



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109338006 B

(45) 授权公告日 2021.10.12

(21) 申请号 201811437802.3

KR 20140106892 A, 2014.09.04

(22) 申请日 2018.11.28

US 2005181389 A1, 2005.08.18

EP 2638163 A1, 2013.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109338006 A

李英慧.“中国大豆地方品种遗传多样性分析及大豆抗胞囊线虫SNAP标记发掘”.《中国博士学位论文全文数据库农业科技辑》.2007,(第11期),

(43) 申请公布日 2019.02.15

Zhi Gang Wu等.“Genetic diversity analysis of yams (*Dioscorea* spp.) cultivated in China using ISSR and SRAP markers”.《Genet Resour Crop Evol》.2014,第61卷

(73) 专利权人 广西中医药大学
地址 530001 广西壮族自治区南宁市明秀东路179号

(72) 发明人 田慧 高慧新 谭勇 曾昭清

高慧新.“褐苞薯蕷ISSR标记及其DNA条形码研究”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2021,(第02期),

(74) 专利代理机构 南宁启创知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 45122

代理人 经国富

周敏等.“白花蛇舌草的简单重复序列区间(ISSR)遗传多样性分析”.《中国药科大学学报》.2019,第50卷(第2期),

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

审查员 夏士博

(56) 对比文件

CN 107354217 A, 2017.11.17

CN 106636377 A, 2017.05.10

CN 101358234 A, 2009.02.04

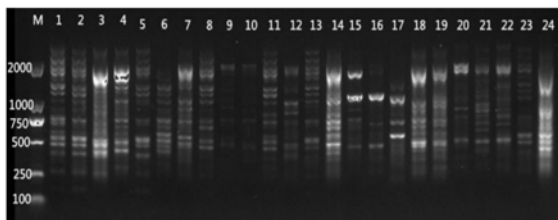
权利要求书2页 说明书9页
序列表9页 附图6页

(54) 发明名称

一种用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开一种用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物及其制备方法和应用。本发明选用两条背景清晰、扩增效果好和多态性高的ISSR引物,对不同产地褐苞薯蕷的DNA进行PCR扩增,构建褐苞薯蕷的遗传资源数据库。其引物为:①编号101,其引物序列为ACA CAC ACA CAC CGC;②编号121,其引物序列为ACA CAC ACA CAC TC。本发明以ISSR为起点,弥补了国内外对褐苞薯蕷分子标记研究甚少的不足,发明成果可用于褐苞薯蕷资源的遗传多样性评价、分子标记辅助育种、遗传关系与品种纯度分析等方面,具有相当大的科学价值与应用价值。



CN 109338006 B

1. 一种用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物,其特征在于:所述的ISSR专用引物包括两条:

(1) 编号101,引物序列为acacacacacaccg;

(2) 编号121,引物序列为acacacacacactc。

2. 一种如权利要求1所述用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 提取不同产地的褐苞薯蕷基因组DNA样品;

(2) 对步骤(1)提取的DNA样品进行ISSR引物的设计;所述的ISSR引物设计原则为:2-3个碱基简单重复4-5次,一端或者两端加2-4个锚定碱基;共设计了50条引物,引物信息如下:

117 atatatatatac
118 atatatatatcg
119 gtgtgtgtgtgtgc
120 gtgtgtgtgtgtgcc
121 acacacacacactc
122 acacacacacactct
123 acacacacacactg
124 acacacacacactgg
125 ctctctctctctag
126 ctctctctctctaga
127 ataataataatc
128 ataataataatca
129 ataataataact
130 ataataataataacg
131 ctcatcatcatcatcta
132 ctactactactactaac
133 tattattattattatta
146 gtcgtcgtcgtcgc
148 tgtgtgtgtgtgtct
150 cacacacacacact
151 acacacacacacgt
156 acacacacacacct
157 acacacacacaccg
160 gatgatgatgatgc
161 cgccgccgccgctg
162 cgccgccgccgccgctc
169 ctctctctctctttg
170 ctctctctctctac
171 ctctctctctctgc

172 cacacacacacacacatc
173 cacacacacacaat
174 cacacacacacaag
175 cacacacacacagc
182 gtggtggtggtggtgac
183 gtggtggtggtggtgat
184 gtggtggtggtggtgag
185 gtggtggtggtggtgct
186 gtggtggtggtggtgtg
187 gtggtggtggtggtgcg
101 acacacacacaccgc
102 acacacacacaccgg
103 acacacacacaccga
104 acacacacacaccgt
105 atatatatatataca
106 atatatatatatact
107 gtgtgtgtgtgtgcg
108 gtgtgtgtgtgtgcc
109 tgtgtgtgtgtgcta
110 tgtgtgtgtgtgctg
111 ctctctctctctaga

(3) 对50条引物进行扩增产物琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像,拍照保存,整理得到ISSR-PCR数据结果;

(4) ISSR引物的筛选,从50条引物凝胶成像得到ISSR-PCR数据结果中,经过数据分析后筛选出2条背景清晰、扩增效果好和多态性高的引物,即为所述的ISSR专用引物。

一种用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属分子生物学领域,具体涉及一种建立褐苞薯蓣遗传资源数据库的方法及其ISSR专用引物与应用。

背景技术

[0002] 褐苞薯蓣来源为薯蓣科薯蓣属植物褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill),别名广西淮山,淮山,淮山药,小薯,薯仔,山板薯。野生于海拔100~1950m的山坡、路旁、山谷杂木林或灌丛中。我国南方各地有栽培,主产于广西陆川、玉林、桂平、平南、灵山。其根茎入药,药材名为广山药,是广西的道地药材;中医认为其性味甘、平,具有“补肺养胃,生津益肺,补肾涩精”的功效,用于脾虚食少,久泻,脾虚咳喘,肾虚遗精,带下,尿频,虚热消渴等症;《广西壮族自治区壮药质量标准》记载其性味甜、平,具有“调谷道气道水道,补肺肾”的功效,用于埃病(咳嗽),墨病(哮喘),遗精,白冻(泄泻),瘰疬(疔积),隆白呆(带下),肉扭(淋症),啊肉甜(消渴)等症。

[0003] 目前对褐苞薯蓣的研究多集中在形态学、化学、药理学;形态学研究法仍是辨别、鉴别种类和品种的最基本的依据,当前对大多数作物种质的鉴定,依然根据作物最鲜明的形态学特性进行区别、分类和命名。但是,形态学标记方法是一种表型性状,标记数量少,标记有限,常与有害或不利性状连锁,数量性状基因等位常需要严格控制实验环境,易受到环境条件影响显著,因此使用其鉴别的结果有很大的误差,同时在使用过程中主观因素较多,所以在植物遗传育种中的应用会受到较大限制,形态学还需要其它的方法进行辅助鉴别。中国专利201610003073.5-《杨梅EST-SSR分子标记及其应用》提供了EST-SSR分子标记法对杨梅多样性分析和品种鉴定,该分子标记法多态性相对低,因而使得后续的研究、分析不准确。中国专利201210200468.6-《豌豆孢囊线虫特异性RAPD标记和SCAR标记快速分子检测方法》提供了一种RAPD标记和SCAR标记快速分子检测方法,该方法虽然具有所需DNA量极少,要求设备也相对简单的优点,但是由于RAPD引物非常短,只有十个碱基,退火温度也较低,因而重复性会变差,且容易产生非特异性条带。

[0004] 目前还未有学者利用ISSR分子标记对褐苞薯蓣的遗传多样性研究。

发明内容

[0005] 本发明针对以上现有技术不足,提供一种用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物及其制备方法和应用,本发明的ISSR标记技术结合了RAPD标记技术和SSR标记技术的优点,模板DNA用量少,操作简单,方便,高效,重复性好,是一种应用于褐苞薯蓣植物种质资源的亲缘鉴定以及育种亲本选择利用以及品种保护等方面的有效工具。

[0006] 本发明的具体技术方案如下:

[0007] 一种用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物,所述的ISSR专用引物包括两条:

- [0008] (1) 编号101,引物序列为ACACACACACACCGC;
- [0009] (2) 编号121,引物序列为ACACACACACACTC。
- [0010] 一种如前所述用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物的制备方法,包括一下步骤:
- [0011] (1) 提取不同产地的褐苞薯蕷基因组DNA样品;
- [0012] (2) 对步骤(1)提取的DNA样品进行ISSR引物的设计;所述的ISSR引物设计原则为:2-3个碱基简单重复4-5次,一端或者两端加2-4个锚定碱基;共设计了50条引物,引物信息如下:
- [0013] 117 ATATATATATATAC
- [0014] 118 ATATATATATATCG
- [0015] 119 GTGTGTGTGTGTGC
- [0016] 120 GTGTGTGTGTGTGCC
- [0017] 121 ACACACACACACTC
- [0018] 122 ACACACACACACTCT
- [0019] 123 ACACACACACACTG
- [0020] 124 ACACACACACACTGG
- [0021] 125 CTCTCTCTCTCTAG
- [0022] 126 CTCTCTCTCTCTAGA
- [0023] 127 ATAATAATAATATC
- [0024] 128 ATAATAATAATATCA
- [0025] 129 ATAATAATAATACT
- [0026] 130 ATAATAATAATAATACG
- [0027] 131 CTCATCATCATCATCTA
- [0028] 132 CTACTACTACTACTAAC
- [0029] 133 TATTATTATTATTATTA
- [0030] 146 GTCGTCGTCGTCGC
- [0031] 148 TGTGTGTGTGTGTCT
- [0032] 150 CACACACACACACT
- [0033] 151 ACACACACACACGT
- [0034] 156 ACACACACACACCT
- [0035] 157 ACACACACACACCG
- [0036] 160 GATGATGATGATGC
- [0037] 161 CGCCGCCGCCGCTG
- [0038] 162 CGCCGCCGCCGCCGCTC
- [0039] 169 CTCTCTCTCTCTTG
- [0040] 170 CTCTCTCTCTCTAC
- [0041] 171 CTCTCTCTCTCTGC
- [0042] 172 CACACACACACACATC
- [0043] 173 CACACACACACAAT

[0044] 174 CACACACACACAAG
[0045] 175 CACACACACACAGC
[0046] 182 GTGGTGGTGGTGGTGAC
[0047] 183 GTGGTGGTGGTGGTGAT
[0048] 184 GTGGTGGTGGTGGTGAG
[0049] 185 GTGGTGGTGGTGGTGCT
[0050] 186 GTGGTGGTGGTGGTGTG
[0051] 187 GTGGTGGTGGTGGTGCG
[0052] 101 ACACACACACACCGC
[0053] 102 ACACACACACACCGG
[0054] 103 ACACACACACACCGA
[0055] 104 ACACACACACACCGT
[0056] 105 ATATATATATATACA
[0057] 106 ATATATATATATACT
[0058] 107 GTGTGTGTGTGTGCG
[0059] 108 GTGTGTGTGTGTGCC
[0060] 109 TGTGTGTGTGTGCTA
[0061] 110 TGTGTGTGTGTGCTG
[0062] 111 CTCTCTCTCTAGA

[0063] (3) 对50条引物进行扩增产物琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像,拍照保存,整理得到ISSR-PCR数据结果;

[0064] (4) ISSR引物的筛选,从50条引物凝胶成像得到ISSR-PCR数据结果中,经过数据分析后筛选出2条背景清晰、扩增效果好和多态性高的引物,即为所述的ISSR专用引物。

[0065] 作为技术方案的进一步改进,以上所述用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物的制备方法,所述的数据分析为利用POPGENE1.32、NTSYS2.10软件对褐苞薯蕷的ISSR-PCR数据进行归类和分析,归类分析的参数为:等位基因数(Na)、有效等位基因(Ne)、Nei's基因多样性指数(H)和Shannon's信息指数(I)。

[0066] 作为本领域技术人员公知的常识,以上所述的琼脂糖凝胶电泳的方法为本领域的常规技术手段。本发明的处理方法为:取7 μ L PCR产物置于1.2%的琼脂糖凝胶(加入GelRed染料)中进行电泳检测,电压60V,恒压电泳80min,用D2000 DNA Marker作为标准参照;作为本领域技术人员公知的常识,也可以选用其他具体的琼脂糖凝胶电泳方法。

[0067] 作为本领域技术人员公知的常识,以上所述的PCR扩增反应为本领域的常规技术手段。本发明的PCR扩增反应步骤如下:95 $^{\circ}$ C预变性5min,95 $^{\circ}$ C变性40s,退火45s(不同引物T_m值决定),72 $^{\circ}$ C延伸2min,34个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0068] 作为本领域技术人员公知的常识,也可以对以上工艺步骤进行适当调整,选用其他PCR扩增反应步骤或方法。

[0069] 如权前所述一种用于褐苞薯蕷遗传资源数据库的ISSR专用引物的应用,用于褐苞薯蕷的品质鉴定、评价、储存和培育新种中的一种或多种。

[0070] 本技术方案的有益效果有以下几点:

[0071] 1. ISSR标记技术比RFLP、SSR、RAPD等技术能够更多地揭示基因组中的遗传多态性,是很好的DNA指纹标记,因此,在种质资源鉴定方面ISSR技术显示出比其他标记技术更高的优越。

[0072] 2. 本发明有效解决前人在遗传标记数据库构建中,库的代表性差的问题;也解决了已有标记技术在褐苞薯蓣遗传资源方面的不足,具有多态性高、重复性好、费用低、检测程序简单和不受环境影响的优点。

[0073] 3. 本发明以ISSR为起点,弥补了国内外对褐苞薯蓣分子标记研究甚少的不足,发明成果可用于褐苞薯蓣品种资源保存与鉴定、遗传关系与品种纯度分析、分子标记辅助育种、新品种保护以及解决品种争议等方面,具有相当大的科学价值与应用价值。

[0074] 4. 本发明采用的ISSR专用引物,包括两条引物:

[0075] ①编号101,其引物序列为ACACACACACACCGC;

[0076] ②编号121,其引物序列为ACACACACACACTC。

[0077] 该ISSR专用引物背景清晰、扩增效果好、多态性高,其中2条引物共扩增出27条条带,其中多态性条带26条,多态性百分比(PPB)为96.30%。

[0078] 5. 本发明改进现有PCR技术,针对褐苞薯蓣的基因组特点改进了PCR扩增的各步骤参数,取得的扩增产物较其他扩增方法具有更稳定的特点。同时采用低熔点琼脂糖凝胶作为电泳凝胶,低熔点琼脂糖凝胶具有更高的筛过特性,且更透明,有利于减少背景干扰;采用氨基黑10B作为扩增产物的染色剂,使得拍照成像更加清晰,便于观察、分析。

[0079] 6. 本发明建立褐苞薯蓣所选择的各指标数:等位基因数(N_a)指位于一对同源染色体的相同位置上控制着相对性状的一对基因的数量;有效等位基因数(N_e)指理想群体中(所有等位基因频率相等),一个基因座上产生与实际群体中相同的纯合度所需的等位基因数(即实际群体的纯合度的倒数); $Nei's$ 基因多样性指数(H)通过计算单倍型多样性指数来计算群体间的核苷酸序列歧化距离,用于表征物种的多样性;和Shannon's信息指数(I)指通过物种频率估算物种多样性的指数。通过对凝胶电泳的精确分析得到的以上几个指数可以准确记录物种的特性和多样性,建立的数据库具有精确、高效的特点,该数据库用于对褐苞薯蓣的品质鉴定准确率达到99%以上。

附图说明

[0080] 图1-5为编号101的引物对104份供试样品的ISSR图谱。

[0081] 图6-10为编号121的引物对104份供试样品的ISSR图谱。

[0082] 图11为褐苞薯蓣的指纹图谱(系统发育树)。

[0083] 图12为通用引物823引物扩增结果图。

[0084] 图13为自设引物121引物扩增结果图。

具体实施方式

[0085] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步说明。

[0086] 实施例1:

[0087] (1) 参见表1,采集104份褐苞薯蓣样品,来自广西南宁、桂林、贵港、柳州、钦州、玉林、百色、梧州、贺州、防城港、河池、来宾,湖南永州,广东韶关。采集块茎冻于液氮,保存在-

80℃。提取所采集的褐苞薯蕷基因组DNA样品；

[0088] 表1褐苞薯蕷104份供试种质资源

[0089]	样品名称	编号	采样地点	样本数
	褐苞薯蕷			
		1	广西南宁青秀区	1 (栽培)
		2	广西南宁伊岭岩	1 (栽培)
		3	广西南宁伊岭岩	1 (野生)
		4	广西南宁武鸣县腾翔	1 (野生)
		5	广西南宁四塘	1 (栽培)
		6	广西南宁武鸣县	1 (栽培)
		7	广西南宁宁明县东安乡	1 (野生)
		8	广西南宁兴宁区	1 (野生)
		9-10	广西桂林龙胜县	2 (野生)
		11	广西桂林龙胜县	1 (栽培)
		13	广西桂林龙胜县江底乡	1 (栽培)
		12、14-22	广西桂林龙胜县江底乡、大坪山	10 (野生)
		23	广西桂林恭城	1 (野生)
		24-28	广西桂林灵川县	5 (野生)
[0090]		29-32	广西桂林灵川县	4 (栽培)
		33-37	广西贵港桂平市金田镇	5 (栽培)
		38-43	广西贵港平南县大新镇	6 (栽培)
		44	广西柳州三门江	1 (野生)
		45-49	广西柳州融安县大将镇	5 (野生)
		50-56	广西钦州灵山县灵城镇	7 (栽培)
		57-63	广西玉林兴业县沙塘镇	6 (栽培)
		64-68	广西玉林陆川县乌石镇	6 (栽培)
		69-75	广西百色田林县平塘乡	7 (野生)
		76-80	广西梧州长洲区长洲镇	5 (栽培)
		81-83	广西贺州钟山县公安镇	3 (栽培)
		84-86	广西贺州钟山县公安镇	3 (野生)
		87-93	广西河池宜州市北山镇	7 (野生)
		94-98	湖南永州江华县桥头铺镇	5 (栽培)
		99-104	广东韶关始兴县都亨乡	6 (野生)

[0091] (2) 对步骤(1)提取的DNA样品进行ISSR引物的设计；所述的ISSR引物设计原则为：

2-3个碱基简单重复4-5次,一端或者两端加2-4个锚定碱基;共设计了50条引物,引物信息如参见表2。

[0092] 表2设计的50条ISSR引物

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
117	ATATATATATATAC	162	CGCCGCCGCCGCCGCTC
118	ATATATATATATCG	169	CTCTCTCTCTCTTG
119	GTGTGTGTGTGTGC	170	CTCTCTCTCTCTAC
120	GTGTGTGTGTGTGCC	171	CTCTCTCTCTCTGC
121	ACACACACACACTC	172	CACACACACACACATC
122	ACACACACACACTCT	173	CACACACACACAAT
123	ACACACACACACTG	174	CACACACACACAAG
124	ACACACACACACTGG	175	CACACACACACAGC
125	CTCTCTCTCTCTAG	182	GTGGTGGTGGTGGTGAC
126	CTCTCTCTCTCTAGA	183	GTGGTGGTGGTGGTGAT
127	ATAATAATAATATC	184	GTGGTGGTGGTGGTGAG
[0093] 128	ATAATAATAATATCA	185	GTGGTGGTGGTGGTGCT
129	ATAATAATAATACT	186	GTGGTGGTGGTGGTGTG
130	ATAATAATAATAATACG	187	GTGGTGGTGGTGGTGCG
131	CTCATCATCATCATCTA	101	ACACACACACACCGC
132	CTACTACTACTACTAAC	102	ACACACACACACCGG
133	TATTATTATTATTATTA	103	ACACACACACACCGA
146	GTCGTCGTCGTCGC	104	ACACACACACACCGT
148	TGTGTGTGTGTGCT	105	ATATATATATATACA
150	CACACACACACACT	106	ATATATATATATACT
151	ACACACACACACGT	107	GTGTGTGTGTGTGCG
156	ACACACACACACCT	108	GTGTGTGTGTGTGCC
157	ACACACACACACCG	109	TGTGTGTGTGTGCTA
160	GATGATGATGATGC	110	TGTGTGTGTGTGCTG
[0094] 161	CGCCGCCGCCGCCGCTG	111	CTCTCTCTCTCTAGA

[0095] (3) 对50条引物进行扩增产物琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像,拍照保存,整理得到ISSR-PCR数据结果;

[0096] 作为本领域技术人员公知的常识,以上所述的琼脂糖凝胶电泳的方法为本领域的常规技术手段。本发明的处理方法为:取7 μ L PCR产物置于1.2%的琼脂糖凝胶(加入GelRed染料)中进行电泳检测,电压60V,恒压电泳80min,用D2000 DNA Marker作为标准参照;作为

本领域技术人员公知的常识,也可以选用其他具体的琼脂糖凝胶电泳方法。

[0097] 作为本领域技术人员公知的常识,以上所述的PCR扩增反应为本领域的常规技术手段。本发明的PCR扩增反应步骤如下:95℃预变性5min,95℃变性40s,退火45s(不同引物T_m值决定),72℃延伸2min,34个循环,72℃延伸5min,4℃保存。

[0098] 作为本领域技术人员公知的常识,也可以对以上工艺步骤进行适当调整,选用其他PCR扩增反应步骤或方法。

[0099] (4) ISSR引物的筛选,从50条引物凝胶成像得到ISSR-PCR数据结果中,经过数据分析后筛选出2条背景清晰、扩增效果好和多态性高的引物,即为所述的ISSR专用引物,参见表3。

[0100] 表3编号101和编号121引物ISSR-PCR扩增

	引物	序列	T _m (°C)
[0101]	101	ACA CAC ACA CAC CGC	48
	121	ACA CAC ACA CAC TC	42

[0102] 编号101和编号121引物扩增结果如表4。

[0103] 表4褐苞薯蓣多态性条带和百分比 (PPB)

	引物	扩增条带/条	多态性条带/条	多态性比 (PPB) (%)
[0104]	101	15	15	100.00
	121	12	11	91.67
	总数	27	26	96.30

[0105] 以上所述的数据分析为利用POPGENE1.32、NTSYS2.10软件对褐苞薯蓣的ISSR-PCR数据进行归类和分析,归类分析的参数为:等位基因数(N_a)、有效等位基因(N_e)、Nei's基因多样性指数(H)和Shannon's信息指数(I)。N_e值越大,说明等位基因越重要,等位基因作用越大。I和H值越大,说明该样品遗传多样性水平越高。由整体样品的物种水平可知,褐苞薯蓣的N_a值为1.9811,N_e值为1.6357,H值为0.3675,I值为0.5439,说明供试褐苞薯蓣样品整体遗传多样性水平较高;野生样品居群的N_a值、N_e值、H值、I值平均为1.5006、1.3847、0.2108、0.3039,栽培样品居群的N_a值、N_e值、H值、I值平均为1.4163、1.3080、0.1698、0.2469,(结果参见表5)两者比较来看,供试褐苞薯蓣野生居群样品比栽培居群样品具有更高的遗传多样性。

[0106] 表5褐苞薯蓣遗传多样性

	褐苞薯蓣	N _a	N _e	H	I
[0107]	野生样品居群	1.5006	1.3847	0.2108	0.3039
	栽培样品居群	1.4163	1.3080	0.1698	0.2469
	整体样品	1.9811	1.6357	0.3675	0.5439

[0108] 不同居群褐苞薯蓣居群总基因多样性(H_t)为0.3527,居群内基因多样性(H_s)为0.1892,居群间遗传分化系数(G_{st})为0.4636。其中G_{st}>H_s,说明褐苞薯蓣居群间遗传分化

度比居群内遗传分化度更高。基因流(Nm)为0.5785<1,说明褐苞薯蓣居群间遗传分化水平较低,不同居群间基因交流较少。

[0109] 聚类结果表明褐苞薯蓣遗传距离与地理距离具有一定的相关性,样品所在地理位置和气候特点愈相似,样品间的生物遗传信息愈相近;同时野生品和栽培品之间存在遗传差异。

[0110] 实施例2(用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物的应用)

[0111] (1) 样品采集,见表6

[0112] 表6样品采集明细

	种	编号	采样地点	采样日期
	褐苞薯蓣	19	广西桂林市龙胜县	2016.10.03
	<i>Dioscorea persimilis</i> Prain et Burkill	35	广西桂平市金田镇	2017.07.15
		101	湖南永州市江华县	2017.07.21
	薯蓣(怀山药)	A3	河南焦作市容县	2017.09.25
[0113]	<i>Dioscorea polystachya</i> Turcz.	A4	河南焦作市容县	2017.09.25
		A5	河南焦作市容县	2017.09.25
		A6	河南焦作市容县	2017.09.25
		A7	河南焦作市容县	2017.09.25
	参薯	B1	广西南宁市青秀区	2017.08.14
	<i>Dioscorea alata</i> L.	B2	广西南宁罗村	2016.10.15
		B3	广西崇左市宁明县	2017.07.30
		B4	广西柳州三门江	2017.06.04
	黄独	C2	广西南宁市青秀区	2016.10.15
	<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	C3	广西南宁市青秀区	2016.10.15
[0114]		C4	广西南宁市青秀区	2016.10.15
		C5	广西南宁市武鸣县	2016.10.15
	光叶薯蓣 <i>Dioscorea glabra</i> Roxb.	E	广西南宁市武鸣县	2016.10.24
	木薯 <i>Manihot esculenta</i> Crantz	F	广西南宁市青秀区	2017.08.14
	甘薯 <i>Dioscorea esculenta</i> (Lour.) Burkill	G	广西防城港市	2016.10.10

[0115] (2) 试验准备:将已提取的上述实验样品的总DNA并处理好的引物取出置于冰盒中,准备已灭菌的枪头、PCR管等实验所需,操作桌面灭菌。本次实验用引物根据课题前期实验结果选用通用引物UBC823和自设引物121。

[0116] (3) ISSR-PCR扩增,扩增程序为:95℃预变性5min,95℃变性40s,退火45s(不同引物Tm值决定),72℃延伸2min,34个循环,72℃延伸5min,4℃保存。

[0117] (4) ISSR扩增产物的电泳检测

[0118] 取7μL PCR产物置于1.2%的琼脂糖凝胶(含GelRed染料)中进行电泳,电压60V,电泳80min,用D2000 DNA Marker作为标准参照。电泳结束后,将凝胶置于紫外凝胶成像仪中观察并拍照保存。

[0119] (5) 扩增结果分析

[0120] 实验经3次重复,扩增图谱结果稳定可信,图12为通用引物823引物扩增结果图;图13为自设引物121引物扩增结果图,编号19、35、101为褐苞薯蓣样品,A3-A7为薯蓣样品,B1-B4为参薯样品,C2-C5为黄独样品,E为光叶薯蓣样品,F为木薯样品,G为甘薯样品。

[0121] 以图13对结果进行分析：(1) 扩增图谱Marker的条带清晰明亮，表明电泳质量较好。(2) 相同样品的扩增图谱存在微小差异，这个差异可以忽略不计，因为相同样品个体间的差异是允许存在的。(3) 在100-250bp之间，只有A3、A4样品扩增泳道有明显明亮的条带，其他泳道未见，可以明显地区别。(4) 在500bp的位置，B4样品所在泳道之后均无明显条带，之前的泳道均有一条清晰明亮的条带，可以明显的区别。(5) 在500-750bp之间，B1-B4样品有非常明亮的2条条带，与其他样品可明显区分。(6) 在750-1000bp之间，B1-B4样品在靠近1000bp的位置，有1条清晰明亮的条带；C2-C5样品在靠近750bp的位置，有1条明显的条带，其他样品未见，存在很大差异。(7) 各样品间扩增图谱主条带位置明显不同，褐苞薯蓣样品(19/35/109)扩增图谱主条带位于靠近1000bp和500bp的位置各1条；薯蓣(怀山药)样品(A3/A4)扩增图谱主条带位于500bp的位置和100-250bp之间的位置各1条；薯蓣(铁棍山药)样品(A5/A6/A7)扩增图谱主条带位于500bp和250-500bp之间靠近500bp的位置各1条；比较来看，薯蓣样品的种内差异也是明显小于褐苞薯蓣与薯蓣样品的种间差异的，薯蓣种内差异提示怀山药、铁棍山药虽在植物分类中没有区分，均为薯蓣，但从此次研究结果来看两者还是存在差异的；参薯样品(B1/B2/B3/B4)扩增图谱主条带位于1000bp的位置和500-750bp之间，前者有1条，后者有3条；黄独样品(C2/C3/C4/C5)扩增图谱主条带1条，位于750-1000bp之间；光叶薯蓣样品(E)扩增仅1条主条带，位于1000-2000bp靠近中间的位置；木薯样品(F)扩增图谱有1条主条带，位于2000bp的位置处；甘薯样品(G)扩增图谱有3条主条带，其中，2条位于500-750bp之间靠近500bp的位置，1条位于250-500bp之间靠近250bp的位置。

[0122] 而进一步对以图12对结果进行分析，达不到以上的技术效果。

[0123] 实施例3(用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物的应用)

[0124] 重复实施例2，区别仅仅在于自设引物选自101，其他步骤与实施例2一样，扩增结果分析基本与实施例2一致。

[0125] 结果表明：本发明用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物101和121均可以用于褐苞薯蓣与其混伪品的品质鉴定及评价、储存和培育新种。

[0126] 以上实施例仅为本发明的示例性实施例，不用于限制本发明，本发明的保护范围由权利要求书限定。本领域人员可以在本发明的实质和保护范围内，对本发明做出各种修改或等同替换，这种修改或等同替换也应视为落在本发明的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 广西中医药大学
- [0003] <120> 一种用于褐苞薯蓣遗传资源数据库的ISSR专用引物及其制备方法和应用
- [0004] <160> 52
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 15
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
- [0010] <400> 1
- [0011] acacacacac accgc 15
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 14
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
- [0016] <400> 2
- [0017] acacacacac actc 14
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 14
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
- [0022] <400> 3
- [0023] atatatatat atac 14
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 14
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
- [0028] <400> 4
- [0029] atatatatat atcg 14
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 14
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
- [0034] <400> 5
- [0035] gtgtgtgtgt gtgc 14
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 15
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0040] <400> 6
[0041] gtgtgtgtgt gtgcc 15
[0042] <210> 7
[0043] <211> 14
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0046] <400> 7
[0047] acacacacac actc 14
[0048] <210> 8
[0049] <211> 15
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0052] <400> 8
[0053] acacacacac actct 15
[0054] <210> 9
[0055] <211> 14
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0058] <400> 9
[0059] acacacacac actg 14
[0060] <210> 10
[0061] <211> 15
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0064] <400> 10
[0065] acacacacac actgg 15
[0066] <210> 11
[0067] <211> 14
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0070] <400> 11
[0071] ctctctctct ctag 14
[0072] <210> 12
[0073] <211> 15
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0076] <400> 12
[0077] ctctctctct ctaga 15

- [0078] <210> 13
[0079] <211> 14
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0082] <400> 13
[0083] ataataataa tatc 14
[0084] <210> 14
[0085] <211> 15
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0088] <400> 14
[0089] ataataataa tatca 15
[0090] <210> 15
[0091] <211> 14
[0092] <212> DNA
[0093] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0094] <400> 15
[0095] ataataataa tact 14
[0096] <210> 16
[0097] <211> 17
[0098] <212> DNA
[0099] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0100] <400> 16
[0101] ataataataa taatcg 17
[0102] <210> 17
[0103] <211> 17
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0106] <400> 17
[0107] ctcatcatca tcatcta 17
[0108] <210> 18
[0109] <211> 17
[0110] <212> DNA
[0111] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0112] <400> 18
[0113] ctactactac tactaac 17
[0114] <210> 19
[0115] <211> 17
[0116] <212> DNA

- [0117] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0118] <400> 19
[0119] tattattatt attatta 17
[0120] <210> 20
[0121] <211> 14
[0122] <212> DNA
[0123] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0124] <400> 20
[0125] gtcgtcgtcg tcgc 14
[0126] <210> 21
[0127] <211> 14
[0128] <212> DNA
[0129] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0130] <400> 21
[0131] tgtgtgtgtg tgct 14
[0132] <210> 22
[0133] <211> 14
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0136] <400> 22
[0137] acacacacac acgt 14
[0138] <210> 23
[0139] <211> 14
[0140] <212> DNA
[0141] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0142] <400> 23
[0143] acacacacac acgt 14
[0144] <210> 24
[0145] <211> 14
[0146] <212> DNA
[0147] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0148] <400> 24
[0149] acacacacac acct 14
[0150] <210> 25
[0151] <211> 14
[0152] <212> DNA
[0153] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0154] <400> 25
[0155] acacacacac accg 14

- [0156] <210> 26
[0157] <211> 14
[0158] <212> DNA
[0159] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0160] <400> 26
[0161] gatgatgatg atgc 14
[0162] <210> 27
[0163] <211> 14
[0164] <212> DNA
[0165] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0166] <400> 27
[0167] cgccgccgcc gctg 14
[0168] <210> 28
[0169] <211> 17
[0170] <212> DNA
[0171] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0172] <400> 28
[0173] cgccgccgcc gccgctc 17
[0174] <210> 29
[0175] <211> 14
[0176] <212> DNA
[0177] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0178] <400> 29
[0179] ctctctctct cttg 14
[0180] <210> 30
[0181] <211> 14
[0182] <212> DNA
[0183] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0184] <400> 30
[0185] ctctctctct ctac 14
[0186] <210> 31
[0187] <211> 14
[0188] <212> DNA
[0189] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0190] <400> 31
[0191] ctctctctct ctgc 14
[0192] <210> 32
[0193] <211> 18
[0194] <212> DNA

- [0195] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0196] <400> 32
[0197] cacacacaca cacacatc 18
[0198] <210> 33
[0199] <211> 14
[0200] <212> DNA
[0201] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0202] <400> 33
[0203] cacacacaca caat 14
[0204] <210> 34
[0205] <211> 14
[0206] <212> DNA
[0207] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0208] <400> 34
[0209] cacacacaca caag 14
[0210] <210> 35
[0211] <211> 14
[0212] <212> DNA
[0213] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0214] <400> 35
[0215] cacacacaca cagc 14
[0216] <210> 36
[0217] <211> 17
[0218] <212> DNA
[0219] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0220] <400> 36
[0221] gtggtggtgg tggtagc 17
[0222] <210> 37
[0223] <211> 17
[0224] <212> DNA
[0225] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0226] <400> 37
[0227] gtggtggtgg tggtagt 17
[0228] <210> 38
[0229] <211> 17
[0230] <212> DNA
[0231] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0232] <400> 38
[0233] gtggtggtgg tggtagg 17

- [0234] <210> 39
[0235] <211> 17
[0236] <212> DNA
[0237] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0238] <400> 39
[0239] gtggtggtgg tgggtgct 17
[0240] <210> 40
[0241] <211> 17
[0242] <212> DNA
[0243] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0244] <400> 40
[0245] gtggtggtgg tgggtg 17
[0246] <210> 41
[0247] <211> 17
[0248] <212> DNA
[0249] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0250] <400> 41
[0251] gtggtggtgg tgggtgcg 17
[0252] <210> 42
[0253] <211> 15
[0254] <212> DNA
[0255] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0256] <400> 42
[0257] acacacacac accgc 15
[0258] <210> 43
[0259] <211> 15
[0260] <212> DNA
[0261] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0262] <400> 43
[0263] acacacacac accgg 15
[0264] <210> 44
[0265] <211> 15
[0266] <212> DNA
[0267] <213> 褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0268] <400> 44
[0269] acacacacac accga 15
[0270] <210> 45
[0271] <211> 15
[0272] <212> DNA

- [0273] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0274] <400> 45
[0275] acacacacac accgt 15
[0276] <210> 46
[0277] <211> 15
[0278] <212> DNA
[0279] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0280] <400> 46
[0281] atatatat ataca 15
[0282] <210> 47
[0283] <211> 15
[0284] <212> DNA
[0285] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0286] <400> 47
[0287] atatatat atact 15
[0288] <210> 48
[0289] <211> 15
[0290] <212> DNA
[0291] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0292] <400> 48
[0293] gtgtgtgtgt gtgcg 15
[0294] <210> 49
[0295] <211> 15
[0296] <212> DNA
[0297] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0298] <400> 49
[0299] gtgtgtgtgt gtgcc 15
[0300] <210> 50
[0301] <211> 15
[0302] <212> DNA
[0303] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0304] <400> 50
[0305] tgtgtgtgtg tgcta 15
[0306] <210> 51
[0307] <211> 15
[0308] <212> DNA
[0309] <213> 褐苞薯蓣(Dioscorea persimilis Prain et Burkill)
[0310] <400> 51
[0311] tgtgtgtgtg tgctg 15

-
- [0312] <210> 52
[0313] <211> 15
[0314] <212> DNA
[0315] <213> 褐苞薯蓣(*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)
[0316] <400> 52
[0317] ctctctctct ctaga 15

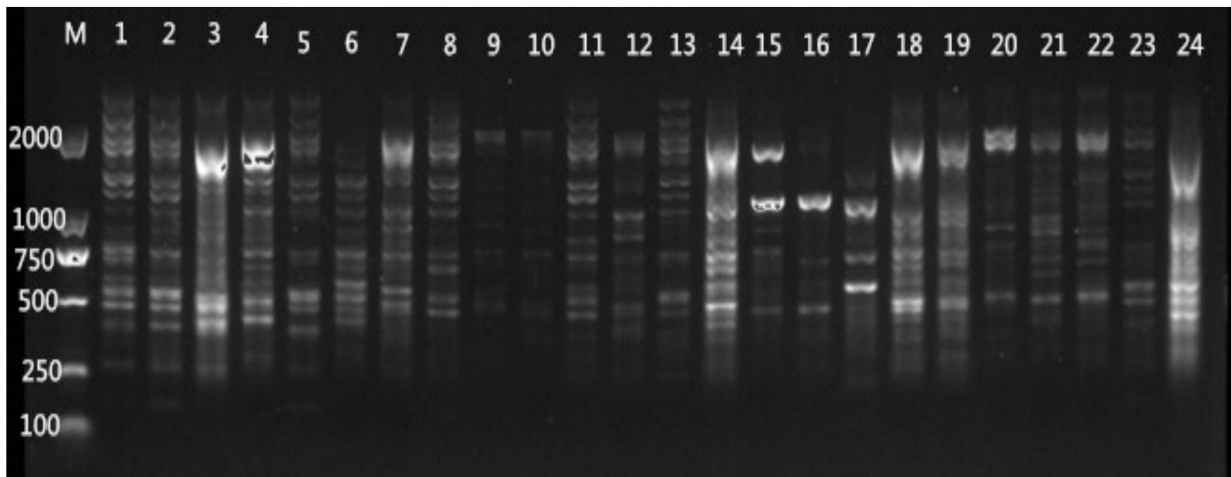


图1

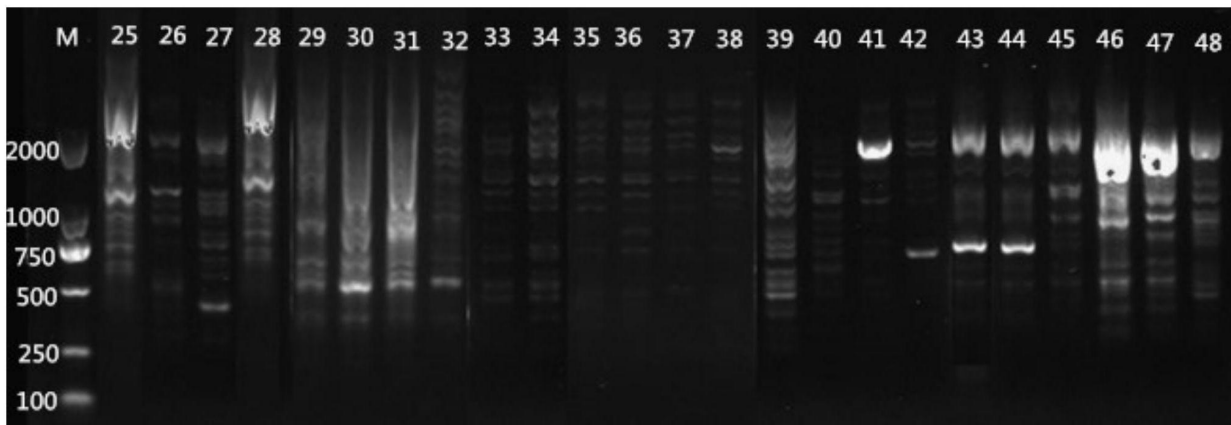


图2

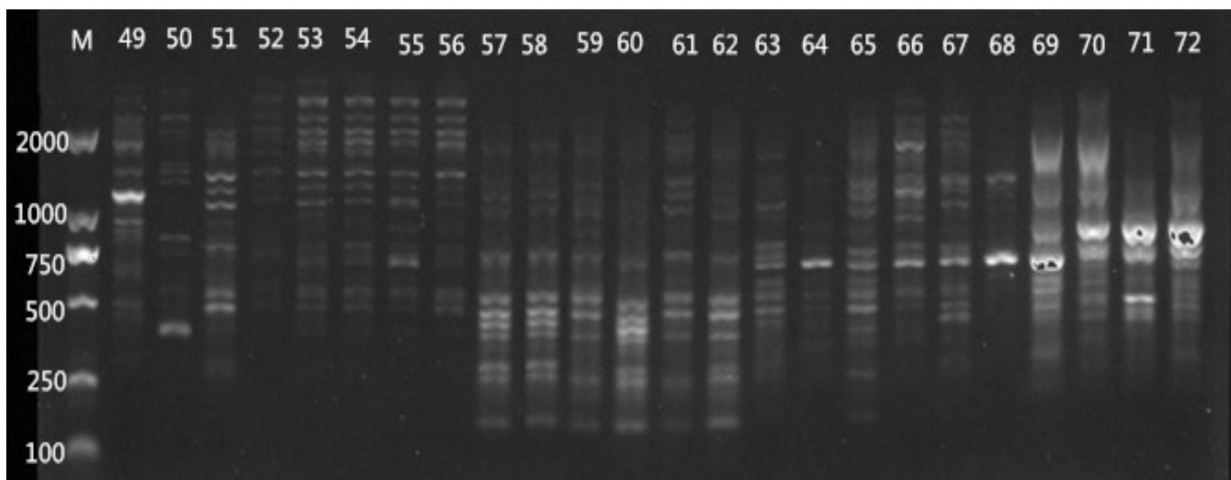


图3

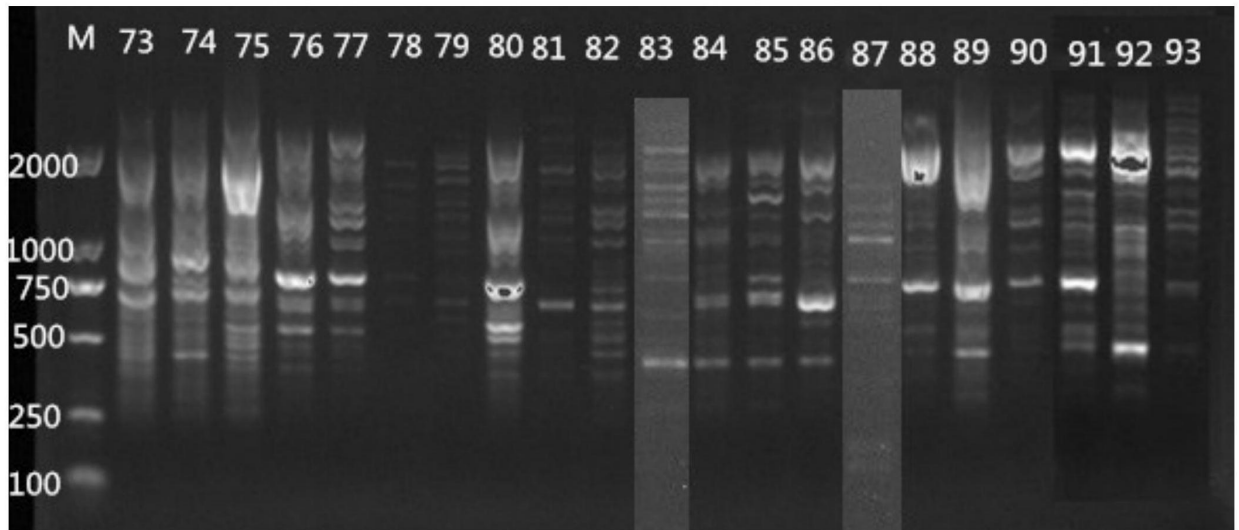


图4

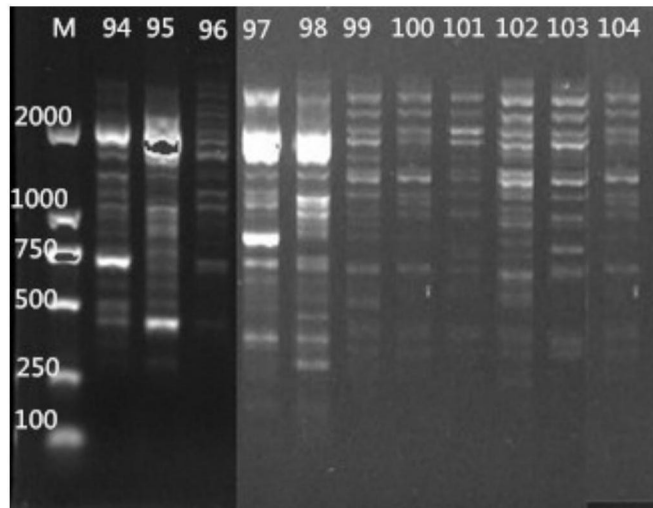


图5

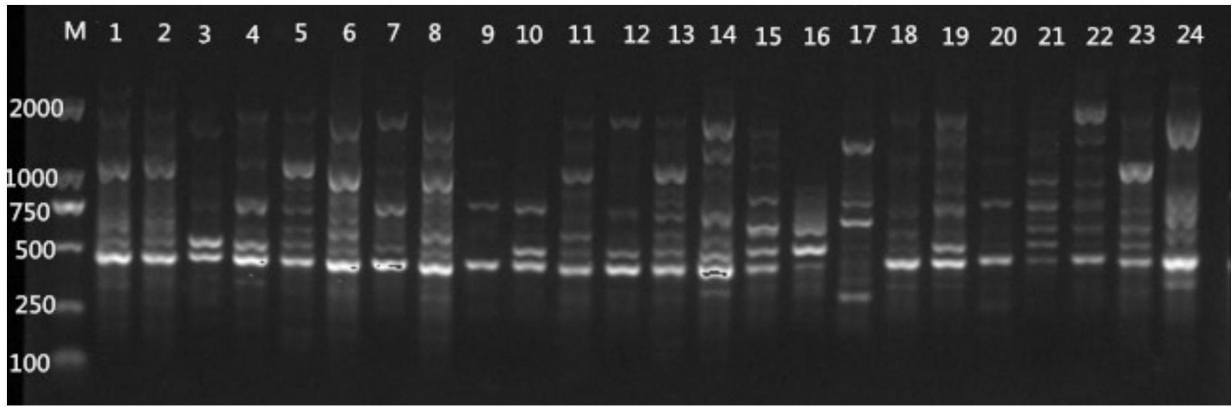


图6

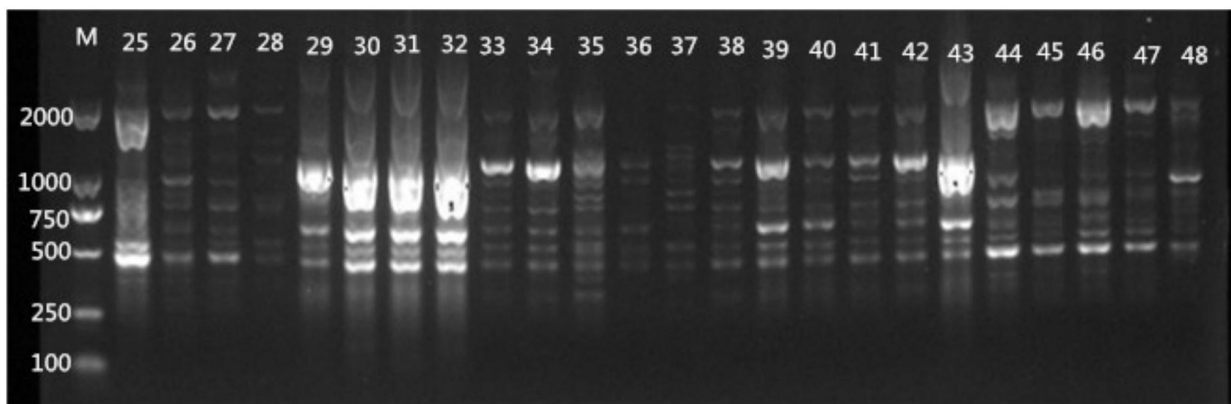


图7

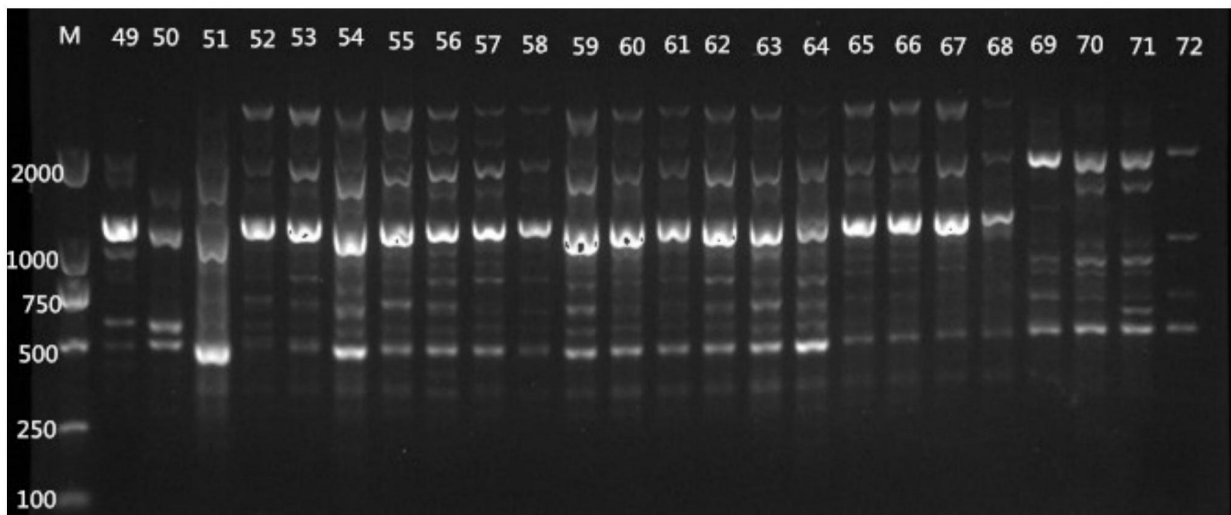


图8

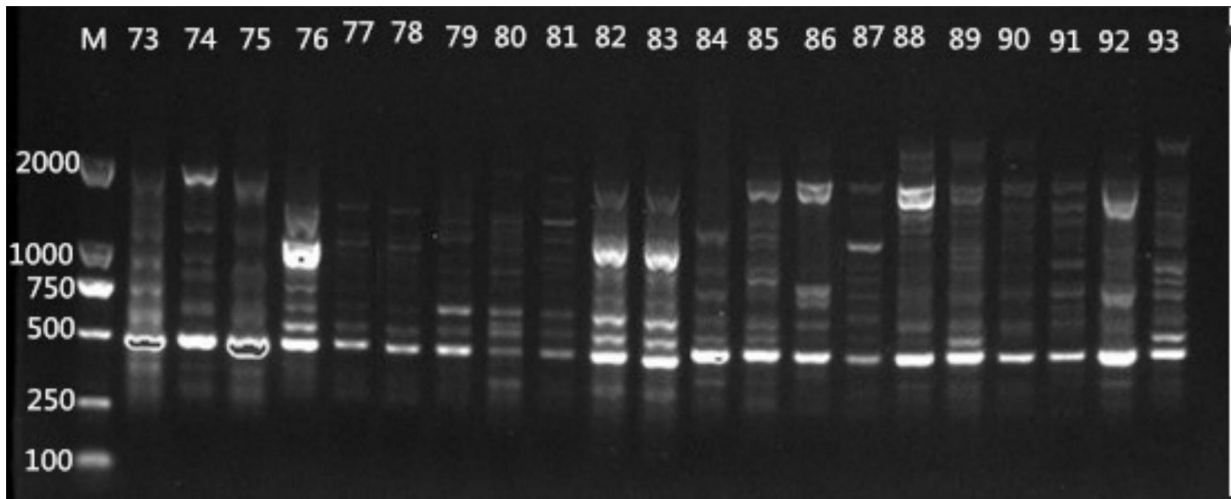


图9

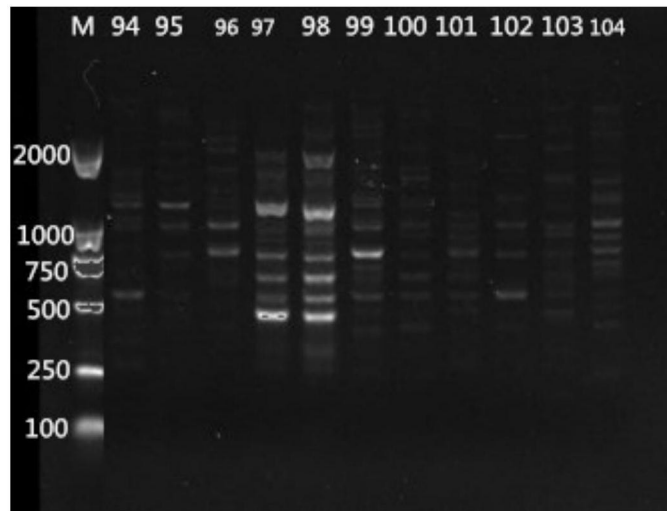


图10

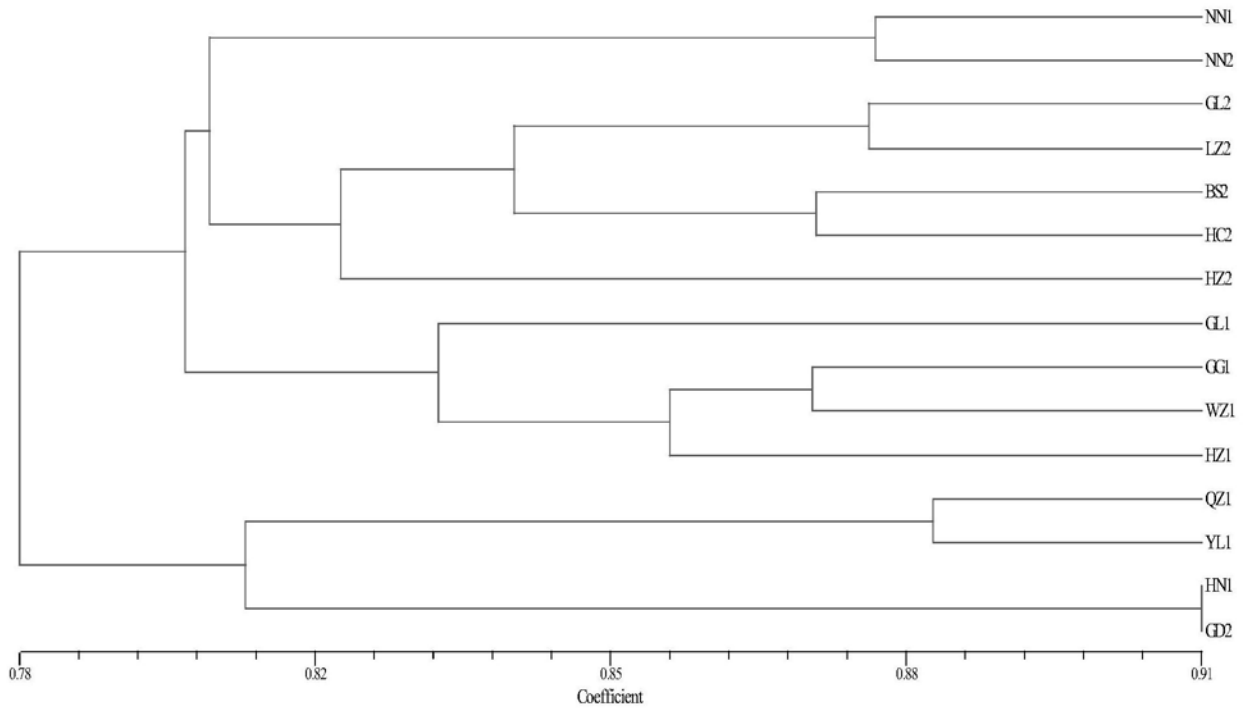


图11

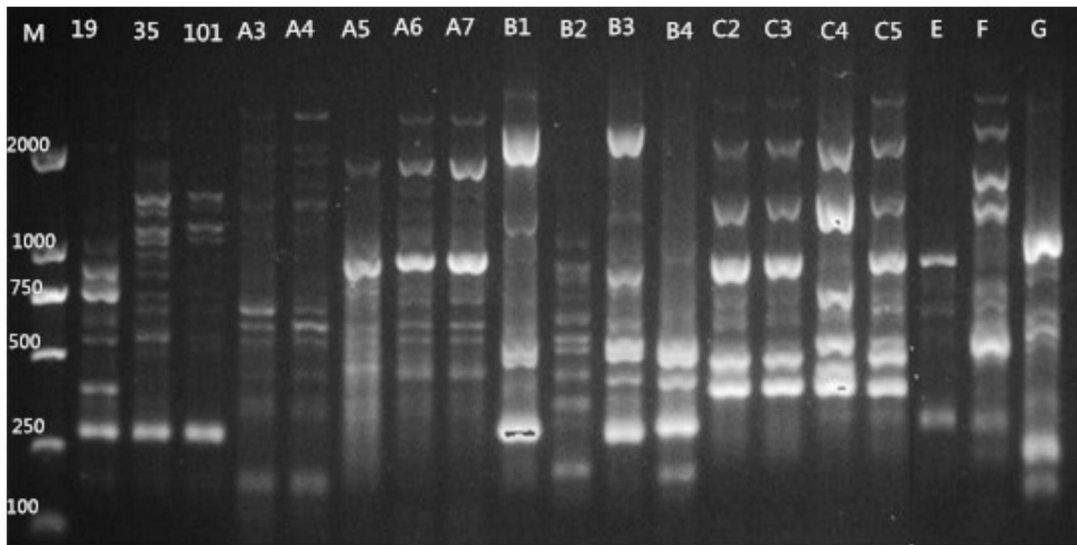


图12

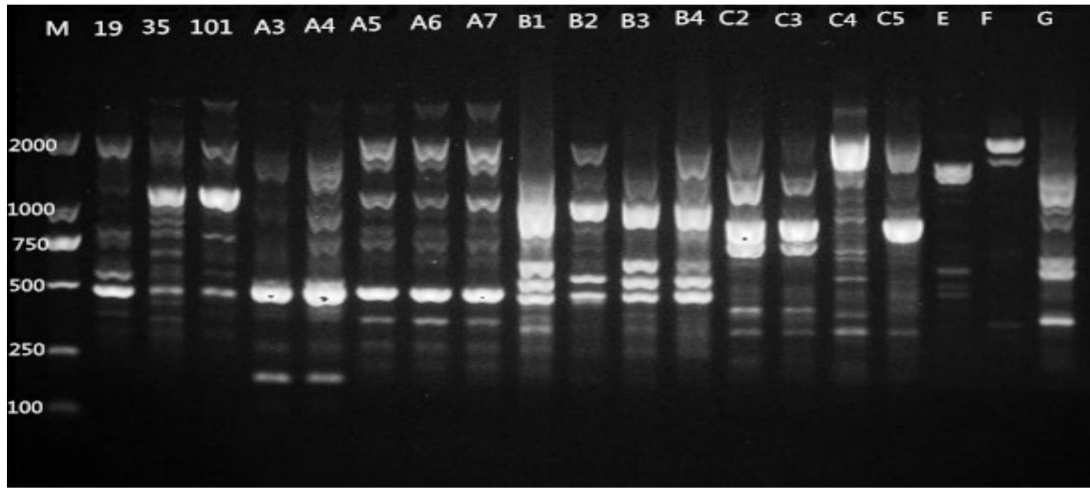


图13