



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111235301 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 202010209970.8

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2020.03.23

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104371998 A, 2015.02.25

申请公布号 CN 111235301 A

CN 104561028 A, 2015.04.29

(43) 申请公布日 2020.06.05

王国莉. 基于分子标记技术的苦瓜育种材料遗传多样性快速分析.《河南农业科学》.2019,第48卷(第9期),第125-136页.

(73) 专利权人 北京市农林科学院

姚春鹏等. 用于长绿2号苦瓜种子纯度鉴定的SSR分子标记的开发.《分子植物育种》.2019,第17卷(第11期),第3660-3664页.

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 罗江 韩向阳 张建杨静静

(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

Cui J,等.Genome-Wide Analysis of Simple Sequence Repeats in Bitter Gourd (Momordica charantia)..《Front. Plant Sci.》.2017,第8卷文献号1103.

审查员 毛颖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书2页 说明书22页

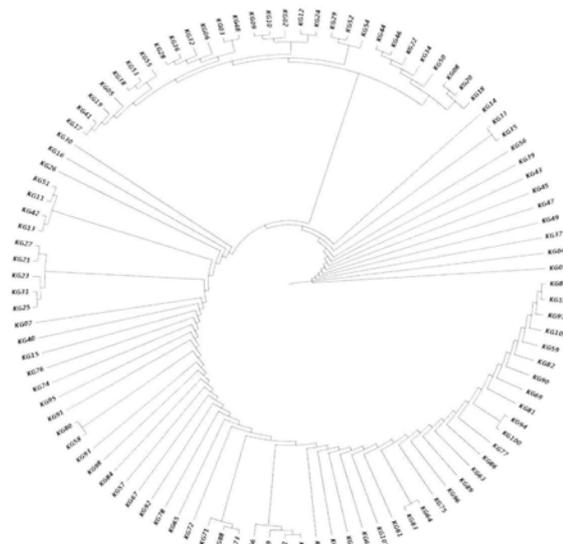
序列表7页 附图11页

(54) 发明名称

一种鉴定苦瓜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,具体涉及一种鉴定苦瓜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合。鉴定苦瓜品种真实性的SSR位点,根据苦瓜的参考基因组Momordica charantia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SSR引物对,分别用于PCR扩增上述第一SSR位点至第二十SSR位点,分别优选为与序列表中的SEQ ID NO:1-40的核苷酸序列的同源性为85%-100%的核苷酸序列。本发明可用于对苦瓜品种进行自种子开始的全生命周期的真实性鉴定,并为苦瓜种质资源和新品种保护提供技术支持。



1. 鉴定苦瓜品种真实性的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引物对和第二十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;

每对所述引物对的一条引物连接有荧光分子,所述荧光分子选自ROX、TAMRA、FAM、HEX。

2. 鉴定苦瓜品种真实性的SSR试剂盒,其特征在於: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所述SSR引物组。

3. 如权利要求2所述的SSR试剂盒,其特征在於:

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为0.25 μ mol/L。

4. 如权利要求2所述的SSR试剂盒,其特征在於:

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

pH7.5-9.0的Tris-HCL配制而成。

一种鉴定苦瓜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,具体涉及一种鉴定苦瓜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合。

背景技术

[0002] 苦瓜是葫芦科苦瓜属植物,原产于东印度,广泛栽培于热带到温带地区,我国南北方均有栽培,是一种深受人民喜爱的瓜类蔬菜作物。

[0003] 苦瓜在我国已经有悠久的栽培历史,由于其是世界性的蔬菜作物,在各国之间的苦瓜品种均由于人民对其风味与使用方式的不同,导致了不同国家和地区之间的苦瓜品种存在着一定的差异,其遗传多样性较为丰富。近年来随着育种技术的发展,各国都需要外来的种质资源进行本国的品种改良工作,故而引种驯化工作大规模展开,又因为不同国家地区之间的文化差异,导致引种驯化中产生了一定的同名异种与同种异名显现,这进一步导致了这些品种所选育或杂交出的后代亲缘关系不清,无法确定真实性等问题,进一步导致了种子市场的混乱。现阶段我们急需一种可以快速有效的鉴定苦瓜品种真实性的方法。

[0004] DUS测试是大部分农作物进行真实性鉴定的方法,其主要依靠表型性状的鉴定来判断品种的真实性。但是在现今的育种环境下,经常会发生亲缘关系很远(育种背景不同),但是DUS鉴定结果一致的情况,这是由于DUS测试只鉴定表型性状,无法对其DNA进行检测,这就忽略了对遗传背景的考量,故而其鉴定结果并不能完全代表品种真实性。而现阶段已经有一部分作物开始推行基于SSR分子标记鉴定的真实性鉴定标准,SSR标记是一种稳定可靠的,基于DNA的鉴定技术,其成本相对较低,鉴定速度快,也是一种国际上公认的分子鉴定技术。但是,现有技术中还没有利用SSR标记进行苦瓜品种真实性鉴定的方法的报到。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种鉴定苦瓜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:待测苦瓜品种是否属于标准苦瓜品种中的某一种,以及具体是哪一种。

[0006] 本发明是通过以下的技术方案实现的:

[0007] 鉴定苦瓜品种真实性的SSR位点,所述SSR位点选自如下第一SSR位点到第二十SSR位点中的任1到20种:第一SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000003所述序列的第879177-879188位,或其种间同源基因组片段;第二SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000011所述序列的第102716-102727位,或其种间同源基因组片段;第三SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000029所述序列的第1291178-1291193位,或其种间同源基因组片段;第四SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000144所述序列的第38202-38211位,或其种间同源基因组片段;第五SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000124所述序列的第105788-

105799位,或其种间同源基因组片段;第六SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000029所述序列的第239380-239394位,或其种间同源基因组片段;第七SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000025所述序列的第875274-875285位,或其种间同源基因组片段;第八SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000001所述序列的第4917304-4917321位,或其种间同源基因组片段;第九SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000033所述序列的第232490-232503位,或其种间同源基因组片段;第十SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000088所述序列的第501874-501887位,或其种间同源基因组片段;第十一SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000031所述序列的第30325-30336位,或其种间同源基因组片段;第十二SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000031所述序列的第705262-705279位,或其种间同源基因组片段;第十三SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000010所述序列的第1661785-1661798位,或其种间同源基因组片段;第十四SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000014所述序列的第658539-658548位,或其种间同源基因组片段;第十五SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000003所述序列的第22900-22911位,或其种间同源基因组片段;第十六SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000171所述序列的第136319-136334位,或其种间同源基因组片段;第十七SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000005所述序列的第2912604-2912617位,或其种间同源基因组片段;第十八SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000037所述序列的第388819-388836位,或其种间同源基因组片段;第十九SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000066所述序列的第1032690-1032710位,或其种间同源基因组片段;第二十SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000016所述序列的第830819-830834位,或其种间同源基因组片段;所述苦瓜参考基因组为*Momordica charantia*。

[0008] 鉴定苦瓜品种真实性的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。

[0009] 在一些实施方式中,所述SSR引物组包括: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

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%；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ROX、TAMRA、FAM、HEX。

[0010] 鉴定苦瓜品种真实性的SSR试剂盒，其特征在于：所述SSR试剂盒配制为PCR反应体系，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。

[0011] 一种鉴定苦瓜品种真实性的检测方法,包括以下步骤:步骤一:检测待测苦瓜的所述SSR位点的基因型;步骤二:所述待测苦瓜的品种判定:如果所述待测苦瓜基于所述20个SSR位点的基因型,和苦瓜标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测苦瓜与所述苦瓜标准品种的该指定品种判定为相似的品种;如果所述待测苦瓜基于所述20个SSR位点的基因型,和苦瓜标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2,则待测苦瓜与所述苦瓜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。

[0012] 在一些实施方式中,所述检测待测苦瓜的SSR位点基因型步骤包括以下分步骤:分步骤一:分别以所述待测苦瓜的基因组DNA和苦瓜标准品种的基因组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,获得所述待测苦瓜和所述苦瓜标准品种基于20个所述SSR位点的基因型。

[0013] 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,获得所述待测苦瓜和所述标准苦瓜品种基于所述20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,获得待测苦瓜和标准苦瓜品种基于所述20个SSR位点的基因型。

[0014] 在一些实施方式中,所述标准苦瓜品种选自以下111个苦瓜品种:大白苦瓜,京白苦瓜,重庆当地品种,大白条苦瓜,新都大白苦瓜,长白条苦瓜,滨城苦瓜,重庆白玉苦瓜,成都长白苦瓜,89-1苦瓜,长白一号,90-1湘苦瓜,90-2湘苦瓜,看苦瓜,苦瓜,武汉青皮,绿人,长绿1,长绿2,广东黑皮冬瓜,横峰苦瓜,纹坊苦瓜,四川白苦瓜,扬子州苦瓜,圆苦瓜,汉中长白苦瓜,桐柏苦瓜,信阳苦瓜,Bitter gourd,AMPALAYA,巩义苦瓜,大白长苦瓜,冷江早苦瓜,新高一号苦瓜,春秋蓝山苦瓜,翠优二号苦瓜,大肉二号苦瓜,嘉庆六号苦瓜,资源1号,资源2号,资源3号,资源4号,资源5号,资源6号,资源7号,良苦1403,良苦1405,良苦1406,良苦1401,疙瘩绿,良苦1402,潘多拉,桂农科育1号,广良2号,丰绿苦瓜,广良3号,丰禄苦瓜,MC1-6-12,桂农科育2号,油绿肉苦瓜,绿箭苦瓜,小癞瓜,泰国严选滨城苦瓜,鑫农长绿苦瓜,春晓14号,泰国翠绿苦瓜,苦瓜树,长白苦瓜,美国绿冠苦瓜,天天摘长绿苦瓜,日本富剑苦瓜,泰国巨型苦瓜,酷奇苦瓜,圣青苦瓜,珍珠苦瓜,赛德苦瓜,润泽苦瓜,黑苦瓜树,美绿苦瓜,新世纪农人,绿巨人,良苦1号,黑苦瓜,17-72苦瓜,顺绿苦瓜,白苦瓜,黑妃,绿隆苦瓜,雅绿苦瓜,法国水晶苦瓜,玉绿滨城苦瓜,新蓝山大白苦瓜,泰国绿龙苦瓜,嫩脆长绿苦瓜,台湾翠玉苦瓜,美人油绿苦瓜,玉冠王苦瓜,苹果苦瓜,赛碧绿苦瓜,绿先锋苦瓜,大顶苦瓜,新达美苦瓜,翠丰苦瓜,正源油苦瓜,翠绿苦瓜,蓝山苦瓜,绿天下苦瓜,汕海明珠苦瓜,黑珍珠苦瓜,碧珠苦瓜,新农村苦瓜。

[0015] 一种鉴定苦瓜品种是否相同的检测方法,待测苦瓜为两种未知品种的苦瓜;所述检测方法包括:步骤一:检测所述待测苦瓜的如权利要求1所述SSR位点的基因型;步骤二:所述待测苦瓜的品种是否相同的判定:如果所述待测苦瓜基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测苦瓜判定为相似的品种;如果所述待测苦瓜基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则待测苦瓜判定为不同的品种。

[0016] 所述SSR位点,或所述SSR引物组合,或所述SSR试剂盒,或权述检测方法,在以下X1或X2或X3中的应用:X1:鉴定待测苦瓜的品种是否属于标准苦瓜品种中的某一种;X2:鉴

定待测苦瓜的品种具体为标准苦瓜品种中的哪一种;X3:鉴定待测苦瓜样本是否为相同的品种。

[0017] 本发明相比现有技术具有以下有益效果:

[0018] 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。本发明大量苦瓜品种进行了重测序,并将其重测序数据与苦瓜参考基因组数据进行分析,获得了大量的SSR位点,并根据多种条件进行了筛选,试验,最终获得了一套可以用于快速准确进行真实性鉴定,并获得稳定可靠结果的SSR引物组合。本发明SSR引物组合可用于对苦瓜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,并为苦瓜种质资源和新品种保护提供强有力的技术支持。

[0019] 2、本发明提供的方法可以鉴定得出:待测苦瓜品种是否属于标准苦瓜品种中的某一种,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苦瓜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。

[0020] 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。

[0021] 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28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种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,同时采用的苦瓜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苦瓜品种的能力。

[0022] 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,在苦瓜的各个物候期进行鉴定,其结果稳定一致。④本发明的20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

[0023] 图1为实施例1中建立在20个引物组上的111个供试苦瓜品种的聚类图。

[0024] 图2-图21为实施例2中20个引物组在部分供试苦瓜品种中的SSR分型效果图。其中,图2:引物为Bdcs_Ssr-0001,采用的品种为大白苦瓜;图3:引物为Bdcs_Ssr-0038,采用

的品种为春秋蓝山苦瓜；图4：引物为Bdcs_Ssr-0066，采用的品种为潘多拉；图5：引物为Bdcs_Ssr-0090，采用的品种为圆苦瓜；图6：引物为Bdcs_Ssr-0012，采用的品种为长绿1；图7：引物为Bdcs_Ssr-0041，采用的品种为良苦1403；图8：引物为Bdcs_Ssr-0075，采用的品种为广良2号；图9：引物为Bdcs_Ssr-0094，采用的品种为信阳苦瓜；图10：引物为Bdcs_Ssr-0011，采用的品种为滨城苦瓜；图11：引物为Bdcs_Ssr-0064，采用的品种为资源1号；图12：引物为Bdcs_Ssr-0085，采用的品种为四川白苦瓜；图13：引物为Bdcs_Ssr-0098，采用的品种为绿巨人；图14：引物为Bdcs_Ssr-0015，采用的品种为长绿2；图15：引物为Bdcs_Ssr-0025，采用的品种为AMPAPAYA；图16：引物为Bdcs_Ssr-0096，采用的品种为小癞瓜；图17：引物为Bdcs_Ssr-0084，采用的品种为疙瘩绿；图18：引物为Bdcs_Ssr-0022，采用的品种为汉中长白苦瓜；图19：引物为Bdcs_Ssr-0080，采用的品种为丰绿苦瓜；图20：引物为Bdcs_Ssr-0088，采用的品种为横峰苦瓜；图21：引物为Bdcs_Ssr-0097，采用的品种为春晓14号。

[0025] 图22为实施例2为SSR标记个数(即SSR位点个数)与区分111个供试苦瓜品种的差异标记图。

具体实施方式

[0026] 定义如下：

[0027] 苦瓜品种真实性：本质上是指一个苦瓜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。

[0028] 种间同源基因组片段：是指在*Momordica charantia*参考基因组序列之外，其他品种的苦瓜中与*Momordica charantia*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111个标准品种中与*Momordica charantia*参考基因组序列存在相同的基因组片段。

[0029] 第一方面，本发明提供鉴定苦瓜品种真实性的SSR位点，分别位于苦瓜苦瓜基因组，数量为20个，可选用其中的1个或多个，具体信息如表1所示。

[0030] 上述SSR位点选自如下第一SSR位点到第二十SSR位点中的任1到20种：

[0031] 第一SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000003所述序列的第879177-879188位，或其种间同源基因组片段；

[0032] 第二SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000011所述序列的第102716-102727位，或其种间同源基因组片段；

[0033] 第三SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000029所述序列的第1291178-1291193位，或其种间同源基因组片段；

[0034] 第四SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000144所述序列的第38202-38211位，或其种间同源基因组片段；

[0035] 第五SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000124所述序列的第105788-105799位，或其种间同源基因组片段；

[0036] 第六SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000029所述序列的第239380-239394位，或其种间同源基因组片段；

[0037] 第七SSR位点，位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000025所述序列的

第875274-875285位,或其种间同源基因组片段;

[0038] 第八SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000001所述序列的第4917304-4917321位,或其种间同源基因组片段;

[0039] 第九SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000033所述序列的第232490-232503位,或其种间同源基因组片段;

[0040] 第十SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000088所述序列的第501874-501887位,或其种间同源基因组片段;

[0041] 第十一SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000031所述序列的第30325-30336位,或其种间同源基因组片段;

[0042] 第十二SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000031所述序列的第705262-705279位,或其种间同源基因组片段;

[0043] 第十三SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000010所述序列的第1661785-1661798位,或其种间同源基因组片段;

[0044] 第十四SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000014所述序列的第658539-658548位,或其种间同源基因组片段;

[0045] 第十五SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000003所述序列的第22900-22911位,或其种间同源基因组片段;

[0046] 第十六SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000171所述序列的第136319-136334位,或其种间同源基因组片段;

[0047] 第十七SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000005所述序列的第2912604-2912617位,或其种间同源基因组片段;

[0048] 第十八SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000037所述序列的第388819-388836位,或其种间同源基因组片段;

[0049] 第十九SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000066所述序列的第1032690-1032710位,或其种间同源基因组片段;

[0050] 第二十SSR位点,位于苦瓜参考基因组中NCBI序列登录号BDCS01000016所述序列的第830819-830834位,或其种间同源基因组片段。

[0051] 所述苦瓜参考基因组为*Momordica charantia*。

[0052] 第二方面,本发明提供鉴定苦瓜品种真实性的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。

[0053] 上述SSR引物组合选自:第一SSR引物对至第二十SSR引物对,分别用于PCR扩增上述第一SSR位点至第二十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

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%。

[0054] 在优选的实施方式中，上述SSR引物组合选自引物组01-20中的一组或多组；上述引物组01-20的DNA序列信息如序列表SEQ ID:1-40所示，参见表2。

[0055] 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FAM荧光标签序列的荧光信号为蓝色，HEX荧光标签序列的荧光信号为绿色。

[0056] 第三方面，本发明提供鉴定苦瓜品种真实性的SSR试剂盒，SSR试剂配制为PCR

[0057] 反应体系，该体系优选包括：

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 $\mu\text{mol/L}$	上下游引物均为 0.25 $\mu\text{mol/L}$	4.0
DNA	50-150 ng/ μL	10- 30 ng/ μL	4.0
总体积			20

[0058] 上述SSR引物组,上游引物和下游引物的终浓度之比为1:1。

[0059] 第四方面,本发明提供一种鉴定苦瓜品种真实性的检测方法,包括以下步骤:

[0060] 步骤一:检测待测苦瓜的SSR位点基因型。

[0061] 分步骤一:分别以上述待测苦瓜的基因组DNA和苦瓜标准品种的基因组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;

[0062] 分步骤二:对上述PCR扩增产物进行检测,获得待测苦瓜和苦瓜标准品种基于20个上述SSR位点的基因型。

[0063] 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,获得待测苦瓜和标准苦瓜品种基于上述20个SSR位点的基因型;

[0064] 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,获得待测苦瓜和标准苦瓜品种基于上述20个SSR位点的基因型。

[0065] 步骤二:待测苦瓜的品种判定步骤:

[0066] 通过聚类分析待测苦瓜和标准苦瓜品种基于上述20个SSR位点的基因型得出结论以下结果:

[0067] 如果所述待测苦瓜基于所述20个SSR位点的基因型,和苦瓜标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测苦瓜与所述苦瓜标准品种的该品种属于相似的品种;

[0068] 如果所述待测苦瓜基于所述20个SSR位点的基因型,和苦瓜标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2,则待测苦瓜与所述苦瓜标准品种的该指定品种判定为不同的品种。

[0069] 上述PCR扩增反应的程序优选为:

[0070] 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。

[0071] 上述标准苦瓜品种包括以下111个苦瓜品种:

[0072] 大白苦瓜,京白苦瓜,重庆当地品种,大白条苦瓜,新都大白苦瓜,长白条苦瓜,滨城苦瓜,重庆白玉苦瓜,成都长白苦瓜,89-1苦瓜,长白一号,90-1湘苦瓜,90-2湘苦瓜,看苦瓜,苦瓜,武汉青皮,绿人,长绿1,长绿2,广东黑皮冬瓜,横峰苦瓜,纹坊苦瓜,四川白苦瓜,扬子州苦瓜,圆苦瓜,汉中长白苦瓜,桐柏苦瓜,信阳苦瓜,Bitter gourd,AMPALAYA,玠义苦

瓜,大白长苦瓜,冷江早苦瓜,新高一号苦瓜,春秋蓝山苦瓜,翠优二号苦瓜,大肉二号苦瓜,嘉庆六号苦瓜,资源1号,资源2号,资源3号,资源4号,资源5号,资源6号,资源7号,良苦1403,良苦1405,良苦1406,良苦1401,疙瘩绿,良苦1402,潘多拉,桂农科育1号,广良2号,丰绿苦瓜,广良3号,丰禄苦瓜,MC1-6-12,桂农科育2号,油绿肉苦瓜,绿箭苦瓜,小癞瓜,泰国严选槟城苦瓜,鑫农长绿苦瓜,春晓14号,泰国翠绿苦瓜,苦瓜树,长白苦瓜,美国绿冠苦瓜,天天摘长绿苦瓜,日本富剑苦瓜,泰国巨型苦瓜,酷奇苦瓜,圣青苦瓜,珍珠苦瓜,赛德苦瓜,润泽苦瓜,黑苦瓜树,美绿苦瓜,新世纪农人,绿巨人,良苦1号,黑苦瓜,17-72苦瓜,顺绿苦瓜,白苦瓜,黑妃,绿隆苦瓜,雅绿苦瓜,法国水晶苦瓜,玉绿槟城苦瓜,新蓝山大白苦瓜,泰国绿龙苦瓜,嫩脆长绿苦瓜,台湾翠玉苦瓜,美人油绿苦瓜,玉冠王苦瓜,苹果苦瓜,赛碧绿苦瓜,绿先锋苦瓜,大顶苦瓜,新达美苦瓜,翠丰苦瓜,正源油苦瓜,翠绿苦瓜,蓝山苦瓜,绿天下苦瓜,汕海明珠苦瓜,黑珍珠苦瓜,碧珠苦瓜,新农村苦瓜。

[0074] 第五方面,本发明提供一种鉴定苦瓜品种是否相同的检测方法。

[0075] 其中,待测苦瓜为两种未知品种的苦瓜;

[0076] 该检测方法包括:

[0077] 步骤一:检测待测苦瓜的上述20个SSR位点的基因型;检测方法如第四方面所述。

[0078] 步骤二:待测苦瓜的品种(两个未知的苦瓜品种)是否相同的判定:

[0079] 如果两个未知的苦瓜品种基于上述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则两个未知的苦瓜判定为相似的品种;

[0080] 如果两个未知的苦瓜品种基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则两个未知的苦瓜判定为不同的品种。

[0081] 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X2或X3中的应用:

[0082] X1:鉴定待测苦瓜的品种是否属于标准苦瓜品种中的某一种;

[0083] X2:鉴定待测苦瓜的品种具体为标准苦瓜品种中的哪一种;

[0084] X3:鉴定待测苦瓜样本是否为相同的品种。

[0085] X1、X2和X3均属于鉴定苦瓜品种真实性的应用。

[0086] 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。

[0087] 实施例1

[0088] 用于鉴定苦瓜品种真实性的SSR引物组合的获得

[0089] 一、20个SSR位点的发现:这些位点是根据近缘种苦瓜的参考基因组*Momordica charantia*与28份种质资源全基因组重测序数据进行数据挖掘所获得的。

[0090] 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,本发明使用苦瓜参考基因组,并使用独有的,具有代表性的,28份苦瓜品种重测序数据(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出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28份实际材料选出了20个鉴别能力最强的

SSR位点作为本发明中所使用的SSR位点。

[0091] 本发明基于28份苦瓜代表资源的重测序数据,首次发现并获得20个SSR位点。这28份苦瓜资源类型丰富,涵盖了市场上现有的苦瓜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。

[0092] 2、本发明的SSR位点的筛选包括以下步骤:

[0093] 首先通过28份苦瓜材料的重测序结果,与*Momordica charantia*参考基因组序列进行比对一共找到8093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2207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114个SSR位点。

[0094] 对111个品种(参见实施例2)使用这114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102个SSR位点作为备选位点。再使用minimal marker算法选出20个SSR位点,此算法优先考虑其对111个苦瓜品种的鉴别能力,并综合考虑SSR位点多态性等条件。

[0095] 为了确定这20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20对引物对111个苦瓜品种进行了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20个SSR位点具有非常高的鉴别能力与可靠性。

[0096] 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。20个SSR位点的基本信息详见表1。其中SSR位点的位置和motif信息是基于苦瓜参考基因组序列比对确定的,所述苦瓜*Momordica charantia*参考基因组序列,网址参见:网址1:

[0097] [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid3673\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid3673[orgn])。

[0098] 表1中PIC值和主要等位变异扩增长度是根据实施例2的111个品种得到的。

[0099] 表1. 20个SSR位点的基本信息

[0100]

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	Bdcs_Ssr-0001	BDCS01000003	879177-879188	(AT)6	0.36389414	79 81 83
2	Bdcs_Ssr-0038	BDCS01000011	102716-102727	(TA)6	0.345679012	102 104 106
3	Bdcs_Ssr-0066	BDCS01000029	1291178-1291193	(TA)8	0.332409972	190 192 188
4	Bdcs_Ssr-0090	BDCS01000144	38202-38211	(AG)5	0.381328074	265 267 263
5	Bdcs_Ssr-0012	BDCS01000124	105788-105799	(GA)6	0.375	80 82

[0101]

6	Bdcs_Ssr-004	BDCS0100002	239380-239394	(AAT)5	0.45429962	137
	1	9				140
						143
7	Bdcs_Ssr-007	BDCS0100002	875274-875285	(TA)6	0.30055401	146
	5	5				200
						202
8	Bdcs_Ssr-009	BDCS0100000	4917304-4917321	(ATA)6	0.43699296	204
	4	1				271
						274
9	Bdcs_Ssr-001	BDCS0100003	232490-232503	(CT)7	0.46519928	277
	1	3				86
						88
10	Bdcs_Ssr-006	BDCS0100008	501874-501887	(AT)7	0.40548204	90
	4	8				188
						190
11	Bdcs_Ssr-008	BDCS0100003	30325-30336	(TC)6	0.48875	251
	5	1				255
						257
12	Bdcs_Ssr-009	BDCS0100003	705262-705279	(AAT)6	0.49382716	295
	8	1				298
						301

[0102]	1 3	Bdcs_Ssr-001 5	BDCS0100001 0	1661785-1661798	(AG)7	0.43875	86 88 90	
	1 4	Bdcs_Ssr-002 5	BDCS0100001 4	658539-658548	(GA)5	0.40237966 5	93 97 99	
	1 5	Bdcs_Ssr-009 6	BDCS0100000 3	22900-22911	(TG)6	0.375	247 249 251	
	1 6	Bdcs_Ssr-008 4	BDCS0100017 1	136319-136334	(TA)8	0.31409875 1	293 299 301	
	1 7	Bdcs_Ssr-002 2	BDCS0100000 5	2912604-2912617	(AG)7	0.39316239 3	95 97 99	
	1 8	Bdcs_Ssr-008 0	BDCS0100003 7	388819-388836	(TAT)6	0.47809626 8	209 212	
	1 9	Bdcs_Ssr-008 8	BDCS0100006 6	1032690-1032710	(TTA)7	0.375	255 261 264	
	[0103]	2 0	Bdcs_Ssr-009 7	BDCS0100001 6	830819-830834	(TA)8	0.34265318 3	276 278 274

[0104] 二、用于鉴定苦瓜品种真实性的SSR引物组合的获得

[0105] 基于步骤一发现的20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)的用于鉴定苦瓜品种真实性的SSR引物组合。基于前述SSR位点在苦瓜*Momordica charantia*参考基因组序列中的上下游序列设计引物,SSR引物组合由20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。20个引物组中各个引物的核苷酸序列如表2。

[0106] 表2. 20个引物组的信息

[0107]

	引物对应的 SSR 位点名称	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
1	Bdcs_Ssr-0001	上游引物 01F	TGTTATTTTAAAATGAGAAACAGCTCAA	1	TAMRA
		下游引物 01R	ATTATGAAGGGCCTGTTTGTGTTT	2	
2	Bdcs_Ssr-0038	上游引物 02F	TCTCGAGGTGGGAGATTTAATCTTC	3	ROX
		下游引物 02R	TTATTTGGTTTCTGATGCGTCTGTC	4	
3	Bdcs_Ssr-0066	上游引物 03F	TTGCTAAACTATGTCCATGGAAAGA	5	HEX
		下游引物 03R	GAACTATTTACCACTTCATCGGTGT	6	
4	Bdcs_Ssr-0090	上游引物 04F	GAATGTGTAGTCAAGGGTCACAATG	7	FAM
		下游引物 04R	TTTGAGGATCTGAAATTTGTCTCGC	8	
5	Bdcs_Ssr-0012	上游引物 05F	GAAAAGAACATAAAAACGGAGGGGAA	9	HEX

[0108]

6	Bdcs_Ssr-00 41	下游引物 05R	AGATTTCTCAACCCTTTGTGAGAT	10	FAM
		上游引物 06F	ACATCCTTCTCCCTACATATGTACT	11	
7	Bdcs_Ssr-00 75	下游引物 06R	GCAGCTTGATCATTGACCCATTTA	12	ROX
		上游引物 07F	CAACTTTAGGGGAGTGTTAGAGTA	13	
8	Bdcs_Ssr-00 94	下游引物 07R	GCCTTTTGCTTCCAAGTTGTAAAGA	14	TAMRA
		上游引物 08F	ACATATTACTTGGTAATTGCTAGACA A	15	
9	Bdcs_Ssr-00 11	下游引物 08R	TGAACATTGTTGAGGCACCTAAAAA	16	ROX
		上游引物 09F	CCTCAATTTGCCTCTCTCCCATATT	17	
10	Bdcs_Ssr-00 64	下游引物 09R	ACTGTGGGA ACTATTTGATGTAGCT	18	TAMRA
		上游引物 10F	GACTTTTGTCGGATCGAACATAACT	19	
11	Bdcs_Ssr-00 85	下游引物 10R	TGGCATCCATTTTGTTTTCTTTCA	20	HEX
		上游引物 11F	ATGGACTCAGAATGAACTGAAAAGG	21	
12	Bdcs_Ssr-00 98	下游引物 11R	ACTTTGTTCTCATAAGAGGGGAGTT	22	FAM
		上游引物 12F	TATTTGTATTTGTCGGTCGGAGGG	23	
13	Bdcs_Ssr-00 15	下游引物 12R	CGCCATTTCTGTTTGATTCAATAT	24	FAM
		上游引物 13F	GGAATGTGGGTTTTCTTTGGAAGAT	25	
14	Bdcs_Ssr-00	下游引物 13R	ACCCCAAAGTAACTAAATACCCC	26	HEX
		上游引物	CCAACAATTATCCACTTGTGCTTCT	27	

[0109]

1	25	14F	下游引物	GACTTTATTGTGTGGGGACATGAAC	28	
		14R				
5	Bdcs_Ssr-0096	15F	上游引物	TAGACGATGGACGCTTTAAGTTGTA	29	ROX
		15R				
1	6	16F	下游引物	TATCAGATGCCATGAAGACAACAGA	30	
		16R				
6	Bdcs_Ssr-0084	17F	上游引物	AATACTTATAGTACCGCATGTCCGT	31	TAMRA
		17R				
1	7	18F	下游引物	AACGTGTCCAACAAATGCTTTCTAT	32	
		18R				
1	8	19F	上游引物	ATCATATGATGTGGGATTAGGTCAT	33	TAMRA
		19R				
8	Bdcs_Ssr-0080	20F	下游引物	GGGCACAGCTTAATTAGGTACCTAA	34	
		20R				
1	9	21F	上游引物	TGCTACTTGAACCAATGAGAAGAAA	35	FAM
		21R				
1	9	22F	下游引物	TGATTTGTTCTTTCTATGAAAATGTTG	36	
		22R				
1	9	23F	上游引物	AAGAAGGTGTACTAGTAGCTCCTCT	37	ROX
		23R				
2	0	24F	下游引物	CCAAGTGGCATCTTATCAACACATT	38	
		24R				
2	0	25F	上游引物	AATGCCAGATGTAATTGCTATGGTG	39	HEX
		25R				
2	0	26F	下游引物	TACACATCCATACCGCTAGAAGAAG	40	
		26R				

[0110] 实施例2

[0111] 本实施例为实施例1开发的SSR引物组合的有效性检验。

[0112] 本实施例的111个供试苦瓜品种均为常见的优良品种或部分国外引进品种,具体品种如下:

[0113]

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
KG01	大白苦瓜	成都种子公司	KG57	丰禄苦瓜	市售品种
KG02	京白苦瓜	四川成都种子公司	KG58	MC1-6-12	市售品种

[0114]

KG03	重庆当地品种	重庆	KG59	桂农科育 2 号	市售品种
KG04	大白条苦瓜	成都市第一农业科学研究所	KG60	油绿肉苦瓜	市售品种
KG05	新都大白苦瓜	四川清阳	KG61	绿箭苦瓜	市售品种
KG06	长白条苦瓜	特菜公司	KG62	小癞瓜	市售品种
KG07	滨城苦瓜	特菜公司	KG63	泰国严选槟城苦瓜	市售品种
KG08	重庆白玉苦瓜	重庆	KG64	鑫农长绿苦瓜	市售品种
KG09	成都长白苦瓜	四川清阳	KG65	春晓 14 号	市售品种
KG10	89-1 苦瓜	湖南省蔬菜研究所	KG66	泰国翠绿苦瓜	市售品种
KG11	长白一号	湖南省蔬菜研究所	KG67	苦瓜树	市售品种
KG12	90-1 湘苦瓜	湖南省蔬菜研究所	KG68	长白苦瓜	市售品种
KG13	90-2 湘苦瓜	湖南省蔬菜研究所	KG69	美国绿冠苦瓜	市售品种
KG14	看苦瓜	吉林蔬菜所	KG70	天天摘长绿苦瓜	市售品种
KG15	苦瓜	广东	KG71	日本富剑苦瓜	市售品种
KG16	武汉青皮	北京蔬菜研究中心	KG72	泰国巨型苦瓜	市售品种
KG17	绿人	北京蔬菜研究中心	KG73	酷奇苦瓜	市售品种
KG18	长绿 1	北京蔬菜研究中心	KG74	圣青苦瓜	市售品种
KG19	长绿 2	北京蔬菜研究中心	KG75	珍珠苦瓜	市售品种
KG20	广东黑皮冬瓜	陕西省蔬菜研究所	KG76	赛德苦瓜	市售品种
KG21	横峰苦瓜	江西横峰蔬菜办	KG77	润泽苦瓜	市售品种
KG22	纹坊苦瓜	江西省铅山县蔬菜办	KG78	黑苦瓜树	市售品种
KG23	四川白苦瓜	江西铅山良种场	KG79	美绿苦瓜	市售品种
KG24	扬子州苦瓜	南昌	KG80	新世纪农人	市售品种
KG25	圆苦瓜	吉林省蔬菜花卉科研所	KG81	绿巨人	市售品种
KG26	汉中长白苦瓜	陕西省农科院蔬菜研究所	KG82	良苦 1 号	市售品种
KG27	桐柏苦瓜	河南职业技术师院	KG83	黑苦瓜	市售品种
KG28	信阳苦瓜	河南省职业技术师院	KG84	17-72 苦瓜	市售品种
KG29	Bitter gourd	国际培训班交	KG85	顺绿苦瓜	市售品种
KG30	AMPALAYA	国际培训班交	KG86	白苦瓜	市售品种
KG31	巩义苦瓜	河南职业技术师院	KG87	黑妃	市售品种
KG32	大白长苦瓜	陕西省蔬菜研究所	KG88	绿隆苦瓜	市售品种
KG33	冷江早苦瓜	陕西省蔬菜研究所	KG89	雅绿苦瓜	市售品种
KG34	新高一号苦瓜	山东	KG90	法国水晶苦瓜	市售品种
KG35	春秋蓝山苦瓜	湖南长沙湘中蔬菜种子子公司	KG91	玉绿槟城苦瓜	市售品种
KG36	翠优二号苦瓜	广东省种子集团良种苗木中心	KG92	新蓝山大白苦瓜	市售品种
KG37	大肉二号苦瓜	南宁桂研种业有限公司	KG93	泰国绿龙苦瓜	市售品种
KG38	嘉庆六号苦瓜	广东省农科院蔬菜所	KG94	嫩脆长绿苦瓜	市售品种
KG39	资源 1 号	蔬菜中心种质库	KG95	台湾翠玉苦瓜	市售品种
KG40	资源 2 号	蔬菜中心种质库	KG96	美人油绿苦瓜	市售品种
KG41	资源 3 号	蔬菜中心种质库	KG97	玉冠王苦瓜	市售品种
KG42	资源 4 号	蔬菜中心种质库	KG98	苹果苦瓜	市售品种
KG43	资源 5 号	蔬菜中心种质库	KG99	赛碧绿苦瓜	市售品种
KG44	资源 6 号	蔬菜中心种质库	KG100	绿先锋苦瓜	市售品种
KG45	资源 7 号	蔬菜中心种质库	KG101	大顶苦瓜	市售品种
KG46	良苦 1403	市售品种	KG102	新达美苦瓜	市售品种
KG47	良苦 1405	市售品种	KG103	翠丰苦瓜	市售品种
KG48	良苦 1406	市售品种	KG104	正源油苦瓜	市售品种
KG49	良苦 1401	市售品种	KG105	翠绿苦瓜	市售品种

[0115]	KG50	疙瘩绿	市售品种	KG106	蓝山苦瓜	市售品种
	KG51	良苦 1402	市售品种	KG107	绿天下苦瓜	市售品种
	KG52	潘多拉	市售品种	KG108	汕海明珠苦瓜	市售品种
	KG53	桂农科育 1 号	市售品种	KG109	黑珍珠苦瓜	市售品种
	KG54	广良 2 号	市售品种	KG110	碧珠苦瓜	市售品种
	KG55	丰绿苦瓜	市售品种	KG111	新农村苦瓜	市售品种
	KG56	广良 3 号	市售品种			

[0116] 1、供试苦瓜品种的基因组DNA的获得

[0117] 采用CTAB法分别提取111个供试苦瓜品种的叶片(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,得到供试苦瓜品种的基因组DNA。

[0118] 上述CTAB法的操作具体为:

[0119] 分别摘取幼苗期的上述111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/Grind68111)打碎叶片,再取200mg叶片干粉,向其中加入800 μ L CTAB提取液(2%CTAB,1.4mM NaCl,100mM Tris-HCl pH8.0,20mM EDTA pH8.0,1% PVP-40,0.2% β -巯基乙醇),混匀,于65 $^{\circ}$ C水浴30min,加入等体积的氯仿/异戊醇(v:v=20:1),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,-20 $^{\circ}$ C放置30min后在4 $^{\circ}$ C、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,得到供试苦瓜品种基因组DNA,检测浓度后4 $^{\circ}$ C备用。

[0120] 供试苦瓜品种的基因组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Nanodrop2000(Thermo)检测A260/A280比值在1.8左右,A260/A230比值大于1.8;供试苦瓜品种的基因组DNA的浓度在30-50ng/ μ L。

[0121] 2、分别以111个供试苦瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用20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。

[0122] 反应体系包括:

[0123] 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)
[0124] ddH ₂ O	—	—	6.6
10 \times Buffer	10 \times	1 \times	2.0

(不含 Mg ²⁺)			
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
[0125] 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

[0126] 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。

[0127] 3、荧光毛细管电泳

[0128] 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。

[0129] 部分结果见图2-21。结果表明,各个引物组在供试苦瓜品种中可以得到很好的分型效果。

[0130] 4、聚类分析

[0131] 根据111个供试苦瓜品种基于20个SSR位点的基因型,利用MEGA7软件对111个供试苦瓜品种进行聚类分析。

[0132] 建立在20个引物组上的111个供试苦瓜品种的聚类图如图1所示。结果表明,20个引物组可以完全区分111个供试苦瓜品种。由此可见,实施例1开发的SSR引物组合可以应用于苦瓜品种DNA指纹数据库构建和品种真实性鉴定。

[0133] 5、效率评价

[0134] 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111个供试苦瓜品种区分率的关系。

[0135] 如图22所示的111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 $C_{111}^2=111\times 110\div 2=6105$ 个;在这些结果中,差差异位点个数为4的约占总数的1.9%,差异位点个数为5的约占总数的4.7%,差异位点个数为6的约占总数的8.4%,差异位点个数为7的约占总数的12.4%,差异位点个数为8的约占总数的16.0%,差异位点个数为9的约占总数的17.4%,差异位点个数为10的约占总数的16.8%,差异位点个数为11的约占总数的11.4%,差异位点个数为12的约占总数的6.6%,差异位点个数为13的约占总数的2.6%,差异位点个数为14的约占总数的0.87%。此结果说明用这些标记在111个品种的多态性好;20个引物组(即20个SSR标记个数)在111个供试苦瓜品种中的区分率达到100%。

[0136] 实施例3

[0137] 本实施例是检测待测苦瓜品种是否属于111个供试苦瓜品种中的品种的方法,该待测苦瓜的品种未知,需要经过本实施例的检测方法得到该待测苦瓜的品种是否是这111个品种之一。

[0138] 1、待测苦瓜品种的基因组DNA的获得

[0139] 待测苦瓜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。

[0140] 按照实施例2中的步骤1的方法,将“供试苦瓜品种的叶片”替换为“待测苦瓜品种的叶片”,其它步骤均不变,得到待测苦瓜品种的基因组DNA。

[0141] 2、SSR引物及PCR反应体系的配置

[0142] 按照实施例2中的步骤2的方法,将“供试苦瓜品种的基因组DNA”替换为“待测苦瓜品种的基因组DNA”,其它步骤均不变,得到待测苦瓜品种的PCR产物。

[0143] 3、荧光毛细管电泳检测

[0144] 取待测苦瓜品种的PCR产物。

[0145] 将待测苦瓜品种的20个SSR扩增产物的片段大小分别与实施例2的111个供试苦瓜品种的20个SSR位点进行对比,统计待测苦瓜品种和20个标准苦瓜品种的差异位点数,然后进行如下判断:

[0146] 如果待测苦瓜品种与某标准苦瓜品种的差异位点数为2个以上,则待测苦瓜品种和该标准苦瓜品种判定为不同的苦瓜品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远。

[0147] 如果待测苦瓜品种与某标准苦瓜品种的差异位点数为0-2,则待测苦瓜品种和该标准苦瓜品种判定为相似的苦瓜品种。

[0148] 结果表明,待测苦瓜品种在20个SSR位点上与111个供试苦瓜品种的差异位点数均为4个以上,因此,待测苦瓜品种不属于111个供试苦瓜品种中的任何一个品种,即待测苦瓜品种并不是上述111个供试苦瓜品种之一。

[0149] 实施例4

[0150] 本实施例是采用毛细管电泳对比片段大小来判定苦瓜品种,而不是采用荧光信号判定。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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,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 $^{\circ}$ 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。

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] S5:将待测苦瓜品种的20个SSR扩增产物的片段大小分别与111个供试苦瓜品种的20个SSR位点进行对比,统计待测苦瓜品种和20个标准苦瓜品种的差异位点数,然后进行如下判断:

[0158] 如果待测苦瓜品种与某标准苦瓜品种的差异位点数为2个以上,则待测苦瓜品种和该标准苦瓜品种判定为不同的苦瓜品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远。

[0159] 如果待测苦瓜品种与某标准苦瓜品种的差异位点数为0-2个,则待测苦瓜品种和该标准苦瓜品种判定为苦瓜相似的品种。

[0160] 实施例5

[0161] 本实施例是检测两个未知的苦瓜品种是否为同一种,本实施例的待测苦瓜品种为两个未知的苦瓜品种。

[0162] 1、待测苦瓜品种的基因组DNA的获得

[0163] 分别取两个待测苦瓜品种的叶片,采用CTAB法分别提取这两个待测苦瓜品种的基因组DNA,该CTAB法的操作见实施例2,得到待测苦瓜品种的基因组DNA。

[0164] 2、SSR引物及PCR反应体系的配置

[0165] 按照实施例2中的步骤2的方法,将“供试苦瓜品种的基因组DNA”替换为“待测苦瓜品种的基因组DNA”,其它步骤均不变,得到待测苦瓜品种的PCR产物。

[0166] 3、荧光毛细管电泳检测和数据记录

[0167] 步骤2的PCR反应完成后,对PCR产物根据不同引物的主要等未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。

[0168] 4、在步骤3中分别获得两个未知苦瓜品种(待测苦瓜品种)的20个SSR位点数据,分别对比两个未知苦瓜品种在相同上述20个SSR位点中每个SSR位点上的数据,记录有差异位点的个数。

[0169] 如果两个未知苦瓜品种在上述20个SSR位点的差异位点数为2个以上,则两个未知苦瓜品种判定为不同的苦瓜品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远;

[0170] 如果两个未知苦瓜品种在上述20个SSR位点的差异位点数为0-2个,则两个未知苦瓜品种判定为相似的苦瓜品种。

[0171] 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> 一种鉴定苦瓜品种真实性的方法及其专用SSR引物组合
- [0004] <141> 2020-02-28
- [0005] <160> 40
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 28
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] tgttatttta aaatgagaaa cagctcaa 28
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 25
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> Artificial Sequence
- [0017] <400> 2
- [0018] attatgaagg gcctgtttgt tgttt 25
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 25
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Artificial Sequence
- [0023] <400> 3
- [0024] tctcgagggtg ggagatttaa tcttc 25
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 25
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <400> 4
- [0030] ttatttggtt tctgatgcgt ctgtc 25
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 25
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <400> 5
- [0036] ttgctaaact atgtccatgg aaaga 25
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 25

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> Artificial Sequence
[0041] <400> 6
[0042] gaactattta ccacttcac ggtgt 25
[0043] <210> 7
[0044] <211> 25
[0045] <212> DNA
[0046] <213> Artificial Sequence
[0047] <400> 7
[0048] gaatgtgtag tcaagggtca caatg 25
[0049] <210> 8
[0050] <211> 25
[0051] <212> DNA
[0052] <213> Artificial Sequence
[0053] <400> 8
[0054] tttgaggatc tgaatttgt ctcgc 25
[0055] <210> 9
[0056] <211> 25
[0057] <212> DNA
[0058] <213> Artificial Sequence
[0059] <400> 9
[0060] gaaaagaaca taaaacggag gggaa 25
[0061] <210> 10
[0062] <211> 25
[0063] <212> DNA
[0064] <213> Artificial Sequence
[0065] <400> 10
[0066] agatttcctc aaccctttgt gagat 25
[0067] <210> 11
[0068] <211> 26
[0069] <212> DNA
[0070] <213> Artificial Sequence
[0071] <400> 11
[0072] acatccttct tcctacata tgtact 26
[0073] <210> 12
[0074] <211> 25
[0075] <212> DNA
[0076] <213> Artificial Sequence
[0077] <400> 12

[0078] gcagcttgat catttgaccc attta 25
[0079] <210> 13
[0080] <211> 25
[0081] <212> DNA
[0082] <213> Artificial Sequence
[0083] <400> 13
[0084] caactttagg gggagtgtta gagta 25
[0085] <210> 14
[0086] <211> 25
[0087] <212> DNA
[0088] <213> Artificial Sequence
[0089] <400> 14
[0090] gccttttgct tccaagttgt aaaga 25
[0091] <210> 15
[0092] <211> 27
[0093] <212> DNA
[0094] <213> Artificial Sequence
[0095] <400> 15
[0096] acatattact tggttaattgc tagacaa 27
[0097] <210> 16
[0098] <211> 25
[0099] <212> DNA
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <400> 16
[0102] tgaacattgt tgaggcacct aaaaa 25
[0103] <210> 17
[0104] <211> 25
[0105] <212> DNA
[0106] <213> Artificial Sequence
[0107] <400> 17
[0108] cctcaatttg cctctctccc atatt 25
[0109] <210> 18
[0110] <211> 25
[0111] <212> DNA
[0112] <213> Artificial Sequence
[0113] <400> 18
[0114] actgtgggaa ctatttgatg tagct 25
[0115] <210> 19
[0116] <211> 25

- [0117] <212> DNA
[0118] <213> Artificial Sequence
[0119] <400> 19
[0120] gacttttgtc cgatcgaaca taact 25
[0121] <210> 20
[0122] <211> 25
[0123] <212> DNA
[0124] <213> Artificial Sequence
[0125] <400> 20
[0126] tggcatccat tttgtttttc tttca 25
[0127] <210> 21
[0128] <211> 25
[0129] <212> DNA
[0130] <213> Artificial Sequence
[0131] <400> 21
[0132] atggactcag aatgaactga aaagg 25
[0133] <210> 22
[0134] <211> 25
[0135] <212> DNA
[0136] <213> Artificial Sequence
[0137] <400> 22
[0138] actttgttct cataagaggg gagtt 25
[0139] <210> 23
[0140] <211> 24
[0141] <212> DNA
[0142] <213> Artificial Sequence
[0143] <400> 23
[0144] tatttgtatt tgtccgtcgg aggg 24
[0145] <210> 24
[0146] <211> 25
[0147] <212> DNA
[0148] <213> Artificial Sequence
[0149] <400> 24
[0150] cgccatttcc tgtttgattc aatat 25
[0151] <210> 25
[0152] <211> 25
[0153] <212> DNA
[0154] <213> Artificial Sequence
[0155] <400> 25

[0156] ggaatgtggg ttttctttgg aagat 25
[0157] <210> 26
[0158] <211> 25
[0159] <212> DNA
[0160] <213> Artificial Sequence
[0161] <400> 26
[0162] accccaaaag taaactaat acccc 25
[0163] <210> 27
[0164] <211> 25
[0165] <212> DNA
[0166] <213> Artificial Sequence
[0167] <400> 27
[0168] ccaacaatta tccacttgtg cttct 25
[0169] <210> 28
[0170] <211> 25
[0171] <212> DNA
[0172] <213> Artificial Sequence
[0173] <400> 28
[0174] gactttattg tgtggggaca tgaac 25
[0175] <210> 29
[0176] <211> 25
[0177] <212> DNA
[0178] <213> Artificial Sequence
[0179] <400> 29
[0180] tagacgatgg acgctttaag ttgta 25
[0181] <210> 30
[0182] <211> 25
[0183] <212> DNA
[0184] <213> Artificial Sequence
[0185] <400> 30
[0186] tatcagatgc catgaagaca acaga 25
[0187] <210> 31
[0188] <211> 25
[0189] <212> DNA
[0190] <213> Artificial Sequence
[0191] <400> 31
[0192] aatacttata gtaccgatg tccgt 25
[0193] <210> 32
[0194] <211> 25

- [0195] <212> DNA
[0196] <213> Artificial Sequence
[0197] <400> 32
[0198] aacgtgtcca acaaatgctt tctat 25
[0199] <210> 33
[0200] <211> 25
[0201] <212> DNA
[0202] <213> Artificial Sequence
[0203] <400> 33
[0204] atcatatgat gtgggattag gtcat 25
[0205] <210> 34
[0206] <211> 25
[0207] <212> DNA
[0208] <213> Artificial Sequence
[0209] <400> 34
[0210] gggcacagct taattaggta cctaa 25
[0211] <210> 35
[0212] <211> 26
[0213] <212> DNA
[0214] <213> Artificial Sequence
[0215] <400> 35
[0216] tgctacttga accaatgaga agaaac 26
[0217] <210> 36
[0218] <211> 28
[0219] <212> DNA
[0220] <213> Artificial Sequence
[0221] <400> 36
[0222] tgatttgttc tttctatgaa aatgttgt 28
[0223] <210> 37
[0224] <211> 25
[0225] <212> DNA
[0226] <213> Artificial Sequence
[0227] <400> 37
[0228] aagaaggtgt actagtagct cctct 25
[0229] <210> 38
[0230] <211> 25
[0231] <212> DNA
[0232] <213> Artificial Sequence
[0233] <400> 38

-
- [0234] ccaagtggca tttatcaac acatt 25
[0235] <210> 39
[0236] <211> 25
[0237] <212> DNA
[0238] <213> Artificial Sequence
[0239] <400> 39
[0240] aatgccagat gtaattgcta tgggtg 25
[0241] <210> 40
[0242] <211> 25
[0243] <212> DNA
[0244] <213> Artificial Sequence
[0245] <400> 40
[0246] tacacatcca taccgctaga agaag 25

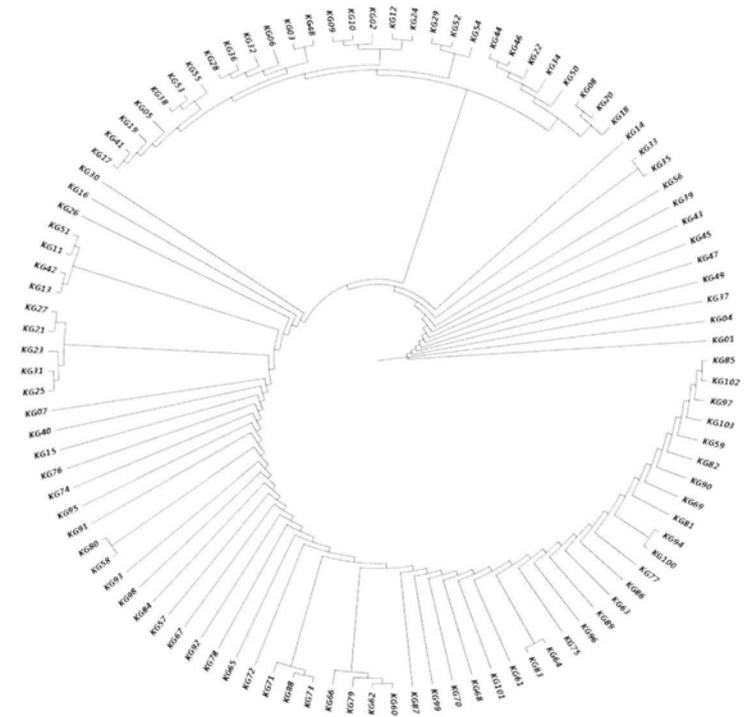


图1

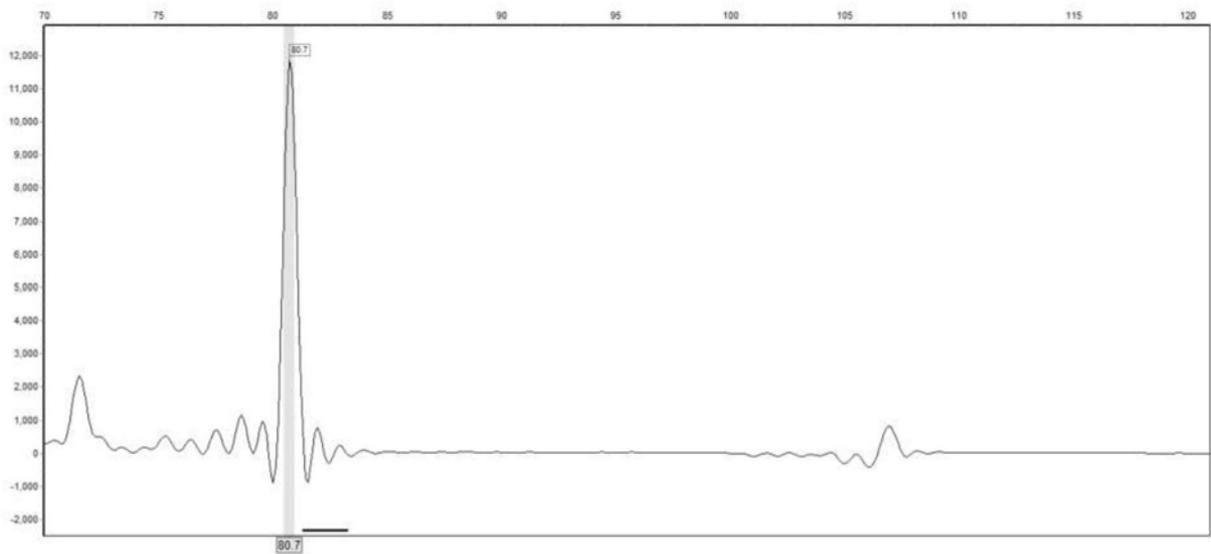


图2

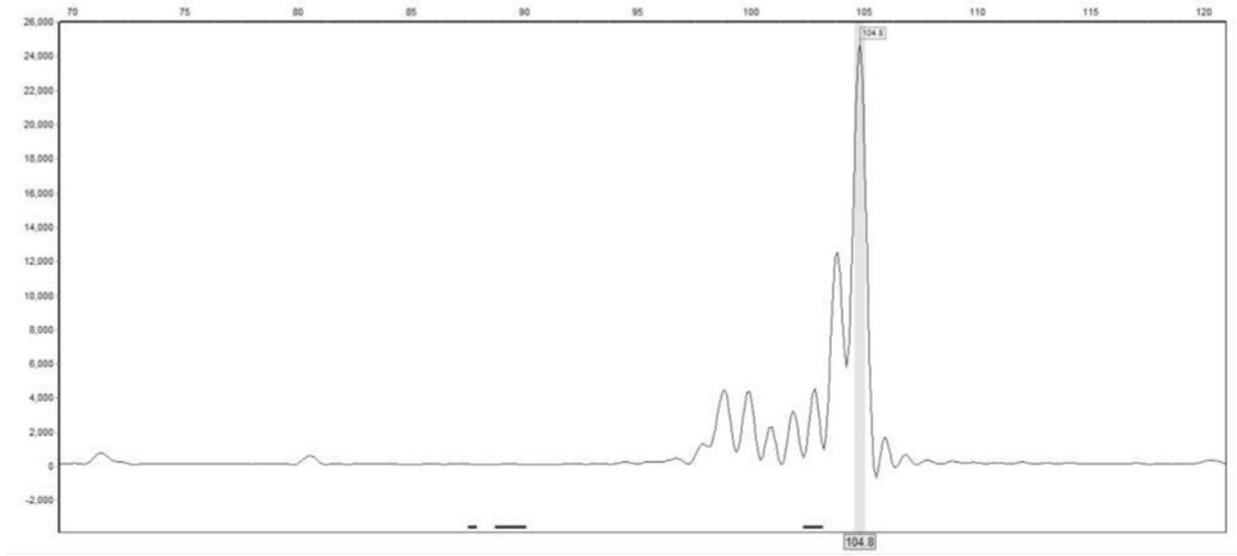


图3

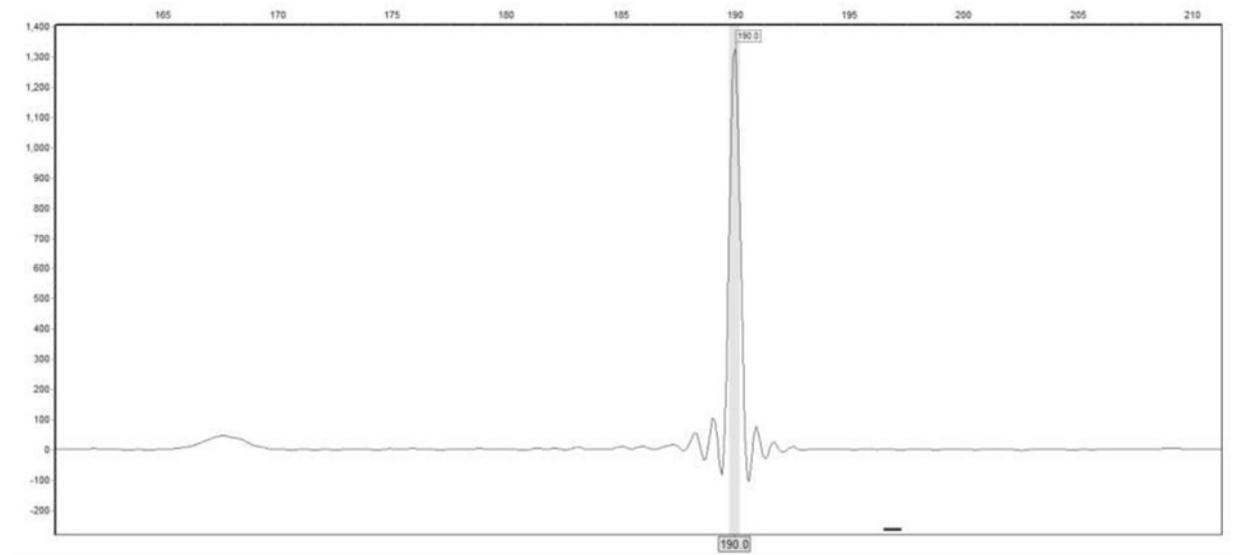


图4

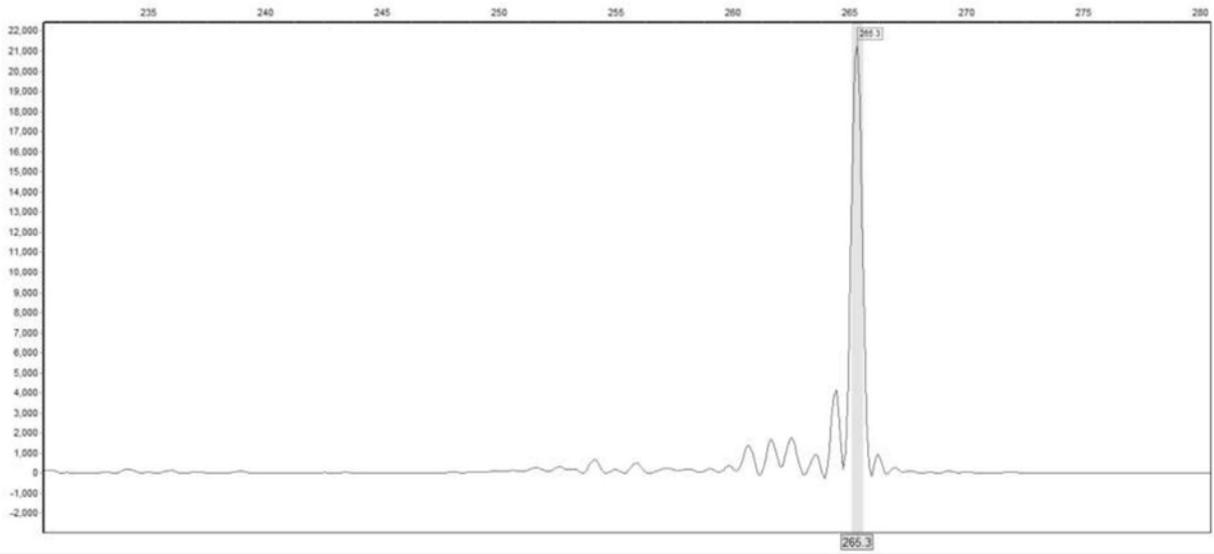


图5

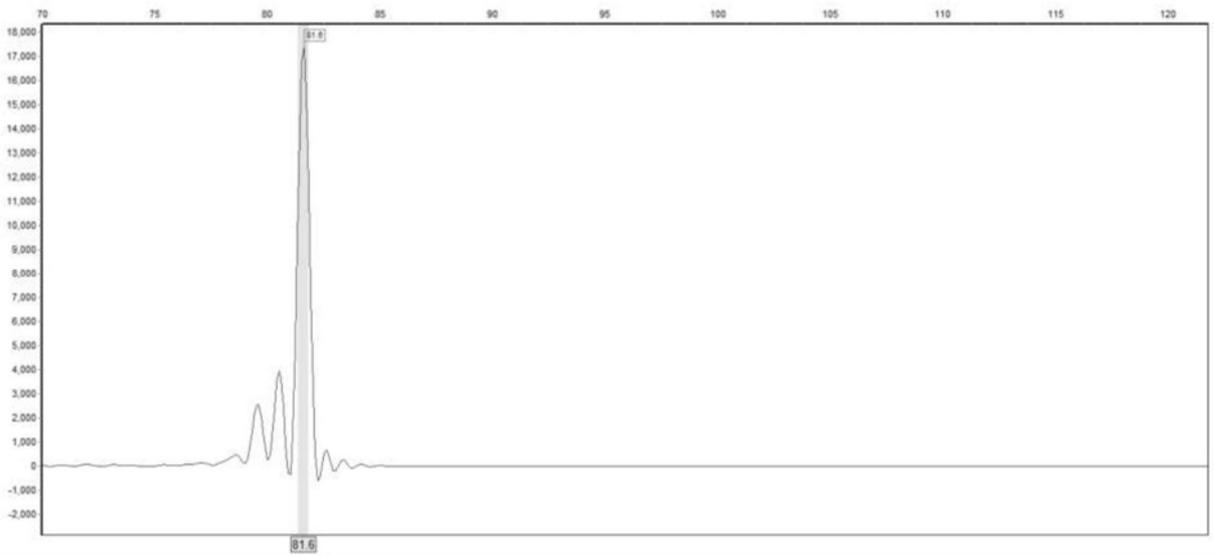


图6

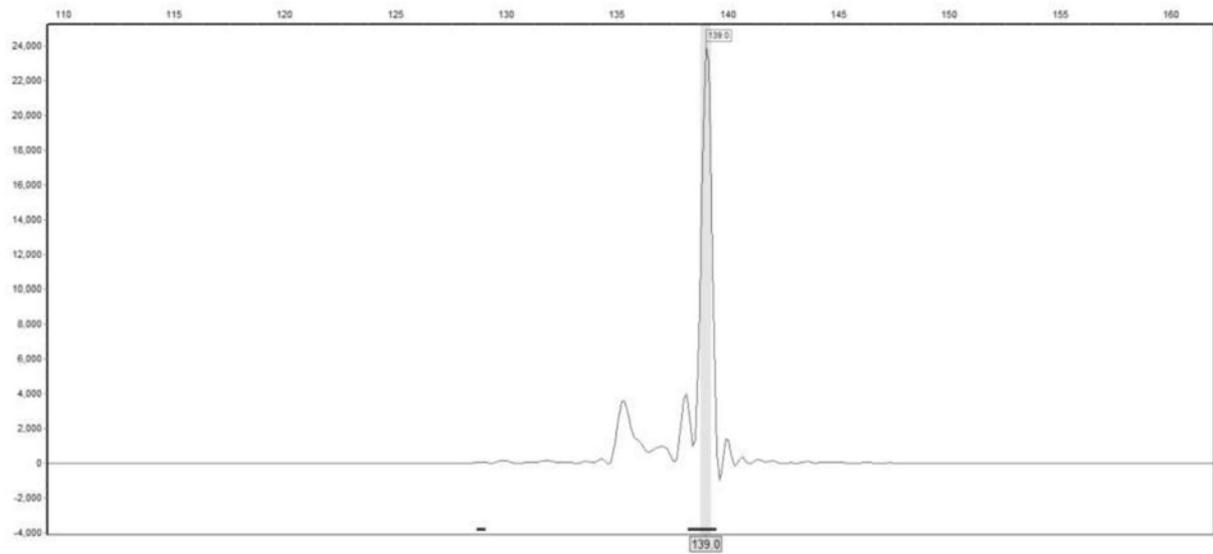


图7

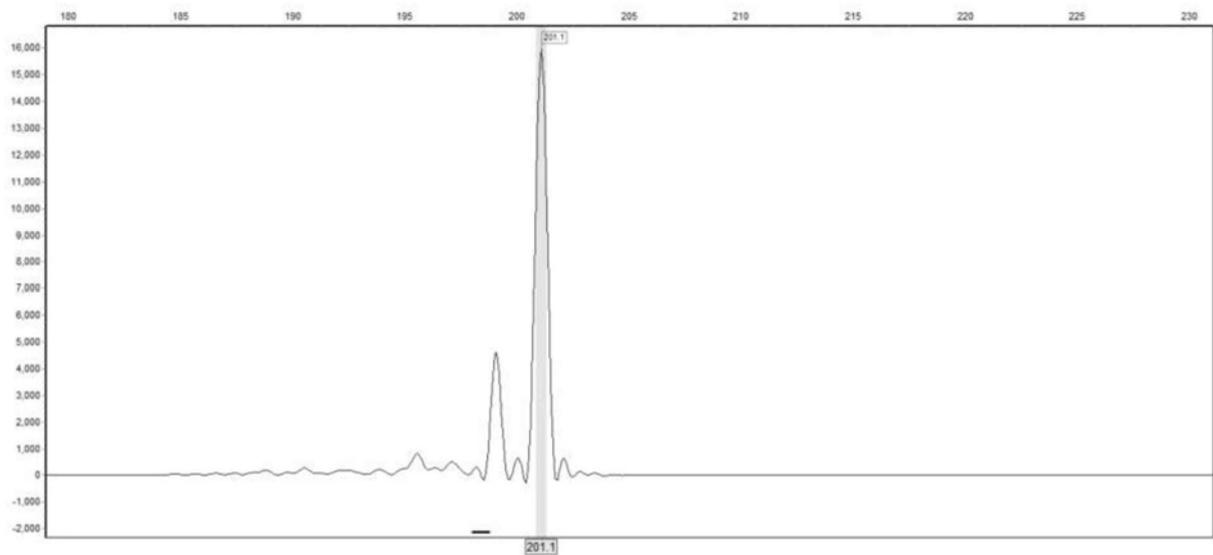


图8

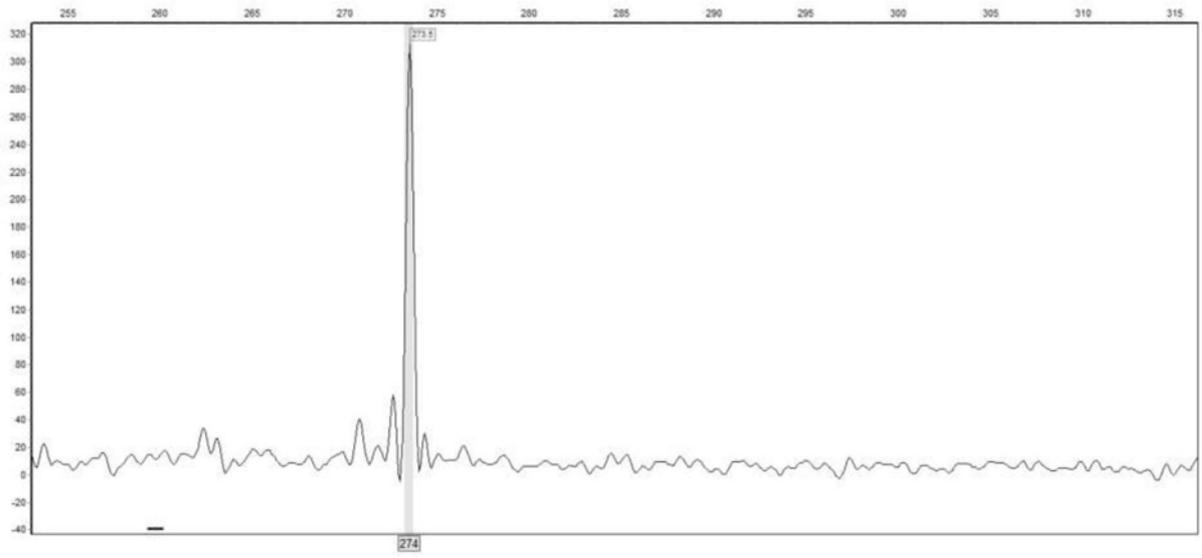


图9

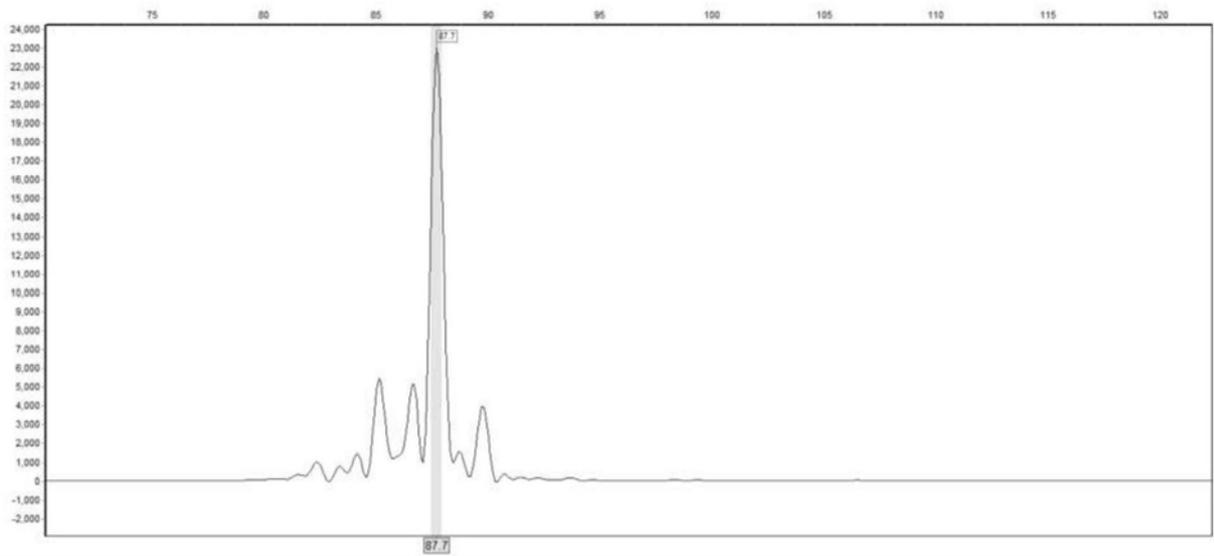


图10

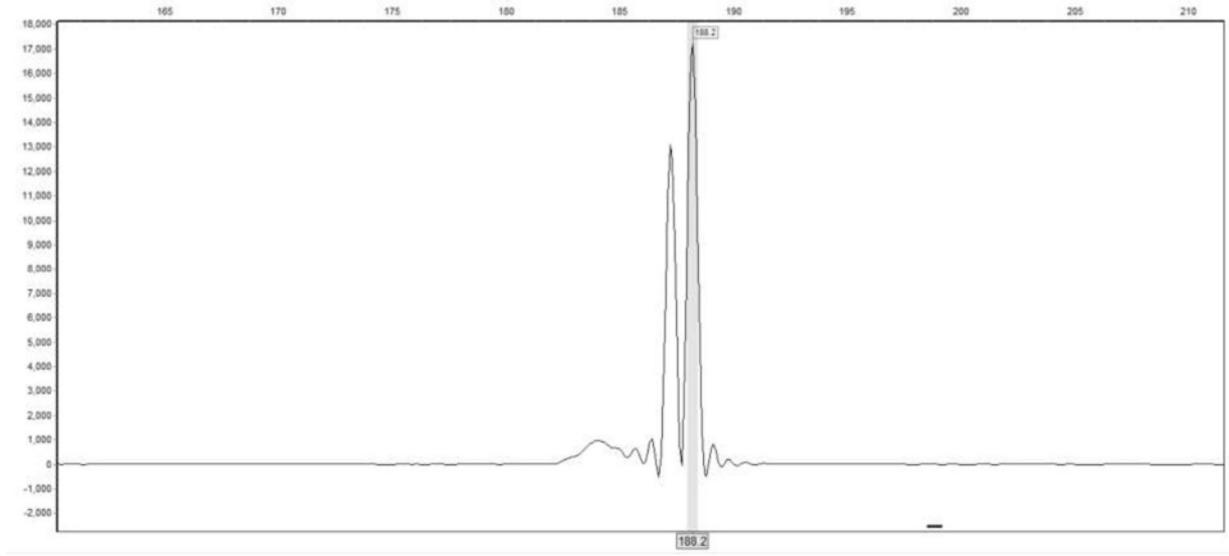


图11

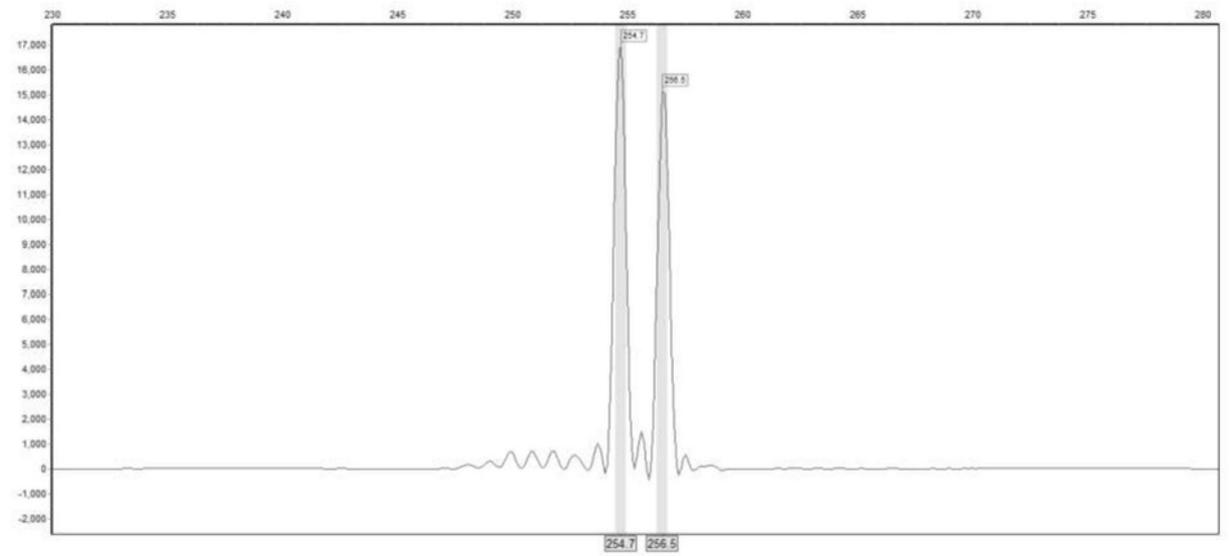


图12

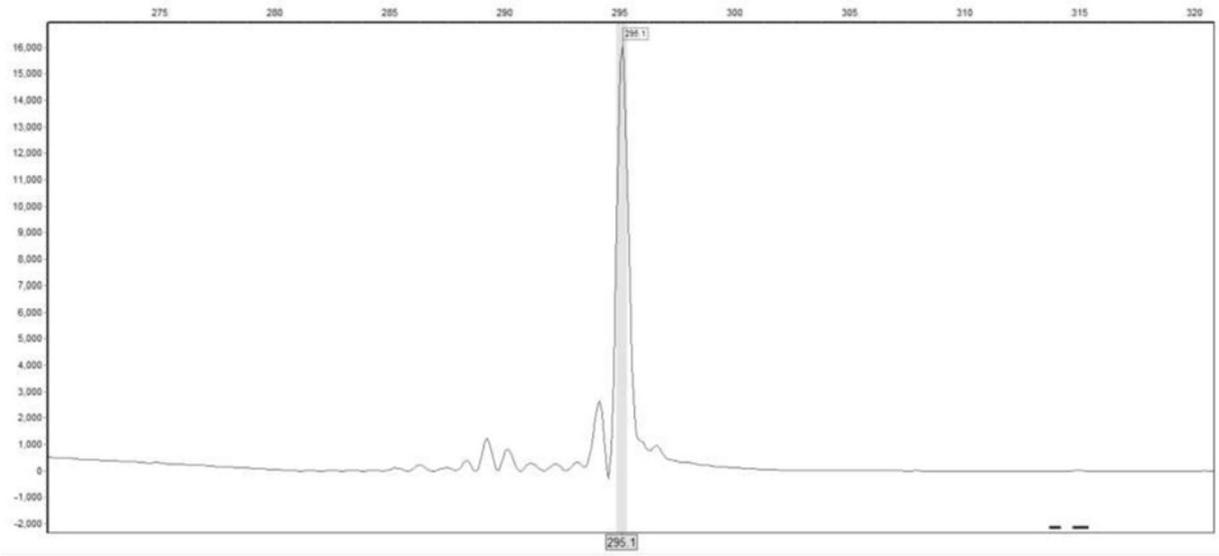


图13

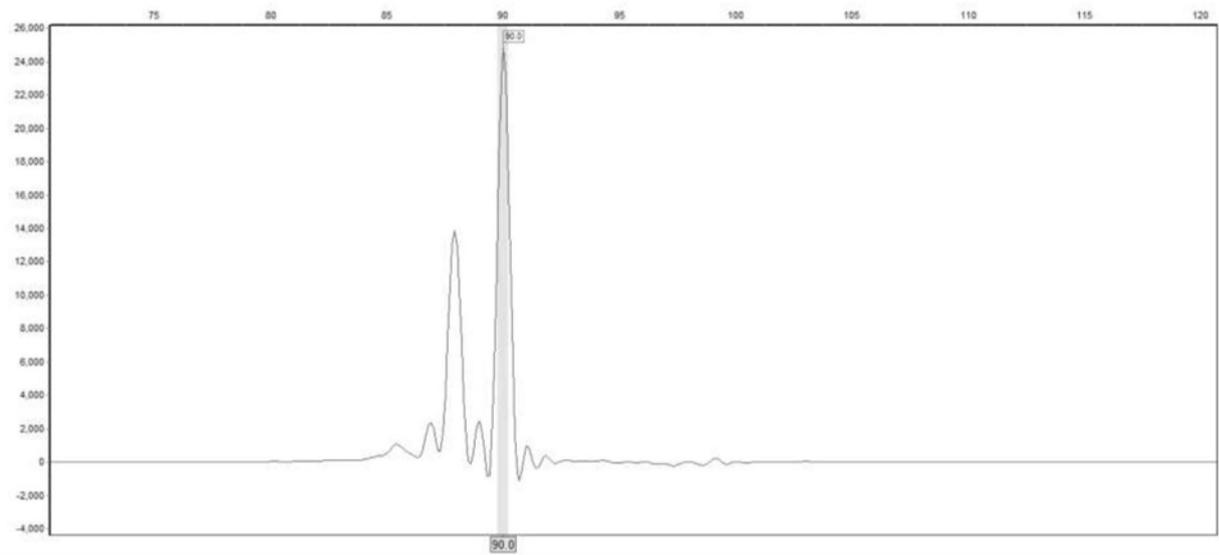


图14

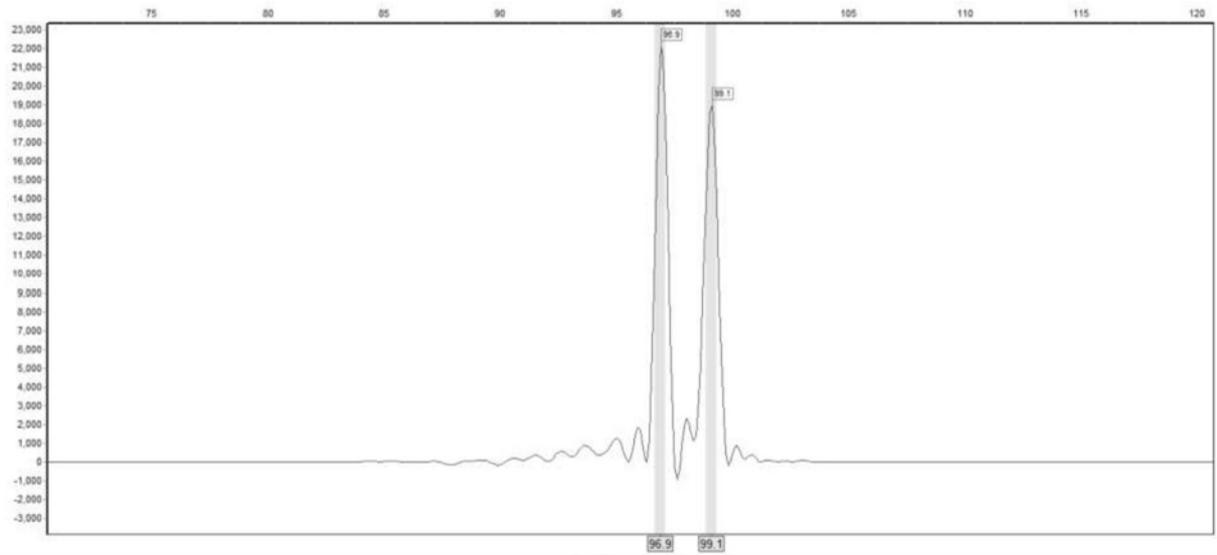


图15

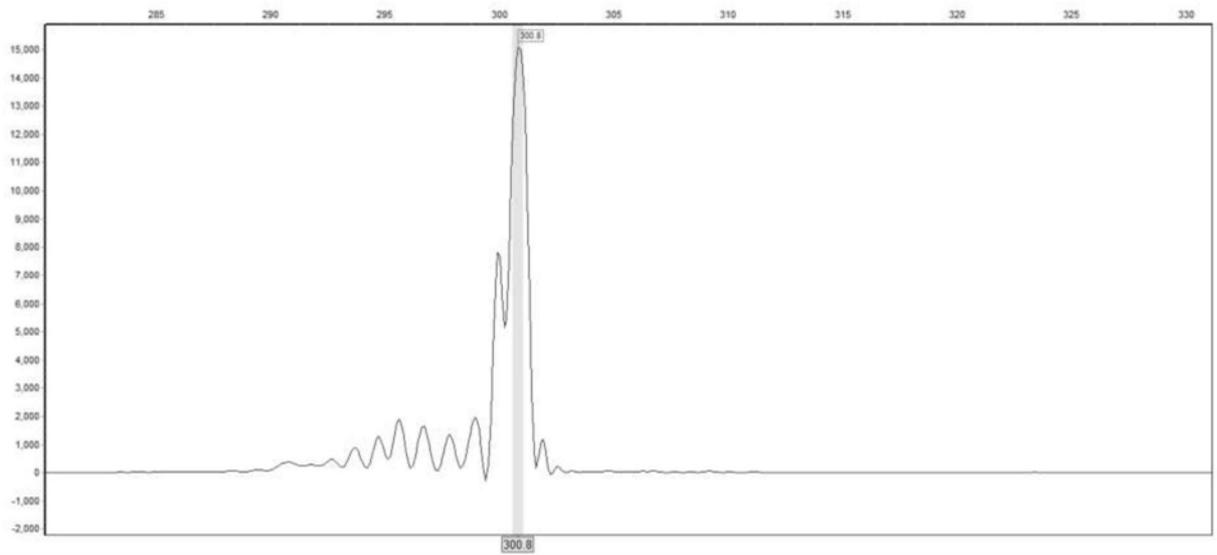


图16

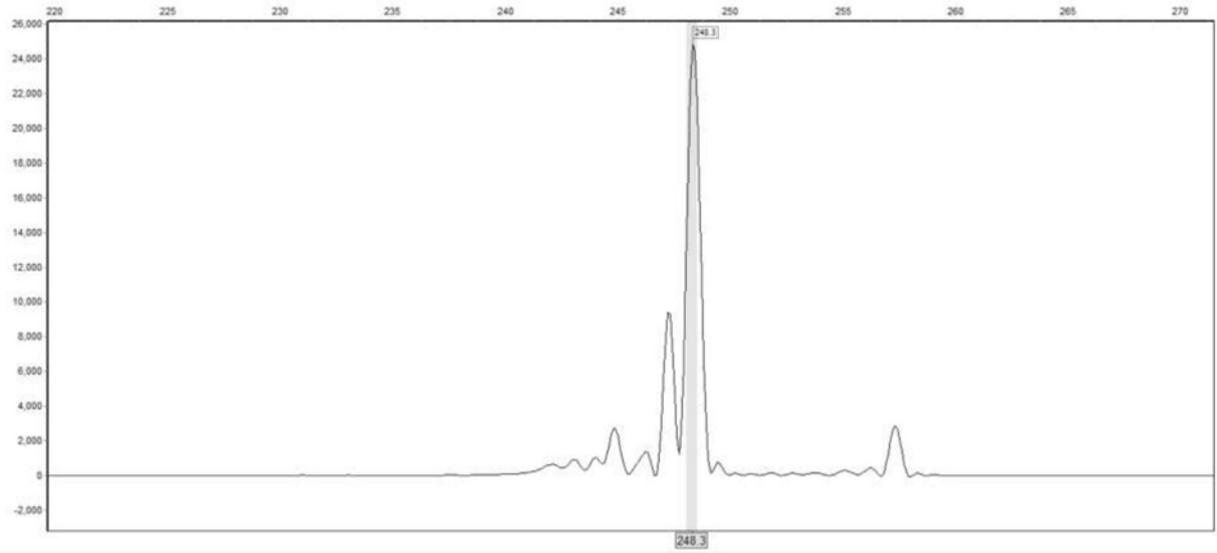


图17

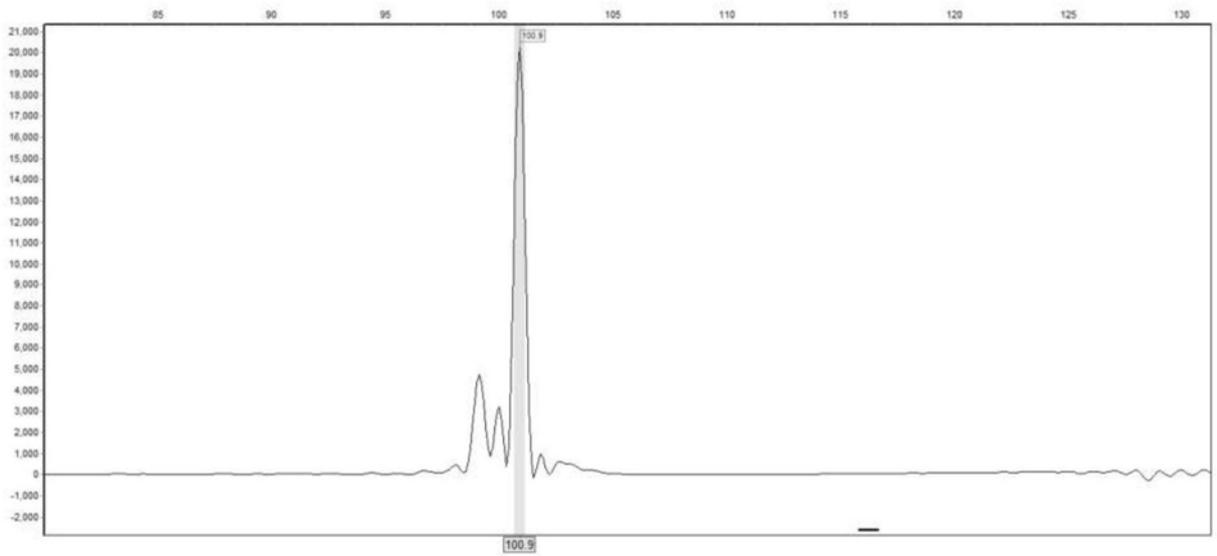


图18

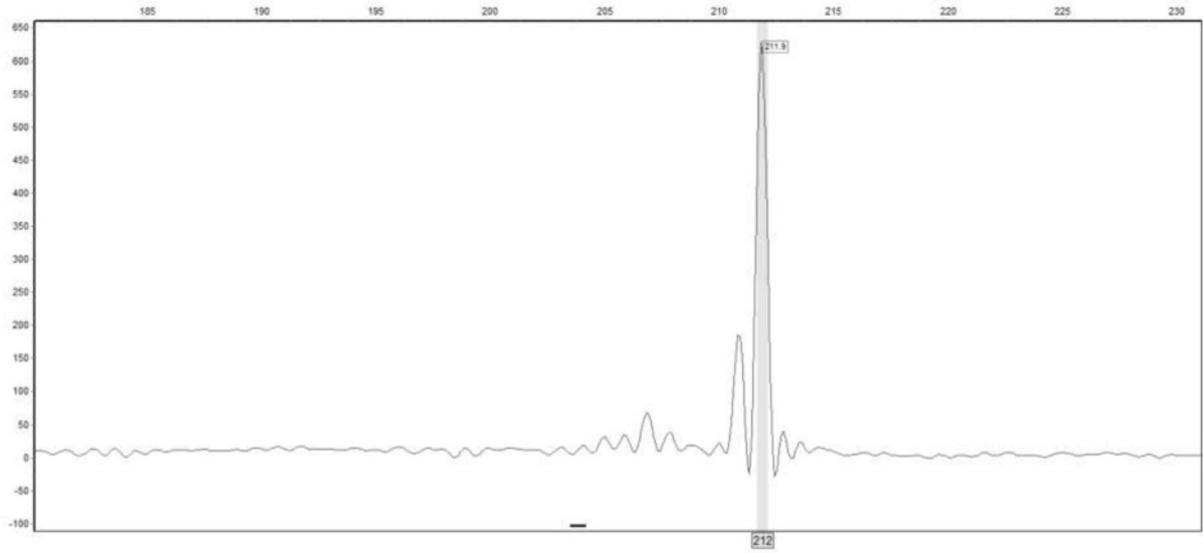


图19

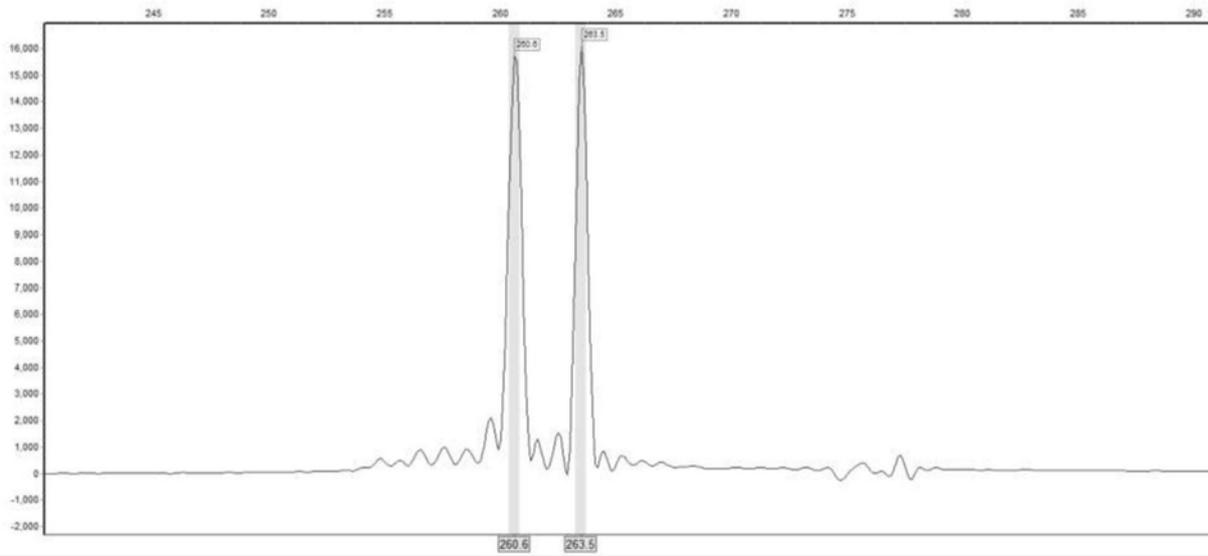


图20

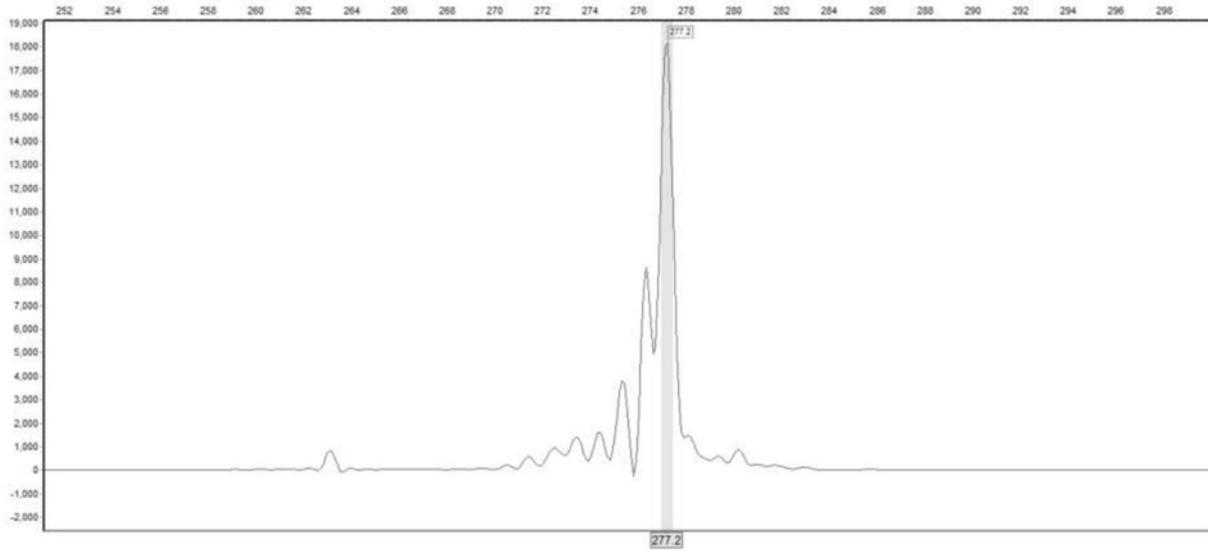


图21

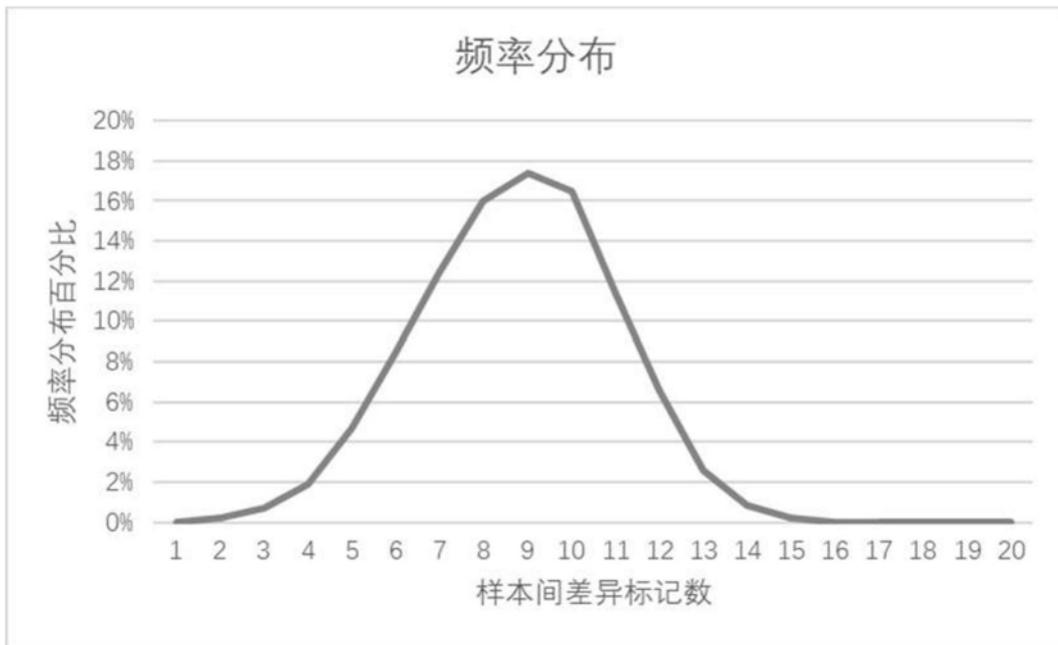


图22