



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112481406 A

(43) 申请公布日 2021. 03. 12

(21) 申请号 202011408035.0

(22) 申请日 2020.12.04

(71) 申请人 新疆农业科学院园艺作物研究所  
地址 830091 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市沙依巴克区南昌路403号  
申请人 中国科学院新疆生态与地理研究所

(72) 发明人 师玮 钟海霞 伍新宇 张付春  
陈浩宇 孟阿静 唐怀君

(74) 专利代理机构 成都方圆聿联专利代理事务所(普通合伙) 51241  
代理人 宋红宾

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

G12N 15/11 (2006.01)

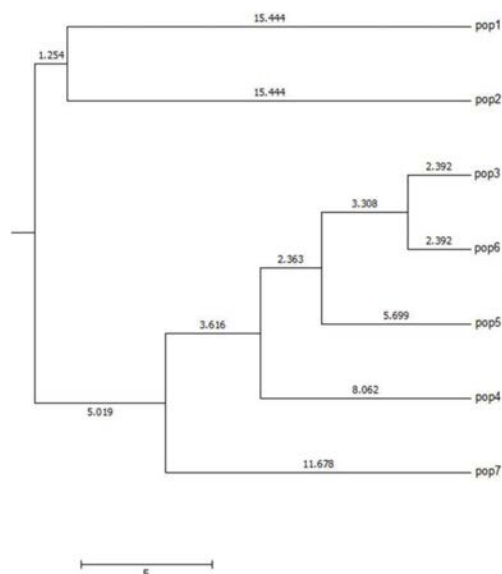
权利要求书1页 说明书5页  
序列表4页 附图2页

## (54) 发明名称

一种基于SSR标记的木纳格葡萄种质资源亲缘鉴定方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种基于SSR标记的木纳格葡萄种质资源亲缘鉴定方法。本发明还公开了用于木纳格葡萄种质资源亲缘鉴定的SSR标记的引物12对。本发明的SSR反应体系的产物检测图谱清晰,说明体系稳定可靠。本发明的12个SSR标记在57个木纳格品种资源中表现多态性,可重复,说明是稳定可靠的标记,可以用来进行木纳格品种资源的遗传多样性和亲缘关系分析。



1. 用于构建木纳格葡萄指纹图谱的SSR引物,由12对引物对组成,分别命名为MNG03、MNG10、MNG14、MNG15、MNG18、MNG23、MNG26、MNG29、MNG35、MNG1314、MNG6666、MNG9999; MNG03的上游引物序列如SEQ ID No.1所示,下游引物序列如SEQ ID No.2所示; MNG10的上游引物序列如SEQ ID No.3所示,下游引物序列如SEQ ID No.4所示; MNG14的上游引物序列如SEQ ID No.5所示,下游引物序列如SEQ ID No.6所示; MNG15的上游引物序列如SEQ ID No.7所示,下游引物序列如SEQ ID No.8所示; MNG18的上游引物序列如SEQ ID No.9所示,下游引物序列如SEQ ID No.10所示; MNG23的上游引物序列如SEQ ID No.11所示,下游引物序列如SEQ ID No.12所示; MNG26的上游引物序列如SEQ ID No.13所示,下游引物序列如SEQ ID No.14所示; MNG29的上游引物序列如SEQ ID No.15所示,下游引物序列如SEQ ID No.16所示; MNG35的上游引物序列如SEQ ID No.17所示,下游引物序列如SEQ ID No.18所示; MNG1314的上游引物序列如SEQ ID No.19所示,下游引物序列如SEQ ID No.20所示; MNG6666的上游引物序列如SEQ ID No.21所示,下游引物序列如SEQ ID No.22所示; MNG9999的上游引物序列如SEQ ID No.23所示,下游引物序列如SEQ ID No.24所示。
2. 权利要求1所述的SSR引物在构建木纳格葡萄指纹图谱中的应用。
3. 权利要求1所述的SSR引物在木纳格葡萄品种鉴定中的应用。
4. 一种木纳格葡萄指纹图谱的构建方法,其特征在于,包括(1)提取木纳格葡萄样品DNA,(2)以步骤(1)提取的DNA为模板,以权利要求1所述的SSR引物进行PCR扩增,(3)扩增产物进行毛细管电泳检测,(4)数据分析处理和图谱构建。
5. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述PCR扩增的反应体系为:25 $\mu$ L的总反应体系,其中含模板DNA 1 $\mu$ L,Taq Mix 12.5 $\mu$ L,上游引物1 $\mu$ L,下游引物1 $\mu$ L,dd H<sub>2</sub>O 9.5 $\mu$ L;反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s;52 $^{\circ}$ C脱火30s;72 $^{\circ}$ C延伸1min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min;反应产物4 $^{\circ}$ C保存。
6. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述毛细管电泳的方法为:将甲酰胺与分子量内标按100:1的体积比混匀后,取9 $\mu$ L加入上样板中,再加入1 $\mu$ L稀释10倍的PCR产物,然后使用测序仪进行毛细管电泳。

## 一种基于SSR标记的木纳格葡萄种质资源亲缘鉴定方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种基于SSR标记的木纳格葡萄种质资源亲缘鉴定方法。

### 背景技术

[0002] 木纳格葡萄(*Vitis vinifera* cv.Munage),又名冬葡萄、戈壁葡萄,按照果实颜色分为白木纳格和红木纳格两种,果实粒大、皮薄、口味甘美、果肉厚而脆而且具有晚熟、耐贮运等特点,鲜食品质佳,是新疆特色的葡萄地方品种。

[0003] 近年来,葡萄新品种选育数量呈逐年增多趋势,但是出现了少数骨干亲本被集中应用,而葡萄品种资源遗传基础日趋狭窄等问题。优质种质资源明晰的遗传背景是葡萄分子育种长远健康发展的重要基础。木纳格葡萄具有高品质性状,是葡萄分子育种的优良材料,然而木纳格葡萄的遗传背景研究极少。随着分子生物学的迅速发展,分子标记已经被广泛应用于种质资源的保护与利用。通过分子标记技术探究木纳格葡萄种质资源的遗传多样性和遗传结构对于葡萄种质资源管理、保护及育种具有重要的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题为:如何提供用于构建木纳格葡萄指纹图谱的SSR引物,如何构建木纳格葡萄指纹图谱,用于木纳格葡萄的鉴定。

[0005] 本发明的技术方案为:用于构建木纳格葡萄指纹图谱的SSR引物,由12对引物对组成,分别命名为MNG03、MNG10、MNG14、MNG15、MNG18、MNG23、MNG26、MNG29、MNG35、MNG1314、MNG6666、MNG9999;

[0006] MNG03的上游引物序列如SEQ ID No.1所示,下游引物序列如SEQ ID No.2所示;

[0007] MNG10的上游引物序列如SEQ ID No.3所示,下游引物序列如SEQ ID No.4所示;

[0008] MNG14的上游引物序列如SEQ ID No.5所示,下游引物序列如SEQ ID No.6所示;

[0009] MNG15的上游引物序列如SEQ ID No.7所示,下游引物序列如SEQ ID No.8所示;

[0010] MNG18的上游引物序列如SEQ ID No.9所示,下游引物序列如SEQ ID No.10所示;

[0011] MNG23的上游引物序列如SEQ ID No.11所示,下游引物序列如SEQ ID No.12所示;

[0012] MNG26的上游引物序列如SEQ ID No.13所示,下游引物序列如SEQ ID No.14所示;

[0013] MNG29的上游引物序列如SEQ ID No.15所示,下游引物序列如SEQ ID No.16所示;

[0014] MNG35的上游引物序列如SEQ ID No.17所示,下游引物序列如SEQ ID No.18所示;

[0015] MNG1314的上游引物序列如SEQ ID No.19所示,下游引物序列如SEQ ID No.20所示;

[0016] MNG6666的上游引物序列如SEQ ID No.21所示,下游引物序列如SEQ ID No.22所示;

[0017] MNG9999的上游引物序列如SEQ ID No.23所示,下游引物序列如SEQ ID No.24所示。

[0018] 进一步地,上述所述的SSR引物在构建木纳格葡萄指纹图谱中的应用。

[0019] 进一步地,上述所述的SSR引物在木纳格葡萄品种鉴定中的应用。

[0020] 一种木纳格葡萄指纹图谱的构建方法,包括(1)提取木纳格葡萄样品DNA,(2)以步骤(1)提取的DNA为模板,以权利要求1所述的SSR引物进行PCR扩增,(3)扩增产物进行毛细管电泳检测,(4)数据分析处理和图谱构建。

[0021] 进一步地,所述PCR扩增的反应体系为:25uL的总反应体系,其中含模板DNA 1μL, Taq Mix 12.5μL,上游引物1μL,下游引物1μL,dd H<sub>2</sub>O 9.5μL;反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s;52℃脱火30s;72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸10min;反应产物4℃保存。

[0022] 进一步地,所述毛细管电泳的方法为:将甲酰胺与分子量内标按100:1的体积比混匀后,取9μL加入上样板中,再加入1μL稀释10倍的PCR产物,然后使用测序仪进行毛细管电泳。

[0023] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0024] 1、本发明的12个SSR标记在57个木纳格品种资源中表现多态性,可重复,说明是稳定可靠的标记,可以用来进行木纳格品种资源的遗传多样性和亲缘关系分析。

[0025] 2、本发明构建的木纳格葡萄指纹图谱清晰、准确,可用于木纳格葡萄种质资源的鉴定。

#### 附图说明

[0026] 图1为木纳格葡萄不同种质的聚类图;

[0027] 图2为引物MNG3-13的扩增产物的毛细管电泳图谱,图中显示扩增得到两个等位点;

[0028] 图3引物MNG1314-7的扩增产物的毛细管电泳图谱,图中显示扩增得到一个等位点。

[0029] 由于本发明的电泳图有12\*57=684张,由于电泳图相差不大,因此选择了具有代表性的电泳图。

#### 具体实施方式

[0030] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为从商业渠道购买得到的。

[0031] 实施例1

[0032] 1、试验材料:

[0033] 本试验共搜集57份木纳格葡萄种质资源参见表1

[0034] 表1供试的木纳格葡萄种质材料

[0035]

编号	市县
1	哈密地区
2-5	吐鲁番地区
6-7	博尔塔拉蒙古自治州
8-13	伊犁哈萨克自治州

14-25	克孜勒苏柯尔克孜自治州
26-31	喀什地区
32-38	阿克苏地区
39-41	巴音郭楞蒙古自治州库尔勒市
42-48	和田地区
49-52	巴音郭楞蒙古自治州且末县
53-55	巴音郭楞蒙古自治州若羌县
56-57	河南省郑州市

[0036] 2、DNA提取

[0037] 2019年秋季取57株木纳格葡萄幼嫩叶片作为材料,采用上海生工磁珠法DNA提取试剂盒提取总DNA用于SSR荧光标记分析。

[0038] 3、SSR引物设计与筛选

[0039] 木纳格葡萄重测序结果设计SSR引物12对,依据引物多态性,用荧光标记物FAM对正向引物进行标记。12对引物参见表2;

[0040] 表2引物及其序列和退火温度

引物名称	引物序列	退火温度 (° C)
MNG03	F:CTAATATCGCGATTCACAAATCA	50
	R:AAAATTGATCAAACTCATGAAAATG	47.7
MNG10	F:TATTGCTGCCCTTACAAGAAGA	53.3
	R:TTCATGAAAATTTCTTATTTCCCTAA	47.4
MNG14	F:TAGCAAGCTCCAAGTGTTCAAAT	54.2
	R:TGATCTTTTGAAGCAAATTAATGG	48.8
MNG15	F:TCAAATACCACAATACATTCCTTC	50.3

[0042]		R:TCATTGTTTAATGTAGTCAATTTTCG	48.9
	MNG18	F:CAACCTGCTTCCAGTAAGTGTTTC	56
		R:AAGAAGCATGTCAAGTGTGGAT	54.2
	MNG23	F:GTAATGGTATTGCAGGCTCTTTG	53.9
		R:AGTGTGCCATAATCCAAGTGC	54.4
	MNG26	F:TCAAAAAGAAATAATATTAGATGCGG	48.4
		R:AATTCCAAAATCCCAACTTTCTC	50.6
	MNG29	F:GTGTGCCTACATTTTTCATTCGT	53.3
		R:AACAATATGGCACAACAATGTCA	52.4
	MNG35	F:CCAGTGCTACAAAACTCTTGCT	55.4
		R:GTTGATTTGGAAGCTGAAAATTG	50.3
	MNG1314	F:CCCCAAAATGTATCCCAATTTTA	50.3
	R:TTTGGAGACAATGAATGGATAGG	51.9	
MNG6666	F:GCCTTTATCTAGAAGCCCTCACT	56.2	
	R:CAACATAAGAATAGGTAGCATCG	55.1	
MNG9999	F:CTTTCTCGAAATTTCCGATTTG	49.4	
	R:AGAAAACCCTTTGCAGCAGTAATATGG	52.6	

[0043] 4、利用SSR引物对57个品种的木纳格葡萄种质基因组DNA进行PCR

[0044] 4.1反应体系的建立和优化

[0045] SSR荧光SSR指纹图谱

[0046] 毛细管电泳引物PCR反应体系(共25 $\mu$ l):

[0047] 94 $^{\circ}$ C 5min; 35个循环(94 $^{\circ}$ C, 30s; 52 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1min); 72 $^{\circ}$ C, 10min;

[0048] 说明:每个样品的PCR反应体积均为25 $\mu$ l,作为扩增模板的DNA样品体积1 $\mu$ l。

[0049] 5、毛细管电泳方法

[0050] 将甲酰胺与分子量内标按100:1的体积比混匀后,取9 $\mu$ L加入上样板中,再加入1 $\mu$ L稀释10倍的PCR产物。然后使用3730XL测序仪进行毛细管电泳(电泳图结果参见图2~3)。

[0051] 6、数据处理与数据分析

[0052] 6.1利用使用MeneMarke 1.91软件观测基因片段的峰值,将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析,得到片段大小。按照Convert1.31软件要求的格式录入到EXCEL中,然后用Convert1.31软件转化成POPGENE软件所要求格式。利用GenALEx 6.5计算位点水平上和居群水平上的等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、Shannon's信息指数(I)、引物多态信息含量(PIC)及多态位百分率(PPB)、居群间遗传分化系数( $F_{st}$ )、基因流( $N_m$ ),并进行居群分子变异方差分析(AMOVA),利用POPGEN 1.32计算居群间遗传距离并通过非加权类平均法(unweight pairgroup method using arithmetic averages,UPGMA)建立供试种质的遗传距离图,再用MEGA7处理。

[0053] 6.2SSR标记的多态性分析

[0054] 利用12对木纳格葡萄SSR标记引物对57个木纳格葡萄材料进行扩增,扩增产物经过毛细管电泳检测。共检测出527个等位变异,每对引物检测出2-10个等位变异,平均5.27

个,每个引物所扩增的均为多态性等位基因。

[0055] 表3其中12对SSR引物及遗传多样性分析

	引物	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>
	MNG03	11	1.817	0.689	0.717	0.435	0.552
	MNG10	15	2.049	0.695	0.147	0.367	0.66
	MNG14	19	3.291	1.200	0.921	0.663	0.75
	MNG15	5	0.650	0.088	0.018	0.044	0.103
	MNG18	7	1.068	0.102	0.029	0.051	0.071
[0056]	MNG23	17	2.884	1.103	0.767	0.634	0.694
	MNG26	21	3.136	1.202	0.950	0.661	0.77
	MNG29	26	3.751	1.350	0.564	0.627	0.842
	MNG35	14	2.280	0.854	0.933	0.553	0.509
	MNG1314	6	1.049	0.070	0.000	0.040	0.046
	MNG6666	15	1.980	0.736	0.848	0.476	0.465
	MNG9999	12	2.160	0.789	0.992	0.532	0.439

[0057] 6.3聚类分析

[0058] 经过聚类分析供试57份材料的遗传结构进行分析,发现 $\Delta k$ 在 $K=5$ 为最大值,因此根据遗传组分可将供试群体划分为5个类群。其中塔里木盆地西北部群体和塔里木盆地南缘群体遗传多样性高于其它居群,两者基因流最大、遗传距离最小,形成了木纳格葡萄的遗传中心。

## 序列表

<110> 新疆农业科学园园艺作物研究所 中国科学院新疆生态与地理研究所

<120> 一种基于SSR标记的木纳格葡萄种质资源亲缘鉴定方法

<160> 24

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

ctaatatcgc gattcacaaa tca 23

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

aaaattgatc aaaactcatg aaaatg 26

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

tattgctgcc cttacaagaa ga 22

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

ttcatgaaaa tttcttattt ccctaa 26

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

tagcaagctc caagtgttca aat 23

<210> 6

<211> 24

<212> DNA



<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 6  
tgatcttttg aagcaaatta atgg 24  
<210> 7  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 7  
tcaaaataacc acaatacatt ccttc 25  
<210> 8  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 8  
tcattgttta atgtagtcaa ttttcg 26  
<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 9  
caacctgctt ccagtaagtg ttc 23  
<210> 10  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 10  
aagaagcatg tcaagtgtg gat 23  
<210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 11  
gtaatggat tgcaggetct ttg 23  
<210> 12  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 12  
agtgttccca taatccaact gtc 23

<210> 13  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 13  
tcaaaaagaa ataatattag atgcgg 26  
<210> 14  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 14  
aattccaaaa tcccaacttt etc 23  
<210> 15  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 15  
gtgtgcctac atttttcatt cgt 23  
<210> 16  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 16  
aacaatatgg cacaacaatg tca 23  
<210> 17  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 17  
ccagtgtac aaaaactctt gct 23  
<210> 18  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 18  
gttgatttgg aagctgaaaa ttg 23  
<210> 19  
<211> 23  
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 19  
ccccaaaatg tatcccaatt tta 23  
<210> 20  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 20  
tttggagaca atgaatggat agg 23  
<210> 21  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 21  
gcctttatct agaagccctc act 23  
<210> 22  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 22  
caacataaga ataggtagca tcg 23  
<210> 23  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 23  
ctttctcgaa atttccgatt tg 22  
<210> 24  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 24  
agaaaaccct ttgcagcagt aatatgg 27

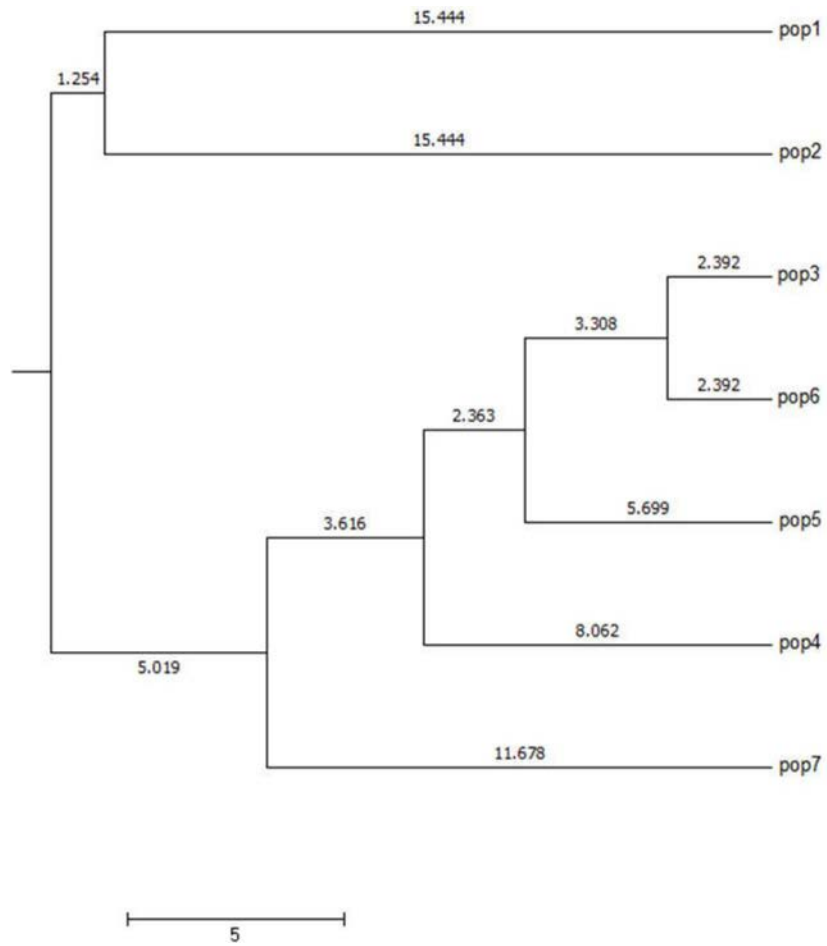


图1

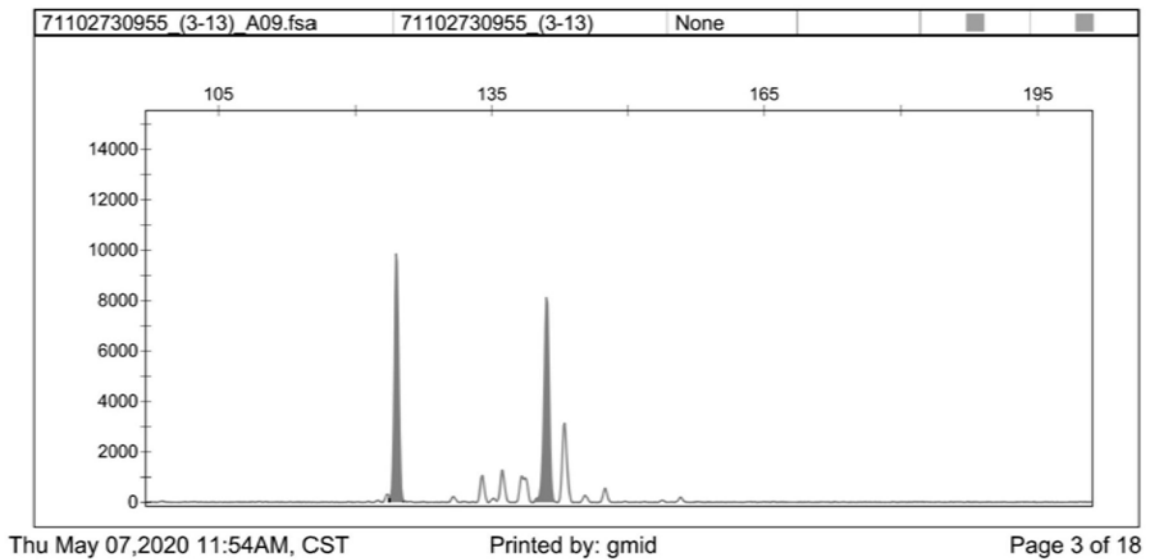


图2

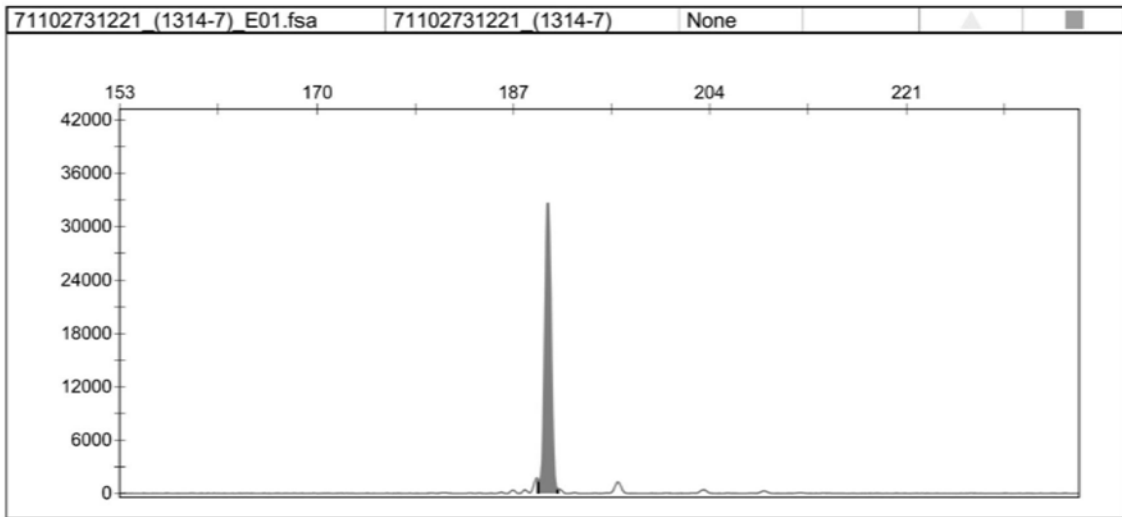


图3