

(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 103194539 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310120547. 0

(22) 申请日 2013. 04. 09

(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

(72) 发明人 陈建华 栾明宝 王晓飞 许英
孙志民 邹自征

(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
43114

代理人 袁靖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法, 首先提取苧麻种质资源的 DNA, 然后通过 EST-SSR 引物进行 PCR 扩增, 根据扩增带型构建苧麻的分子身份证, 以区分和鉴定苧麻品种。本发明方法具有以下优势: 首先, 分子身份证编码原则方面, 直接规定了第 N 个标记引物的扩增结果对应分子身份证的第 N 位, 省略对标记名称的表述; 同时, 由于每个标记的引物扩增的带型不超过 9, 因此保证了分子身份证每 1 位上也只有 1 位数, 书写非常简洁。其次, EST-SSR 引物形成和实验操作过程简单, 易操作, 扩增带型清晰稳定, 重复性好。该方法为准确鉴别苧麻种质资源, 尤其是同物异名和同名异物现象奠定了基础, 也为新品种保护奠定了基础。

1. 一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 提取各样品苧麻种质 DNA;
- (2) 利用设计的 8 对苧麻 EST-SSR 引物,扩增苧麻的基因组 DNA;
- (3) 记录每个样品每对引物的 DNA 扩增带型;
- (4) 根据 DNA 扩增带型区分鉴定苧麻品种;

所述的 8 对苧麻 EST-SSR 引物序列如下:

ibfc50 :F:AACAATCCAGGAGTGGCAATC

R:ACAAGCGAAGATCGTCTCATC ;

ibfc40F:TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG

R:CAACTTTCTTAAACCACTTTTCG ;

Ibfc27F:AGCCAGGTTCCAGAAGTCC

R:CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC ;

Ibfc11F:GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG

R:ACTCAATACATACACGGCACTAG ;

ibfc65F:ACGAACCACAACACAGAGAG

R:ACGAGGGAACACCAGAGAG ;

ibfc62F:GAAACTATTTCCACCAACAAAG

R:ACACACATTCTACACACC ;

ibfc53F:GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC

R:CGGCTTCGCTTTAGGATTTG ;

ibfc20F:AGTGCGGAGATAACTGTTC

R:GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC。

2. 根据权利要求 1 所述的利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法,其特征在于,PCR 反应体系:20 μ L,

体系组成	终浓度
Mg ²⁺	2.0mmol/L
Taq Buffer	1 $\times$
dNTP Mix	200 μ mol/L
Taq Enzyme	1U
Primers	0.25 μ mol/L
DNA	90ng

体系中余量为水。

3. 根据权利要求 1 所述的利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法,其特征在于,PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,根据引物的退火温度复性 50sec,72 $^{\circ}$ C

延伸 1min, 29 次循环后 72°C 延伸 10min ;

引物 Ibfc50、ibfc40、ibfc27、ibfc11、ibfc65、ibfc62、ibfc53、ibfc20 的退火温度分别为 :50° C、52° C、56° C、51° C、60° C、54° C、56° C、54° C。

4. 根据权利要求 1 所述的利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法, 其特征在于, 步骤 (4) 具体是对每个样品不同的 DNA 扩增带型赋值, 构建苧麻 SSR 分子标记身份证, 以区分苧麻品种。

5. 根据权利要求 4 所述的利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法, 其特征在于,

首先将每个样品分别加入 1 个引物对扩增, 即每对引物扩增出来的带型均不超过 9 种, 然后将每对引物扩增出来的所有带型种类均从 1 开始按序编号, 扩增的条带模糊不清, 无法正确辨别带型以 0 表示, 最后将每个样品的每对引物的带型编号依次组合在一起, 形成 8 位的分子身份证。

6. 根据权利要求 1 或 4 或 5 所述的利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法, 其特征在于, 根据所述的 8 对引物区分 108 个苧麻品种。

一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物品种的分子生物学鉴定方法技术领域,具体涉及一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法。

背景技术

[0002] 苧麻 (*Boehmeria nivea* L. Gaud), 又叫“中国草”, 起源于中国, 为荨麻科苧麻属的多年生宿根性草本植物, 是中国特色的天然纺织原料^[1]。除传统的纤维价值外, 苧麻的药用价值、饲料用途、水土保持、工业原料、生物能源等多功能用途已开始受到关注^[2-5]。迄今为止, 我国是收集、保存苧麻属种质资源最多的国家, 仅国家种质长沙苧麻圃就拥有 2000 多份材料, 其中的栽培资源已广泛为育种和生产所利用^[6]。

[0003] 在收集种质资源的过程中发现, 苧麻存在同物异名和同名异物现象。而且, 随着选育品种的增加, 面对如此多的新种质, 进行品种鉴定不仅对苗木繁育具有重要意义, 也是保护这些品种知识产权的需要。传统上苧麻一般采用形态性状进行种质鉴定。采用田间调查品种性状的方法, 时间长, 费用高; 且苧麻为宿根性多年生植物, 生命周期长, 种质资源间的形态差异性状少, 利用传统的形态学性状鉴定方法区分种质较为困难。随着 DNA 分子标记的不断发展和完善, 从分子水平上对种质的遗传特异性快速、准确、经济、不受环境条件影响的鉴定成为可能。

[0004] 我们课题组 2010 年利用 ISSR 分子标记技术构建了 42 份苧麻种质的分子身份证^[7]以区分和鉴定品种。但是 ISSR 标记扩增结果相对不稳定, 重复性差。SSR (simple sequence repeats) 分析技术具有染色体上分布均匀、多态性丰富、共显性、分辨率高和易于检测等优点^[8], 自开发以来就成为最为有效构建许多作物指纹图谱的工具^[9]。高运来等^[10]利用 43 对 SSR 引物对黑龙江省 6 个积温带的 83 个大豆品种构建了分子身份证。王黎明等^[11]利用 41 对 SSR 引物构建了 142 份甜高粱的分子身份证。陈昌文等^[12]利用 8 对 SSR 引物构建了 176 份桃种质资源的分子身份证。

[0005] 目前, 尚未有利用 SSR 分子标记构建苧麻分子身份证的方法。

发明内容

[0006] 本发明旨在创立一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法。

[0007] 一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法, 包括以下步骤:

[0008] (1) 提取各样品苧麻种质 DNA;

[0009] (2) 利用设计的 8 对苧麻 EST-SSR 引物, 扩增苧麻的基因组 DNA;

[0010] (3) 记录每个样品每对引物的 DNA 扩增带型;

[0011] (4) 根据 DNA 扩增带型区分鉴定苧麻品种;

[0012] 所述的 8 对苧麻 EST-SSR 引物序列如下:

[0013] ibfc50 :F:AACAATCCAGGAGTGGCAATC

[0014] R:ACAAGCGAAGATCGTCTCATC;

- [0015] ibfc40F:TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG
 [0016] R:CAACTTTCTTAAACCACTTTCG ;
 [0017] Ibfc27F:AGCCAGGTTCCAGAAGTCC
 [0018] R:CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC ;
 [0019] Ibfc11F:GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG
 [0020] R:ACTCAATACATACACGGCACTAG ;
 [0021] ibfc65F:ACGAACCACAACACAGAGAG
 [0022] R:ACGAGGGAACACCAGAGAG ;
 [0023] ibfc62F:GAAACTATTTCCACCAACAAAG
 [0024] R:ACACACATTCTTACACACC ;
 [0025] ibfc53F:GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC
 [0026] R:CGGCTTCGCTTTAGGATTTG ;
 [0027] ibfc20F:AGTGCGGAGATAACTGTTC
 [0028] R:GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC。
 [0029] PCR 反应体系 :20 μ L,
 [0030]

体系组成	终浓度
Mg ²⁺	2.0mmol/L
Taq Buffer	1×
dNTP Mix	200 μ mol/L
Taq Enzyme	1U
Primers	0.25 μ mol/L
DNA	90ng

- [0031] 体系中余量为水。
 [0032] PCR 扩增程序 :95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 1min,根据引物的退火温度复性 50sec,72℃ 延伸 1min,29 次循环后 72℃ 延伸 10min ;
 [0033] 引物 ibfc50、ibfc40、ibfc27、ibfc11、ibfc65、ibfc62、ibfc53、ibfc20 的退火温度分别为 :50° C、52° C、56° C、51° C、60° C、54° C、56° C、54° C。
 [0034] 步骤(4)是对每个样品不同的 DNA 扩增带型赋值,构建苧麻 SSR 分子标记身份证,以区分苧麻品种。
 [0035] 首先将每个样品分别加入 1 个引物对扩增,即每对引物扩增出来的带型均不超过 9 种,然后将每对引物扩增出来的所有带型种类均从 1 开始按序编号,扩增的条带模糊不清,无法正确辨别带型以 0 表示,最后将每个样品的每对引物的带型编号依次组合在一起,形成 8 位的分子身份证。
 [0036] 上述方法根据所述的 8 对引物可以区分 108 个苧麻品种。

[0037] 本发明方法中,相对于我们实验室以前利用 ISSR 分子标记技术构建的苧麻分子身份证具有以下优势。首先,分子身份证编码原则方面,直接规定了第 N 个标记引物的扩增结果对应分子身份证的第 N 位,因此省略对标记名称的表述;同时,由于每个标记的引物扩增的带型总数不超过 9,从 1 开始按序编号,扩增的条带模糊不清,无法正确辨别带型以 0 表示,因此保证了分子身份证每 1 位上也只有 1 位数,相比以前的苧麻分子身份证,书写非常简洁。其次,筛选的 EST-SSR 引物好,实验操作过程简单,易操作,扩增带型清晰稳定,重复性好。苧麻 SSR 分子标记身份证方法的确立,为准确鉴别苧麻种质资源,尤其是同物异名和同名异物现象奠定了基础,也为新品种保护奠定了基础。

附图说明

[0038] 图 1 为引物 ibfc50 在 1-46 种质中的扩增图;

[0039] 其中前 5 个泳道分别代表 5 个带型,第 7 个泳道为第 6 个带型,第 15 个泳道为第 7 个带型,第 18 个泳道为第 8 个带型,第 26 个泳道为第 9 个带型;

[0040] 图 2 为引物 ibfc65 扩增的 6 种带型示意图。

具体实施方式

[0041] 以下结合实施例旨在进一步说明本发明,而非限制本发明。

[0042] 实施例 1

[0043] 1 材料与方法

[0044] 1.1 材料

[0045] 108 份苧麻种质资源。原产地来自于中国、日本、印度尼西亚、缅甸 4 个国家。其中国外种质资源 5 份,国内种质资源 103 份。国内种质资源包括部分主栽地区的地方品种和全国各苧麻育种单位育成的品种(品系)。以上材料均种植于国家长沙苧麻种质圃。

[0046]

表 1 108 份品种资源			
品种	来源地	品种	来源地
瓦窑苧麻	广西防城县	宁都大白麻	江西宁都县
赣杂 2 号	江西宜春	湘苧 1 号	湖南沅江市
庙坝苧麻	四川	新民青麻	贵州道真县
思茅红苧麻	云南普洱县	油漆麻	湖南大庸县
水箐青麻	重庆	白叶麻	江西吉安县
宜春铜皮青	江西宜春市	黎川厚皮苧麻	江西黎川县
鸭池白麻	贵州清镇县	波阳黄叶麻	江西波阳县
荣昌苧麻	重庆	小青杆	四川省渠县

[0047]

广东黄皮莞 2 号	广东	宜黄家麻	江西资溪县
青叶苧麻		咸宁大叶绿	湖南咸宁县
贺县家麻	广西贺县	野莞子	江西永丰县
广皮麻	江西瑞昌县	天台铁麻	浙江天台县
卷洞土麻	重庆	大叶红蚱蜢	江西永丰县
栗木青麻	贵州罗甸县	江口青皮苧麻	贵州
大刀麻	贵州平塘县	龙塘白麻	重庆
黎平青麻	贵州黎平县	武昌山坡苧麻 1 号	湖北
里达苧麻	云南富宁县	锦屏青麻	贵州锦屏县
革步青麻	广西隆林县	青皮秆	江西上高县
桐木青麻	广西象州县	分宜黄庄莞	江西分宜县
青皮大麻 1 号	重庆	黄九麻	湖南湘乡县
高安麻	江西高安县	广皮麻	江西瑞昌县
余江麻	江西余江县	黔苧 1 号	贵州麻科所
福利丝麻	重庆	娄山黄皮麻	贵州遵义市
务川白麻	贵州务川县	安龙苧麻 2 号	四川安龙县
宣汉丛麻	四川	岭巩青皮麻	贵州岭巩县
南充苧麻	四川南充县	日本苧麻 7 号	日本
西宁线麻	重庆巫溪县	协力青麻	重庆
蒲圻大叶绿 1 号	湖北	苦瓜青	湖南宁远县
武隆红杆	重庆武隆县	隆回白麻 1 号	湖南隆回县
小骨白	江西武宁县	永善苧麻	云南永善县
榕江白麻 1 号	贵州榕江县	红骨筋	湖北广济县
牛蹄麻	湖南加禾县	玉山麻	江西玉山县
南城厚皮苧 麻	江西南城县	印尼 1 号	印尼
黄青莞	江西吉水县	四川高堤白麻	重庆
资溪麻	江西宜黄县	印尼 2 号	印尼
大田黄杆苧 麻	云南富宁县	山青白麻	重庆
宁都野麻	江西南城县	恩施青麻 2 号	湖北恩施县
黑皮麻	广西荔蒲县	新宁青麻	湖南新宁县
天宝麻	江西宜丰县	洗马土麻	广西
长沙青叶麻	湖南长沙县	印尼 3 号	印尼
川苧 2 号	四川达县	遵义串根麻	贵州遵义县
南城薄皮苧 麻	江西南城县	大浴见刀白	湖北大冶县
宁都青苧麻	江西南城县	小叶芦秆	江西永丰县

[0048]

满娘苧麻	湖北恩施县	平昌家麻	四川平昌县
绿竹白	江西萍乡市	耒阳黄壳麻	湖南耒阳市
大浴见刀白	湖北大冶县	高堤青麻	重庆
衢县苧麻	浙江衢县	定业苧麻	广西
竹子鞭	江西永丰县	勐拉苧麻	缅甸
阳朔鸡骨白	广西阳朔县	盛坝线麻	湖北恩施县
虎皮麻	江西南丰县	新铺青麻	贵州遵义市
阳新细叶绿	湖北阳新县	天排山野麻	广西
湘苧6号	湖南沅江市	黄金苧	湖北建始县
天宝麻	江西宜丰县	崇仁苧麻	湖南农大
黄平黄秆麻	贵州黄平县	葛根麻	湖南永顺县

[0049] 1.2 方法

[0050] 1.2.1 基因组 DNA 的提取

[0051] 在国家种质长沙苧麻圃取 108 份苧麻种质(表 1)植株的新发出的嫩芽,利用天根试剂盒提取 DNA。提取后的 DNA 通过电泳检测浓度后,计算样品 DNA 浓度,并稀释到所需浓度。

[0052] 1.2.2 引物设计与合成

[0053] 利用 SSRhunter 结合人工搜索寻找含有 SSR 的苧麻 EST 序列,搜索的标准为:单核苷酸的重复次数 ≥ 16 ,二核苷酸的重复次数 ≥ 6 ,三核苷酸的重复次数 ≥ 4 ,四核苷酸的重复次数 ≥ 3 ,五核苷酸的重复次数 ≥ 3 。六核苷酸的重复次数 ≥ 2 。为进一步利用苧麻 EST 建立 SSR 标记,在剔除 SSR 旁邻序列小于 20bp 的 EST 后,对余下的 EST-SSR 用软件 Primer5 设计苧麻 SSR 引物。设计好的 SSR 引物在南京金斯特公司合成。

[0054] 1.2.3 SSR-PCR 分析

[0055] PCR 反应体系:20 μ L 反应体系组成见表 2

[0056] 表 2PCR 反应体系组成

[0057]

体系组成	终浓度
Mg ²⁺	2.0mmol/L
Taq Buffer	1 $\times$
dNTP Mix	200 μ mol/L each
Taq Enzyme	1U
Primers	0.25 μ mol/L each
DNA	90ng

[0058] PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,50-60 $^{\circ}$ C 之间(依引物的退火温度而定)复性 50sec,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,29 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增在 PTC-200 扩增

仪上进行(MJ Research, Inc.)。

[0059] 1.2.4PCR 扩增产物检测

[0060] 扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用张军^[13]的方法进行银染。记录带型。

[0061] 1.2.5 分子身份证的构建

[0062] 用筛选出多态性好的 SSR 引物,对各种质资源的苧麻基因组总 DNA 样品进行 PCR 扩增。

[0063] 对每个引物不同带型进行赋值。

[0064] 采用东北农业大学开发的资源特征分析软件 IAnalysis1.0(登记号为 2007SR11870) 建立品种分子 ID。

[0065] 2 结果与分析

[0066] 2.1 苧麻 EST-SSR 引物的特点

[0067] 从 NCBI 下载的 320 条 EST 序列中,共有 70 条含有 SSR 序列,其中 6 条含有 2 条以上的 SSR 序列。苧麻的 EST-SSR 种类丰富,单核苷酸至六核苷酸重复都能检出。但各类型的 EST-SSR 出现的频率大不相同。共设计了 76 对 SSR 引物,所设计的苧麻 EST-SSR 引物的优势重复单元为三核苷酸、单核苷酸和二核苷酸。其中三核苷酸基元所占的比例最高,为 46.1%;单碱基基元所占比例次之,为 19.7%;双碱基基元所占比例达到 15.8%。四碱基、五碱基和六碱基所占的比例较低,为 3.9%-7.9% 之间。

[0068] 2.2 苧麻 EST-SSR 引物的遗传多样性

[0069] 利用 76 对 EST-SSR 引物,对 62 份苧麻种质 DNA 进行扩增,结果表明,70 对引物进行了有效扩增,50 对引物具有多态性,27 对引物扩增出了清晰条带。利用 popgene32 软件,考察了 27 对引物的遗传多样性(表 3)。结果表明,27 对 SSR 引物中,每对引物扩增的位点数在 2-5 之间,其中 19 对引物扩增出 2 个位点,7 对引物扩增出 3 个位点,1 对引物扩增出 5 个位点。27 对引物的观察杂合度(H_0) 在 0.16 到 0.93 之间,期望杂合度在 0.21 到 0.66 之间。14 对引物偏离 Hardy - Weinberg ($P < 0.05$)。

[0070] 2.3 分子身份证的构建

[0071] 分别记录 27 对引物 108 份苧麻种质的 PCR 扩增带型。每对引物扩增带型分别记为 1, 2, ..., n。然后把数据输入 EXCEL 表格中。首先删除扩增模糊不清比例超过 4% 的引物,共有 6 对引物被删除,分别是 ibfc35、ibfc10、ibfc28、ibfc16、ibfc69、ibfc56。其次删除与其他引物相似系数超过 0.8 的引物,共有 2 对引物被删除,分别是 ibfc19 和 ibfc24。然后根据引物的特异性指数进行分子身份证构建。如采用 2 个以上标记组合的特异等位基因来区分苧麻种质资源,当 2 个标记不能完全区分所有种质时,则通过增加标记数的方法来区分,直到把所有种质区分开为止。即第 k 个标记的带型结果 n 对应分子身份证的第 k 位。例如在本发明中利用 k=8 对引物(ibfc20、ibfc53、ibfc65、ibfc40、ibfc50、ibfc11、ibfc27、ibfc62 引物序列)可以把 108 份苧麻种质资源区分开。构建了具有 8 位的苧麻分子身份证(表 4)。如:瓦窑苧麻的 ID 为 43311132,分子身份证的第一位 4,表示引物 ibfc20 (k_i) 扩增出该引物的第四种 (n_j) 带型。分子身份证的第三位 3,表示引物 ibfc65 扩增出该引物的第三种带型。

[0072] 表 4 108 份苧麻种质资源的分子身份证

[0073]

品种名称	ID
瓦窑苎麻	43311132
赣杂 2 号	23122223

[0074]

庙坝苧麻	23413323
思茅红苧麻	24434323
水箐青麻	12435223
宜春铜皮青	24221233
鸭池白麻的	54326123
荣昌苧麻的	25221113
广东黄皮莞 2 号	42444113
青叶苧麻	45425323
贺县家麻	37214303
广皮麻	54215323
卷洞土麻	27221113
栗木青麻	24336333
大刀麻	32227223
黎平青麻	32453122
里达苧麻	34436223
革步青麻	25248123
桐木青麻	24223213
青皮太麻 1 号	24221123
高安麻的	22334133
余江麻	24321233
福利丝麻	13224123
务川白麻	55201333
宣汉从麻	34323323
南充苧麻	35329322
西宁线麻	45221232
蒲圻大叶绿 1 号	24625223
武隆红杆	37225222
小骨白	54221133
榕江白麻 1 号	43226223
牛蹄麻	34233323
南城厚皮	54221333
黄青莞	27226323
资溪麻	53225323
大田黄杆	27235323
宁都野麻	07226123
黑皮麻	37234123
天宝麻 1 号	54215123
长沙青叶麻	43224332
川苧 2 号	24265323
南城薄皮苧麻	72225113
宁都青苧麻	52234112
满娘苧麻	32246322
绿竹白	44424323

[0075]

大浴见刀白	34231123
衢县苎麻	34224223
竹子鞭	44214103
阳朔鸡骨白	23217312
虎皮麻	24221312
阳新细叶绿	44426312
湘苎 6 号	23418313
宁都大白麻	24231213
湘苎 1 号	14246213
新民青麻	17646213
油漆麻	12326313
白叶麻	74323113
黎川厚皮苎麻	35326332
波阳黄叶麻	47640132
小青杆	11324132
宜黄家麻	43325322
咸宁人叶绿	74626233
野茺子	44235332
天台铁麻	32211132
大叶红蚱蜢	34415312
江口青皮	30265122
龙塘白麻	30244122
武昌山坡苎麻 1 号	74236133
锦屏青麻	50236133
青皮杆	44224123
分宜黄庄茺	34231122
黄九麻	17221222
广皮麻	14446232
黔苎 1 号	04025033
娄山黄皮麻	54233133
安龙苎麻 2 号	44233032
岭巩青皮麻	25221133
日本苎麻 7 号	54220233
协力青麻	72334332
苦瓜青	44424122
隆回白麻 1 号	04465123
永善苎麻	77333223
红骨筋	37621333
玉山麻	44225132
印尼 1 号	20225132
四川高堤白麻	72334222
印尼 2 号	02225232
山青白麻	21541132

[0076]

恩施青麻 2 号	23424323
新宁青麻	54224222
洗马土麻	72430222
印尼 3 号	72237322
遵义串根麻	27637332
大浴见刀白	54615322
小叶芦秆	77225223
平昌家麻	34225212
耒阳黄壳麻	24225232
高堤青麻	14243222
定业苧麻	22234132
勐拉苧麻	47321322
盛坝线麻	25313123
新铺青麻	74325232
天排山野麻	14234233
黄金苧	54334132
崇仁苧麻	34432323
葛根麻	24325222
天宝麻	22333332
黄平黄秆麻	57224333

[0077] 0 表示扩增的条带模糊不清,无法正确辨别带型。

[0078] 3 讨论

[0079] 3.1 本发明的分子身份证编码原则书写简洁

[0080] 王静毅等^[14]对香蕉构建的指纹图谱也可认为是一种分子身份证,作者采用字母加数字的方法表示分子身份证的位数和 SSR 引物扩增的不同等位基因,例如,将第 1 个标记的引物扩增的第 11 个等位基因命名为 A11,这造成了分子身份证的字符串编码位数过多。以前本申请人课题组利用 ISSR 标记构建苧麻分子身份证,采用的是 01 表示法,位数达到 16 位。而在本发明中,直接规定了第 N 个标记引物的扩增结果对应分子身份证的第 N 位,因此省略对标记名称的表述;同时,由于每个标记的引物扩增的带型不超过 9,因此保证了分子身份证每 1 位上也只有 1 位数,相比以前的苧麻分子身份证,书写非常简洁。

[0081] 表 3.8 对 SSR 引物的特征

[0082]

Lo cu s	Primer sequences (5'-3')	GenBank Accession no.	Size (bp)	Ta (°C)	N _A	H _O	H _E	HW E P valu e
ibf c5 0	F: AACAAATCCAGGAGTGGCAATC R: ACAAGCGAAGATCGTCTCATC	ES584549 .1	157	50	5	0.39	0.4 8	0.14
ibf c4 0	F: TGTATAGAACTGAGTAAATG ATTG R:	FG588929 .1	147	52	3	0.42	0.4 6	0.09

[0083]

	CAACTTTCTTAAACCACTTTCG							
ibf c2 7	F: AGCCAGGTTCCAGAAGTCC R: CATAATCACAAAGTCTCGGTTC C	ES584570 .1	132	56	2	0.45	0.4 9	0.58
ibf c1 1	F: GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG R: ACTCAATACATACACGGCACTA G	ES584571 .1	122	51	2	0.32	0.5 0	0.00
ibf c6 5	F: ACGAACCACAACACAGAGAG R: ACGAGGGAACACCAGAGAG	FG588888 .1	90	60	3	0.41	0.4 8	0.00
ibf c6 2	F: GAAACTATTTCCACCAACAAA G R: ACACACATTCCTACACACC	GH57185 8.1	186	54	2	0.39	0.3 1	0.07
ibf c5 3	F: GGCTCAAGTTTGCTCATAGATT C R: CGGCTTCGCTTTAGGATTTG	EH667249 .1	124	56	3	0.62	0.5 9	0.14
ibf c2 0	F: AGTGCGGAGATAACTGTTC R: GGCTACTTTATTCTAAACCAAA C	FG588867 .1	191	54	3	0.44	0.6 6	0.01

[0084] 3. 2SSR 分子标记构建苧麻分子身份证的优势

[0085] 我们前期利用了 ISSR 分子标记技术构建了 42 份苧麻的分子身份证。但是发现, 利用 ISSR 技术扩增的条带较多, 重复性较差, 容易导致人为误差。SSR 分子标记技术, 由于标记方法本身的特性, 其不同品种间每个特定大小的等位基因序列一致, 扩增的条带相对较少, 因此重复性高; 同时 SSR 不需要对模板酶切, 操作简单。这些特点使其应用于分子身份证的构建成为可能。根据大麦谱系对亲本及其后代品种中 SSR 的分析, SSR 在不同世代间遗传稳定^[15]。同一品种不同个体 SSR 的稳定性在水稻中得到证实^[16]。因此, 相对 ISSR 等分子标记技术, 利用 SSR 分子标记技术构建分子身份证具有准确可靠的优势。

[0086] 参考文献

[0087] [1] 卢浩然. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1992

[0088] [2] 藏巩固, 赵立宁, 陈建华, 李育君. 苧麻药用保健价值及其前景开发浅析. 中国麻业, 2002, 24: 27-29.

[0089] [3]. 喻春明, 陈建荣, 王延周. 苧麻分子育种与饲料用苧麻研究进展. 中国麻业科学, 2007, 29: 389-392.

[0090] [4]. 熊和平. 我国麻类生产的现状与政策建议. 中国麻业科学, 2010, 32: 301-304.

[0091] [5] 土小宁, 陈书春. 南方坡耕地的有效水土保持植物-苧麻. 国际沙棘研究与开发, 2007, 5: 45-48.

[0092] [6] 熊和平. 麻类作物育种学. 北京: 中国农业科技出版社, 2008. pp46-50.

[0093] [7] 王晓飞, 陈建华, 栾明宝等. 苧麻种质资源分子身份证构建的初步研究. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 802-805, 810.

- [0094] [8]Morgante M, Olivieri A. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 1993, 3(1):175-182.
- [0095] [9]Gabriela R, Marco A M, Carlos M, Gamalier L, Patricio H. Identification of a minimal microsatellite marker panel for the fingerprinting of peach and nectarine cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2008, 11(5):1-12.
- [0096] [10] 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 李文福, 蒋洪蔚, 李灿东, 姚丙晨, 胡国华, 陈庆山. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建. *作物学报*, 2009, 35(2):211-218.
- [0097] [11] 王黎明, 焦少杰, 姜艳喜. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建. *作物学报*, 2011, 37(11):1975-1983.
- [0098] [12] 陈昌文, 曹珂, 王力荣. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建. *中国农业科学*, 2011, 44(10):2081-2093.
- [0099] [13] 张军, 武耀廷, 郭旺珍. 棉花微卫星标记的 PAGE/ 银染快速检测. *棉花学报*, 2000, 12(5):267-269.
- [0100] [14] 王静毅, 陈业渊, 黄秉智. 部分香蕉品种 SSR 指纹图谱的构建. *果树学报* 2009, 26(5):733-738.
- [0101] [15] Russell J, Fuller J, Young G, Thomas B, Taramino G, Macaulay M, Waugh R, Powell W. Discrimination between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, 1997, 40:442-450.
- [0102] [16] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor Appl Genet*, 1997, 94:61-67.

[0001]

序列表

<110> 中国农业科学院麻类研究所

<120> 一种利用 SSR 分子标记鉴定苧麻品种的方法

<130> 无

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 引物 ibfc50F

<400> 1

aacaatccag gagtggcaat c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 引物 ibfc50R

<400> 2

acaagcgaag atcgtctcat c

21

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 引物 ibfc40F

<400> 3

tgtatagaac tgagtaaatg attg

24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 引物 ibfc40R

[0002]

<400> 4	
caacttttt aaaccacttt cg	22
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc27F	
<400> 5	
agccagggttc cagaagtc	19
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc27R	
<400> 6	
cataatcaca aagtctcggt tcc	23
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc11F	
<400> 7	
gcggaggctt aatttgcctt g	21
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc11R	
<400> 8	
actcaataca tacacggcac tag	23
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc65F	

[0003]

<400> 9	
acgaaccaca acacagagag	20
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc65R	
<400> 10	
acgagggaac accagagag	19
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc62F	
<400> 11	
gaaactattt ccaccaaca ag	22
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc62R	
<400> 12	
acacacattc ctacacacc	19
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc53F	
<400> 13	
ggetcaagtt tgetcataga ttc	23
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 引物 ibfc53R	

[0004]

<400>	14	
cggttcgct ttaggttg		20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	引物 ibfc20F	
<400>	15	
agtgcggaga taactgtc		19
<210>	16	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	引物 ibfc20R	
<400>	16	
ggctacttta ttctaaacca aac		23

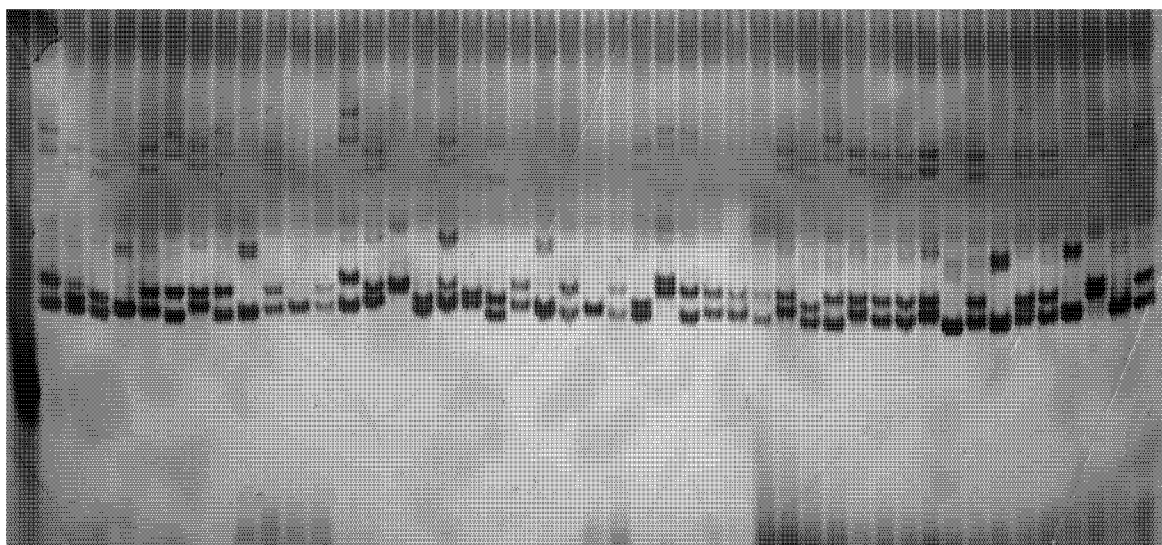


图 1

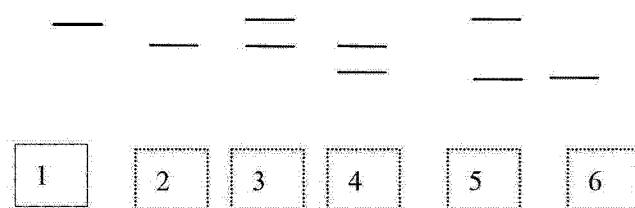


图 2