



(10) 授权公告号 CN 110484644 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 07

(21) 申请号 201910835241.0

(22) 申请日 2019.09.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110484644 A

(43) 申请公布日 2019.11.22

(73) 专利权人 中国林业科学研究院林业研究所
地址 100000 北京市海淀区东小府2号
专利权人 湖北省林业科学研究院

(72) 发明人 孙晓梅 杜超群 谢允慧 冯健
许业洲 袁慧

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470
专利代理师 强红刚

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 107557362 A, 2018.01.09

CN 109517920 A, 2019.03.26

Jean-Charles Bastien et al..Molecular markers used for genetic studies in Japanese Larch (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.).《Silva slovenica》.2018,第1-23页.

杨秀艳等.日本落叶松EST-SSR标记开发及二代优树遗传多样性分析.《林业科学》.2011,第47卷(第11期),第52-58页.

Chen et al..Development and Characterization of Polymorphic Genic-SSR Markers in *Larix kaempferi*.《Molecules》.2015,第6060-6067页.

审查员 郝永利

权利要求书1页 说明书11页
序列表3页

(54) 发明名称

一种日本落叶松种质的指纹图谱构建方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种日本落叶松种质的指纹图谱构建方法及应用。本发明是基于SSR分子标记鉴定方法构建的,利用9对SSR引物构建92份收集自中国和日本共10个省市的日本落叶松种质的指纹图谱并进行种质鉴定的技术体系。该技术体系不仅能够准确、高效地构建不同日本落叶松种质的指纹图谱,还能对日本落叶松种质进行鉴定,有利于日本落叶松种质的利用和保护。

1. 一种构建日本落叶松种质的指纹图谱的引物组, 其特征在于, 该引物组包括SSR分子标记的引物 $(AGTCC)_4 + (GTCCA)_6$ 、 $(GA)_9$ 、 $(GA)_{13}$ 、 $(TC)_6$ 、 $(CAG)_5$ 、 $(CTG)_5$ 、 $(ACTGGC)_4$ 、 $(AGGCGG)_3$ 和 $(AGC)_7$, 采用不同颜色的荧光染料标记, 其序列具体为:

$(AGTCC)_4 + (GTCCA)_6$ 的引物由SEQ ID NO:1所示的单链引物和SEQ ID NO:2所示的单链引物组成;

$(GA)_9$ 的引物由SEQ ID NO:3所示的单链引物和SEQ ID NO:4所示的单链引物组成;

$(GA)_{13}$ 的引物由SEQ ID NO:5所示的单链引物和SEQ ID NO:6所示的单链引物组成;

$(TC)_6$ 的引物由SEQ ID NO:7所示的单链引物和SEQ ID NO:8所示的单链引物组成;

$(CAG)_5$ 的引物由SEQ ID NO:9所示的单链引物和SEQ ID NO:10所示的单链引物组成;

$(CTG)_5$ 的引物由SEQ ID NO:11所示的单链引物和SEQ ID NO:12所示的单链引物组成;

$(ACTGGC)_4$ 的引物由SEQ ID NO:13所示的单链引物和SEQ ID NO:14所示的单链引物组成;

$(AGGCGG)_3$ 的引物由SEQ ID NO:15所示的单链引物和SEQ ID NO:16所示的单链引物组成;

$(AGC)_7$ 的引物由SEQ ID NO:17所示的单链引物和SEQ ID NO:18所示的单链引物组成。

一种日本落叶松种质的指纹图谱构建方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于种质鉴别技术领域,尤其涉及一种日本落叶松种质的指纹图谱构建方法及应用。

背景技术

[0002] 日本落叶松(*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.)为松科落叶松属,原产于日本本州岛中部地区,自引入我国后,在我国的温带(吉林、辽宁、内蒙古等)、暖温带(山东、河南、甘肃等)及中北亚热带(湖北、湖南、四川等)高山区得到迅速推广应用,表现出抗性强,病虫害少,生长快,材质优等特性,已逐渐成为我国制浆造纸业和高密度纤维板生产的主要树种之一,具有重要的经济和生态价值。

[0003] 日本落叶松在原生地的分布范围较小,作为外来引进树种,国内的日本落叶松引种资源有限,加上长期高频率地使用少数种质作为育种亲本,使得日本落叶松资源的遗传基础比较狭窄,品系之间的形态学差异小,很难实现通过表型性状鉴定或区别不同日本落叶松种质,这就给品系鉴定和知识产权保护增加了困难。随着分子生物学的快速发展,DNA指纹图谱作为一种遗传种质分析的新方法,可以直接反映植物遗传物质在DNA分子水平上的差异,具有准确、高效、经济、不受环境影响等优点。目前构建DNA指纹图谱的标记方法有多种,SSR(simple sequence repeat)分子标记由于扩增稳定、重复性好、操作简便、易于推广,已被国际植物品种权保护联盟(UPOV)认定为植物新品种保护最广泛应用的标记体系。特别是利用荧光标记检测PCR扩增产物,使得多态性产物的检测结果更加准确,从而保证了所构建指纹图谱具有更高的可信度。另外,DNA指纹图谱对于辅助育种、杂种鉴定、遗传多样性分析等方面均具有重要的意义。

[0004] 然而,目前在构建日本落叶松种质DNA指纹图谱、并利用SSR分子标记技术进行日本落叶松种质资源鉴定的方法尚未见报道。

发明内容

[0005] 为了解决现有日本落叶松种质资源无有效鉴定方法的问题,本发明的目的在于提供一种日本落叶松种质的指纹图谱的构建方法,可鉴定或辅助鉴定日本落叶松种质资源,为梳理种质资源亲缘关系,开展育种亲本的选择,实现种质资源科学管理和高效利用以及品种保护方面奠定基础。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明人通过大量试验研究并不懈努力,最终获得了如下技术方案:一种日本落叶松种质的指纹图谱构建方法,该方法包括以下步骤:

[0007] (1)选取不同种质来源的日本落叶松标准品,分别提取基因组DNA;需要说明的是,本发明对如何提取基因组DNA的方式无特殊限定,采用本领域已知的方式即可。在本发明具体的实施例中,采用改良的CTAB提取法,也可采用市售试剂盒或者自行按照基因组DNA提取方法制备。

[0008] (2)以各标准品基因组DNA为模板,采用 $(AGTCC)_4 + (GTCCA)_6$ 、 $(GA)_9$ 、 $(GA)_{13}$ 、 $(TC)_6$ 、

(CAG)₅、(CTG)₅、(ACTGGC)₄、(AGGCGG)₃和(AGC)₇中的一种或多种SSR分子标记的引物分别进行PCR扩增;不同来源的日本落叶松种质在本发明所述的SSR分子标记中有不同体现,采用上述的SSR分子标记的引物越多则最终构建的指纹图谱特异性越强。在本发明中,优选对PCR扩增得到的产物进行毛细管电泳检测,以确定是否有PCR产物。

[0009] (3) 将各标准品基因组DNA的PCR扩增结果转化为计算机可识别的数码,得到日本落叶松种质的指纹图谱。

[0010] 需要说明的是,本发明中 (AGTCC)₄+(GTCCA)₆、(GA)₉、(GA)₁₃、(TC)₆、(CAG)₅、(CTG)₅、(ACTGGC)₄、(AGGCGG)₃和(AGC)₇中的数字指重复括号内碱基排列的次数。

[0011] 进一步优选地,如上所述的日本落叶松种质的指纹图谱构建方法,步骤(2)中各SSR分子标记的引物采用不同颜色的荧光染料标记,本发明对荧光标记的颜色和修饰方式无特殊限定,可在DNA测序仪上实现荧光检测即可。SSR分子标记的引物序列具体为:

[0012] (AGTCC)₄+(GTCCA)₆的引物由SEQ ID NO:1所示的单链引物和SEQ ID NO:2所示的单链引物组成;

[0013] (GA)₉的引物由SEQ ID NO:3所示的单链引物和SEQ ID NO:4所示的单链引物组成;

[0014] (GA)₁₃的引物由SEQ ID NO:5所示的单链引物和SEQ ID NO:6所示的单链引物组成;

[0015] (TC)₆的引物由SEQ ID NO:7所示的单链引物和SEQ ID NO:8所示的单链引物组成;

[0016] (CAG)₅的引物由SEQ ID NO:9所示的单链引物和SEQ ID NO:10所示的单链引物组成;

[0017] (CTG)₅的引物由SEQ ID NO:11所示的单链引物和SEQ ID NO:12所示的单链引物组成;

[0018] (ACTGGC)₄的引物由SEQ ID NO:13所示的单链引物和SEQ ID NO:14所示的单链引物组成;

[0019] (AGGCGG)₃的引物由SEQ ID NO:15所示的单链引物和SEQ ID NO:16所示的单链引物组成;

[0020] (AGC)₇的引物由SEQ ID NO:17所示的单链引物和SEQ ID NO:18所示的单链引物组成;

[0021] 进一步优选地,如上所述的日本落叶松种质的指纹图谱构建方法,步骤(2)中所述PCR扩增使用的体系,每15μL,包括:dNTP 1.5μL,Buffer (Mg²⁺ plus) 1.5μL,Taq酶0.2μL (5u/μL),上下游引物各0.6μL,模板DNA1μL,超纯水9.6μL;所述上游引物或下游引物浓度分别为10μmol/L,基因组DNA模板的浓度为30ng/μL。

[0022] 进一步优选地,如上所述的日本落叶松种质的指纹图谱构建方法,步骤(2)中所述的PCR扩增的程序为:95℃预变性5min;95℃变性30s,60~50℃退火30s,72℃延伸45s,30个循环;再经72℃延伸7min后于4℃保存;

[0023] 所述PCR扩增程序采用Touch down PCR程序,30个循环中前20个循环每个循环退火温度降低0.5℃,退火温度保持在50℃完成剩余10个循环。

[0024] 进一步优选地,如上所述的日本落叶松种质的指纹图谱构建方法,步骤(3)中将各

标准品的PCR扩增结果转化为计算机可识别的数码是:PCR产物在DNA测序仪上进行自动荧光检测,用GeneMarker软件对原始数据进行分析,将各峰值的位置与同一泳道GL500分子内标进行比较,得出SSR扩增产物的长度数值,缺失该SSR分子标记扩增产物计作“000”,转化为依次排列的矩阵,得到计算机可识别的日本落叶松种质的指纹图谱。

[0025] 本发明对日本落叶松标准品的来源无特殊限定,包括但不限于源自中国收集保存的和原产地日本的日本落叶松。因此进一步优选地,如上所述的日本落叶松种质的指纹图谱构建方法,步骤(1)中日本落叶松标准品为实施例1表1中的LK001~LK092,共计92个日本落叶松种质标准品材料。

[0026] 另外,本发明提供了上述方法构建的指纹图谱在区分不同种质来源的日本落叶松中的应用。具体的应用方法为:提取待测日本落叶松样品的基因组DNA,采用上述步骤(2)中相同的SSR分子标记的引物进行PCR扩增,根据扩增结果在所述指纹图谱中的位置,判断待测样品的种质来源。

[0027] 与现有技术相比,本发明提供的日本落叶松种质指纹图谱的构建方法及种质鉴定方法,具有如下优点和显著的进步性:

[0028] (1) 选用了9对SSR引物,采用这9对SSR分子标记的引物对日本落叶松样品DNA进行扩增,同一SSR分子标记位点上,不同来源的日本落叶松种质资源得到的SSR扩增产物的长度各不相同,根据产物长度的差异可以快速有效地区分不同种质来源的日本落叶松。加之本发明将指纹图谱转化为计算机可识别的指纹图谱,直接利用计算机进行检索,结果比对方便、快速又准确。

[0029] (2) 本发明采用Touch down PCR程序,可有效避开针对不同引物确定最佳退火温度而进行的复杂的反应优化及设置过程,所有9对引物在同一PCR程序设置下均可获得理想的扩增效果。

[0030] (3) 本发明利用荧光标记进行PCR扩增,采用DNA测序仪进行PCR扩增产物检测,利用毛细管电泳代替传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳,可将不同的PCR扩增产物按荧光颜色和产物片段大小合理组合后同时检测,利用软件进行结果批量判读,与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测方法相比,检测数据更为精确,检测效率更高,具有快速、简便、可靠及高通量的优点,而且随着分子标记技术的不断发展,毛细管电泳检测方法的成本越来越低,特别适合大规模的检测。

具体实施方式

[0031] 以下实施例进一步描述本发明方法的实施过程和有益效果,实施例仅用于例证的目的,不限制本发明的范围,同时本领域普通技术人员根据本发明所做的显而易见的改变也包含在本发明范围之内。

[0032] 在本发明中,所述 $(AGTCC)_4 + (GTCCA)_6$ 的引物优选的如序列1和序列2所示:

[0033] 上游引物序列1:GGCTGAGGTTGCGAAAGA

[0034] 下游引物序列2:CAATTACATAAGTGGGACGAGA

[0035] 在本发明中,所述 $(GA)_9$ 的引物优选的如序列3和序列4所示:

[0036] 上游引物序列3:TCTGAATCAATGTATCATGTATCGAA

[0037] 下游引物序列4:CTGTCAGTCATGCTGCGTTT

- [0038] 在本发明中,所述(GA)₁₃的引物优选的如序列5和序列6所示:
- [0039] 上游引物序列5:TCCATCTTTATTTGGCAGGC
- [0040] 下游引物序列6:CCATCAGAGATGGGAGTGCT
- [0041] 在本发明中,所述(TC)₆的引物优选的如序列7和序列8所示:
- [0042] 上游引物序列7:AGTGGCAGTCAGCATCTCCT
- [0043] 下游引物序列8:AGAAGATTTTGCAGAGGGCA
- [0044] 在本发明中,所述(CAG)₅的引物优选的如序列9和序列10所示:
- [0045] 上游引物序列9:AGGCGTCTGAGCTACCAAAA
- [0046] 下游引物序列10:CGACGACACCCAATACCTTT
- [0047] 在本发明中,所述(CTG)₅的引物优选的如序列11和序列12所示:
- [0048] 上游引物序列11:AAACCAATGAAAATGCCTGC
- [0049] 下游引物序列12:TCCCCAGCCAACTCTCATAC
- [0050] 在本发明中,所述(ACTGGC)₄的引物优选的如序列13和序列14所示:
- [0051] 上游引物序列13:AGCGTATGAATTGGTCCAGG
- [0052] 下游引物序列14:ACGAAGATAGCTCGAACGGA
- [0053] 在本发明中,所述(AGGCGG)₃的引物优选的如序列15和序列16所示:
- [0054] 上游引物序列15:TAAATACGCACAAGCCCACA
- [0055] 下游引物序列16:GGAGGAGCAAATGGATCAAA
- [0056] 在本发明中,所述(AGC)₇的引物优选的如序列17和序列18所示:
- [0057] 上游引物序列17:AATTCGTTGGCCTTCAGATG
- [0058] 下游引物序列18:CGATCTCGGGCATTATGAGT
- [0059] 实施例1利用9对SSR引物构建日本落叶松种质指纹图谱的应用
- [0060] 1、日本落叶松基因组DNA提取
- [0061] 参照改良的CTAB法,具体操作如下:
- [0062] 1) 采集日本落叶松不同种质标准品材料的幼嫩、洁净的叶片,硅胶干燥后保存于-80℃冰箱;
- [0063] 2) 在研钵中用液氮将1g标准品磨成细粉末状,并在加入液氮保护的情况下立即放入2mL离心管,同时立即加入800μL 65℃预热的DNA抽提缓冲溶液,然后放入65℃水浴锅中水浴30~45min,水浴过程中每5min轻微翻转下离心管;
- [0064] 3) 水浴后冷却至室温后加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1,v/v),温和翻转50次以上至充分混合均匀,常温离心12000rpm10 min;
- [0065] 4) 取上清于新的离心管中,按上一步骤再抽提1次;
- [0066] 5) 重复步骤4);
- [0067] 6) 抽提后,取上清于新的离心管中,并加入0.6~1.0倍体积-20℃预冷的的异丙醇,并静置于-20℃下1h以上;
- [0068] 7) 用75%的乙醇和无水乙醇各洗一次;
- [0069] 8) 倒掉酒精风干,加50μL ddH₂O溶解DNA,4℃保存;
- [0070] 9) 取出少量DNA电泳检测其纯度,并利用紫外分光光度计测定DNA浓度,将DNA溶液稀释到30ng/μL备用。

[0071] 采用上述方法提取表1所示的92个日本落叶松种质标准品材料的基因组DNA。

[0072] 表1日本落叶松种质标准品材料

[0073]

编号	品系	种质名称	来源
LK001	Z126	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK002	Z127	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK003	Z128	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK004	Z129	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK005	Z130	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK006	Z131	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK007	Z132	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK008	Z133	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK009	Z134	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK010	Z135	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK011	Z136	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK012	Z137	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK013	Z138	<i>Larix kaempferi</i>	甘肃
LK014	Z090	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK015	Z091	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK016	Z092	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK017	Z093	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK018	Z094	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK019	Z113	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK020	Z114	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK021	Z118	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK022	Z121	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK023	Z122	<i>Larix kaempferi</i>	湖北

[0074]

LK024	Z123	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK025	Z124	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK026	Z125	<i>Larix kaempferi</i>	湖北
LK027	Z001	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK028	Z003	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK029	Z004	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK030	Z005	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK031	Z057	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK032	Z071	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK033	Z072	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK034	Z073	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK035	Z082	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK036	Z083	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK037	Z089	<i>Larix kaempferi</i>	辽宁
LK038	Z009	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK039	Z016	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK040	Z017	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK041	Z021	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK042	Z022	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK043	Z037	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK044	Z066	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK045	Z068	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK046	Z069	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK047	Z079	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK048	Z080	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK049	Z081	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK050	Z120	<i>Larix kaempferi</i>	内蒙
LK051	Z010	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK052	Z015	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK053	Z032	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK054	Z034	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK055	Z035	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK056	Z070	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK057	Z085	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK058	Z086	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK059	Z141	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK060	Z145	<i>Larix kaempferi</i>	山东
LK061	CJ15	<i>Larix kaempferi</i>	日本草津
LK062	CJ16	<i>Larix kaempferi</i>	日本草津
LK063	CJ17	<i>Larix kaempferi</i>	日本草津
LK064	CJ18	<i>Larix kaempferi</i>	日本草津
LK065	FS17	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士
LK066	FS22	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士

[0075]

LK067	FS32	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士
LK068	FS42	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士
LK069	FS45	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士
LK070	FS50	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士
LK071	FS7	<i>Larix kaempferi</i>	日本富士
LK072	RG1	<i>Larix kaempferi</i>	日本日光
LK073	RG12	<i>Larix kaempferi</i>	日本日光
LK074	RG18	<i>Larix kaempferi</i>	日本日光
LK075	RG3	<i>Larix kaempferi</i>	日本日光
LK076	RG4	<i>Larix kaempferi</i>	日本日光
LK077	RG7	<i>Larix kaempferi</i>	日本日光
LK078	SB1	<i>Larix kaempferi</i>	日本松本
LK079	SB1	<i>Larix kaempferi</i>	日本松本
LK080	SB2	<i>Larix kaempferi</i>	日本松本
LK081	SB3	<i>Larix kaempferi</i>	日本松本
LK082	SB5	<i>Larix kaempferi</i>	日本松本
LK083	YN1	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK084	YN10	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK085	YN12	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK086	YN13	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK087	YN14	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK088	YN15	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK089	YN18	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK090	YN19	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK091	YN2	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那
LK092	YN20	<i>Larix kaempferi</i>	日本伊那

[0076] 2、SSR引物序列

[0077] 人工合成表2所示的9对SSR引物,并加上不同颜色荧光修饰。引物由北京睿博兴科生物技术有限公司提供。

[0078] 表2日本落叶松SSR引物序列

[0079]

引物	Genbank 登录号	引物序列 (5'-3')	重复单元
P1	JG745371	GGCTGAGGTTGCGAAAGA (序列 1) CAATTACATAAGTGGGACGAGA (序列 2)	(AGTCC) ₄ +(GTCCA) ₆
P2	JR161052	TCTGAATCAATGTATCATGTATCGAA (序列 3) CTGTCAGTCATGCTGCGTTT (序列 4)	(GA) ₉
P3	JR159815	TCCATCTTTATTTGGCAGGC (序列 5) CCATCAGAGATGGGAGTGCT (序列 6)	(GA) ₁₃
P4	JR158646	AGTGGCAGTCAGCATCTCCT (序列 7) AGAAGATTTTGCAGAGGGCA (序列 8)	(TC) ₆
P5	JR153722	AGGCGTCTGAGCTACCAAAA (序列 9) CGACGACACCCAATACCTTT (序列 10)	(CAG) ₅
P6	JR151216	AAACCAATGAAAATGCCTGC (序列 11) TCCCCAGCCAACTCTCATAC (序列 12)	(CTG) ₅
P7	KP863161	AGCGTATGAATTGGTCCAGG (序列 13) ACGAAGATAGCTCGAACGGA (序列 14)	(ACTGGC) ₄
P8	KP863145	TAAATACGCACAAGCCCACA (序列 15) GGAGGAGCAAATGGATCAA (序列 16)	(AGGCGG) ₃
P9	KP863118	AATTCGTTGGCCTTCAGATG (序列 17) CGATCTCGGGCATTATGAGT (序列 18)	(AGC) ₇

[0080] 3、SSR-PCR扩增

[0081] 利用上述9对引物对日本落叶松样品基因组DNA进行PCR扩增,反应体系和程序如下:

[0082] 1)PCR扩增采用15μL体系,包括:dNTP 1.5μL,Buffer(Mg²⁺ plus)1.5μL,Taq酶0.2μL(5u/μL),上下游引物各0.6μL,模板DNA1μL,超纯水9.6μL。上游引物或下游引物浓度独立地为10μmol/L,基因组DNA模板的浓度为30ng/μL。试剂由TAKARA公司提供。

[0083] 2)PCR扩增采用Touch down PCR程序:95℃预变性5min;95℃变性30s,60~50℃退火30s,72℃延伸45s,20个循环,每个循环退火温度降低0.5℃;95℃变性30s,50℃退火30s,72℃延伸45s,10个循环;72℃延伸7min后于4℃保存。采用PE9700型PCR仪(Applied Biosystems,USA)运行PCR反应。

[0084] 依据上述方法得到92个日本落叶松种质的9对SSR扩增产物。

[0085] 4、电泳检测并构建指纹图谱

[0086] 将PCR扩增产物在ABI 3730XL DNA测序仪上进行自动荧光检测,用GeneMarker2.2.0软件对原始数据进行分析,将各峰值的位置与同一泳道GL 500分子内标进行比较,得出SSR扩增产物的长度数值,录入到Excel中,缺失该SSR分子标记扩增产物计作“000”,将扩增产物长度数值依次排列为矩阵,得到计算机可识别的日本落叶松种质鉴定的指纹图谱。92个日本落叶松种质的指纹图谱如表3所示。

[0087] 表3日本落叶松种质的指纹图谱

[0088]

编号	指纹图谱*																	
	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	P6	P6	P7	P7	P8	P8	P9	P9
LK001	144	144	146	150	134	152	228	230	453	453	167	167	224	224	203	209	316	319
LK002	144	144	144	146	134	144	228	230	426	453	155	167	224	224	191	203	319	319
LK003	134	144	150	152	142	142	228	230	426	453	167	167	224	224	203	203	316	319
LK004	139	144	144	146	140	148	228	230	426	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK005	139	139	140	142	148	150	230	230	426	426	167	167	224	230	203	203	319	319
LK006	144	144	136	150	144	148	230	230	426	453	155	155	224	230	203	209	319	319
LK007	139	139	150	152	138	138	212	228	426	426	149	155	224	224	203	203	316	319
LK008	134	139	142	152	142	152	230	230	453	453	149	167	224	224	203	209	319	319
LK009	139	144	146	150	138	144	228	230	426	426	167	167	224	224	203	209	319	319
LK010	144	144	150	152	138	142	230	230	426	426	167	167	224	224	203	209	319	319
LK011	139	144	142	146	134	138	228	230	426	453	155	167	224	224	209	209	316	319
LK012	144	144	136	152	138	138	228	230	426	426	167	167	224	224	203	209	316	319
LK013	139	144	144	150	138	142	230	230	426	453	167	167	224	230	203	203	319	319
LK014	139	139	144	146	138	144	228	230	453	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK015	134	144	146	150	138	142	230	230	426	426	155	161	224	224	203	203	319	319
LK016	139	144	146	154	138	142	212	230	453	453	161	167	224	224	203	203	316	319
LK017	144	144	146	152	134	142	230	230	426	426	161	167	224	230	203	209	319	319
LK018	139	139	150	152	138	142	228	230	426	453	161	167	224	224	203	203	319	319
LK019	139	144	144	158	134	134	230	230	426	453	149	161	224	224	191	203	319	319
LK020	139	144	150	152	138	138	230	230	426	426	149	161	224	230	203	209	316	319
LK021	144	144	150	152	138	142	230	230	426	453	161	167	224	224	203	203	319	319
LK022	139	144	136	146	138	142	228	228	426	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK023	139	139	136	152	138	138	230	230	453	453	149	161	224	230	203	203	319	319
LK024	144	144	142	150	134	138	228	230	426	453	167	173	224	224	209	209	319	319
LK025	134	144	146	150	140	142	230	230	453	453	167	173	224	224	203	203	319	319
LK026	139	144	142	150	142	142	230	230	453	453	155	161	224	230	203	203	319	319
LK027	134	134	150	152	134	142	228	230	453	453	155	167	224	224	203	209	319	319
LK028	139	144	140	152	138	138	212	228	453	453	155	161	224	236	209	209	319	319
LK029	134	144	150	152	134	142	228	230	426	453	155	167	224	224	203	209	319	319
LK030	144	144	146	156	144	146	230	230	426	453	161	167	224	224	203	203	316	319
LK031	139	144	136	150	138	142	228	230	426	453	161	167	224	224	203	203	319	319
LK032	134	139	152	158	148	150	228	230	426	453	167	173	224	224	203	209	319	319
LK033	139	144	146	152	134	138	230	230	453	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK034	139	144	142	152	142	144	230	230	426	453	161	167	224	224	203	209	316	319
LK035	134	144	136	150	138	146	230	230	426	426	167	167	224	224	203	209	316	319
LK036	139	144	150	152	138	142	228	230	426	453	161	161	224	224	203	203	319	319

[0089]

LK037	134	144	146	152	148	150	212	228	426	453	161	167	224	224	209	209	319	319
LK038	139	144	150	152	142	148	230	230	426	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK039	144	144	146	150	138	152	230	230	453	453	161	167	224	230	203	209	319	319
LK040	139	144	146	150	138	142	228	230	426	453	167	167	224	224	203	209	316	319
LK041	129	144	150	152	132	150	230	230	426	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK042	139	139	140	156	140	140	230	230	426	453	167	167	224	224	209	209	319	319
LK043	134	139	142	150	134	138	230	230	426	453	149	161	224	224	203	209	319	319
LK044	139	144	140	154	138	138	228	228	426	453	155	155	224	224	203	203	316	319
LK045	139	144	152	154	138	138	230	230	426	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK046	139	144	150	152	140	144	230	230	453	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK047	134	144	146	152	138	150	228	230	453	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK048	134	139	136	150	138	154	228	230	426	453	161	167	224	224	203	203	319	319
LK049	144	144	138	150	138	142	212	230	426	453	167	173	224	224	203	209	319	319
LK050	144	144	134	150	138	148	230	230	453	453	167	167	224	224	209	209	319	319
LK051	139	139	144	146	134	138	230	230	426	453	155	167	224	224	203	203	319	319
LK052	139	144	136	150	138	138	228	230	453	453	167	167	224	224	209	209	319	319
LK053	139	144	136	152	152	154	230	230	453	453	155	167	224	230	203	209	319	319
LK054	144	149	136	152	138	152	230	230	426	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK055	134	139	142	146	138	150	230	230	453	453	161	167	224	230	203	209	319	319
LK056	134	139	150	152	150	152	230	230	426	453	155	155	224	224	203	203	316	319
LK057	134	139	142	152	134	138	228	230	426	453	149	161	224	224	203	209	319	319
LK058	139	139	146	152	140	142	230	230	453	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK059	144	144	146	150	138	138	230	230	426	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK060	144	144	136	152	138	150	230	230	426	453	149	167	224	224	203	203	316	319
LK061	139	139	150	150	130	140	230	230	426	453	149	167	224	224	203	203	316	319
LK062	134	139	148	148	130	134	230	230	426	453	161	161	224	224	203	209	316	319
LK063	129	139	144	148	134	134	230	230	453	453	149	161	224	224	203	209	319	319
LK064	129	139	148	148	130	134	230	230	453	453	167	167	224	224	203	209	316	319
LK065	134	139	146	146	138	150	230	230	453	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK066	134	139	144	146	138	138	230	230	426	453	161	167	218	224	203	203	319	319
LK067	139	139	148	150	134	138	230	230	453	453	167	167	224	224	209	209	316	319
LK068	139	139	136	146	130	130	230	230	453	453	167	167	224	224	203	203	319	319
LK069	139	139	136	148	138	150	230	230	426	426	167	167	224	224	203	203	316	319
LK070	139	139	144	148	134	134	230	230	426	453	161	167	224	224	203	209	319	319
LK071	139	139	144	146	130	138	230	230	426	453	155	167	224	224	203	203	319	319
LK072	134	139	146	150	138	150	230	230	426	453	155	167	224	224	203	203	319	319
LK073	129	134	146	150	144	146	230	230	450	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK074	134	134	146	146	134	146	230	230	453	453	167	167	224	224	203	203	319	319
LK075	129	134	144	148	134	142	230	230	426	426	161	167	224	224	203	209	319	319
LK076	134	134	146	146	134	138	230	230	453	453	167	167	224	224	203	209	319	319
LK077	129	134	136	148	134	138	228	230	453	453	155	167	224	224	203	203	319	319
LK078	134	139	148	150	140	142	228	228	426	453	161	167	224	224	203	209	316	319
LK079	139	139	136	136	134	136	228	230	426	453	167	167	224	224	203	209	319	319

[0090]

LK080	129	134	142	146	134	140	230	230	426	453	149	149	224	224	203	209	319	319
LK081	139	144	146	148	130	142	230	230	453	453	149	167	224	224	209	209	319	319
LK082	134	139	142	148	134	146	230	230	426	453	149	161	224	224	209	209	319	319
LK083	129	134	142	150	140	146	230	230	426	453	161	161	224	230	203	209	316	319
LK084	129	139	144	146	130	134	230	230	426	426	167	167	224	224	203	209	319	319
LK085	129	134	146	148	130	146	230	230	426	453	167	167	224	230	203	209	319	319
LK086	129	134	146	150	146	150	230	230	453	453	167	173	212	224	209	209	319	319
LK087	129	129	148	148	134	140	230	230	426	453	155	167	224	230	209	209	319	319
LK088	134	139	146	146	134	150	228	230	426	453	167	167	230	230	209	209	319	319
LK089	134	139	146	150	134	138	228	230	426	453	149	167	224	224	203	203	319	319
LK090	134	134	148	150	134	138	230	230	426	426	149	167	224	230	203	209	319	319
LK091	134	134	142	148	140	142	230	230	453	453	167	167	224	224	209	209	316	319
LK092	134	134	144	146	138	140	230	230	453	453	167	179	224	224	209	209	319	319

[0091] *数字表示品种DNA利用SSR引物进行扩增,在自动荧光检测仪上读出的SSR扩增产物的长度数值。每对引物读出两个数值,按照从小到大的顺序排列。

[0092] 实施例2利用构建的日本落叶松种质指纹图谱进行种质鉴定

[0093] 1、日本落叶松种质的DNA提取

[0094] 采用实施例1的方法提取来源于表1范围内、临时编号为U01、U02、U03、U04和U05的5份日本落叶松种质的基因组DNA。

[0095] 2、日本落叶松种质的SSR-PCR扩增

[0096] 以上述5份日本落叶松种质基因组DNA为模板,利用实施例1的9对SSR引物分别进行PCR扩增,得到5份日本落叶松种质的9对SSR引物的扩增产物。

[0097] 3、电泳并构建指纹图谱

[0098] 将上述5份日本落叶松种质的9对SSR引物的扩增产物按照实施例1的方法进行电泳检测并构建SSR指纹图谱,结果如表4所示。

[0099] 将5份日本落叶松种质的SSR指纹图谱与表3中各种质的SSR指纹图谱进行比对,其中U01与LK030、U02与LK048、U03与LK062、U04与LK073、U05与LK083的指纹图谱完全一致,则判定该5份日本落叶松种质分别为LK030、LK048、LK062、LK073和LK083。

[0100] 表4日本落叶松种质样品的指纹图谱

[0101]

编号	指纹图谱																	
	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	P6	P6	P7	P7	P8	P8	P9	P9
U01	144	144	146	156	144	146	230	230	426	453	161	167	224	224	203	203	316	319
U02	134	139	136	150	138	154	228	230	426	453	161	167	224	224	203	203	319	319

[0102]

U03	134	139	148	148	130	134	230	230	426	453	161	161	224	224	203	209	316	319
U04	129	134	146	150	144	146	230	230	450	453	167	167	224	224	203	209	319	319
U05	129	134	142	150	140	146	230	230	426	453	161	161	224	230	203	209	316	319

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 湖北省林业科学研究院
- [0003] <120> 一种日本落叶松种质的指纹图谱构建方法及应用
- [0004] <160> 18
- [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 18
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] ggctgaggtt gcgaaaga 18
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 22
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] caattacata agtgggacga ga 22
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 26
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] tctgaatcaa tgtatcatgt atcgaa 26
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 20
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] ctgtcagtca tgctgcgttt 20
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 20
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] tccatcttta tttggcaggc 20
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 20
- [0038] <212> DNA

[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0040] <400> 6
[0041] ccatcagaga tgggagtgct 20
[0042] <210> 7
[0043] <211> 20
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0046] <400> 7
[0047] agtggcagtc agcatctcct 20
[0048] <210> 8
[0049] <211> 20
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0052] <400> 8
[0053] agaagatttt gcagaggga 20
[0054] <210> 9
[0055] <211> 20
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058] <400> 9
[0059] aggcgtctga gctaccaaaa 20
[0060] <210> 10
[0061] <211> 20
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064] <400> 10
[0065] cgacgacacc caataccttt 20
[0066] <210> 11
[0067] <211> 20
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0070] <400> 11
[0071] aaaccaatga aaatgcctgc 20
[0072] <210> 12
[0073] <211> 20
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0076] <400> 12
[0077] tccccagcca actctcatac 20

[0078]	<210> 13
[0079]	<211> 20
[0080]	<212> DNA
[0081]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082]	<400> 13
[0083]	agcgtatgaa ttggtccagg 20
[0084]	<210> 14
[0085]	<211> 20
[0086]	<212> DNA
[0087]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0088]	<400> 14
[0089]	acgaagatag ctcgaacgga 20
[0090]	<210> 15
[0091]	<211> 20
[0092]	<212> DNA
[0093]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0094]	<400> 15
[0095]	taaatacgca caagcccaca 20
[0096]	<210> 16
[0097]	<211> 20
[0098]	<212> DNA
[0099]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0100]	<400> 16
[0101]	ggaggagcaa atggatcaaa 20
[0102]	<210> 17
[0103]	<211> 20
[0104]	<212> DNA
[0105]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0106]	<400> 17
[0107]	aattcgttgg ccttcagatg 20
[0108]	<210> 18
[0109]	<211> 20
[0110]	<212> DNA
[0111]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112]	<400> 18
[0113]	cgatctcggg cattatgagt 20