(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108103219 A
(43)申请公布日 2018.06.01

(21)申请号 201710221539.3

(22)申请日 2017.04.06

(71)申请人 浙江大学
地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 高中山 王妍 贾慧敏 赵海波 汪国云

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224
代理人 沈自军

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6895(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

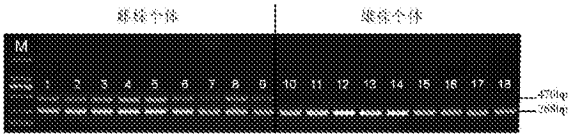
权利要求书1页 说明书9页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记、引物对及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记、引物对及其应用。通过对雌雄杨梅植株的基因组测序，发现了雌株特异性基因FT1以及与FT1基因具有较高序列同源性的雌雄植株共有的FT2基因，通过分析比较两者的序列，设计得到本发明引物对。引物对，包括上游引物和下游引物，核苷酸序列为：上游引物：5′-GTATCAAATCGATCTTTTC-3′；下游引物：5′-ACAGCTACCTATTTTGGATT-3′。利用本发明引物对来鉴别杨梅植株的性别，其预测雌株的准确性高达99%。利用本发明引物对进行PCR鉴定杨梅性别，对杨梅的幼苗鉴定、杂交育种等具有重要的意义，对杨梅的实践生产具有较高的指导价值。



CN 108103219 A

1.一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记，为杨梅雌性特异的基因FT1，其核苷酸序列如SEQ ID No.3所示。

2.引物对，包括上游引物和下游引物，其特征在于，核苷酸序列为：

上游引物：5′-GTATCAAATCGATCTTTTC-3′；

下游引物：5′-ACAGCTACCTATTTTGGATT-3′。

3.如权利要求2所述引物对在鉴别杨梅性别中的应用。

4.如权利要求3所述的应用，其特征在于，所述杨梅为杨梅幼苗。

5.如权利要求2所述引物对在制备用于鉴别杨梅性别的试剂盒中的应用。

6.一种包含如权利要求2所述引物对的试剂盒。

7.如权利要求6所述试剂盒在鉴别杨梅性别中的应用。

8.一种鉴别杨梅性别的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1)对待检测杨梅植株取样并提取基因组DNA；

(2)以所述基因组DNA为模板，利用权利要求2所述引物对进行PCR扩增；

(3)PCR扩增产物进行电泳检测，

若电泳检测结果在470bp和268bp处均有特异性条带，则待检测杨梅植株为雌株；

若电泳检测结果只在268bp处有特异性条带，则待检测杨梅植株为雄株。

9.如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述PCR扩增的体系为：

2×SapphireAmp Fast PCR Master Mix	5 μL
10 μM 上游引物	0.5 μL
10 μM 下游引物	0.5 μL
30 ng/μL 模板	1 μL
ddH2O	3 μL。

10.如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述PCR扩增的条件为：

94℃预变性5min；94℃变性30s，53℃退火30s，72℃延伸10s，共35个循环；72℃延伸10min。

一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记、引物对及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子鉴别技术领域，特别是涉及一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记、引物对及其应用。

背景技术

[0002] 杨梅(Myrica rubra Sieb.&Zucc.)属于杨梅科杨梅属植物，原产于我国东南各省及云贵高原，栽培历史悠久，是我国南方的特色水果，目前杨梅主栽品种分布在我国浙江，江苏、福建、江西、湖南、广东、贵州和云南等省，其中浙江省的栽培面积、产量、质地等均为最佳。杨梅果实成熟期(6月份)恰逢一年中的水果淡季，能够有效填补市场上的水果空缺期，再加上杨梅果色艳丽，风味独特，同时富含花青苷，具有较高的营养价值，深受消费者的喜爱。

[0003] 杨梅多为雌雄异株植物，少有雌雄同株；花小，单性，无花被，为风媒花；雌花为柔荑花序，雌花自3月上旬至4月初渐次开放，3月中旬为盛花期，花期约20天；雄花为复柔荑花序，自2月下旬至4月上旬陆续开放，3月中旬为盛花期，花期约45天。

[0004] 然而，杨梅雄株不能直接产生经济效益，因此目前在栽培上以雌株为主。而在杨梅育种上多采用实生育种，需要等待10多年方能鉴别出植株的雌雄。这种传统的育种方式年限长，生产成本高，经济效益低。利用分子标记鉴定雌雄异株植物的性别有利于较早选择雌株后代，可以使得上述问题得以改善。其他果树相关的性别决定机制在国内外都有过大量的报道，比如木瓜、猕猴桃等，然而在杨梅上相关研究却是空白。寻找到一种可以在杨梅植株早期就能够有效鉴别杨梅植株性别的方法，对杨梅的幼苗鉴定、杂交育种等具有重要的意义，对杨梅的实践生产具有较高的指导价值。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足，提供了一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记，以及基于该分子标记设计的一种引物对，利用该引物对能够有效地对杨梅植株进行早期性别鉴定。

[0006] 一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记，为杨梅雌性特异的基因FT1，其核苷酸序列如SEQ ID No.3所示。

[0007] 该分子标记是通过对杨梅基因组测序，雌、雄各100个个体分别组成的混池进行测序，以及雌雄5个个体重测序，发现雌性特异的基因组区段，其中一个与开花相关的功能基因FT1(SEQ ID No.3)，雄性植株中并不含有该基因。

[0008] 引物对，包括上游引物和下游引物，核苷酸序列为：

[0009] 上游引物：5′-GTATCAAATCGATCTTTTC-3′；

[0010] 下游引物：5′-ACAGCTACCTATTTTGGATT-3′。

[0011] 与FT1基因的核苷酸序列80％同源的基因序列FT2(SEQ ID No.4)在雌雄中都存在。通过对他们的序列进行分析比较，最终设计得到本发明引物对，并经过验证具有较高的

可靠性。

[0012] 使用本发明引物对进行PCR扩增，理论上雌性的杨梅植株最后能够扩增出470bp和268bp两条特异性条带，其中470bp的条带是引物扩增雌性特异性基因FT1所得，扩增的片段序列如SEQ ID No.5所示，而268bp的条带是引物扩增基因FT2所得，扩增的片段序列如SEQ ID No.6所示；而雄性的杨梅植株只能扩增出268bp的一条特异性条带。

[0013] 当然，由于植株个体之间的差异，个别杨梅植株可能存在基因突变或者染色体方面的变异，造成个别雄性植株也扩增出两条特异性条带，但整体来讲，使用本发明引物对对197份杨梅植株进行性别鉴定，鉴定杨梅植株雌性的准确率高达99％左右，具有足够的经济效益。

[0014] 本发明又提供了所述引物对在鉴别杨梅性别中的应用。

[0015] 所述杨梅为杨梅幼苗。

[0016] 本发明又提供了所述引物对在制备用于鉴别杨梅性别的试剂盒中的应用。

[0017] 本发明还提供了一种包含所述引物对的试剂盒。

[0018] 本发明还提供了所述试剂盒在鉴别杨梅性别中的应用。

[0019] 本发明还提供了一种鉴别杨梅性别的方法，包括以下步骤：

[0020] (1)对待检测杨梅植株取样并提取基因组DNA；

[0021] (2)以所述基因组DNA为模板，利用权利要求1所述引物对进行PCR扩增；

[0022] (3)PCR扩增产物进行电泳检测，

[0023] 若电泳检测结果在470bp和268bp处均有特异性条带，则待检测杨梅植株为雌株；

[0024] 若电泳检测结果只在268bp处有特异性条带，则待检测杨梅植株为雄株。

[0025] 所述PCR扩增的体系为：

[0026]

2×SapphireAmp Fast PCR Master Mix	5 μL
10 μM 上游引物	0.5 μL
10 μM 下游引物	0.5 μL
30 ng/μL 模板	1 μL
ddH2O	3 μL。

[0027] 所述PCR扩增的条件为：

[0028] 94℃预变性5min；94℃变性30s，53℃退火30s，72℃延伸10s，共35个循环；72℃延伸10min。

[0029] 本发明通过对雌雄杨梅植株的基因组测序，发现了雌株特异性基因FT1以及与FT1基因具有较高序列同源性的雌雄植株共有的FT2基因，通过分析比较两者的序列，最后设计得到本发明引物对。对大量来自不同地方不同品系的杨梅雌雄植株进行检测，发现利用本发明引物对来鉴别杨梅植株的性别，其预测雌株的准确性高达99％。利用本发明引物对进行PCR鉴定杨梅性别，对杨梅的幼苗鉴定、杂交育种等具有重要的意义，对杨梅的实践生产具有较高的指导价值。

附图说明

[0030] 图1为实施例2中杨梅2号染色体上在雄混池DNA测序覆盖深度为0情况下的雌混池

覆盖度结果图，其中横线上部的点为雌性，下部的点为雄性。

[0031] 图2为实施例4中使用引物Mr-F1时部分植株的电泳检测结果图，其中，M为DL2000DNA Markers；泳道1～9为雌株，品系依次为：荸荠、东魁、粉红种、上虞白杨梅、安海片早生、纽叶梅、广东黑梅、大纪、黑瑞林；泳道10～18为雄株，品系依次为：C2010-1、Y2010-1、T2011-26、W2011-4、Y2015-1、Y2015-2、FJ2011-40、JS2011-14、GX2011-20。

[0032] 图3为实施例4中使用引物Mr-F2时部分植株的电泳检测结果图，其中，M为DL2000DNA Markers；泳道1～9为雌株，品系依次为：荸荠、东魁、粉红种、上虞白杨梅、安海片早生、纽叶梅、广东黑梅、大纪、黑瑞林；泳道10～18为雄株，品系依次为：C2010-1、Y2010-1、T2011-26、W2011-4、Y2015-1、Y2015-2、FJ2011-40、JS2011-14、GX2011-20。

具体实施方式

[0033] 实施例1

[0034] 基因组DNA的提取。

[0035] 用改良的CTAB法分别提取197份(雄株100份，雌株97份)杨梅品种的基因组DNA，具体方法如下：

[0036] 1、配制缓冲液

[0037] CTAB缓冲液：2％CTAB，0.1M Tris，20mM EDTA，1.4M NaCl，pH 8.0；

[0038] DNA溶解缓冲液TE：10mM Tris；1mM EDTA；pH 8.0。

[0039] 2、提取杨梅基因组DNA

[0040] ①用天平迅速称取约1.0g贮藏于-80℃冰箱中的杨梅幼嫩叶片组织，加少许PVP防止氧化，用液氮于研钵中充分研磨后将粉末快速转入盛有在65℃预热的4mL CTAB溶液与80μLβ-巯基乙醇的10mL离心管中，65℃水浴1h；

[0041] ②将步骤①混合物中加入4mL氯仿/异戊醇(24∶1)，涡旋混匀，12000rpm离心10min，取上清液于新10mL管中，再次加入4mL氯仿/异戊醇(24∶1)，涡旋混匀，12000rpm离心10min；

[0042] ③将步骤②离心后所得的上清液转入新10mL管，并加入等体积-20℃预冷的异丙醇，轻轻混匀，在-20℃放置30min至DNA沉淀。10000rpm离心2min，去上清液；

[0043] ④用75％的乙醇清洗步骤③DNA沉淀物3次；

[0044] ⑤将步骤④洗涤后的DNA晾干并溶于200μL的TE缓冲液中，加入2μL RNA酶(10mg/mL)以除去RNA；DNA检测采用紫外分光光度计(Beckman coulter，USA)，确定其浓度和质量，同时取1μL用TE缓冲液稀释5倍后在1.0％的琼脂糖凝胶上检测。DNA原液保存于-20℃，工作液稀释为30ng/μL备用。

[0045] 实施例2

[0046] 基因组测序分析，引物设计。

[0047] 通过杨梅基因组测序，雌、雄各100个混池测序，以及雌雄5个个体重测序，发现雌性特异的基因组区段，2号染色体(chr2)上具有一个与开花相关的功能基因FT1(SEQ ID No.3)，测序分析结果如图1所示。与此序列80％同源的基因序列FT2(SEQ ID No.4)在雌雄中都存在。据此设计了2对鉴别杨梅性别的PCR引物Mr-F1，Mr-F2，委托杭州金百奥生物科技有限公司合成，引物信息如表1所示。

[0048] 表1

[0049]

引物		序列（5′-3′）	扩增片段大小	
Mr-F1	上游引物	GTATCAAATCGATCTTTTC	雌株	雄株
	下游引物	ACAGCTACCTATTTTGGATT	268 bp、470 bp 两条	268bp 一条
Mr-F2	上游引物	CCTCTCAGGTTGTCAACCAA	426bp、332bp 两条	426bp 一条
	下游引物	GAAAAGATCGATTTGATAC		

[0050] 实施例3

[0051] PCR扩增。

[0052] ①反应体系：

[0053]

2×SapphireAmp Fast PCR Master Mix （购自 TAKARA 公司）	5 μL
10 μM 上游引物	0.5 μL
10 μM 下游引物	0.5 μL
30 ng/μL 模板	1 μL
ddH2O	3 μL。

[0054] ②反应程序：94℃预变性5min；94℃变性30s，53℃退火30s，72℃延伸10s，共35个循环；72℃延伸10min。

[0055] ③产物在2.0％琼脂糖凝胶上电泳检测，紫外灯下观察并照相记录结果。

[0056] 实施例4

[0057] 以实施例1中提取的基因组DNA为模板，利用实施例2中设计的引物，按照实施例3中的PCR扩增方法进行扩增检测。部分植株的电泳结果如图2（引物Mr-F1）和图3（Mr-F2）所示，由于Mr-F2引物扩增片段大小相近，电泳检测效果不清晰，因此将Mr-F1引物作为最终检测用引物。

[0058] 使用Mr-F1引物进行扩增，197份（雄株100份，雌株97份）杨梅群体检测结果如表2所示。结果显示：用Mr-F1引物扩增，雌株主要基因型为268/470bp，雄株主要的基因型为268bp，将197份杨梅植株的性别与扩增基因型相对应，其中97份雌株杨梅检测结果均正确；100份雄株杨梅检测结果中98份检测结果正确，2份（编号为99、100）雄性杨梅检测结果与预期不符，出现两条特异性片段。利用Mr-F引物预测杨梅植株雌性的准确率高达99％。

[0059] 表2

[0060]

编号	品系	性别	原产地	采样地	结果
1	C2010-1	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
2	C2010-2	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
3	C2010-11	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
4	C2010-13	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
5	C2010-14	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
6	C2010-15	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
7	C2010-17	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
8	C2010-18	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
9	C2010-19	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
10	C2010-20	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
11	C2010-22	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
12	C2010-23	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
13	C2010-24	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
14	C2010-25	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
15	C2010-26	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
16	C2010-27	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
17	C2010-28	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
18	C2010-29	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
19	C2010-30	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
20	C2010-31	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
21	C2010-32	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
22	C2010-33	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
23	C2010-34	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
24	C2010-35	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
25	C2010-36	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
26	C2010-37	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268

[0061]

27	C2010-38	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
28	C2010-39	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
29	C2010-40	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
30	C2010-41	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
31	C2010-42	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
32	C2010-43	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
33	C2010-44	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
34	C2010-45	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
35	C2010-46	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
36	C2010-47	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
37	C2010-48	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
38	C2010-49	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
39	C2010-51	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
40	C2010-52	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
41	C2010-53	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
42	C2010-54	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
43	C2010-55	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
44	Y2010-1	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
45	Y2010-4	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
46	Y2010-7	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
47	Y2010-12	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
48	Y2010-14	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
49	Y2010-20	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
50	Y2010-21	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
51	Y2010-23	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
52	Y2010-24	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
53	Y2010-36	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
54	Y2010-46	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
55	Y2010-47	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
56	Y2010-48	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
57	Y2010-51	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
58	Y2010-54	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
59	Y2010-63	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
60	FJ2011-40	♂	福建福安	福建福安	268
61	FJ2011-41	♂	福建福安	福建福安	268
62	FJ2011-43	♂	福建福安	福建福安	268
63	T2011-26	♂	浙江台州	浙江台州	268
64	T2011-29	♂	浙江台州	浙江台州	268
65	T2011-31	♂	浙江台州	浙江台州	268
66	GX2011-20	♂	广西桂林	广西桂林	268
67	GX2011-21	♂	广西桂林	广西桂林	268
68	GX2011-23	♂	广西桂林	广西桂林	268
69	GZ2011-33	♂	贵州黔东南	贵州黔东南	268
70	JS2011-14	♂	江苏苏州	江苏苏州	268
71	JS2011-18	♂	江苏苏州	江苏苏州	268
72	JS2011-19	♂	江苏苏州	江苏苏州	268
73	W2011-4	♂	浙江温州	浙江温州	268
74	W2011-6	♂	浙江温州	浙江温州	268

[0062]

75	W2011-9	♂	浙江温州	浙江温州	268
76	H2011-12	♂	浙江杭州	浙江杭州	268
77	H2011-13	♂	浙江杭州	浙江杭州	268
78	Y2015-1	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
79	Y2015-2	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
80	Y2015-3	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
81	Y2015-4	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
82	Y2015-7	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
83	Y2015-8	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
84	Y2015-9	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
85	Y2015-10	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
86	Y2015-13	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
87	Y2015-14	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
88	Y2015-15	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
89	Y2015-16	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
90	Y2015-17	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
91	Y2015-18	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
92	Y2015-19	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
93	Y2015-20	♂	湖南靖州	湖南靖州	268
94	CZLSZ	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
95	Y2012-1	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
96	Y2012-2	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
97	Y2012-151	♂	浙江余姚	浙江余姚	268
98	C2010-50	♂	浙江慈溪	浙江慈溪	268
99	W2011-2	♂	浙江温州	浙江温州	268、470
100	W2011-3	♂	浙江温州	浙江温州	268、470
101	Y2012-9	♀	浙江杭州	浙江杭州	268、470
102	Y2012-10	♀	浙江杭州	浙江杭州	268、470
103	瑞光东魁变异	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
104	Y2012-21	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
105	Y2012-24	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
106	黄叶梅	♀	浙江温州	浙江温州	268、470
107	Y2012-28	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
108	Y2012-29	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
109	三夹岙乌梅	♀	浙江宁波	余姚杨梅资源圃	268、470
110	安海片早生	♀	福建安海	余姚杨梅资源圃	268、470
111	Y2012-35	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
112	土梅	♀	浙江温州	余姚杨梅资源圃	268、470
113	湘红	♀	浙江杭州	余姚杨梅资源圃	268、470
114	迟色	♀	浙江杭州	余姚杨梅资源圃	268、470
115	Y2012-42	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
116	Y2012-44	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
117	Y2012-45	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
118	荸荠优系高云	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
119	Y2012-47	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
120	Y2012-51	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
121	Y2012-54	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
122	大叶高桩	♀	浙江温州	浙江温州	268、470

[0063]

123	土大	♀	浙江温州	余姚杨梅资源圃	268、470
124	晚荠蜜梅	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
125	Y2012-67	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
126	Y2012-69	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
127	Y2012-70	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
128	Y2012-71	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
129	Y2012-73	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
130	宁波甬 56	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
131	Y2012-79	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
132	Y2012-80	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
133	Y2012-81	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
134	Y2012-82	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
135	金钱炭梅	♀	浙江杭州	余姚杨梅资源圃	268、470
136	Y2012-85	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
137	Y2012-88	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
138	松毛荔	♀	浙江杭州	余姚杨梅资源圃	268、470
139	早色	♀	浙江杭州	余姚杨梅资源圃	268、470
140	阳平梅	♀	浙江台州	余姚杨梅资源圃	268、470
141	松浆	♀	浙江慈溪	余姚杨梅资源圃	268、470
142	Y2012-95	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
143	纽叶梅	♀	湖南靖州	余姚杨梅资源圃	268、470
144	Y2012-99	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
145	早荠蜜梅	♀	浙江余姚	余姚杨梅资源圃	268、470
146	上冲梅	♀	湖南靖州	余姚杨梅资源圃	268、470
147	早水梅	♀	浙江金华	余姚杨梅资源圃	268、470
148	广东大梅	♀	广东广州	余姚杨梅资源圃	268、470
149	Y2012-105	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
150	Y2012-106	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
151	刺梅	♀	浙江温州	余姚杨梅资源圃	268、470
152	大红袍	♀	浙江湖州	浙江湖州	268、470
153	广东黑梅	♀	广东广州	余姚杨梅资源圃	268、470
154	Y2012-113	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
155	温岭本梅	♀	浙江温州	余姚杨梅资源圃	268、470
156	Y2012-116	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
157	Y2012-118	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
158	大纪	♀	江苏苏州	江苏苏州	268、470
159	黑瑞林	♀	台湾	余姚杨梅资源圃	268、470
160	Y2012-125	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
161	柳叶梅	♀	浙江金华	余姚杨梅资源圃	268、470
162	Y2012-127	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
163	Y2012-128	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
164	月粒盘	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
165	啷哉水晶杨梅	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
166	啷哉荸荠	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
167	荸荠优系临山	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
168	荸荠优株	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
169	临山荸荠	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
170	Y2012-138	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470

[0064]

171	戚变异	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
172	141 西山优株	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
173	吴 早大种 1	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
174	吴 早大种 2	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
175	Y2012-144	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
176	吴 水晶优系	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
177	粉红种	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
178	Y2012-147	♀	未知	余姚杨梅资源圃	268、470
179	上虞白杨梅优系	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470
180	上虞粉红 1	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470
181	上虞白杨梅 2	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470
182	上虞粉红 2	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470
183	上虞荸荠	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470
184	上虞月粒盘	♀	浙江上虞	浙江上虞	268、470
185	Y2015-6	♀	湖南靖州	湖南靖州	268、470
186	W2011-10	♀	浙江温州	浙江温州	268、470
187	大叶上椿	♀	湖南靖州	湖南靖州	268、470
188	小叶上椿	♀	湖南靖州	湖南靖州	268、470
189	木洞上椿	♀	湖南靖州	湖南靖州	268、470
190	HZ2012-1	♀	浙江杭州	浙江杭州	268、470
191	HZ2012-2	♀	浙江杭州	浙江杭州	268、470
192	HZ2012-11	♀	浙江杭州	浙江杭州	268、470
193	浙江大学图书馆雌	♀	浙江杭州	浙江杭州	268、470
194	荸荠	♀	浙江余姚	浙江余姚	268、470
195	东魁	♀	浙江慈溪	余姚杨梅资源圃	268、470
196	荔枝梅	♀	浙江余姚	余姚杨梅资源圃	268、470
197	大浮大叶细蒂	♀	江苏苏州	江苏苏州	268、470

[0065] 注:*与性别关联的标记名,片段大小:bp;-/-为未得到扩增产物;♀-雌;♂-雄。

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江大学

<120> 一种用于鉴别杨梅雌雄的分子标记、引物对及其应用

<130>

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gtatcaaatc gatcttttc 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

acagctacct attttggatt 20

<210> 3

<211> 2635

<212> DNA

<213> 杨梅(Myrica rubra Sieb. & Zucc.)

<400> 3

atggccaggg aaagggacac tctcgctgtt gggcgtgtta taggagatgt gctggacccc 60

tttacaaggt ccattgctct gagggcaatt tataacagta gggaggttaa caacggttgt 120

gagctcaaac cctctcaggt tgtcaaccaa cctagggttg atgttggtgg tgaagatcta 180

aggacgttct atactctggt aaatgtatct tacctctttt ttcctttgct aagcgtcttt 240

ctcttcaact agcttttccc tcaagttgac caccattttt ctcatgagca tttttggttc 300

ttgatatttg acttatgatc atgtccactg cagcttatgg tggatcctga tgcgcccagt 360

ccaagtgatc ccaacctcag ggagtacttg cattggtgag cactctctct ctcattccac 420

aaatacacaa gcacattgca aaggtatcaa atcgatcttt tctctgccct cgatcgtctc 480

tgcgacataa atgcgtagac atccgtttct gactctctat ttgacttccc tcccttcata 540

aaaggactgg taggcggtat agtaatcagg attccatcaa aagctggtta gaagggctca 600

gcattttaaa aaataaatct aatgattgat cccaagtcaa acaaaaaact ctctttattt 660

catctcatta aataaatgaa atggttaaat tcaggccctt ggatttattt tttaaaatct 720

tgacccctcc ttgcaataac ttagaacaaa tgtccttatg atggaaccct ttggcatata 780

ggttggccaa aagaagagag agagaggaaa aagtgatgag aaccggaata ttcttgtttc 840

aattgttcag cctcttttcg ggaaagtagt tcatgcatct tacagaagaa agcaatccaa 900

aataggtagc tgtcgagggc gggatggcgg cggagccaga cattaatatt tgagaaacct 960
ctcgcaatgt actaattgtt taatacgttt aaaaattatg gttaattagt agatttattg 1020
accaacagga tcgatcgaaa gcctaagggg aagcaaaagg acaaggaaga agagttcccc 1080
ctgttgtgat ttttagataa gatacttttt ttcctttaag aagtttttga gcaaaagaaa 1140
aattagattt taaaaaaatt tcttgatttt taagaaaaat ctatacatat atttctatgt 1200
acctatgttg tccttttatt ttattttaat aatcaccaga aagcccaagt actggttttt 1260
tgtgtgaaat tgacaaatat ctttgtcctt ttgttttgct tcctggttga ccgattgagg 1320
gcacgtatga tctctcatgg aaagaaatca tttggaggac cactactaaa gtatctcagg 1380
atatataaag tttctgggat atgcaatgga accgtacatg catgtacgta ccaattacca 1440
tgatacagcc aacaatattg tcatcgtgct ttactcctat attctctccc aggctgtcct 1500
tttccttgtt tctttctctt tgcagttttg tctcctttct ttctcttata cgtacgcacg 1560
tacgtaattc ttcttattcc attgggtagt gatagactct ggaacgtcgc atgttgaata 1620
tttccacatc tgatgacttg tatagtagtg ttgatcgact accatgacaa aggctatcaa 1680
ctctccttaa tatattagag tgatttggca gccagttaat tattgtccgc tgtttaaatc 1740
tgccattgct aatgtaaata ttgcatttaa caaactaatt aattaagaaa ctgtctttaa 1800
gaggacttca agtgataatt tagttgccaa attactgaga agtactctct cgttctttgt 1860
agctattcta tcactattat tatttcttct tggcctttct taactcttgc gataattgtt 1920
aacttttgt catatattta tatatagtga tcaatgatta accgttacca aggcatcggg 1980
tgctattatt gtaacctttc tactttagtt tcatttgaag gtccatttgt cgtagttatg 2040
attttatatt ttgtctagga gaaatttgat attatccgta actgttactt ctactaagtt 2100
tttcaaaatt aagattaatt tgtcgtctcc ctctggtttg ttaggttggt gactgatatt 2160
ccagaaacta cgggggcaag ctttggtgag tatactacac atgcacatgt ggtttagtaa 2220
attatcaaga gttaaagaca cctctcttga gacatgcaaa gcactgtcgt acggcaaaca 2280
atgcttgtat ggctttgtga gaaggccaag catttgtagg gatagtttga tctagcagta 2340
ctattattgt ttgtatcttc atgagtaaca tgtatatatg atctatggcc aaatttttt 2400
gggcgtaggg caagaggttg tgtgctacga aagtccacga ccagtggtag ggatccatcg 2460
gtttgttttc gtgttgttcc gtcaactggg taggcagaca gtatatgcac cagggtggcg 2520
ccaaaatttc aacaccagag acttcgctga gcaatacaat ctcggattgc cagtggctgc 2580
actttacttt aactgccaga gggaaagcgg ctgtggtgga aggagaagat tgtga 2635

<210> 4
<211> 2620
<212> DNA
<213> 杨梅(Myrica rubra Sieb. & Zucc.)
<400> 4
atggctaggg aaagggaccc tctcactgtt gggcgtgtta taggagatgt gttggacccc 60
tttacgagat ccatcgctat gagggcaatt tataacagta gggaggttaa caacggttgt 120
gagctcaaac cctctcaggt tgtcaaccaa cctagggttg atattggtgg tgaagatctc 180
aggacgttct atactctggt aaatgtatct taccctcttt cttcctttgc cgtgcgtctt 240
tctcttcagc tagctcttcc ctcaagttga ccacctttct tttttctcat gagctttttt 300

ggttcttgat attttactta tgatcatgtc cactgcagct tatggtggat cctgatgcgc 360
ccagtccaag tgatcccagc ctcagggagt acttgcattg gtgagctctc tctctctctc 420
tctctcccca aaatacacaa gccctttgca aaggtactat atatatatag atatattttt 480
cttgtaaaga tgggggaaca tatatttttt cttcttgtaa agatgggaac atatatagta 540
tcaaatcgat cttttctctg ccctcgatcg tctctgcaat ataattccat atacatctgt 600
ttctgactct ctatttgaca tccctagctc cctccataaa acgactggta ggcggtatat 660
aggtcggcca aaaaaaaaaa cagagagagc aagaagagag aagaaccaga atattcttgt 720
ttcagtcgtt cagcctcttt ccgggaaagt agttcatctt ggagcatcaa taatcagcag 780
aaagcaatcc aaaataggta gctgttgagg acgtacggga tggcggcgga tccagaaatt 840
aatatttgag aaacctcgta atatactaat tatttatata cgtttttata gaatatatat 900
ttcttgatct ctcctatatg tatatataac gatagaaaaa ggtagggata taattcaaaa 960
tttaaaaatt atcgatgata tatagattta ttgaccaaca ggatcgatcg aaagcctaag 1020
gggaagcaaa aggacaagga agaagaaatc cccctattgt gattttcaga taagatactt 1080
tttgtttcct tttagaagtt tttgagcaaa agaaaaattg gattttcaaa atatttcttg 1140
atttttaaca aaaatctata catattatat atttctatgt atttatcagc ttgtcctttt 1200
gttttatttt aataattacc agaaagccca agtgctgttt tttcgtgtga aattgacaaa 1260
tatctcttgt ccttttgttt tgcttcctgc ctgatcgatt gagggcacgt atctctcatg 1320
gatgtgaaat tattggagga ccactactaa agtatctttc gatttataag gtttctggga 1380
tatgcatgca tatacgtacc atgataaagc caacaatatt gtcatcgtac gtgctttact 1440
cctatcttct ctccccgtcc ttttccttgt ttgatctttc tccttgaagt tttgtctcct 1500
ttctttctct tatattaata cgtacgcgcg tacgtaattc tccttattct ttttttttc 1560
ttcttgaaaa ttattctcct ttttccattg ggtagtgata gactctggaa cgcatataga 1620
atatttcccc atctaaggac ttgcatatat agtgttaatc gactaccatg ataagggcta 1680
tcaactctct ccttaatata ttagagtgat ttggcagcca gttaaatatt attgcccgct 1740
gtttaaatct agctagctac catgcattgc taatattgta aatatatatt gcatttaaca 1800
aactaagaaa ccatttttaa aaggacttca agtgataaac tattattttc ttcttggcct 1860
ttcttaactc ttacgataac tttttaactt ttgaattata tttatacttt tttgtggtat 1920
tgtcatacat acatatatat atatatatat ataaccgtca ctaaggtgtc aggatttatt 1980
attgtaaact ttctaattta gttttatttg aaggtgcata tgccgtagtt atgattattt 2040
tgtccagtta ggagaaattt gagattattc gtaacagttc tatacaaagt ttttcaaaac 2100
taaaattaat tccctctggt taatttgtca ggttggtgac tgatattcca gcaactacgg 2160
ggacaagctt tggtgagtat tatactatac atgcatgcac atgtggttta ttaaattatc 2220
aagagttaaa gacacctctc ttgagacatg gaaagcaatg tcgtacggga aacaatgctt 2280
gcatggcttt gtgagaatta ggccaagcat ttgtagggat agtttgatta gcactattat 2340
tgttggtatc cttgattgac atatgatgta ttggccaaat tcaatgggtg taggacaaga 2400
ggtggtgtgc tacgaaagtc cacgaccagt ggtagggatc catcggtttg ttttcgtgtt 2460
gttccgtcaa atgggtaggc agacagtata tgcaccgggg tggcgccaga atttcaacac 2520
caaggacttc gctgagctct acaatctcgg attgccagtg gctgcacatt acttcaactg 2580
ccagagggaa agcggttccg gtggaaggag aagatcgtga 2620

<210> 5
<211> 470
<212> DNA
<213> 杨梅(Myrica rubra Sieb. & Zucc.)
<400> 5
gtatcaaatc gatcttttct ctgccctcga tcgtctctgc gacataaatg cgtagacatc 60
cgtttctgac tctctatttg acttccctcc cttcataaaa ggactggtag gcggtatagt 120
aatcaggatt ccatcaaaag ctggttagaa gggctcagca ttttaaaaaa taaatctaat 180
gattgatccc aagtcaaaca aaaaactctc tttatttcat ctcattaaat aaatgaaatg 240
gttaaattca ggcccttgga tttatttttt aaaatcttga cccctccttg caataactta 300
gaacaaatgt ccttatgatg gaacccttg gcatataggt tggccaaaag aagagagaga 360
gaggaaaaag tgatgagaac cggaatattc ttgtttcaat tgttcagcct cttttcggga 420
aagtagttca tgcatcttac agaagaaagc aatccaaaat aggtagctgt 470
<210> 6
<211> 268
<212> DNA
<213> 杨梅(Myrica rubra Sieb. & Zucc.)
<400> 6
gtatcaaatc gatcttttct ctgccctcga tcgtctctgc aatataattc catatacatc 60
tgtttctgac tctctatttg acatccctag ctccctccat aaaacgactg gtaggcggta 120
tataggtcgg ccaaaaaaaa aaacagagag agcaagaaga gagaagaacc agaatattct 180
tgtttcagtc gttcagcctc tttccgggaa agtagttcat cttggagcat caataatcag 240
cagaaagcaa tccaaaatag gtagctgt 268
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
cctctcaggt tgtcaaccaa 20
<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
gaaaagatcg atttgatac 19

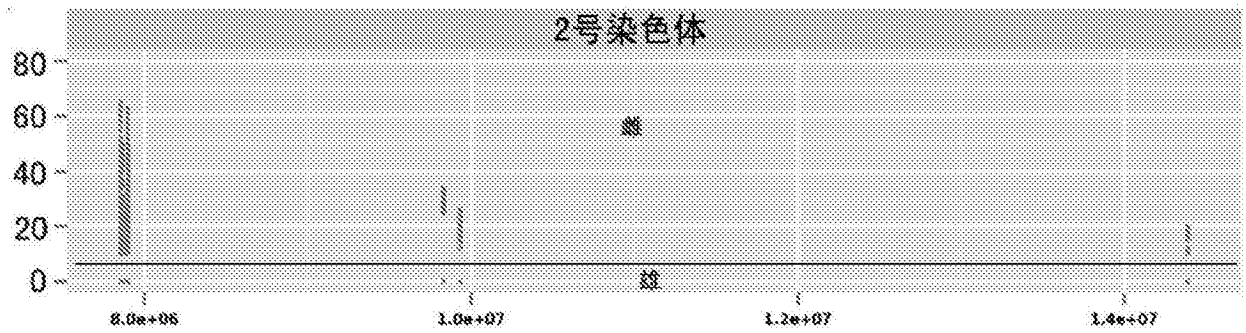

2号染色体
80
60
40
20
0
8.0e+06
1.0e+07
1.2e+07
1.4e+07

图1

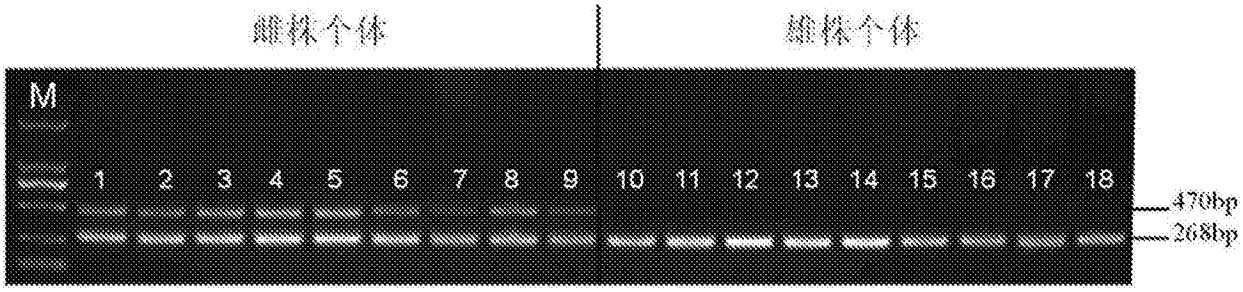

雌株个体
雄株个体
M
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
470bp
268bp

图2

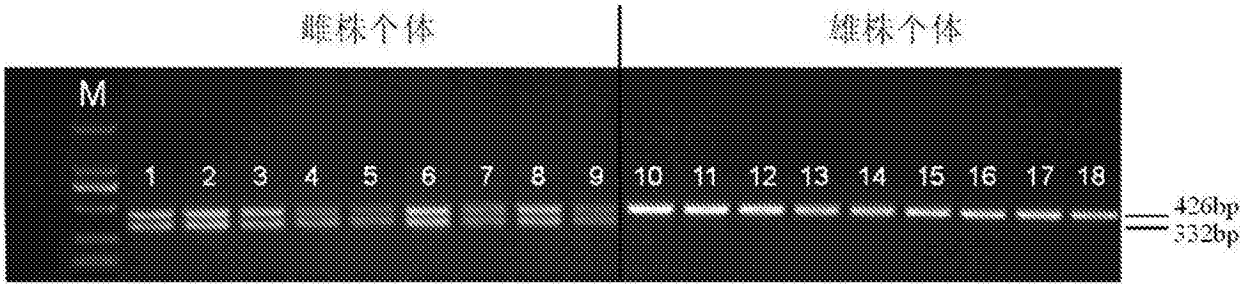

雌株个体
雄株个体
M
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
426bp
332bp

图3