



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104293776 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201310300890. 3

(22) 申请日 2013. 07. 17

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100029 北京市朝阳区惠新里 241 号  
612 室

(72) 发明人 宋云 赵竹 徐晗

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记及其应用,所述 SNP 位于如 SEQ ID NO. 1 所示的金花茶 GBSSI 基因的第 141 位碱基,此处碱基为 T,则鉴定为金花茶物种。本发明首次基于金花茶 SNP 位点建立 dCAPS 分子标记体系,通过生物信息学方法对金花茶 GBSSI 基因序列进行分析,筛选 SNP 位点,设计适当的错配引物进行 PCR 扩增,选择合适的限制性内切酶进行酶切,最终将 SNP 转化为 dCAPS 分子标记进行检测,建立了适用于口岸检验的金花茶物种的快速鉴定方法。

1. 用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记,其特征在于,其位于如 SEQ ID NO. 1 所示的金花茶 GBSSI 基因的第 141 位碱基,此处碱基为 T,则鉴定为金花茶物种。

2. 权利要求 1 所述 SNP 分子标记在金花茶分子标记辅助育种中的应用。

3. 用于 PCR 检测金花茶的特异性引物对,其特征在于,包括上游引物 F5' -CTGTGGACGCAAACATCCACTTGAT-3' 和下游引物 R5' -CCATGTATTTCTTGCCAGTGCCCT-3'。

4. 一种鉴定金花茶的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 提取待测植物的基因组 DNA;

2) 以待测植物的基因组 DNA 为模板,利用权利要求 3 所述的特异性引物对 PCR 扩增金花茶 GBSSI 基因;

3) 检测 PCR 扩增产物;

其中,金花茶 GBSSI 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于,步骤 3) 中采用酶切法检测 PCR 扩增产物,酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果呈现 2 条带,则待测植物为金花茶物种;

其中,酶切使用的限制性内切酶为 BstXI。

6. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于,步骤 2) 中 25  $\mu$  L PCR 反应体系中包括:添加  $Mg^{2+}$  的 10 $\times$ EX Taq 缓冲液 2.5  $\mu$  L, 2.5mM dNTPs 2  $\mu$  L, 10  $\mu$  M 上、下游引物各 1  $\mu$  L, 5U/ $\mu$  L EX Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$  L, 50  $\mu$  g/ $\mu$  L 基因组 DNA 1  $\mu$  L, 余量为 ddH<sub>2</sub>O。

7. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于,步骤 2) 中 PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

8. 含有权利要求 3 所述引物对的用于检测金花茶的试剂盒。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括 dNTPs、Taq DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、PCR 反应缓冲液、标准阳性模板中的一种或多种。

10. 权利要求 3 所述引物对或权利要求 8 或 9 所述试剂盒在检测金花茶中的应用。

## 用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体地说,涉及用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记及其应用。

### 背景技术

[0002] 金花茶 (*Camellia nitidissima* Chi) 属于山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*) 金花茶组 (*Sect. chrysantha*) 的常绿灌木,因其花冠呈黄色而具有重要的园艺价值,被誉为“茶花皇后”。近年来,由于栖息地的丧失,濒危物种资源的过度采集和非法出口贸易,其自然种群急剧下降。金花茶被列为国家一级重点保护植物,IUCN 红色名录中最濒危的植物种类之一。因此,建立准确的金花茶植物鉴定方法是其生物多样性保护和研究的关键。

[0003] 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指在基因组水平上由于单个核苷酸的转换、颠换、插入或缺失等所引起的碱基序列多态性,与其它类型分子标记相比具有数量丰富、分布广泛、遗传稳定性高、易实现自动化分析等优势 (Mochida et al., 2003)。目前 SNP 的检测分析方法,如:DNA 直接测序法、基因芯片技术、阵列杂交分析、高效变性液相色谱检测等 (Jehan and Lakhanpaul, 2006),但是由于技术繁琐、成本高,限制了其应用。酶切扩增多态性 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) 标记是根据 SNPs 位点的 DNA 序列设计特异的 PCR 引物,与限制性内切酶相结合产生的一种分子标记。但 SNP 恰好位于限制性酶切位点这种情况比较少,为了更有效地检测 SNPs,衍生酶切扩增多态性 (derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS) 技术在 CAPS 标记基础上通过在引物中引入错配碱基,结合 SNP 位点引入新的限制性内切酶位点,从而达到酶切检测 SNPs 的目的 (Michaels and Amasino, 1998)。dCAPS 技术自发明以来大量应用于分子遗传学及种质资源品种品系鉴定等方面研究,该技术已在水稻 (Komori and Nitta, 2005)、拟南芥 (Nemri et al., 2007; Hou et al., 2010)、小麦 (Yanagisawa et al., 2003)、大麦 (Shahinnia and Sayed-Tabatabaei, 2009)、葡萄 (Boss and Thomas, 2002)、香蕉 (P. UMALI and NAKAMURA, 2003)、山茶 (张成才等, 2012) 等作物中得到了广泛的应用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种基于金花茶 SNP 位点建立 dCAPS 分子标记体系,从而快速鉴定金花茶物种的方法。

[0005] 为了实现本发明目的,本发明首先提供一种用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记,其位于如 SEQ ID NO. 1 所示的金花茶 GBSSI 基因的第 141 位碱基,此处碱基为 T,则鉴定为金花茶物种。

[0006] 本发明还提供所述 SNP 分子标记在金花茶分子标记辅助育种中的应用。

[0007] 本发明还提供用于 PCR 检测金花茶的特异性引物对,包括上游引物 F5' -CTGTGGACGCAAACATCCACTTGAT-3' 和下游引物 R5' -CCATGTATTTCTTGCCAGTGCCCT-3'。

[0008] 本发明还提供一种鉴定金花茶的方法,包括以下步骤:1)提取待测植物的基因组DNA;2)以待测植物的基因组DNA为模板,利用上述引物F和R,PCR扩增金花茶GBSSI基因;3)检测PCR扩增产物。

[0009] 具体地,步骤3)中采用酶切法检测PCR扩增产物,酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果呈现2条带,则待测植物为金花茶物种。其中,酶切使用的限制性内切酶为BstXI。

[0010] 前述方法中,25 $\mu$ L PCR反应体系中包括:添加Mg<sup>2+</sup>的10 $\times$ EX Taq缓冲液2.5 $\mu$ L,2.5mM dNTPs2 $\mu$ L,10 $\mu$ M上、下游引物各1 $\mu$ L,5U/ $\mu$ L EX Taq DNA聚合酶0.2 $\mu$ L,50 $\mu$ g/ $\mu$ L基因组DNA1 $\mu$ L,余量为ddH<sub>2</sub>O。

[0011] 前述方法中,PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸50s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0012] 本发明还提供含有所述引物F和R的用于检测金花茶的试剂盒。优选所述试剂盒还包括dNTPs、Taq DNA聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、PCR反应缓冲液、标准阳性模板等中的一种或多种。

[0013] 本发明进一步提供所述引物F和R,或所述试剂盒在检测金花茶中的应用。

[0014] 本发明针对金花茶物种设计了特异性引物,能迅速将金花茶与山茶属其它近源种区分,其中dCAPS引物的设计是将SNP转化为dCAPS分子标记的关键,通过软件设计了一系列dCAPS上游引物,引物中错配碱基的数量、距离引物3'端的位置对分子标记的成功开发具有重要影响。本发明选择了错配碱基数目为1个,距离3'端第6位的引物,通过PCR扩增出目的条带,且酶切后结果与预期一致。表明错配碱基在距离引物3'端较远的位置能够通过PCR反应顺利引入扩增产物中,从而形成专一的限制性内切酶识别位点。鉴于此方法建立了基于SNPs的dCAPS分子标记技术鉴定金花茶物种的方法体系,从而达到可以快速、准确检测物种特异SNPs的目的,dCAPS分子标记的成功开发,对于口岸物种检验工作及品种资源鉴别、种质资源保护具有重大意义。

## 附图说明

[0015] 图1为本发明实施例1中金花茶与其它近源种的GBSSI基因全序列比对结果;其中,“.”表示相同的碱基,“-”表示碱基缺失,方框标注为SNP位点,下划线序列为dCAPS引物设计所用的目标序列。

[0016] 图2为本发明实施例1中金花茶dCAPS引物设计原理示意图;其中,下划线大写字母表示SNP;下划线小写字母表示引物中设置的错配碱基。

[0017] 图3为本发明实施例1中dCAPS分子标记鉴定金花茶的PCR分析结果;其中,M:DL500DNA marker;A:酶切前PCR产物,DNA片段为254bp;B:经BstXI酶切后的PCR产物;1-17:分别对应于表1中样本号;1-7以及9-17:DNA片段大小为254bp;8:DNA片段大小为229bp。

## 具体实施方式

[0018] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0019] 以下实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(New York:Gold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的操作技术规程,或按照制造厂商所建议的实验条件。

[0020] 实施例 1 金花茶 SNP 分子标记的获得

[0021] 颗粒结合淀粉合成酶(Granule-bound starch synthase I, GBSSI)是胚乳等植物储藏器官中,合成直链淀粉的关键酶,其功能保守,在大部分植物科内是单拷贝。研究表明在山茶属内 GBSSI 基因是单拷贝的,并且具有较高的序列变异率(不同物种间的变异在 5% 左右),这对于研究山茶属此类具有许多近缘物种的类群的系统发育关系具有重要价值(Yang et al., 2006)。

[0022] 1、根据杨俊波等(Yang et al., 2006)公开的 GBSSI 基因的引物及扩增条件,以表 1 中 17 个山茶属物种基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并在紫外凝胶成像系统观察合格后进行测序。

[0023] 表 1 17 个山茶属物种(基本涵盖了所有山茶属植物)

[0024]

样本号	物种名	采集地	GenBank 登录号
1	毛瓣金花茶 <i>Camellia pubipetala</i>	广西南宁	KC844915
2	显脉金花茶 <i>Camellia euphlebia</i>	广西南宁	KC878512
3	凹脉金花茶 <i>Camellia impressinervis</i>	广西南宁	KC878513
4	东兴金花茶 <i>Camellia tunghinensi</i>	广西南宁	KC878514

[0025]

5	平果金花茶 <i>Camellia pingguoensis</i>	广西南宁	KC878515
6	龙州金花茶 <i>Camellia longzhouensis</i>	广西南宁	KC878516
7	小瓣金花茶 <i>Camellia parvipetala</i>	广西南宁	KC878517
8	金花茶 <i>Camellia nitidissima</i>	广西桂林	KC878518
9	华东山茶-牡丹王 <i>Camellia japonica var. "kings peony"</i>	广西南宁	KC878519
10	华东山茶-锦楼春 <i>Camellia japonica var. "jinlouchun"</i>	广西南宁	KC878520
11	云南山茶-狮子头 <i>Camellia reticulata var. "shizitou"</i>	广西南宁	KC878521
12	云南山茶-小桂叶 <i>Camellia reticulata var. "xiaoguiye"</i>	广西南宁	KC878522
13	云南山茶-牡丹茶 <i>Camellia reticulata var. "mudancha"</i>	广西南宁	KC878523
14	云南山茶-大玛瑙 <i>Camellia reticulata var. "damanao"</i>	广西南宁	KC878524
15	云南山茶-紫袍 <i>Camellia reticulata var. "zipao"</i>	广西南宁	KC878525
16	油茶 <i>Camellia oleifera Abel.</i>	广西南宁	KC878526
17	贵州连蕊茶 <i>Camellia costei Levl.</i>	广西南宁	KC878527

[0026] 山茶属物种基因组 DNA 的提取采用 TIANGEN 公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒, 参照试剂盒说明进行操作。将提取的 DNA 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

[0027] 2、序列比对及物种特异的 dCAPS 标记的开发

[0028] 将获得的 17 个山茶属物种的 GBSSI 基因序列, 通过 DNAMAN 软件进行序列比对寻找合适的 SNP 位点。序列比对结果如图 1 所示, 经分析发现金花茶 GBSSI 基因的第 141 个碱基为 T, 而其它山茶属物种为 C。其中, 金花茶 GBSSI 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0029] 根据该 SNP 位点设计合成 dCAPS 引物(图 2), 错配碱基为  $C \rightarrow A$ 。dCAPS 引物和下游引物 PCR 扩增出单一的目的条带为 254bp, 结果与预期一致(图 3A)。用相应的限制性内切酶 BstXI 对扩增产物进行酶切, 酶切产物中只有金花茶(图 3B) 出现 254bp 和 229bp 两个片段, 而其它近源种只有一个 254bp 片段, 从而将金花茶与其它近源种分开。

[0030] 具体地, 利用 dCAPS Finder2.0 program(Neff et al., 2002) 和 Primer Premier5.0 分别设计 dCAPS 引物(5' -CTGTGGACGCAAACATCCACTTGAT-3') 及相应的下游引物(5' -CCATGTATTTCTTGCCAGTGCCCT-3'), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。以 17 个山茶属物种基因组 DNA 为模板, 25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系中包括: 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ EX Taq 缓冲液 ( $\text{Mg}^{2+}$ Plus), 2  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5mmol/L), 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 0.2  $\mu\text{L}$  EX Taq DNA

聚合酶 (5U/ $\mu$ L), 1 $\mu$ L 基因组 DNA (50 $\mu$ g/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 $\mu$ L。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增结束后,采用限制性内切酶 BstXI 酶切,酶切反应体系参照 Takara 内切酶说明书进行,酶切产物经过 2.5%MetaPhor 琼脂糖凝胶电泳检测,通过紫外凝胶成像系统记录结果。

[0031] 实施例 2 金花茶 SNP 分子标记的应用

[0032] 本实施例是基于金花茶 SNP 位点建立 dCAPS 分子标记体系,从而快速鉴定世界珍稀濒危物种——金花茶。

[0033] 包括以下步骤:1) 提取待测植物的基因组 DNA;2) 以待测植物的基因组 DNA 为模板,利用 dCAPS 引物(5'-CTGTGGACGCAAACATCCACTTGAT-3')及相应的下游引物(5'-CCATGTATTTCTTGCCAGTGCCT-3'),PCR 扩增金花茶 GBSSI 基因;3) 采用限制性内切酶 BstXI 酶切 PCR 扩增产物(具体方法同实施例 1),酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结果呈现 2 条带,则待测植物鉴定为金花茶物种。

[0034] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

[0035] 参考文献

[0036] Boss P. K., and Thomas M. R., 2002, Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation, *Nature*, 416 (6883):847-850

[0037] Hou X., Li L., Peng Z., Wei B., Tang S., Ding M., Liu J., Zhang F., Zhao Y., Gu H., and Qu L. J., 2010, A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 63 (5):880-888

[0038] Jehan T, Lakhanpaul S, 2006, Single nucleotide polymorphism (SNP) - Methods and applications in plant genetics: A review. *Indian Journal of Biotechnology*, 5 (4):435

[0039] Komori T, Nitta N, 2005, Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. *Breeding Science*, 55 (1):93-98

[0040] Michaels SD, Amasino RM, 1998 A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J.*, 14 (3):381-385

[0041] Mochida K, Yamazaki Y, Ogihara Y, 2003, Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Mol Genet Genomics*, 270 (5):371-377.

[0042] Neff MM, Turk E, Kalishman M, 2002, Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet*, 18 (12):613-615

[0043] Nemri A, Neff MM, Burrell M, Jones JD, Studholme DJ, 2007, Marker development for the genetic study of natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 23 (22):3108-3109

[0044] UMALI P. R., and NAKAMURA I., 2003, Identification of dCAPS markers that discriminate A and B cytoplasm in banana (*Musa* spp.), *Plant*

Biotechnology, 20(2):159-164

[0045] Shahinnia F, Sayed-Tabatabaei BE, 2009, Conversion of barley SNPs into PCR-based markers using dCAPS method. *Genet Mol Biol*, 32(3):564-567. doi:10.1590/S1415-47572009005000047

[0046] Yanagisawa T, Kiribuchi-Otobe C, Hirano H, Suzuki Y, Fujita M, 2003, Detection of single nucleotide polymorphism(SNP)controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence(dCAPS)marker. *Theor Appl Genet*, 107(1):84-88

[0047] Yang J. B., Li H. T., Yang S. X., Li D. Z., Yang Y. Y., 2006, The application of four DNA sequences to studying molecular phylogeny of *Camellia*(Theaceae). *Yunnan Zhiwu Yanjiu(Acta Botanica Yunnanica)*, 28(2):108-114(杨俊波, 李洪涛, 杨世雄, 李德铎, 杨莹燕, 2006, 四个DNA片段在山茶属分子系统学研究中的应用, 云南植物研究, 28(2):108-114)

[0048] Zhang C. C., Wang L. Y., Wei K., Cheng H., Bao Y. X., Liu B. Y., Wang Y. G., 2012, Study of SNP and Relative dCAPS Markers in Tea Plant(*Camellia sinensis*), *Chaye Kexue(Journal of Tea Science)*, 32(6):517-522(张成才, 王丽鸳, 韦康, 成浩, 包云秀, 刘本英, 汪云刚, 2012, 基于茶树SNP的dCAPS标记体系研究, 茶叶科学, 32(6):517-522)。



[0001]

## 序列表

<110>	中国检验检疫科学研究院	
<120>	用于鉴定金花茶的 SNP 分子标记及其应用	
<130>	KHP13115839.1	
<160>	3	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	693	
<212>	DNA	
<213>	金花茶	
<400>	1	
	tctctcaata tttttgtggc tttaaaaagc cttagegtat tataattgtg attttttttag	60
	gtcatggctg caaagcgtct ttngaaggaa gcacttcaag cagaagttgg gttgcctgtg	120
	gacgcaaca tccccttgat tggattcatt ggtagactag aagagcagaa aggcctggat	180
	atcctagcag ctgccattcc taaattcatt agagagaatg ttcagattgt agttcttcta	240
	agtttagtgg ttttttttct ttaggcaact ttttttttta aaagagaact tttatttctc	300
	gcttttttct ggtttgaatt gtgaaatgga ttigtctctt ctattaggge actggcaaga	360
	aatacatgga gaagcagcta gaacagctcg agatattata tctgacaag gccagaggag	420
	tggcaaaatt caacgtacce ttggcccaea agattattge tgggtctgat tttatgttge	480
	tccctagtag atttgaacct tgtggtctca ttcagttgca tgccatgca tatggatcgg	540
	taaacctgt ttttccccct gtttggctgc tgcctttaaa acttaatgaa teatgcacaa	600
	ttacttgcct aaattgatca ttcttccatg atttgatttt attttttctg ctctctcttt	660
	tatggtacta accgtaatta caattggacc agg	693
<210>	2	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	ctgtggacgc aaacatccac ttgat	25
<210>	3	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	ccatgtattt ctgcccagtg ccc	24

C. nitidissima. seq	.....TCTCTCAATATTTTGTGGCTTAAAAAGCCTTAGCGTATTATAATTTGGATTTTTATAGTCATGGCT	69
C. arvipetala. seq	.....TTA.....C.....G.....G	72
C. costei. seq	.....TTA.....C.....G.....G	82
C. euphlebica. seq	.....TTA.....C.....G.....G	86
C. impressinervis. seq	.....TTA.....C.....G.....G	102
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....TTA.....C.....G.....G	61
C. japonica var. kings peony. seq	.....TTA.....C.....G.....G	72
C. longzhouensis. seq	.....TTA.....C.....G.....G	62
C. oleifera. seq	.....TTA.....C.....G.....G	70
C. pingguoensis. seq	.....TTA.....C.....G.....G	71
C. pubipetala. seq	.....TTA.....C.....G.....G	72
C. reticulata var. damansu. seq	.....TTA.....C.....G.....G	72
C. reticulata var. mudancha. seq	.....TTA.....C.....G.....G	72
C. reticulata var. shizitou. seq	.....TTA.....C.....G.....G	72
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....TTA.....C.....G.....G	71
C. reticulata var. zipao. seq	.....TTA.....C.....G.....G	71
C. tunghinensi. seq	.....TTTCCATTAA.....	79
C. nitidissima. seq	GC AAAAGCGCTTTTGAAGGAGCCTTCAAGCAGAAGTTGGGTTGCCTGTGGCGCAACATCCCTTGTATTTGGATTTCATTGGTAGACTAGAAGAGCAGAAA	171
C. arvipetala. seq	.....T.....	163
C. costei. seq	.....T.....	174
C. euphlebica. seq	.....T.....	164
C. impressinervis. seq	.....T.....	170
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....T.....	204
C. japonica var. kings peony. seq	.....T.....	163
C. longzhouensis. seq	.....T.....	174
C. oleifera. seq	.....T.....	164
C. pingguoensis. seq	.....T.....	172
C. pubipetala. seq	.....T.....	173
C. reticulata var. damansu. seq	.....T.....	174
C. reticulata var. mudancha. seq	.....T.....	174
C. reticulata var. shizitou. seq	.....T.....	174
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....T.....	174
C. reticulata var. zipao. seq	.....T.....	173
C. tunghinensi. seq	.....T.....	181
C. nitidissima. seq	GGCTCGGATATCTAGCAGCTGCCATTCCTAAATTCATTAGAGAGAATGTCAGATTGTAGTCTCTGTAAGTTTAGTGG-TTITTTTTCCTTAGGCAACTTT	272
C. arvipetala. seq	.....T.....	265
C. costei. seq	.....T.....	273
C. euphlebica. seq	.....T.....	264
C. impressinervis. seq	.....T.....	270
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....T.....	304
C. japonica var. kings peony. seq	.....T.....	274
C. longzhouensis. seq	.....T.....	276
C. oleifera. seq	.....T.....	264
C. pingguoensis. seq	.....T.....	274
C. pubipetala. seq	.....T.....	275
C. reticulata var. damansu. seq	.....T.....	275
C. reticulata var. mudancha. seq	.....T.....	275
C. reticulata var. shizitou. seq	.....T.....	275
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....T.....	275
C. reticulata var. zipao. seq	.....T.....	274
C. tunghinensi. seq	.....T.....	281
C. nitidissima. seq	TTTTTTT-AAAAGAGAACTTTTATTGTCTGCTTTTTCCTGGTTGAAATGTAATGGAATGGATTGCTCTTCTATTAGGGCACTGGCAAGAAATACATGGAGA	372
C. arvipetala. seq	.....T.....	365
C. costei. seq	.....T.....	372
C. euphlebica. seq	.....T.....	365
C. impressinervis. seq	.....T.....	370
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....T.....	404
C. japonica var. kings peony. seq	.....T.....	363
C. longzhouensis. seq	.....T.....	377
C. oleifera. seq	.....T.....	364
C. pingguoensis. seq	.....T.....	374
C. pubipetala. seq	.....T.....	375
C. reticulata var. damansu. seq	.....T.....	375
C. reticulata var. mudancha. seq	.....T.....	375
C. reticulata var. shizitou. seq	.....T.....	375
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....T.....	375
C. reticulata var. zipao. seq	.....T.....	374
C. tunghinensi. seq	.....T.....	383
C. nitidissima. seq	AGCAGCTAGAACAGCTCGAGATATTATATCTGACAGGCCAGGAGGCGCAAAATTCACCTAGCCCTTGCCCAAGAAATTATGCTGGGCTGATTTTA	474
C. arvipetala. seq	.....T.....	467
C. costei. seq	.....T.....	474
C. euphlebica. seq	.....T.....	468
C. impressinervis. seq	.....T.....	472
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....T.....	506
C. japonica var. kings peony. seq	.....T.....	465
C. longzhouensis. seq	.....T.....	479
C. oleifera. seq	.....T.....	466
C. pingguoensis. seq	.....T.....	476
C. pubipetala. seq	.....T.....	477
C. reticulata var. damansu. seq	.....T.....	477
C. reticulata var. mudancha. seq	.....T.....	477
C. reticulata var. shizitou. seq	.....T.....	477
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....T.....	477
C. reticulata var. zipao. seq	.....T.....	476
C. tunghinensi. seq	.....T.....	485
C. nitidissima. seq	IGTTGCTCCCTAGTAGATTGAACTTGTGGTCTCATTGATGTCATGCCATGCGATGGATGGTAAACCGCTTTTTCCTCCCTGTTGGCTGCTGCTTT	576
C. arvipetala. seq	.....T.....	569
C. costei. seq	.....T.....	576
C. euphlebica. seq	.....T.....	570
C. impressinervis. seq	.....T.....	574
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....T.....	606
C. japonica var. kings peony. seq	.....T.....	565
C. longzhouensis. seq	.....T.....	581
C. oleifera. seq	.....T.....	568
C. pingguoensis. seq	.....T.....	578
C. pubipetala. seq	.....T.....	579
C. reticulata var. damansu. seq	.....T.....	577
C. reticulata var. mudancha. seq	.....T.....	577
C. reticulata var. shizitou. seq	.....T.....	577
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....T.....	577
C. reticulata var. zipao. seq	.....T.....	576
C. tunghinensi. seq	.....T.....	587
C. nitidissima. seq	TAAACTTAATGAATCATGCACAATTACTTGCTTAAATGATCATTCTCCATGATTGATTTTATTTTTCCTCTCTCTTTTA-TGGTACTAACCGTAA	677
C. arvipetala. seq	.....T.....	670
C. costei. seq	.....T.....	677
C. euphlebica. seq	.....T.....	671
C. impressinervis. seq	.....T.....	675
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....T.....	707
C. japonica var. kings peony. seq	.....T.....	666
C. longzhouensis. seq	.....T.....	682
C. oleifera. seq	.....T.....	670
C. pingguoensis. seq	.....T.....	682
C. pubipetala. seq	.....T.....	680
C. reticulata var. damansu. seq	.....T.....	678
C. reticulata var. mudancha. seq	.....T.....	678
C. reticulata var. shizitou. seq	.....T.....	678
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....T.....	678
C. reticulata var. zipao. seq	.....T.....	677
C. tunghinensi. seq	.....T.....	688
C. nitidissima. seq	TTACAATGGACCAGG	693
C. arvipetala. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGCTA	675
C. costei. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	722
C. euphlebica. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	687
C. impressinervis. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	682
C. japonica var. jinlouchun. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	749
C. japonica var. kings peony. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	670
C. longzhouensis. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	685
C. oleifera. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	681
C. pingguoensis. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	682
C. pubipetala. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	684
C. reticulata var. damansu. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	684
C. reticulata var. mudancha. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	684
C. reticulata var. shizitou. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	684
C. reticulata var. xiaoguiye. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	682
C. reticulata var. zipao. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	682
C. tunghinensi. seq	.....TTCCATTGTTGCCTCAACTGGCGGGG	693

图 1

Wild type: CTGTGGACGCAAACATCCCCCTTGATTGGATTCATTGGTAGACTAGAAGAGC  
Mutant: CTGTGGACGCAAACATCCCCCTTGATCGGATTCATTGGTAGACTAGAAGAGC  
dCAPS primer: CTGTGGACGCAAACATCCaCTTGAT

Wild type: CTGTGGACGCAAACATCCaCTTGATTGGATTCATTGGTAGACTAGAAGAGC  
Mutant: CTGTGGACGCAAACATCCaCTTGATCGGATTCATTGGTAGACTAGAAGAGC

*Bst*XI recognition sequence: CCANNNNNNTGG  
no *Bst*XI recognition sequence

图 2

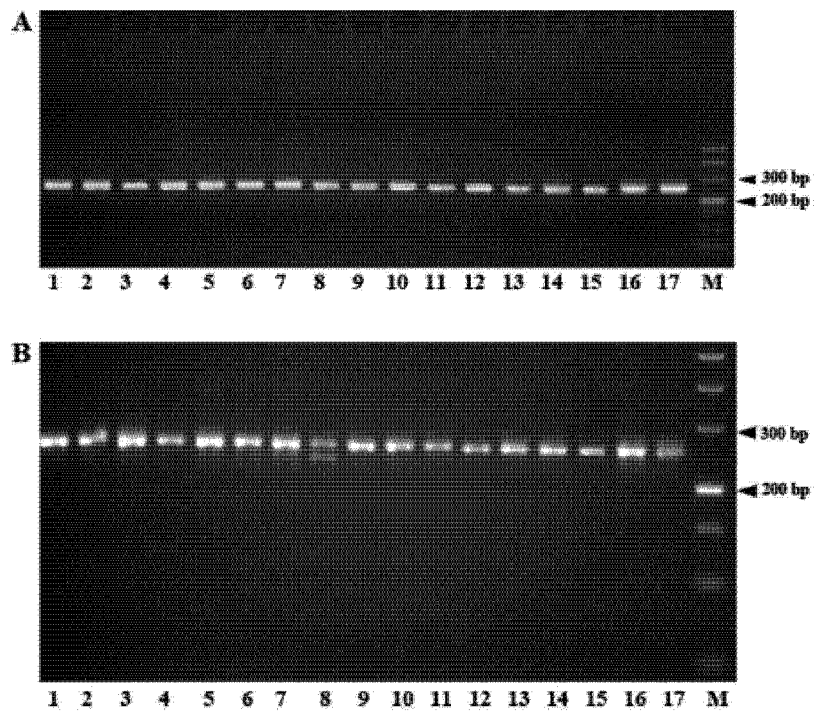


图 3