



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116024373 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 28

(21) 申请号 202211695652.2

(22) 申请日 2022.12.28

(71) 申请人 沈阳农业大学

地址 110000 辽宁省沈阳市东陵路120号
133栋1-3-2

(72) 发明人 郭印山 马潇乐乐 林洪 姜长岳
侯洋明

(74) 专利代理机构 北京智行阳光知识产权代理
事务所(普通合伙) 11738
专利代理师 李慧

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

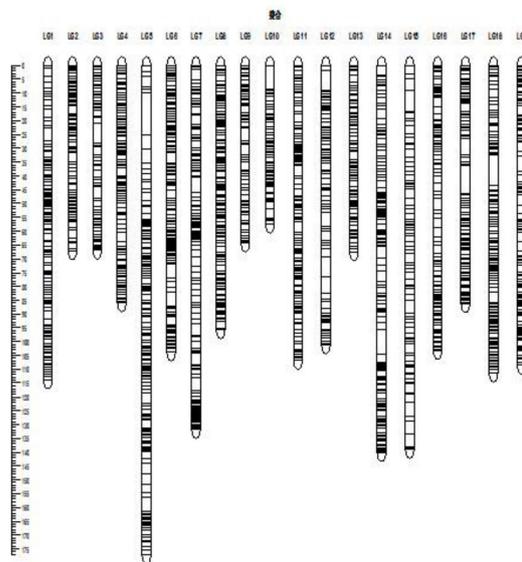
权利要求书2页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种与葡萄抗寒性相关的SNP分子标记及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记及其应用,通过前期筛选得到抗寒性强的葡萄品种和抗寒性弱的葡萄品种之间具有显著表达差异的VvCML基因,在VvCML基因上挖掘得到了具有显著差异的SNP位点,突变位点为148bpC/T的突变。本发明通过鉴定VvCML基因序列与葡萄抗寒性的关系,开发了与抗寒性相关的SNP分子标记,并进一步进行四引物法直接PCR分型,实现对葡萄幼苗直接而快速的遗传鉴定,可对野生资源驯化育种及传统杂交育种早期评价,加快育种进展,推动品种优化,本发明通过设计特异性引物进行PCR,能有效实现SNP位点基因分型,具有操作简便、成本低等特点。



1. 一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记,其特征在于,该SNP分子标记位于葡萄第2号染色体第8876325bp处,位于VvCML基因,核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,其序列中第148位碱基R为T/C,导致葡萄抗寒性出现多态性。

2. 根据权利要求1所述的一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记在鉴定葡萄抗寒性SNP芯片中的应用,其特征在于,该芯片的核苷酸序列为SEQ ID NO.1,或者探针3'端的最末一个碱基,紧挨所述核苷酸序列SEQ ID NO.1中第148位碱基的SNP位点。

3. 根据权利要求2所述的一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记制备鉴定葡萄抗寒性的试剂盒或检测装置中的应用,其特征在于,包括用于特异性检测核苷酸序列SEQ ID NO.1,其序列中第148位碱基R为T/C一种或多种引物,或引物和探针的组合。

4. 根据权利要求2所述的一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记制备鉴定葡萄抗寒性的试剂盒或检测装置,其特征在于,所述引物和/或探针选自:用于测序检测的特异性引物和测序引物,所述引物的序列分别如外引物F、内引物R、内引物F、外引物R,具体如下:

外引物F:5' -ATGAGCGTGGATGAACCG-3'

内引物R:5' -GTCCAGCTGCTCGGA-3'

内引物F:5' -GGTCTGAAACCAAATC-3'

外引物R:5' -CTAGGCCCATGAATTATCAA-3'。

5. 根据权利要求1所述SNP分子标记的试剂在制备鉴定葡萄抗寒性的试剂盒或检测装置中的应用,其特征在于,包含:

外引物F:5' -ATGAGCGTGGATGAACCG-3'

内引物R:5' -GTCCAGCTGCTCGGA-3'

内引物F:5' -GGTCTGAAACCAAATC-3'

外引物R:5' -CTAGGCCCATGAATTATCAA-3'。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述试剂盒的应用,其特征在于,所述试剂盒在如下1)-3)至少一项中的应用,具体包括如下方面:

1) 鉴定葡萄品种的抗寒性状;

2) 筛选抗寒性强的葡萄品种、或淘汰抗寒性弱的葡萄品种;

3) 通过遗传改良培育抗寒性强的葡萄品种。

7. 一种鉴定葡萄抗寒性状的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 提取待检测葡萄叶片的基因组DNA;

2) 以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用两种引物组合,利用外引物F和内引物R;内引物F和外引物R分别进行PCR扩增;

3) 对扩增产物进行测序,根据测序比对结果,对葡萄抗寒性强弱进行判断:扩增产物第148位碱基为C的类型抗寒性强于扩增产物第148位碱基为T的类型。

8. 一种鉴定葡萄抗寒性状的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 提取待检测葡萄叶片的基因组DNA;

2) 以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用两种引物组合分别进行PCR扩增;所述两种引物组合为外引物F和内引物R、内引物F和外引物R;

3) 将两者的PCR产物混匀,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测产物将SNP进行分型。

4) 分析分型结果,权利1所述SNP分子标记,其特征在于,C/C纯合的葡萄材料,可扩增出

162bp特异条带。T/T纯合的葡萄材料,可扩增出360bp特异条带。C/T杂合的葡萄材料,可扩增出162bp与360bp两种条带类型。T/T基因型为抗寒性强,C/C基因型为抗寒性弱,C/T基因型为中间型。

9.一种选育高抗寒性的葡萄品种的方法,其特征在于,包括以下步骤:对权利要求1所述的SNP分子标记进行基因分型检测;将两种C/T基因型,或C/C基因型和CT基因型葡萄进行杂交,筛选C/C基因型的杂交后代。

10.根据权利要求7或8所述的一种鉴定葡萄抗寒性状的应用,其特征在于,以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用两种引物组合,利用外引物F和内引物R;内引物F和外引物R分别进行PCR扩增,其中PCR扩增反应使用的反应体系10ul记为:1000ng/uL基因组DNA1uL,2×Taq Master Mix 5uL,PCR Primer mix 1uL,去离子水补齐10uL;PCR扩增反应的扩增程序为;95°C5min;95°C30s;60°C30s;72°C30s,30个循环;72°C10min;4°C∞。

一种与葡萄抗寒性相关的SNP分子标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于果树分子生物学技术领域,具体涉及与葡萄抗寒性相关的SNP分子标记、以及检测葡萄抗寒性状的方法。

背景技术

[0002] 单核苷酸多态性(Single-Nucleotide Polymorphism, SNP)是指在基因组脱氧核酸(DNA)序列上由单个脱氧核苷酸的变异引起的DNA片段的多态性。SNP涉及到单个碱基的变异,表现形式有转换、颠换、插入和缺失。SNP目前有多种检测方法,常用的包括,PC直接检测、DNA芯片、高通量二代测序技术等。通过检测SNP位点检测基因型是近年兴起的一种方法。分子标记在园艺作物育种中的应用已有一段时间,相比传统育种方法,分子育种技术大大提高选育效率,节省育种时间、成本,为育种学家在分子水平上打开了探索道路。

[0003] 葡萄作为全球重要的经济果树作物之一,被广泛用于酿酒、加工和鲜食。近十年来,中国葡萄种植,无论是栽培面积、产量,都取得了迅猛发展。我国葡萄的主栽区多位于寒冷、干旱、半干旱区域,这些地区大多冬季寒冷,气候干燥。而我国目前生产上主栽的欧亚种和欧美杂交种葡萄,对低温干旱气候适应性较差。葡萄冷害和冻害问题是我国尤其是北方地区葡萄生产面临的主要问题。目前田间所采取的主要措施是下架埋土防寒,但其繁重的工作量会消耗大量的人力财力。同时,埋土过程中易对树体、根系产生伤害,缩短树体生产年限;因此,培育优质抗寒葡萄品种,提高葡萄的抗寒性是我国葡萄产业有待解决的重要课题。

[0004] 葡萄抗寒性是受多基因控制的数量性状,难以用常规育种方法来快速改良,无法清晰的区分性状差异,而通过分子生物技术鉴定葡萄抗寒性相关的主效基因或分子标记,可以有效提高育种效率,同时也为传统育种提供一定的依据。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种与葡萄抗寒性相关的SNP分子标记及其应用,本发明通过设计特异性引物进行PCR,能有效实现SNP位点基因分型,具有操作简便、成本低等特点。

[0006] 本发明的目的是通过下述技术方案予以实现:一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记,该SNP分子标记位于葡萄第2号染色体第8876325bp处,位于VvCML基因,核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,其序列中第148位碱基R为T/C,导致葡萄抗寒性出现多态性。

[0007] 一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记在鉴定葡萄抗寒性SNP芯片中的应用,该芯片的核苷酸序列为SEQ ID NO.1,或者探针3'端的最末一个碱基,紧挨所述核苷酸序列SEQ ID NO.1中第148位碱基的SNP位点。

[0008] 一种葡萄抗寒性相关的SNP分子标记制备鉴定葡萄抗寒性的试剂盒或检测装置中的应用,包括用于特异性检测核苷酸序列SEQ ID NO.1,其序列中第148位碱基R为T/C一种或多种引物,或引物和探针的组合。

[0009] 进一步地,所述引物和/或探针选自:用于测序检测的特异性引物和测序引物,所述引物的序列分别如外引物F、内引物R、内引物F、外引物R,具体如下;

[0010] 外引物F:5' -ATGAGCGTGGATGAACCG-3'

[0011] 内引物R:5' -GTCCAGCTGCTCGGA-3'

[0012] 内引物F:5' -GGTCTGAAACCAAATC-3'

[0013] 外引物R:5' -CTAGGCCCATGAATTATCAA-3'。

[0014] 进一步地,SNP分子标记的试剂在制备鉴定葡萄抗寒性的试剂盒或检测装置中的应用,包含:

[0015] 外引物F:5' -ATGAGCGTGGATGAACCG-3'

[0016] 内引物R:5' -GTCCAGCTGCTCGGA-3'

[0017] 内引物F:5' -GGTCTGAAACCAAATC-3'

[0018] 外引物R:5' -CTAGGCCCATGAATTATCAA-3'。

[0019] 试剂盒的应用,所述试剂盒在如下1) -3)至少一项中的应用,具体包括如下方面:

[0020] 4) 鉴定葡萄品种的抗寒性状;

[0021] 5) 筛选抗寒性强的葡萄品种、或淘汰抗寒性弱的葡萄品种;

[0022] 6) 通过遗传改良培育抗寒性强的葡萄品种。

[0023] 一种鉴定葡萄抗寒性状的方法,包括以下步骤:

[0024] 4) 提取待检测葡萄叶片的基因组DNA;

[0025] 5) 以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用两种引物组合,利用外引物F和内引物R;内引物F和外引物R分别进行PCR扩增;

[0026] 6) 对扩增产物进行测序,根据测序比对结果,对葡萄抗寒性强弱进行判断:扩增产物第148位碱基为C的类型抗寒性强于扩增产物第148位碱基为T的类型。

[0027] 一种鉴定葡萄抗寒性状的方法,包括以下步骤:

[0028] 5) 提取待检测葡萄叶片的基因组DNA;

[0029] 6) 以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用两种引物组合分别进行PCR扩增;所述两种引物组合为外引物F和内引物R、内引物F和外引物R;

[0030] 7) 将两者的PCR产物混匀,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测产物将SNP进行分型。

[0031] 8) 分析分型结果,权利1所述SNP分子标记,其特征在于,C/C纯合的葡萄材料,可扩增出162bp特异条带。T/T纯合的葡萄材料,可扩增出360bp特异条带。C/T杂合的葡萄材料,可扩增出162bp与360bp两种条带类型。T/T基因型为抗寒性强,C/C基因型为抗寒性弱,C/T基因型为中间型。

[0032] 一种选育高抗寒性的葡萄品种的方法,包括以下步骤:

[0033] 对权利要求1所述的SNP分子标记进行基因分型检测;将两种C/T基因型,或C/C基因型和CT基因型葡萄进行杂交,筛选C/C基因型的杂交后代。

[0034] 一种鉴定葡萄抗寒性状的应用,以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用两种引物组合,利用外引物F和内引物R;内引物F和外引物R分别进行PCR扩增,其中PCR扩增反应使用的反应体系10 μ l记为:1000ng/ μ L基因组DNA 1 μ L,2 \times Taq Master Mix 5 μ L,PCR Primer mix 1 μ L,去离子水补齐10 μ L;PCR扩增反应的扩增程序为:95 $^{\circ}$ C5min;95 $^{\circ}$ C30s;60 $^{\circ}$ C30s;72 $^{\circ}$ C30s,30个循环;72 $^{\circ}$ C10min;4 $^{\circ}$ C ∞ 。

[0035] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0036] 本发明首次提出一种适用于鉴定葡萄抗寒性状的SNP分子标记,该分子标记来自于葡萄VvCML基因。针对现有技术中的不足,提供了一种准确、高效、低成本的葡萄抗寒性状鉴定方法,对葡萄抗寒相关的大规模育种具有潜在应用价值,本发明通过鉴定VvCML基因序列与葡萄抗寒性的关系,开发了与抗寒性相关的SNP分子标记,并进一步进行四引物法直接PCR分型,实现对葡萄幼苗直接而快速的遗传鉴定,可对野生资源驯化育种及传统杂交育种早期评价,加快育种进展,推动品种优化。

附图说明

[0037] 图1为‘红地球’×‘双优’杂交群体整合遗传图谱,单位为cM。图2为‘霞多丽’×‘北冰红’杂交群体整合遗传图谱,单位为cM。图3为葡萄VvCML抗寒基因型和敏感基因型部分序列差异位点比对结果。

[0038] 图4为利用抗寒分子标记Vach1鉴定不同葡萄品种抗寒性电泳谱带图;

[0039] 图4中标记如下,注:1为红地球,2为霞多丽,3为赤霞珠,4为维多利亚,5为双优,6为北冰红,7为左优红,8为贝达M:2000maker。

[0040] 图5为利用抗寒分子标记Vach1鉴定葡萄杂交后代抗寒性电泳谱带图;

[0041] 图5中标记如下,注:1为9-1-16,2为9-1-17,3为9-1-68,4为9-1-309,5为9-1-2,6为9-1-6,7为9-1-30,8为9-1-41M:2000maker。

具体实施方式

[0042] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0043] 如图1-4所示,本发明利用转录组测序和QTL定位联合筛选分子标记。采用了三个葡萄杂交群体,群体的亲本分别为:‘红地球’×‘双优’、‘霞多丽’×‘北冰红’、‘赤霞珠’×‘左优红’。采集三个群体2019年和2020年抗寒性表型数据,结合课题组所构建的葡萄遗传图谱,通过复合区间作图法和多重QTL模型(MQM)进行QTL定位,发现了不同年份间稳定的QTL位点,其位于葡萄2号染色体上。对一个抗寒品种(双优)和一个不抗寒品种(红地球)的休眠芽低温处理,将处理前后的样品进行转录组测序。转录组测序结果和QTL定位结果联合分析获得具有显著差异的基因,其中包括VvCML基因,再利用qRT-PCR技术做时空表达量的分析以加强验证。在一个杂交后代群体(‘红地球’×‘双优’)和6个葡萄品种(‘红地球’、‘双优’、‘霞多丽’、‘北冰红’、‘赤霞珠’、‘左优红’)中进行VvCML基因克隆,根据VvCML基因第148位核苷酸发生C到T的等位变异,挖掘出SNP位点,并在已知抗寒性状的品种中进行验证。

[0044] 本发明提供一种和葡萄抗寒性相关的SNP分子标记。

[0045] 所述SNP分子标记位于葡萄第2号染色体8876325bp位点,位于VvCML基因,基因序列信息如SEQ ID NO.1所示,突变位点为148C/T突变。VvCML基因(gene id:Vitvi02g00774,数据库链接:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=LOC100241974>)。以VvCML基因起始密码子为+1,当检测到148bp位点的碱基为纯合C/C型,判定为抗寒性强,是优良的高抗

寒葡萄品种;当检测到148bp位点的碱基为纯合T/T型或杂合C/T型,判定为抗寒性弱,是不抗寒葡萄品种。

[0046] SNP序列信息

[0047] 2:8876325位点及前后各25-bp

[0048] AAGATCATTAGGTCTGAAACCAACT[C/T]CAGAGCAGCTGGACGCCCTAAGTCA

[0049] 本发明提供一组用于扩增上述SNP分子标记的引物,其与SNP位点配对情况如附图1,所述引物序列如下:

[0050] 外引物F:5' -ATGAGCGTGGATGAACCG-3'

[0051] 内引物R:5' -GTCCAGCTGCTCGGA-3'

[0052] 内引物F:5' -GGTCTGAAACCAAATC-3'

[0053] 外引物R:5' -CTAGGCCCATGAATTATCAA-3'。

[0054] 本发明提供一种检测葡萄抗寒性候选基因VvCML基因型的方法,通过对葡萄第2号染色体8876325bp位点(gene id:Vitvi02g00774,数据库链接:)的核苷酸进行SNP检测,根据检测结果判定葡萄VvC ML基因为C\C、T\T或C\T。本申请所用的SNP检测方法为四引物扩增受阻突变体系PCR(Tetra-primer ARMS-PCR)。

[0055] 具体实施例一;

[0056] 利用SNP标记高效鉴别不同品种葡萄抗寒性;

[0057] 1材料与方法

[0058] 1.1选材和DNA提取

[0059] 供试材料为‘红地球’、‘双优’、‘霞多丽’、‘北冰红’、‘赤霞珠’、‘左优红’、维多利亚、贝达,均来自沈阳农业大学葡萄资源圃。选取待测葡萄单株的幼嫩叶片存储于4℃冰箱,采用改良CTAB法提取所有样本的DNA,使用琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,然后置于-20℃冰箱中以备后续实验使用。

[0060] 1.2PCR扩增碱基片段以待检测葡萄的基因组DNA为模板,采用本发明提供的两种引物组合(外引物F和内引物R;内引物F和外引物R)分别进行PCR扩增。所述PCR反应体系如下:Premix Taq™ 5μl,ddH₂O3μl,DNA1μl,引物各0.5μl。所述PCR反应条件如下:1000ng/uL基因组DNA 1uL,2×Taq Master Mix 5uL,PCR Primer mix 1uL,去离子水补齐10uL;PCR扩增反应的扩增程序为;95℃5min;95℃30s;60℃30s;72℃30s,30个循环;72℃10min;4℃∞。

[0061] 1.3分型情况分析

[0062] 将两者的PCR产物混匀,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测产物将SNP进行分型。

[0063] 根据所述PCR产物大小鉴定待测葡萄的抗寒性,C/C纯合的葡萄材料,可扩增出162bp特异条带。T/T纯合的葡萄材料,可扩增出360bp特异条带。C/T杂合的葡萄材料,可扩增出162bp与360bp两种条带类型。T/T基因型为抗寒性强,C/C、C/T基因型为抗寒性弱。

[0064] 结果如表1和附图4所示,4个抗寒品种均呈现360bp的谱带类型,4个不抗寒品种呈现360bp和162bp的2条谱带类型。

[0065] 表1抗寒相关的SNP分子标记对不同葡萄品种DNA的扩增检测

品种	抗寒性	360bp	162bp	基因型
‘红地球’	不抗	+	+	CT
‘霞多丽’	不抗	+	+	CT
‘双优’	高抗	+	-	CC
‘北冰红’	高抗	+	-	CC
[0066] ‘赤霞珠’	不抗	+	+	CT
‘维多利 亚’	不抗	+	+	CT
‘左优红’	高抗	+	-	CC
‘贝达’	高抗	+	-	CC

[0067] 具体实施例二；

[0068] 利用SNP标记高效鉴别葡萄杂交后代的抗寒性；

[0069] 1材料与方法

[0070] 1.1选材和DNA提取

[0071] 供试材料为8个‘红地球’×‘双优’杂交F1代，样品均来自沈阳农业大学葡萄资源圃，选取待测葡萄单株的幼嫩叶片存储于4℃冰箱，采用改良CTAB法提取所有样本的DNA，使用琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量，然后置于-20℃冰箱中以备后续实验使用。

[0072] 1.2PCR扩增碱基片段以待检测葡萄的基因组DNA为模板，采用本发明提供的两种引物组合（外引物F和内引物R；内引物F和外引物R）分别进行PCR扩增。所述PCR反应体系如下：Premix Taq™ 5μl，ddH₂O 3μl，DNA 1μl，引物各0.5μl。所述PCR反应条件如下：1000ng/uL基因组DNA 1uL，2×Taq Master Mix 5uL，PCR Primer mix 1uL，去离子水补齐10uL；PCR扩增反应的扩增程序为；95℃5min；95℃30s；60℃30s；72℃30s，30个循环；72℃10min；4℃∞。

[0073] 1.3分型情况分析

[0074] 将两者的PCR产物混匀，使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测产物将SNP进行分型。

[0075] 根据所述PCR产物大小鉴定待测葡萄的抗寒性，C/C纯合的葡萄材料，可扩增出162bp特异条带。T/T纯合的葡萄材料，可扩增出360bp特异条带。C/T杂合的葡萄材料，可扩增出162bp与360bp两种条带类型。T/T基因型为抗寒性强，C/C、C/T基因型为抗寒性弱。

[0076] 结果如表2和附图5所示，4个抗寒品种均呈现360bp的谱带类型，4个不抗寒品种呈现360bp和162bp的2条谱带类型。

[0077] 表2抗寒相关的SNP分子标记对葡萄品种杂交后代DNA的扩增检测

	株系	抗寒性	360bP	162bP	基因型
	9-1-2	高抗	+	-	CC
	9-1-6	高抗	+	-	CC
	9-1-30	高抗	+	-	CC
[0078]	9-1-41	高抗	+	-	CC
	9-1-16	不抗	+	+	CT
	9-1-17	不抗	+	+	CT
	9-1-68	不抗	+	+	CT
	9-1-309	不抗	+	+	CT

[0079] 本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0080] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

[0081] 序列表;

[0082] 1. 敏感型SNP位点前后25bp的核苷酸序列

[0083] AAGATCATTAGGTCTGAAACCAACT[T]CAGAGCAGCTGGACGCCCTAAGTCAGAAAAGC A;

[0084] 2. 抗寒型SNP位点前后25bp的核苷酸序列

[0085] AAGATCATTAGGTCTGAAACCAACT[C]CAGAGCAGCTGGACGCCCTAAGTCAGAAAAGC A.

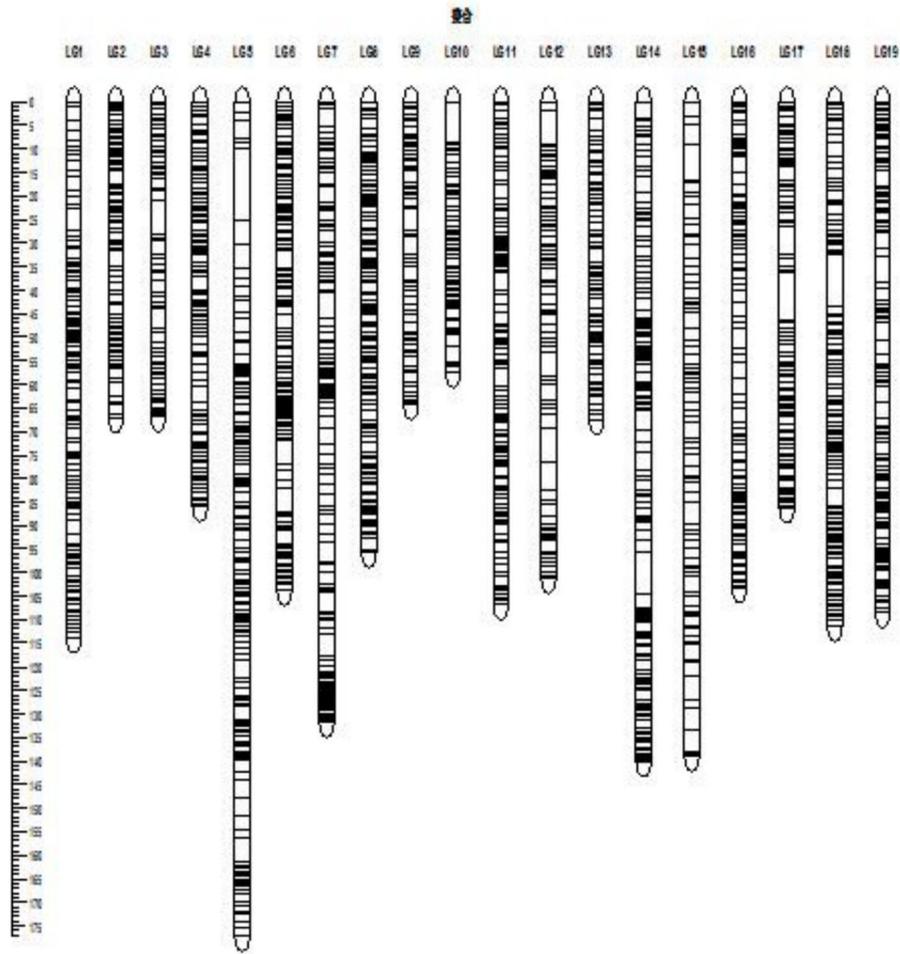


图1

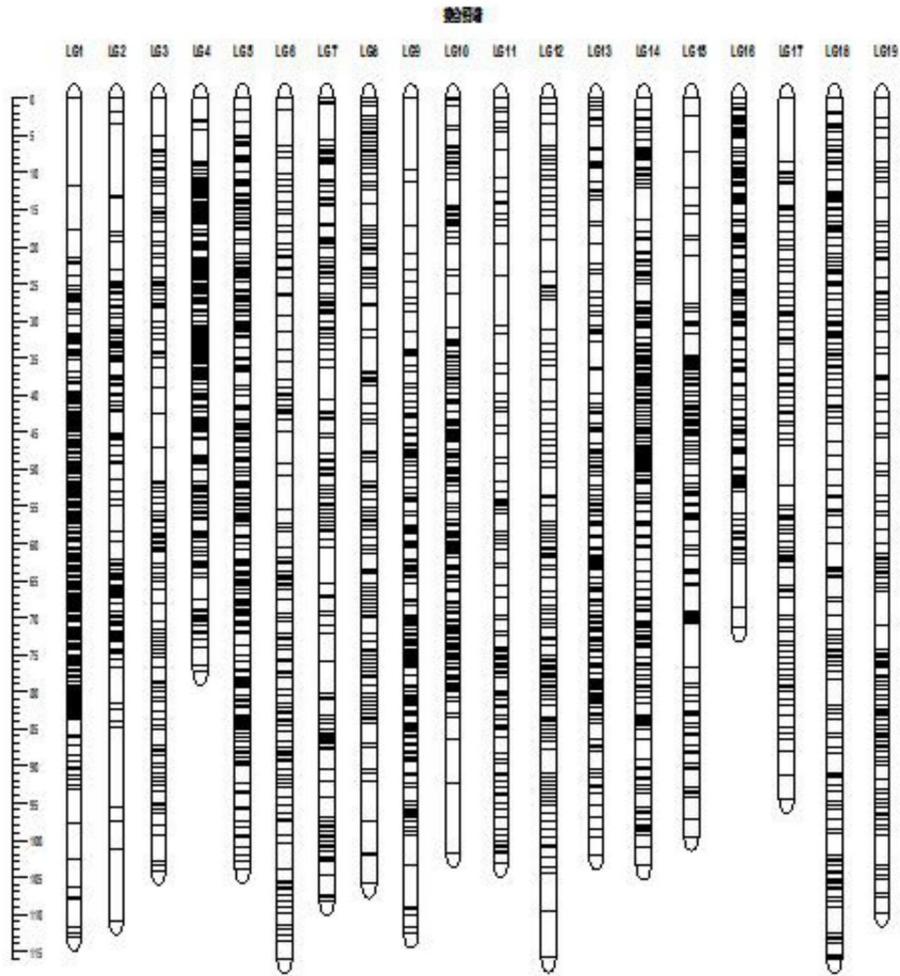


图2

红地球.txt	TTTCGATCATTTCGATAGAAACAATGACGGAAGCCTAACGCAGCTGGAGCTGGGATCCTTG
霞多丽.txt	TTTCGATCATTTCGATAGAAACAATGACGGAAGCCTAACGCAGCTGGAGCTGGGATCCTTG
赤霞珠.txt	TTTCGATCATTTCGATAGAAACAATGACGGAAGCCTAACGCAGCTGGAGCTGGGATCCTTG
双优.txt	TTTCGATCATTTCGATAGAAACAATGACGGAAGCCTAACGCAGCTGGAGCTGGGATCCTTG
北冰红.txt	TTTCGATCATTTCGATAGAAACAATGACGGAAGCCTAACGCAGCTGGAGCTGGGATCCTTG
左优红.txt	TTTCGATCATTTCGATAGAAACAATGACGGAAGCCTAACGCAGCTGGAGCTGGGATCCTTG

图3

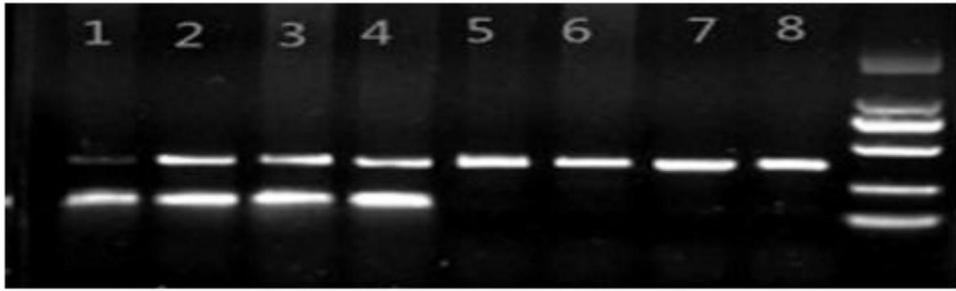


图4

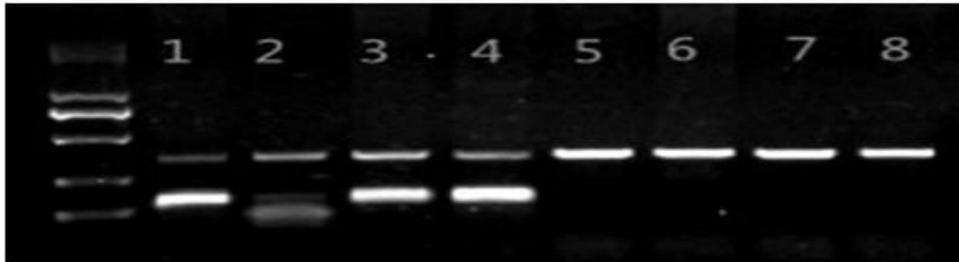


图5