



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111748646 A

(43) 申请公布日 2020.10.09

(21) 申请号 202010842397.4

(22) 申请日 2020.08.20

(71) 申请人 辽宁省经济林研究所

地址 116031 辽宁省大连市甘井子区中华
西路31号

(72) 发明人 刘振盼 尤文忠 孙阳 张悦
张雪梅 李仁浩 李冬生 卢立媛
郝家臣 王克瀚 戴永利 张永华

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 薛红凡

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

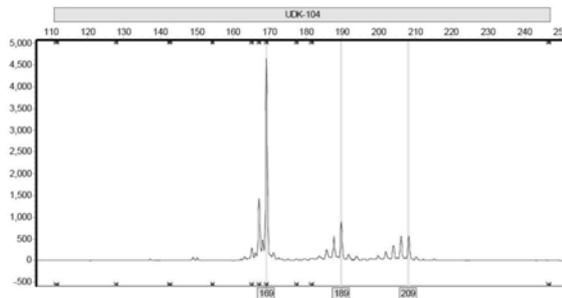
权利要求书1页 说明书8页
序列表7页 附图1页

(54) 发明名称

一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法

(57) 摘要

本方法提供了一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法,涉及品种鉴定技术领域。本发明采用SSR标记结合毛细管电泳技术,建立了基于2对SSR引物标记的软枣猕猴桃品种鉴定方法。本发明所述方法利用已有品种的扩增数据,与未知品种进行数据比对,从而为未知品种的早期品种鉴定提供了一种重复性好、位点特异性强、扩增条带数字化,并且通用、便捷、有效的方法。



1. 一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法,其特征在于,包括以下步骤:以软枣猕猴桃苗木基因组DNA为模板,利用引物对UDK-104和/或UDK-099进行扩增,将扩增产物进行毛细管电泳,依据电泳结果,判断软枣猕猴桃苗木品种;

所述引物对UDK-104包括UDK-104-F和UDK-104-R,所述UDK-104-F的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述UDK104-R的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

所述引物对UDK-099包括UDK-099-F和UDK-099-R,所述UDK-099-F的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;所述UDK099-R的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述软枣猕猴桃苗木基因组DNA提取自落叶期的软枣猕猴桃芽。

3. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,所述引物对UDK-104的扩增片段内TG重复单元数为9,CA或TG重复单元数为13,TC或AC重复单元数为11;所述引物对UDK-099的扩增片段内TG重复单元数为19。

4. 根据权利要求3所述方法,其特征在于,所述扩增的PCR体系以10 μ L计,包括:ddH₂O 3.0 μ L,2 \times Taq master mix 5 μ L,20ng模板DNA 1.0 μ L,20 μ M正向引物和20 μ M反向引物各0.5 μ L。

5. 根据权利要求4所述方法,其特征在于,所述扩增的PCR程序包括:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法

技术领域

[0001] 本发明属于品种鉴定技术领域,具体涉及一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法。

背景技术

[0002] 软枣猕猴桃 (*Actinida arguta*) 为猕猴桃科 (*Actinidaceae*) 猕猴桃属 (*Actinida*) 多年生木质藤本植物,在东北地区属于具有地方特色的林下资源,目前以其独特的风味和丰富的营养深受消费者喜爱,发展前景广阔。随着国内外引种工作的开展,栽培品种区域化格局逐渐形成,苗木市场逐渐变大,但由于目前品种繁多,存在“同名异物”、“同物异名”现象。传统品种划分主要依据其形态学特征、生物学特征和经济性状为主要依据,这种品种鉴定方法难以在早期准确地鉴定品种,生产上因伪劣品种或品种混杂造成损失的现象时有发生。因此在苗期准确鉴别品种显得较为重要和迫切,同时对新品种的审定、注册、保护和管理,建立快速、准确、可靠的品种特异性检测方法,具有较高的实践价值。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法,可数字化表征不同品种性状,从而快速鉴定软枣猕猴桃苗木品种,具有通用、便捷和有效的特点。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法,包括以下步骤:以软枣猕猴桃苗木基因组DNA为模板,利用引物对UDK-104和/或UDK-099进行扩增,将扩增产物进行毛细管电泳,依据电泳结果,判断软枣猕猴桃苗木品种;

[0006] 所述引物对UDK-104包括UDK-104-F和UDK-104-R,所述UDK104-F的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述UDK-104-R的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0007] 所述引物对UDK-099包括UDK-099-F和UDK-099-R,所述UDK-099-F的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;所述UDK-099-R的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0008] 优选的,所述软枣猕猴桃苗木基因组DNA提取自落叶期的软枣猕猴桃芽。

[0009] 优选的,所述引物对UDK-104的扩增片段内TG重复单元数为9,CA或TG重复单元数为13,TC或AC重复单元数为11;所述引物对UDK-099的扩增片段内TG重复单元数为19。

[0010] 优选的,所述扩增的PCR体系以10 μ L计,包括:ddH₂O 3.0 μ L,2 \times Taq master mix 5 μ L,20ng模板DNA1.0 μ L,20 μ M正向引物和20 μ M反向引物各0.5 μ L。

[0011] 优选的,所述扩增的PCR程序包括:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0012] 本方法提供了一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法,采用SSR标记结合毛细管电泳技术,建立了基于2对SSR标记的软枣猕猴桃品种鉴定方法。本发明实施例首次建立了目前国内外的15个软枣猕猴桃品种的SSR扩增数据,为未知品种的鉴定提供了可对比的数据结果,为软枣猕猴桃的早期品种鉴定提供了一种重复性好、位点特异性强、扩增条带数字化,并且通用、便捷、有效的方法。

附图说明

[0013] 图1为UDK-099在‘龙成2号’上的扩增结果；

[0014] 图2为UDK-104在‘龙成2号’上的扩增结果图。

具体实施方式

[0015] 本发明提供了一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法,包括以下步骤:以软枣猕猴桃苗木基因组DNA为模板,利用引物对UDK-104和/或UDK-099进行扩增,将扩增产物进行毛细管电泳,依据电泳结果,判断软枣猕猴桃苗木品种;

[0016] 所述引物对UDK-104包括UDK-104-F和UDK-104-R,所述UDK-104-F的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述UDK-104-R的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0017] 所述引物对UDK-099包括UDK-099-F和UDK-099-R,所述UDK-099-F的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;所述UDK-099-R的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0018] 本发明对所述基因组DNA的来源并没有特殊限定,所述软枣猕猴桃苗木基因组DNA优选提取自落叶期的软枣猕猴桃芽。本发明对所述提取的方法并没有特殊限定,优选CTAB法进行DNA提取,更优选的参照刘振盼等方法提取(刘振盼等.一种用于软枣猕猴桃ISSR分析的芽DNA提取方法.辽宁林业科技.2019年第6期)。本发明优选将提取得到的DNA利用TE进行稀释,稀释至10ng/ μ L,以进行后续的扩增。

[0019] 本发明所述引物对UDK-104的扩增片段内TG重复单元数为9,CA或TG重复单元数为13,TC或AC重复单元数为11;所述引物对UDK-099的扩增片段内TG重复单元数为19。

[0020] 本发明所述扩增的PCR体系以10 μ L计,优选包括:ddH₂O 3.0 μ L,2 \times Taq master mix 5 μ L,20ng模板DNA1.0 μ L,20 μ M正向引物和20 μ M反向引物各0.5 μ L。所述扩增的PCR程序优选包括:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0021] 本发明优选取PCR产物0.3 μ L、分子量内标0.5 μ L和去离子甲酰胺9.5 μ L混合加入PCR板,95 $^{\circ}$ C变性5min,4 $^{\circ}$ C冷却后离心,1 \times Buffer缓冲液上机进行所述毛细管电泳,而后再利用分析软件Genemarker2.2.0对得到的原始数据进行分析,得到扩增片段大小按位点导出峰图、EXCEL位点信息表。本发明通过上述操作将基于SSR标记扩增出来的片段进行数字化展示,尤其是在不同的等位基因上扩增出不同长度的片段,从而作为以后对软枣猕猴桃品种鉴定的依据。

[0022] 本发明以15个软枣猕猴桃品种为例进行说明,最终UDK104的特异性最高,它可将所有品种区分开;UDK-099除2号(‘龙成2号’)和10号(‘赤焰’)两个品种无法区分外,其余品种均可区分,所以在应用时,可以UDK-104为主,以UDK-099为辅,作为补充。

[0023] 下面结合实施例对本发明提供的软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0024] 实施例1

[0025] 1、实验材料

[0026] 试验样品于2019年3月采自辽宁省大连市金普新区亮子屯,辽宁省经济林研究所软枣猕猴桃种质资源圃。采集的带有隐形芽的小段1年生枝条,带回实验室,-20 $^{\circ}$ C保存备用。每个品种5次重复。样品的序号、名称、产地见表1。

[0027] 表1国内外主要软枣猕猴桃栽培品种

序号	名称	产地	序号	名称	产地
1	桓优1号	中国	9	红哈迪	美国
2	龙成二号	中国	10	赤焰	新西兰
3	魁绿	中国	11	紫色萨瓦多	乌克兰
4	亚当	波兰	12	红色九月	波兰
5	韦迪	波兰	13	库库瓦	日本
6	伊赛	日本	14	日内瓦	美国
7	巨人	意大利	15	安娜	俄罗斯
8	罗高	波兰			

[0029] 2、基因组DNA提取与定量

[0030] 参照改良CTAB法进行提取(刘振盼等.一种用于软枣猕猴桃ISSR分析的芽DNA提取方法.辽宁林业科技.2019年第6期)。取1个隐形芽,在有液氮的研钵快速研磨1次,加入1mL 1.5%CTAB提取液(100mmol·L⁻¹Tris-HCl,20mmol·L⁻¹EDTA,1.4mol·L⁻¹NaCl,2.5%CTAB,2%PVP),65℃水浴60min,取上清600μL,加600μL氯仿:异戊醇(24:1)混匀。10000r·min⁻¹离心5min。取上清300μL,加入600μL无水乙醇,倒掉上清,70%乙醇洗3次,自然风干。用50μL TE溶解,置于4℃备用。用琼脂糖凝胶电泳法检测DNA提取质量,用紫外分光光度计测定纯度和浓度。用TE将其最终质量浓度调至10ng·μL⁻¹。

[0031] 3、PCR扩增

[0032] PCR反应体系(10.0μL):ddH₂O 3.0μL,2×Taq master mix 5μL,DNA 1.0μL,F-primer 0.5μL(20μM),R-primer 0.5μL(20μM)。在正向引物上进行荧光标记;PCR反应程序:94℃5min,94℃30s,52℃30s,72℃30s,共35个循环,最后72℃10min。扩增完成后置于4℃冰箱保存备用。试验所用引物信息如表2。

[0033] 表2 SSR引物信息

[0034]

引物编号	序列	SEQ ID NO	重复单元数
UDK-096-F	CCCAAAGTTCCTCACTCTTCC	5	(CT)4(GT)14
UDK-096-R	TAAACAAAAACCAAATCTGGCA	6	
UDK-097-F	TTGATCGCATAAAACCTCCC	7	(TG)18
UDK-097-R	GGCAGTGTCTGAGTCTTTTG	8	
UDK-098-F	GTAAGGTTGGTACTGGCAGTCA	9	(CA)11
UDK-098-R	TGCATGATTATGGTTGGCAT	10	
UDK-099-F	TCCTATTATTGCTGACACGACA	3	(TG)19
UDK-099-R	TGTTATAGGCCACCTCACTGG	4	
UDK-101-F	GGGTTTGTGAGGGAAAGA	11	(TG)16
UDK-101-R	AACACCAAACAGCACCCCTTC	12	
UDK-103-F	TCTTCTCCCTTTCTTGGCA	13	(TC)9
UDK-103-R	GCTGTCTAGTCATTTCCCTCAA	14	
UDK-104-F	ACATCTCGGCTGAAGATGCT	1	(TG)9CA(TG)
UDK-104-R	AGGTTGCATATGAGTGGTTGC	2	13TC(AC)11
UDK-106-F	CACCTGTCAAGCATTGTAGAA	15	(CA)11TA(CA))6
UDK-106-R	GTGTTGCCAGTGAAGTTATGC	16	

[0035]	UDK-125-F	ACGAGCCCAAATAGAGTTCA	17	(CA)18
	UDK-125-R	TGAGTGCAGCATAGCTACTTCC	18	
	UDK-128-F	GCTCTCGGGACTGTTTGGTA	19	(GT)7GC(GT)
	UDK-128-R	GCAACGTAAACTCCGTTAACG	20	7(GA)11
	UDK-131-F	CGGTGTGGAGAGGATACGAT	21	(GT)14
	UDK-131-R	AAGTAAAGCCATTGTCATTGCA	22	
	UDK-143-F	TGGTGTAAGTCAAAAACAGCC	23	(AC)18
	UDK-143-R	AGAAGATTTTCATTGTCCTCCCT	24	
	UDK-153-F	CCCCAGTGGAGATCACTTTC	25	(TG)11
	UDK-153-R	TGGATATCTTGCCCATCTCC	26	
	UDK-155-F	TGCCCTTGTATTTGTGTCTT	27	(AC)11(CA)5
	UDK-155-R	TCATGTTTCAGTAGTTACGGCG	28	
	UDK-158-F	GCCCATCTAATCCGTA CTCTG	29	(GT)16
	UDK-158-R	TCAATTGAAGCAACTCTTCTTGA	30	
	A002-F	CCGCACGAGGGTTACATC	31	(GGAAG)3
	A002-R	ACAGAGGCTTGGTGGTTG	32	
	A009-F	TCTTCGTTGCCTGACATT	33	(GA)10
	A009-R	GTCCGTTCTCGTCAATAGTT	34	
	A033-F	AACTGGACGGTCACGATT	35	(GA)15
	A033-R	TCCTCAACCACTGGCTCT	36	
A059-F	AAGTGGTTCCGCTCTGGT	37	(CT)9	
A059-R	ATGGTCACATCGTCGTCA	38		
A103-F	GAGCATA CAGAGGGAAGA	39	(TC)18	
A103-R	ACTGGAGTGAAGGAGGGT	40		

[0036] 4、毛细管电泳上机检测

[0037] 取PCR产物0.3 μ L、分子量内标0.5 μ L和去离子甲酰胺9.5 μ L混合加入PCR板,95 $^{\circ}$ C变性5min,4 $^{\circ}$ C冷却后离心,1 \times Buffer缓冲液上机检测。

[0038] 利用分析软件Genemarker2.2.0对得到的原始数据进行分析,得到扩增片段大小按位点导出峰图、EXCEL位点信息表。

[0039] 5、以芽为试材基因组DNA扩增效果评价

[0040] 20对初筛引物中除A033外,共19对引物在全部或部分样品中有扩增结果,其中9对引物在全部15个样品中均有扩增结果,另外10对引物有在部分品种有扩增结果。图1和图2分别显示UDK-099、UDK-104在2号样品(‘龙成2号’)的扩增结果。这说明以1a生苗木枝条的落叶期采集的芽为试材,可以用于后续的SSR的品种鉴别研究。

[0041] 6、软枣猕猴桃品种的分子鉴定

[0042] 在20对引物中UDK-104特性最高,它可将所有品种区分开;UDK-099次之,除2号(‘龙成2号’)和10号(‘赤焰’)样品不能区分外,其他品种均可区分,可以作为UDK-104的补充。表3列出了15个软枣猕猴桃品种利用UDK-104和UDK-099扩增时的筛选的重复性好的具体扩增片段大小,目标品种的鉴定可根据扩增片段的大小进行比对,该研究结果为软枣猕猴桃的品种鉴定提供了便捷、有效的方法。结果见表3和表4。

[0043] 表3引物UDK-104对15个软枣猕猴桃品种的鉴定

编号	品种	特征扩增片段大小			
	1 桓优1号	171	181	197	*
	2 龙成2号	169	189	209	*
	3 魁绿	179	189	*	*
	4 亚当	167	185	*	*
	5 韦迪	167	184	*	*
[0044]	6 伊赛	161	169	181	*
	7 巨人	167	183	*	*
	8 罗高	129	143	155	*
	9 红哈迪	165	181	199	*
	10 赤焰	167	173	*	*
	11 紫色萨瓦多	169	179	*	*
	12 红色九月	167	173	179	*
	13 库库瓦	167	175	181	*
[0045]	14 日内瓦	167	181	199	*
	15 安娜	167	177	185	201

[0046] 注:表格中*表示无其他特征片段。

[0047] 表4引物UDK-099对15个软枣猕猴桃品种的鉴定

编号	品种	扩增片段大小				
	1 桓优 1 号	62	72	118	*	*
	2 龙成 2 号	100	100	*	*	*
	3 魁绿	126	126	*	*	*
	4 亚当	62	66	74	86	*
	5 韦迪	62	70	78	*	*
	6 伊赛	76	100	*	*	*
	7 巨人	72	76	100	106	118
[0048]	8 罗高	72	98	*	*	*
	9 红哈迪	68	82	100	108	*
	10 赤焰	100	100	*	*	*
	11 紫色萨瓦多	82	124	*	*	*
	12 红色九月	82	118	*	*	*
	13 库库瓦	62	72	92	100	116
	14 日内瓦	64	68	80	106	118
	15 安娜	68	72	76	*	*

注：表格中*表示其他特征片段。

[0049] 实施例2

[0050] 1、实验材料

[0051] 试验样品于2020年3月采自辽宁省大连市金普新区亮子屯,辽宁省经济林研究所软枣猕猴桃种质资源繁殖圃,以‘龙成2号’次年生扦插苗和组培苗为测试样品各100株,共200株,用于验证UDK-104和UDK-099的准确性。每株采集1个芽放入1.5mL离心管内,带回实验室,-20℃保存备用。

[0052] 2、基因组DNA提取与定量

[0053] 采用改良CTAB法进行提取。将测试芽在有液氮的研钵快速研磨1次,加入1mL 1.5%CTAB提取液(100mmol·L⁻¹Tris-HCl,20mmol·L⁻¹EDTA,1.4mol·L⁻¹NaCl,2.5%CTAB,2%PVP),65℃水浴60min,取上清600μL,加600μL氯仿:异戊醇(24:1)混匀。10000r·min⁻¹离心5min。取上清300μL,加入600μL无水乙醇,倒掉上清,70%乙醇洗3次,自然风干。用50μL TE溶解,置于4℃备用。用琼脂糖凝胶电泳法检测DNA提取质量,用紫外分光光度计测定纯度和浓度。用TE将其最终质量浓度调至10ng·μL⁻¹。

[0054] 3、PCR扩增

[0055] PCR反应体系1(10.0μL):ddH₂O 3.0μL,2×Taq master mix 5μL,DNA 1.0μL,F-

primer 0.5 μ L (UDK-104-F, 20 μ M), R-primer 0.5 μ L (UDK-104-R, 20 μ M)。在正向引物上进行荧光标记;PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C 10min。扩增完成后置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0056] PCR反应体系2 (10.0 μ L): ddH₂O 3.0 μ L, 2 \times Taq master mix 5 μ L, DNA 1.0 μ L, F-primer 0.5 μ L (UDK-099-F, 20 μ M), R-primer 0.5 μ L (UDK-099-R, 20 μ M)。在正向引物上进行荧光标记;PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C 10min。扩增完成后置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0057] 4、毛细管电泳上机检测

[0058] 分别取UDK-104和UDK-099两对引物的PCR产物0.3 μ L、分子量内标0.5 μ L和去离子甲酰胺9.5 μ L混合加入PCR板, 95 $^{\circ}$ C变性5min, 4 $^{\circ}$ C冷却后离心, 1 \times Buffer缓冲液上机检测。利用分析软件Genemarker2.2.0对得到的原始数据进行分析, 得到扩增片段大小按位点导出峰图、EXCEL位点信息表。根据测试结果与标准品种进行特征片段比对, 统计目标品种符合率。目标品种符合率=目标品种数/检测数 \times 100%。

[0059] 5、‘龙成2号’ SSR鉴定的准确性

[0060] 利用引物UDK-104和UDK-099的扩增结果200株‘龙成2号’进行品种鉴定, 结果见表5。从表5可知, 将UDK-104和UDK-099用于品种的鉴定, 测试样品中有3个样品无扩增结果, 结果显示扦插苗和组培苗的品种符合率达到98.5%。

[0061] 表5 ‘龙成2号’ SSR品种鉴定结果

测试品种	SSR 鉴定记录				符合率
	检测数	目标品种数	其他品种数	无扩增结果数	
龙成2号	200	197	0	3	98.5%

[0063] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

- <110> 辽宁省经济林研究所
<120> 一种软枣猕猴桃苗木品种鉴定的方法
<160> 40
<170> SIPOSequenceListing 1.0
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 1
acatctcggc tgaagatgct 20
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 2
aggttgcata tgagtggttg c 21
<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 3
tcctattatt gctgacacga ca 22
<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 4
tgttataggc cacctcactg g 21
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 5
cccaaagttc ctcactcttc c 21
<210> 6
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
taaacaaaa ccaaactctgg ca 22
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
ttgatcgcat aaaacctccc 20
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
ggcagtgtcc tgagtctttt g 21
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
gtaaggttgg tactggcagt ca 22
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
tgcattgatta tggttggcat 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
gggtttgttt gagggaaaga 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
aacaccaaac agcacccttc 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 13
tcttcttccc tttcttggca 20
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 14
gctgtctagt catttcctc aa 22
<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 15
cacctgtcaa gcattttag aa 22
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 16
gtgttgcag tgaagttatg c 21
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 17
acgagcccaa aatagagttc a 21
<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 18
tgagtgcagc atagctactt cc 22
<210> 19
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 19
gctctcggga ctgtttggta 20
<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 20
gcaacgtaaa ctccgttaac g 21
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 21
cgggtgtggag aggatacgat 20
<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 22
aagtaaagcc attgtcattg ca 22
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 23
tggtgtaaag tcaaaaacag cc 22
<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 24
agaagatttc attgtcctcc ct 22
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 25
ccccagtgga gatcactttc 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 26
tggatatctt gcccatctcc 20
<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 27
tgccccttgt atttgtgtct t 21
<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 28
tcatgttcag tagttacggc g 21
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 29
gcccatctaa tccgtactct g 21
<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 30
tcaattgaag caactcttct tga 23
<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 31
ccgcacgagg gttacatc 18
<210> 32
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 32
acagaggctt ggtggttg 18
<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 33
tcttcgttgc ctgacatt 18
<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 34
gtccgttctc gtcaatagtt 20
<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 35
aactggacgg tcacgatt 18
<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 36
tcctcaacca ctggctct 18
<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 37
aagtggttcc gctctggt 18
<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 38
atggtcacat cgtcgtca 18

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 39
gagcatacag agggaaga 18
<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 40
actggagtga aggagggt 18

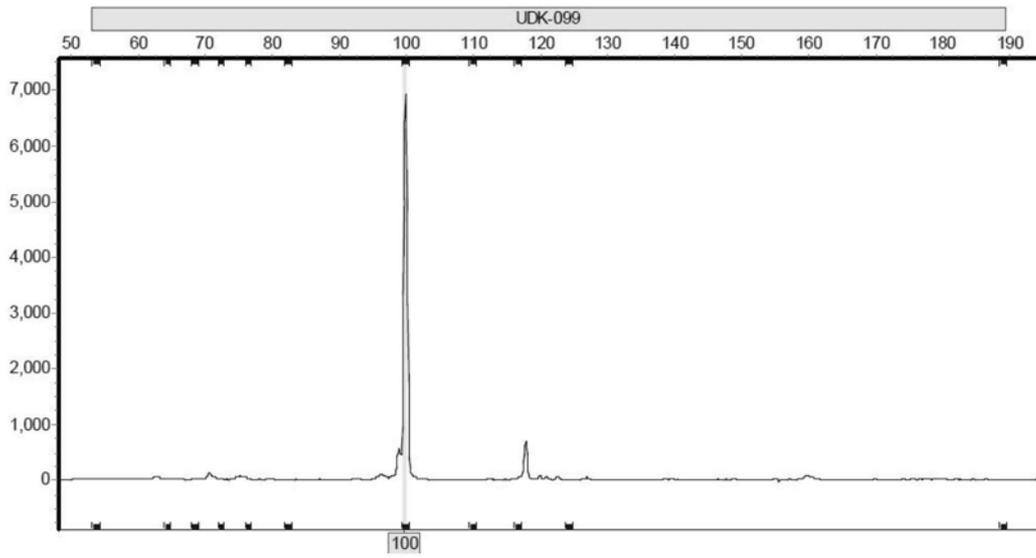


图1

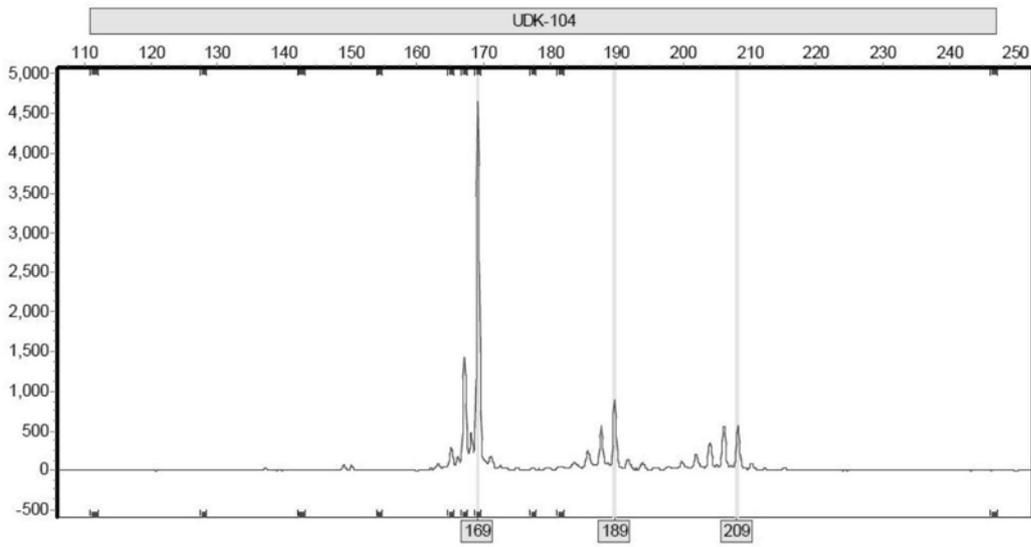


图2