

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910044219.0

[43] 公开日 2010 年 3 月 10 日

[11] 公开号 CN 101665829A

[22] 申请日 2009.8.31
[21] 申请号 200910044219.0
[71] 申请人 中国农业科学院麻类研究所
地址 410205 湖南省长沙市岳麓区咸嘉湖西路 348 号中国农业科学院麻类研究所
[72] 发明人 陈信波 邓 欣 龙松华 王玉富

[74] 专利代理机构 长沙永星专利商标事务所
代理人 周 咏 米中业

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 8 页

[54] 发明名称
亚麻微卫星 DNA 标记

[57] 摘要
本发明公开了一种亚麻微卫星 DNA 标记，提供了 25 个亚麻微卫星位点的 DNA 序列及扩增了上述 25 个亚麻微卫星位点的引物序列和扩增方法，25 个亚麻微卫星位点用于亚麻品种分类、遗传关系分析和标记辅助育种，重复性好，是一种可靠有效的分子标记。

1、一种亚麻微卫星 DNA 标记，其特征在于所述微卫星标记的编号分别为 LU1、LU2、LU3、LU4、LU5、LU6、LU7、LU8、LU9、LU10、LU11、LU12、LU13、LU14、LU15、LU16、LU17、LU18、LU19、LU20、LU21、LU22、LU23、LU24、LU25 其核苷酸序列依次如 SEQ ID NO: 1—25 所示。

2、根据权利要求 1 所述的亚麻微卫星 DNA 标记，其特征在于所述 LU1、LU2、LU3、LU4、LU5、LU6、LU7、LU8、LU9、LU10、LU11、LU12、LU13、LU14、LU15、LU16、LU17、LU18、LU19、LU20、LU21、LU22、LU23、LU24、LU25 二十五个位点的引物序列为：

LU1-F:CTCGCTCTTTTCTTCTCTCTC

LU1-R:GGACTKCTCCCTAATTACACA

LU2-F:CCTGTTTGGTTAGGTTGGAAT

LU2-R:AGCCGCCGTTGTAGGTCTCA

LU3-F:GGGCCAAGTTTGGTTAGGTT

LU3-R:GCCGTTGTAGGTCTCAGGTG

LU4-F:TCCTCCTTGGGACTCTCTACTC

LU4-R:CCCTGTTTGTTTCCAGTCTTTT

LU5-F:CTCCCTCGCTCTTTTCTT

LU5-R:GGGGGAGCTATTAGGACTT

LU6-F:CCTTTGCTTCCAACCTCACCC

LU6-R:AAAAAGAGAAGAAGGGGAGG

LU7-F:TCACAAGCCCTCGCTAAGTTC

LU7-R:AGAATGTGGCTCAACTCGGT

LU8-F:CCTCGCTCTTTTCTTCTCTC

LU8-R:GGGGAGCTATTAGGACTTCT

LU9-F:CTCTCCCTCGCTCTTTTCTT
LU9-R:GGGGGAGCTATTAGGACTTCT
LU10-F:TACTGAGAGGGTCGCAGTCG
LU10-R:AAGCTGCGATTGTGAGAAGG
LU11-F:ATGTTGGGAAGCAGCAAGACT
LU11-R:CCATAAGGGAGAAGGGGGTA
LU12-F:TGGGGGCAGACCTACGTTAC
LU12-R:CCCCTGTTTGTTTCCAGTCTTT
LU13-F:TGACACAACCGTTGGACACT
LU13-R:GAAGGTTTCGGATGAAAAGC
LU14-F:GTCTCGGCAAGCATTCAATT
LU14-R:GCCAACAATGGTGTCAAGAG
LU15-F:CCCCTTCATCCTCTCTCACA
LU15-R:TTTGCTTGGGAAGATCAGGTTG
LU16-F:TCCTTTCTTTCCAGTTCTCACC
LU16-R:GCATTTCCCAGGCATCAA
LU17-F:GTGTGGGAATTGGACACTTG
LU17-R:CAAACCGAAGAGGCAAGAAG
LU18-F:GTGCGGCTGAGGACGATTT
LU18-R:CCAGCCACTACAGCACCACT
LU19-F:CTGAGTGCGAAAGCCTATTG
LU19-R:TACTGCCCTCTTCCACCTGA
LU20-F:CCATTGATGTGATGCCTGAG
LU20-R:GGTGGGAGTATGATAGTCGTTTC
LU21-F:CACCACAGAATCAAGAGAAATCC

LU21-R: TGACCCACCATCTTGTTCTTTC

LU22-F: TGTGCCAAAGACTGCATT

LU22-R: CATGGAGGTGTTGAAAACGA

LU23-F: AAGAGGGCACCTGAACTTTG

LU23-R: GACAAAACAAGCCTCCTTGG

LU24-F: TCCCTTTATTCCCCTTGCT

LU24-R: AGACAGAACCGCAGTCATCG

LU25-F: CTTGGCTCGATGTTTCCTTG

LU25-R: GTATACACCGCCACGTTTCC。

亚麻微卫星 DNA 标记

技术领域

本发明涉及一种亚麻微卫星 DNA 标记，适用于亚麻品种分类、遗传关系鉴定和辅助育种。

背景技术

微卫星(Microsatellite),又称为简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)或短串联重复(short tandem repeat, STR),是以少数几个核苷酸(1—6个)为重复单位的串联重复DNA序列。由于微卫星具有高水平的杂合性和突变率、双亲遗传模式等优势,加之便于检测,费用低廉,因此广泛用于遗传图谱构建、基因定位、标记辅助育种、家系分析、品种鉴定以及进化分析等研究。如用微卫星标记研究樱桃品种间的亲缘关系(艾呈祥等,2007,果树学报,24(4):460465)、用微卫星DNA标记进行猪品种分类的专利申请“适于猪品种分类的猪微卫星DNA标记”(公开号CN 1370834A)。

亚麻(Linum usitatissimum L.)是亚麻科(Linaceae)亚麻属(Linum)的一年生草本纤维植物,已经有六七千年的栽培历史。亚麻既是世界第3大纤维作物,又是5大油料作物之一。作为一种重要的经济作物,亚麻在微卫星分子标记方面的研究远远滞后于其他作物,大豆、棉花、水稻、葡萄、花生的SSR标记已有许多研究,并公开发表了大量可以直接利用引物序列,而现有亚麻的微卫星标记数量非常有限,仅有法国科学家Roose-Amsaleg等分离的28个微卫星标记(Roose-Amsaleg C等,2006, Molecular Ecology Notes, 6(3): 796 - 799)。这严重制约了微卫星标记在亚麻遗传学、分子生物学方面的研究和应用。因此,迫切需要获得更多独立分离的、多态性丰富的亚麻微卫星标记。

发明内容

本发明旨在分离克隆微卫星DNA标记,建立亚麻的微卫星DNA的技术体系并利用这些分子标记进行品种分类,遗传关系分析和辅助育种。

实现上述发明目的的技术方案包括亚麻（CT）_h和（GT）_h微卫星富集文库的构建、含微卫星序列的阳性克隆的筛选及测序，得到17个含有（CT）_h和8个含有（GT）_h的微卫星克隆，确定了25个多态性丰富的微卫星标记LU1、LU2、LU3、LU4、LU5、LU6、LU7、LU8、LU9、LU10、LU11、LU12、LU13、LU14、LU15、LU16、LU17、LU18、LU19、LU20、LU21、LU22、LU23、LU24、LU25；LU1为214个核苷酸、LU2为265个核苷酸、LU3为328个核苷酸、LU4为250个核苷酸、LU5为173个核苷酸、LU6为202个核苷酸、LU7为363个核苷酸、LU8为199个核苷酸、LU9为206个核苷酸、LU10为270个核苷酸、LU11为511个核苷酸、LU12为196个核苷酸、LU13为302个核苷酸、LU14为196个核苷酸、LU15为393个核苷酸、LU16为314个核苷酸、LU17为369个核苷酸、LU18为394个核苷酸、LU19为356个核苷酸、LU20为305个核苷酸、LU21为462个核苷酸、LU22为249个核苷酸、LU23为308个核苷酸、LU24为258个核苷酸、LU25为616个核苷酸。

附图说明

图1是用LU1位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图2是用LU2位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图3是用LU3位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图4是用LU4位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图5是用LU5位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图6是用LU6位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图7是用LU7位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图8是用LU8位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图9是用LU9位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图10是用LU10位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图11是用LU11位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图12是用LU12位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图13是用LU13位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图14是用LU14位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图15是用LU15位点的特异性引物扩增8个亚麻品种DNA的PAGE电泳图。

图 16 是用 LU16 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 17 是用 LU17 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 18 是用 LU18 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 19 是用 LU19 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 20 是用 LU20 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 21 是用 LU21 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 22 是用 LU22 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 23 是用 LU23 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 24 是用 LU24 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。
图 25 是用 LU25 位点的特异性引物扩增 8 个亚麻品种 DNA 的 PAGE 电泳图。

具体实施方式

1、亚麻微卫星富集文库的构建。

(1) 以亚麻品种白花幼苗为材料, 采用改进的 CTAB 法 (参见邓欣等, 2007, 中国麻业科学, 29(4): 184-188) 提取亚麻基因组 DNA。用限制性内切酶 *Mse* I 酶切 10 μ g 亚麻基因组 DNA, 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (TIANGEN) 回收 300-1 500 bp 的 DNA 片段。

(2) 将碱基互补的寡核苷酸 primer A (5' -AGATGGAA TTCGTACACTCGT-3') 和 primer B (5' -TAACGAGTGTACGAATTCATCT-3') 等摩尔混合, 95℃变性 5 min, 60℃退火 1 h, 形成具有粘性末端的接头。

(3) 将酶切产物和接头用 T_4 DNA 连接酶连接。连接产物用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提一次, 离心收集上清液 在上清液中加 0.3M 醋酸钠 (pH5.2) 和 2 倍体积冰乙醇纯化沉淀 DNA, 加入 15 μ L 去离子水溶解。

(4) 接头连接片段的 PCR 扩增连接产物以 primer A 为引物进行 PCR 扩增。用普通 DNA 产物纯化试剂盒 (TIANGEN) 纯化 PCR 产物, 并将其浓缩至 15 μ L。

(5) 用生物素标记的探针 (CT)₁₅ 和 (GT)₁₅ 分别与纯化的接头连接 DNA 片段杂交。具体操作为: 建立 50 μ L 杂交混合液反应体系含 5 μ L 探针 (10 μ mol L⁻¹), 5 μ L primer A, 15 μ L 20×SSC, 10% SDS 0.5 μ L 及 12.5 μ L ddH₂O, 68℃预热。将 15 μ L 连接产物 DNA 片段于 95℃变性 5 min, 再加预热

的杂交混合液，于 68℃杂交 1 h。

(6) 将杂交混合液加入 100 μ L 链霉亲和素包被的磁珠 (Dynal M-280) 中，于 25℃温育 20 min。

(7) 用磁力架吸附磁珠，弃上清。依次用 200 μ L 洗液 I、洗液 II (3×SSC, 0.1% SDS)、洗液 III (6×SSC) 洗涤磁珠，去除不含微卫星的序列。方法是用洗液 I 在室温洗 2 次，每次静置 8 min；洗液 II 在 68℃洗 2 次，每次静置 15 min；洗液 III 在室温快速洗 2 次。

(8) 用 0.1×TE 200 μ L 在室温快速洗 2 次，加入 0.1×TE 50 μ L，95℃变性 10 min，小心吸取上清，上清液即含有微卫星序列的单链 DNA，以 primer A 为引物，以单链 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得双链目的片段。

(9) 将扩增产物纯化后连接到 pMD18-T 载体 (大连宝生物) 上，然后将连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞 (TIANGEN)，转化液涂抹在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基平板上进行蓝白斑筛选，得到微卫星基因组文库。

2、含微卫星序列的阳性克隆的筛选、测序及微卫星引物的设计。

(1) 挑取白色单菌落接种到 1 mL LB 培养液中，于 37℃培养过夜。

(2) 以菌液为模板，采取 PIMA 方法 (参见 Lunt 等, Molecular Ecology, 8: 891-894) 筛选含有 (CT)_n 和 (GT)_n 微卫星序列的阳性克隆。

(3) 将阳性克隆测序，分析是否含有 (CT)_n 或 (GT)_n 重复序列。

(4) 根据微卫星重复序列两侧的保守序列设计引物。

(5) 测序结果采用 SSR Hunter 1.3 软件分析序列，并用 Bioedit Sequence Alignment Editor 软件对所有序列进行比对分析、归类，再用 Premier Primer 5.0 软件进行引物设计。对高度相似的一类微卫星序列设计特异引物，对进一步筛选的阳性克隆进行第二次 PCR 扩增，以提高筛选效率。

3、利用亚麻微卫星 DNA 标记分析亚麻品种间的遗传差异。

将上述微卫星标记用于 8 个亚麻品种的分类，确定了 25 个多态性丰富、适用于亚麻品种分类的微卫星标记 LU1、LU2、LU3、LU4、LU5、LU6、LU7、LU8、LU9、LU10、LU11、LU12、LU13、LU14、LU15、LU16、LU17、LU18、LU19、LU20、LU21、LU22、LU23、LU24、LU25 (表 1)。具体操作过程如下：

(1) 按邓欣等的方法(参见邓欣等, 2007, 中国麻业科学, 29(4): 184-188)提取各个亚麻品种的 DNA 作为模板, 进行 PCR。

(2) 分别用 LU1、LU2、LU3、LU4、LU5、LU6、LU7、LU8、LU9、LU10、LU11、LU12、LU13、LU14、LU15、LU16、LU17、LU18、LU19、LU20、LU21、LU22、LU23、LU24、LU25。25 个位点的 25 对引物(引物序列见表 1)扩增这 8 个亚麻品种的 DNA。

(3) 将 PCR 产物在 8% 的丙烯酰胺凝胶上电泳, 让后进行银染并拍照, 得到图 1-25。

(4) 结果分析: 每个一篇的扩增条带按有或无记录, 扩增条带存在时赋值为 1, 否则赋值为 0。采用 SPSS10.1 for windows 统计分析软件中的系统聚类分析程序, 距离测量选用相关系数距离法, 用类间平均连锁法(Between-groups linkage)进行聚类分析并建立系统树。

由附图 1-25 可看出, 本发明的 25 个微卫星位点的序列长度在供试的 8 个品种中都出现多态性, 由此可见, 本发明的这 25 个微卫星标记能用于亚麻品种分类和遗传关系分析。

表 1 引物特性表: 引物序列, 退火温度, 片段大小

位点	基序	引物序列(5' - 3')	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
LU1	(CT) ₂₄ T(CT) ₅	F:CTCGCTCTTTTCTTCTCTCTC R:GGACTKCTCCCTAATTACACA	136	60
LU2	(CT) ₂₂	F:CCTGTTTGGTTAGGTTGGAAT R:AGCCGCCGTTGTAGGTCTCA	146	62
LU3	(CT) ₂₁	F:GGGCCAAGTTTGGTTAGGTT R:GCCGTTGTAGGTCTCAGGTG	140	62
LU4	(CT) ₂₂	F:TCCTCCTTGGGACTCTCTACTC R:CCCTGTTTGTTCAGTCTTTT	121	62
LU5	(CT) ₃₄	F:CTCCCTCGCTCTTTTCTT R:GGGGGAGCTATTAGGACTT	147	59

LU6	(CT) ₃₉ CC(CT) ₁₁	F:CCTTTGCTTCCAACCTCACCC R:AAAAAGAGAAGAAGGGGAGG	151	60
LU7	(CT) ₂₄	F:TCACAAGCCCTCGCTAAGTTC R:AGAATGTGGCTCAACTCGGT	139	61
LU8	(CT) ₁₆ TT(CT) ₅	F:CCTCGCTCTTTTCTTCTCTC R:GGGGAGCTATTAGGACTTCT	133	60
LU9	(CT) ₃₆ TT(CT) ₅	F:CTCTCCCTCGCTCTTTTCTT R:GGGGGAGCTATTAGGACTTCT	147	61
LU10	(CT) ₃₆ ...(CT) ₁₈	F:TACTGAGAGGGTCGCAGTCG R:AAGCTGCGATTGTGAGAAGG	157	62
LU11	(CT) ₁₀	F:ATGTTGGAAGCAGCAAGACT R:CCATAAGGGAGAAGGGGGTA	176	61
LU12	(CT) ₆	F:TGGGGGCAGACCTACGTTAC R:CCCCTGTTTGTTCAGTCTTT	145	63
LU13	(CT) ₁₇ CC(CT) ₈	F:TGACACAACCGTTGGACACT R:GAAGGTTTCGGATGAAAAGC	240	59
LU14	(CT) ₂₃	F:GTCTCGGCAAGCATTCAATT R:GCCAACAATGGTGTCAAGAG	150	59
LU15	(CT) ₂₃	F:CCCCTTCATCCTCTCTCACA R:TTTGCTTGGAAGATCAGGTTG	151	61
LU16	(CT) ₂₅	F:TCCTTTCTTTCCAGTTCTCACC R:GCATTTCCCAGGCATCAA	282	59
LU17	(GT) ₁₂	F:GTGTGGAATTGGACACTTG R:CAAACCGAAGAGGCAAGAAG	156	60
LU18	(GT) ₁₀	F:GTGCGGCTGAGGACGATTT R:CCAGCCACTACAGCACCCT	191	63
LU19	(GT) ₁₁	F:CTGAGTGCGAAAGCCTATTG	190	61

		R:TACTGCCCTCTTCCACCTGA		
LU20	(GT) ₅ GC(GT) ₅	F:CCATTGATGTGATGCCTGAG R:GGTGGGAGTATGATAGTCGTTTC	162	61
LU21	(GT) ₁₅	F:CACCACAGAATCAAGAGAAATCC R:TGACCCACCATCTTGTTCTTTC	182	61
LU22	(GT) ₁₁	F:TGTTGCCAAAGACTGCATTT R:CATGGAGGTGTTGAAAACGA	187	57
LU23	(GT) ₁₀	F:AAGAGGGCACCTGAACTTTG R:GACAAAACAAGCCTCCTTGG	151	60
LU24	(CT) ₉ TT(CT) ₉	F:TCCCTTTATTCCCCTTTGCT R:AGACAGAACCGCAGTCATCG	243	60
LU25	(GT) ₁₁	F:CTTGGCTCGATGTTTCCTTG R:GTATACACCGCCACGTTTCC	215	61

表1中F表示5'端引物，R表示3'端引物。

本发明提供了25个亚麻微卫星位点的DNA序列及扩增上述25个亚麻微卫星位点的引物序列和扩增方法，25个亚麻微卫星位点用于亚麻品种分类、遗传关系分析和标记辅助育种，重复性好，是一种可靠有效的分子标记。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院麻类研究所

<120> 亚麻的DNA分子遗传标记

<130> 亚麻的DNA分子遗传标记

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 214

<220>

<221> 重复

<222> (107)..(165)

<400> 1

acacttcct ctatctctct ctattcctct cccctcttc atctctctcc cccctctcc	60
ctcgctcttt tcttctctct cccctctct ccctcgctct cttctcctct ctctctctct	120
ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctcttctct ctctctgcaa ccatttgtgt	180
aattagggag aagtcctaata agtccccct tact	214

<210> 2

<211> 265

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (54)..(97)

<400> 2

atgttggcct gtttggttag gttggaattc gctcggcttc tctcctctc tgactctctc	60
tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttgc tgccactctg aacttggcac	120
ttccgcctc acctgagacc tacaacggcg gctacgccac aaaactctgt cctcggatct	180
tacggttcgt ttctgtctt tatcattccc ttctgctata tctccttgtt tgtttacaga	240
acaatctata cctccccggc tctgt	265

<210> 3

<211> 328

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (119)..(160)

<400> 3

caggggccga ttctgacggc agtgccaaga ccatgacggc aagtgagca acgatggaat	60
tctaattcca aggggccaaag ttgggttagg ttggaattcc tcgccaaggg cccactgact	120
ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct tgctgccact ctgaaagggg	180
ccctttccgc ctacactgag acctacaacg gcggctacgc cacaaaactc tgcctcgga	240
tcttacgggt cgtttctgt cttatcatt ccctctgct atatctcctt gttgtttac	300
agaacaatct atacctcccc ggctctgt	328

<210> 4

<211> 250

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (113)..(178)

<400> 4

aaaattgggc gtgggggcag acctacgtta cgtcgtatat agtagcttag ctactttga	60
tacttctcta tcagttggaa ctgcgaattc ctcttggga ctcttactc atctctctct	120
ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctgt	180
gaattctaaa agactggaaa caaacagggg aaagagagga agaagaagta gaagaaggac	240

tacaattact

250

<210> 5

<211> 173

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (40)..(115)

<400> 5

tcttcattctc tctccccccc tctccctcgc tctttcttc tcttcccc tcttccctc 60

gctctcttct cctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctcttctc 120

tctctgcaac catttgtga attagggaga agtctaata gctccccctt act 173

<210> 6

<211> 202

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (49)..(150)

<400> 6

gacccctcca ctccctttat tcccctttgc ttccaactca ccccttccct ctctctctct 60

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct 120

ctctctccct ctctctctct ctctctctct atttctccc ctctctctct tttttttat 180
tttttttat ttctccctct ct 202

<210> 7

<211> 364

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (261)..(308)

<400> 7

accgtactgc atttggcag gagtcacaag tggtagaac cagattggtg gaaattcggg 60
aacaagaaat cgtaagttgc tctttctcca taaccatttt cagtctcaac tacttgctcg 120
tccaattgg agatgttcag taggcctttt cagcaattga tttctttctc tctaacagggt 180
actttcgcca tgctcccggc gagatgtatg tctgtgcaca agccctcgct aagttcatat 240
cgatcaacag gtgagctcat ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct 300
ctctctccac ctctcgattc tccactaca agttaccgag ttgagccaca ttctaagcga 360
gct 363

<210> 8

<211> 199

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (108)..(151)

<400> 8

acacttcct ctatctct ctattcctt cccctcttc atctctctcc cccctctc 60
cctcgtctt ttctctct tccccctc tccctcgtc tcttctctc tctctctc 120
tctctctc tctctctt tctctctc tgcaaccatt tgtgtaatta gggagaagtc 180
ctaatagtc ccccttact 199

<210> 9

<211> 206

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (75)..(158)

<400> 9

acacttcct ccactctct ctattcctt cccctcttc atctctctcc cccctctcc 60
ctcgtcttt ttctctct ctctctct ctctctct ctctctct ctctctct 120
ctctctct ctctctct ctctcttct ctctctctgc aaccattgt gtaattaggg 180
agaagtccta atagctcccc ctact 206

<210> 10

<211> 270

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (151)..(186)

<400> 10

```
aatttaaggc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc      60
tctctctctc tctctctctc tttcttttt atttactgag agggctgcag tcgcaggggg      120
gggtccgtgtc ctgcagccgt tagctgcca ctctctctct ctctctctct ctctctctct      180
ctctctgttt ctgcagcctg cagcccagca gccagccaac cagcctgcag ccttctcaca      240
atcgagcgtt caagaaattc atcattcact                                     270
```

<210> 11

<211> 511

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (128)..(147)

<400> 11

```
aatgttggga agcagcaaga cttgcggttg gcaaagttct ggatgcaggg gggatgaatgt      60
tatctagttc ttgttattt ttccatttt attctcttc ttgtgagatg ttggattgt      120
gtgttagctc tctctctctc tctctctgca tattgttac ccccttctcc ctatggctt      180
atactgactt gacttgtagg agtatttggc ttctgtatgt taggaaactg ttttttgta      240
atggattgat tatgtaatag aatattgtat cttggctttt acattgggc ttccgggtca      300
agggatccga caatcaagcc cattcccacc ctcaacgtc ggcccttctg actgggtttc      360
gcggtccgta catggtatca tatctgggat attgtcaag gttgatgtag agaggtttgt      420
tctcaccta tgcacctcc cagagataa ctatggttta atgattggga gtcattaggct      480
```

ataactcaat ggagtaccca gtctcatgat t

511

<210> 12

<211> 196

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (112)..(123)

<400> 12

aaaattgggc gtgggggcag acctacgtta cgtcgtatat agtagcttac ctagcttga 60

tacttctcta tcagttggaa ctgcgaattc ctccttgga ctcttactc atctctct 120

ctctgtgaat tctaaaagac tggaaacaaa caggggaaag agaggaagaa gaagtagaag 180

aaggactaca attact 196

<210> 13

<211> 302

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (191)..(241)

<400> 13

ataataacaa tagagtagct tcatttacac ctacgaactg acacaaccgt tggacacttt 60

ccaacgtgac aaatcctcta aacttatagt gacaagaact agtgttctac aataatagag 120

ttgcgatcaa gatcaacaca ctccgtcgat ctcaccgact taccaagggg acctacgctc 180
actcactcat tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctccctctc tctctctctc 240
ttcgaacact acctaagagc ttttcatccg aaaccttctt agtgacaata tgatcacact 300
at 302

<210> 14

<211> 196

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (98)..(143)

<400> 14

aattcctgat atagtaaact gtcaccttc cagagggtctc ggcaagcatt catttggcgc 60
ctctcccact ctctgtctct tcagtcttcc aagttcatct ctctctctct ctctctctct 120
ctctctctct ctctctctct ctggaatctt cgaaatcttt cgtttctctt gacaccattg 180
ttggccttct gatcat 196

<210> 15

<211> 393

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (85)..(130)

<400> 15

```
acatagatgg tcattacgt tcatgcggg ccttccttt caccgacgcc gacaactccc      60
cttcacctc ttcacatcc tgacctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct    120
ctctctctct ttcttagttt ccttccaac caaatcatac tatcaaattc aaacccaac      180
tctcctcaac ctgatcttc caagcaaatt cattttcata atcaaaatac taattactct    240
ttcattcttg ccaatgatca ttctacaaa cgaatttctc tctgctgcta taaacctaat    300
atcggaggtc ccattcatga gtagacttc atgccaccaa cggtcaaaac aatcactctt    360
ctagtgggac agtactttat cctctttcc act                                  393
```

<210> 16

<211> 314

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (59)..(108)

<400> 16

```
agactctgtt ttctttctt tccagttctc accattctca ctctcactct cactctcact      60
ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctag acctgcttct    120
atttcttct tctcgtgttg accagaaaaa atgggaaact tgtattcag ctcaatactc      180
atcaggttgg ctgtatctc catattgctt ctttgattt cgggctctac ccgagtgaga      240
ttcacggtc aaggtaattg tgtgttttc aagtctgat ttgatgcct gggaaatgca      300
taaagacttc actt                                                  314
```

<210> 17

<211> 369

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (79)..(102)

<400> 17

```
caatgcatgt gtaggtgtta tgtgtgggaa ttggacactt gtcctagttc ctttttactt      60
ttctttctg gttttatgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtttgagtga gtttcaggag      120
ttagttggcc gccgagtttg agtttcaatg gatcatgctt cttgcctctt cggtttgctc      180
actgcttcca ggtattccta cacaactttt ccatttcgtt tagtgaggac actgttcaaa      240
ctaagtgtgg ggggtgaattc ccatatgatt cttgttagct catcttgatg ggtatttatt      300
catcttgcac attagtccaa atctcaagcg tgttgaaca atctttgaat caattacttg      360
acatgctct                                     369
```

<210> 18

<211> 394

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (202)..(221)

<400> 18

```
agggagggga agatagtgga gtaaggaagg atgtggggga gcaaaggaaa gagagcttgg      60
gaaggacgga acacactgag aaggtagggg acttcaacgt tgttttgag attgggttgg      120
```

attctattcg tgcggctgag gacgatttct agaccaagg tttgaacta tactcaaagc 180
aagttgggtg ctggatgtg cgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tggggggggg ggggggggtg 240
gcaggtaaca atgatgagaa tgcaacgtca attctgaaca atgatgacaa ggatgacgcg 300
gacagtgggtg ctgtagtggc tgggaagata caactgttgt ttgtatgtac aattaccata 360
acgtttgtat tgatggttc ggctcttgtt atgt 394

<210> 19

<211> 356

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (128)..(149)

<400> 19

attgtttgca tgacaccagg ccgaggcaat gaaccagttc gttacagatc ttgccattat 60
tgcagcacgg gagaaatcga tacttgctga gtgcgaaagc ctattggcac caacagcagc 120
catgcagggtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg ctcaaatgtc acaatgggta tcgcttctct 180
ttgaaaattt tcagttactt gctttgttac cgagcaaaaa acacgaaagg aaaccctaca 240
atgacaatct gattgttcag gtggaagagg gcagtattag gacgcatctg attcaaatga 300
gacagattct ggaaaaccaa gcaatgttga ctacaagaac acatcaatgg tggctct 356

<210> 20

<211> 305

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (167)..(188)

<400> 20

```
atcctcttca aatctttccg ctgttgatg ttttgtaca gaagttgaat ccattgatgt      60
gatgcctgag agagagatga gatgtgttga tcgatcgaat atacgctgat atagcgagag    120
ttgagagggt tagccaccga tcatagaatg atatatatat ctgtgcgtgt gtgtgtgcgt    180
gtgtgtgtgg aaacgactat catactccca cctgcatggg ctcatctcaa cctctcattt    240
ctaggataag atctaaacgt tcaataatca ttctgaaaac aaaattactg aaacatcact    300
ccatt                                                                    305
```

<210> 21

<211> 462

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (261)..(290)

<400> 21

```
aggtagcagt ataacgaacc aatacaaagt catgagaata ggaatgagtt catacatcta    60
gctaagtcag ttctgtacaa gtgctgagta tcaggtgtaa tccggtgcaa gaactcaacg    120
taatcagcag aatggaactg agctagtcca accgggtatg cttgtgtgg ccgctgcacc    180
aaagagatac accacagaat caagagaaat ccaaattttc atcaaactag ttacgaaaag    240
taaagagatt atatatatat gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt aaagattaca    300
aattgccatg aaactaacat aaatctccat ctcttgtga aggtcataag aaagaacaag    360
```

atggtgggtc atacacagcc tgtgcggtt catcgggtga ttcggaccaa agtaaact 420
gccaacatcc catgcattgt tgcacgcaa tagaagatta gt 462

<210> 22

<211> 249

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (45)..(66)

<400> 22

atcgaggaga ttgttgcca aagactgcat tttatttg tgttggtg tgttggtg 60
tgtgtgtta ggtgtggtg aaaggccctg gaaaactca gatgctaggc ttgtgctga 120
agatggctct gtgtggaagg ccaagtcgtt tggtgccact ggtactcaag ttggtgaagt 180
cgtttcaac acctccatga cagggttaatt tgttatttg ctgcttcac tggcttata 240
taatcttgt 249

<210> 23

<211> 308

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (171)..(190)

<400> 23

```
ggttctgcat ttagcttct gtgattgctt tcaacatccg agtgaatat agccccttat    60
gatctttgag aatcacagca cctgaactta tttgtttt ctttcacga agagggcacc    120
tgaactttgt tcaagccatg acctttagt tctagaaaag ttcattgtga gtgtgtgtgt    180
gtgtgtgtgt ttccctgtct gaaactttt gggtgttgca agatctggc gatgcgcat    240
ccaaggaggc ttgtttgtc cggctgcctg agcgcatgga ttgtaagtgt tttcatcgc    300
catcgtct                                     308
```

<210> 24

<211> 258

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (49)..(85)

<400> 24

```
aaccctcca ctcccttat tccccttgc ttctaactca cccttcct ctctctct    60
ctctcttct ctctctct ctctccatc cgtgcgtctt tctctctac tctgttcac    120
tctgctttc ccactctgc ttcttatcc aatggcgtt ggctgtatac ccaattcct    180
catcatccgc cgccgccgcc gaattccac tagggatcag gtcgccgctt ttccgatga    240
ctgcggttct gtctctgt                                     258
```

<210> 25

<211> 616

<212> DNA

<213> 亚麻

<220>

<221> 重复

<222> (508)..(529)

<400> 25

```
atgtggttg tgcaggatat aaggagaagc attccaggta aactacggcc attgatgacc      60
aacattccag catcctcaat gtactgtgtg agaccagggc ccacccgaag cagaaccacc     120
agcgtttcgg actcttcgcc tcttgcaaca agcagtaatg ctagttctga attgagtgtg     180
agcaacaacg gtctttcatt cgagctggag gatgagatcg ggaatgagag acacggccgt     240
tctccaattc gaggcagggtg attgctgctg ctgctttctc tgaaagctcc ctcccccattg    300
tctcgtctga gtttatatta tatctttgtg gtattattcc ggggtgtgcc ttggctcgat     360
gtttccttgt aaaagaaaag aaaatcccta accagagagt cagtcctatg ctctgtattg     420
tttgtaaagt agattagttc cattggcaaa tccaaagttc ccttacgggtg gtctttagt      480
gcaaaagaat tgccacgtgt acaacatgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgt tagctgattc     540
tcttggaaac gtggcgggtg atacatccca atttcctacc ctttcccaaa ctgagaaatg     600
agaatttata ggtttt                                     616
```

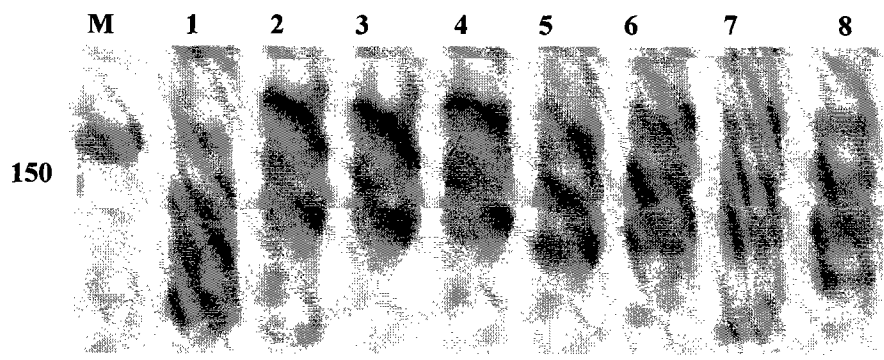


图 1

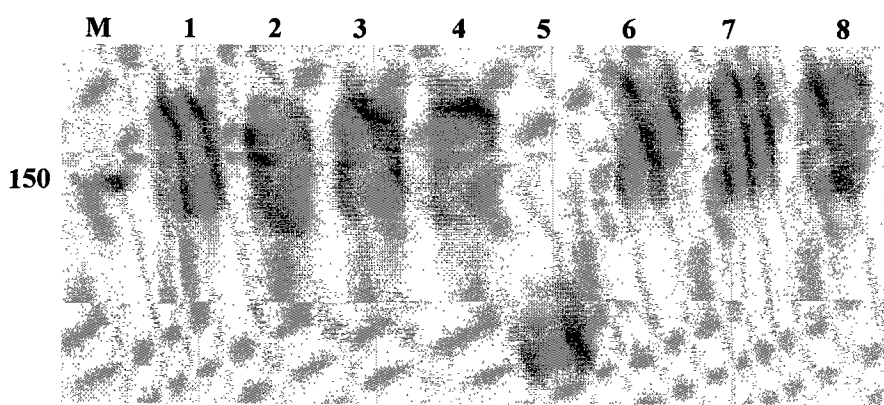


图 2

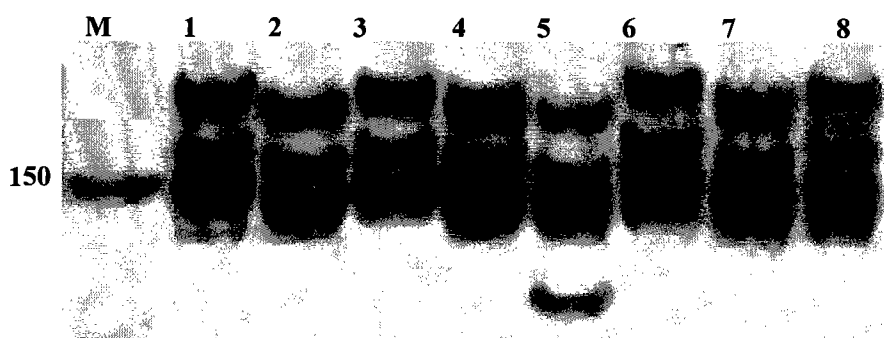


图 3

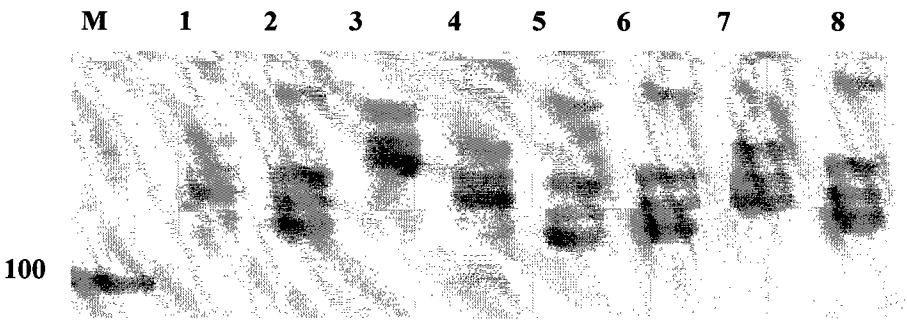


图 4

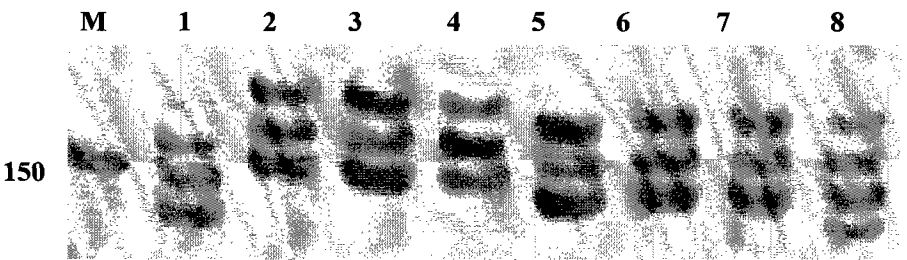


图 5

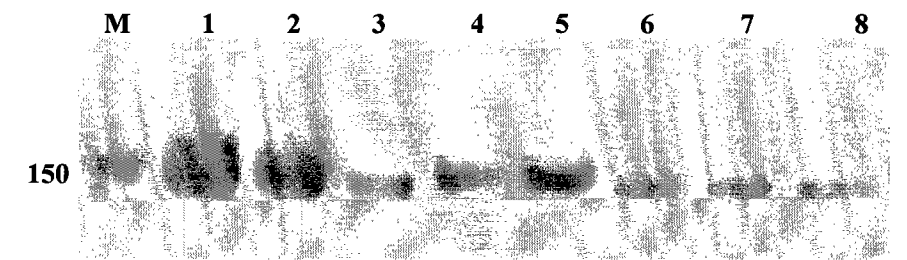


图 6

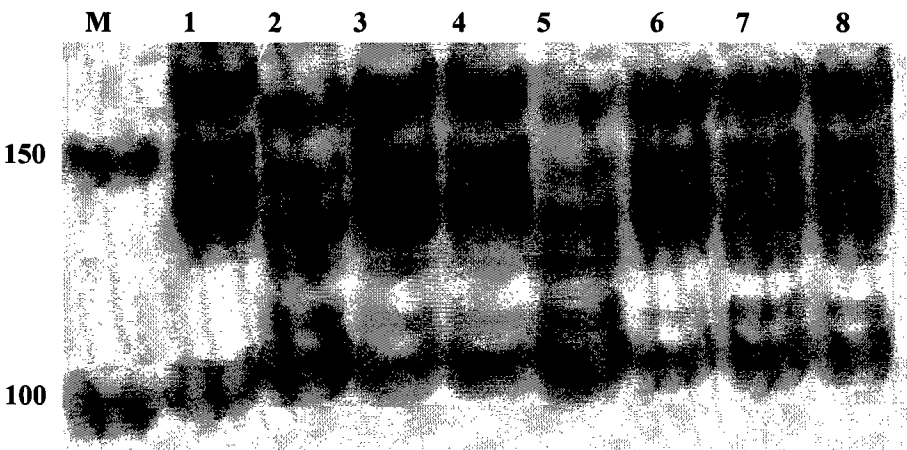


图 7

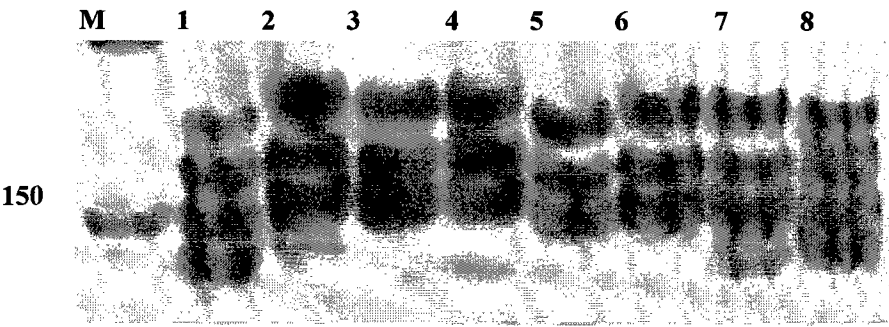


图 8

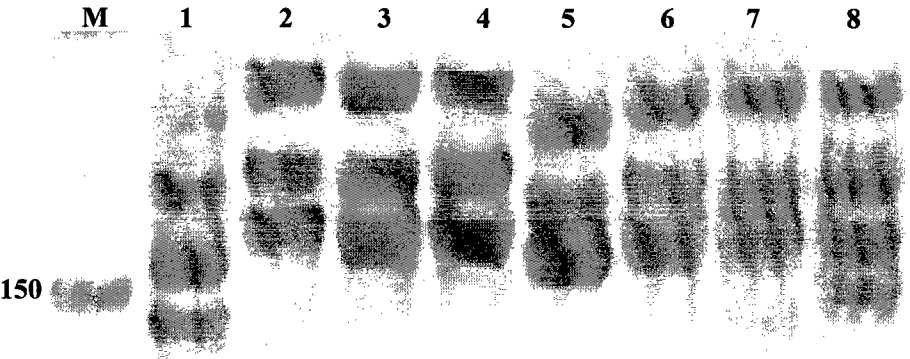


图 9

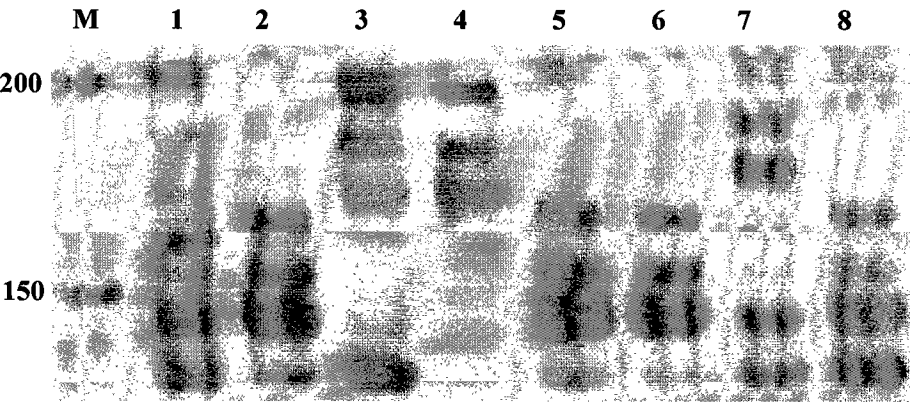


图 10

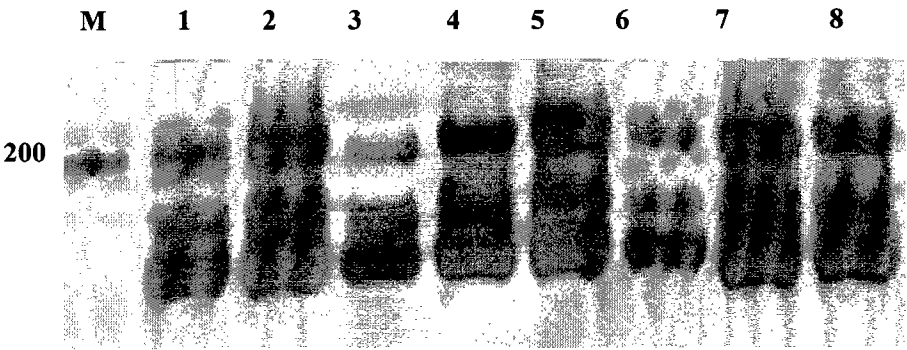


图 11

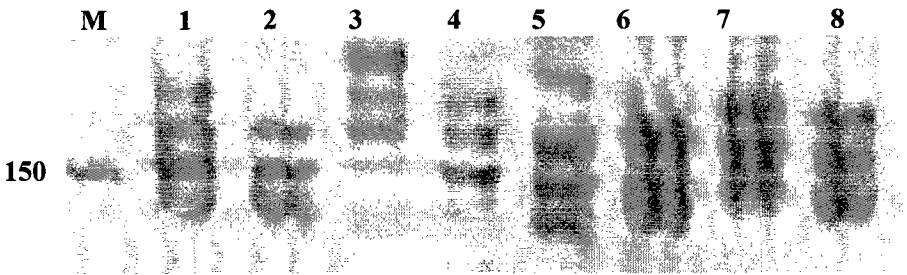


图 12

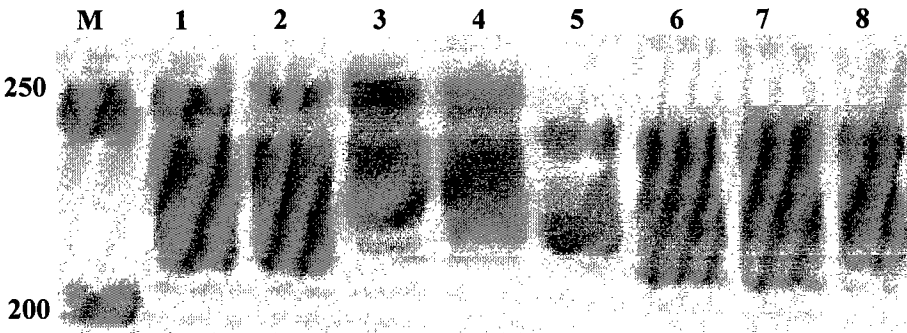


图 13

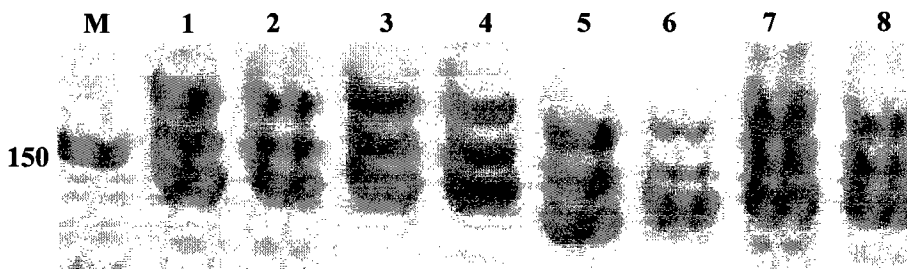


图 14

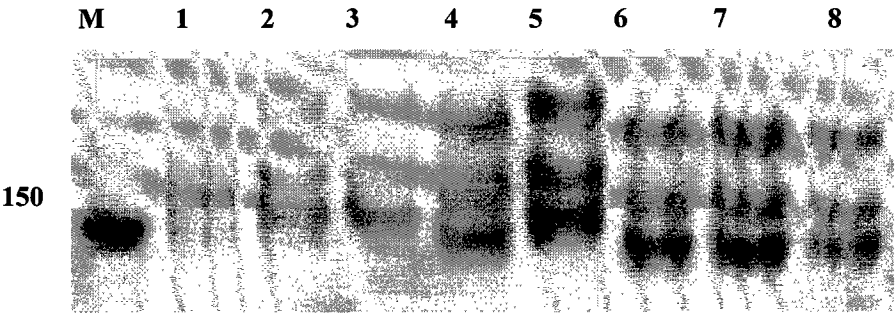


图 15

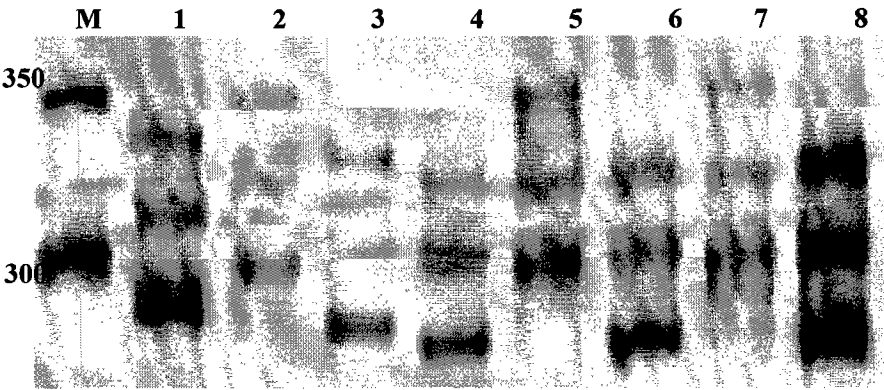


图 16

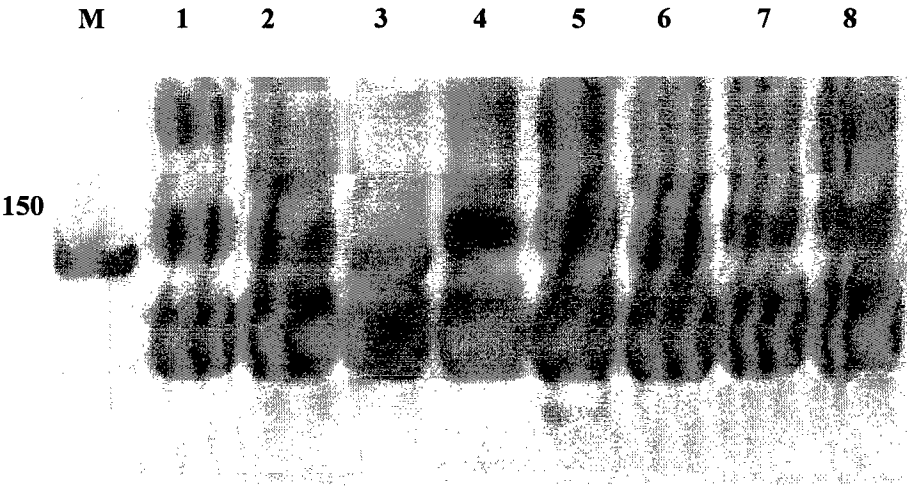


图 17

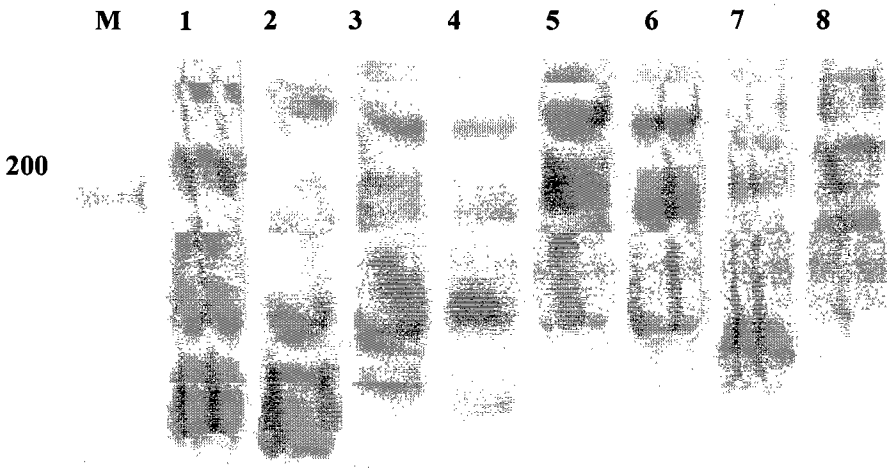


图 18

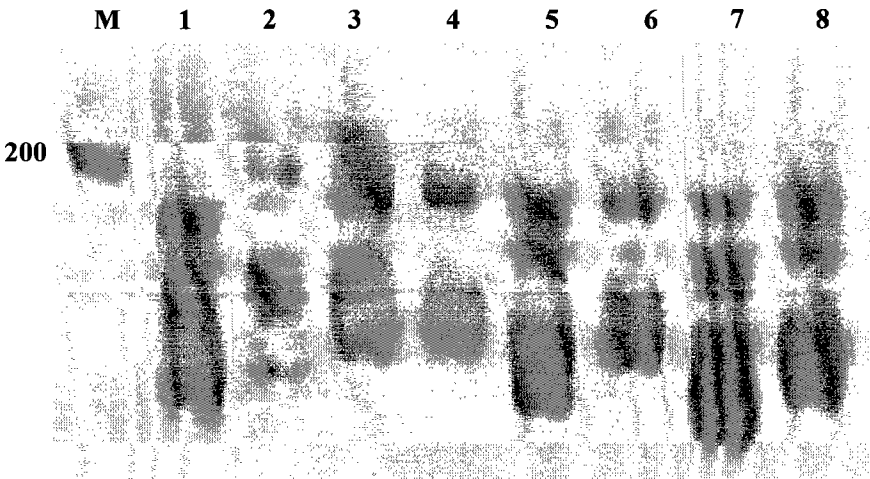


图 19

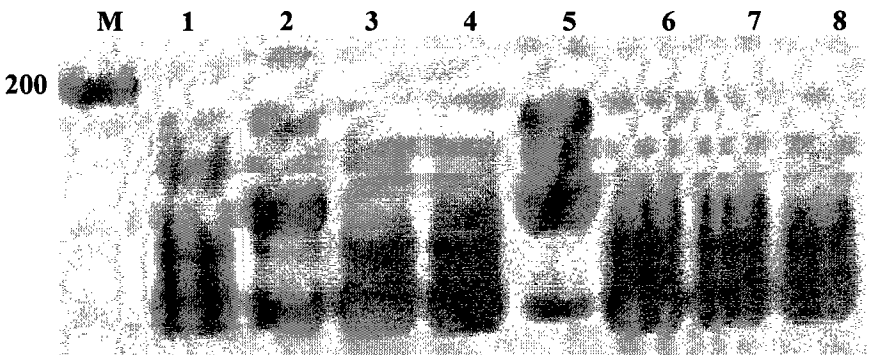


图 20

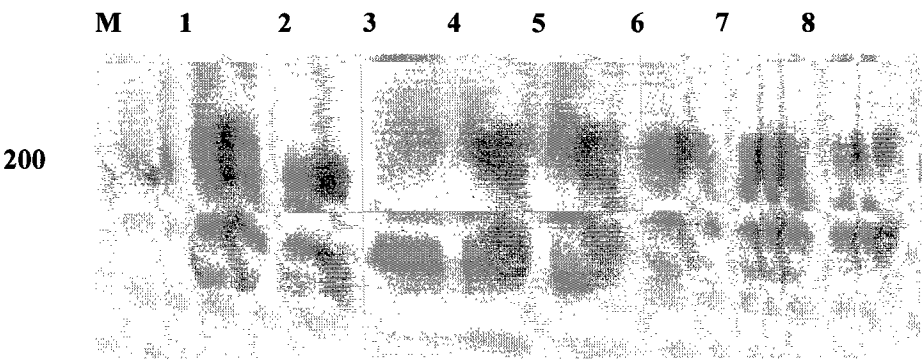


图 21

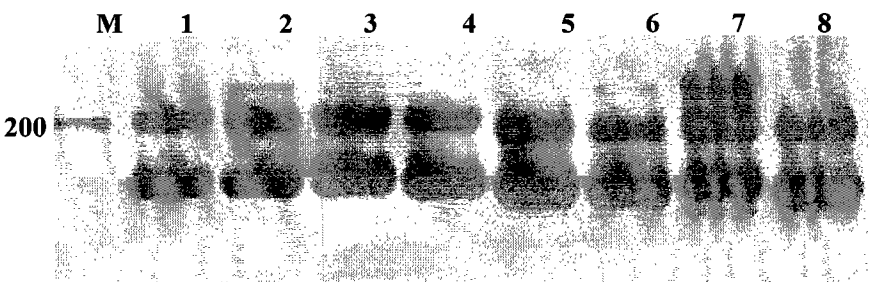


图 22

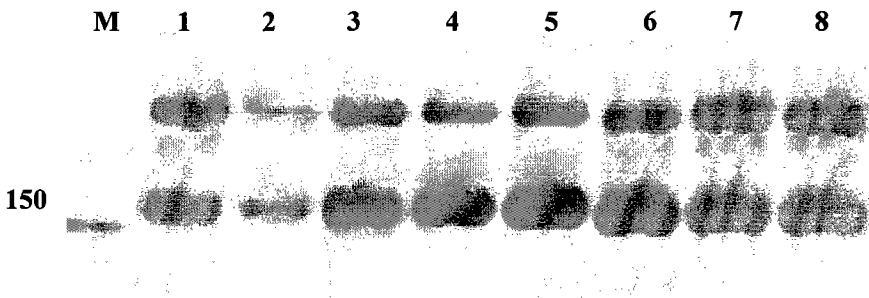


图 23

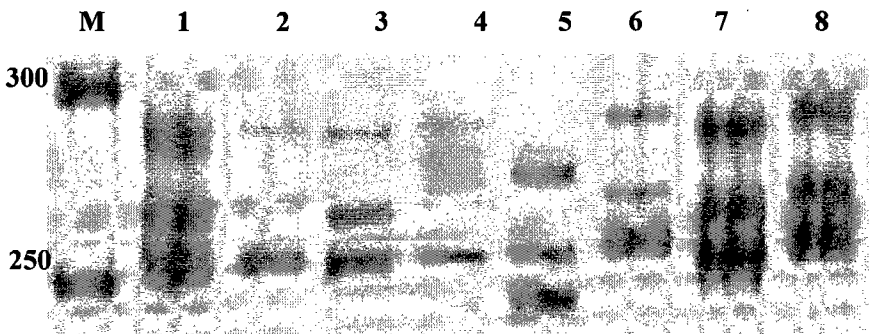


图 24

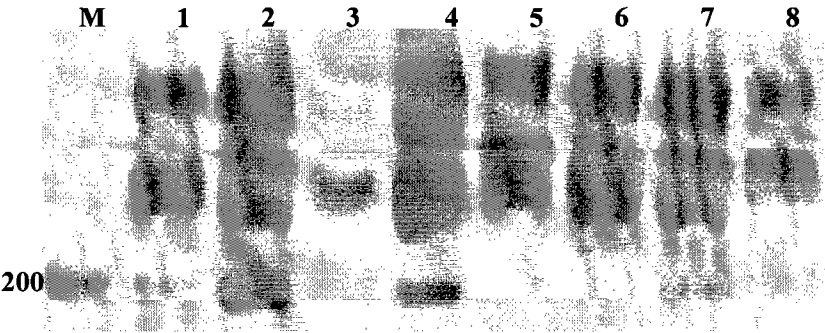


图 25