品种中与Daucus carota参考基因组序列存在相同的基因组片段。

[0032] 第一方面,本发明提供鉴定胡萝卜品种真实性的SSR位点,分别位于胡萝卜胡萝卜基因组,数量为24个,可选用其中的1个或多个,具体信息如表1所示。

[0033] 上述SSR位点选自如下第一SSR位点到第二十四SSR位点中的任1到24种:

[0034] 第一SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第7499095-7499106位,或其种间同源基因组片段;

[0035] 第二SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第36613402-36613411位,或其种间同源基因组片段;

[0036] 第三SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第33287904-33287919位,或其种间同源基因组片段;

[0037] 第四SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030386.1所述序列的第25850818-25850827位,或其种间同源基因组片段;

[0038] 第五SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第15004822-15004839位,或其种间同源基因组片段;

[0039] 第六SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030384.1所述序列的第28259340-28259354位,或其种间同源基因组片段;

[0040] 第七SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030386.1所述序列的第29640136-29640145位,或其种间同源基因组片段;

[0041] 第八SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030384.1所述序列的第29264089-29264103位,或其种间同源基因组片段;

[0042] 第九SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第12352369-12352378位,或其种间同源基因组片段;

[0043] 第十SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第35393957-35393970位,或其种间同源基因组片段;

[0044] 第十一SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第27935052-27935061位,或其种间同源基因组片段;

[0045] 第十二SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030387.1所述序列的第20723244-20723253位,或其种间同源基因组片段;

[0046] 第十三SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030386.1所述序列的第33583239-33583250位,或其种间同源基因组片段;

[0047] 第十四SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第25935567-25935581位,或其种间同源基因组片段;

[0048] 第十五SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第20936935-20936946位,或其种间同源基因组片段;

[0049] 第十六SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030383.1所述序列的第38294478-38294487位,或其种间同源基因组片段;

[0050] 第十七SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030389.1所述序列的第31015109-31015118位,或其种间同源基因组片段;

[0051] 第十八SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030384.1所述序列

的第12013711-12013722位,或其种间同源基因组片段;

[0052] 第十九SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030383.1所述序列的第29910830-29910855位,或其种间同源基因组片段;

[0053] 第二十SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030388.1所述序列的第19372226-19372235位,或其种间同源基因组片段;

[0054] 第二十一SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第2839462-2839471位,或其种间同源基因组片段;

[0055] 第二十二SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030381.1所述序列的第48784263-48784274位,或其种间同源基因组片段;

[0056] 第二十三SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030382.1所述序列的第29461594-29461608位,或其种间同源基因组片段;

[0057] 第二十四SSR位点,位于胡萝卜参考基因组中NCBI序列登录号NC_030385.1所述序列的第1774792-1774801位,或其种间同源基因组片段;

[0058] 上述胡萝卜参考基因组为*Daucus carota*。

[0059] 第二方面,本发明提供鉴定胡萝卜品种真实性的SSR引物组,可以通过PCR扩增反应得基于上述SSR位点的PCR扩增产物。

[0060] 上述SSR引物组合选自:第一SSR引物对至第二十四SSR引物对,分别用于PCR扩增上述第一SSR位点至第二十四SSR位点。上述第一SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第二SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第三SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第四SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第五SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第六SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第七SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第八SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第九SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十一SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十二SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十三SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的

核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第十四SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第十五SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第十六SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第十七SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第十八SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第十九SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第二十SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第二十一SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第二十二SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第二十三SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；上述第二十四SSR引物对，与序列表中的SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；。

[0061] 在优选的实施方式中，上述SSR引物组合选自引物组01-24中的一组或多组；上述引物组01-24的DNA序列信息如序列表SEQ ID:1-48所示，参见表2。上述引物组中，上游引物的5'端可带有荧光标签序列以便荧光PCR检测，例如NED、PET、VIC、FAM。

[0062] 第三方面，本发明提供鉴定胡萝卜品种真实性的SSR试剂盒，SSR试剂配制为PCR反应体系，该体系优选包括：

[0063]	反应组分	原浓度	在体系中的终浓度	体积 (μL)
	ddH ₂ O	—	—	6.6
	10×Buffer (不含 Mg ²⁺)	10×	1×	2.0
	MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.0
	dNTPs	2.5 mmol/L each	每种 dNTP 均为 0.15 mmol/L	1.2
	Taq 酶	5 U/μL	0.05U/μL	0.2
	引物	1.25 μmol/L	上下游引物均为 0.25 μmol/L	4.0
	DNA	50-150 ng/μL	10- 30 ng/μL	4.0
	总体积			20

[0064] 上述SSR引物组，上游引物和下游引物的终浓度之比为1:1。

[0065] 第四方面，本发明提供一种鉴定胡萝卜品种真实性的检测方法，包括以下步骤：

[0066] 步骤一：检测待测胡萝卜的SSR位点基因型。

[0067] 分步骤一:分别以上述待测胡萝卜的基因组DNA和胡萝卜标准品种的基因组DNA为模板,分别采用上述SSR引物组合中的引物组的进行PCR扩增反应,得到PCR扩增产物;

[0068] 分步骤二:对上述PCR扩增产物进行检测,获得待测胡萝卜和胡萝卜标准品种基于24个上述SSR位点的基因型。

[0069] 所述检测可以为荧光信号检测:检测上述PCR扩增产物的荧光信号,获得待测胡萝卜和标准胡萝卜品种基于上述24个SSR位点的基因型;

[0070] 上述检测也可以为扩增产物片段检测:利用毛细管电泳检测上述PCR扩增产物的片段大小,获得待测胡萝卜和标准胡萝卜品种基于上述24个SSR位点的基因型。

[0071] 步骤二:待测胡萝卜的品种判定步骤:

[0072] 通过聚类分析待测胡萝卜和标准胡萝卜品种,判断标准参考GB/T 3543.1、GB/T 3543.5、NY/T 2594,基于上述24个SSR位点的基因型得出结论以下结果:

[0073] 如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型,和胡萝卜标准品种中的某指定品种的基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测胡萝卜与所述胡萝卜标准品种的该品种属于相似的品种;

[0074] 如果所述待测胡萝卜基于所述24个SSR位点的基因型,和胡萝卜标准品种中的某指定品种的基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2,则待测胡萝卜与所述胡萝卜标准品种的该指定品种判定为不同的品种。

[0075] 上述PCR扩增反应的程序优选为:

[0076] 94℃预变性5min;94℃变性30s,60℃退火45s,72℃延伸45s,每循环降0.8℃,共12个循环;94℃变性30s,50℃退火45s,72℃延伸45s,共25个循环;72℃终延伸10min。扩增产物电泳前于-20℃或冰上保存。

[0077] 上述标准胡萝卜品种包括以下75个胡萝卜品种:

[0078] 欧防1号,紫色胡萝卜,紫龙胡萝卜,边杆红胡萝卜,齐头黄紫色胡萝卜,五寸参,红帅一号,日本小甜脆(迷你胡萝卜),西班牙黄色奶油胡萝卜,日本武藏野的春秋鼎盛,千寻六寸,艳紫胡萝卜,兴运三红五寸参,金帝红笋胡萝卜,齐头黄,京红九寸参,三红八寸参,三红七寸参,三红七寸参胡萝卜,千红甜脆(冰糖胡萝卜),齐头黄胡萝卜,迷你胡萝卜,三红九寸参,韩育九寸参,三红八寸参二号,韩育齐头黄胡萝卜,藤原8号(红萝卜),红芯三红七寸参,法国富红八寸参,甜脆齐头黄,小顶八寸参,法兰德紫箭,丰收红,贝娅斯红福七寸,精选齐头黄(西洋黄参),三红五寸参,红星,红彩星,三红五寸胡萝卜,红胡萝卜,手指胡萝卜,红根胡萝卜(莫迪红胡萝卜),黄色胡萝卜(罗萨德胡萝卜),紫鸾胡萝卜,紫龙胡萝卜二号,黄石胡萝卜,拇指胡萝卜,艳紫新胡萝卜,玫瑰红胡萝卜,红太二号,胡萝卜杂交3号,华耐7号,红福212,胡萝卜C0-12,胡萝卜C0-13,胡萝卜C0-20,胡萝卜C0-21,华誉208,华誉218,华誉258,H1702,H1704,H1705,H1718,H1731,H1732,H1733,H1734,H1735,H1736,H1737,H1703,H1738,H1739,H1740。

[0079] 第五方面,本发明提供一种鉴定胡萝卜品种是否相同的检测方法。

[0080] 其中,待测胡萝卜为两种未知品种的胡萝卜;

[0081] 该检测方法包括:

[0082] 步骤一:检测待测胡萝卜的上述24个SSR位点的基因型;检测方法如第四方面所述。

[0083] 步骤二:待测胡萝卜的品种(两个未知的胡萝卜品种)是否相同的判定:

[0084] 如果两个未知的胡萝卜品种基于上述24个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则两个未知的胡萝卜判定为相似的品种;

[0085] 如果两个未知的胡萝卜品种基于所述24个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则两个未知的胡萝卜判定为不同的品种。

[0086] 第六方面,本发明提供上述SSR位点,SSR引物组合,SSR试剂盒,述检测方法,在以下X1或X 2或X3中的应用:

[0087] X1:鉴定待测胡萝卜的品种是否属于标准胡萝卜品种中的某一种;

[0088] X2:鉴定待测胡萝卜的品种具体为标准胡萝卜品种中的哪一种;

[0089] X3:鉴定待测胡萝卜样本是否为相同的品种。

[0090] X1、X2和X3均属于鉴定胡萝卜品种真实性的应用。

[0091] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0092] 实施例1

[0093] 用于鉴定胡萝卜品种真实性的SSR引物组合的获得

[0094] 一、24个SSR位点的发现:这些位点是根据近缘种胡萝卜的参考基因组*Daucus carota*与24份种质资源全基因组重测序数据进行数据挖掘所获得的。

[0095] 1、区别于其他分子标记鉴定方法中,随机盲目选取SSR标记的方法,本发明使用胡萝卜参考基因组,并使用独有的,具有代表性的,24份胡萝卜品种重测序数据(重测序结果未公开),通过特定的大数据分析手段,对全基因组的SSR位点进行分析,通过PIC、MAF、序列保守性等一系列的筛选条件进行筛选,最终获得了一个SSR位点的集合,通过数据降维等手段选取能充分代表本作物基因组的SSR位点。通过Target-Seq简化测序技术,ABI3730荧光毛细管电泳等不同检测手段进行验证,最终结合24份实际材料选出了24个鉴别能力最强的SSR位点作为本发明中所使用的SSR位点。

[0096] 本发明基于24份胡萝卜代表资源的重测序数据,首次发现并获得24个SSR位点。这24份胡萝卜资源类型丰富,涵盖了市场上现有的胡萝卜主要的生态类型与农艺性状,尽可能多地体现了种质代表性,具有较高的遗传多样性。

[0097] 2、本发明的SSR位点的筛选包括以下步骤:

[0098] 首先通过24份胡萝卜材料的重测序结果,与*Daucus carota*参考基因组序列进行比对一共找到9398个SSR位点,根据筛选条件:数据缺失少于20%、杂合度低于15%、PIC大于0.25、两端150bp之内没有Indel没有SNP,剩余4913个SSR位点,最后按照数据降维方法选取最具代表性的SSR位点,最终剩余106个SSR位点。

[0099] 对75个品种(参见实施例2)使用这106对SSR引物进行扩增后,通过TargetSeq技术获得其SSR序列信息,并进行数据分析,去掉缺失比例大于10%的SSR位点数据剩余96个SSR位点作为备选位点。再使用minimal marker算法选出24个SSR位点,此算法优先考虑其对75个胡萝卜品种的鉴别能力,并综合考虑SSR位点多态性等条件。

[0100] 为了确定这24个SSR位点鉴别能力的可靠性,发明人重新设计适用于荧光毛细管电泳检测的引物,使用这24对引物对75个胡萝卜品种进行了PCR扩增,并使用AB 3730荧光

毛细管电泳系统进行片段长度检测,其结果证明所选24个SSR位点具有非常高的鉴别能力与可靠性。

[0101] 3、具体的,SSR位点的筛选标准如下:在全基因组范围内选择位置均匀、多态性好、杂合度小、MAF>0.3、PCA聚类效果好、区分度高且两翼150bp序列保守(无InDel,无SNP,无其它SSR)的SSR位点。24个SSR位点的基本信息详见表1。其中SSR位点的位置和motif信息是基于胡萝卜参考基因组序列比对确定的,所述胡萝卜 *Daucus carota* 参考基因组序列,网址参见:网址1:

[0102] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=LNRQ000000000>。表1中PIC值和主要等位变异扩增长度是根据实施例2的75个品种得到的。

[0103] 表1. 24个SSR位点的基本信息

[0104]	编号	SSR 位点名称	位点所在序列的 NCBI 登录号	起止位置(bp)	参考基因组 _motif	PIC	主要等位变异扩增长度 (bp)
	1	DcSSR083	NC_030387.1	7499095-7499106	(GCTAAA)2	0.35	91 85
	2	DcSSR027	NC_030382.1	36613402-36613411	(AC)5	0.31	91

[0105]

						93
						95
3	DcSSR112	NC_030389.1	33287904-33287919	(GT)8	0.31	102 104
4	DcSSR072	NC_030386.1	25850818-25850827	(AT)5	0.39	105 107
5	DcSSR105	NC_030389.1	15004822-15004839	(CTA)6	0.22	106 109
6	DcSSR048	NC_030384.1	28259340-28259354	(GGC)5	0.46	107 110
7	DcSSR073	NC_030386.1	29640136-29640145	(TC)5	0.27	148 162
8	DcSSR049	NC_030384.1	29264089-29264103	(TGC)5	0.32	150 153 159
9	DcSSR085	NC_030387.1	12352369-12352378	(GAACC)2	0.16	175 180 185
10	DcSSR092	NC_030387.1	35393957-35393970	(AT)7	0.05	155 177 171

[0106]

11	DcSSR024	NC_030382.1	27935052-27935061	(AG)5	0.40	182 184
12	DcSSR089	NC_030387.1	20723244-20723253	(TG)5	0.12	189 191
13	DcSSR078	NC_030386.1	33583239-33583250	(CA)6	0.33	190 192 194
14	DcSSR109	NC_030389.1	25935567-25935581	(GAA)5	0.33	193 199
15	DcSSR020	NC_030382.1	20936935-20936946	(TA)6	0.37	219 221 217
16	DcSSR038	NC_030383.1	38294478-38294487	(AT)5	0.30	217 221 225
17	DcSSR110	NC_030389.1	31015109-31015118	(AT)5	0.03	225 227
18	DcSSR043	NC_030384.1	12013711-12013722	(AC)6	0.38	244 248
19	DcSSR036	NC_030383.1	29910830-29910855	(AT)13	0.39	237 239 245

[0107]	20	DcSSR096	NC_030388.1	19372226-19372235	(TA)5	0.31	259 261
	21	DcSSR017	NC_030382.1	2839462-2839471	(CATAT)2	0.30	261 263
	22	DcSSR014	NC_030381.1	48784263-48784274	(AT)6	0.57	265 267 269
	23	DcSSR025	NC_030382.1	29461594-29461608	(AAG)5	0.27	295 304
	24	DcSSR055	NC_030385.1	1774792-1774801	(AC)5	0.21	355 367

[0108] 二、用于鉴定胡萝卜品种真实性的SSR引物组合的获得

[0109] 基于步骤一发现的24个SSR位点,本发明的发明人开发了具有较高的多态性信息量(即PIC值,PIC值指的是一个标记,用于在群体检测多态性的价值;PIC值取决于检测的等位基因的数目和等位基因它们的频率分布;PIC值等于1减去所有等位基因频率的平方的总和)的用于鉴定胡萝卜品种真实性的SSR引物组合。基于前述SSR位点在胡萝卜 *Daucus carota* 参考基因组序列中的上下游序列设计引物,SSR引物组合由24个引物组组成。每个引物组由2条引物序列组成,用于扩增一个SSR位点。24个引物组中各个引物的核苷酸序列如表2。

[0110] 表2. 24个引物组的信息

引物名称	引物编号	引物的核苷酸序列 (5'-3')	序列编号 (SEQ ID NO)	5'荧光修饰
DcSSR083	上游引物 01F	ACTAGCCCCGCATCTAAAACATATA	1	NED
	下游引物 01R	AGAAAGTTAAACCATATTCGATGCA	2	
DcSSR027	上游引物 02F	ATTCTAACGAGGATTCTAGTGGAGT	3	NED
	下游引物 02R	ACAGATAGAATAGTATGCTCTACACTCT	4	

[0112]

DcSSR112	上游引物 03F	ATTTATTGTGTTGCAAGACGTTGGG	5	PET
	下游引物 03R	CAAAAATAAAGGCCAAGGTACACCA	6	
DcSSR072	上游引物 04F	TAAGGATCTGCATTGCATTGATCAC	7	PET
	下游引物 04R	TATTAGGTGGCTGGTTAGTTGACTT	8	
DcSSR105	上游引物 05F	AGGCAGTAACAATCATGATAGTGAT	9	VIC
	下游引物 05R	GCACTTTACAACAATGACACCTGA	10	
DcSSR048	上游引物 06F	CTCTCACTCTATCCTATCAATCAAATTC	11	VIC
	下游引物 06R	GACCACCGTCTCTTCCGC	12	
DcSSR073	上游引物 07F	TCAGTCACTCTAGTAGCTCCTGTAA	13	FAM
	下游引物 07R	CCAGCCAGCAAAATTTTACCATT	14	
DcSSR049	上游引物 08F	CGAGATAACTGGTTGCATCATCATC	15	FAM
	下游引物 08R	CTTTTATGGCGTCGAATAGCATGAA	16	
DcSSR085	上游引物 09F	GGTTGAGCATTCGGTCGGTT	17	NED
	下游引物 09R	TCCAGAAAAATTCGGTTCTTAATGAAG	18	
DcSSR092	上游引物 10F	CCGTCGTTCCCCATTACTC	19	NED
	下游引物 10R	CCTCGTCTTTATAAACCTGCAAGT	20	
DcSSR024	上游引物 11F	TGAGTTCTATGTATGTGTTTGGTGC	21	PET
	下游引物 11R	TCGACCTCTCTTATTGCTGATTTCT	22	
DcSSR089	上游引物 12F	TCTTGTGAACTAATAAGAGGGGAAGA	23	VIC
	下游引物 12R	CGCATATAAAATTAAGCAAAATGTTAATATACA	24	
DcSSR078	上游引物 13F	CTCAAGTGCACCACCGATAAAATAT	25	PET
	下游引物 13R	TGAAAGGCCTATATCACTAGCTTGT	26	
DcSSR109	上游引物 14F	ACAGCAGGCTTAACATGTTTAACT	27	FAM
	下游引物 14R	GCAGATGCTTACAAGATGCAATTAT	28	
DcSSR020	上游引物 15F	TTACTTGGTCTTACTTTTGTGGCC	29	VIC
	下游引物 15R	CACATCCAGTTGGCTCTCTGTATAT	30	
DcSSR038	上游引物 16F	AATCTGACTTGCAAGAAAAGATGGT	31	NED
	下游引物 16R	CAAAATTGTGGACAGTGGATCTCAA	32	
DcSSR110	上游引物 17F	AACAATTTGTGAAAAGTGGTCAGGA	33	FAM
	下游引物 17R	GAATTGACTTGTCCGCCTTCATG	34	
DcSSR043	上游引物 18F	TCTTAGAAATTTGTCTGTCTGTGCA	35	NED
	下游引物 18R	TTGTTTTTGCATTGTCATACATGCC	36	
DcSSR036	上游引物 19F	TACTCGGTCTCAACTTGGGC	37	PET
	下游引物 19R	GTGTTACAAATCTACAATGACAGATGA	38	
DcSSR096	上游引物 20F	TGTA CTGGTGATATGTGCTTTAGGA	39	VIC

[0113]

DcSSR017	下游引物 20R	GTCGCTTTTCTTGTAGTGACATTAGA	40	PET
	上游引物 21F	TGTGAAATAAAGTGAAGTAGTTGAGAAGT	41	
DcSSR014	下游引物 21R	TCATATTCATGTGCTCCTATTTGCT	42	
	上游引物 22F	GCCATGTTGGTACAGAGGAAAAATT	43	FAM
DcSSR025	下游引物 22R	GCAATCCGTCCTTCTGTAATTAGCTC	44	
	上游引物 23F	TCAAGAAAAAGTTTAAACATAGTTGGGG	45	VIC
DcSSR055	下游引物 23R	TTTAAACCAATTTTAGATAAAGCACCTC	46	
	上游引物 24F	ACAATTGATGGTTACAGTGAGGAGT	47	FAM
	下游引物 24R	TGCTGATGTTTGCATGAAATTTTC	48	

[0114] 实施例2

[0115] 本实施例为实施例1开发的SSR引物组合的有效性检验。

[0116] 本实施例的75个供试胡萝卜品种均为常见的优良品种或部分国外引进品种,来源均为市售。具体品种如下:

[0117]

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
HLB1	欧防 1 号	市售品种	HLB39	三红五寸胡萝卜	市售品种
HLB2	紫色胡萝卜	市售品种	HLB40	红胡萝卜	市售品种
HLB3	紫龙胡萝卜	市售品种	HLB41	手指胡萝卜	市售品种
HLB4	边杆红胡萝卜	市售品种	HLB42	红根胡萝卜(莫迪红胡萝卜)	市售品种
HLB5	齐头黄紫色胡萝卜	市售品种	HLB43	黄色胡萝卜(罗萨德胡萝卜)	市售品种
HLB6	五寸参	市售品种	HLB44	紫鸢胡萝卜	市售品种
HLB7	红帅一号	市售品种	HLB45	紫龙胡萝卜二号	市售品种
HLB8	日本小甜脆(迷你胡萝卜)	市售品种	HLB46	黄石胡萝卜	市售品种
HLB9	西班牙黄色奶油胡萝卜	市售品种	HLB47	拇指胡萝卜	市售品种
HLB10	日本武藏野的春秋鼎盛	市售品种	HLB48	艳紫新胡萝卜	市售品种
HLB11	千寻六寸	市售品种	HLB49	玫瑰红胡萝卜	市售品种
HLB12	艳紫胡萝卜	市售品种	HLB50	红太二号	市售品种
HLB13	兴运三红五寸参	市售品种	HLB51	胡萝卜杂交 3 号	市售品种
HLB14	金帝红笋胡萝卜	市售品种	HLB52	华耐 7 号	市售品种
HLB15	齐头黄	市售品种	HLB53	红福 212	市售品种

[0118]

HLB16	京红九寸参	市售品种	HLB54	胡萝卜 C0-12	市售品种
HLB17	三红八寸参	市售品种	HLB55	胡萝卜 C0-13	市售品种
HLB18	三红七寸参	市售品种	HLB56	胡萝卜 C0-20	市售品种
HLB19	三红七寸参胡萝卜	市售品种	HLB57	胡萝卜 C0-21	市售品种
HLB20	千红甜脆（冰糖胡萝卜）	市售品种	HLB58	华誉 208	市售品种
HLB21	齐头黄胡萝卜	市售品种	HLB59	华誉 218	市售品种
HLB22	迷你胡萝卜	市售品种	HLB60	华誉 258	市售品种
HLB23	三红九寸参	市售品种	HLB61	H1702	市售品种
HLB24	韩育九寸参	市售品种	HLB62	H1704	市售品种
HLB25	三红八寸参二号	市售品种	HLB63	H1705	市售品种
HLB26	韩育齐头黄胡萝卜	市售品种	HLB64	H1718	市售品种
HLB27	藤原 8 号（红萝卜）	市售品种	HLB65	H1731	市售品种
HLB28	红芯三红七寸参	市售品种	HLB66	H1732	市售品种
HLB29	法国富红八寸参	市售品种	HLB67	H1733	市售品种
HLB30	甜脆齐头黄	市售品种	HLB68	H1734	市售品种
HLB31	小顶八寸参	市售品种	HLB69	H1735	市售品种
HLB32	法兰德紫箭	市售品种	HLB70	H1736	市售品种
HLB33	丰收红	市售品种	HLB71	H1737	市售品种
HLB34	贝娅斯红福七寸	市售品种	HLB72	H1703	市售品种
HLB35	精选齐头黄（西洋黄参）	市售品种	HLB73	H1738	市售品种
HLB36	三红五寸参	市售品种	HLB74	H1739	市售品种
HLB37	红星	市售品种	HLB75	H1740	市售品种
HLB38	红彩星	市售品种			

[0119] 1、供试胡萝卜品种的基因组DNA的获得

[0120] 采用CTAB法分别提取75个供试胡萝卜品种的叶片（混取30粒种子的真叶，即每个品种取30粒种子长出来的真叶，指的是：同一品种取30个不同植株的真叶混合）的基因组DNA，得到供试胡萝卜品种的基因组DNA。

[0121] 上述CTAB法的操作具体为：

[0122] 分别摘取幼苗期的上述75个品种的叶片，置于冷冻干燥仪（CoolSafe 55-4）中脱水；然后用高通量研磨仪（Geno/Grind6875）打碎叶片，再取240mg叶片干粉，向其中加入800 μ L CTAB提取液（2%CTAB, 1.4mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH8.0, 24mM EDTA pH8.0, 1%PVP-40, 0.2% β -巯基乙醇），混匀，于65℃水浴30min，加入等体积的氯仿/异戊醇（v:v=24:1），在10000rpm/min条件下离心10分钟，吸取上清液转移至新的离心管中，加入0.8倍体积预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀，-24℃放置30min后在4℃、12,000r/min离心10min。弃上清液，加入70%乙醇溶液洗涤2遍，自然条件下干燥加100 μ L ddH₂O溶解DNA，得到供试胡萝卜品种基因组DNA，检测浓度后4℃备用。

[0123] 供试胡萝卜品种的基因组DNA的质量和浓度均须满足PCR要求,达标标准为:紫外分光光度计Nanodrop2400 (Thermo) 检测A260/A280比值在1.8左右,A260/A230比值大于1.8;供试胡萝卜品种的基因组DNA的浓度在30-50ng/ μ L。

[0124] 2、分别以75个供试胡萝卜品种的基因组DNA为模板,分别采用24个引物组进行PCR扩增,得到PCR扩增产物。各个PCR反应体系中,名称中含有“F”的引物和名称中含有“R”的引物浓度比为1:1。

[0125] 反应体系包括:

[0126] 上游引物(名称中含有“F”)和下游引物(名称中含有“R”)在体系中浓度之比为1:1。

反应组分	原浓度	体系中的终浓度	体积 (μ L)
ddH ₂ O	—	—	6.6
10×Buffer (不含 Mg ²⁺)	10×	1×	2.0
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.0
dNTPs	2.5 mmol/L each	每种 dNTP 0.15 mmol/L	1.2
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05U/ μ L	0.2
引物	1.25 μ mol/L	上下游引物均为 0.25 μ mol/L	4.0
DNA	50-150 ng/ μ L	10- 30 ng/ μ L	4.0
总体积			20

[0127] 反应程序为:预变性:94℃5min;扩增:94℃变性30s,60℃退火45s,72℃延伸45s,每循环降0.8℃,共12个循环;94℃变性30s,50℃退火45s,72℃延伸45s,共25个循环;终延伸:72℃10min。形成的扩增产物电泳前于4℃保存。

[0128] 3、荧光毛细管电泳

[0129] 完成步骤2后,根据SSR分子标记扩增片段大小的不同,可以根据不同仪器选用多个引物组合进行电泳。按照预先确定的组合引物,分别取等体积同一组合引物的不同荧光标记的扩增产物,TAMRA稀释50倍,其它荧光产物稀释100倍后充分混匀。从混合液中吸取1 μ L,加入到DNA分析仪专用上样板孔中。各孔再分别加入0.1 μ L分子量内标和8.9 μ L去离子甲酰胺,在PCR仪上95℃变性5min,取出立即置-20℃冰箱内或冰上,冷却5min。瞬时离心10s后置放到DNA分析仪上。开始检测。

[0130] 部分结果见图2-25。结果表明,各个引物组在供试胡萝卜品种中可以得到很好的分型效果。

[0131] 4、聚类分析

[0132] 根据75个供试胡萝卜品种基于24个SSR位点的基因型,利用MEGA7软件对75个供试胡萝卜品种进行聚类分析。

[0133] 建立在24个引物组上的75个供试胡萝卜品种的聚类图如图1所示。结果表明,24个引物组可以完全区分75个供试胡萝卜品种。由此可见,实施例1开发的SSR引物组合可以应用于胡萝卜品种DNA指纹数据库构建和品种真实性鉴定。

[0134] 5、效率评价

[0135] 品种真实性鉴定可以采用序贯分析方式减少工作量。本发明的发明人比较了SSR

标记个数(即引物组数)与区分75个供试胡萝卜品种区分率的关系。

[0137] 如图26所示的75个品种两两之间比较并统计的差异标记数,其中两两之间比较的结果的个数为 $C_{75}^2=75 \times 74 \div 2=2775$ 个;在这些结果中,差异位点个数为5的约占总数的1.3%,差异位点个数为6的约占总数的4.2%,差异位点个数为7的约占总数的6.8%,差异位点个数为8的约占总数的10.4%,差异位点个数为9的约占总数的13.5%,差异位点个数为10的约占总数的14.4%,差异位点个数为11的约占总数的12.2%,差异位点个数为12的约占总数的7.9%,差异位点个数为13的约占总数的4.3%,差异位点个数为14的约占总数的2.0%,差异位点个数为15的约占总数的1.2%,此结果说明用这些标记在75个品种的多态性好;24个引物组(即24个SSR标记个数)在75个供试胡萝卜品种中的区分率达到100%。

[0138] 实施例3

[0139] 本实施例是检测待测胡萝卜品种是否属于75个供试胡萝卜品种中的品种的方法,该待测胡萝卜的品种未知,需要经过本实施例的检测方法得到该待测胡萝卜的品种是否是这75个品种之一。

[0140] 1、待测胡萝卜品种的基因组DNA的获得

[0141] 待测胡萝卜品种的叶片取自北京市农林科学院蔬菜研究中心试验基地。

[0142] 按照实施例2中的步骤1的方法,将“供试胡萝卜品种的叶片”替换为“待测胡萝卜品种的叶片”,其它步骤均不变,得到待测胡萝卜品种的基因组DNA。

[0143] 2、SSR引物及PCR反应体系的配置

[0144] 按照实施例2中的步骤2的方法,将“供试胡萝卜品种的基因组DNA”替换为“待测胡萝卜品种的基因组DNA”,其它步骤均不变,得到待测胡萝卜品种的PCR产物。

[0145] 3、荧光毛细管电泳检测

[0146] 取待测胡萝卜品种的PCR产物。

[0147] 将待测胡萝卜品种的24个SSR扩增产物的片段大小分别与实施例2的75个供试胡萝卜品种的24个SSR位点进行对比,统计待测胡萝卜品种和24个标准胡萝卜品种的差异位点数,然后进行如下判断:

[0148] 如果待测胡萝卜品种与某标准胡萝卜品种的差异位点数为2个以上,则待测胡萝卜品种和该标准胡萝卜品种判定为不同的胡萝卜品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远。

[0149] 如果待测胡萝卜品种与某标准胡萝卜品种的差异位点数为0-2,则待测胡萝卜品种和该标准胡萝卜品种判定为相似的胡萝卜品种。

[0150] 结果表明,待测胡萝卜品种在24个SSR位点上与75个供试胡萝卜品种的差异位点数均为3个以上,因此,待测胡萝卜品种不属于75个供试胡萝卜品种中的任何一个品种,即待测胡萝卜品种并不是上述75个供试胡萝卜品种之一。

[0151] 实施例4

[0152] 本实施例是采用毛细管电泳对比片段大小来判定胡萝卜品种,而不是采用荧光信号判定。

[0153] 本案例是以ABI 3730荧光毛细管检测平台为参考,如使用其他平台则根据设备操作要求做相应调整。

[0154] 根据SSR分子标记扩增片段大小的不同,可以根据不同仪器选用多个引物组合进

行电泳。

[0155] S1:按照预先确定的组合引物,分别取等体积同一组合引物的不同荧光标记的扩增产物,稀释后充分混匀。从混合液中吸取1 μ L,加入到DNA分析仪专用上样板孔中。各孔再分别加入0.1 μ L分子量内标和8.9 μ L去离子甲酰胺,在PCR仪上95 $^{\circ}$ C变性1min,取出立即置冰上,冷却5min。瞬时离心10s后置放到DNA分析仪上。

[0156] S2:打开ABI 3730DNA分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。将装有样品的上样板放置于样品架基座上,将装有电极缓冲液的buffer板放置于buffer板架基座上,打开数据收集软件,按照DNA分析仪的使用手册进行操作。DNA分析仪将自动运行参数,并保存电泳原始数据。检测荧光引物所用激发波长及颜色参照仪器默认值。

[0157] S3:导出电泳原始数据文件,采用数据分析软件按照下列步骤进行数据甄别:在数据分析软件中预先设置好SSR引物名称及荧光类别、分子量内标、相应引物的扩增片段大小;将电泳原始数据文件导入分析软件,选择panel、分子量内标、Bin、质量控制参数等进行分析;分析软件会对检测质量赋以颜色标志进行评分,绿色表示质量可靠无需干预,红色表示质量不过关或未落入规定片段大小范围内,黄色表示有疑问需要查验原始图像进行确认。

[0158] S4:分别通过同时进行试验的标准样品、参照样品(依据引物选择少量的对照),校准不同电泳板间的数据偏差后再读取扩增片段大小。甄别后的特异峰如果落入规定的片段大小范围内,则直接读取扩增片段大小;若其峰大多不在规定范围内,可将其整体平移尽量使峰落设置范围内后读取数据。

[0159] S5:将待测胡萝卜品种的24个SSR扩增产物的片段大小分别与75个供试胡萝卜品种的24个SSR位点进行对比,统计待测胡萝卜品种和24个标准胡萝卜品种的差异位点数,然后进行如下判断:

[0160] 如果待测胡萝卜品种与某标准胡萝卜品种的差异位点数为2个以上,则待测胡萝卜品种和该标准胡萝卜品种判定为不同的胡萝卜品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远。

[0161] 如果待测胡萝卜品种与某标准胡萝卜品种的差异位点数为0-2个,则待测胡萝卜品种和该标准胡萝卜品种判定为胡萝卜相似的品种。

[0162] 实施例5

[0163] 本实施例是检测两个未知的胡萝卜品种是否为同一种,本实施例的待测胡萝卜品种为两个未知的胡萝卜品种。

[0164] 1、待测胡萝卜品种的基因组DNA的获得

[0165] 分别取两个待测胡萝卜品种的叶片,采用CTAB法分别提取这两个待测胡萝卜品种的基因组DNA,该CTAB法的操作见实施例2,得到待测胡萝卜品种的基因组DNA。

[0166] 2、SSR引物及PCR反应体系的配置

[0167] 按照实施例2中的步骤2的方法,将“供试胡萝卜品种的基因组DNA”替换为“待测胡萝卜品种的基因组DNA”,其它步骤均不变,得到待测胡萝卜品种的PCR产物。

[0168] 3、荧光毛细管电泳检测和数据记录

[0169] 步骤2的PCR反应完成后,对PCR产物根据不同引物的主要等位变异扩增长度的不同,结合检测设备进行分组电泳,检测其PCR产物的片段大小并进行数据记录,其记录方法

为:某样品在某个位点仅出现1个等位变异,大小为150bp,则在该位点的主要等位变异的基因型写作150/150;某样品在某个位点有两个等位变异,大小分别为141bp、150bp,则在该位点的主要等位变异的基因型写作141/150。

[0170] 4、在步骤3中分别获得两个未知胡萝卜品种(待测胡萝卜品种)的24个SSR位点数据,分别对比两个未知胡萝卜品种在相同上述24个SSR位点中每个SSR位点上的数据,记录有差异位点的个数。

[0171] 如果两个未知胡萝卜品种在上述24个SSR位点的差异位点数为2个以上,则两个未知胡萝卜品种判定为不同的胡萝卜品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远;

[0172] 如果两个未知胡萝卜品种在上述24个SSR位点的异位点数为0-2个,则两个未知胡萝卜品种判定为相似的胡萝卜品种。

[0173] 最后所应说明的是,以上具体实施方式仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京市农林科学院
- [0003] <120> 一种鉴定胡萝卜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合
- [0004] <141> 2020-02-28
- [0005] <160> 48
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 25
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] actagcccccg catctaaaac atata 25
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 25
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> Artificial Sequence
- [0017] <400> 2
- [0018] agaaagttaa accatattcg atgca 25
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 25
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Artificial Sequence
- [0023] <400> 3
- [0024] attctaacga ggattctagt ggagt 25
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 28
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <400> 4
- [0030] acagatagaa tagtatgctc tacactct 28
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 25
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <400> 5
- [0036] atttattgtg ttgcaagacg ttggg 25
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 25

[0039] <212> DNA
[0040] <213> Artificial Sequence
[0041] <400> 6
[0042] caaaaataaa ggccaaggta cacca 25
[0043] <210> 7
[0044] <211> 25
[0045] <212> DNA
[0046] <213> Artificial Sequence
[0047] <400> 7
[0048] taaggatctg cattgcattg atcac 25
[0049] <210> 8
[0050] <211> 25
[0051] <212> DNA
[0052] <213> Artificial Sequence
[0053] <400> 8
[0054] tattaggtgg ctggttagtt gactt 25
[0055] <210> 9
[0056] <211> 25
[0057] <212> DNA
[0058] <213> Artificial Sequence
[0059] <400> 9
[0060] aggcagtaac aatcatgata gtgat 25
[0061] <210> 10
[0062] <211> 25
[0063] <212> DNA
[0064] <213> Artificial Sequence
[0065] <400> 10
[0066] gcacttttac aacaatgaca cctga 25
[0067] <210> 11
[0068] <211> 28
[0069] <212> DNA
[0070] <213> Artificial Sequence
[0071] <400> 11
[0072] ctctcactct atcctatcaa tcaaattc 28
[0073] <210> 12
[0074] <211> 18
[0075] <212> DNA
[0076] <213> Artificial Sequence
[0077] <400> 12

[0078] gaccaccgtc tcttccgc 18
[0079] <210> 13
[0080] <211> 25
[0081] <212> DNA
[0082] <213> Artificial Sequence
[0083] <400> 13
[0084] tcagtcactc tagtagctcc tgtaa 25
[0085] <210> 14
[0086] <211> 25
[0087] <212> DNA
[0088] <213> Artificial Sequence
[0089] <400> 14
[0090] ccagccagca aaatttttac cattt 25
[0091] <210> 15
[0092] <211> 25
[0093] <212> DNA
[0094] <213> Artificial Sequence
[0095] <400> 15
[0096] cgagataact ggttgcata tcata 25
[0097] <210> 16
[0098] <211> 25
[0099] <212> DNA
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <400> 16
[0102] cttttatggc gtcgaatagc atgaa 25
[0103] <210> 17
[0104] <211> 20
[0105] <212> DNA
[0106] <213> Artificial Sequence
[0107] <400> 17
[0108] ggtagagcat tcggtcggtt 20
[0109] <210> 18
[0110] <211> 27
[0111] <212> DNA
[0112] <213> Artificial Sequence
[0113] <400> 18
[0114] tccagaaaaa ttcggttctt aatgaag 27
[0115] <210> 19
[0116] <211> 19

[0117]	<212> DNA
[0118]	<213> Artificial Sequence
[0119]	<400> 19
[0120]	ccgtcgttcc ccattactc 19
[0121]	<210> 20
[0122]	<211> 25
[0123]	<212> DNA
[0124]	<213> Artificial Sequence
[0125]	<400> 20
[0126]	cctcgttctt tataaacctg caagt 25
[0127]	<210> 21
[0128]	<211> 25
[0129]	<212> DNA
[0130]	<213> Artificial Sequence
[0131]	<400> 21
[0132]	tgagttctat gtatgtgttt ggtgc 25
[0133]	<210> 22
[0134]	<211> 25
[0135]	<212> DNA
[0136]	<213> Artificial Sequence
[0137]	<400> 22
[0138]	tcgacctctc ttattgctga tttct 25
[0139]	<210> 23
[0140]	<211> 27
[0141]	<212> DNA
[0142]	<213> Artificial Sequence
[0143]	<400> 23
[0144]	tcttggtgaa ctaataagag gggaaga 27
[0145]	<210> 24
[0146]	<211> 33
[0147]	<212> DNA
[0148]	<213> Artificial Sequence
[0149]	<400> 24
[0150]	cgcataaaa attaagcaaa atgttaatat aca 33
[0151]	<210> 25
[0152]	<211> 25
[0153]	<212> DNA
[0154]	<213> Artificial Sequence
[0155]	<400> 25

[0156] ctcaagtgca ccaccgataa aatat 25
[0157] <210> 26
[0158] <211> 25
[0159] <212> DNA
[0160] <213> Artificial Sequence
[0161] <400> 26
[0162] tgaaaggcct atatcactag cttgt 25
[0163] <210> 27
[0164] <211> 25
[0165] <212> DNA
[0166] <213> Artificial Sequence
[0167] <400> 27
[0168] acagcaggct taacatgttt taact 25
[0169] <210> 28
[0170] <211> 25
[0171] <212> DNA
[0172] <213> Artificial Sequence
[0173] <400> 28
[0174] gcagatgctt acaagatgca attat 25
[0175] <210> 29
[0176] <211> 25
[0177] <212> DNA
[0178] <213> Artificial Sequence
[0179] <400> 29
[0180] ttacttggtc ttacttttgt tggcc 25
[0181] <210> 30
[0182] <211> 25
[0183] <212> DNA
[0184] <213> Artificial Sequence
[0185] <400> 30
[0186] cacatccagt tggctctctg tatat 25
[0187] <210> 31
[0188] <211> 25
[0189] <212> DNA
[0190] <213> Artificial Sequence
[0191] <400> 31
[0192] aatctgactt gcaagaaaag atggt 25
[0193] <210> 32
[0194] <211> 25

[0195] <212> DNA
[0196] <213> Artificial Sequence
[0197] <400> 32
[0198] caaaattgtg gacagtggat ctcaa 25
[0199] <210> 33
[0200] <211> 25
[0201] <212> DNA
[0202] <213> Artificial Sequence
[0203] <400> 33
[0204] aacaatttgt gaaaactggc cagga 25
[0205] <210> 34
[0206] <211> 23
[0207] <212> DNA
[0208] <213> Artificial Sequence
[0209] <400> 34
[0210] gaattgactt gtccgccttc atg 23
[0211] <210> 35
[0212] <211> 25
[0213] <212> DNA
[0214] <213> Artificial Sequence
[0215] <400> 35
[0216] tcttagaaat ttgtctgtct gtgca 25
[0217] <210> 36
[0218] <211> 25
[0219] <212> DNA
[0220] <213> Artificial Sequence
[0221] <400> 36
[0222] ttgtttttgc attgtcatac atgcc 25
[0223] <210> 37
[0224] <211> 20
[0225] <212> DNA
[0226] <213> Artificial Sequence
[0227] <400> 37
[0228] tactcggctc caacttgggc 20
[0229] <210> 38
[0230] <211> 28
[0231] <212> DNA
[0232] <213> Artificial Sequence
[0233] <400> 38

[0234] gtgttacaaa ttctacaatg acagatga 28
[0235] <210> 39
[0236] <211> 25
[0237] <212> DNA
[0238] <213> Artificial Sequence
[0239] <400> 39
[0240] tgtactgggtg atatgtgctt tagga 25
[0241] <210> 40
[0242] <211> 26
[0243] <212> DNA
[0244] <213> Artificial Sequence
[0245] <400> 40
[0246] gtcgcttttcc ttgtagtgac attaga 26
[0247] <210> 41
[0248] <211> 29
[0249] <212> DNA
[0250] <213> Artificial Sequence
[0251] <400> 41
[0252] tgtgaaataa agtgaagtag ttgagaagt 29
[0253] <210> 42
[0254] <211> 25
[0255] <212> DNA
[0256] <213> Artificial Sequence
[0257] <400> 42
[0258] tcatattcat gtgctcctat ttgct 25
[0259] <210> 43
[0260] <211> 25
[0261] <212> DNA
[0262] <213> Artificial Sequence
[0263] <400> 43
[0264] gccatgttgg tacagaggaa aaatt 25
[0265] <210> 44
[0266] <211> 25
[0267] <212> DNA
[0268] <213> Artificial Sequence
[0269] <400> 44
[0270] gcaatccgtc ttctgtaatt agctc 25
[0271] <210> 45
[0272] <211> 28

[0273] <212> DNA
[0274] <213> Artificial Sequence
[0275] <400> 45
[0276] tcaagaaaaa gtttaaacaat agttgggg 28
[0277] <210> 46
[0278] <211> 28
[0279] <212> DNA
[0280] <213> Artificial Sequence
[0281] <400> 46
[0282] tttaaaccacaa ttttagataa agcacctc 28
[0283] <210> 47
[0284] <211> 25
[0285] <212> DNA
[0286] <213> Artificial Sequence
[0287] <400> 47
[0288] acaattgatg gttacagtga ggagt 25
[0289] <210> 48
[0290] <211> 25
[0291] <212> DNA
[0292] <213> Artificial Sequence
[0293] <400> 48
[0294] tgctgatgtt tgcgatgaaa ttttc 25

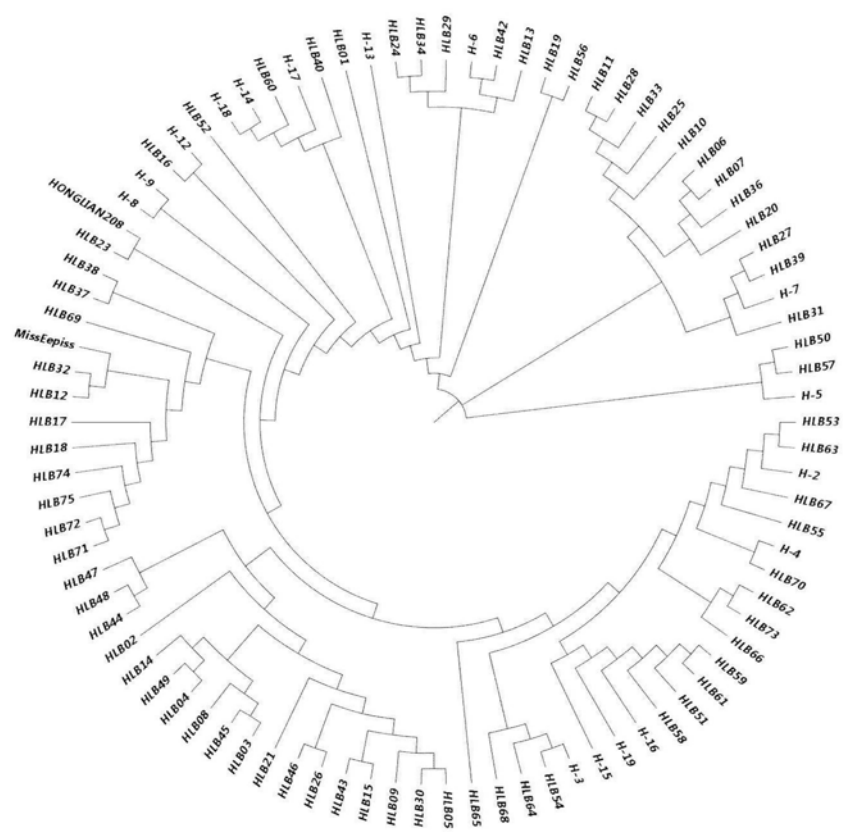


图1

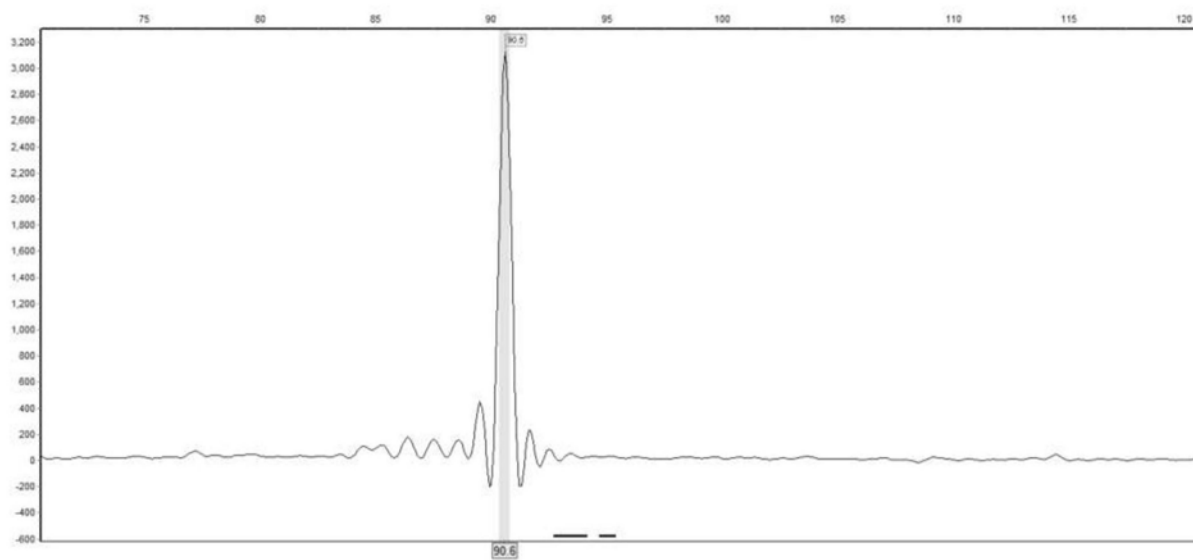


图2

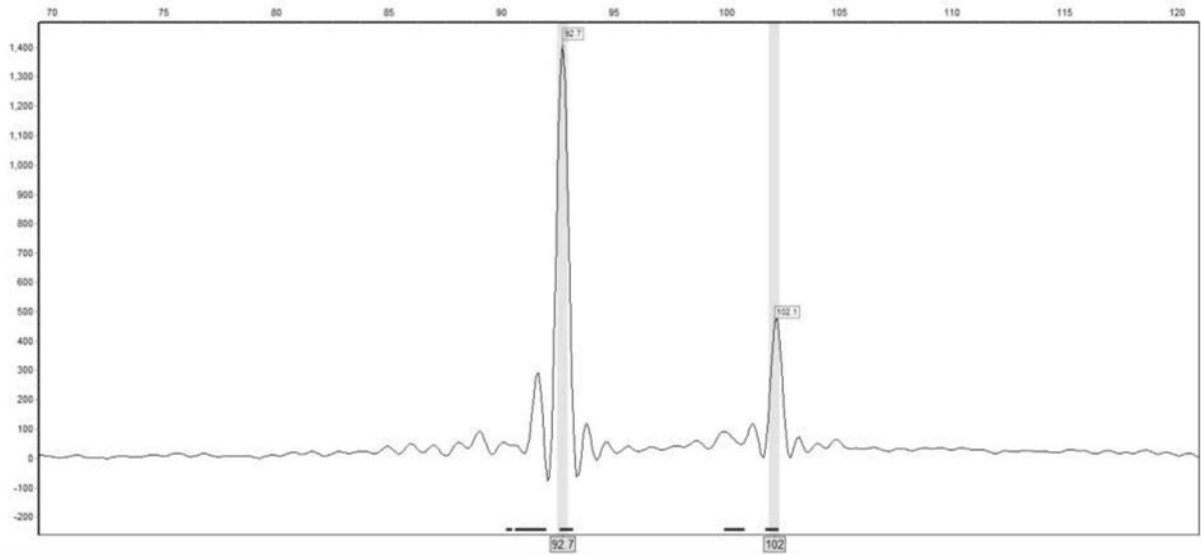


图3

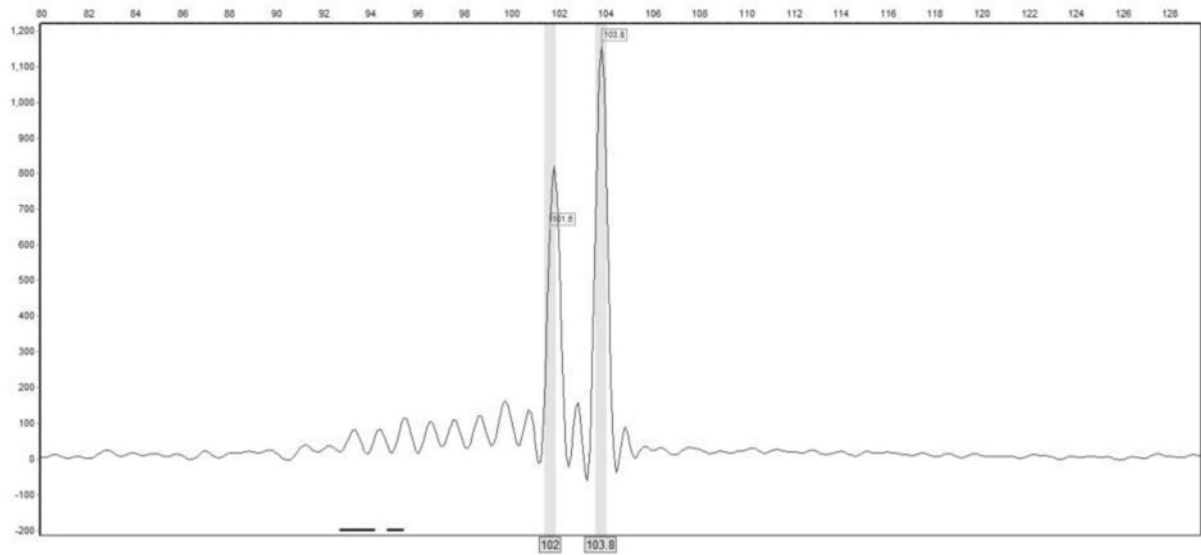


图4

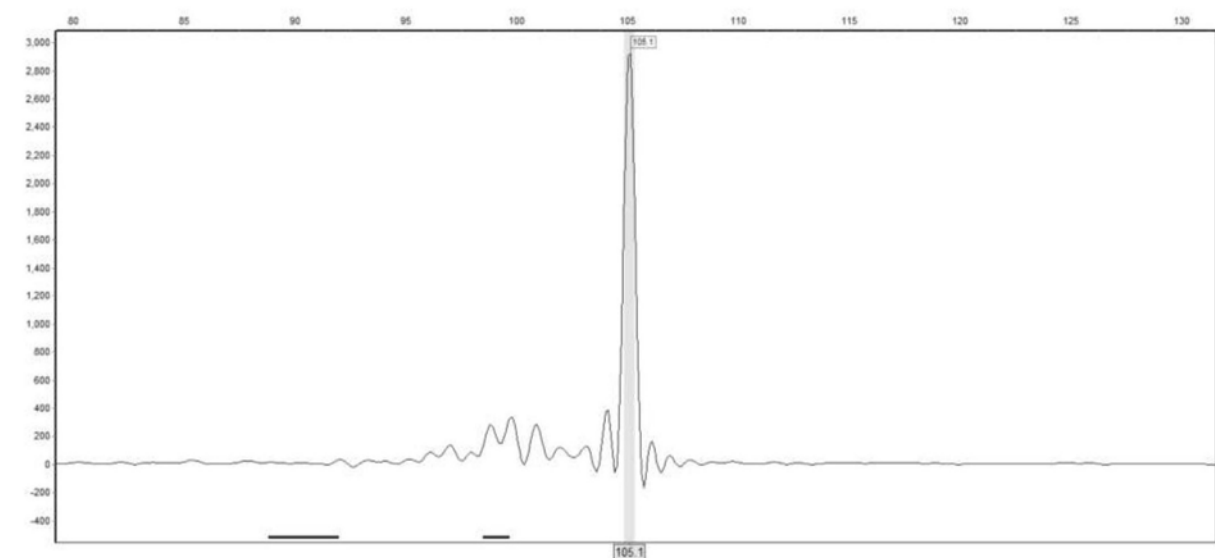


图5

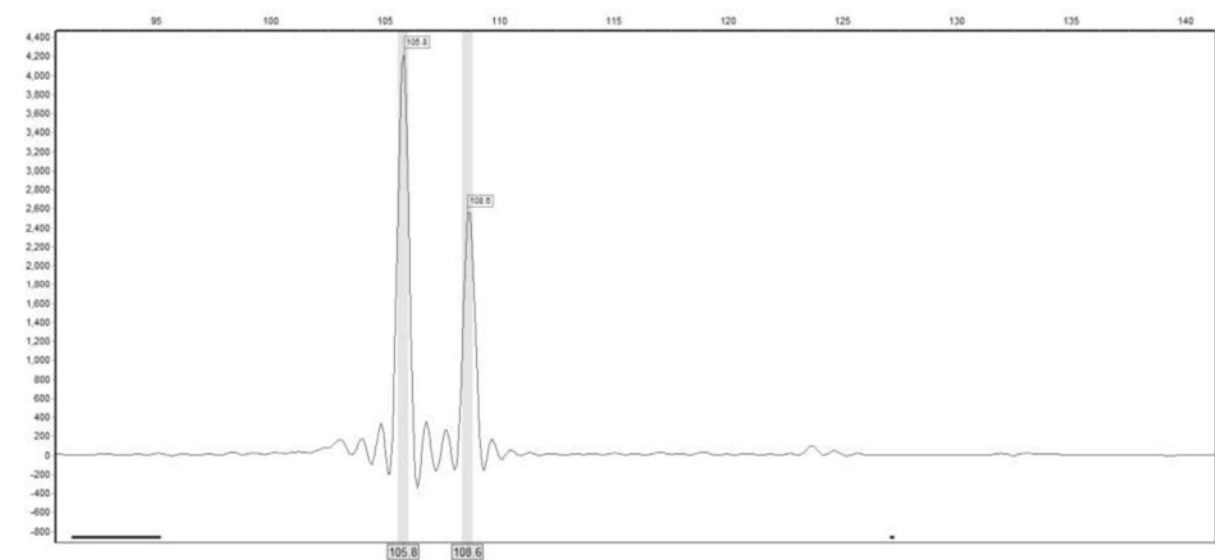


图6

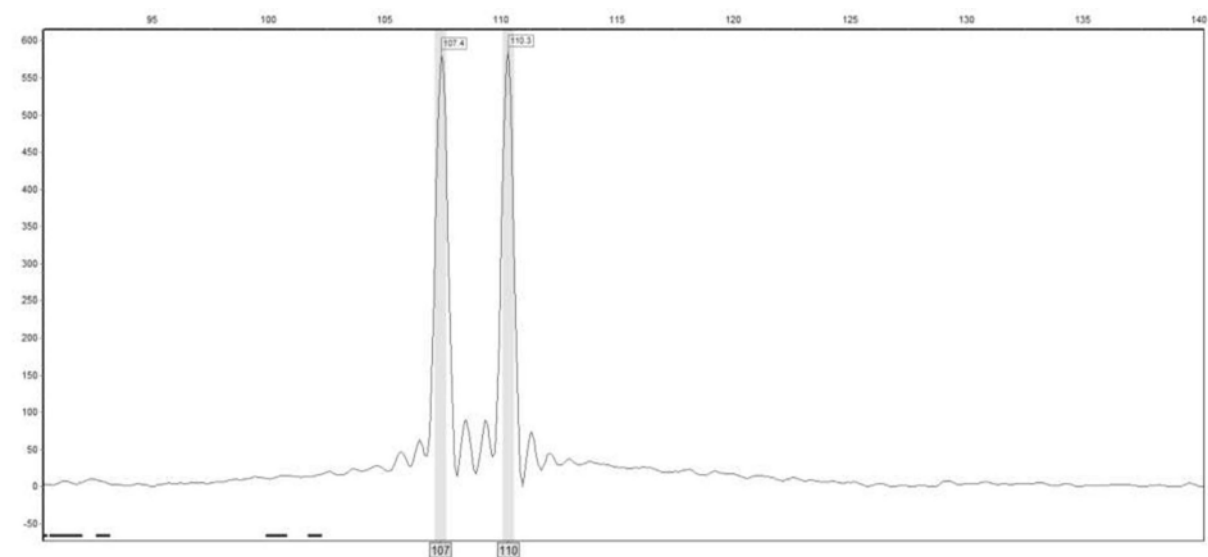


图7

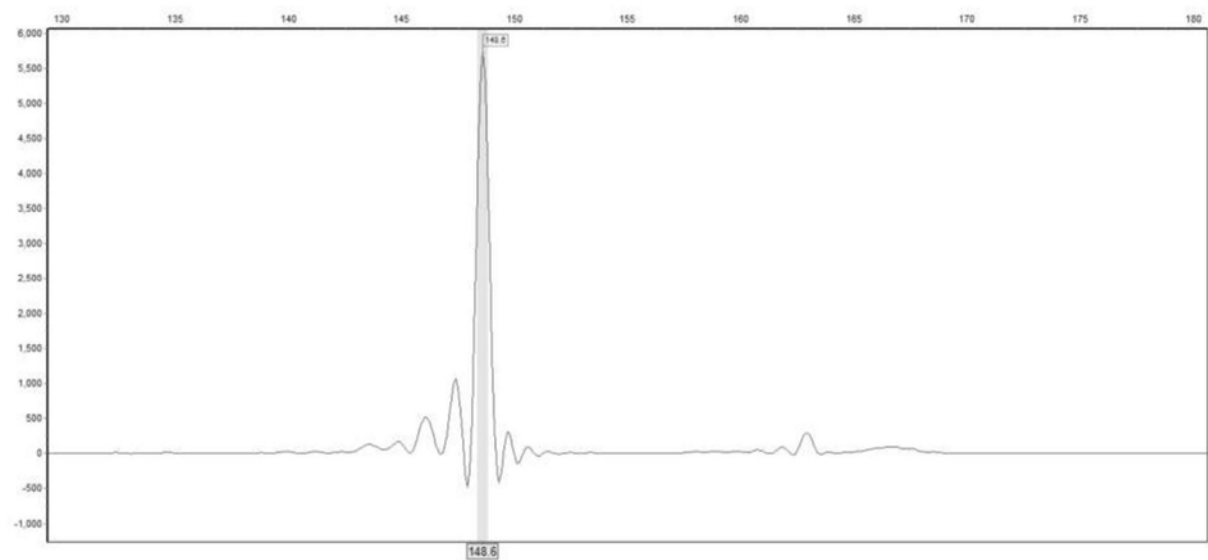


图8

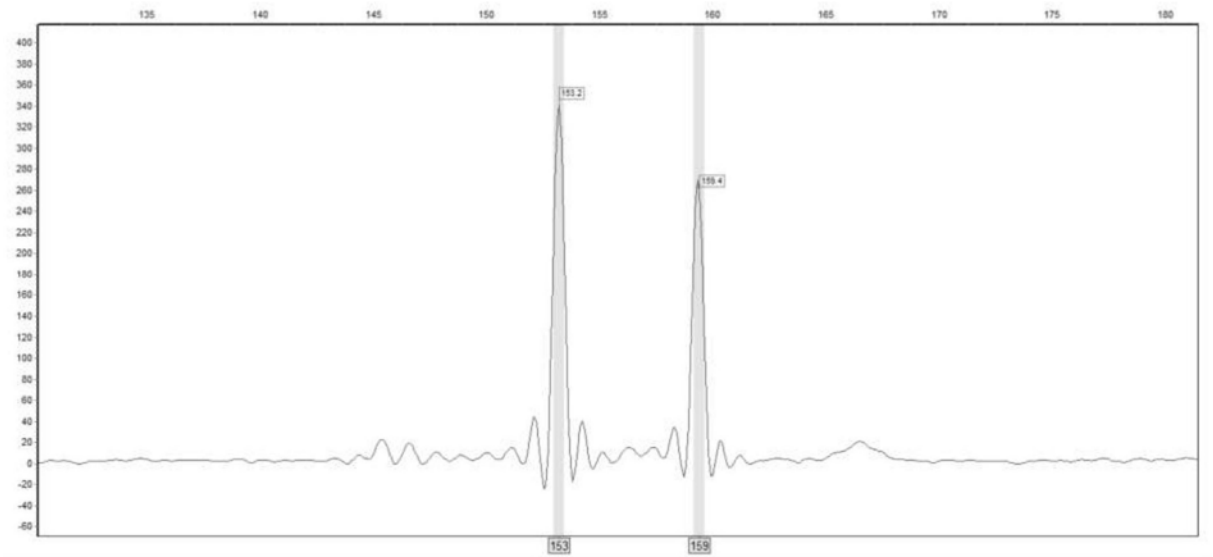


图9

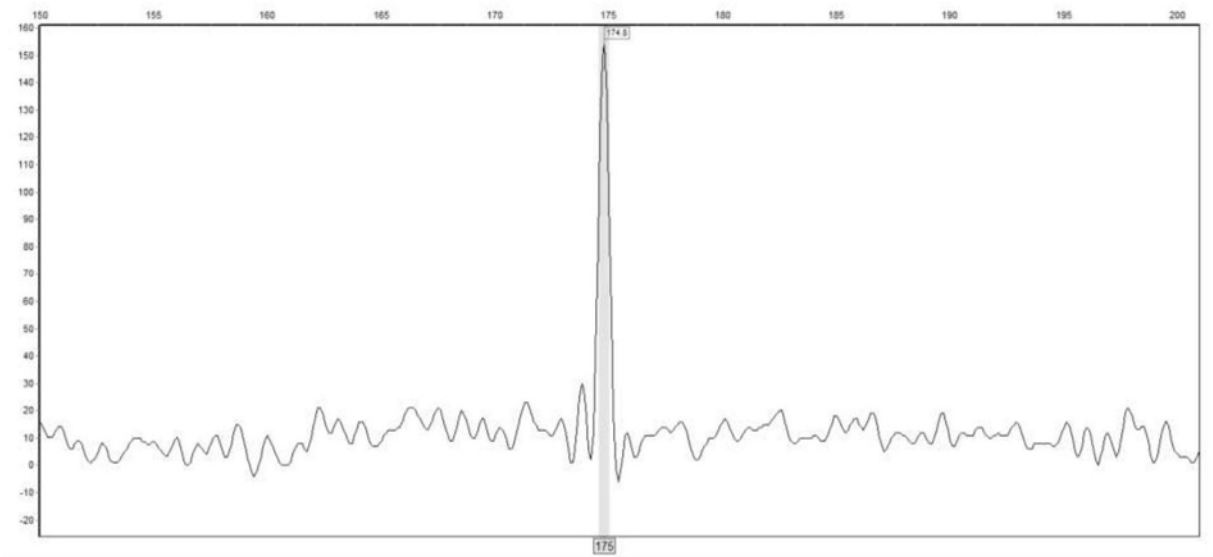


图10

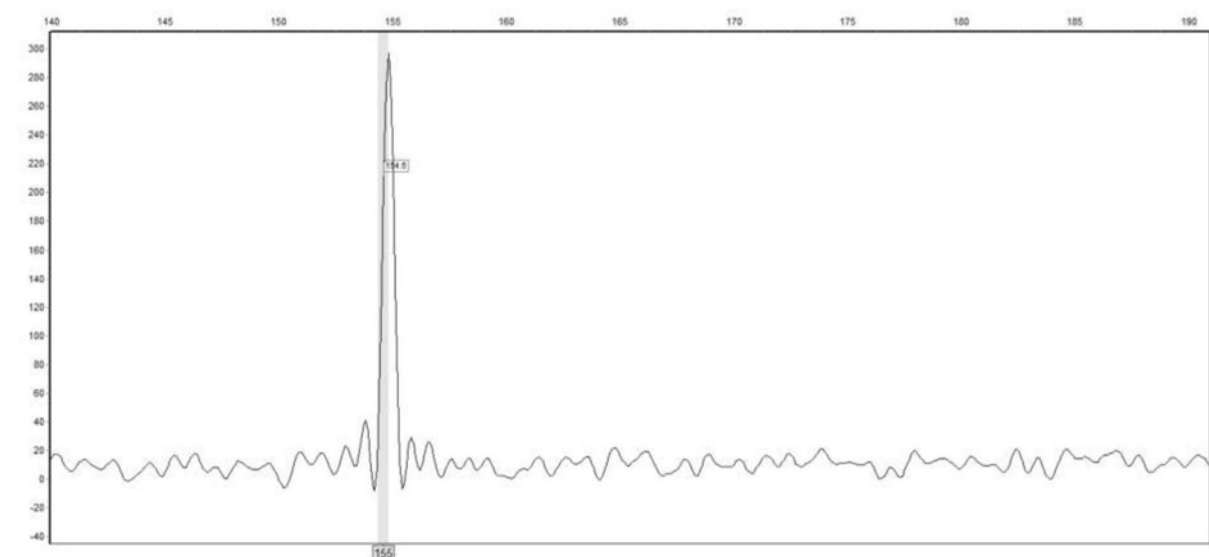


图11

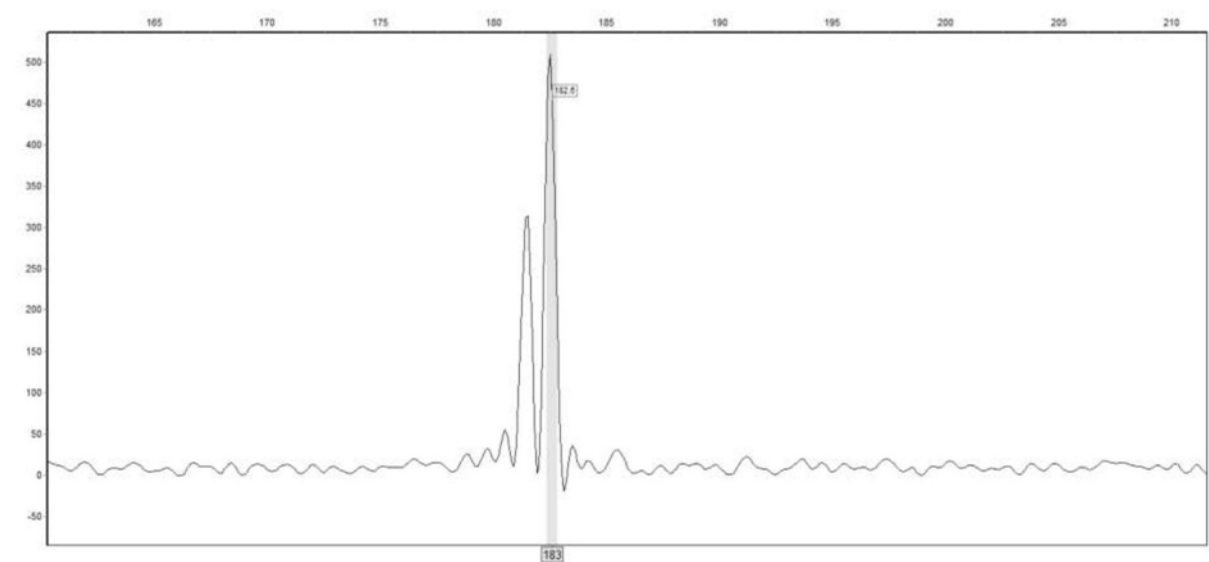


图12

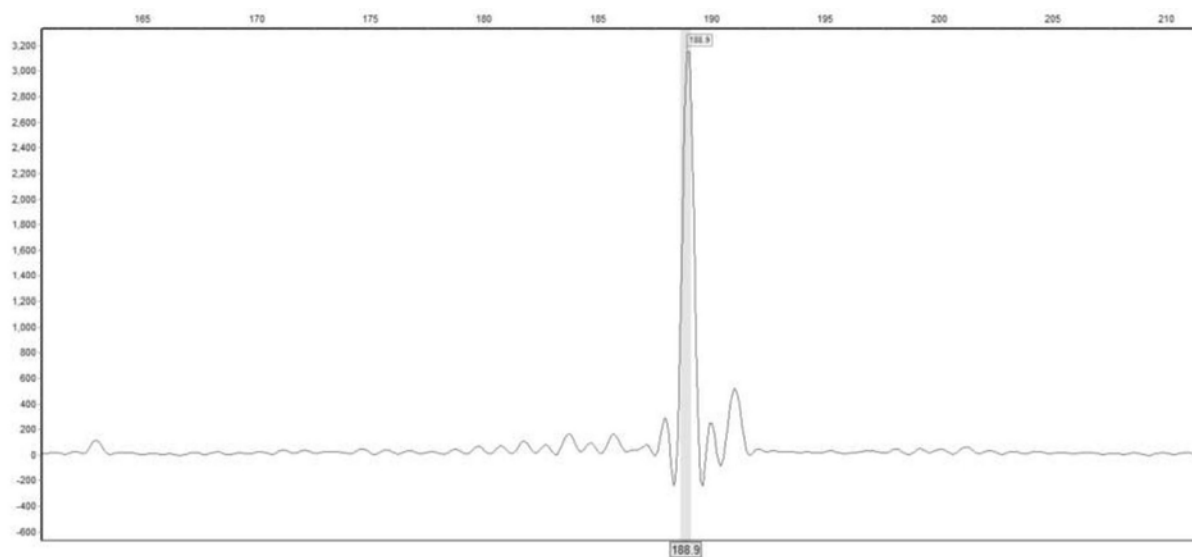


图13

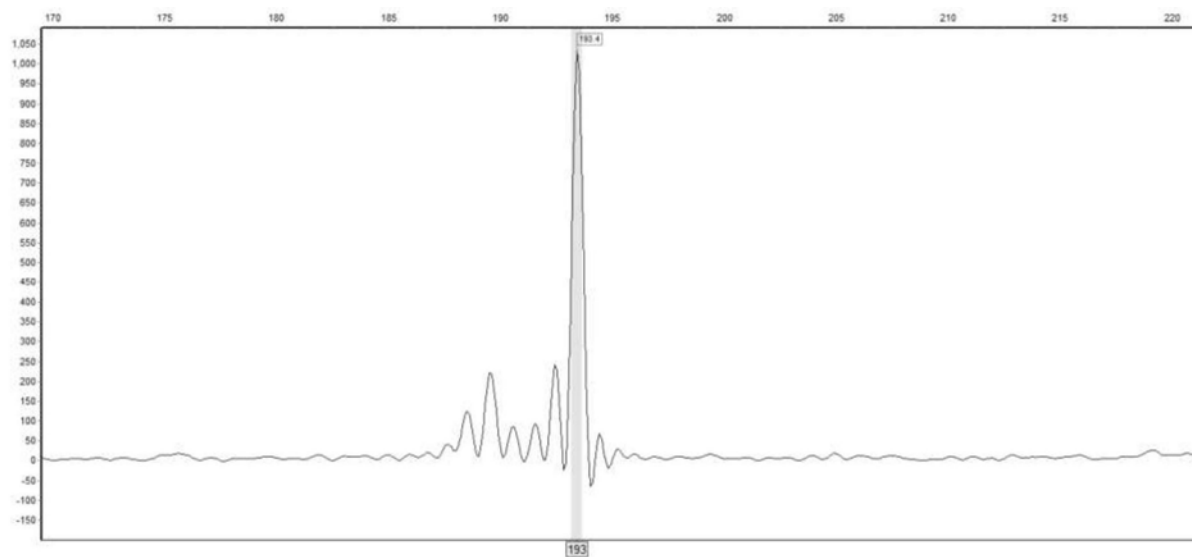


图14

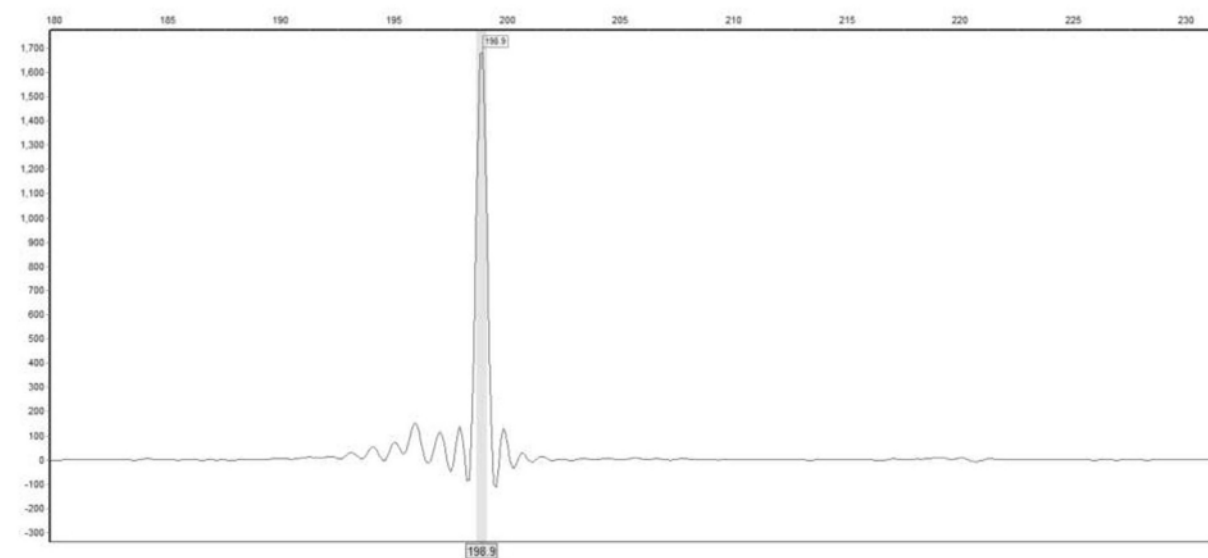


图15

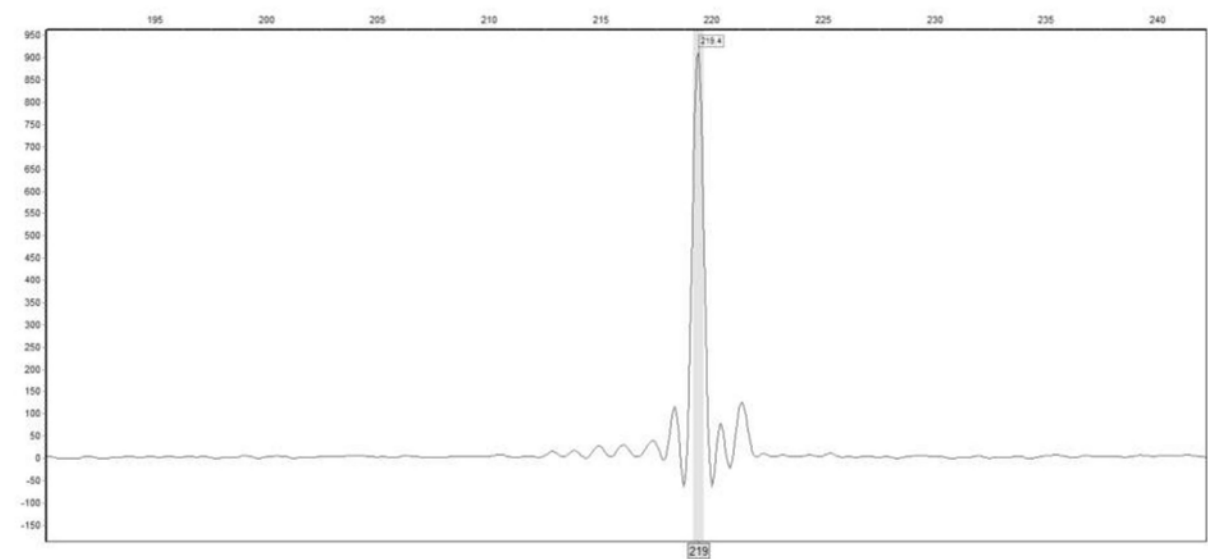


图16

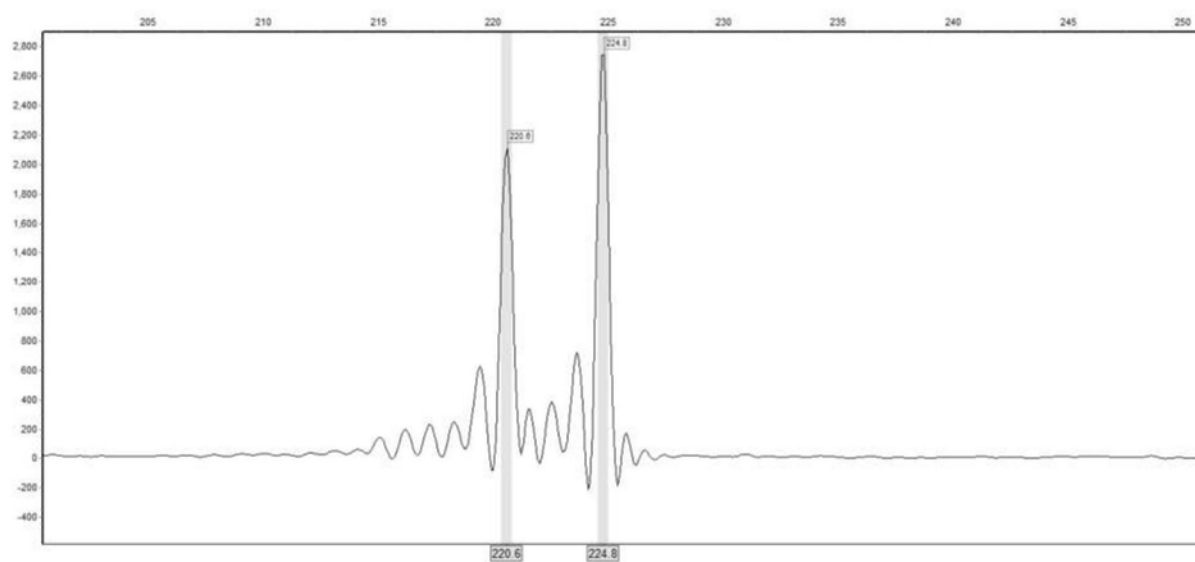


图17

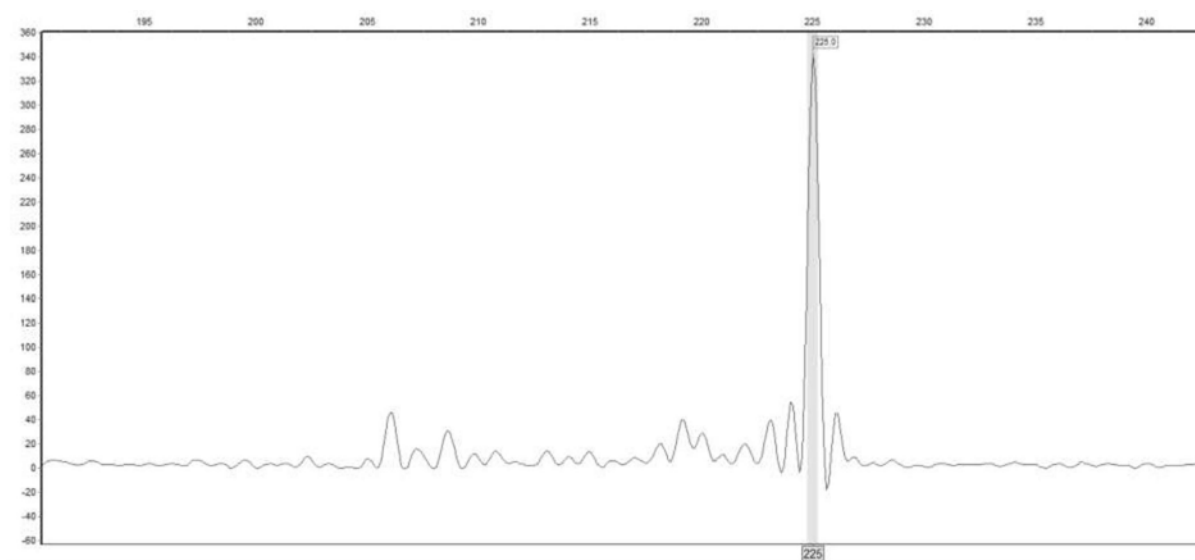


图18

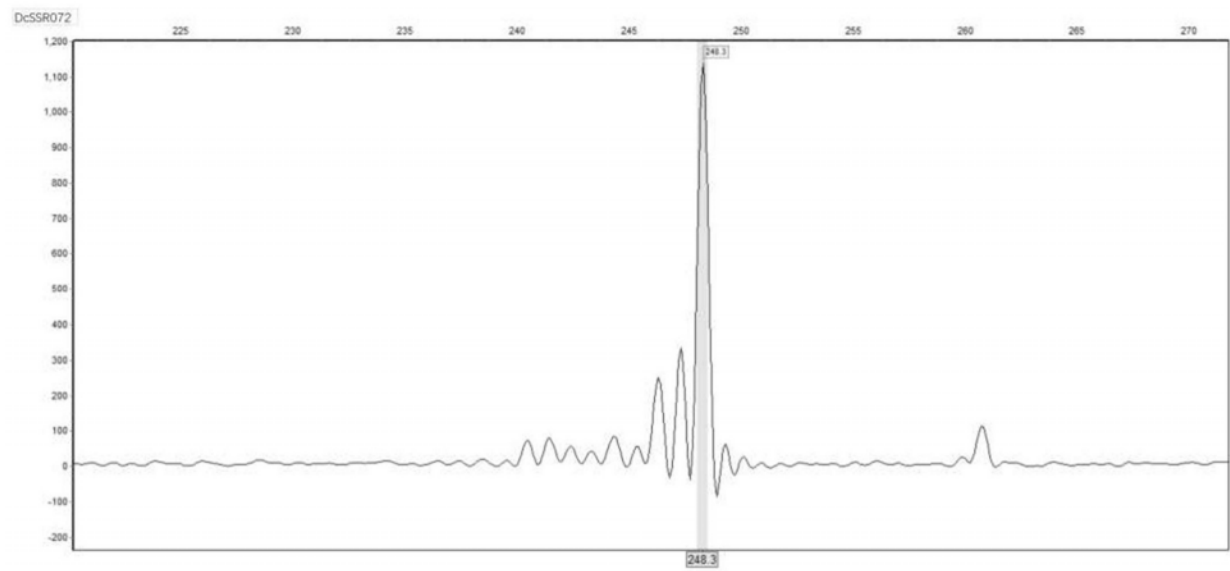


图19

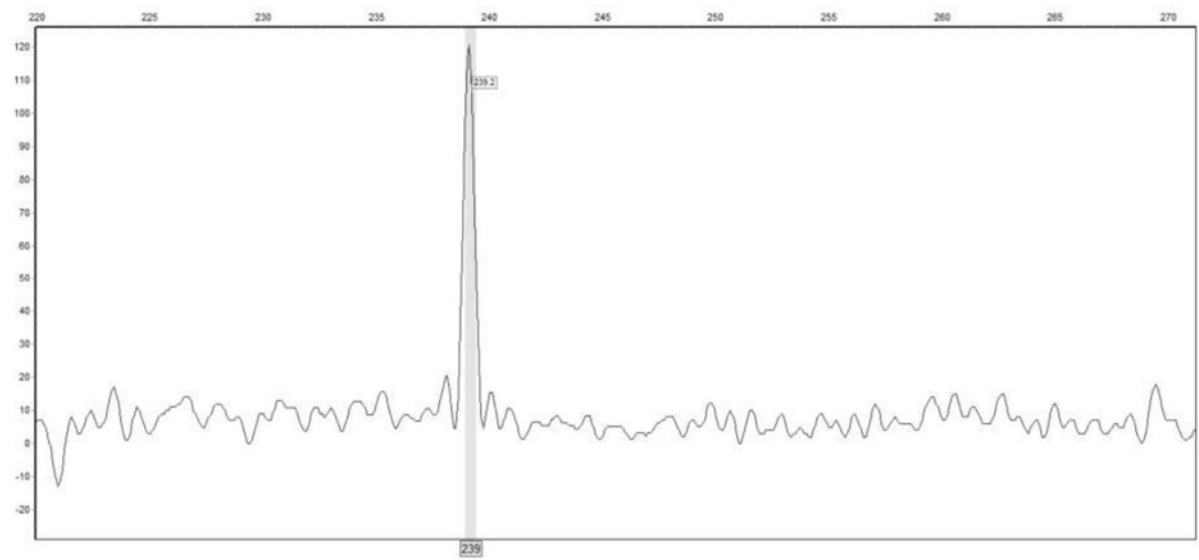


图20

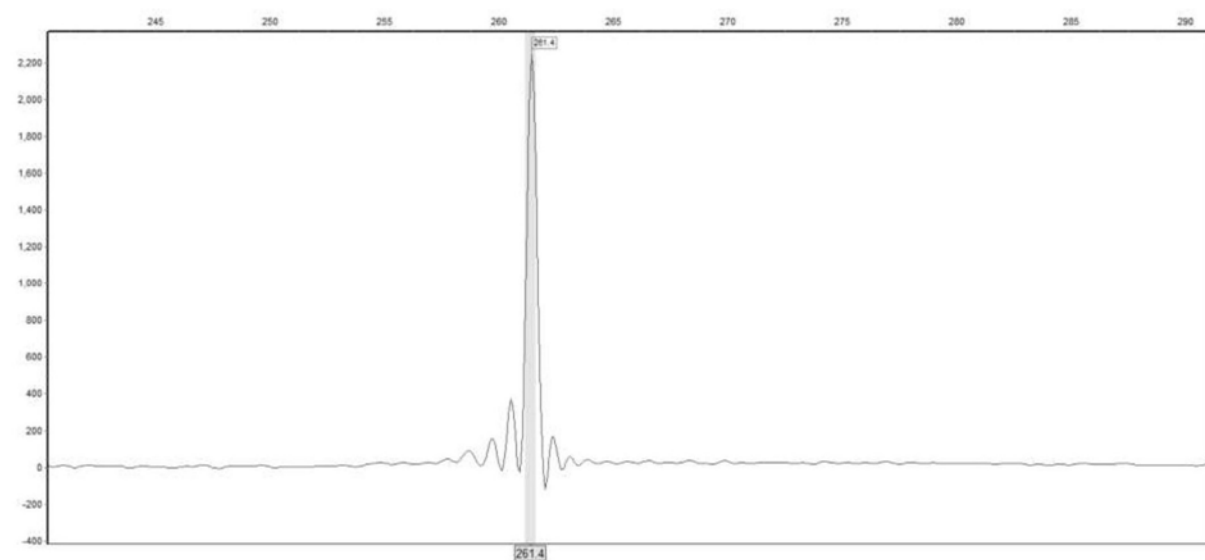


图21

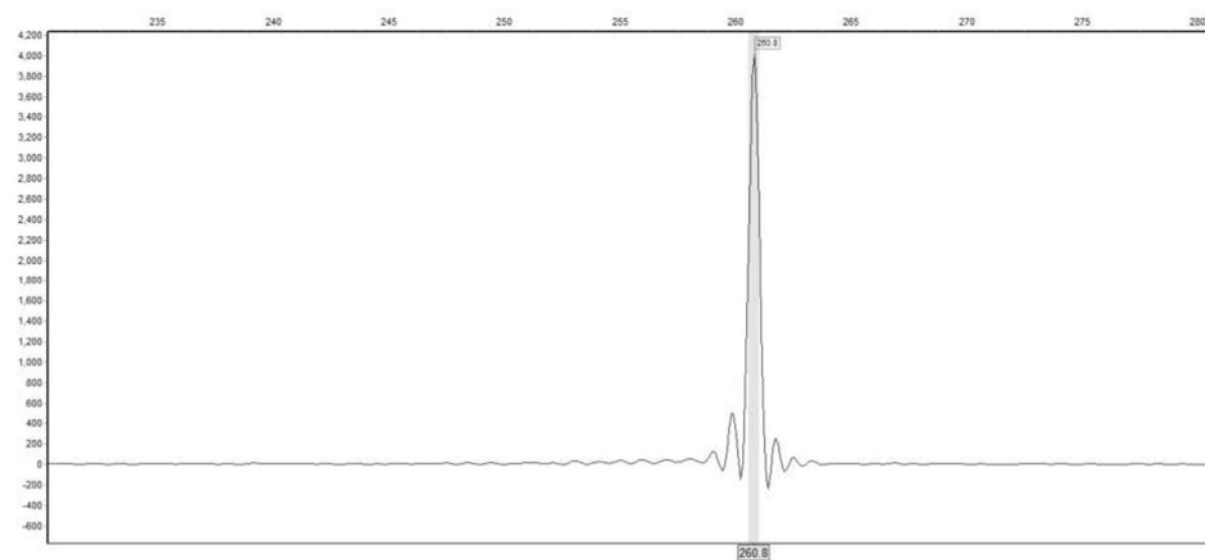


图22

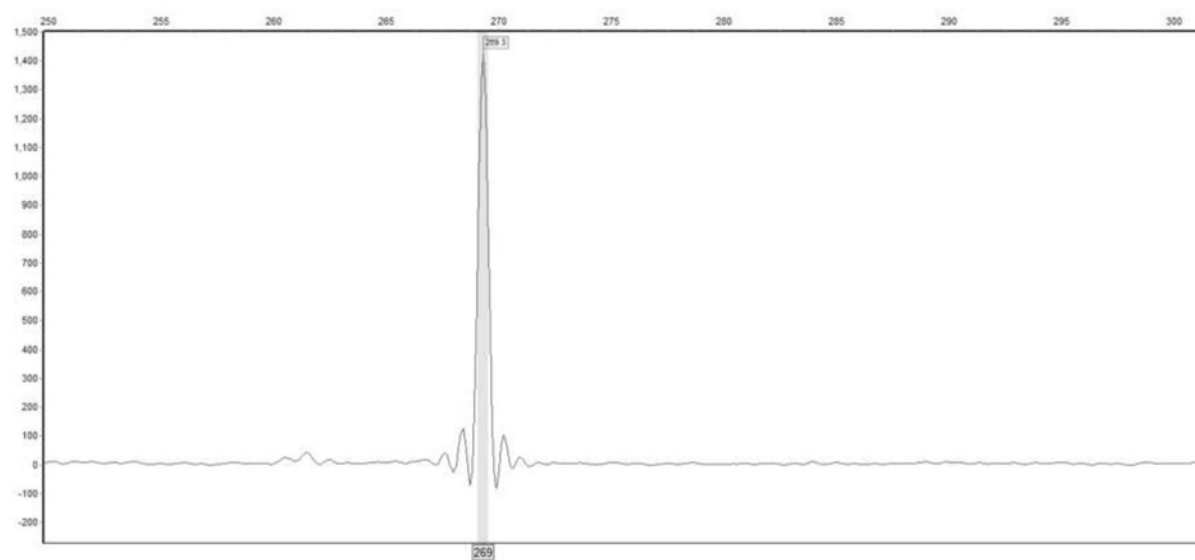


图23

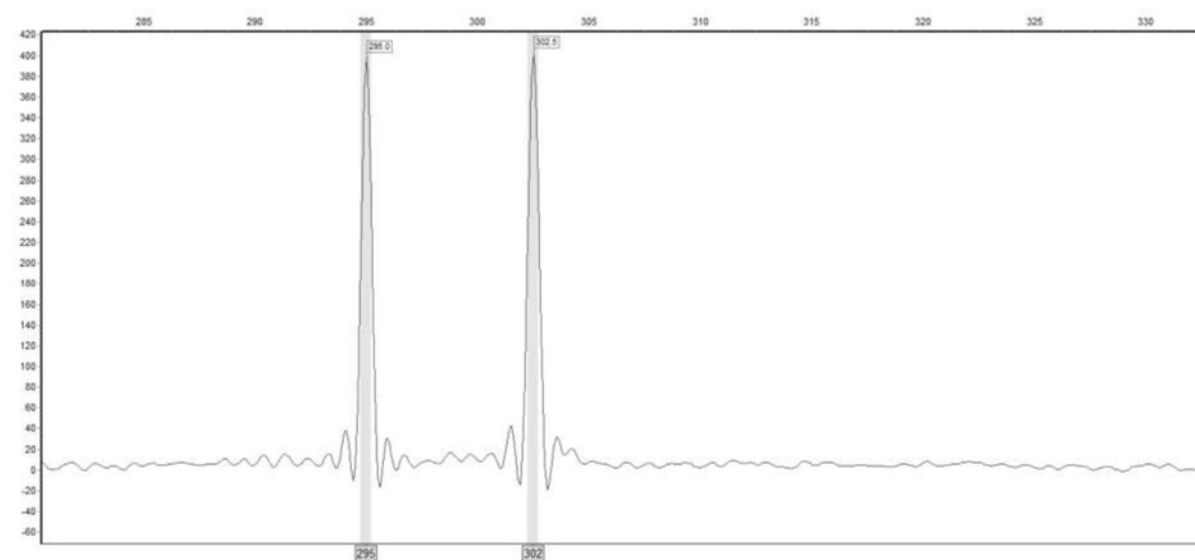


图24

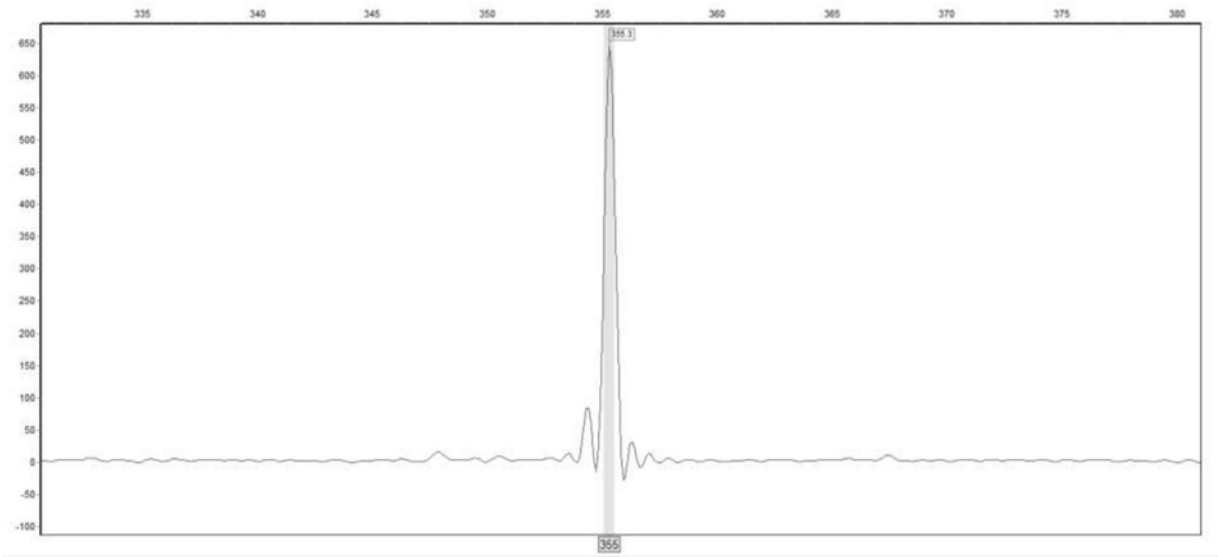


图25

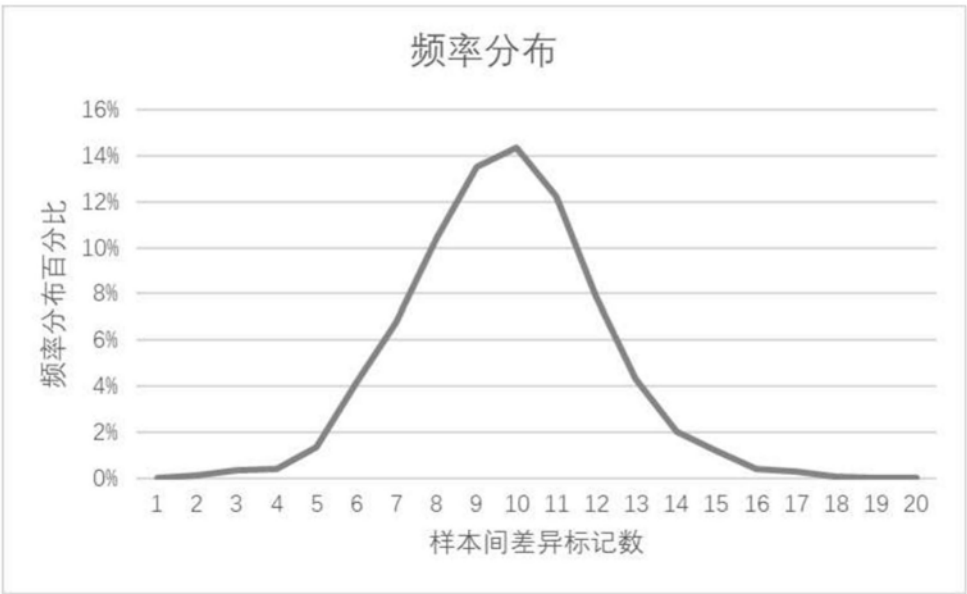


图26