



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109666756 B

(45) 授权公告日 2020.11.10

(21) 申请号 201910079722.3

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.28

审查员 蔡玉品

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109666756 A

(43) 申请公布日 2019.04.23

(73) 专利权人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72) 发明人 温常龙 张建 杨静静 罗江

刘伟伦 杨明珠

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书5页 说明书15页

序列表20页 附图4页

(54) 发明名称

一种鉴定甜瓜品种真实性的方法及其专用
SNP引物组合

(57) 摘要

本发明公开了一种鉴定甜瓜品种真实性的方法及其专用SNP引物组合。本发明所提供的SNP引物组合由32个引物组组成。每个引物组由3条引物序列组成,用于扩增一个SNP位点。32个引物组中各个引物的核苷酸序列依次如序列表中序列1至序列96所示。本发明提供的SNP引物组合可用于对甜瓜品种在种子或幼苗期进行早期鉴定,保证品种的真实性,切实保护生产者和育种家的权益,并为甜瓜种质资源和新品种保护提供技术支持。本发明提供的方法既可以未知甜瓜品种进行鉴定,也可以对已知品种的真实性进行鉴定。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、物力等有点,具有十分广阔的应用前景。

1. 引物组合甲,包括引物组1—引物组32;

所述引物组1由序列1所示的正向引物01F1、序列2所示的正向引物01F2和序列3所示的反向引物01R组成;所述引物组2由序列4所示的正向引物02F1、序列5所示的正向引物02F2和序列6所示的反向引物02R组成;所述引物组3由序列7所示的正向引物03F1、序列8所示的正向引物03F2和序列9所示的反向引物03R组成;所述引物组4由序列10所示的正向引物04F1、序列11所示的正向引物04F2和序列12所示的反向引物04R组成;所述引物组5由序列13所示的正向引物05F1、序列14所示的正向引物05F2和序列15所示的反向引物05R组成;所述引物组6由序列16所示的正向引物06F1、序列17所示的正向引物06F2和序列18所示的反向引物06R组成;所述引物组7由序列19所示的正向引物07F1、序列20所示的正向引物07F2和序列21所示的反向引物07R组成;所述引物组8由序列22所示的正向引物08F1、序列23所示的正向引物08F2和序列24所示的反向引物08R组成;所述引物组9由序列25所示的正向引物09F1、序列26所示的正向引物09F2和序列27所示的反向引物09R组成;所述引物组10由序列28所示的正向引物10F1、序列29所示的正向引物10F2和序列30所示的反向引物10R组成;所述引物组11由序列31所示的正向引物11F1、序列32所示的正向引物11F2和序列33所示的反向引物11R组成;所述引物组12由序列34所示的正向引物12F1、序列35所示的正向引物12F2和序列36所示的反向引物12R组成;所述引物组13由序列37所示的正向引物13F1、序列38所示的正向引物13F2和序列39所示的反向引物13R组成;所述引物组14由序列40所示的正向引物14F1、序列41所示的正向引物14F2和序列42所示的反向引物14R组成;所述引物组15由序列43所示的正向引物15F1、序列44所示的正向引物15F2和序列45所示的反向引物15R组成;所述引物组16由序列46所示的正向引物16F1、序列47所示的正向引物16F2和序列48所示的反向引物16R组成;所述引物组17由序列49所示的正向引物17F1、序列50所示的正向引物17F2和序列51所示的反向引物17R组成;所述引物组18由序列52所示的正向引物18F1、序列53所示的正向引物18F2和序列54所示的反向引物18R组成;所述引物组19由序列55所示的正向引物19F1、序列56所示的正向引物19F2和序列57所示的反向引物19R组成;所述引物组20由序列58所示的正向引物20F1、序列59所示的正向引物20F2和序列60所示的反向引物20R组成;所述引物组21由序列61所示的正向引物21F1、序列62所示的正向引物21F2和序列63所示的反向引物21R组成;所述引物组22由序列64所示的正向引物22F1、序列65所示的正向引物22F2和序列66所示的反向引物22R组成;所述引物组23由序列67所示的正向引物23F1、序列68所示的正向引物23F2和序列69所示的反向引物23R组成;所述引物组24由序列70所示的正向引物24F1、序列71所示的正向引物24F2和序列72所示的反向引物24R组成;所述引物组25由序列73所示的正向引物25F1、序列74所示的正向引物25F2和序列75所示的反向引物25R组成;所述引物组26由序列76所示的正向引物26F1、序列77所示的正向引物26F2和序列78所示的反向引物26R组成;所述引物组27由序列79所示的正向引物27F1、序列80所示的正向引物27F2和序列81所示的反向引物27R组成;所述引物组28由序列82所示的正向引物28F1、序列83所示的正向引物28F2和序列84所示的反向引物28R组成;所述引物组29由序列85所示的正向引物29F1、序列86所示的正向引物29F2和序列87所示的反向引物29R组成;所述引物组30由序列88所示的正向引物30F1、序列89所示的正向引物30F2和序列90所示的反向引物30R组成;所述引物组31由序列91所示的正向引物31F1、序列92所示的正向引物31F2和序列93所示的反向引物31R组成;所述引物组32由序列94所示的正向引物

32F1、序列95所示的正向引物32F2和序列96所示的反向引物32R组成。

2. 引物组合乙,包括引物组1—引物组32;

所述引物组1由序列1自5'末端起第22至54位所示的正向引物01F1、序列2自5'末端起第22至53位所示的正向引物01F2和序列3所示的反向引物01R组成;所述引物组2由序列4自5'末端起第22至54位所示的正向引物02F1、序列5自5'末端起第22至52位所示的正向引物02F2和序列6所示的反向引物02R组成;所述引物组3由序列7自5'末端起第22至49位所示的正向引物03F1、序列8自5'末端起第22至48位所示的正向引物03F2和序列9所示的反向引物03R组成;所述引物组4由序列10自5'末端起第22至46位所示的正向引物04F1、序列11自5'末端起第22至46位所示的正向引物04F2和序列12所示的反向引物04R组成;所述引物组5由序列13自5'末端起第22至51位所示的正向引物05F1、序列14自5'末端起第22至49位所示的正向引物05F2和序列15所示的反向引物05R组成;所述引物组6由序列16自5'末端起第22至48位所示的正向引物06F1、序列17自5'末端起第22至47位所示的正向引物06F2和序列18所示的反向引物06R组成;所述引物组7由序列19自5'末端起第22至51位所示的正向引物07F1、序列20自5'末端起第22至51位所示的正向引物07F2和序列21所示的反向引物07R组成;所述引物组8由序列22自5'末端起第22至46位所示的正向引物08F1、序列23自5'末端起第22至48位所示的正向引物08F2和序列24所示的反向引物08R组成;所述引物组9由序列25自5'末端起第22至43位所示的正向引物09F1、序列26自5'末端起第22至44位所示的正向引物09F2和序列27所示的反向引物09R组成;所述引物组10由序列28自5'末端起第22至48位所示的正向引物10F1、序列29自5'末端起第22至49位所示的正向引物10F2和序列30所示的反向引物10R组成;所述引物组11由序列31自5'末端起第22至54位所示的正向引物11F1、序列32自5'末端起第22至54位所示的正向引物11F2和序列33所示的反向引物11R组成;所述引物组12由序列34自5'末端起第22至46位所示的正向引物12F1、序列35自5'末端起第22至48位所示的正向引物12F2和序列36所示的反向引物12R组成;所述引物组13由序列37自5'末端起第22至51位所示的正向引物13F1、序列38自5'末端起第22至49位所示的正向引物13F2和序列39所示的反向引物13R组成;所述引物组14由序列40自5'末端起第22至46位所示的正向引物14F1、序列41自5'末端起第22至46位所示的正向引物14F2和序列42所示的反向引物14R组成;所述引物组15由序列43自5'末端起第22至48位所示的正向引物15F1、序列44自5'末端起第22至48位所示的正向引物15F2和序列45所示的反向引物15R组成;所述引物组16由序列46自5'末端起第22至48位所示的正向引物16F1、序列47自5'末端起第22至49位所示的正向引物16F2和序列48所示的反向引物16R组成;所述引物组17由序列49自5'末端起第22至54位所示的正向引物17F1、序列50自5'末端起第22至54位所示的正向引物17F2和序列51所示的反向引物17R组成;所述引物组18由序列52自5'末端起第22至46位所示的正向引物18F1、序列53自5'末端起第22至48位所示的正向引物18F2和序列54所示的反向引物18R组成;所述引物组19由序列55自5'末端起第22至46位所示的正向引物19F1、序列56自5'末端起第22至44位所示的正向引物19F2和序列57所示的反向引物19R组成;所述引物组20由序列58自5'末端起第22至46位所示的正向引物20F1、序列59自5'末端起第22至47位所示的正向引物20F2和序列60所示的反向引物20R组成;所述引物组21由序列61自5'末端起第22至46位所示的正向引物21F1、序列62自5'末端起第22至47位所示的正向引物21F2和序列63所示的反向引物21R组成;所述引物组22由序列64自5'末端起第22至51位所示的正向

引物22F1、序列65自5'末端起第22至50位所示的正向引物22F2和序列66所示的反向引物22R组成;所述引物组23由序列67自5'末端起第22至47位所示的正向引物23F1、序列68自5'末端起第22至50位所示的正向引物23F2和序列69所示的反向引物23R组成;所述引物组24由序列70自5'末端起第22至51位所示的正向引物24F1、序列71自5'末端起第22至50位所示的正向引物24F2和序列72所示的反向引物24R组成;所述引物组25由序列73自5'末端起第22至51位所示的正向引物25F1、序列74自5'末端起第22至49位所示的正向引物25F2和序列75所示的反向引物25R组成;所述引物组26由序列76自5'末端起第22至52位所示的正向引物26F1、序列77自5'末端起第22至52位所示的正向引物26F2和序列78所示的反向引物26R组成;所述引物组27由序列79自5'末端起第22至46位所示的正向引物27F1、序列80自5'末端起第22至45位所示的正向引物27F2和序列81所示的反向引物27R组成;所述引物组28由序列82自5'末端起第22至56位所示的正向引物28F1、序列83自5'末端起第22至56位所示的正向引物28F2和序列84所示的反向引物28R组成;所述引物组29由序列85自5'末端起第22至48位所示的正向引物29F1、序列86自5'末端起第22至49位所示的正向引物29F2和序列87所示的反向引物29R组成;所述引物组30由序列88自5'末端起第22至45位所示的正向引物30F1、序列89自5'末端起第22至44位所示的正向引物30F2和序列90所示的反向引物30R组成;所述引物组31由序列91自5'末端起第22至46位所示的正向引物31F1、序列92自5'末端起第22至47位所示的正向引物31F2和序列93所示的反向引物31R组成;所述引物组32由序列94自5'末端起第22至47位所示的正向引物32F1、序列95自5'末端起第22至48位所示的正向引物32F2和序列96所示的反向引物32R组成。

3. 权利要求1所述引物组合甲或权利要求2所述引物组合乙的应用,为x1)至x4)中的任一种:x1)制备用于鉴定157个甜瓜品种的试剂盒;x2)制备用于鉴别157个甜瓜品种真伪性的试剂盒;x3)鉴定157个甜瓜品种;x4)鉴别157个甜瓜品种真伪性;

所述157个甜瓜品种为春棚5号、京蜜10号、京蜜11号、京蜜15号、京蜜7号、京蜜8号、久久红、蜜脆香园、一特白、一特金、早熟一春、京玉5号 F1、京玉10 F1、京玉2008 F1、京玉280 F1、京玉2号 杂交一代、京玉357 F1、京玉白流星 杂交一代、京玉黄流星 杂交一代、京玉绿宝 F1、京玉墨宝 F1、京玉三号、京玉四号 F1、京玉羊角酥 杂交一代、京玉月亮 F1、京御蜜28、骄傲、京域香帅 F1、甜冠三号 F1、甜冠一号 F1、甜蜜蜜 F1、玉美人 F1、Ames 13271、Ames 26809、Ames 26810、Ames 29539、Ames 29551、Hxle's Bese、NSL 34600、NSL 5648、NSL 60241、PI 116489、PI 123188、PI 125865、PI 177347、PI 315410、PI 378169、PI 446928、PI 532841、PI 618848、PI-164569、小花道、无棱洋酥瓜、青旦子、脆菜瓜、荆州八方、白梨瓜、湘西黄金瓜、白沙蜜、江苏三叶瓜、看瓜、白玉满堂、慈溪菜瓜、翠雪5号、东方蜜1号、东之星、丰甜7号、丰甜七号、丰甜一号、甘肃白兰瓜、花脆、江淮蜜一号、金蜜龙、景甜208、热瓜旦子、日本甜宝、西薄洛托、西周蜜25号、西洲密25号、香华、小白瓜、新辉、新世纪、伊莉莎白、玉红、中甜2号、恰尔可洪、金太郎、刘金瓜、鲁甜二号、羊角蜜、十条鲜、M16002、RX-14-3、RX-99、芭苏317、白云、创研脆脆甜、慈脆2号、翠甜1号、东方花脆、鄂甜瓜5号、丰蜜29、风味4号、风味5号、红佳、红绿早脆、红酥手1401、红酥手1402、红优、红玉脆、黄冠、黄晶玉、黄皮9818、江淮蜜7号、江淮蜜二号、江淮蜜六号、江淮蜜三号、金橙、金龙、金露三号、金玉、久红瑞、久青蜜、蜜丰一号、墨香玉、青酥、瑞雪8号、世纪蜜、甜香玉、香瑞301、香瑞一号、香山雪蜜、新红心脆、鑫橙香、雪里红、雪甜一号、银露一号、甬甜5号、甬甜7号、甬甜8号、甬

越1号、玉露一号、玉如意、众天5号、众天7号、众天8号、众天翠宝、众天翠雪、众云20、贮冠、土棱沟金瓜、网纹甜瓜、IVF192、中蜜198、IVF117和赤子牛。

4. 一种鉴定待测甜瓜属于权利要求3中所述157个甜瓜品种中哪个品种的方法,包括如下步骤:分别检测待测甜瓜和157个甜瓜品种基于32个SNP位点的基因型,然后进行如下判断:如果待测甜瓜基于32个SNP位点的基因型和157个甜瓜品种中某品种基于32个SNP位点的基因型完全一致,则待测甜瓜与该甜瓜品种属于同一个品种;如果待测甜瓜基于32个SNP位点的基因型和157个甜瓜品种中各个品种基于32个SNP位点的基因型均不一致,则待测甜瓜与157个甜瓜品种的品种均不相同;

32个SNP位点如下:MeSNP01位点为1号染色体上的第1382511位核苷酸;MeSNP02位点为1号染色体上的第4793379位核苷酸;MeSNP03位点为1号染色体上的第23711547位核苷酸;MeSNP04位点为2号染色体上的第1937599位核苷酸;MeSNP05位点为2号染色体上的第8393441位核苷酸;MeSNP06位点为3号染色体上的第342407位核苷酸;MeSNP07位点为3号染色体上的第7279267位核苷酸;MeSNP08位点为3号染色体上的第16629736位核苷酸;MeSNP09位点为3号染色体上的第17337108位核苷酸;MeSNP10位点为4号染色体上的第2457507位核苷酸;MeSNP11位点为4号染色体上的第16923749位核苷酸;MeSNP12位点为4号染色体上的第23822623位核苷酸;MeSNP13位点为5号染色体上的第428537位核苷酸;MeSNP14位点为5号染色体上的第16951407位核苷酸;MeSNP15位点为6号染色体上的第12568938位核苷酸;MeSNP16位点为7号染色体上的第118327位核苷酸;MeSNP17位点为8号染色体上的第176762位核苷酸;MeSNP18位点为8号染色体上的第26184976位核苷酸;MeSNP19位点为9号染色体上的第9115133位核苷酸;MeSNP20位点为9号染色体上的第19237576位核苷酸;MeSNP21位点为9号染色体上的第21606061位核苷酸;MeSNP22位点为10号染色体上的第57887位核苷酸;MeSNP23位点为10号染色体上的第13346032位核苷酸;MeSNP24位点为10号染色体上的第18145244位核苷酸;MeSNP25位点为11号染色体上的第228130位核苷酸;MeSNP26位点为11号染色体上的第3987092位核苷酸;MeSNP27位点为11号染色体上的第20770253位核苷酸;MeSNP28位点为11号染色体上的第30655566位核苷酸;MeSNP29位点为12号染色体上的第1189283位核苷酸;MeSNP30位点为12号染色体上的第3196136位核苷酸;MeSNP31位点为12号染色体上的第5745821位核苷酸;MeSNP32位点为12号染色体上的第12366462位核苷酸。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于:所述“检测待测甜瓜和157个甜瓜品种基于32个SNP位点的基因型”的步骤如下:

(1) 分别以待测甜瓜的基因组DNA和157个甜瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用权利要求1所述引物组合甲中的引物组进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;

(2) 完成步骤(1)后,采用仪器检测PCR扩增产物的荧光信号,根据荧光信号的颜色获得待测甜瓜和157个甜瓜品种基于32个SNP位点的基因型。

6. 如权利要求4所述的方法,其特征在于:所述“检测待测甜瓜和157个甜瓜品种基于32个SNP位点的基因型”的步骤如下:

(1) 分别以待测甜瓜的基因组DNA和157个甜瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用权利要求2所述引物组合乙中的引物组进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;

(2) 取步骤(1)得到的PCR扩增产物,测序;

(3) 根据步骤(2)得到的测序结果,获得待测甜瓜和157个甜瓜品种基于32个SNP位点的基因型。

一种鉴定甜瓜品种真实性的方法及其专用SNP引物组合

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种鉴定甜瓜品种真实性的方法及其专用引物组合。

背景技术

[0002] 甜瓜是我国重要的蔬菜作物,栽培面积已达50.1万公顷,占全国蔬菜栽培面积的2.2%。我国的甜瓜收获面积占世界总收获面积的45%以上,产量约占世界总产量的50%。甜瓜产业的发展为实现农民增收和提高居民的生活水平发挥了重要作用。依据《非主要农作物品种登记办法》,2017年4月农业部公布了第一批非主要农作物品种登记目录,甜瓜位列其中。目前,全国通过鉴定、认定、登记的品种达500多个,但是市场上的甜瓜品种数量远远超过这一数字。由于各省市之间品种审定相互不协调,甜瓜的品种管理未能有效跟进。甜瓜育种企业较小且分散,存在较多假冒伪劣品种,其中多为衍生、派生近似品种。加之良种生产基地管理不严,盗育、套购品种、同名异种现象现象严重,种子生产质量事故时有发生。根据《非主要农作物品种登记指南》的要求,品种特性说明和品种DUS测试报告中涉及的有关性状如有明确关联基因,可以直接提交DNA检测结果。因此,建立一套基于DNA指纹有效进行甜瓜品种资源真实性和纯度鉴定的标准显得尤为重要。

[0003] 近年来,SNP作为第三代分子标记,以其数量多、分布广、遗传稳定等优点受到广泛重视。随着高通量测序技术的发展和测序成本的降低,获得了大量甜瓜重测序数据。基于分析甜瓜变异组信息,可以挖掘更加可靠高效的SNP位点。采用等位基因竞争性特异PCR法,并设计其特异引物,最终获得样本在SNP位点的基因型。

[0004] 目前,我国还没有专用于甜瓜品种鉴定的DNA分子标记方法。目前,其它作物多采用SSR分子标记。但是SSR检测方式极易导致不真实、假阳性、假阴性结果;不能适应自动化、高通量、大规模的要求。与SSR标记相比,SNP具有多个方面的优势:变异清晰稳定容易检测,真实性准确性高;每个作物均有数以百万计SNP可供选择;适宜于高通量、低成本、自动化快速检测;SNP分型无需对照品种,以准确的碱基呈现结果,可减少人为误差。

发明内容

[0005] 本发明的目的是鉴定甜瓜品种。

[0006] 本发明首先保护SNP位点组合,可包括甜瓜基因组的32个SNP位点;所述32个SNP位点如下:MeSNP01位点为1号染色体上的第1382511位核苷酸;MeSNP02位点为1号染色体上的第4793379位核苷酸;MeSNP03位点为1号染色体上的第23711547位核苷酸;MeSNP04位点为2号染色体上的第1937599位核苷酸;MeSNP05位点为2号染色体上的第8393441位核苷酸;MeSNP06位点为3号染色体上的第342407位核苷酸;MeSNP07位点为3号染色体上的第7279267位核苷酸;MeSNP08位点为3号染色体上的第16629736位核苷酸;MeSNP09位点为3号染色体上的第17337108位核苷酸;MeSNP10位点为4号染色体上的第2457507位核苷酸;MeSNP11位点为4号染色体上的第16923749位核苷酸;MeSNP12位点为4号染色体上的第

23822623位核苷酸;MeSNP13位点为5号染色体上的第428537位核苷酸;MeSNP14位点为5号染色体上的第16951407位核苷酸;MeSNP15位点为6号染色体上的第12568938位核苷酸;MeSNP16位点为7号染色体上的第118327位核苷酸;MeSNP17位点为8号染色体上的第176762位核苷酸;MeSNP18位点为8号染色体上的第26184976位核苷酸;MeSNP19位点为9号染色体上的第9115133位核苷酸;MeSNP20位点为9号染色体上的第19237576位核苷酸;MeSNP21位点为9号染色体上的第21606061位核苷酸;MeSNP22位点为10号染色体上的第57887位核苷酸;MeSNP23位点为10号染色体上的第13346032位核苷酸;MeSNP24位点为10号染色体上的第18145244位核苷酸;MeSNP25位点为11号染色体上的第228130位核苷酸;MeSNP26位点为11号染色体上的第3987092位核苷酸;MeSNP27位点为11号染色体上的第20770253位核苷酸;MeSNP28位点为11号染色体上的第30655566位核苷酸;MeSNP29位点为12号染色体上的第1189283位核苷酸;MeSNP30位点为12号染色体上的第3196136位核苷酸;MeSNP31位点为12号染色体上的第5745821位核苷酸;MeSNP32位点为12号染色体上的第12366462位核苷酸。

[0007] 所述SNP位点组合具体可由上述32个SNP位点组成。

[0008] 本发明还保护SNP引物组合,可包括用于扩增所述MeSNP01的引物组1、用于扩增所述MeSNP02的引物组2、用于扩增所述MeSNP03的引物组3、用于扩增所述MeSNP04的引物组4、用于扩增所述MeSNP05的引物组5、用于扩增所述MeSNP06的引物组6、用于扩增所述MeSNP07的引物组7、用于扩增所述MeSNP08的引物组8、用于扩增所述MeSNP09的引物组9、用于扩增所述MeSNP10的引物组10、用于扩增所述MeSNP11的引物组11、用于扩增所述MeSNP12的引物组12、用于扩增所述MeSNP13的引物组13、用于扩增所述MeSNP14的引物组14、用于扩增所述MeSNP15的引物组15、用于扩增所述MeSNP16的引物组16、用于扩增所述MeSNP17的引物组17、用于扩增所述MeSNP18的引物组18、用于扩增所述MeSNP19的引物组19、用于扩增所述MeSNP20的引物组20、用于扩增所述MeSNP21的引物组21、用于扩增所述MeSNP22的引物组22、用于扩增所述MeSNP23的引物组23、用于扩增所述MeSNP24的引物组24、用于扩增所述MeSNP25的引物组25、用于扩增所述MeSNP26的引物组26、用于扩增所述MeSNP27的引物组27、用于扩增所述MeSNP28的引物组28、用于扩增所述MeSNP29的引物组29、用于扩增所述MeSNP30的引物组30、用于扩增所述MeSNP31的引物组31和用于扩增所述MeSNP32的引物组32。

[0009] 所述SNP引物组合中,所述引物组1可由序列1所示的正向引物01F1、序列2所示的正向引物01F2和序列3所示的反向引物01R组成。所述引物组2可由序列4所示的正向引物02F1、序列5所示的正向引物02F2和序列6所示的反向引物02R组成。所述引物组3可由序列7所示的正向引物03F1、序列8所示的正向引物03F2和序列9所示的反向引物03R组成。所述引物组4可由序列10所示的正向引物04F1、序列11所示的正向引物04F2和序列12所示的反向引物04R组成。所述引物组5可由序列13所示的正向引物05F1、序列14所示的正向引物05F2和序列15所示的反向引物05R组成。所述引物组6可由序列16所示的正向引物06F1、序列17所示的正向引物06F2和序列18所示的反向引物06R组成。所述引物组7可由序列19所示的正向引物07F1、序列20所示的正向引物07F2和序列21所示的反向引物07R组成。所述引物组8可由序列22所示的正向引物08F1、序列23所示的正向引物08F2和序列24所示的反向引物08R组成。所述引物组9可由序列25所示的正向引物09F1、序列26所示的正向引物09F2和序

列27所示的反向引物09R组成。所述引物组10可由序列28所示的正向引物10F1、序列29所示的正向引物10F2和序列30所示的反向引物10R组成。所述引物组11可由序列31所示的正向引物11F1、序列32所示的正向引物11F2和序列33所示的反向引物11R组成。所述引物组12可由序列34所示的正向引物12F1、序列35所示的正向引物12F2和序列36所示的反向引物12R组成。所述引物组13可由序列37所示的正向引物13F1、序列38所示的正向引物13F2和序列39所示的反向引物13R组成。所述引物组14可由序列40所示的正向引物14F1、序列41所示的正向引物14F2和序列42所示的反向引物14R组成。所述引物组15可由序列43所示的正向引物15F1、序列44所示的正向引物15F2和序列45所示的反向引物15R组成。所述引物组16可由序列46所示的正向引物16F1、序列47所示的正向引物16F2和序列48所示的反向引物16R组成。所述引物组17可由序列49所示的正向引物17F1、序列50所示的正向引物17F2和序列51所示的反向引物17R组成。所述引物组18可由序列52所示的正向引物18F1、序列53所示的正向引物18F2和序列54所示的反向引物18R组成。所述引物组19可由序列55所示的正向引物19F1、序列56所示的正向引物19F2和序列57所示的反向引物19R组成。所述引物组20可由序列58所示的正向引物20F1、序列59所示的正向引物20F2和序列60所示的反向引物20R组成。所述引物组21可由序列61所示的正向引物21F1、序列62所示的正向引物21F2和序列63所示的反向引物21R组成。所述引物组22可由序列64所示的正向引物22F1、序列65所示的正向引物22F2和序列66所示的反向引物22R组成。所述引物组23可由序列67所示的正向引物23F1、序列68所示的正向引物23F2和序列69所示的反向引物23R组成。所述引物组24可由序列70所示的正向引物24F1、序列71所示的正向引物24F2和序列72所示的反向引物24R组成。所述引物组25可由序列73所示的正向引物25F1、序列74所示的正向引物25F2和序列75所示的反向引物25R组成。所述引物组26可由序列76所示的正向引物26F1、序列77所示的正向引物26F2和序列78所示的反向引物26R组成。所述引物组27可由序列79所示的正向引物27F1、序列80所示的正向引物27F2和序列81所示的反向引物27R组成。所述引物组28可由序列82所示的正向引物28F1、序列83所示的正向引物28F2和序列84所示的反向引物28R组成。所述引物组29可由序列85所示的正向引物29F1、序列86所示的正向引物29F2和序列87所示的反向引物29R组成。所述引物组30可由序列88所示的正向引物30F1、序列89所示的正向引物30F2和序列90所示的反向引物30R组成。所述引物组31可由序列91所示的正向引物31F1、序列92所示的正向引物31F2和序列93所示的反向引物31R组成。所述引物组32可由序列94所示的正向引物32F1、序列95所示的正向引物32F2和序列96所示的反向引物32R组成。

[0010] 所述SNP引物组合中,所述引物组1可由序列1自5'末端起第22至54位所示的正向引物01F1、序列2自5'末端起第22至53位所示的正向引物01F2和序列3所示的反向引物01R组成。所述引物组2可由序列4自5'末端起第22至54位所示的正向引物02F1、序列5自5'末端起第22至52位所示的正向引物02F2和序列6所示的反向引物02R组成。所述引物组3可由序列7自5'末端起第22至49位所示的正向引物03F1、序列8自5'末端起第22至48位所示的正向引物03F2和序列9所示的反向引物03R组成。所述引物组4可由序列10自5'末端起第22至46位所示的正向引物04F1、序列11自5'末端起第22至46位所示的正向引物04F2和序列12所示的反向引物04R组成。所述引物组5可由序列13自5'末端起第22至51位所示的正向引物05F1、序列14自5'末端起第22至49位所示的正向引物05F2和序列15所示的反向引物05R组成。所述引物组6可由序列16自5'末端起第22至48位所示的正向引物06F1、序列17自5'末端

起第22至47位所示的正向引物06F2和序列18所示的反向引物06R组成。所述引物组7可由序列19自5'末端起第22至51位所示的正向引物07F1、序列20自5'末端起第22至51位所示的正向引物07F2和序列21所示的反向引物07R组成。所述引物组8可由序列22自5'末端起第22至46位所示的正向引物08F1、序列23自5'末端起第22至48位所示的正向引物08F2和序列24所示的反向引物08R组成。所述引物组9可由序列25自5'末端起第22至43位所示的正向引物09F1、序列26自5'末端起第22至44位所示的正向引物09F2和序列27所示的反向引物09R组成。所述引物组10可由序列28自5'末端起第22至48位所示的正向引物10F1、序列29自5'末端起第22至49位所示的正向引物10F2和序列30所示的反向引物10R组成。所述引物组11可由序列31自5'末端起第22至54位所示的正向引物11F1、序列32自5'末端起第22至54位所示的正向引物11F2和序列33所示的反向引物11R组成。所述引物组12可由序列34自5'末端起第22至46位所示的正向引物12F1、序列35自5'末端起第22至48位所示的正向引物12F2和序列36所示的反向引物12R组成。所述引物组13可由序列37自5'末端起第22至51位所示的正向引物13F1、序列38自5'末端起第22至49位所示的正向引物13F2和序列39所示的反向引物13R组成。所述引物组14可由序列40自5'末端起第22至46位所示的正向引物14F1、序列41自5'末端起第22至46位所示的正向引物14F2和序列42所示的反向引物14R组成。所述引物组15可由序列43自5'末端起第22至48位所示的正向引物15F1、序列44自5'末端起第22至48位所示的正向引物15F2和序列45所示的反向引物15R组成。所述引物组16可由序列46自5'末端起第22至48位所示的正向引物16F1、序列47自5'末端起第22至49位所示的正向引物16F2和序列48所示的反向引物16R组成。所述引物组17可由序列49自5'末端起第22至54位所示的正向引物17F1、序列50自5'末端起第22至54位所示的正向引物17F2和序列51所示的反向引物17R组成。所述引物组18可由序列52自5'末端起第22至46位所示的正向引物18F1、序列53自5'末端起第22至48位所示的正向引物18F2和序列54所示的反向引物18R组成。所述引物组19可由序列55自5'末端起第22至46位所示的正向引物19F1、序列56自5'末端起第22至44位所示的正向引物19F2和序列57所示的反向引物19R组成。所述引物组20可由序列58自5'末端起第22至46位所示的正向引物20F1、序列59自5'末端起第22至47位所示的正向引物20F2和序列60所示的反向引物20R组成。所述引物组21可由序列61自5'末端起第22至46位所示的正向引物21F1、序列62自5'末端起第22至47位所示的正向引物21F2和序列63所示的反向引物21R组成。所述引物组22可由序列64自5'末端起第22至51位所示的正向引物22F1、序列65自5'末端起第22至50位所示的正向引物22F2和序列66所示的反向引物22R组成。所述引物组23可由序列67自5'末端起第22至47位所示的正向引物23F1、序列68自5'末端起第22至50位所示的正向引物23F2和序列69所示的反向引物23R组成。所述引物组24可由序列70自5'末端起第22至51位所示的正向引物24F1、序列71自5'末端起第22至50位所示的正向引物24F2和序列72所示的反向引物24R组成。所述引物组25可由序列73自5'末端起第22至51位所示的正向引物25F1、序列74自5'末端起第22至49位所示的正向引物25F2和序列75所示的反向引物25R组成。所述引物组26可由序列76自5'末端起第22至52位所示的正向引物26F1、序列77自5'末端起第22至52位所示的正向引物26F2和序列78所示的反向引物26R组成。所述引物组27可由序列79自5'末端起第22至46位所示的正向引物27F1、序列80自5'末端起第22至45位所示的正向引物27F2和序列81所示的反向引物27R组成。所述引物组28可由序列82自5'末端起第22至56位所示的正向引物28F1、序列83自5'末端起第22至56位所示

的正向引物28F2和序列84所示的反向引物28R组成。所述引物组29可由序列85自5'末端起第22至48位所示的正向引物29F1、序列86自5'末端起第22至49位所示的正向引物29F2和序列87所示的反向引物29R组成。所述引物组30可由序列88自5'末端起第22至45位所示的正向引物30F1、序列89自5'末端起第22至44位所示的正向引物30F2和序列90所示的反向引物30R组成。所述引物组31可由序列91自5'末端起第22至46位所示的正向引物31F1、序列92自5'末端起第22至47位所示的正向引物31F2和序列93所示的反向引物31R组成。所述引物组32可由序列94自5'末端起第22至47位所示的正向引物32F1、序列95自5'末端起第22至48位所示的正向引物32F2和序列96所示的反向引物32R组成。

[0011] 上述任一所述引物组中,名称中含有“F1”的引物、名称中含有“F2”的引物和名称中含有“R”的引物的摩尔比具体可为2:2:5。

[0012] 上述任一所述SNP引物组合具体可由所述引物组1、所述引物组2、所述引物组3、所述引物组4、所述引物组5、所述引物组6、所述引物组7、所述引物组8、所述引物组9、所述引物组10、所述引物组11、所述引物组12、所述引物组13、所述引物组14、所述引物组15、所述引物组16、所述引物组17、所述引物组18、所述引物组19、所述引物组20、所述引物组21、所述引物组22、所述引物组23、所述引物组24、所述引物组25、所述引物组26、所述引物组27、所述引物组28、所述引物组29、所述引物组30、所述引物组31和所述引物组32组成。

[0013] 上文中,序列表中序列1自5'末端起第1至21位所示的核苷酸序列为荧光标签序列(即FAM荧光标签序列),荧光信号具体为蓝色。序列表中序列2自5'末端起第1至21位所示的核苷酸序列也为荧光标签序列(即HEX荧光标签序列),荧光信号具体为红色。

[0014] 含有上述任一所述SNP引物组合的试剂盒也属于本发明的保护范围。

[0015] 所述试剂盒的制备方法也属于本发明的保护范围。所述试剂盒的制备方法包括将上述任一所述引物组中的各条引物分别单独包装的步骤。

[0016] 所述试剂盒的应用也属于本发明的保护范围。所述试剂盒的应用可为x3)或x4): x3) 鉴定甜瓜品种;x4) 鉴别甜瓜品种真伪性。

[0017] 上述任一所述SNP位点组合或上述任一所述SNP引物组合的应用,可为x1)至x4)中的任一种:x1) 制备用于鉴定甜瓜品种的试剂盒;x2) 制备用于鉴别甜瓜品种真伪性的试剂盒;x3) 鉴定甜瓜品种;x4) 鉴别甜瓜品种真伪性。

[0018] 本发明还保护一种鉴定待测甜瓜属于157个甜瓜品种中哪个品种的方法,可包括如下步骤:分别检测待测甜瓜和157个甜瓜品种基于所述32个SNP位点的基因型,然后进行如下判断:如果待测甜瓜基于所述32个SNP位点的基因型和157个甜瓜品种中某品种基于所述32个SNP位点的基因型完全一致,则待测甜瓜与该甜瓜品种属于同一个品种;如果待测甜瓜基于所述32个SNP位点的基因型和157个甜瓜品种中各个品种基于所述32个SNP位点的基因型均不一致,则待测甜瓜与157个甜瓜品种的品种均不相同。

[0019] 上述方法中,所述“检测待测甜瓜和157个甜瓜品种基于所述32个SNP位点的基因型”的步骤可如下:

[0020] (1) 分别以待测甜瓜的基因组DNA和157个甜瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用上述任一所述SNP引物组合中引物组的进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;

[0021] (2) 完成步骤(1)后,采用仪器检测PCR扩增产物的荧光信号,根据荧光信号的颜色获得待测甜瓜和157个甜瓜品种基于所述32个SNP位点的基因型。

[0022] 上述方法中,所述“检测检测待测甜瓜和157个甜瓜品种基于所述32个SNP位点的基因型”的步骤可如下:

[0023] (1) 分别以待测甜瓜的基因组DNA和157个甜瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用上述任一所述SNP引物组合中引物组的进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;

[0024] (2) 取步骤(1)得到的PCR扩增产物,测序;

[0025] (3) 根据步骤(2)得到的测序结果,获得待测甜瓜和157个甜瓜品种基于所述32个SNP位点的基因型。

[0026] 本发明还保护一种鉴定待测甜瓜属于157个甜瓜品种中哪个品种的方法,可包括如下步骤:

[0027] (1) 以待测甜瓜的基因组DNA为模板,分别采用上述任一所述SNP引物组合中引物组的进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;以标准甜瓜品种群中的各个甜瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用上述任一所述SNP引物组合中引物组的进行PCR扩增,得到PCR扩增产物;所述标准甜瓜品种群由157个甜瓜品种组成;

[0028] (2) 将待测甜瓜得到的各个PCR扩增产物与每个标准甜瓜品种对应的PCR扩增产物进行聚类分析,聚类分析中待测甜瓜与哪个标准甜瓜品种为同一类,该待测甜瓜与该标准甜瓜品种即属于同一个品种。

[0029] 上述任一所述的方法中,157个甜瓜品种可为春棚5号、京蜜10号、京蜜11号、京蜜15号、京蜜7号、京蜜8号、久久红、蜜脆香园、一特白、一特金、早熟一春、京玉5号F1、京玉10F1、京玉2008F1、京玉280F1、京玉2号杂交一代、京玉357F1、京玉白流星杂交一代、京玉黄流星杂交一代、京玉绿宝F1、京玉墨宝F1、京玉三号、京玉四号F1、京玉羊角酥杂交一代、京玉月亮F1、京御蜜28、骄傲、京域香帅F1、甜冠三号F1、甜冠一号F1、甜蜜蜜F1、玉美人F1、Ames 13271、Ames 26809、Ames 26810、Ames 29539、Ames 29551、Hxle's Bese、NSL 34600、NSL 5648、NSL 60241、PI 116489、PI 123188、PI 125865、PI 177347、PI 315410、PI 378169、PI 446928、PI 532841、PI 618848、PI-164569、小花道、无棱洋酥瓜、青旦子、脆菜瓜、荆州八方、白梨瓜、湘西黄金瓜、白沙蜜、江苏三叶瓜、看瓜、白玉满堂、慈溪菜瓜、翠雪5号、东方蜜1号、东之星、丰甜7号、丰甜七号、丰甜一号、甘肃白兰瓜、花脆、江淮蜜一号、金蜜龙、景甜208、热瓜旦子、日本甜宝、西薄洛托、西周蜜25号、西洲密25号、香华、小白瓜、新辉、新世纪、伊莉莎白、玉红、中甜2号、恰尔可洪、金太郎、刘金瓜、鲁甜二号、羊角蜜、十条鲜、M16002、RX-14-3、RX-99、芭苏317、白云、创研脆脆甜、慈脆2号、翠甜1号、东方花脆、鄂甜瓜5号、丰蜜29、风味4号、风味5号、红佳、红绿早脆、红酥手1401、红酥手1402、红优、红玉脆、黄冠、黄晶玉、黄皮9818、江淮蜜7号、江淮蜜二号、江淮蜜六号、江淮蜜三号、金橙、金龙、金露三号、金玉、久红瑞、久青蜜、蜜丰一号、墨香玉、青酥、瑞雪8号、世纪蜜、甜香玉、香瑞301、香瑞一号、香山雪蜜、新红心脆、鑫橙香、雪里红、雪甜一号、银露一号、甬甜5号、甬甜7号、甬甜8号、甬越1号、玉露一号、玉如意、众天5号、众天7号、众天8号、众天翠宝、众天翠雪、众云20、贮冠、土棱沟金瓜、网纹甜瓜、IVF192、中蜜198、IVF117和赤子牛。

[0030] 上述任一所述的方法中,“分别采用上述任一所述SNP引物组合中引物组的进行PCR扩增”的反应程序具体可为:94℃预变性,15min;94℃变性20s,61℃-55℃(选用touch down程序,每循环降低0.6℃),1min,扩增10个循环;94℃变性20s,55℃复性&延伸1min,继续扩增26个循环。若PCR扩增结束后荧光信号弱,影响数据分析,可以加循环(94℃变性20s,

55℃复性及延伸1min,5个循环),直至结果满意为止。

[0031] 本发明建立了基于高通量测序鉴定甜瓜品种真实性的DNA指纹数据库,可用于对甜瓜品种在种子或幼苗期进行早期鉴定,保证品种的真实性,切实保护生产者和育种家的权益,并为甜瓜种质资源和新品种保护提供技术支持。本发明提供的方法既可以对未知甜瓜品种进行鉴定,也可以对已知品种的真实性进行鉴定。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、物力等有点,具有十分广阔的应用前景。

附图说明

[0032] 图1为建立在32个SNP引物组上的157个供试甜瓜品种的聚类图。

[0033] 图2为SNP标记个数(即SNP位点个数)与区分157个供试甜瓜品种的关系图。

[0034] 图3为32个引物组在部分供试甜瓜品种中的SNP分型效果。

具体实施方式

[0035] 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。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0036] 实施例1、用于鉴定甜瓜品种真实性的引物组合的获得

[0037] 一、32个SNP位点的发现

[0038] 本发明基于20份甜瓜代表资源的重测序数据,获得32个SNP位点。这20份甜瓜资源类型丰富,涵盖厚皮甜瓜(8份)、薄皮甜瓜(7份)、野生甜瓜(1份)以及中间型(4份),基本包括了甜瓜主要的生态类型,在生育期、果形、果色、果纹、瓢色等农艺性状方面具有较高的遗传多样性,尽可能多地体现了种质代表性。具体的,SNP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50bp序列保守(无InDel,无SSR,无其它SNP)的SNP位点。32个SNP位点的基本信息详见表1中第1至4列。其中SNP位点在染色体上的位置是基于甜瓜DHL92参考基因组序列比对确定的,所述甜瓜DHL92参考基因组序列的版本号为V3.6.1(下载地址为:<ftp://cucurbitgenomics.org/pub/cucurbit/genome/melon/v3.6.1/>)。

[0039] 表1. 32个SNP位点的基本信息

[0040]

SNP 位点的名称	所在染色体	在染色体上的位置	碱基类型 (ref/alt)	PIC
MeSNP01	Chr1	1382511	C/A	0.500
MeSNP02	Chr1	4793379	T/C	0.445
MeSNP03	Chr1	23711547	A/G	0.490
MeSNP04	Chr2	1937599	G/C	0.499
MeSNP05	Chr2	8393441	A/G	0.496
MeSNP06	Chr3	342407	G/A	0.495
MeSNP07	Chr3	7279267	T/A	0.466
MeSNP08	Chr3	16629736	G/A	0.498
MeSNP09	Chr3	17337108	G/A	0.427
MeSNP10	Chr4	2457507	G/A	0.422
MeSNP11	Chr4	16923749	C/T	0.413
MeSNP12	Chr4	23822623	C/T	0.500
MeSNP13	Chr5	428537	G/A	0.479
MeSNP14	Chr5	16951407	A/T	0.499

[0041]

MeSNP15	Chr6	12568938	T/C	0.497
MeSNP16	Chr7	118327	T/G	0.500
MeSNP17	Chr8	176762	G/A	0.398
MeSNP18	Chr8	26184976	T/C	0.497
MeSNP19	Chr9	9115133	C/T	0.462
MeSNP20	Chr9	19237576	G/A	0.496
MeSNP21	Chr9	21606061	G/A	0.493
MeSNP22	Chr10	57887	C/A	0.427
MeSNP23	Chr10	13346032	C/T	0.218
MeSNP24	Chr10	18145244	T/G	0.495
MeSNP25	Chr11	228130	T/C	0.380
MeSNP26	Chr11	3987092	T/A	0.464
MeSNP27	Chr11	20770253	T/C	0.414
MeSNP28	Chr11	30655566	T/G	0.464
MeSNP29	Chr12	1189283	T/C	0.499
MeSNP30	Chr12	3196136	A/G	0.500
MeSNP31	Chr12	5745821	G/A	0.445
MeSNP32	Chr12	12366462	C/A	0.490

[0042] 二、用于鉴定甜瓜品种真实性的引物组合的获得

[0043] 根据步骤一发现的32个SNP位点,开发出具有较高的多态性信息量(PIC值)(见表1中第5列)且适合用等位基因竞争性特异PCR法鉴定甜瓜品种真实性的引物组合。

[0044] SNP引物组合由32个引物组组成,每个引物组的名称见表2中第2列。每个引物组由3条引物序列组成,用于扩增一个SNP位点。32个引物组中各个引物的核苷酸序列如表2中第4列所示。

[0045] 表2

[0046]

用于扩 增的 SNP 位 点	引物组名 称	引物名称	引物的核苷酸序列 (5'-3') 及其在序列表中的位置
MeSNP01	引物组 01	正向引物 01F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGACCTAATTTATTGCATAATAATTCATATACA</u> (序列 1)
		正向引物 01F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACCTAATTTATTGCATAATAATTCATATACC</u> (序列 2)
		反向引物 01R	GAAAAAGAAAAAGAATGATAAATAAGGTAGGATTA (序列 3)
MeSNP02	引物组 02	正向引物 02F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAATACTTTCTGATAGAAATTAACCTAGAGAAA</u> (序列 4)
		正向引物 02F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATACTTTCTGATAGAAATTAACCTAGAGAAG</u> (序列 5)
		反向引物 02R	GCTTCTCCACAAGGAACTAAGTCCAT (序列 6)
MeSNP03	引物组 03	正向引物 03F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAACATGTGGACTAATTCAGTCAAATGT</u> (序列 7)
		正向引物 03F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAACATGTGGACTAATTCAGTCAAATGC</u> (序列 8)
		反向引物 03R	GTAGGTCGATAGTATAGAATAAAAAGAAGGCG (序列 9)
MeSNP04	引物组 04	正向引物 04F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGATCTGGAAATGCTGGAATCACC</u> (序列 10)

[0047]

		正向引物 04F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGATCTGGAAATGCTGGAATCACG</u> (序列 11)
		反向引物 04R	GGTTATCATATGTTTTATATTTTCCAGAATGAT (序列 12)
MeSNP05	引物组 05	正向引物 05F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCGATTGAGTTAAAGAATTGGGATTGATA</u> (序列 13)
		正向引物 05F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCGATTGAGTTAAAGAATTGGGATTGATG</u> (序列 14)
		反向引物 05R	GGATCAAAAGTAACTATCTAAAGAACAAAATAAA (序列 15)
MeSNP06	引物组 06	正向引物 06F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTAGTTTCCAATTTGGATCATCTAGGA</u> (序列 16)
		正向引物 06F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGTTTCCAATTTGGATCATCTAGGG</u> (序列 17)
		反向引物 06R	CATCTAGGATAACTAATTAATTGTTCTTTAAATA (序列 18)
MeSNP07	引物组 07	正向引物 07F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTAAAAAGGTTGAAATGGACGTCGTTTTA</u> (序列 19)
		正向引物 07F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTAAAAAGGTTGAAATGGACGTCGTTTTT</u> (序列 20)
		反向引物 07R	CCAAATTGTATTAGTTTTTCGTAATAAATTTCCAAT (序列 21)
MeSNP08	引物组 08	正向引物 08F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGAACCAATAGCACATAATGGCCG</u> (序列 22)
		正向引物 08F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATGAACCAATAGCACATAATGGCCA</u> (序列 23)
		反向引物 08R	GCAGTCTCTTTCAGAATATCCAATACCTTT (序列 24)
MeSNP09	引物组 09	正向引物 09F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTATCCACCGGTCTTACCCTG</u> (序列 25)
		正向引物 09F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTTATCCACCGGTCTTACCCTA</u> (序列 26)
		反向引物 09R	TATCGTTGGTTCAATATGCCTCCCATTT (序列 27)
MeSNP10	引物组 10	正向引物 10F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAAGATGC</u> (序列 28)
		正向引物 10F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAGATGT</u> (序列 29)
		反向引物 10R	GCCGATTGATTTAAGAGAGAAATCCCA (序列 30)
MeSNP11	引物组 11	正向引物 11F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTTAATTCAAAAGAGCTCAAAAATATTGAAAC</u> (序列 31)
		正向引物 11F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTTAATTCAAAAGAGCTCAAAAATATTGAAAT</u> (序列 32)
		反向引物 11R	CTAACCAACCAATCCTTATAGACTTAAT (序列 33)
MeSNP12	引物组 12	正向引物 12F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTTTATCAGTGAAACATGAAACGG</u> (序列 34)
		正向引物 12F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGTTTTATCAGTGAAACATGAAACGA</u> (序列 35)
		反向引物 12R	TCCAGGATTATGAAAATACAATAAAATAAATTCTAG (序列 36)
MeSNP13	引物组 13	正向引物 13F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATGTAATATCCTCAATGTCTTACATCTCAT</u> (序列 37)

[0048]

		正向引物 13F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTAATATCCTCAATGTCTTACATCTCAC</u> (序列 38)
		反向引物 13R	GTATGATATTCGAGCGTATTGGTAGTAT(序列 39)
MeSNP14	引物组 14	正向引物 14F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCATTGTTGTGCATTCTTGGATCA</u> (序列 40)
		正向引物 14F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCATTGTTGTGCATTCTTGGATCT</u> (序列 41)
		反向引物 14R	CTCAACAACCTTTCCCTAACTTGTAAG(序列 42)
MeSNP15	引物组 15	正向引物 15F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTAAGAGCAAAATTTCCAATGTGTAA</u> (序列 43)
		正向引物 15F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTAAGAGCAAAATTTCCAATGTGTAG</u> (序列 44)
		反向引物 15R	TTTGGCTTCATAAAAGGAAGTGAATAGTA(序列 45)
MeSNP16	引物组 16	正向引物 16F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCGCTTACCTCACATGATTATGATTC</u> (序列 46)
		正向引物 16F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCGCTTACCTCACATGATTATGATTA</u> (序列 47)
		反向引物 16R	CGCAACAATTTGAATTACACCAACGAAAT(序列 48)
MeSNP17	引物组 17	正向引物 17F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAGTTCAATTGGCAATAAAATAAATAAGGATG</u> (序列 49)
		正向引物 17F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTAGTTCAATTGGCAATAAAATAAATAAGGATA</u> (序列 50)
		反向引物 17R	ACACACCTAGTCAAAATTTACTATATTTATGCAA(序列 51)
MeSNP18	引物组 18	正向引物 18F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTAAATGTTCAACCTTTGCCGACGC</u> (序列 52)
		正向引物 18F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTTAAATGTTCAACCTTTGCCGACGT</u> (序列 53)
		反向引物 18R	GATCGACCTTTTGCCGACATTGCTTT(序列 54)
MeSNP19	引物组 19	正向引物 19F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACACGTCATGACCTAAGCATGTCT</u> (序列 55)
		正向引物 19F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACGTCATGACCTAAGCATGTCC</u> (序列 56)
		反向引物 19R	GTCCCCCTCGTTATCGTTACATATAT(序列 57)
MeSNP20	引物组 20	正向引物 20F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTTGCCATTGTTAGTTCTGTCTGC</u> (序列 58)
		正向引物 20F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTGGCATTGTTAGTTCTGTCTGT</u> (序列 59)
		反向引物 20R	CAATTTTTCCTAAAGGGTTATCGTCAGTA(序列 60)
MeSNP21	引物组 21	正向引物 21F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTTGTGTTTGTGAGATCAACGCC</u> (序列 61)
		正向引物 21F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGTTTGTGTTTGTGAGATCAACGCT</u> (序列 62)
		反向引物 21R	GTGGAGGTGATTTGGACCATCTTATAA(序列 63)
MeSNP22	引物组 22	正向引物 22F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCCTACCGCATATAAAATATTGAAGAAAAA</u> (序列 64)

[0049]

		正向引物 22F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTACCGCATATAAAATATTGAAGAAAAC</u> (序列 65)
		反向引物 22R	GTATACCAATCTAAACCACCAATATCTGAAT (序列 66)
MeSNP23	引物组 23	正向引物 23F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACAAAAGTAGAAAGAGAAGGTAAAC</u> (序列 67)
		正向引物 23F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATAGACAAAAGTAGAAAGAGAAGGTAAAT</u> (序列 68)
		反向引物 23R	GTCAATTTTCAAAACAGCAGTGAAAGTTTTTC (序列 69)
MeSNP24	引物组 24	正向引物 24F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTGGGAAAGTTTTAGTAATAGGTAGTTT</u> (序列 70)
		正向引物 24F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTGGGAAAGTTTTAGTAATAGGTAGTTG</u> (序列 71)
		反向引物 24R	CAACAAAACCTCTTCCCCACCGTTAA (序列 72)
MeSNP25	引物组 25	正向引物 25F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAATCGCTCGTTACCTTATTTCTCAAAAAA</u> (序列 73)
		正向引物 25F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCGCTCGTTACCTTATTTCTCAAAAAG</u> (序列 74)
		反向引物 25R	TTTCATTTCTTCTGGACTCAATTGCAATTATA (序列 75)
MeSNP26	引物组 26	正向引物 26F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAAAAGAAATGGCAGAATATGATATAAGATA</u> (序列 76)
		正向引物 26F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAAAGAAATGGCAGAATATGATATAAGATT</u> (序列 77)
		反向引物 26R	GTACTACATACATATCCACACTATCATCATAA (序列 78)
MeSNP27	引物组 27	正向引物 27F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGACAAGAAACCAAGATTCCGCTA</u> (序列 79)
		正向引物 27F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACAAGAAACCAAGATTCCGCTG</u> (序列 80)
		反向引物 27R	CAACGAAATCAAGGATGGATTCTCAATTTAA (序列 81)
MeSNP28	引物组 28	正向引物 28F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTGATATATTGTTATACTTATAAATATTTTCAT</u> (序列 82)
		正向引物 28F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAATTGATATATTGTTATACTTATAAATATTTTCAG</u> (序列 83)
		反向引物 28R	CATATAAAATATAGTTGCACGTACTGTTCTAAG (序列 84)
MeSNP29	引物组 29	正向引物 29F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGAGGTCATATCATAACCTACAATACC</u> (序列 85)
		正向引物 29F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTGAGGTCATATCATAACCTACAATACT</u> (序列 86)
		反向引物 29R	ATCATATCTATCTACATCTCTGAATTTGACATAT (序列 87)
MeSNP30	引物组 30	正向引物 30F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTTCGGGACCTTAATTAAGGCCAT</u> (序列 88)
		正向引物 30F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCGGGACCTTAATTAAGGCCAC</u> (序列 89)
		反向引物 30R	TCGGACACAATTACCATTCATTATATTTC (序列 90)
MeSNP31	引物组 31	正向引物 31F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTAAACAAATCTCCATTAATCGCC</u> (序列 91)

[0050]

MeSNP32	引物组 32	正向引物 31F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGCTAAACAAATCTCCATTAATCGCT</u> (序列 92)
		反向引物 31R	CTGTTGGACTGTCATAGGTTTGTAAAGT(序列 93)
		正向引物 32F1	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAGTGAGCTAATTTACTCATTGTTTC</u> (序列 94)
		正向引物 32F2	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAGTGAGCTAATTTACTCATTGTTTA</u> (序列 95)
		反向引物 32R	CTTAAACTCCTTTAGGGATGCTAAGATG(序列 96)

[0051] 注:单下划线为FAM荧光标签序列,双下划线为HEX荧光标签序列。

[0052] 实施例2、实施例1开发的引物组合的有效性检验

[0053] 本实施例中的157个供试甜瓜品种的基本信息见表3。157个供试甜瓜品种均为常见的优良品种或部分国外引进品种。

[0054] 表3. 157个供试甜瓜品种的基本信息

[0055]

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
TG01	春棚 5 号	市场购买	TG80	香华	市场购买
TG02	京蜜 10 号	市场购买	TG81	小白瓜	市场购买
TG03	京蜜 11 号	市场购买	TG82	新辉	市场购买
TG04	京蜜 15 号	市场购买	TG83	新世纪	市场购买
TG05	京蜜 7 号	市场购买	TG84	伊莉莎白	市场购买
TG06	京蜜 8 号	市场购买	TG85	玉红	市场购买
TG07	久久红	市场购买	TG86	中甜 2 号	市场购买
TG08	蜜脆香园	市场购买	TG87	恰尔可洪	蔬菜中心种质库
TG09	一特白	市场购买	TG88	金太郎	蔬菜中心种质库
TG10	一特金	市场购买	TG89	刘金瓜	蔬菜中心种质库
TG11	早熟一春	市场购买	TG90	鲁甜二号	蔬菜中心种质库
TG12	京玉 5 号 F1	市场购买	TG91	羊角蜜	蔬菜中心种质库
TG13	京玉 10 F1	市场购买	TG92	十条鲜	蔬菜中心种质库
TG14	京玉 2008 F1	市场购买	TG93	M16002	市场购买
TG15	京玉 280 F1	市场购买	TG94	RX-14-3	市场购买
TG16	京玉 2 号 杂交一代	市场购买	TG95	RX-99	市场购买
TG17	京玉 357 F1	市场购买	TG96	芭苏 317	市场购买
TG18	京玉白流星 杂交一代	市场购买	TG97	白云	市场购买
TG19	京玉黄流星 杂交一代	市场购买	TG98	创研脆脆甜	市场购买
TG20	京玉绿宝 F1	市场购买	TG99	慈脆 2 号	市场购买
TG21	京玉墨宝 F1	市场购买	TG100	翠甜 1 号	市场购买
TG22	京玉三号	市场购买	TG101	东方花脆	市场购买
TG23	京玉四号 F1	市场购买	TG102	鄂甜瓜 5 号	市场购买
TG24	京玉羊角酥 杂交一代	市场购买	TG103	丰蜜 29	市场购买
TG25	京玉月亮 F1	市场购买	TG104	风味 4 号	市场购买
TG26	京御蜜 28	市场购买	TG105	风味 5 号	市场购买
TG27	骄傲	市场购买	TG106	红佳	市场购买
TG28	京域香帅 F1	市场购买	TG107	红绿早脆	市场购买
TG29	甜冠三号 F1	市场购买	TG108	红酥手 1401	市场购买
TG30	甜冠一号 F1	市场购买	TG109	红酥手 1402	市场购买
TG31	甜蜜蜜 F1	市场购买	TG110	红优	市场购买

[0056]

TG32	玉美人 F1	市场购买	TG111	红玉脆	市场购买
TG33	Ames 13271	国外引种	TG112	黄冠	市场购买
TG34	Ames 26809	国外引种	TG113	黄晶玉	市场购买
TG35	Ames 26810	国外引种	TG114	黄皮 9818	市场购买
TG36	Ames 29539	国外引种	TG115	江淮蜜 7 号	市场购买
TG37	Ames 29551	国外引种	TG116	江淮蜜二号	市场购买
TG38	Hxle' s Bese	国外引种	TG117	江淮蜜六号	市场购买
TG39	NSL 34600	国外引种	TG118	江淮蜜三号	市场购买
TG40	NSL 5648	国外引种	TG119	金橙	市场购买
TG41	NSL 60241	国外引种	TG120	金龙	市场购买
TG42	PI 116489	国外引种	TG121	金露三号	市场购买
TG43	PI 123188	国外引种	TG122	金玉	市场购买
TG44	PI 125865	国外引种	TG123	久红瑞	市场购买
TG45	PI 177347	国外引种	TG124	久青蜜	市场购买
TG46	PI 315410	国外引种	TG125	蜜丰一号	市场购买
TG47	PI 378169	国外引种	TG126	墨香玉	市场购买
TG48	PI 446928	国外引种	TG127	青酥	市场购买
TG49	PI 532841	国外引种	TG128	瑞雪 8 号	市场购买
TG50	PI 618848	国外引种	TG129	世纪蜜	市场购买
TG51	PI-164569	国外引种	TG130	甜香玉	市场购买
TG52	小花道	蔬菜中心种质库	TG131	香瑞 301	市场购买
TG53	无棱洋酥瓜	蔬菜中心种质库	TG132	香瑞一号	市场购买
TG54	青旦子	蔬菜中心种质库	TG133	香山雪蜜	市场购买
TG55	脆菜瓜	蔬菜中心种质库	TG134	新红心脆	市场购买
TG56	荆州八方	蔬菜中心种质库	TG135	鑫橙香	市场购买
TG57	白梨瓜	蔬菜中心种质库	TG136	雪里红	市场购买
TG58	湘西黄金瓜	蔬菜中心种质库	TG137	雪甜一号	市场购买
TG59	白沙蜜	蔬菜中心种质库	TG138	银露一号	市场购买
TG60	江苏三叶瓜	蔬菜中心种质库	TG139	甬甜 5 号	市场购买
TG61	看瓜	蔬菜中心种质库	TG140	甬甜 7 号	市场购买
TG62	白玉满堂	市场购买	TG141	甬甜 8 号	市场购买
TG63	慈溪菜瓜	市场购买	TG142	甬越 1 号	市场购买
TG64	翠雪 5 号	市场购买	TG143	玉露一号	市场购买
TG65	东方蜜 1 号	市场购买	TG144	玉如意	市场购买
TG66	东之星	市场购买	TG145	众天 5 号	市场购买
TG67	丰甜 7 号	市场购买	TG146	众天 7 号	市场购买
TG68	丰甜七号	市场购买	TG147	众天 8 号	市场购买
TG69	丰甜一号	市场购买	TG148	众天翠宝	市场购买
TG70	甘肃白兰瓜	市场购买	TG149	众天翠雪	市场购买
TG71	花脆	市场购买	TG150	众云 20	市场购买
TG72	江淮蜜一号	市场购买	TG151	贮冠	市场购买
TG73	金蜜龙	市场购买	TG152	土棱沟金瓜	蔬菜中心种质库
TG74	景甜 208	市场购买	TG153	网纹甜瓜	蔬菜中心种质库
TG75	热瓜旦子	市场购买	TG154	IVF192	市场购买
TG76	日本甜宝	市场购买	TG155	中蜜 198	市场购买
TG77	西薄洛托	市场购买	TG156	IVF117	市场购买

[0057]

TG78	西周蜜 25 号	市场购买	TG157	赤子牛	市场购买
TG79	西洲密 25 号	市场购买			

[0058] 1、供试甜瓜品种的基因组DNA的获得

[0059] 采用CTAB法分别提取157个供试甜瓜品种的叶片(混取30粒种子的真叶)的基因组DNA,得到供试甜瓜品种的基因组DNA。

[0060] 供试甜瓜品种的基因组DNA的质量和浓度均须满足PCR要求,达标标准为:琼脂糖电泳显示DNA条带单一,没有明显弥散;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;供试甜瓜品种的基因组DNA的浓度在10-30ng/ μ L。

[0061] 2、分别以157个供试甜瓜品种的基因组DNA为模板,分别采用32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“F1”的引物、名称中含有“F2”的引物和名称中含有“R”的引物的浓度比为2:2:5。

[0062] 反应程序为:94℃预变性,15min;94℃变性20s,61℃-55℃(选用touch down程序,每循环降低0.6℃),1min,扩增10个循环;94℃变性20s,55℃复性&延伸1min,继续扩增26个循环。

[0063] 3、完成步骤2后,待PCR扩增产物温度降至40℃以下时通过酶标仪的FAM、HEX光束扫描读取荧光值(FAM荧光标签序列在激发光485nm,发射光520nm波长下观察读值,HEX荧光标签序列在激发光528nm,发射光560nm波长下观察读值),根据荧光信号颜色判断157个供试甜瓜品种基于每个SNP位点的基因型。具体的判断原则如下:如果某供试甜瓜品种基于某SNP位点显示蓝色荧光信号,则该供试甜瓜品种基于该SNP位点的基因型为“扩增该SNP位点且名称中含有“F1”的引物的3'末端第1个碱基的互补碱基”纯合型;如果某供试甜瓜品种基于某SNP位点显示红色荧光信号,则该供试甜瓜品种基于该SNP位点的基因型为“扩增该SNP位点且名称中含有“F2”的引物的3'末端第1个碱基的互补碱基”纯合型;如果某供试甜瓜品种基于某SNP位点显示绿色荧光信号,则该供试甜瓜品种基于该SNP位点的基因型为杂合型,一个碱基为“扩增该SNP位点且名称中含有“F1”的引物的3'末端第1个碱基的互补碱基”,另一个碱基“扩增该SNP位点且名称中含有“F2”的引物的3'末端第1个碱基的互补碱基”。需要说明的是,若PCR扩增结束后荧光信号弱,影响数据分析,可以加循环(94℃变性20s,55℃复性及延伸1min,5个循环),直至结果满意为止。

[0064] 部分结果见图3。结果表明,各个引物组在供试甜瓜品种中可以得到很好的分型效果。

[0065] 4、聚类分析

[0066] 根据157个供试甜瓜品种基于32个SNP位点的基因型,利用MiniMarker和MEGA7软件对157个供试甜瓜品种进行聚类分析。

[0067] 建立在32个引物组上的157个供试甜瓜品种的聚类图如图1所示。结果表明,32个引物组可以完全区分表3中的157个供试甜瓜品种。由此可见,实施例1开发的SNP引物组合可以应用于甜瓜品种DNA指纹数据库构建和品种真实性鉴定。

[0068] 5、效率评价

[0069] 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SNP标记个数(即引物组数)与区分157个供试甜瓜品种区分率的关系。

[0070] 实验结果表明(图2),32个引物组(即32个SNP标记个数)在157个供试甜瓜品种中的区分率达到100%。

- [0001] <110> 北京市农林科学院
- [0002] <120> 一种鉴定甜瓜品种真实性的方法及其专用SNP引物组合
- [0003] <160> 96
- [0004] <170> PatentIn version 3.5
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 54
- [0007] <212> DNA
- [0008] <213> 人工序列
- [0009] <220>
- [0010] <223>
- [0011] <400> 1
- [0012] gaaggtgacc aagttcatgc tcgacctaat ttattgcata ataattcata taca 54
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 53
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <220>
- [0018] <223>
- [0019] <400> 2
- [0020] gaaggtcgga gtcaacggat tgacctaat tattgcataa taattcatat acc 53
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 36
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> 人工序列
- [0025] <220>
- [0026] <223>
- [0027] <400> 3
- [0028] gaaaaagaaa aaagaatgat aaataaggta ggatta 36
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 54
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <220>
- [0034] <223>
- [0035] <400> 4
- [0036] gaaggtgacc aagttcatgc ttaatacttt ctgatagaaa ttaacctaga gaaa 54
- [0037] <210> 5
- [0038] <211> 52

[0039]	<212> DNA
[0040]	<213> 人工序列
[0041]	<220>
[0042]	<223>
[0043]	<400> 5
[0044]	gaaggtcgga gtcaacggat tatactttct gatagaaatt aacctagaga ag 52
[0045]	<210> 6
[0046]	<211> 27
[0047]	<212> DNA
[0048]	<213> 人工序列
[0049]	<220>
[0050]	<223>
[0051]	<400> 6
[0052]	gcttctccac aaggaaacta agtccat 27
[0053]	<210> 7
[0054]	<211> 49
[0055]	<212> DNA
[0056]	<213> 人工序列
[0057]	<220>
[0058]	<223>
[0059]	<400> 7
[0060]	gaaggtgacc aagttcatgc tcaacatgtg gactaattca gtcaaattgt 49
[0061]	<210> 8
[0062]	<211> 48
[0063]	<212> DNA
[0064]	<213> 人工序列
[0065]	<220>
[0066]	<223>
[0067]	<400> 8
[0068]	gaaggtcgga gtcaacggat taacatgtgg actaattcag tcaaattgc 48
[0069]	<210> 9
[0070]	<211> 32
[0071]	<212> DNA
[0072]	<213> 人工序列
[0073]	<220>
[0074]	<223>
[0075]	<400> 9
[0076]	gtaggtcgat agtatagaat aaaaagaagg cg 32
[0077]	<210> 10

[0078]	<211> 46
[0079]	<212> DNA
[0080]	<213> 人工序列
[0081]	<220>
[0082]	<223>
[0083]	<400> 10
[0084]	gaaggtgacc aagttcatgc taagatctgg aaatgctgga atcacc 46
[0085]	<210> 11
[0086]	<211> 46
[0087]	<212> DNA
[0088]	<213> 人工序列
[0089]	<220>
[0090]	<223>
[0091]	<400> 11
[0092]	gaaggtcgga gtcaacggat taagatctgg aaatgctgga atcacg 46
[0093]	<210> 12
[0094]	<211> 35
[0095]	<212> DNA
[0096]	<213> 人工序列
[0097]	<220>
[0098]	<223>
[0099]	<400> 12
[0100]	ggttatcata tgtttttata tttttccaga atgat 35
[0101]	<210> 13
[0102]	<211> 51
[0103]	<212> DNA
[0104]	<213> 人工序列
[0105]	<220>
[0106]	<223>
[0107]	<400> 13
[0108]	gaaggtgacc aagttcatgc tttcgattga gttaaagaat tgggattgat a 51
[0109]	<210> 14
[0110]	<211> 49
[0111]	<212> DNA
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<220>
[0114]	<223>
[0115]	<400> 14
[0116]	gaaggtcgga gtcaacggat tcgattgagt taaagaattg ggattgatg 49

[0117]	<210> 15
[0118]	<211> 35
[0119]	<212> DNA
[0120]	<213> 人工序列
[0121]	<220>
[0122]	<223>
[0123]	<400> 15
[0124]	ggatcaaaag taaactatct aaagaacaaa ataaa 35
[0125]	<210> 16
[0126]	<211> 48
[0127]	<212> DNA
[0128]	<213> 人工序列
[0129]	<220>
[0130]	<223>
[0131]	<400> 16
[0132]	gaaggtgacc aagttcatgc tctagtttcc aatttggatc atctagga 48
[0133]	<210> 17
[0134]	<211> 47
[0135]	<212> DNA
[0136]	<213> 人工序列
[0137]	<220>
[0138]	<223>
[0139]	<400> 17
[0140]	gaaggtcgga gtcaacggat ttagtttcca atttggatca tctaggg 47
[0141]	<210> 18
[0142]	<211> 36
[0143]	<212> DNA
[0144]	<213> 人工序列
[0145]	<220>
[0146]	<223>
[0147]	<400> 18
[0148]	catctaggat aactaactta attgtttctt taaata 36
[0149]	<210> 19
[0150]	<211> 51
[0151]	<212> DNA
[0152]	<213> 人工序列
[0153]	<220>
[0154]	<223>
[0155]	<400> 19

[0156] gaaggtgacc aagttcatgc tttaaaaagg ttgaaaatgg acgtcgtttt a 51
[0157] <210> 20
[0158] <211> 51
[0159] <212> DNA
[0160] <213> 人工序列
[0161] <220>
[0162] <223>
[0163] <400> 20
[0164] gaaggtcgga gtcaacggat tttaaaaagg ttgaaaatgg acgtcgtttt t 51
[0165] <210> 21
[0166] <211> 36
[0167] <212> DNA
[0168] <213> 人工序列
[0169] <220>
[0170] <223>
[0171] <400> 21
[0172] ccaaattgta ttagttttcg taaaataatt tccaat 36
[0173] <210> 22
[0174] <211> 46
[0175] <212> DNA
[0176] <213> 人工序列
[0177] <220>
[0178] <223>
[0179] <400> 22
[0180] gaaggtgacc aagttcatgc ttgaaccaa tagcacataa tggccg 46
[0181] <210> 23
[0182] <211> 48
[0183] <212> DNA
[0184] <213> 人工序列
[0185] <220>
[0186] <223>
[0187] <400> 23
[0188] gaaggtcgga gtcaacggat taatgaacca aatagcacat aatggcca 48
[0189] <210> 24
[0190] <211> 30
[0191] <212> DNA
[0192] <213> 人工序列
[0193] <220>
[0194] <223>

[0195]	<400> 24
[0196]	gcagtctctt tcagaatata caataccttt 30
[0197]	<210> 25
[0198]	<211> 43
[0199]	<212> DNA
[0200]	<213> 人工序列
[0201]	<220>
[0202]	<223>
[0203]	<400> 25
[0204]	gaaggtgacc aagttcatgc tttatccacc cggctcttacc ctg 43
[0205]	<210> 26
[0206]	<211> 44
[0207]	<212> DNA
[0208]	<213> 人工序列
[0209]	<220>
[0210]	<223>
[0211]	<400> 26
[0212]	gaaggtcgga gtcaacggat tgttatccac ccggtcttac ccta 44
[0213]	<210> 27
[0214]	<211> 28
[0215]	<212> DNA
[0216]	<213> 人工序列
[0217]	<220>
[0218]	<223>
[0219]	<400> 27
[0220]	tatcgttggg tcaatatgcc tcccattt 28
[0221]	<210> 28
[0222]	<211> 48
[0223]	<212> DNA
[0224]	<213> 人工序列
[0225]	<220>
[0226]	<223>
[0227]	<400> 28
[0228]	gaaggtgacc aagttcatgc tgaagaagaa gaagaagaag aaagatgc 48
[0229]	<210> 29
[0230]	<211> 49
[0231]	<212> DNA
[0232]	<213> 人工序列
[0233]	<220>

[0234]	<223>
[0235]	<400> 29
[0236]	gaaggtcgga gtcaacggat tagaagaaga agaagaagaa gaaagatgt 49
[0237]	<210> 30
[0238]	<211> 28
[0239]	<212> DNA
[0240]	<213> 人工序列
[0241]	<220>
[0242]	<223>
[0243]	<400> 30
[0244]	gccgattgat ttaagagaga aattccca 28
[0245]	<210> 31
[0246]	<211> 54
[0247]	<212> DNA
[0248]	<213> 人工序列
[0249]	<220>
[0250]	<223>
[0251]	<400> 31
[0252]	gaaggtgacc aagttcatgc tctttaattc aaaagagctc aaaaatattg aaac 54
[0253]	<210> 32
[0254]	<211> 54
[0255]	<212> DNA
[0256]	<213> 人工序列
[0257]	<220>
[0258]	<223>
[0259]	<400> 32
[0260]	gaaggtcgga gtcaacggat tctttaattc aaaagagctc aaaaatattg aaat 54
[0261]	<210> 33
[0262]	<211> 30
[0263]	<212> DNA
[0264]	<213> 人工序列
[0265]	<220>
[0266]	<223>
[0267]	<400> 33
[0268]	ctaaccacaac ccaatcetta tagacttaat 30
[0269]	<210> 34
[0270]	<211> 46
[0271]	<212> DNA
[0272]	<213> 人工序列

[0273]	<220>
[0274]	<223>
[0275]	<400> 34
[0276]	gaaggtgacc aagttcatgc tgttttatca cgtgaacatg aaacgg 46
[0277]	<210> 35
[0278]	<211> 48
[0279]	<212> DNA
[0280]	<213> 人工序列
[0281]	<220>
[0282]	<223>
[0283]	<400> 35
[0284]	gaaggtcgga gtcaacggat ttgtttttat cacgtgaaca tgaaacga 48
[0285]	<210> 36
[0286]	<211> 37
[0287]	<212> DNA
[0288]	<213> 人工序列
[0289]	<220>
[0290]	<223>
[0291]	<400> 36
[0292]	tccaggatta tgaaaataca ataaaaataa attctag 37
[0293]	<210> 37
[0294]	<211> 51
[0295]	<212> DNA
[0296]	<213> 人工序列
[0297]	<220>
[0298]	<223>
[0299]	<400> 37
[0300]	gaaggtgacc aagttcatgc tatgtaatat cctcaatgtc ttacatctca t 51
[0301]	<210> 38
[0302]	<211> 49
[0303]	<212> DNA
[0304]	<213> 人工序列
[0305]	<220>
[0306]	<223>
[0307]	<400> 38
[0308]	gaaggtcgga gtcaacggat tgtaatatcc tcaatgtctt acatctcac 49
[0309]	<210> 39
[0310]	<211> 29
[0311]	<212> DNA

[0312]	<213> 人工序列
[0313]	<220>
[0314]	<223>
[0315]	<400> 39
[0316]	gtatgatatt ccgagcgtat tggtagtat 29
[0317]	<210> 40
[0318]	<211> 46
[0319]	<212> DNA
[0320]	<213> 人工序列
[0321]	<220>
[0322]	<223>
[0323]	<400> 40
[0324]	gaaggtgacc aagttcatgc tgcattgttg tgcattcctt g gatca 46
[0325]	<210> 41
[0326]	<211> 46
[0327]	<212> DNA
[0328]	<213> 人工序列
[0329]	<220>
[0330]	<223>
[0331]	<400> 41
[0332]	gaaggtcgga gtcaacggat tgcattgttg tgcattcctt ggatct 46
[0333]	<210> 42
[0334]	<211> 28
[0335]	<212> DNA
[0336]	<213> 人工序列
[0337]	<220>
[0338]	<223>
[0339]	<400> 42
[0340]	ctcaacaacc tttcccctaa cttgtaaa 28
[0341]	<210> 43
[0342]	<211> 48
[0343]	<212> DNA
[0344]	<213> 人工序列
[0345]	<220>
[0346]	<223>
[0347]	<400> 43
[0348]	gaaggtgacc aagttcatgc tcttaagagc aaaatttcca atgtgtaa 48
[0349]	<210> 44
[0350]	<211> 48

- [0351] <212> DNA
[0352] <213> 人工序列
[0353] <220>
[0354] <223>
[0355] <400> 44
[0356] gaaggtcggg gtcaacggat tcttaagagc aaaatttcca atgtgtag 48
[0357] <210> 45
[0358] <211> 31
[0359] <212> DNA
[0360] <213> 人工序列
[0361] <220>
[0362] <223>
[0363] <400> 45
[0364] tttggcttca taaaaggaac taggaatagt a 31
[0365] <210> 46
[0366] <211> 48
[0367] <212> DNA
[0368] <213> 人工序列
[0369] <220>
[0370] <223>
[0371] <400> 46
[0372] gaaggtgacc aagttcatgc tategcttac ctcacatgat tatgattc 48
[0373] <210> 47
[0374] <211> 49
[0375] <212> DNA
[0376] <213> 人工序列
[0377] <220>
[0378] <223>
[0379] <400> 47
[0380] gaaggtcggg gtcaacggat tcatcgctta cctcacatga ttatgatta 49
[0381] <210> 48
[0382] <211> 31
[0383] <212> DNA
[0384] <213> 人工序列
[0385] <220>
[0386] <223>
[0387] <400> 48
[0388] cgcaaacaat ttgaatttac accaacgaaa t 31
[0389] <210> 49

[0390]	<211> 54
[0391]	<212> DNA
[0392]	<213> 人工序列
[0393]	<220>
[0394]	<223>
[0395]	<400> 49
[0396]	gaaggtgacc aagttcatgc ttagttcaat tggcaaataa aataaataag gatg 54
[0397]	<210> 50
[0398]	<211> 54
[0399]	<212> DNA
[0400]	<213> 人工序列
[0401]	<220>
[0402]	<223>
[0403]	<400> 50
[0404]	gaaggtcgga gtcaacggat ttagttcaat tggcaaataa aataaataag gata 54
[0405]	<210> 51
[0406]	<211> 34
[0407]	<212> DNA
[0408]	<213> 人工序列
[0409]	<220>
[0410]	<223>
[0411]	<400> 51
[0412]	acacacctag tcaaatttta ctatatattat gcaa 34
[0413]	<210> 52
[0414]	<211> 46
[0415]	<212> DNA
[0416]	<213> 人工序列
[0417]	<220>
[0418]	<223>
[0419]	<400> 52
[0420]	gaaggtgacc aagttcatgc tttaaatggt caacctttgc cgacgc 46
[0421]	<210> 53
[0422]	<211> 48
[0423]	<212> DNA
[0424]	<213> 人工序列
[0425]	<220>
[0426]	<223>
[0427]	<400> 53
[0428]	gaaggtcgga gtcaacggat tttttaaatg ttcaaccttt gccgacgt 48

[0429]	<210> 54
[0430]	<211> 26
[0431]	<212> DNA
[0432]	<213> 人工序列
[0433]	<220>
[0434]	<223>
[0435]	<400> 54
[0436]	gatcgacctt ttgccgacat tgcttt 26
[0437]	<210> 55
[0438]	<211> 46
[0439]	<212> DNA
[0440]	<213> 人工序列
[0441]	<220>
[0442]	<223>
[0443]	<400> 55
[0444]	gaaggtgacc aagttcatgc tacacgtcaa tgacctaacg atgtct 46
[0445]	<210> 56
[0446]	<211> 44
[0447]	<212> DNA
[0448]	<213> 人工序列
[0449]	<220>
[0450]	<223>
[0451]	<400> 56
[0452]	gaaggtcgga gtcaacggat tacgtcaatg acctaacgac gtcc 44
[0453]	<210> 57
[0454]	<211> 27
[0455]	<212> DNA
[0456]	<213> 人工序列
[0457]	<220>
[0458]	<223>
[0459]	<400> 57
[0460]	gtccccccctc gttatcgtta catatat 27
[0461]	<210> 58
[0462]	<211> 46
[0463]	<212> DNA
[0464]	<213> 人工序列
[0465]	<220>
[0466]	<223>
[0467]	<400> 58

[0468] gaaggtgacc aagttcatgc ttcttgccat tgttagttct gtctgc 46
[0469] <210> 59
[0470] <211> 47
[0471] <212> DNA
[0472] <213> 人工序列
[0473] <220>
[0474] <223>
[0475] <400> 59
[0476] gaaggtcgga gtcaacggat tctcttgcca ttgtagttc tgtctgt 47
[0477] <210> 60
[0478] <211> 30
[0479] <212> DNA
[0480] <213> 人工序列
[0481] <220>
[0482] <223>
[0483] <400> 60
[0484] caattttttc caaaggggtt atcgtcagta 30
[0485] <210> 61
[0486] <211> 46
[0487] <212> DNA
[0488] <213> 人工序列
[0489] <220>
[0490] <223>
[0491] <400> 61
[0492] gaaggtgacc aagttcatgc tgtttgtttt gcttgagatc aacgcc 46
[0493] <210> 62
[0494] <211> 47
[0495] <212> DNA
[0496] <213> 人工序列
[0497] <220>
[0498] <223>
[0499] <400> 62
[0500] gaaggtcgga gtcaacggat tagtttgttt tgcttgagat caacgct 47
[0501] <210> 63
[0502] <211> 28
[0503] <212> DNA
[0504] <213> 人工序列
[0505] <220>
[0506] <223>

- [0507] <400> 63
[0508] gtggaggtgt atttgacca tcttataa 28
[0509] <210> 64
[0510] <211> 51
[0511] <212> DNA
[0512] <213> 人工序列
[0513] <220>
[0514] <223>
[0515] <400> 64
[0516] gaaggtgacc aagttcatgc tccctaccgc atataaaata ttgaagaaaa a 51
<210> 65
[0517] <211> 50
[0518] <212> DNA
[0519] <213> 人工序列
[0520] <220>
[0521] <223>
[0522] <400> 65
[0523] gaaggtcgga gtcaacggat tcctaccgca tataaaatat tgaagaaaac 50
[0524] <210> 66
[0525] <211> 32
[0526] <212> DNA
[0527] <213> 人工序列
[0528] <220>
[0529] <223>
[0530] <400> 66
[0531] gtataccaaa tctaaaccac caatatctga at 32
[0532] <210> 67
[0533] <211> 47
[0534] <212> DNA
[0535] <213> 人工序列
[0536] <220>
[0537] <223>
[0538] <400> 67
[0539] gaaggtgacc aagttcatgc tgacaaaact agaaagagaa ggtaaac 47
[0540] <210> 68
[0541] <211> 50
[0542] <212> DNA
[0543] <213> 人工序列
[0544] <220>

[0545] <223>
[0546] <400> 68
[0547] gaaggtcggg gtcaacggat tatagacaaa actagaaaga gaaggtaa at 50
[0548] <210> 69
[0549] <211> 32
[0550] <212> DNA
[0551] <213> 人工序列
[0552] <220>
[0553] <223>
[0554] <400> 69
[0555] gtcaatttttc aaaacagcag tgaaagtttt tc 32
[0556] <210> 70
[0557] <211> 51
[0558] <212> DNA
[0559] <213> 人工序列
[0560] <220>
[0561] <223>
[0562] <400> 70
[0563] gaaggtgacc aagttcatgc tagtgggaaa gtttttagta ataggtagtt t 51
[0564] <210> 71
[0565] <211> 50
[0566] <212> DNA
[0567] <213> 人工序列
[0568] <220>
[0569] <223>
[0570] <400> 71
[0571] gaaggtcggg gtcaacggat tgtgggaaag tttttagtaa taggtagttg 50
[0572] <210> 72
[0573] <211> 27
[0574] <212> DNA
[0575] <213> 人工序列
[0576] <220>
[0577] <223>
[0578] <400> 72
[0579] caacaaaact tcttccccac ccgttaa 27
[0580] <210> 73
[0581] <211> 51
[0582] <212> DNA
[0583] <213> 人工序列

[0584]	<220>
[0585]	<223>
[0586]	<400> 73
[0587]	gaaggtgacc aagttcatgc taatcgctcg tttaccttat ttctcaaaaa a 51
[0588]	<210> 74
[0589]	<211> 49
[0590]	<212> DNA
[0591]	<213> 人工序列
[0592]	<220>
[0593]	<223>
[0594]	<400> 74
[0595]	gaaggtcgga gtcaacggat ttcgctcggtt taccttattt ctcaaaaag 49
[0596]	<210> 75
[0597]	<211> 34
[0598]	<212> DNA
[0599]	<213> 人工序列
[0600]	<220>
[0601]	<223>
[0602]	<400> 75
[0603]	tttcatttct tcttgactc aatttgcaat tata 34
[0604]	<210> 76
[0605]	<211> 52
[0606]	<212> DNA
[0607]	<213> 人工序列
[0608]	<220>
[0609]	<223>
[0610]	<400> 76
[0611]	gaaggtgacc aagttcatgc tcaaaagaaa tggcagaata tgatataaga ta 52
[0612]	<210> 77
[0613]	<211> 52
[0614]	<212> DNA
[0615]	<213> 人工序列
[0616]	<220>
[0617]	<223>
[0618]	<400> 77
[0619]	gaaggtcgga gtcaacggat tcaaaagaaa tggcagaata tgatataaga tt 52
[0620]	<210> 78
[0621]	<211> 32
[0622]	<212> DNA

- [0623] <213> 人工序列
- [0624] <220>
- [0625] <223>
- [0626] <400> 78
- [0627] gtactacata catatccaca ctatcatcat aa 32
- [0628] <210> 79
- [0629] <211> 46
- [0630] <212> DNA
- [0631] <213> 人工序列
- [0632] <220>
- [0633] <223>
- [0634] <400> 79
- [0635] gaaggtgacc aagttcatgc tcgacaagaa accaagattt ccgcta 46
- [0636] <210> 80
- [0637] <211> 45
- [0638] <212> DNA
- [0639] <213> 人工序列
- [0640] <220>
- [0641] <223>
- [0642] <400> 80
- [0643] gaaggtcgga gtcaacggat tgacaagaaa ccaagatttc cgctg 45
- [0644] <210> 81
- [0645] <211> 31
- [0646] <212> DNA
- [0647] <213> 人工序列
- [0648] <220>
- [0649] <223>
- [0650] <400> 81
- [0651] caacgaaatc aaggatggat tctcaattta a 31
- [0652] <210> 82
- [0653] <211> 56
- [0654] <212> DNA
- [0655] <213> 人工序列
- [0656] <220>
- [0657] <223>
- [0658] <400> 82
- [0659] gaaggtgacc aagttcatgc tcattgatat attgttatac ttataaatat tttcat 56
- [0660] <210> 83
- [0661] <211> 56

- [0662] <212> DNA
[0663] <213> 人工序列
[0664] <220>
[0665] <223>
[0666] <400> 83
[0667] gaaggtcgga gtcaacggat tcattgatat attgttatac ttataaatat tttcag 56
[0668] <210> 84
[0669] <211> 33
[0670] <212> DNA
[0671] <213> 人工序列
[0672] <220>
[0673] <223>
[0674] <400> 84
[0675] catataaaat atagttgcac gtactgttct aag 33
[0676] <210> 85
[0677] <211> 48
[0678] <212> DNA
[0679] <213> 人工序列
[0680] <220>
[0681] <223>
[0682] <400> 85
[0683] gaaggtgacc aagttcatgc ttgaggatcat atcataacct acaatacc 48
[0684] <210> 86
[0685] <211> 49
[0686] <212> DNA
[0687] <213> 人工序列
[0688] <220>
[0689] <223>
[0690] <400> 86
[0691] gaaggtcgga gtcaacggat tctgaggatca tatcataacc tacaatact 49
[0692] <210> 87
[0693] <211> 34
[0694] <212> DNA
[0695] <213> 人工序列
[0696] <220>
[0697] <223>
[0698] <400> 87
[0699] atcatatcta tctacatctc tgaatttgac atat 34
[0700] <210> 88

[0701] <211> 45
[0702] <212> DNA
[0703] <213> 人工序列
[0704] <220>
[0705] <223>
[0706] <400> 88
[0707] gaaggtgacc aagttcatgc ttttcgggac cttaattaag gccat 45
[0708] <210> 89
[0709] <211> 43
[0710] <212> DNA
[0711] <213> 人工序列
[0712] <220>
[0713] <223>
[0714] <400> 89
[0715] gaaggtcgga gtcaacggat ttcgggacct taattaaggc cac 43
[0716] <210> 90
[0717] <211> 31
[0718] <212> DNA
[0719] <213> 人工序列
[0720] <220>
[0721] <223>
[0722] <400> 90
[0723] tcggacacaa ttaccatttc attatatttc c 31
[0724] <210> 91
[0725] <211> 46
[0726] <212> DNA
[0727] <213> 人工序列
[0728] <220>
[0729] <223>
[0730] <400> 91
[0731] gaaggtgacc aagttcatgc tgctaaacaa atctccatta atcgcc 46
[0732] <210> 92
[0733] <211> 47
[0734] <212> DNA
[0735] <213> 人工序列
[0736] <220>
[0737] <223>
[0738] <400> 92
[0739] gaaggtcgga gtcaacggat tagctaaaca aatctccatt aatcgct 47

[0740]	<210> 93
[0741]	<211> 27
[0742]	<212> DNA
[0743]	<213> 人工序列
[0744]	<220>
[0745]	<223>
[0746]	<400> 93
[0747]	ctgttggact gtcataagggt tgtaagt 27
[0748]	<210> 94
[0749]	<211> 47
[0750]	<212> DNA
[0751]	<213> 人工序列
[0752]	<220>
[0753]	<223>
[0754]	<400> 94
[0755]	gaaggtgacc aagttcatgc tgagtgaagt aatttactca ttgtttc 47
[0756]	<210> 95
[0757]	<211> 48
[0758]	<212> DNA
[0759]	<213> 人工序列
[0760]	<220>
[0761]	<223>
[0762]	<400> 95
[0763]	gaaggtcgga gtcaacggat tggagtgaagc taatttactc attgttta 48
[0764]	<210> 96
[0765]	<211> 29
[0766]	<212> DNA
[0767]	<213> 人工序列
[0768]	<220>
[0769]	<223>
[0770]	<400> 96
[0771]	cttaaaactc ctttagggat gctaagatg 29



图1

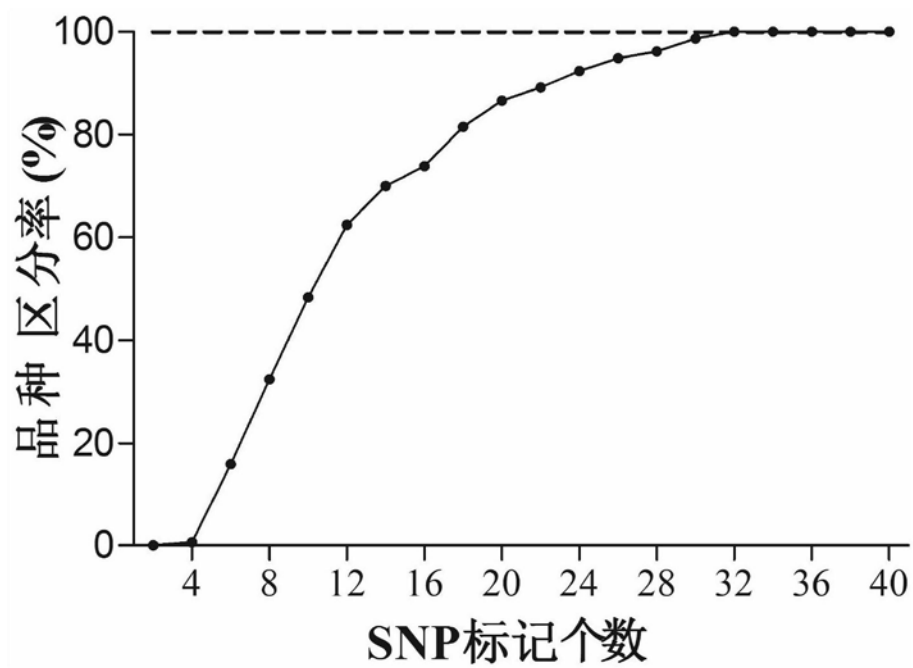
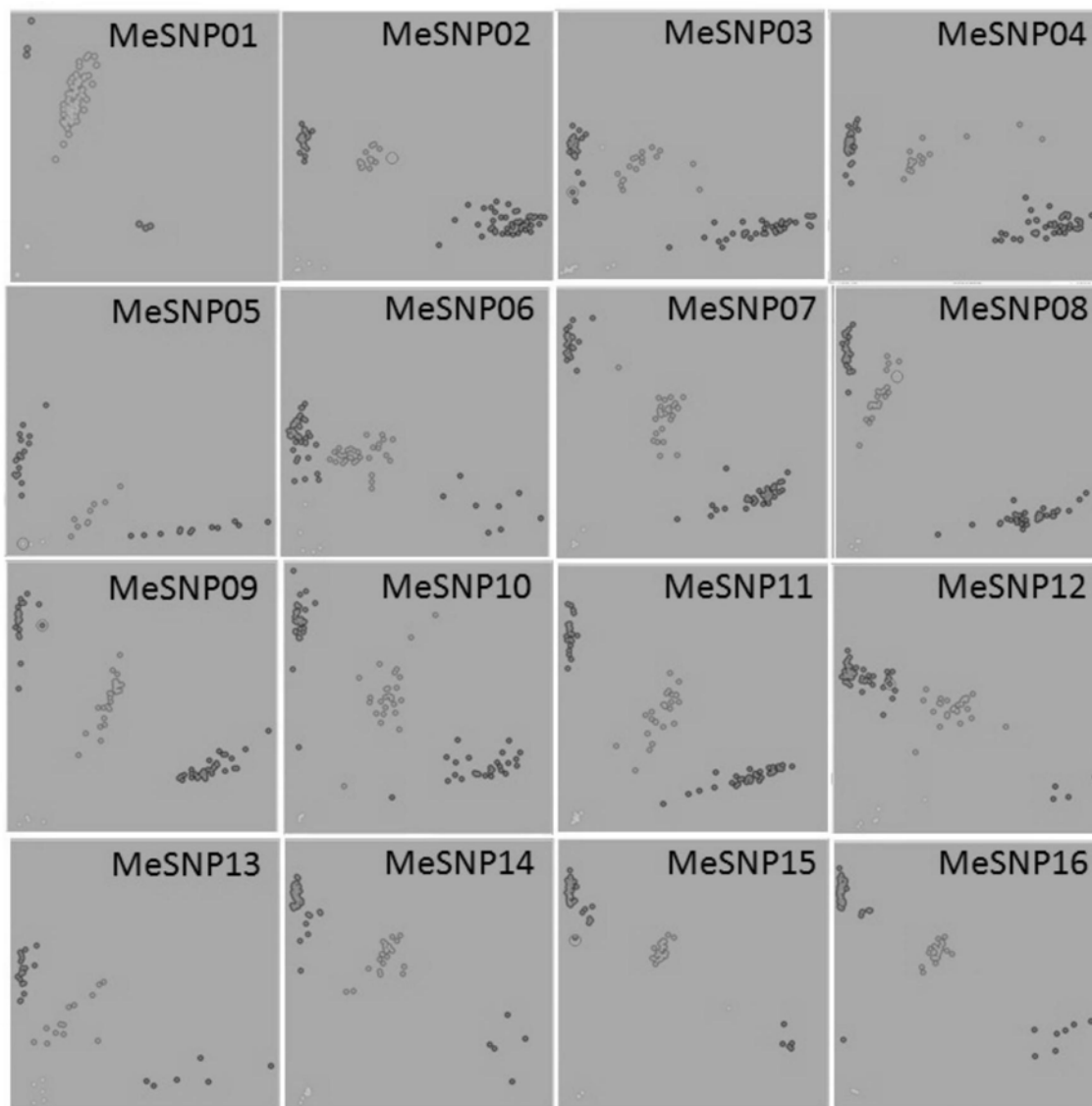


图2



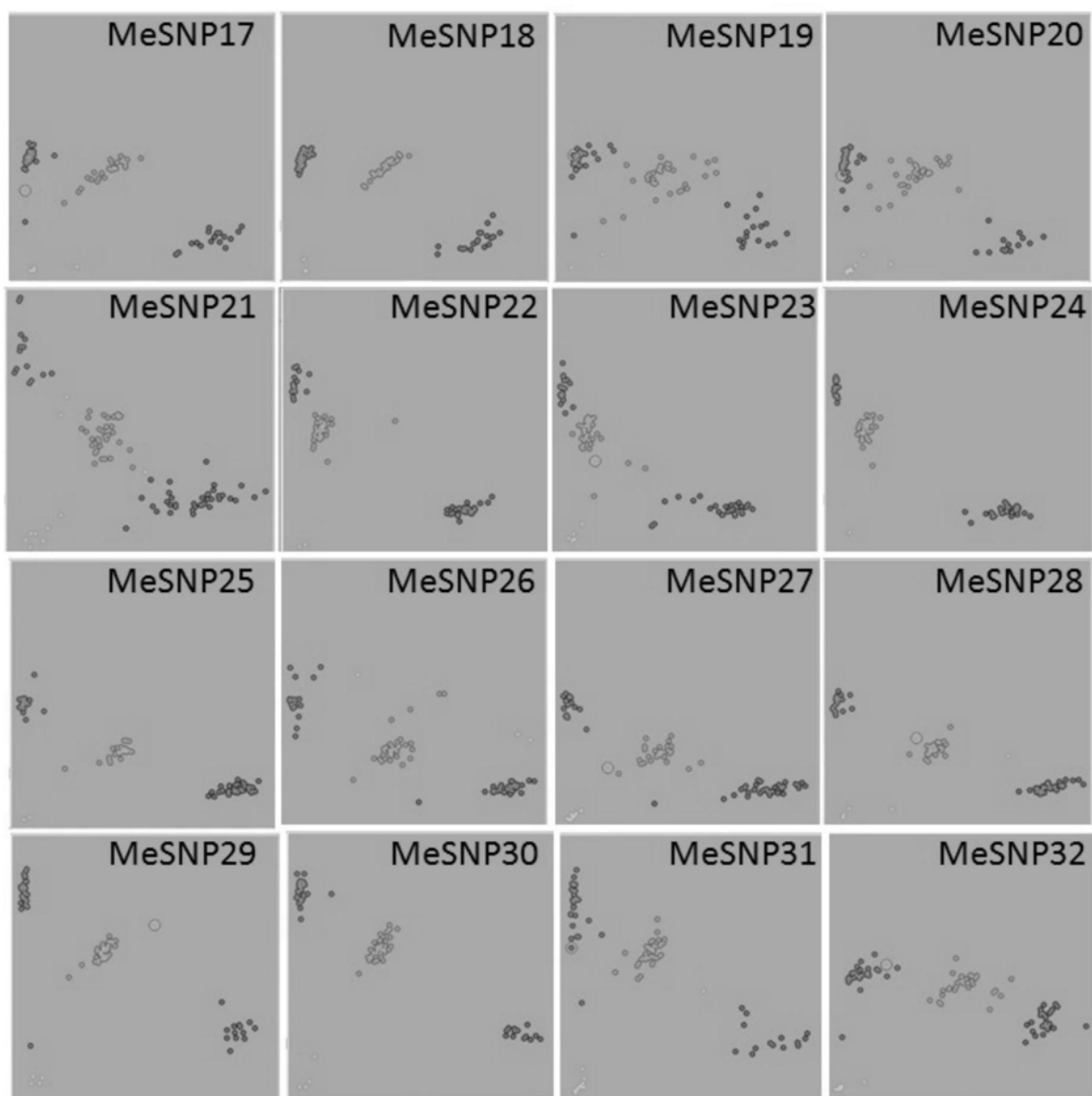


图3