



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106011135 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610490294.X

(22)申请日 2016.06.29

(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 栾明宝 陈建华 王晓飞 许英
孙志民

(74)专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11369

代理人 史霞

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

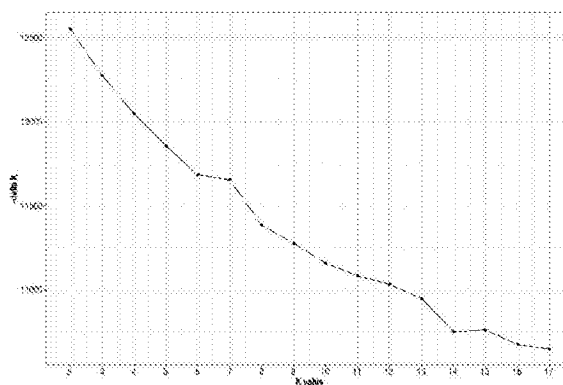
权利要求书1页 说明书12页
序列表40页 附图2页

(54)发明名称

与苧麻茎粗关联的SSR标记及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种与苧麻茎粗关联的SSR标记,包括SSR标记RAM290。本发明还公开了所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记在培育苧麻新品种中的用途。本发明还公开了所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记在稳定或提高苧麻产量中的用途。本发明提供的SSR标记与苧麻的茎粗相关,而茎粗与苧麻的产量直接相关,本发明为今后筛选优良种质、基因定位和克隆以及分子标记辅助育种打下基础,本发明的SSR标记能够用于苧麻的分子育种及提高苧麻产量中。对于现阶段我国苧麻的育种和生产具有重要意义。同时,本发明也为分子标记育种提供了有益的借鉴。



1. 一种与苕麻茎粗关联的SSR标记,包括SSR标记RAM290。
2. 如权利要求1所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记,其特征在于,还包括SSR标记RAM109、RAM131和RAM156。
3. 如权利要求1所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记,其特征在于,还包括SSR标记RAM39。
4. 如权利要求1所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记,其特征在于,所述SSR标记RAM290与苕麻头季麻、二季麻和第三季麻的茎粗相关联。
5. 如权利要求2所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记,其特征在于,所述SSR标记RAM109、RAM131和RAM156与苕麻头季麻和二季麻的茎粗相关联。
6. 如权利要求3所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记,其特征在于,所述SSR标记RAM39与苕麻的二季麻和第三季麻的茎粗相关联。
7. 如权利要求3所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记,其特征在于,所述SSR标记RAM39还与苕麻的头季麻和二季麻的分株数相关联。
8. 权利要求1所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记在培育苕麻新品种中的用途。
9. 如权利要求1所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记在稳定或提高苕麻产量中的用途。

与苧麻茎粗关联的SSR标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种与苧麻茎粗关联的SSR标记及其应用。

背景技术

[0002] 苧麻(*Boehmerianivea*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,是具有中国特色的天然纺织原料。目前,苧麻是我国第二大纤维作物。尽管苧麻产量相比以前已有了较大提高,但提高纤维产量仍是苧麻育种的重要目标。作物的产量性状是极其复杂的数量性状,是作物整个生命周期内一系列生长发育过程和环境互作的最终产物,通常由多基因控制。苧麻纤维产量构成要素包括株高、茎粗、皮厚、出麻率和分株力等子性状。研究表明,这些性状是数量性状,其遗传受微效多基因控制,通过传统育种技术进行遗传改良效率受限。

[0003] 寻找目标数量性状连锁分子标记,通过分子标记辅助选择,可以有效提高数量性状的遗传改良进程。现代育种有必要利用植物遗传多样性平台,并结合最新的基因组技术来发现新基因或等位基因,用于性状的改良。利用DNA分子标记技术和QTL(quantitative trait loci)作图方法对苧麻产量相关性状的QTL报道较少,报道的连锁分子标记仅有33个,限制了分子标记在育种上的利用。基于连锁不平衡(Linkage disequilibrium,LD)的关联分析(Association analysis)是挖掘新等位基因的有效方法。关联分析以自然群体为研究对象,以长期重组后保留下来的基因(位点)间连锁不平衡为基础,将目标性状表型的多样性与基因(或标记位点)的多态性结合起来分析,可直接鉴定出与表型变异密切相关且具有特定功能的基因位点或标记位点。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是解决至少上述问题和/或缺陷,并提供至少后面将说明的优点。

[0005] 本发明还有一个目的是提供一种与苧麻茎粗关联的SSR标记,以解决苧麻分子育种中连锁分子标记少的问题。

[0006] 本发明再有一个目的是提供与苧麻茎粗关联的SSR标记在培育苧麻新品种中的用途。

[0007] 本发明另有一个目的是提供与苧麻茎粗关联的SSR标记在稳定或提高苧麻产量中的用途。

[0008] 为此,本发明提供的技术方案为:

[0009] 一种与苧麻茎粗关联的SSR标记,包括SSR标记RAM290。

[0010] 优选的是,所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记中,还包括SSR标记RAM109、RAM131和RAM156。

[0011] 优选的是,所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记中,还包括SSR标记RAM39。

[0012] 优选的是,所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记中,所述SSR标记RAM290与苧麻头季

麻、二季麻和三季麻的茎粗相关联。

[0013] 优选的是,所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记中,所述SSR标记RAM109、RAM131和RAM156与苕麻头季麻和二季麻的茎粗相关联。

[0014] 优选的是,所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记中,所述SSR标记RAM39与苕麻的二季麻和三季麻的茎粗相关联。

[0015] 优选的是,所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记中,所述SSR标记RAM39还与苕麻的头季麻和二季麻的分株数相关联。

[0016] 所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记在培育苕麻新品种中的用途。

[0017] 所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记在稳定或提高苕麻产量中的用途。

[0018] 本发明至少包括以下有益效果:

[0019] 与传统QTL定位方法相比,GWAS采用遗传背景丰富的自然群体为材料,不需要花多年时间构建特定的分离群体,具有作图定位精度高、能同时扫描控制目标性状所有关联位点的优点。

[0020] 本发明提供的SSR标记与苕麻的茎粗相关,而茎粗与苕麻的产量直接相关,为今后筛选优良种质、基因定位和克隆以及分子标记辅助育种打下基础,本发明的SSR标记能够用于苕麻的分子育种及提高苕麻产量中。对于现阶段我国苕麻的育种和生产具有重要意义。同时,本发明也为分子标记辅助育种提供了有益的借鉴。

[0021] 本发明的其它优点、目标和特征将部分通过下面的说明体现,部分还将通过对本发明的研究和实践而为本领域的技术人员所理解。

附图说明

[0022] 图1为本发明其中一个实施例中 ΔK 值随亚群个数变化的示意图。

[0023] 图2为本发明107份种质资源的进化树。

[0024] 注:图中每个分枝为一个样品。0.05表示在固定长度的样品间的遗传距离。

[0025] 图3为本发明中SSR标记连锁强度 r^2 统计图的一部分。

具体实施方式

[0026] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0027] 应当理解,本文所使用的诸如“具有”、“包含”以及“包括”术语并不配出一个或多个其它元件或其组合的存在或添加。

[0028] 本发明以107份苕麻自然群体为材料,利用具有多态性的95对SSR分子标记,分析遗传多样性、群体结构等;并对其茎粗、株高、分株力等性状进行一年3个环境重复鉴定以及皮厚、出麻率等性状进行一年2个环境重复鉴定,并对其以上性状和分子标记进行关联分析,发掘与其相关的SSR位点,为苕麻产量性状的QTL定位及其改良等研究提供科学依据。

[0029] 本发明提供一种与苕麻茎粗关联的SSR标记,包括SSR标记RAM290。

[0030] 在本发明的其中一个实施例中,作为优选,所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记中,还包括SSR标记RAM109、RAM131和RAM156。

[0031] 在本发明的其中一个实施例中,作为优选,所述的与苕麻茎粗关联的SSR标记中,

还包括SSR标记RAM39。

[0032] 在本发明的其中一个实施例中,作为优选,所述SSR标记RAM290与苧麻头季麻、二季麻和第三季麻的茎粗相关联。

[0033] 在本发明的其中一个实施例中,作为优选,所述SSR标记RAM109、RAM131和RAM156与苧麻头季麻和二季麻的茎粗相关联。

[0034] 在本发明的其中一个实施例中,作为优选,所述SSR标记RAM39与苧麻的二季麻和第三季麻的茎粗相关联。

[0035] 在本发明的其中一个实施例中,作为优选,所述SSR标记RAM39还与苧麻的头季麻和二季麻的分株数相关联。

[0036] 本发明还提供所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记在培育苧麻新品种中的用途。

[0037] 本发明还提供所述的与苧麻茎粗关联的SSR标记在稳定或提高苧麻产量中的用途。

[0038] 1材料与方法

[0039] 1.1供试材料

[0040] 以107份苧麻核心种质资源为研究材料(见表1)。

[0041] 1.2田间试验和性状调查

[0042] 2014年4月下旬在湖南长沙望城实验基地种植107份苧麻种质资源的扦插苗。行距1m,株距60cm,单行区,每行4株(兜)。随机区组设计,两次重复。2015年6月、8月、10月分别调查头季麻、二季麻、第三季麻的株高、茎粗、皮厚、出麻率、分株力等性状。其中每个小区调查15株的株高、茎粗、皮厚、出麻率;调查4兜麻的分株力。调查方法参照《苧麻种质资源描述规范和数据标准》。

[0043] 1.3SSR分子标记分析

[0044] 利用CTAB植物基因组DNA快速提取试剂盒提取DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测纯度与浓度。参照Chen等的方法进行SSR-PCR。PCR产物烯酰胺凝胶垂直电泳进行检测,银染检测多态性,拍照记录条带。

[0045] 表1 107份苧麻种质资源

[0046]

品种编号	品种名称	品种类型	地理来源	品种编号	品种名称	品种类型	地理来源
1	稀节巴	地方品种	湖南沅江市	515	南城薄皮苕麻	地方品种	江西南城
2	泰山稀节巴	地方品种	湖南沅江市	525	小叶芦秆	地方品种	江西永丰县
6	沅江大叶白	地方品种	湖南沅江市	527	野茭子	地方品种	江西永丰县
8	汉寿肉麻	地方品种	湖南汉寿县	534	小骨白	地方品种	江西武宁县
10	宜章肉麻	地方品种	湖南宜章县	548	高安麻	地方品种	江西高安县
12	坐笼麻	地方品种	湖南平江县	560	羽翎鸡骨白	地方品种	广西阳朔县
14	红脚麻	地方品种	湖南加禾县	573	黑皮麻	地方品种	广西荔浦县
15	牛蹄麻	地方品种	湖南加禾县	579	革步青麻	地方品种	广西藤县
33	葛根麻	地方品种	湖南永顺县	590	贺县家麻	地方品种	广西贺县
40	新宁青麻	地方品种	湖南新宁县	607	桐木青麻	地方品种	广西象州县
55	湘芷1号	新品种	湖南沅江市	684	青叶苕麻	地方品种	海南保亭县
59	青麻苕	地方品种	海南保亭县	787	羽新细叶绿	地方品种	湖北阳新县
60	黄麻苕	地方品种	海南保亭县	775	武昌山坡苕麻1号	地方品种	湖北武昌县
61	黑皮苕	地方品种	广西平乐县	797	威宁大叶绿	地方品种	湖南威宁县
71	黔芷1号	选育品种	贵州麻科所	822	红骨髓	地方品种	湖北广济县
79	川芷2号	选育品种	四川达县	847	山阳苕麻	地方品种	陕西山阳县
80	荣昌苕麻	地方品种	重庆荣昌县	860	青皮大麻	地方品种	四川巴县
81	旬阳绿白麻	地方品种	陕西旬阳县	913	南充苕麻	地方品种	四川南充县
82	汉中苕麻	地方品种	陕西汉中市	957	小清秆	地方品种	四川省渠县
83	丝麻	地方品种	陕西安康县	966	平昌家麻	地方品种	四川平昌县
86	印度苕麻	引进品种	印度	991	合江青麻	地方品种	四川合江县
102	苦瓜青	地方品种	湖南宁远县	1025	79-20	新品系	
111	耒阳黄壳麻	地方品种	湖南耒阳市	1065	务川白麻	地方品种	贵州务川县
119	长沙青叶麻	地方品种	湖南长沙县	1180	盛坝线麻	地方品种	湖北恩施县
120	涪陵麻	地方品种	湖南大庸县	1210	黄金跑	地方品种	湖北建始县
124	细叶白	地方品种	湖南双峰县	1214	恩施青麻2号	地方品种	湖北恩施县
126	黄九麻	地方品种	湖南湘乡县	1225	酉宁线麻	地方品种	重庆酉溪县
185	江口青皮苕麻	地方品种	贵州江口县	1226	满园串1号	地方品种	湖北恩施县
188	紫阳大叶泡	地方品种	陕西紫阳县	1258	S-1-6	新品系	湖南农大
192	宜春碧皮青	地方品种	江西宜春市	1276	遂宁青麻	地方品种	湖南农大
195	天台铁麻	地方品种	浙江天台县	1345	新铺青麻	地方品种	贵州遵义市
208	衢县苕麻	地方品种	浙江衢县	1352	恩荣红苕麻	地方品种	云南普洱县
248	广皮麻	地方品种	江西瑞昌县	1360	安龙苕麻2号	地方品种	四川安龙县
267	里达苕麻	地方品种	云南富宁县	1363	广东黄皮苕2号	地方品种	贵州麻类所
275	勐拉苕麻	地方品种	云南金平县	1372	柔木青麻	地方品种	贵州罗甸县
296	日本苕麻5号	引进品种	巴西	1377	大路风刀白	地方品种	湖北大冶县
337	榕江白麻1号	地方品种	贵州榕江县	1405	印尼1号	引进品种	印尼
340	锦屏青麻	地方品种	贵州锦屏县	1407	印尼2号	引进品种	印尼
414	黄平黄秆麻	地方品种	贵州黄平县	1408	印尼3号	引进品种	印尼
429	遵义串根麻	地方品种	贵州遵义县	1421	洗马苕麻	地方品种	广西上思县
440	新民青麻	地方品种	贵州道真县	1431	定业苕麻	地方品种	广西那坡县
449	青皮秆	地方品种	江西上高县	1439	大排山野麻	地方品种	广西大化县
450	分宜黄庄跑	地方品种	江西分宜县	1441	福利丝麻	地方品种	四川云阳县
454	绿竹白	地方品种	江西萍乡市	1443	协力青麻	地方品种	四川云阳县
456	白叶麻	地方品种	江西吉安縣	1454	高堤青麻	地方品种	四川西阳县
461	大叶红蚌蚌	地方品种	江西永丰县	1455	四川高堤白麻	地方品种	四川西阳县
466	黎川厚皮苕麻	地方品种	江西黎川县	1464	塘坝苕麻	地方品种	四川西阳县
468	安溪麻	地方品种	江西宜黄县	1474	山青白麻	地方品种	重庆涪陵
471	南陵厚皮苕麻	地方品种	江西南城县	1479	水箐青麻	地方品种	贵州毕节
484	天宝麻	地方品种	江西吉丰县	1484	宜汝苕麻	地方品种	四川达县
485	宜黄家麻	地方品种	江西资溪县	中饲苕	中饲苕1号	选育品种	
489	玉山麻	地方品种	江西玉山县	中苕1	中苕1号	选育品种	
502	黄青跑	地方品种	江西吉水县	中苕2	中苕2号	选育品种	
509	宁都野麻	地方品种	江西宁都县				

[0047]

1.4统计方法

[0048]

利用SPSS软件统计表型性状的正态分布情况和相关分析;利用软件Popgene1.32

(version 1.31)计算Shannon多样性指数、观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e);基于各个样品在各SSR位点的基因型,利用K-means聚类算法,获得各种质间的进化树;利用STRUCTURE2.2软件,按照数学模型划分物种的类群,并计算材料对应的Q值(即第i个材料其基因组变异源于第k个群体的概率)(王艳敏等,2008;王西成等,2010),作为协方差消除关联分析的假阳性,以保证物种群体结构的分析结果准确有效。利用Popgene软件计算LD的方差组分;运用TASSEL软件的MLM程序,以得到的K矩阵和群体Q值矩阵作为协方差,在显著性水平 $P < 0.05$ 下,将分子数据分别跟多个环境数量性状数据进行Q+K+MLM混合线性模型的逻辑回归率检验。

[0049] 2结果与分析

[0050] 2.1表型性状正态分布检验和相关分析

[0051] 由表1可以看出,株高、茎粗头季麻最高,三季麻最低;头季麻和二季麻均符合正态分布,三季麻不符合正态分布。株数头季麻最低,三季麻最高;头季麻、二季麻均不符合正态分布,而三季麻符合正态分布。皮厚和出麻率呈相反的趋势。皮厚二季麻大于三季麻,但出麻率二季麻小于三季麻;且皮厚两季麻均呈正态分布,而出麻率两季麻均不符合正态分布。

[0052] 表1正态分布检测表

	性状	季别	平均数	标准差	显著性	是否正态分布
[0053]	株高	头季麻	153.02	19.13	0.63	是
		二季麻	110.42	14.32	0.37	是
		三季麻	96.81	16.17	0.012	否
	茎粗	头季麻	9.21	1.26	0.1	是
		二季麻	7.84	1.09	0.93	是
		三季麻	6.72	1.36	0.013	否
	株数	头季麻	7.76	2.62	0	否
		二季麻	9.49	2.65	0.001	否
		三季麻	11.67	3.06	0.59	是
[0054]	皮厚	二季麻	0.77	0.13	0.25	是
		三季麻	0.49	0.09	0.93	是
	出麻率 (%)	二季麻	12.02	4.03	0	否
		三季麻	13.11	8.88	0	否

[0055] 表2产量性状相关系数

季别	性状	株高	茎粗	株数	皮厚	出麻率
头季麻	株高	1	0.498**	0.014		
	茎粗		1	-0.349**		
	株数			1		
二季麻	株高	1	0.754**	0.078	0.246**	-0.196*
	茎粗		1	-0.307**	0.567**	-0.085
	株数			1	-0.336**	-0.091
三季麻	皮厚				1	0.018
	出麻率					1
	株高	1	0.213*	0.026	0.414**	-0.358**
	茎粗		1	-0.014	0.242*	-0.202*
	株数			1	-0.104	-0.055
	皮厚				1	-0.339**
	出麻率					1

[0057] 由表2可以看出,株高和茎粗、皮厚显著正相关,与出麻率显著负相关;茎粗与皮厚显著负相关。茎粗与株数在头季麻、二季麻均表现极显著负相关。

[0058] 2.2遗传多样性分析

[0059] 利用95对SSR多态性引物对107份苧麻核心种质进行扩增,共扩增出255个多态性条带。每个位点等位基因数平均为2.6559,分布在2~5之间;基因多样性平均为0.5211,分布在0.2276~0.7258之间;期望杂合度最低0,最高0.90;观察杂合度最低0.05,最高1.00。

[0060] 表3 95对SSR引物信息

[0061]

Marker	FORWARD PRIMER1 (5'-3')	SEQ ID NO:	REVERSE PRIMER1 (5'-3')	SEQ ID NO:
RAM0006	TCAGTGTACTATGCGTATGGGG	1	TGGGGTTCCAGCAGTAAGAC	2
RAM0007	CAAAGCTTGAGCAACCATGA	3	AGACGAGAAAGAGCGAGCTG	4
RAM0010	CTGGGCATCCAAACAGAGTT	5	AGCATCGCTCTCTCTATCGC	6
RAM0018	CCACCCACCTACAACGAAAT	7	GAAGCTGATGGAGTGCCTTC	8
RAM0020	GGCATAGGGAGTGAACCAAA	9	GAAACGCACCCCTTAATCCAA	10
RAM0021	CCTCTCGGCTCTCTCTCTCA	11	CGTGATCGATATGGTGATCG	12
RAM0023	GACTTTGATCGAGTGCAGACA	13	TTCTGTTCCCTAAGCTCCGA	14
RAM0024	CAGAGGAATCATCAGCACCA	15	AAAGGCTGGGTGATTTGTTG	16
RAM0030	TCGATCCCGATAAGATCCTG	17	AACAACATCAACCACACGGA	18
RAM0032	ATTCTGCTGCTGCTGTCTCA	19	AGGCCAAAAGCATCTTCTCA	20
RAM0033	GAGGTTGGCGGAGGAGAT	21	ACGCTCTACTAGCCTTTGGG	22
RAM0039	GAGATTCCGGGGACGTAAT	23	ACGACGAGAAGGAGTGGAAA	24
RAM0083	AAAGAGAAGAGAGGGTCGGC	25	CCAACGTTGTGTCTTCAC	26
RAM0084	GCTTTGAAAGAGAGAGTGAGAG	27	ACACAGATCCAACATGCCAA	28
RAM0097	ACATGGCTTGCTTCTGAGT	29	CCCTTCTGCTTCTGGGTTT	30
RAM0108	GCTTGACCTTGAAGAGGACC	31	TCAGCAACAACAACACGACA	32
RAM0109	AAGAGGATGAGAGCCAAGCA	33	CTTTACAAAACGGCGTGACA	34
RAM0115	CCAATAGCTTCTTCTCGCTG	35	ATGAGCTTGTGGAGCTTGG	36
RAM0117	CCAAGGAAGGCGTCTTGATA	37	CTCGCTGAAGAACGTGTTGA	38
RAM0118	GCTGCTCTGGCTTGGACTC	39	GAGGTGCATTACAGAGGCGT	40
RAM0119	GTTTGGGTTTGGGAAGACCT	41	TGATCTGAGTGTGGAAAGCG	42
RAM0120	GGGTGCTTAGCTTCTCCCTT	43	GTCGTGTTTGACGATGTTTG	44
RAM0122	GCGTAGAGGATCACCAGACC	45	TCGTCTTCAACCAACAACCA	46
RAM0123	CAAAACGGTGACGTACAGGA	47	CGAAACCCAGAAGCAGAAGA	48
RAM0124	CGGAAATTGATCGGAGATA	49	AAGCTTTTCCATGACTGGGA	50
RAM0127	TGATCTCATCACCTCCACCA	51	TTGCTAACAAGGGCCGATAC	52
RAM0128	TGGTAGGTCTACCGCTCAC	53	AGGTGGTGGTGGTGGTGTAT	54
RAM0130	CGCTCATGATCGTGATCTCT	55	TCATGGGTGGTACAAACGAC	56
RAM0131	ATGAGAAGCGTGGTCCAGAT	57	ATCCCAACACGAAAATCGAG	58
RAM0134	TGCCACTGTCCAAGTACGAG	59	CACTCGCCAACCTAAGTGCAA	60
RAM0139	CAAGACCAAGACCGAGGAAG	61	TGATGTGCCAACCTTGTAA	62
RAM0140	CTTGCTCTCTCGCTCCGATTC	63	GGACGATGAACCTGAAGCAT	64
RAM0141	GCCCAAAATTCCAGAGTTCA	65	TGGATCAGCGAGAGTGTGAG	66
RAM0142	CCCTAGAGGCGTTTGTGTGT	67	AACAATTTGTCCCACTGCC	68
RAM0144	TTCAACGGAACACAGTCAGC	69	AACACCTGAAATGGAATCGC	70
RAM0145	CATAGAATGCATGTTGTGCC	71	TTGGGTGGTGTGAAATGTTG	72
RAM0146	TTGAGGCAGAGGTGACACAG	73	AATGGAGTCAATCAGGGTGC	74
RAM0147	GCAGAAGGAGGAGGAGGAGT	75	TAGAGGAGGATCGCTGGAGA	76
RAM0148	ATTCCGTTTATGCCACGTC	77	ATAGCTCCGAGAGCGGTACA	78
RAM0152	CACCAAGTCTTCTCTGTCTTC	79	GTGCTTGCTCGACTTTTCC	80
RAM0156	CGAACCTCATCTTTCGCTTC	81	AACACACCCCAATTATCCCA	82
RAM0179	TTGGCTCTGGCTCTGGTTAT	83	GAGGAGGAAGATGACGACGA	84
RAM0181	CGTCAAGCTTCACAAATCCA	85	CTTCTACAACCGCTCCTTCG	86

RAM0182	CTTCGACGAGCGATGAATTT	87	GAGGTCTGGTGGACGAAGAG	88
RAM0183	ACCCTAGCCTCTTGGTGGTT	89	CTTCTTCTTGAACGAACCG	90
RAM0185	CCTCCAGATCTCCACGTAA	91	TTCGATTATCGGGTTTCGAG	92
RAM0186	TCTCTTCTCTCCCGAATCA	93	GCTGAGGAGGGAGTTCATTG	94
RAM0190	CCAACCCACAAAACTCAC	95	CGTCGCCATAGTTGTACGTG	96
RAM0192	CTGAAGTTCAAGGCAGGAGG	97	AAAGGCAGAGGTGACACGAC	98
RAM0200	AAAGCGGCTTATGTCGAGAA	99	AATTAAGAGAGCACGGAAGGG	100
RAM0201	GACCGAATCTTTTCCACAA	101	AGTGGGTGTGTCTCCTTTGG	102
RAM0271	GCAAAACCTATGTGGCGATT	103	GACGCAGCAAACACTTCAAA	104
RAM0279	ATCTCCTGCACCGTCTCAAC	105	GAAAATGCCACCTTCCAAGA	106
RAM0282	AAACCCAAACCTTGCTTTC	107	TCTCTGCATGGCTTTGTACG	108
RAM0290	GCCACAGCCACTCTTTCAGT	109	CGAGTTCTGAAACCGTCCAT	110
RAM0296	ATTGGGCTATTGTGAGTCGG	111	TTCTCTCTTATGTACGCCAAGC	112
RAM0298	CCATTTGCTGCTTCAACAGA	113	CGAGATTTGGAAGCGAAGAG	114
RAM0340	CATTCCTAGCTTTGGAAGCG	115	CGTGCTGTTTTGGTTCTAGAGT	116
RAM0359	GGGATGACACAGAGCAACAA	117	CGATCAGCTTGTCTAGTTCG	118
RAM0361	AGTCTTTGGCGTTGGAGAGA	119	AGAAGAGGGACCACCACCAT	120
RAM0447	ACAGCAGCAGCAACAACAAC	121	ATTCCAGAAAACGACAACCG	122
RAM0448	ACGAGCACTGCATGAAGGAG	123	CCACTGGGCTTAGTGAAAGC	124
RAM0452	TGGGATAGCTTTGCCTTTGT	125	GGTTTTGGGGAGTGAAAGTGA	126
RAM0453	GATTCCGATTCACTTCTGC	127	TTCCATGGACCTTCGAAAAC	128
RAM0571	TGGGCTCATAGTCCAAAATG	129	GAGTTGACGTGAACACCACG	130
[0062] RAM0578	TTGGGTAGTGAAGAGTGGGG	131	CTGTGTCACAACCTCACAACCTCA	132
RAM0580	TACAAGCCCTTCCACTTGCT	133	GCGAGCAGCTATAATACGCC	134
RAM0586	GGAGAGAGAGGCGGAGATTT	135	AGCCACGCCATAGAGAAAGA	136
RAM0598	ACGCTCATCCACAGATAGGG	137	TCCCTTCAAGGCTAGTCGAA	138
RAM0609	AGCCGGATTAACGATGTGTC	139	GATCGATGAGTGGACTCGGT	140
RAM0611	GTGGGTAATGCGGAAAAGAG	141	GGGAGGCAAATCATCGTCTA	142
RAM0613	GATTTGGTAGAGTCTGTGCTG	143	AAGTGGGCAACAAAACCTGG	144
RAM0615	GCTTCAATCCTGATCTCCTCC	145	GGAAGCTGATTGAGAAGCG	146
RAM0617	GGGTTGGGTTCTTCATCTCA	147	CCCTCCCTCTTCTCTCTGCT	148
b50	ACAATCCAGGAGTGGCAATC	149	ACAAGCGAAGATCGTCTCATC	150
b35	CGTTCAGTCACCAGCAAGG	151	GAGGGAAGCAGGGAGAGC	152
b38	TAATCCCTCAATGGCTCTTTTC	153	GAGAAGGATACGAATTGACAGG	154
b40	TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG	155	CAACTTTCTTAAACCACTTTTCG	156
b43	CGAGCCTTCTTCTTCTTCTGG	157	GCAAGCAATACGGACAGTAGG	158
c03	CGTGAAAATAGTGATATGTGTG	159	ACTGTAAACAATCAAGAAGAAACC	160
c07	GCCACAGCCGAGGAAGAG	161	TCTCATCACCACCACCTTAGG	162
b27	AGCCAGGTTCAGAAGTCC	163	CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC	164
b28	TCCCACCACGGACTACTG	165	AACCACCATCATCATCATCATC	166
b11	GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG	167	ACTCAATACATACACGGCACTAG	168
b16	ACCTCTACGGACCTCTTCTTC	169	CATAACATAACATGACACACAAGC	170
b24	GAGCCAGAGCCAGGTTCC	171	ACAAAGTCTCGGTTCCCTTACAC	172
b34	AATAGAATGTGGAGGCGATAGAG	173	AAACCATAAATCAACTACCGAACC	174
b64	CTTGAGATACAGCCTTCCATTAG	175	CACACCTCGCTTCCCTTG	176
c17	GAAACTATTTCCACCAACAAAG	177	ACACACATTCTACACACC	178

[0063]	b57	CGGATATGGTGGAGGTTATGC	179	CAGAACGACGACGACGAC	180
	b65	ACGAACCACAACACAGAGAG	181	ACGAGGGAACACCAGAGAG	182
	c18	AAGCCGAGCGTGAAGAAG	183	ACACACAGAAAGAACACAAGAC	184
	b53	GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC	185	CGGCTTCGCTTTAGGATTTG	186
	b56	CGGTCTGTGGATACGAATGG	187	GACGACGACGACGATGATG	188
	c10	AGTGCGGAGATAACTGTTC	189	GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC	190

[0064] 2.3群体结构分析

[0065] 利用STRUCTURE 2.2软件分析供试材料的群体结构。分析107个样品的群体结构。分别假设107个样品的分群数(K值)为2-17,进行聚类,根据 ΔK 峰值的位置来确定分群数,结果表明,当K=2时, ΔK 最大(图1),表明供试材料存在一定程度的群体结构,可以分为2个亚群。

[0066] 2.4亲缘聚类分析

[0067] 进化树用来表示物种之间的进化关系,根据各类生物间的亲缘关系的远近,把各类生物安置在有分枝的树状的图表上,简明地表示生物的进化历程和亲缘关系。基于各个样品在各SSR位点的基因型,利用K-means聚类算法,获得各样品间的进化树。从样品间的进化树上可以看出,各样品主要分为两大类(图2)。其中第一类包含87个品种,第二类包含20个品种。

[0068] 2.5连锁不平衡分析

[0069] 在某一群体中,不同座位上某两个位点同时遗传的频率明显高于预期的随机频率的现象,称连锁不平衡(linkage disequilibrium)。进行连锁不平衡分析,可以获得物种的最小的遗传单元。本研究以SSR位点为对象,利用TASSEL软件对95个多态性位点进行群体连锁不平衡分析,得到基因组内连锁不平衡的分布情况(图3)。试验得到总共95个标记的4465个组合,当 $P<0.05$ 时,210个位点组合处于LD,占总位点组合数的4.70%;当 $P<0.01$ 时,41个位点组合处于LD,占总位点组合数的0.92%;按 R^2 的范围, $R^2>0.01$ 的位点组合有2795个,占总位点组合数的62.6%; $R^2>0.05$ 的位点组合有1206个,占总位点组合数的27%; $R^2>0.1$ 的位点组合有491个,占总位点组合数的11%。总之,本研究所使用的107个材料连锁不平衡水平很低,适合于全基因组关联分析策略进行初定位。

[0070] 2.6SSR位点与苧麻产量性状的关联分析

[0071] 为避免群体结构和亲缘关系的存在影响关联分析的准确性,应用Tassel 3.0软件,将核心种质各个体的Q值和Kinship值作为协变量,基于MLM模型进行株高表型变异对标记变异的回归分析,探求产量相关性状QTL的关联标记,并统计各位点的表型变异解释率。

[0072] 结果表明,头季麻、二季麻、三季麻分别检测到7个、13个、5个株高关联分子标记($p<0.05$)。其中在两个环境中同时检测到的有6个。在头季麻和二季麻中可以被同时检测到的标记有RAM144、RAM123;在头季麻和三季麻无标记被同时检测到。在二季麻和三季麻中可以被同时检测到的标记有RAM598, RAM156, RAM130。RAM144、RAM130在两个环境中表型变异解释率均超过10%。

[0073] 头季麻、二季麻、三季麻分别检测到6个、3个、9个分株数关联分子标记($p<0.05$)。其中在两个环境中可以被同时检测到的标记有2个。RAM147在二季麻和三季麻中被同时检测到,而RAM39在头季麻和二季麻中被同时检测到。RAM147在两个环境中表型变异解释率均超过15%。

[0074] 头季麻、二季麻、三季麻分别检测到12个、8个、5个茎粗关联分子标记($p < 0.05$)。其中RAM290分子标记在三个环境中全被检测到,4个关联分子标记在两个环境中同时检测到。在头季麻和二季麻中可以被同时检测到的标记有RAM109、RAM156、RAM131;在头季麻和三季麻无标记被同时检测到。在二季麻和三季麻中可以被同时检测到的标记有RAM39。在所检测到的分子标记中,有2个(RAM290和RAM109)分子标记在两个环境中表型变异解释率均超过15%。

[0075] 二季麻、三季麻分别检测到13个、8个皮厚关联分子标记($p < 0.05$)。其中,在两个环境中同时被检测到的标记有3个,分别为RAM200, RAM108和RAM141。其中, RAM200和RAM141在两个环境中表型变异解释率均超过10%。

[0076] 二季麻、三季麻分别检测到5个、8个出麻率关联分子标记($p < 0.05$)。其中,在两个环境中同时检测到的标记有3个,分别为RAM144, RAM179和RAM181。表型变异解释率在0.06-0.37之间。其中RAM144表型变异解释率高达15%-37%。

[0077] 在检测到的多个稳定产量相关性状SSR标记中,其中3个分子标记同时与2个性状相关。其中RAM144与株高、出麻率相关;RAM156与株高、茎粗相关;RAM39与分株数和茎粗相关。

[0078] 表4多个稳定产量相关性状关联SSR标记

性状	标记	头季麻		二季麻		三季麻	
		p 值	贡献率 (%)	p 值	贡献率 (%)	p 值	贡献率 (%)
株高	RAM144	0.00	22.25	0.04	14.33		
	RAM598			0.02	5.97	0.01	7.81
	RAM156			0.03	6.47	0.00	10.12
	RAM130			0.04	10.52	0.03	11.48
	RAM124	0.04	10.36	0.05	9.78		
	RAM123	0.00	26.59	0.02	8.61		
分株数	RAM147			0.02	16.04	0.01	19.63
	RAM39	0.04	9.75	0.00	21.12		
茎粗	RAM290	0.00	13.19	0.02	8.32	0.00	23.42
	RAM109	0.03	11.53	0.05	10.65		
	RAM156	0.00	9.86	0.01	9.04		
	RAM131	0.04	9.52	0.00	15.94		
	RAM39			0.01	13.64	0.03	10.28
皮厚	RAM200			0.01	15.55	0.05	12.27
	RAM108			0.01	12.99	0.04	9.73
	RAM141			0.01	18.20	0.02	15.98
出麻率	RAM144			0.03	14.81	0.00	36.92
	RAM179			0.01	13.15	0.03	9.00
	RAM181			0.04	6.57	0.02	8.19

[0080] 讨论

[0081] 利用传统QTL作图方法进行苧麻性状QTL定位有很多不足。首先,由于分离群体仅涉及两个特定的亲本材料,因此只涉及同一基因座的两个等位基因(苧麻是杂合体,最多可

涉及4个等位基因),定位的QTL可能不是优异等位基因(Magnus et al.2008);其次,构建群体费时费力。苧麻构建一个群体从开始杂交到群体可以QTL定位,一切顺利的话需要3年。另外,由于苧麻杂交授粉技术的限制,构建过程外源花粉污染严重,获得苧麻的真实杂交后代困难。对真伪杂交种的鉴别就是一个很费时费力的工作,且构建的群体偏分离比较严重(邹自征,2012)。因此,本发明利用自然群体作为分析群体,不仅可充分利用种质资源的遗传多样性和优异等位基因,而且避免了构建群体的不足。

[0082] 群体结构是影响关联分析结果的重要因素,亚群的混合使整个群体的LD强度增强,容易造成伪关联。不同作物的遗传结构不同。例如,桃可分为7个亚群;青稞则被划分为4个亚群。同一作物不同的自然群体有时也会表现不同的群体结构。在大豆上的研究证实了这一点。前人关于苧麻的群体遗传结构报道不多,刘晨晨认为104份苧麻种质资源可划分为2大类群。本研究也得到相同的结论。因此,把苧麻种质资源划分为2大类群为降低苧麻的伪关联奠定了基础。

[0083] 连锁不平衡是关联分析的前提。自花授粉作物LD水平较高,而异花授粉作物LD水平较低。苧麻作为异花授粉作物,也表现出了较低的LD水平,与前人的结论相同。由于LD水平较低,进行全基因组关联分析需要较多的分子标记。而本研究所用的分子标记仅有95个,因此,本研究只是进行了粗略意义上的全基因组关联分析,只是一定意义上的粗定位。因此,为了得到更加可靠地结果,需要进一步扩大标记数目。

[0084] Liu通过连锁分析的方法报道了苧麻的产量性状QTL定位,共检测到9个稳定的QTL。本研究一共发现了19个与产量性状相关的稳定分子标记。其中,株高6个,分株数2个,茎粗5个,皮厚3个,出麻率3个。对比了Liu的结果,未发现与其任何一个分子标记重合。在这19个稳定的分子标记中,与茎粗相关的分子标记RAM290在三个环境中均被检测到,且遗传贡献率达到8.32%-23.42%之间,是一个可用于分子育种的分子标记。

[0085] 在检测到的19个稳定分子标记中,都是头季麻和第二季麻或者第二季麻和第三季麻同时检测到。未检测到头季麻和第三季麻同时存在的分子标记。原因可能是苧麻是多年生作物,头季麻和第二季麻以及第二季麻和第三季麻生理年龄相近,因此更容易挖掘到共有的分子标记。也暗示苧麻产量性状的基因表达与生理年龄有关,相对于一年生作物,其产量性状QTL定位更复杂。

[0086] 本发明中,表型性状的相关分析结果表明,株高和茎粗、皮厚显著正相关,与出麻率显著负相关;分株数和茎粗显著负相关。同时,关联分析结果也表明,RAM144与株高、出麻率相关;RAM156与株高、茎粗相关;RAM39与分株数和茎粗相关。多种作物的QTL定位结果表明,QTL成簇分布和一因多效十分常见。本发明表型和分子结果均暗示这些标记附近可能存在着与2个性状相关的不同基因,或者可能存在同时控制2个性状的一个基因。以上研究为进行分子育种提供了便利。

[0087] 这里说明的模块数量和处理规模是用来简化本发明的说明的。对本发明的分子标记的应用、修改和变化对本领域的技术人员来说是显而易见的。

[0088] 如上所述,根据本发明,由于发现了与苧麻茎粗相关联的SSR标记,因此具有在分子水平上进行苧麻育种的指导,也对提高或稳定苧麻的产量提出了技术上的指导。

[0089] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地

实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院麻类研究所
<120> 与苧麻茎粗关联的SSR标记及其应用
<130> 2010
<160> 190
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 1
tcagtgtact atgcgtatgg gg
22

[0001] <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 2
tggggttcca gcagtaagac
20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 3
caaagcttga gcaaccatga
20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 4

agacgagaaa gagcgagctg
20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 5
ctgggcatcc aaacagagtt
20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 6
agcategetc tctctatcgc
20

[0002]

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 7
ccacccacct acaacgaaat
20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 8
gaagctgatg gagtgccttc
20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 9
ggcataggga gtgaaccaaa
20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 10
gaaacgcacc cttaatccaa
20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 11
cctctcggct ctctctctca
20

[0003]

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 12
cgtgatcgat atggtgatcg
20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 13
gactttgatc gagtgcgaca
20

<210> 14
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 14
ttctgttccc taagctccga
20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 15
cagaggaatc atcagcacca
20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0004] <400> 16
aaaggctggg tgatttggtg
20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 17
tegatcccg taagatcctg
20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 18
aacaacatca accacacgga
20

	<210> 19
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 19
	attctgctgc tgctgtetca
	20
	<210> 20
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 20
	aggccaaaag catcttctca
	20
	<210> 21
	<211> 18
	<212> DNA
[0005]	<213> 人工序列
	<400> 21
	gaggttggcg gaggagat
	18
	<210> 22
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 22
	acgctctaact agcctttggg
	20
	<210> 23
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 23
	gagattccgg ggacgtaa
	20

	<210> 24
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 24
	acgacgagaa ggagtggaaa
	20
	<210> 25
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 25
	aaagagaaga gagggtcggc
	20
[0006]	<210> 26
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 26
	ccaacgttgt gtcgtttcac
	20
	<210> 27
	<211> 22
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 27
	gctttgaaag agagagtgag ag
	22
	<210> 28
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 28

acacagatcc aacatgccaa
20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 29
acatggcttg gcttctgagt
20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 30
ccctttctgg ttctgggttt
20

[0007]

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 31
gcttgacett gaagaggacc
20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 32
tcagcaacaa caacacgaca
20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 33
aagaggatga gagccaagca
20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 34
ctttacaaaa cggcgtgaca
20

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 35
ccaatagctt cttcttcgct g
21

[0008]

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 36
atgagcttgt tggagcttgg
20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 37
ccaaggaagg cgtcttgata
20

<210> 38
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 38
ctcgtgaag aacgtgtga
20

<210> 39
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 39
getgetctgg cttggactc
19

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0009] <400> 40
gaggtgcatt acagaggcgt
20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 41
gtttgggttt gggaagacct
20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 42
tgatctgagt gtggaaagcg
20

	<210> 43
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 43
	gggtgcttag cttctccctt
	20
	<210> 44
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 44
	gtcgtgtttg acgatggttg
	20
	<210> 45
	<211> 20
	<212> DNA
[0010]	<213> 人工序列
	<400> 45
	gcgtagagga tcaccagacc
	20
	<210> 46
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> TCGTCTTCAACCAACAACCA
	<400> 46
	tcgtcttcaa ccaacaacca
	20
	<210> 47
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 47
	caaaacggtg acgtacagga
	20

	$\langle 210 \rangle$	48
	$\langle 211 \rangle$	20
	$\langle 212 \rangle$	DNA
	$\langle 213 \rangle$	人工序列
	$\langle 400 \rangle$	48
		cgaaaccag aagcagaaga
		20
	$\langle 210 \rangle$	49
	$\langle 211 \rangle$	20
	$\langle 212 \rangle$	DNA
	$\langle 213 \rangle$	人工序列
	$\langle 400 \rangle$	49
		cggaaattcg atcggagata
		20
[0011]	$\langle 210 \rangle$	50
	$\langle 211 \rangle$	20
	$\langle 212 \rangle$	DNA
	$\langle 213 \rangle$	人工序列
	$\langle 400 \rangle$	50
		aagcttttcc atgactggga
		20
	$\langle 210 \rangle$	51
	$\langle 211 \rangle$	20
	$\langle 212 \rangle$	DNA
	$\langle 213 \rangle$	人工序列
	$\langle 400 \rangle$	51
		tgatctcate acctecacca
		20
	$\langle 210 \rangle$	52
	$\langle 211 \rangle$	20
	$\langle 212 \rangle$	DNA
	$\langle 213 \rangle$	人工序列
	$\langle 400 \rangle$	52

ttgctaacaa gggccgatac
20

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 53
tggtaggtct accgcctcac
20

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 54
aggtggtggt ggtggtgtat
20

[0012]

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 55
cgctcatgat cgtgatctct
20

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 56
tcatgggtgg tacaacgac
20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 57
atgagaagcg tgggtccagat
20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 58
atcccaacac gaaaatcgag
20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 59
tgccactgtc caagtacgag
20

[0013]

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 60
cactcgccaa ctaagtgcaa
20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 61
caagaccaag accgaggaag
20

<210> 62
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 62
tgatgtgcca acccttgtaa
20

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 63
cttgtctctc getccgattc
20

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0014] <400> 64
ggacgatgaa cctgaagcat
20

<210> 65
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 65
gcccaaaatt ccagagttca
20

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 66
tggatcagcg agagtgtgag
20

	<210> 67
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 67
	ccctagaggc gtttgtgtgt
	20
	<210> 68
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 68
	aacaattttg tcccactgcc
	20
	<210> 69
	<211> 20
	<212> DNA
[0015]	<213> 人工序列
	<400> 69
	ttcaacggaa cacagtcage
	20
	<210> 70
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 70
	aacacctgaa atggaatcgc
	20
	<210> 71
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 71
	catagaatgc atgttgtgcc
	20

	<210> 72
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 72
	ttgggtggtg tgaaatgttg
	20
	<210> 73
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 73
	ttgaggcaga ggtgacacag
	20
[0016]	<210> 74
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 74
	aatggagtca atcagggtgc
	20
	<210> 75
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 75
	gcagaaggag gaggaggagt
	20
	<210> 76
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 76

tagaggagga tcgctggaga
20

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 77
atttccgttt atgccacgtc
20

<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 78
atagctccga gagecgtaca
20

[0017] <210> 79
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 79
caccaagtct tctcttgtct tc
22

<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 80
gtgcttgctc gactttttcc
20

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 81
cgaacctcat ctttegttc
20

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 82
aacacacccc aattatccca
20

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 83
ttggctctgg ctctggttat
20

[0018]

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 84
gaggaggaag atgacgacga
20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 85
cgtcaagett cacaaatcca
20

<210> 86
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 86
cttctacaac cgctccttcg
20

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 87
cttcgacgag cgatgaattt
20

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0019] <400> 88
gaggtctggt ggacgaagag
20

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 89
accctagcct cttggtggtt
20

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 90
cttctttcttc gaacgaaccg
20

	<210> 91
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 91
	cctccagatc tcccacgtaa
	20
	<210> 92
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 92
	ttcgatttat cgggttcgag
	20
	<210> 93
	<211> 20
	<212> DNA
[0020]	<213> 人工序列
	<400> 93
	tctctttctt ccccgaatca
	20
	<210> 94
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 94
	getgaggagg gagttcattg
	20
	<210> 95
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 95
	ccaaceccac aaaaactcac
	20

	<210> 96
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 96
	aaaggcagag gtgacacgac
	20
	<210> 97
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 97
	ctgaagttca aggcaggagg
	20
[0021]	<210> 98
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 98
	aaaggcagag gtgacacgac
	20
	<210> 99
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 99
	aaagcggett atgtcgagaa
	20
	<210> 100
	<211> 21
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 100

aattaagaga gcacggaagg g
21

<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 101
gaccgaatct tttcccacaa
20

<210> 102
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 102
agtgggtgtg tctcctttgg
20

[0022]

<210> 103
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 103
gcaaaaceta tgtggcgatt
20

<210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 104
gacgcagcaa acattcaaa
20

<210> 105
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 105
atctcttgca cegtctcaac
20

<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 106
gaaaatgcca ccttccaaga
20

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 107
aaaccctaac ccttgctttc
20

[0023]

<210> 108
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 108
tctctgcatg gctttgtacg
20

<210> 109
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 109
gccacagecca ctctttcagt
20

<210> 110
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 110
cgagttctga aaccgtccat
20

<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 111
attgggctat tgtgagtcgg
20

<210> 112
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

[0024] <400> 112
ttctctctta tgtacgccaa gc
22

<210> 113
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 113
ccatttgetg cttcaacaga
20

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 114
cgagatttgg aagcgaagag
20

	<210> 115
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 115
	cattcctagc tttggaagcg
	20
	<210> 116
	<211> 22
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 116
	cgtgctgttt tggttctaga gt
	22
	<210> 117
	<211> 20
	<212> DNA
[0025]	<213> 人工序列
	<400> 117
	gggatgacac agagcaacaa
	20
	<210> 118
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 118
	cgatcagctt gtcgtagtcg
	20
	<210> 119
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 119
	agtctttggc gttggagaga
	20

	<210>	120
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	120
		agaagaggga ccaccaccat
		20
	<210>	121
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	121
		acagcageag caacaacaac
		20
[0026]	<210>	122
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	122
		attccagaaa acgacaaccg
		20
	<210>	123
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	123
		acgagcactg catgaaggag
		20
	<210>	124
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	124

ccactgggct tagtgaaagc
20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 125
tgggatagct ttgcctttgt
20

<210> 126
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 126
ggttttgggg agtgaagtga
20

[0027]

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 127
gattccgatt cagcttctgc
20

<210> 128
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 128
ttccatggac cttegaaaac
20

<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 129
tgggctcata gtccaaaatg
20

<210> 130
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 130
gagttgacgt gaacaccacg
20

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 131
ttgggtagtg aagagtgggg
20

[0028]

<210> 132
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 132
ctgtgtcaca actcacaact ca
22

<210> 133
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 133
tacaagccct tccaattgct
20

<210> 134
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 134
gcgagcagct ataatacgcc
20

<210> 135
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 135
ggagagagag gcggagattt
20

<210> 136
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0029] <400> 136
agccacgcca tagagaaaga
20

<210> 137
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 137
acgctcatcc acagataggg
20

<210> 138
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 138
tcccttcaag gctagtcgaa
20

	<210> 139
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 139
	agccggatta acgatgtgtc
	20
	<210> 140
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 140
	gatcgatgag tggactcgg
	20
	<210> 141
	<211> 20
	<212> DNA
[0030]	<213> 人工序列
	<400> 141
	gtgggtaatg cggaaaagag
	20
	<210> 142
	<211> 20
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 142
	gggaggcaaa tcategtcta
	20
	<210> 143
	<211> 22
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<400> 143
	gatttggtta gagtctgtgc tg
	22

	<210>	144
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	144
		aagtgggcaa caaaaactgg
		20
	<210>	145
	<211>	21
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	145
		gcttcaatcc tgatctctc c
		21
[0031]	<210>	146
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	146
		ggaagctgat ttgagaagcg
		20
	<210>	147
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	147
		gggttgggtt cttcatctca
		20
	<210>	148
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<400>	148

ccctccctct tctctctgct
20

<210> 149
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 149
aacaatccag gagtggcaat c
21

<210> 150
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 150
acaagcgaag atcgtctcat c
21

[0032]

<210> 151
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 151
cgttcagtca ccagcaagg
19

<210> 152
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 152
gagggaagca gggagagc
18

<210> 153
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 153
taatccctca atggetcttt tc
22

<210> 154
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 154
gagaaggata cgaattgaca gg
22

<210> 155
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 155
tgtatagaac tgagtaaattg attg
24

[0033]

<210> 156
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 156
caactttctt aaaccacttt cg
22

<210> 157
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 157
cgagccttct tcttcttctg g
21

<210> 158
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 158
gcaagcaata cggacagtag g
21

<210> 159
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 159
cgtgaaaata gtgatatgtg tg
22

<210> 160
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

[0034] <400> 160
actgtaacaa tcaagaagaa acc
23

<210> 161
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 161
gccacagccg aggaagag
18

<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 162
tctcatcacc accaccttag g
21

<210> 163
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 163
agccaggttc cagaagtec
19

<210> 164
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 164
cataatcaca aagtctcggt tcc
23

[0035] <210> 165
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 165
tcccaccacg gactactg
18

<210> 166
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 166
aaccaccate atcatcatca tc
22

<210> 167
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 167
gcggaggctt aatttgettt g
21

<210> 168
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 168
actcaataca tacacggcac tag
23

<210> 169
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 169
acctctaegg acctcttctt c
21

[0036] <210> 170
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 170
cataacataa catgacacac aagc
24

<210> 171
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 171
gagccagagc caggttcc
18

<210> 172
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 172

acaaagtctc ggttccttac ac
22

<210> 173
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 173
aatagaatgt ggaggcgata gag
23

<210> 174
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 174
aaaccataaa tcaactaccg aacc
24

[0037]

<210> 175
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 175
cttgagatac agccttccat tag
23

<210> 176
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 176
cacacctcgc ttcccttg
18

<210> 177
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 177
gaaactattt ccaccaacaa ag
22

<210> 178
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 178
acacacattc ctacacacc
19

<210> 179
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 179
cggatatggt ggaggttatg c
21

[0038]

<210> 180
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 180
cagaacgacg acgacgac
18

<210> 181
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 181
acgaaccaca acacagagag
20

<210> 182
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 182
acgagggaac accagagag
19

<210> 183
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 183
aagccgagcg tgaagaag
18

<210> 184
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

[0039] <400> 184
acacacagaa agaacacaag ac
22

<210> 185
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 185
ggctcaagtt tgctcataga ttc
23

<210> 186
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 186
cggttcgct ttaggatttg
20

<210> 187
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 187
cggctctgtgg atacgaatgg
20

<210> 188
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 188
gacgacgacg acgatgatg
19

[0040]

<210> 189
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 189
agtgcggaga taactgttc
19

<210> 190
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 190
ggctacttta ttetaaacca aac
23

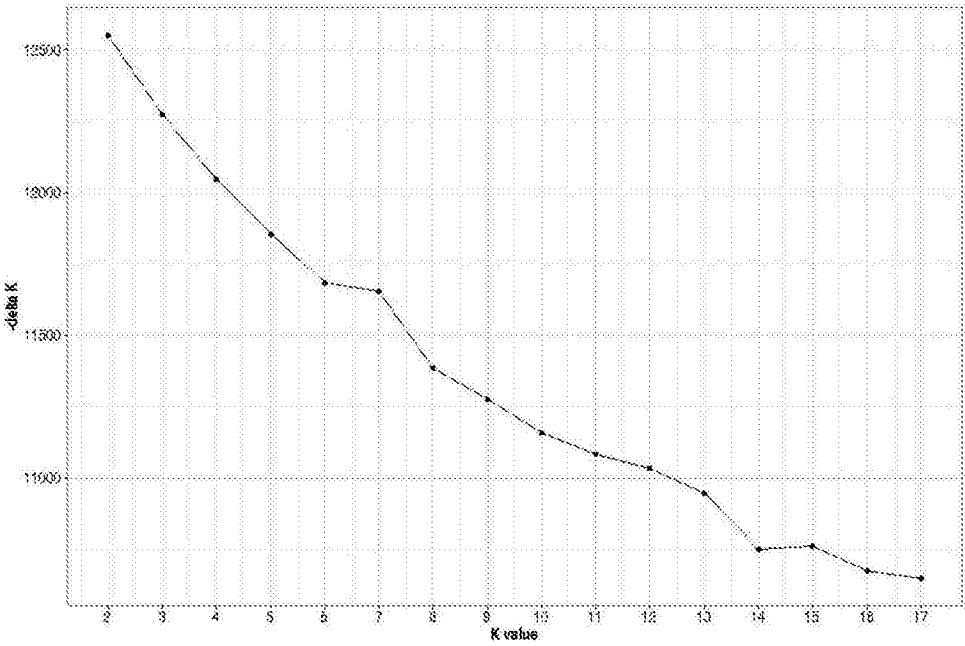


图1

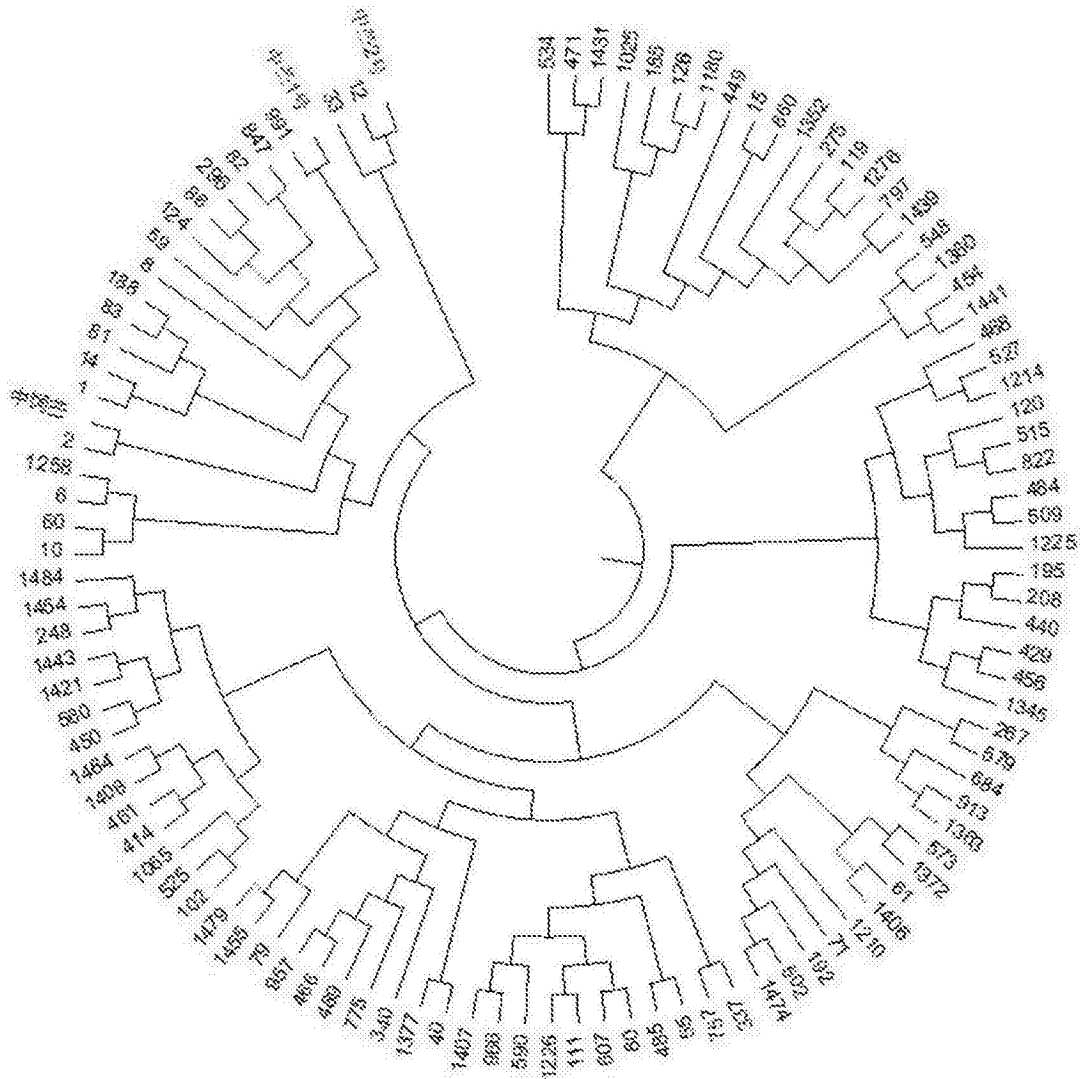


图2

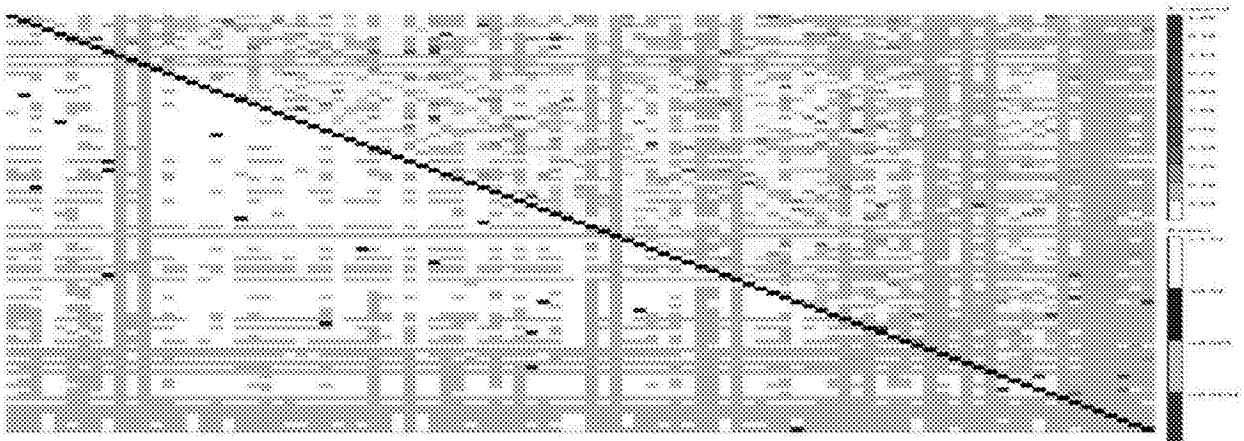


图3