



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113604596 A

(43) 申请公布日 2021.11.05

(21) 申请号 202110915013.1

(22) 申请日 2021.08.10

(71) 申请人 河北省农林科学院经济作物研究所
地址 050051 河北省石家庄市新华区和平西路598号

(72) 发明人 吴志明 李亚栋 王鹏 田哲娟
康忱 赵雪芳

(74) 专利代理机构 石家庄海天知识产权代理有限公司 13101

代理人 田文其

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

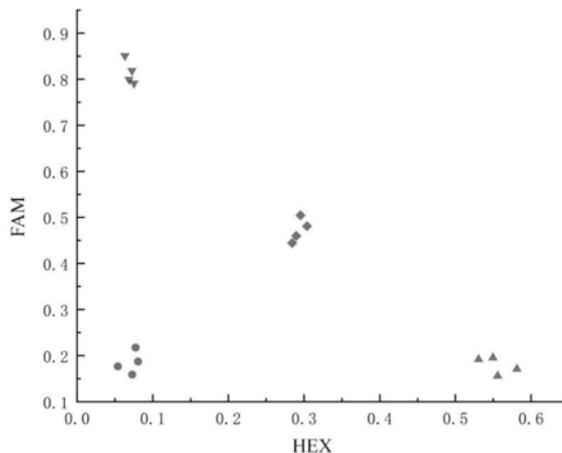
权利要求书2页 说明书21页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学和黄瓜育种技术领域,特别是指检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物及其应用。本发明提供了可用于检测zym基因第86bp和第99bp不同基因型的KASP引物和包含KASP引物的试剂盒。本发明中的KASP引物或试剂盒可用于鉴定黄瓜中是否含有ZYMV抗病基因zym,区分含有zym基因的抗ZYMV的黄瓜和含有突变的Zym基因的感ZYMV的黄瓜。本发明相比现有技术可在黄瓜苗期快速、准确、高通量的进行ZYMV抗性鉴定,大大降低了苗期人工接种和田间抗性鉴定的工作量,其应用可提高黄瓜育种效率、加快育种进程,节约成本。所述的KASP引物及试剂盒可应用于黄瓜种质资源、各类亲本、杂交种等材料的鉴定。



1. 检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物,其特征在于所述的KASP引物序列包含:

正向引物zym-86-FT:5'-GCAATTACGCAAAAGCCTT-3',其序列如SEQNo.1;

正向引物zym-86-FC:5'-GCAATTACGCAAAAGCCTC-3',其序列如SEQNo.2;

反向引物zym-99-RC:5'-TTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3',其序列如SEQ No.3;

反向引物zym-99-RT:5'-TTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3',其序列如SEQ No.4;

所述正向引物zym-86-FT和正向引物zym-86-FC分别与不同的标签序列相连接;

所述反向引物zym-99-RC和反向引物zym-99-RT分别与不同的标签序列相连接。

2. 根据权利要求1所述的检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物,其特征在于合成所述的正向引物zym-86-FT和反向引物zym-99-RC时,在两者5'端加上序列为:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3'的标签序列A,其序列如SEQ No.5;合成所述正向引物zym-86-FC和反向引物zym-99-RT时,在两者5'端加上序列为:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'的标签序列B,其序列如SEQ No.6。

3. 根据权利要求1所述的检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物,其特征在于所述的KASP引物序列为:

正向引物86-FT:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAATTACGCAAAAGCCTT-3',其序列如SEQ No.7;

正向引物86-FC:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAGCCTC-3',其序列如SEQ No.8;

反向引物99-RC:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3',其序列如SEQ No.9;

反向引物99-RT:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3',其序列如SEQ No.10。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物,其特征在于所述的KASP引物中还包括:

反向引物86-R:5'-CTTGGATTTTTCTCATACTTCA-3',其序列如SEQNo.11;

正向引物99-F:5'-CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3',其序列如SEQ No.12。

5. 用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒,其特征在于包含权利要求1-4中任一项所述的KASP引物,其中正向引物86-FT、正向引物86-FC和反向引物86-R为一对KASP引物;反向引物99-RC、反向引物99-RT和正向引物99-F为一对KASP引物。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于其中还包含:

标签序列A:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3',其序列如SEQ No.5;

标签序列B:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3',其序列如SEQ No.6;

所述两种标签序列:标签序列A和标签序列B,分别与不同的荧光基团相连接,其特征在于标签序列A与FAM荧光基因相连接,标签序列B与HEX荧光基因相连接;

所述两种标签序列的互补序列均与BHQ淬灭基因相连接。

7. 根据权利要求1-4中任一所述的KASP引物或权利要求5-6任一项所述的试剂盒在鉴定黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym中的应用。

8. 根据权利要求1-4中任一所述的KASP引物或权利要求5-6任一项所述的试剂盒

鉴定黄瓜中是否含有黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym中的应用。

9. 根据权利要求1-4中任一所述的KASP引物或权利要求要求5-6任一项所述的试剂盒在鉴定或区分含有抗病基因zym的抗小西葫芦黄化花叶病毒病的黄瓜和含有突变基因Zym的感小西葫芦黄化花叶病毒病的黄瓜中的应用。

10. 根据权利要求1-4中任一所述的KASP引物或权利要求要求5-6任一项所述的试剂盒在区分含有zym基因的纯合抗小西葫芦黄化花叶病毒的黄瓜 (zym/zym)、含有突变基因Zym的纯合感小西葫芦黄化花叶病毒的黄瓜 (Zym/Zym) 和同时含有Zym基因和zym基因的杂合感小西葫芦黄化花叶病毒的黄瓜 (Zym/zym) 中的应用。

11. 根据权利要求1-4中任一所述的KASP引物或权利要求要求5-6任一项所述的试剂盒在zym基因在黄瓜抗小西葫芦黄化花叶病毒病育种中的应用。

12. 根据权利要求1-4中任一所述的KASP引物或权利要求要求5-6任一项所述的试剂盒扩增待检测的黄瓜样品,检测和分析扩增产物中的应用。

检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和作物育种技术领域,特别是检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物及其应用。

背景技术

[0002] 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)属葫芦科一年生攀援状草本植物,原产印度,是国际上第三大蔬菜作物,也是我国主要栽培蔬菜之一。黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒(Zucchini Yellow Mosaic Virus,ZYMV)是危害黄瓜的主要病毒之一,近年来在日光温室中广泛传播,严重影响了黄瓜产量和品质,培育抗病毒品种可以有效抵御ZYMV,减少损失。

[0003] ZYMV为马铃薯Y病毒属,主要通过蚜虫传播,可侵染葫芦科、苋科、藜科、豆科等多种植物。黄瓜感染ZYMV后,植株出现叶片黄化、花叶,并伴随泡状或瘤状突起,发病严重时植株矮化,叶片皱缩和果实发育畸形,甚至死亡。然而在实际生产中并无有效的化学药剂或其他方法能明显防治ZYMV的发生与传播。培育抗病毒的黄瓜新品种是防治ZYMV的根本途径。

[0004] 常规育种费时费力,环境要求较高,难度较大,具有一定的局限性。近年来随着现代分子生物学技术的发展,为植物育种提供了新的思维,加快育种进程。分子标记辅助选择是对目标性状在DNA水平上的选择,具有不受环境影响,不受等位基因显隐性关系干扰,选择结果准确可靠等优点,越来越被育种家青睐。常用的分子标记类型有RFLP、RAPD、AFLP、SSR、CAPS等,并广泛应用于黄瓜育种中,但是这些标记操作繁琐、实验要求高、检测效率低,不适用大样品、高通量的检测。为满足育种需要,建立一种高效、便捷、准确地检测方法尤为重要。

[0005] SNP标记作为第3代分子标记,目前被公认是极具应用前景的分子标记技术,基于SNP标记开发的竞争性等位基因特异PCR(Kompetitive Allele Specific PCR,KASP)技术具有高通量、省时、便捷等优点,其特点是基于引物末端碱基的特异匹配对SNP分型,可在广泛的基因组DNA样品中对SNP位点进行精准的双等位基因判断,具有高度稳定性与准确性,成为SNP基因分型的主流。其主要特征是引物采用3条特异性引物,其中上游引物2条,3'端为等位基因变异碱基,5'端添加通用荧光接头序列,通用的下游引物为普通引物,常规PCR扩增,终点法荧光信号检测。

[0006] 国内外学者对于ZYMV已经进行了很多研究,1973年Lisa等首次从西葫芦中分离并描述了ZYMV。Provvidenti等对ZYMV的遗传规律的研究,认为ZYMV抗性基因是受一对隐性基因zym/zym控制。Amano等将ZYMV的抗性基因zym^{A192-18}定位在黄瓜六号染色体50kb的区间内,通过对抗病与感病亲本间的基因序列分析,表明Vacuolar protein sorting-associated protein 4-like(VPS4-like)基因(Csa6G152960.1)最有可能是候选的ZYMV抗病基因,该基因可能与病毒的复制及在细胞间的移动有关。抗病与感病亲本在该基因的第一个外显子处存在两个SNP位点,分别位于第86bp(T/C)和第99bp(G/A)处。抗病亲本在第86bp为C,第99bp为A;感病亲本在第86bp为T,第99bp为G。这两处SNP位点使得利用KASP技术

检测该基因成为可能,可以大幅提高抗病品种选育效率,缩短育种年限。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物及其应用,可用于鉴定黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym及黄瓜中是否含有zym基因,区分含有zym基因的抗ZYMV的黄瓜和含有突变基因Zym的感ZYMV的黄瓜,区分含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜(zym/zym)、含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜(Zym/Zym)和同时含有Zym和zym基因的杂合感ZYMV的黄瓜(Zym/zym),进而选育出含有zym基因的抗ZYMV的黄瓜品种。

[0008] 本发明的整体技术构思是:

[0009] 检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物,所述KASP引物序列包含:

[0010] 正向引物zym-86-FT:5'-GCAATTACGCAAAAGCCTT-3',其序列如SEQNo.1;

[0011] 正向引物zym-86-FC:5'-GCAATTACGCAAAAGCCTC-3',其序列如SEQNo.2;

[0012] 反向引物zym-99-RC:5'-TTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3',其序列如SEQ No.3;

[0013] 反向引物zym-99-RT:5'-TTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3',其序列如SEQ No.4;

[0014] 所述正向引物zym-86-FT和正向引物zym-86-FC分别与不同的标签序列相连接;

[0015] 所述反向引物zym-99-RC和反向引物zym-99-RT分别与不同的标签序列相连接。

[0016] 合成所述的正向引物zym-86-FT和反向引物zym-99-RC时,在两者5'端加上序列为:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3'的标签序列A,其序列如SEQ No.5;合成所述正向引物zym-86-FC和反向引物zym-99-RT时,在两者5'端加上序列为:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'的标签序列B,其序列如SEQ No.6。

[0017] 所述的KASP引物序列为:

[0018] 正向引物86-FT:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAATTACGCAAAAGCCTT-3',其序列如SEQ No.7;

[0019] 正向引物86-FC:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAGCCTC-3',其序列如SEQ No.8;

[0020] 反向引物99-RC:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3',其序列如SEQ No.9;

[0021] 反向引物99-RT:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3',其序列如SEQ No.10。

[0022] 所述的KASP引物中还包括:

[0023] 反向引物86-R:5'-CTTGGGATTTTTCTCATACTTCA-3',其序列如SEQNo.11;

[0024] 正向引物99-F:5'-CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3',其序列如SEQ No.12。

[0025] 用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒,包括所述KASP引物,其中正向引物86-FT、正向引物86-FC和反向引物86-R为一对KASP引物;反向引物99-RC、反向引物99-RT和正向引物99-F为一对KASP引物。

[0026] 用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒,其中还包括:

[0027] 标签序列A:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3',其序列如SEQ No.5;

- [0028] 标签序列B:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3',其序列如SEQ No.6;
- [0029] 所述两种标签序列:标签序列A和标签序列B,分别与不同的荧光基团相连接,其特征在于标签序列A与FAM荧光基因相连接,标签序列B与HEX荧光基因相连接;
- [0030] 所述两种标签序列的互补序列均与BHQ淬灭基因相连接。
- [0031] 检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒在如下a-e至少一种中的应用:
- [0032] a、鉴定黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym;
- [0033] b、鉴定黄瓜中是否含有黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym;
- [0034] c、鉴定或区分含有zym基因的抗ZYMV的黄瓜和含有突变的Zym基因的感ZYMV的黄瓜;
- [0035] d、区分含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜(zym/zym)、含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜(Zym/Zym)和同时含有Zym基因和zym基因的杂合感ZYMV的黄瓜(Zym/zym);
- [0036] e、黄瓜抗ZYMV育种。
- [0037] 鉴定黄瓜中是否含有黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的应用,是利用检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒扩增待检测的黄瓜样品,检测和分析扩增产物。
- [0038] 区分含有zym基因的抗ZYMV的黄瓜和含有突变的Zym基因的感ZYMV的黄瓜的应用,是利用检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒扩增待检测的黄瓜样品,检测和分析扩增产物。
- [0039] 区分含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜(zym/zym)、含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜(Zym/Zym)和同时含有Zym基因和zym基因的杂合感ZYMV的黄瓜(Zym/zym)的应用,是利用检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或用于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒扩增待检测的黄瓜样品,检测和分析扩增产物。
- [0040] 本发明所取得的实质性特点和显著的技术进步在于:
- [0041] 利用本发明所提供的KASP引物及试剂盒,当黄瓜植株在苗期时,仅使用少量叶片组织即可快速、准确、高通量的完成对黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的检测,大大降低苗期人工接种和田间抗病性鉴定的工作量。本所述的KASP引物及试剂盒可应用于黄瓜种植资源、各类亲本和杂交种等材料的鉴定,其应用可以提高黄瓜抗ZYMV的育种效率、加快育种进程、节约成本。

附图说明

- [0042] 图1为检测zym基因第86bp SNP位点KASP标记的分型结果。
- [0043] 图中横坐标和纵坐标数值均表示荧光信号值,其中纵坐标表示FAM荧光信号值,横坐标表示HEX荧光信号值;图中靠近横轴的黑色三角所表示的为纯合抗ZYMV材料TMG1的扩增信号;图中处于中间位置的黑色菱形所表示的为杂合的感ZYMV材料TMG1-9930-F1的扩增信号;图中靠近纵轴的倒三角所表示的为纯合的感ZYMV材料9930的扩增信号;靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号。
- [0044] 图2为检测zym基因第99bp SNP位点KASP标记的分型结果。

[0045] 图中横坐标和纵坐标数值均表示荧光信号值,其中纵坐标表示FAM荧光信号值,横坐标表示HEX荧光信号值;图中靠近横轴黑色三角所表示的为纯合抗ZYMV材料TMG1的扩增信号;图中处于中间位置的黑色菱形所表示的为杂合的感ZYMV材料TMG1-9930-F1的扩增信号;图中靠近纵轴的倒三角所表示的为纯合的感ZYMV材料9930的扩增信号;靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号。

[0046] 图3为利用检测zym基因第8bp SNP位点的KASP引物鉴定抗ZYMV的黄瓜和感ZYMV的黄瓜的分型结果。

[0047] 图中横坐标和纵坐标数值均表示荧光信号值,其中纵坐标表示FAM荧光信号值,横坐标表示HEX荧光信号值;图中靠近横轴黑色三角所表示的即为纯合抗ZYMV的黄瓜材料的扩增信号;图中处于中间位置的黑色菱形所表示的为杂合的感ZYMV的黄瓜材料的扩增信号;图中靠近纵轴的倒三角所表示的为纯合感ZYMV的黄瓜材料的扩增信号;靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号。

[0048] 图4为利用检测zym基因第99bp SNP位点的KASP引物鉴定抗ZYMV的黄瓜和感ZYMV的黄瓜的分型结果。

[0049] 图中横坐标和纵坐标数值均表示荧光信号值,其中纵坐标表示FAM荧光信号值,横坐标表示HEX荧光信号值;图中靠近横轴黑色三角所表示的即为纯合抗ZYMV的黄瓜材料的扩增信号;图中处于中间位置的黑色菱形所表示的为杂合的感ZYMV的黄瓜材料的扩增信号;图中靠近纵轴的倒三角所表示的为纯合感ZYMV的黄瓜材料的扩增信号;靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号。

具体实施方式

[0050] 以下结合实施例对本发明做进一步描述,但不作为对本发明的限定,本发明的保护范围以权利要求记载的内容为准,任何依据本发明的说明书所做出的等效手段替换,均不脱离本发明的保护范围。

[0051] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0052] 下述实施例中所用的试剂(武汉市景肽生物科技有限公司)等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0053] 下列实施例中所用的黄瓜材料:TMG1(含有zym基因的纯合抗ZYMV材料)、9930(含有Zym基因的纯合感ZYMV材料)和TMG1-9930-F1(同时含有Zym基因和zym基因的杂合感ZYMV材料),社会公众可向河北省农林科学院经济作物研究所生物技术室索取,以重复本实验。

[0054] KASP基因分型方法操作简单,只需要将特异的KASP Primer mix和通用的KASP Master mix加入到含有DNA样本的PCR反应孔中,进行PCR扩增,最终结果采用荧光检测仪进行PCR产物分析即可。

[0055] 本发明基于KASP技术,提供了可检测zym基因的两个SNP位点的KASP引物,结合条件严格的Touchdown PCR方法,可在高通量分子标记检测平台上鉴定zym基因。

[0056] 具体的,申请人基于前人研究,黄瓜对ZYMV的抗性是由单一隐性基因控制,抗ZYMV亲本与感ZYMV亲本在zym候选基因VPS4-like上的第一个外显子处存在两个SNP位点,分别位于第86位碱基(T/C)和第99位碱基(G/A)处。抗ZYMV亲本和感ZYMV亲本在第86位的碱基分别为C和T,在第99位的碱基分别为A和G。针对这两处SNP位点进行大量实验,筛选确定了检

测该基因第86位 (T/C) SNP位点的两条特异性正向引物和一条通用的反向引物,和检测第99位 (G/A) SNP位点的一条通用的正向引物和两条特异的反向引物。

[0057] 具体实施方案中,针对SNP位点设计的KASP引物需要包括两条特异性正向引物(或反向引物)和一条通用的反向引物(或正向引物)。

[0058] 例如,本申请提供的检测zym基因第86位 (T/C) SNP位点的KASP引物包括正向引物zym-86-FT:5'-GCAATTACGCAAAAAGCCTT-3'和正向引物zym-86-FC:5'-GCAATTACGCAAAAAGCCTC-3',两者仅3'端最后一个碱基不同,即对应的SNP位点,在两个正向引物的5'端分别连接上不同的标签序列,如标签序列A:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3',和标签序列B:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'。

[0059] 例如,本申请提供的检测zym基因第99位 (G/A) SNP位点的KASP引物包括反向引物zym-99-RC:5'-TTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3'和反向引物zym-99-RT:5'-TTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3',两者仅3'端最后一个碱基不同,即对应的SNP位点,在两个反向引物的5'端分别与不同的标签序列,如标签序列A:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3',和标签序列B:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'。

[0060] 例如,本申请提供的正向引物86-FT:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAATTACGCAAAAAGCCTT-3',和正向引物86-FC:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAAGCCTC-3';反向引物99-RC:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3',和反向引物99-RT:5'-例如,本申请提供的检测zym基因第86位 (T/C) SNP位点的KASP引物包括正向引物zym-86-FT:5'-GCAATTACGCAAAAAGCCTT-3'和正向引物zym-86-FC:5'-GCAATTACGCAAAAAGCCTC-3',两者仅3'端最后一个碱基不同,即对应的SNP位点,在两个正向引物的5'端分别连接上不同的标签序列,如标签序列A:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3',和标签序列B:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'。GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3'。其中下划线所示序列为添加的标签序列A,波浪线所示为标签序列B。

[0061] 具体实施方案中,KASP引物所扩增出来的PCR产物长度在80bp-150bp之间为宜,满足条件的情况下序列可变。例如,本申请提供的检测zym基因第86位 (T/C) SNP位点的反向引物86-R:5'-CTTGGATTTTTCTCATACTTCA-3',扩增长度为83bp;检测zym基因第99位 (G/A) SNP位点的正向引物99-F:5'-CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3',扩增长度为94bp。

[0062] 进一步地,在具体实施方案中,本申请所提供的试剂盒还包含荧光探针A、荧光探针B、淬灭探针A和淬灭探针B,其中,荧光探针A的序列与标签序列A的序列相同,为5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3',在其5'末端连接1个荧光基团FAM;荧光探针B的序列与标签序列B相同,为5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3',在其5'末端连接1个荧光基团HEX。淬灭探针A的序列与标签序列A的序列互补,为5'-CTTCCACTGGTTCAAGTACGA-3',其序列如SEQ No.13;淬灭探针B的序列与标签序列B互补,为5'-CTCCAGCCTCAGTTGCCTAA-3',其序列如SEQ No.14;同时,在淬灭探针A和淬灭探针B的3'末端均连接上淬灭基因BHA。

[0063] 例如,上述的荧光探针A、荧光探针B、淬灭探针A和淬灭探针B可来自武汉市景肽生物科技有限公司的PARMS (PRO2.0) 试剂盒。

[0064] 本申请所提供的检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或用

于检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的试剂盒,可用于鉴定黄瓜中是否含有zym基因,同时又可以区分含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜(zym/zym)、含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜(Zym/Zym)和同时含有Zym基因和zym基因的杂合感ZYMV的黄瓜(Zym/zym)。

[0065] 在具体实施方案中,本申请提供了鉴定黄瓜中是否含有zym基因的方法,包括利用本申请提供的KASP引物扩增待鉴定的黄瓜样品的DNA,检测、分析扩增产物。

[0066] 在具体实施方案中,本申请提供的KASP:例如,正向引物86-FT:5' -GAAGGTGACCAAGTTCAATGCTGCAATTACGCAAAAAGCCTT-3', 和正向引物86-FC:5' -GAAGGTTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAAGCCTC-3', 及反向引物86-R:5' -CTTGGGATTTTTCTCATACTTCA-3';或反向引物99-RC:5' -GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3', 和反向引物99-RT:5' -GAAGGTTCGGAGTCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3', 及正向引物99-F:5' -

CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3'。PCR扩增后,若反应中只检测到HEX荧光信号,则认定待检测的黄瓜样品中含有zym基因;若只检测到FAM荧光信号,则认定黄瓜样品中含有突变的Zym基因;若同时检测到HEX荧光信号和FAM荧光信号,则认定黄瓜样品中同时含有Zym基因和zym基因。

[0067] 在具体实施方案中,所述的待检测的黄瓜样品可以是黄瓜植株的叶片、根、茎、花、果实和种子中的任意一种的DNA。

[0068] 在另一个具体实施方案中,本申请提供了区分抗ZYMV的黄瓜和感ZYMV的黄瓜,及区分含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜(zym/zym)、含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜(Zym/Zym)和同时含有Zym基因和zym基因的杂合感ZYMV的黄瓜(Zym/zym)的应用,包括利用本申请提供的KASP引物扩增待鉴定的黄瓜样品的DNA,检测、分析扩增产物。

[0069] 在具体实施方案中,本申请提供的KASP:例如,正向引物86-FT:5' -GAAGGTGACCAAGTTCAATGCTGCAATTACGCAAAAAGCCTT-3', 和正向引物86-FC:5' -GAAGGTTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAAGCCTC-3', 及反向引物86-R:5' -CTTGGGATTTTTCTCATACTTCA-3';或反向引物99-RC:5' -GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3', 和反向引物99-RT:5' -GAAGGTTCGGAGTCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3', 及正向引物99-F:5' -

CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3'。PCR扩增后,若反应中只检测到HEX荧光信号,则认定待检测的黄瓜样品为抗ZYMV的黄瓜;若只检测到FAM信号,或同时检测到HEX荧光信号和FAM荧光信号,则认定待检测的黄瓜样品为感ZYMV的黄瓜。

[0070] 在具体实施方案中,本申请提供的KASP:例如,正向引物86-FT:5' -GAAGGTGACCAAGTTCAATGCTGCAATTACGCAAAAAGCCTT-3', 和正向引物86-FC:5' -GAAGGTTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAAGCCTC-3', 及反向引物86-R:5' -CTTGGGATTTTTCTCATACTTCA-3';或反向引物99-RC:5' -GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3', 和反向引物99-RT:5' -GAAGGTTCGGAGTCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3', 及正向引物99-F:5' -

TCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT-3' , 及正向引物99-F:5' -

CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3'。扩增若只检测到HEX荧光信号,则认定待检测的黄瓜样品为含有zym基因的纯合抗ZYMV的样品;扩增若同时检测到HEX和FAM信号,则认定黄瓜样品为同时含有Zym基因和zym基因的杂合感ZYMV的黄瓜;若只检测FAM荧光信号,则认定待检测的黄瓜样品为含有突变基因Zym纯合感ZYMV的黄瓜。

[0071] 在具体实施方案中,所述的待检测的黄瓜样品可以是黄瓜植株的叶片、根、茎、花、果实和种子中的任意一种的DNA。

[0072] 以下实施例仅用于说明而非限制本发明范围的目的。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等《分子克隆实验手册》(Sambrook J&Russell DW, Molecularcloning:a laboratory manual,2001),或按照制造厂商说明书建议的条件进行。

[0073] 实施例1

[0074] KASP标记的开发

[0075] 比较分析了抗ZYMV亲本与感ZYMV亲本的zym基因DNA序列,发现在该基因第一个外显子处存在两个SNP位点,位于第86bp (T/C) 和第99bp (G/A) 处。抗ZYMV亲本和感ZYMV亲本在第86位的碱基分别为C和T,在第99位的碱基分别为A和G。

[0076] 根据上述SNP位点设计KASP引物,引物序列为:

[0077] 第86位T/C:

[0078] 正向引物86-FT:5' -GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAATTACGCAAAAAGCCTT-3' ;

[0079] 正向引物86-FC:5' -GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAATTACGCAAAAAGCCTC-3' ;

[0080] 其中下划线所示序列为添加的标签序列A,波浪线所示为标签序列B;

[0081] 反向引物86-R:5' -CTTGGGATTTTTCTCATACTTCA-3' 。

[0082] 引物测试结果如图1。

[0083] 第99位G/A:

[0084] 反向引物99-RC:5' -GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTC-3' ;

[0085] 反向引物99-RT:

5' -GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGAAGTACTCCAAGGCGTTT- 3' ;

[0086] 其中下划线所示序列为添加的标签序列A,波浪线所示为标签序列B;

[0087] 正向引物99-F:5' -CTATTGAATACGTGAAGCAGGC-3' 。

[0088] 引物测试结果如图2。

[0089] 实施例2

[0090] 分子标记的扩增

[0091] 本实施例中使用的材料为黄瓜育种界公认的抗ZYMV材料TMG1,感ZYMV材料9930,和将两者作为亲本杂交制备的TMG1-9930-F1杂合感病材料。采集植株叶片组织用于基因组DNA提取。

[0092] 按照Plant DNA Isolation Kit (成都福际生物技术有限公司) 试剂盒说明要求提

取上述材料叶片中的基因组DNA,并将所提取的DNA溶液的浓度稀释至50-100ng/ μ l,于-20℃保存。

[0093] 按照KASP-PARMS试剂盒(武汉市景肽生物科技有限公司)要求配置PCR反应体系,反应总体积为10 μ l,包括:2X PARMS PCR Mix:5 μ l;DNA提取液(50-100ng/ μ l):1 μ l;特异引物1:0.15 μ l(10pmol/ μ l);特异引物2:0.15 μ l(10pmol/ μ l);通用引物:0.4 μ l(10pmol/ μ l);以及ddH₂O:3.3 μ l。设置三个技术重复。

[0094] PCR反应程序为:94℃:15分钟;94℃:20秒,65℃(每循环下降0.8℃):1分钟,10个循环;94℃:20秒,57℃:1分钟,28个循环。PCR反应使用Applied Biosystems 7500Real-Time PCR System进行。

[0095] 实施例3

[0096] 扩增产物的检测和分析

[0097] 使用Applied Biosystems 7500Real-Time PCR System自带的软件对PCR产物进行基因分型和数据分析,其中设定纵坐标数值表示FAM荧光信号值,横坐标数值表示HEX荧光信号值。

[0098] 根据第86bp的SNP位点设计的KASP引物的分型结果见图1。图中靠近横轴的黑色三角所表示的为纯合抗ZYMV材料TMG1的扩增信号,仅检测到HEX荧光信号;图中处于中间位置的黑色菱形所表示的为杂合感ZYMV材料TMG1-9930-F1的扩增信号,同时能检测到HEX和FAM荧光信号;图中靠近纵轴的倒三角所表示的为纯合感ZYMV材料9930的扩增信号,仅能检测到FAM荧光信号;靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号,HEX和FAM荧光均不明显。纯合抗ZYMV的基因型和纯合感ZYMV的基因型的荧光扩增信号分别与原点连线,所形成的夹角越接近直角表明分型效果越好。

[0099] 结果表明,所述KASP引物对黄瓜材料TMG1的扩增信号按预期靠近横轴,对9930的扩增信号按预期靠近纵轴,对TMG1-9930-F1的扩增信号按预期处于中间位置。

[0100] 三种基因型可以明显被区分和聚类,该KASP引物可以使用,设计成功。

[0101] 根据第99bp的SNP位点设计的KASP引物的分型结果见图2。图中靠近横轴的黑色三角所表示的为纯合抗ZYMV材料TMG1的扩增信号,仅检测到HEX荧光信号;图中处于中间位置的黑色菱形所表示的为杂合感ZYMV材料TMG1-9930-F1的扩增信号,同时能检测到HEX和FAM荧光信号;图中靠近纵轴的倒三角所表示的为纯合感ZYMV材料9930的扩增信号,仅能检测到FAM荧光信号;靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号,HEX和FAM荧光均不明显。纯合抗ZYMV的基因型和纯合感ZYMV的基因型的荧光扩增信号分别与原点连线,所形成的夹角越接近直角表明分型效果越好。

[0102] 结果表明,所述KASP引物对黄瓜材料TMG1的扩增信号按预期靠近横轴,对9930的扩增信号按预期靠近纵轴,对TMG1-9930-F1的扩增信号按预期处于中间位置。

[0103] 三种基因型可以明显被区分和聚类,该KASP引物可以使用,设计成功。

[0104] 实施例4

[0105] 利用所述检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或试剂盒鉴定和区分抗ZYMV和感ZYMV的黄瓜

[0106] 本实施例中使用的材料为黄瓜育种界公认的抗ZYMV材料TMG1,感ZYMV材料9930,和将两者作为亲本杂交制备的TMG1-9930-F1杂合感病材料。同时广泛搜集黄瓜种质资源

338份(具体分型结果见表1)。采集上述黄瓜植株叶片组织用于基因组DNA提取。

[0107] 采用实施例2中所述方法,分别提取338份黄瓜材料的基因组DNA作为PCR扩增模板;使用所述检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或试剂盒进行PCR扩增;使用Applied Biosystems 7500Real-Time PCR System进行PCR反应;使用Applied Biosystems 7500Real-Time PCR System自带的软件对PCR产物进行基因分型 and 数据分析,其中设定纵坐标数值表示FAM荧光信号值,横坐标数值表示HEX荧光信号值。

[0108] 检测zym基因第86bp SNP位点的KASP引物分型结果显示,检测带型同图3中靠近横轴的黑色三角的单株数为60(仅检测到HEX荧光信号,为含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜材料,基因型为C:C)、检测带型同图3中间位置的菱形的单株数为91(同时能检测到HEX和FAM信号,为同时含有Zym基因和zym基因杂合感ZYMV的黄瓜材料,基因型为C:T)、检测带型同图3中靠近纵轴的倒三角的单株数为187个(仅检测到FAM荧光信号,为含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜材料,基因型为T:T)检测带型同图3中靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号。

[0109] 检测zym基因第99bp SNP位点的KASP引物分型结果显示,检测带型同图4中靠近横轴的黑色三角的单株数为60(仅检测到HEX荧光信号,为含有zym基因的纯合抗ZYMV的黄瓜材料,基因型为A:A)、检测带型同图3中间位置的菱形的单株数为91(同时能检测到HEX和FAM信号,为同时含有Zym基因和zym基因杂合感ZYMV的黄瓜材料,基因型为A:G)、检测带型同图3中靠近纵轴的倒三角的单株数为187个(仅检测到FAM荧光信号,为含有突变基因Zym的纯合感ZYMV的黄瓜材料,基因型为G:G)检测带型同图3中靠近原点的黑色圆点表示阴性对照(未添加DNA样品)的扩增信号。

[0110] 上述结果表明,本申请提供的检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物或试剂盒可以对抗ZYMV和感ZYMV的黄瓜实现准确、快速、高通量的鉴定。

[0111] 表1鉴定抗ZYMV和感ZYMV黄瓜的分型结果

[0112]

黄瓜材料编号	86bp 基因型	99bp 基因型	纯合抗 ZYMV	杂合感 ZYMV	纯合感 ZYMV
TMG1	C:C	A:A	√		
9930	T:T	G:G			√
TMG1-9930-F1	C:T	A:G		√	
1	T:T	G:G			√
2	T:T	G:G			√
3	T:T	G:G			√
4	T:T	G:G			√
5	C:T	A:G		√	
6	T:T	G:G			√
7	T:T	G:G			√
8	T:T	G:G			√
9	C:T	A:G		√	
10	T:T	G:G			√
11	T:T	G:G			√
12	T:T	G:G			√
13	T:T	G:G			√
14	T:T	G:G			√
15	T:T	G:G			√
16	C:T	A:G		√	
17	C:T	A:G		√	

[0113]

18	T:T	G:G			√
19	C:T	A:G		√	
20	T:T	G:G			√
21	T:T	G:G			√
22	T:T	G:G			√
23	T:T	G:G			√
24	T:T	G:G			√
25	T:T	G:G			√
26	T:T	G:G			√
27	C:T	A:G		√	
28	C:T	A:G		√	
29	C:T	A:G		√	
30	C:T	A:G		√	
31	T:T	G:G			√
32	C:T	A:G		√	
33	T:T	G:G			√
34	T:T	G:G			√
35	T:T	G:G			√
36	C:T	A:G		√	
37	T:T	G:G			√
38	T:T	G:G			√
39	T:T	G:G			√
40	T:T	G:G			√
41	C:T	A:G		√	
42	C:T	A:G		√	
43	T:T	G:G			√
44	T:T	G:G			√
45	T:T	G:G			√
46	T:T	G:G			√
47	T:T	G:G			√
48	T:T	G:G			√

[0114]

49	T:T	G:G			√
50	T:T	G:G			√
51	T:T	G:G			√
52	T:T	G:G			√
53	C:T	A:G		√	
54	C:T	A:G		√	
55	T:T	G:G			√
56	T:T	G:G			√
57	T:T	G:G			√
58	T:T	G:G			√
59	T:T	G:G			√
60	T:T	G:G			√
61	T:T	G:G			√
62	T:T	G:G			√
63	T:T	G:G			√
64	T:T	G:G			√
65	T:T	G:G			√
66	T:T	G:G			√
67	T:T	G:G			√
68	C:T	A:G		√	
69	T:T	G:G			√
70	C:T	A:G		√	
71	C:T	A:G		√	
72	C:T	A:G		√	
73	C:C	A:A	√		
74	T:T	G:G			√
75	C:T	A:G		√	
76	C:C	A:A	√		
77	T:T	G:G			√
78	T:T	G:G			√
79	T:T	G:G			√

[0115]

80	T:T	G:G			√
81	T:T	G:G			√
82	C:T	A:G		√	
83	C:T	A:G		√	
84	T:T	G:G			√
85	T:T	G:G			√
86	T:T	G:G			√
87	C:T	A:G		√	
88	C:T	A:G		√	
89	C:T	A:G		√	
90	C:T	A:G		√	
91	C:T	A:G		√	
92	C:T	A:G		√	
93	C:T	A:G		√	
94	C:C	A:A	√		
95	C:T	A:G		√	
96	C:C	A:A	√		
97	C:T	A:G		√	
98	C:T	A:G		√	
99	C:T	A:G		√	
100	T:T	G:G			√
101	T:T	G:G			√
102	T:T	G:G			√
103	T:T	G:G			√
104	C:T	A:G		√	
105	C:T	A:G		√	
106	C:T	A:G		√	
107	C:T	A:G		√	
108	T:T	G:G			√
109	C:T	A:G		√	
110	T:T	G:G			√

[0116]

111	C:T	A:G		√	
112	C:C	A:A	√		
113	T:T	G:G			√
114	T:T	G:G			√
115	C:T	A:G		√	
116	C:T	A:G		√	
117	C:C	A:A	√		
118	C:T	A:G		√	
119	C:T	A:G		√	
120	C:C	A:A	√		
121	C:T	A:G		√	
122	T:T	G:G			√
123	T:T	G:G			√
124	T:T	G:G			√
125	C:C	A:A	√		
126	T:T	G:G			√
127	T:T	G:G			√
128	T:T	G:G			√
129	T:T	G:G			√
130	C:T	A:G		√	
131	T:T	G:G			√
132	C:T	A:G		√	
133	T:T	G:G			√
134	C:T	A:G		√	
135	C:T	A:G		√	
136	T:T	G:G			√
137	T:T	G:G			√
138	C:T	A:G		√	
139	T:T	G:G			√
140	T:T	G:G			√
141	T:T	G:G			√

[0117]

142	T:T	G:G			√
143	C:T	A:G		√	
144	C:T	A:G		√	
145	C:T	A:G		√	
146	C:T	A:G		√	
147	T:T	G:G			√
148	T:T	G:G			√
149	T:T	G:G			√
150	C:T	A:G		√	
151	T:T	G:G			√
152	T:T	G:G			√
153	T:T	G:G			√
154	T:T	G:G			√
155	T:T	G:G			√
156	C:T	A:G		√	
157	C:C	A:A	√		
158	C:T	A:G		√	
159	T:T	G:G			√
160	T:T	G:G			√
161	T:T	G:G			√
162	C:T	A:G		√	
163	T:T	G:G			√
164	T:T	G:G			√
165	C:T	A:G		√	
166	T:T	G:G			√
167	C:C	A:A	√		
168	T:T	G:G			√
169	T:T	G:G			√
170	T:T	G:G			√
171	T:T	G:G			√
172	T:T	G:G			√

[0118]

173	T:T	G:G			√
174	T:T	G:G			√
175	T:T	G:G			√
176	C:C	A:A	√		
177	C:C	A:A	√		
178	C:C	A:A	√		
179	C:C	A:A	√		
180	C:C	A:A	√		
181	C:C	A:A	√		
182	C:T	A:G		√	
183	C:C	A:A	√		
184	C:T	A:G		√	
185	C:T	A:G		√	
186	C:C	A:A	√		
187	C:C	A:A	√		
188	T:T	G:G			√
189	T:T	G:G			√
190	C:C	A:A	√		
191	C:C	A:A	√		
192	C:T	A:G		√	
193	C:T	A:G		√	
194	T:T	G:G			√
195	C:C	A:A	√		
196	T:T	G:G			√
197	C:T	A:G		√	
198	C:T	A:G		√	
199	T:T	G:G			√
200	T:T	G:G			√
201	T:T	G:G			√
202	T:T	G:G			√
203	T:T	G:G			√

[0119]

204	T:T	G:G			√
205	T:T	G:G			√
206	C:C	A:A	√		
207	C:C	A:A	√		
208	C:C	A:A	√		
209	T:T	G:G			√
210	C:C	A:A	√		
211	T:T	G:G			√
212	C:C	A:A	√		
213	T:T	G:G			√
214	T:T	G:G			√
215	T:T	G:G			√
216	T:T	G:G			√
217	T:T	G:G			√
218	C:C	A:A	√		
219	T:T	G:G			√
220	T:T	G:G			√
221	T:T	G:G			√
222	T:T	G:G			√
223	T:T	G:G			√
224	T:T	G:G			√
225	T:T	G:G			√
226	T:T	G:G			√
227	T:T	G:G			√
228	C:C	A:A	√		
229	C:C	A:A	√		
230	T:T	G:G			√
231	T:T	G:G			√
232	C:C	A:A	√		
233	T:T	G:G			√
234	T:T	G:G			√

[0120]

235	T:T	G:G			√
236	T:T	G:G			√
237	T:T	G:G			√
238	T:T	G:G			√
239	T:T	G:G			√
240	T:T	G:G			√
241	T:T	G:G			√
242	T:T	G:G			√
243	T:T	G:G			√
244	T:T	G:G			√
245	C:C	A:A	√		
246	T:T	G:G			√
247	C:C	A:A	√		
248	T:T	G:G			√
249	C:C	A:A	√		
250	C:T	A:G		√	
251	C:C	A:A	√		
252	C:T	A:G		√	
253	C:T	A:G		√	
254	T:T	G:G			√
255	T:T	G:G			√
256	T:T	G:G			√
257	T:T	G:G			√
258	C:T	A:G		√	
259	T:T	G:G			√
260	T:T	G:G			√
261	T:T	G:G			√
262	C:C	A:A	√		
263	T:T	G:G			√
264	T:T	G:G			√
265	T:T	G:G			√

[0121]

266	T:T	G:G			√
267	T:T	G:G			√
268	T:T	G:G			√
269	T:T	G:G			√
270	C:T	A:G		√	
271	C:T	A:G		√	
272	C:T	A:G		√	
273	C:T	A:G		√	
274	C:C	A:A	√		
275	C:C	A:A	√		
276	C:T	A:G		√	
277	C:T	A:G		√	
278	C:C	A:A	√		
279	C:C	A:A	√		
280	C:C	A:A	√		
281	C:C	A:A	√		
282	C:C	A:A	√		
283	C:T	A:G		√	
284	T:T	G:G			√
285	C:T	A:G		√	
286	C:T	A:G		√	
287	C:T	A:G		√	
288	T:T	G:G			√
289	T:T	G:G			√
290	T:T	G:G			√
291	C:T	A:G		√	
292	C:C	A:A	√		
293	C:C	A:A	√		
294	C:T	A:G		√	
295	C:T	A:G		√	
296	C:T	A:G		√	

[0122]

297	T:T	G:G			√
298	T:T	G:G			√
299	T:T	G:G			√
300	T:T	G:G			√
301	C:C	A:A	√		
302	C:C	A:A	√		
303	C:T	A:G		√	
304	C:T	A:G		√	
305	C:T	A:G		√	
306	T:T	G:G			√
307	T:T	G:G			√
308	C:T	A:G		√	
309	T:T	G:G			√
310	T:T	G:G			√
311	T:T	G:G			√
312	C:T	A:G		√	
313	C:T	A:G		√	
314	C:C	A:A	√		
315	T:T	G:G			√
316	C:C	A:A	√		
317	C:C	A:A	√		
318	C:T	A:G		√	
319	T:T	G:G			√
320	C:C	A:A	√		
321	C:T	A:G		√	
322	T:T	G:G			√
323	T:T	G:G			√
324	C:C	A:A	√		
325	C:C	A:A	√		
326	C:C	A:A	√		
327	C:C	A:A	√		

[0123]

328	T:T	G:G			√
329	C:C	A:A	√		
330	T:T	G:G			√
331	T:T	G:G			√
332	T:T	G:G			√
333	C:C	A:A	√		
334	C:C	A:A	√		
335	C:C	A:A	√		
336	C:C	A:A	√		
337	T:T	G:G			√
338	T:T	G:G			√

序列表

<110>	河北省农林科学院经济作物研究所	
<120>	检测黄瓜小西葫芦黄化花叶病毒病抗病基因zym的KASP引物及其应用	
<160>	14	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	10	
	gcaattacgc aaaagcctt	19
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	2	
	gcaattacgc aaaagcctc	19
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	3	
	ttgaagtact ccaaggcggtt c	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	4	
	ttgaagtact ccaaggcggtt t	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	5	
	gaaggtgacc aagttcatgc t	21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> An Artificial Sequence	
<400> 6	
gaaggtcggg gtcaacggat t	21
<210> 7	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> An Artificial Sequence	
<400> 7	
gaaggtgacc aagttcatgc tgcaattacg caaaagcctt	40
<210> 8	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> An Artificial Sequence	
<400> 8	
gaaggtcggg gtcaacggat tgcaattacg caaaagcctc	40
<210> 9	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> An Artificial Sequence	
<400> 9	
gaaggtgacc aagttcatgc ttggaagtac tccaaggcgt tc	42
<210> 10	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> An Artificial Sequence	
<400> 10	
gaaggtcggg gtcaacggat ttggaagtac tccaaggcgt tt	42
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> An Artificial Sequence	
<400> 11	
cttgggattt ttctcact tca	23
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> An Artificial Sequence	
<400> 12	
ctattgaata cgtaagcag gc	22

<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	13	
cttccactgg ttcaagtacg a		21
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	An Artificial Sequence	
<400>	14	
cttccagcct cagttgcta a		21

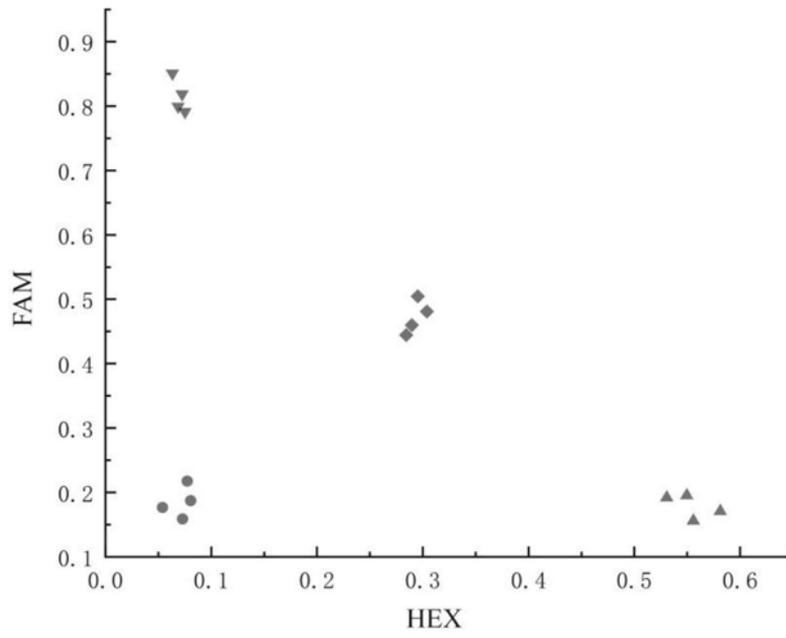


图1

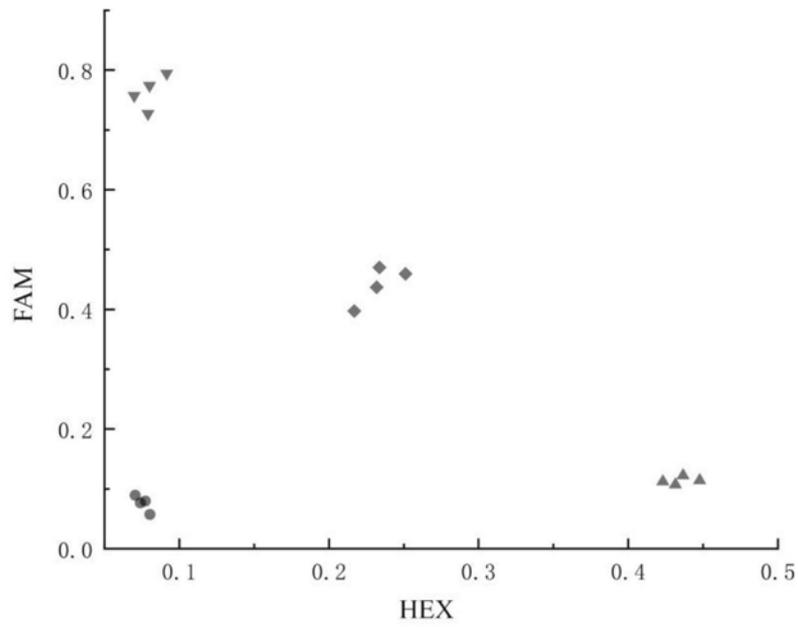


图2

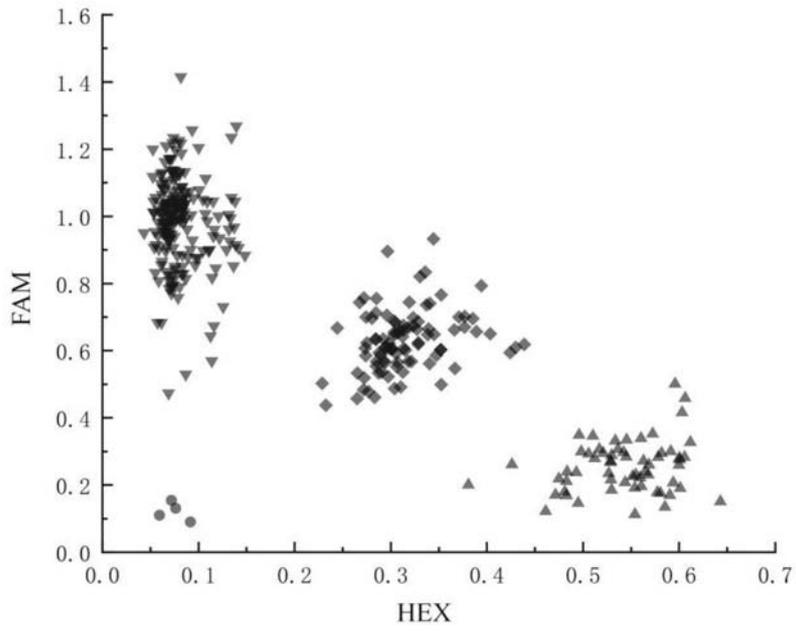


图3

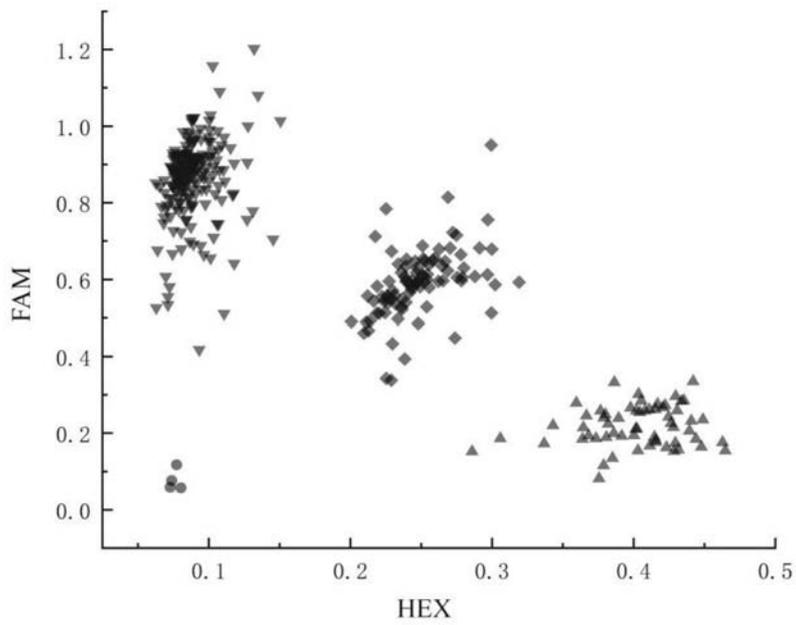


图4