



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113122641 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 202010039108.7

(22)申请日 2020.01.14

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

申请人 云南省烟草公司玉溪市公司

(72)发明人 李虎 冯增贝 杨海林 周文斌

张立猛 彩万志

(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 黄爽

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6888(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页  
序列表6页

(54)发明名称

烟蚜茧蜂SSR标记及其应用

(57)摘要

本发明提供一组烟蚜茧蜂SSR标记及其应用。包括16个SSR标记,编号分别为S1、S3、S5、S8、S10、S13、S15、S18、S30、S36、S38、S39、S40、S41、S42和S44,用于扩增各SSR标记的引物分别见SEQ ID NO:1-32。本发明从来自不同地区的烟蚜茧蜂样本中提取DNA,筛选微卫星位点,从而设计引物。该组引物具有PCR扩增结果稳定,多态性高等优点,可用于烟蚜茧蜂多样性及群体遗传结构的分析,具有很好的应用价值。

1. 烟蚜茧蜂SSR标记, 其特征在于, 包括16个SSR标记, 编号分别为S1、S3、S5、S8、S10、S13、S15、S18、S30、S36、S38、S39、S40、S41、S42和S44, 用于扩增各SSR标记的引物分别如SEQ ID NO:1-2、SEQ ID NO:3-4、SEQ ID NO:5-6、SEQ ID NO:7-8、SEQ ID NO:9-10、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14、SEQ ID NO:15-16、SEQ ID NO:17-18、SEQ ID NO:19-20、SEQ ID NO:21-22、SEQ ID NO:23-24、SEQ ID NO:25-26、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:29-30和SEQ ID NO:31-32所示。

2. 用于扩增权利要求1所述SSR标记的引物, 其特征在于, 扩增SSR标记S1、S3、S5、S8、S10、S13、S15、S18、S30、S36、S38、S39、S40、S41、S42和S44的引物分别如SEQ ID NO:1-2、SEQ ID NO:3-4、SEQ ID NO:5-6、SEQ ID NO:7-8、SEQ ID NO:9-10、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14、SEQ ID NO:15-16、SEQ ID NO:17-18、SEQ ID NO:19-20、SEQ ID NO:21-22、SEQ ID NO:23-24、SEQ ID NO:25-26、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:29-30和SEQ ID NO:31-32所示。

3. 含有权利要求2所述的引物的检测试剂、试剂盒或芯片。

4. 权利要求1所述SSR标记、权利要求2所述引物、或者权利要求3所述检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂品种鉴定及选育中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 提取待测烟蚜茧蜂的基因组DNA;

2) 以提取的DNA为模板, 分别利用权利要求2中的每对引物进行PCR扩增;

3) 分析PCR扩增产物。

6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于, 步骤2) 中使用的PCR扩增体系为:  $2 \times$  Taq PCR MasterMix 5 $\mu$ l, 10 $\mu$ M上、下游引物各0.08-0.20 $\mu$ l, DNA模板0.5-1.0 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O补齐至总体积10 $\mu$ l。

7. 根据权利要求5或6所述的应用, 其特征在于, 步骤2) 中采用的PCR反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 54-58 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 30-45s, 30-36个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min。

8. 权利要求1所述SSR标记、权利要求2所述引物、或者权利要求3所述检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂分子标记辅助育种中的应用。

9. 权利要求1所述SSR标记、权利要求2所述引物、或者权利要求3所述检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂群体结构、遗传多样性分析或亲缘关系鉴定中的应用。

10. 权利要求1所述SSR标记、权利要求2所述引物、或者权利要求3所述检测试剂、试剂盒或芯片在构建烟蚜茧蜂DNA指纹图谱中的应用。

## 烟蚜茧蜂SSR标记及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体地说,涉及烟蚜茧蜂SSR标记及其应用。

### 背景技术

[0002] 烟蚜茧蜂(*Aphidius gifuensis* Ashmead),属于膜翅目(Hymenoptera)蚜茧蜂科(Aphidiidae)蚜茧蜂属(*Aphidius*),国外分布于亚洲东部日本、朝鲜及夏威夷群岛;国内分布于吉林、辽宁、陕西、山东、河南、江苏、安徽、浙江、福建、台湾、广东、云南等省,主要在我国东部及南方各省烟区,是烟蚜的优势天敌。烟蚜茧蜂除了寄生烟蚜*Myzus persicae* (Sulzer)外,还可以寄生菜蚜*Brevicoryne brassicae* (Linnaeus)、萝卜蚜*Lipaphis erysimi* (Kaltenbach)、小麦长管蚜*Macrosiphum avenae* (Fabricius)等,对烟蚜的自然寄生率通常为20%~60%,最高的可达89.16%,在蚜虫的生物防治中意义重大且应用效果显著。自烟蚜茧蜂能够人工大量繁殖之后,每年有大量的烟蚜茧蜂投放在田间,防治烟蚜。但是人工繁育烟蚜茧蜂的释放对野外种群的影响从未进行过遗传评估。而人工繁育的种群也常常因为亲本有限,近亲杂交等因素导致遗传多样性的降低,不利于烟蚜茧蜂的长期繁殖育种与应用。

[0003] 微卫星标记技术(microsatellite),又称为简单序列重复(Simple Sequence Repeats, SSR),是以重复单位(1-6bp的核苷酸)首尾相连,均匀分布在整个生物基因组中。其原理是SSR位点两端侧翼序列保守性高,因微卫星本身基序和重复次数都不同,进行PCR扩增时形成微卫星位点多态性,特异性好,共显性遗传,成本低。开发烟蚜茧蜂微卫星标记对于进行烟蚜茧蜂的遗传研究具有重要意义,可应用于烟蚜茧蜂谱系地理格局、群体结构、遗传多样性的分析,也可以为烟蚜茧蜂品种选育、遗传评估提供基础。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供烟蚜茧蜂SSR标记及其应用。

[0005] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供烟蚜茧蜂SSR标记,包括16个SSR标记,编号分别为S1、S3、S5、S8、S10、S13、S15、S18、S30、S36、S38、S39、S40、S41、S42和S44,用于扩增各SSR标记的引物分别如SEQ ID NO:1-2、SEQ ID NO:3-4、SEQ ID NO:5-6、SEQ ID NO:7-8、SEQ ID NO:9-10、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14、SEQ ID NO:15-16、SEQ ID NO:17-18、SEQ ID NO:19-20、SEQ ID NO:21-22、SEQ ID NO:23-24、SEQ ID NO:25-26、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:29-30和SEQ ID NO:31-32所示。

[0006] 烟蚜茧蜂16个SSR标记的信息见表1:

[0007] 表1烟蚜茧蜂16个SSR标记的引物信息

[0008]

位点	引物	重复单元	退火温度 (°C)	片段长度 (bp)
S1	F:AGGCATGAATACAGTGAATCAACA	(TCA) <sub>7</sub>	58	100
	R:TGTCTGAGCTTTCATCATCCAA			
S3	F:ACGTGATAATTTCTTGAGCCGG	(TGA) <sub>7</sub>	59	114
	R:TACCACGCCACCTGGATTAG			
S5	F:GCCAGGTCATCATCGTCGTA	(TGT) <sub>9</sub>	59	200
	R:ACACGACCGGTTGTTTCATTG			
S8	F:CTCTCAGATGGTGGTGCTGA	(ATT) <sub>7</sub>	59	272
	R:GGCAGACGAACTCCCAGAAT			
S10	F:GTATATCCGGCGGGCGTT	(AGT) <sub>10</sub>	59	131
	R:GAAGATCGATCCGGCATTCTG			
S13	F:ACCTGAATGAGCACCACCAT	(TAT) <sub>7</sub>	59	147
	R:GGACCACCAATGAATAATATGGCA			
S15	F:CATCTTGTCGTGGAACAGGC	(GTG) <sub>8</sub>	59	175
	R:TCCGTTCGTCCAATGGGTAA			
S18	F:TCTGCTTGACTATCAGCACCA	(CAT) <sub>7</sub>	59	193
	R:TGGGTACAAGAGTAACTCGTTCA			
S30	F:TTGACGAGTTCTTCAGTTGGC	(TGA) <sub>7</sub>	59	190
	R:GTTGCTATCAAGATGGTTTGGGT			
S36	F:ACGCTTGAGTGATAAATCTGGG	(CAA) <sub>7</sub>	58	144
	R:GGCTGGACCTGTTTCACTTT			
S38	F:GGCATCATCAACATCATCACCA	(CAA) <sub>8</sub>	59	178
	R:GCTGGGAAATATAACACCACGA			
S39	F:CGACAGACGTGACAACCTGAA	(AAC) <sub>7</sub>	59	184
	R:ACACTTCTTGAAGATGGTGTGTT			
S40	F:AGTGTTGATCGTTCATTGTGGG	(AAT) <sub>8</sub>	59	186
	R:ACGTGGTTGATAATCAAGTGCT			
S41	F:AAACATCTGTTTCTGGCGACA	(ATC) <sub>8</sub>	59	190
	R:AATTTAAGTGAAGCAAAGGGTGGT			
S42	F:TCGTGTTGATTTGAGTGGATTAGA	(AAT) <sub>7</sub>	59	261
	R:TCCTCTGTGCTGTCTTGTGG			
S44	F:TCATCGTTTACCATCATCAGGT	(AAC) <sub>7</sub>	58	307
	R:TGCACTCATTTACCAAGTGA			

[0009] 扩增产物序列 (16个SSR标记) 如下:

[0010] S1:AGGCATGAATACAGTGAATCAACATCTTCATTGTTCATCCtcatcatcatcatcatcatcaGCGTCATCTTCAAATGATTTGGATGATGAAAGCTCAGACA

[0011] S3:ACGTGATAATTTCTTGAGCCGGAAATAATATAAAATGATGTtgatgatgatgatgatgatgaTTGTGGTCATCTTTCTCTTTCTATTCTATATTCTAATCCAGGTGGCGTGGTA

[0012] S5:GCCAGGTCATCATCGTCGTATCATATTCATTATTTTAAATAAAATTTTATAAAACATCAAATTGATCATTATTATAAAATTAGTTTAATTAATTTAtgttggttggttggttggttggttggttggtTGGTTTGAGGGTACGTGGTTATCGTGATGCACTTGCTCTCGGTGATGGTGCTCGTCGTCAATGAACAACCGGTCTGTGT

[0013] S8:CTCTCAGATGGTGGTGCTGATATTCTTCCAGATGGACCATGATTTCTGAAGAATCGTGGCTGTGC

ATCTTGAAAGCTATGTTTACGCTCCAAGGCAGTTCTATGATGTCCCTCattattattattattattattAGCTGGT  
ATCAAAATATTTTGTGTTTATTTGTCTCATATCAGGAGAACCAGATATTATATTTTGATCAATCCATTTATCTTCAAC  
AGCAATTGAACTTAATGATGAATTTG

[0014] TTGTATAAATTCTGGGAGTTCGTCTGCC

[0015] S10:GTATATCCGGCGGGCGTTGCAACGGTACAATAGAAGTATGTAATAGTAGAagtagtagtagtag  
tagtagtagtagtagtagAGCAGAGCTTTTGGCTCGGCCTGGCAGACCGGAATGCCGGATCGATCTTC

[0016] S13:ACCTGAATGAGCACCACCATTATTGCTATTAACATTATTACtattattattattattattatGA  
CCTCCAGGACCACCAGGACCCATATGTCCCATTTGATTTGGATGTGGCATATTCATATTTGCCATATTATTCATTGG  
TGGTCC

[0017] S15:CATCTTGTCGTGGAACAGGCATACCAGGATGTCTTGGAGGGCCTTGATGCATTTGTTgtggtgg  
tggtggtggtggtggtgGACCACGTTGACCAGGCATTTGTTGTCTCGGCATATTATTTAATGGACCTTGATGTACC  
ATCATTGGTAACCGATTACCCATTGGACGAACGGA

[0018] S18:TCTGCTTGACTATCAGCACCATCTTGAGATATCAATGTATCATTATTATCAAcatcatcatcat  
catcatcatCTTCATCTTCATCAAGTGATACATTTTGTACTTTATTTGATAATTCATCAACTTGATTTGTTTCACA  
ATTATTAATCTGGCTATTATTCATTTTCATTGAACGAGTTACTCTTGTAACCA

[0019] S30:TTGACGAGTTCTTCAGTTGGCTTTAAATATAATTTAATAAATTAATAAATCATCTtgatgatga  
tgatgatgatgaTGTTCAATCAATTGGAATTATGTCTTGGATATTTTAATAATCATCATTTCATATTGATGCATC  
ATTTAATTTAAAGAAATAAAAGACTTACCCAAACCATCTTGATAGCAAC

[0020] S36:ACGCTTGAGTGATAAATCTGGGTCATAACCATTACATGTACGCATACATTATTATATCGAACTG  
GGTTCATAACGAGGCATCTTAAAGTTTGcaacaacaacaacaacaacaaAAATACCAACCAAAGTGAAACAGGTCC  
AGCC

[0021] S38:GGCATCATCAACATCATCACCATCAGTAGCAATACCAACATTATCATTAAATTCACAATCAACA  
ACTCCAATGACATCAACATCATTACACTCAACAAATTcaacaacaacaacaacaacaacaaGTGGTAATGGTACTA  
GAGCATCAACTAGAAATCGTGGTGTTATATTTCCCAGC

[0022] S39:CGACAGACGTGACAACCTGAATCAGATACCAAGGACATTGATCAGAATGGTGGTGAAGTTACAGA  
CAAAATACCAAATGATAATTCATCAACTCCATCGCCATCATCACCATCATCACCAAATaacaacaacaacaaca  
acTGAATCAACAAAAGAAGAAACAACACCATCTTCAAGAAGTGT

[0023] S40:AGTGTTGATCGTTCATTGTGGGGTGATATGTCTGATGTTATTGAATATAGTGAAaataataata  
ataataataataatATATTGAATGAATATTCATCAAGCAAAGAAATACCATTTGCATTGGGTTTGTACCATTGAG  
AGCAGCATTAGAAAGAATGCAAGCAGCACTTGATTATCAACCACGT

[0024] S41:AAACATCTGTTTCTGGCGACAGAGATTAGCAAAGCCGCGCACAGTAAATCCATTTTATCCATT  
GACCCTCCTAAATCACGGTTATTGTAatcatcatcatcatcatcatcatcGGGTGCACGCTCTCAACCTCCGGTA  
AACTCATCCCATCATTGAATTGGAATACCACCTTTGCTTCACTTAAATT

[0025] S42:TCGTGTTGATTTGAGTGGATTAGAATTATTATCAAATAGTATTGCTGAATTGGAACATATCAAA  
TCATCTGATCCAAATTCATCAGAATATGAATCATTAAACTCACCAATTAAGAAACAAATGAAATTAAACAAAATG  
AAaataataataataataataatGAAGTTGATAGTCCATTGGGTTTACTATGTGCACTTGCTGAACAAAGATTTAT  
GGAAGAAGTTGGTGATAATGATGTACCACAAGACAGCACAGAGGA

[0026] S44:TCATCGTTTACCATCATCAGGTTCAAGTTATTATTTAAGTTTAAATGTTCAATCATCAACAGTA  
ACATTAACAGTCCATTAACATCTGAAGATTTTGCTACGACATTTAGTCATCCACTTGATAATGGAATTGaacaac

aacaacaacaacaacCACAAAGAGATACAACAAATTCACATGAATGTCAATCAAAAGGTAGTGTCTGATGAATT  
ATTAAATGACAGTTTACAAGTTGAAGTTAAAGAAAGAAATAGTTGGCATAAAGTTAATAATTTAGAAAATTCCTTG  
GTGAAATGAGTGCA

[0027] 第二方面,本发明提供用于扩增上述16个SSR标记的引物,扩增SSR标记S1、S3、S5、S8、S10、S13、S15、S18、S30、S36、S38、S39、S40、S41、S42和S44的引物分别如SEQ ID NO:1-2、SEQ ID NO:3-4、SEQ ID NO:5-6、SEQ ID NO:7-8、SEQ ID NO:9-10、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14、SEQ ID NO:15-16、SEQ ID NO:17-18、SEQ ID NO:19-20、SEQ ID NO:21-22、SEQ ID NO:23-24、SEQ ID NO:25-26、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:29-30和SEQ ID NO:31-32所示。

[0028] 第三方面,本发明提供含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片。

[0029] 第四方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂品种鉴定及选育中的应用。

[0030] 所述应用包括以下步骤:

[0031] 1) 提取待测烟蚜茧蜂的基因组DNA;

[0032] 2) 以提取的DNA为模板,分别利用表1中的每对引物进行PCR扩增;

[0033] 3) 分析PCR扩增产物。

[0034] 步骤2)中使用的PCR扩增体系为:2×Taq PCR MasterMix 5μl,10μM上、下游引物各0.08-0.20μl,DNA模板0.5-1.0μl,ddH<sub>2</sub>O补齐至总体积10μl。

[0035] 优选地,扩增体系为:2×Taq PCR MasterMix 5μl,10μM上、下游引物各0.16μl,DNA模板0.5μl,ddH<sub>2</sub>O补齐至总体积10μl。

[0036] PCR反应程序为:94℃2min;94℃30s,54-58℃45s,72℃30-45s,30-36个循环;72℃7min。

[0037] 优选地,PCR反应程序为:94℃2min;94℃30s,56℃45s,72℃45s,35个循环;72℃7min。

[0038] 进一步地,对微卫星引物进行荧光染料(任选其一FAM、HEX、ROX)标记,将荧光染料标记加在上游引物5'端,合成荧光引物。PCR产物进行毛细管电泳荧光检测。

[0039] 第五方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂分子标记辅助育种中的应用。

[0040] 第六方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂群体结构、遗传多样性分析或亲缘关系鉴定中的应用。

[0041] 第七方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在构建烟蚜茧蜂DNA指纹图谱中的应用。

[0042] 第八方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂大规模释放遗传学评估中的应用。

[0043] 第九方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂大规模繁殖选育亲本中的应用。

[0044] 第十方面,本发明提供所述SSR标记、扩增所述SSR标记的引物、或者含有所述引物的检测试剂、试剂盒或芯片在烟蚜茧蜂遗传背景分类中的应用。

[0045] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0046] (一) 本发明提供一组用于烟蚜茧蜂多样性分析的微卫星引物,从来自不同地区的烟蚜茧蜂样本中提取DNA,筛选微卫星位点,从而设计引物。该组引物具有PCR扩增结果稳定,多态性高等优点,可用于烟蚜茧蜂多样性及群体遗传结构的分析,具有很好的应用价值。

[0047] (二) 采用本发明提供的微卫星标记及其引物进行烟蚜茧蜂亲本选育、遗传背景等分析,准确度高、成本低。

[0048] (三) 本发明首次对烟蚜茧蜂进行分子标记开发,目前对烟蚜茧蜂种群遗传分析尚未有研究,该物种的微卫星引物及序列也尚未报道。因此本发明提供的烟蚜茧蜂微卫星引物可以为进一步开展该物种的遗传分析提供理论依据。

[0049] (四) 本发明所用烟蚜茧蜂微卫星位点等位基因数目较多,多态性高,而且片段大小间隔得当,介于100-350bp之间,可以根据扩增片段大小和荧光标记的颜色不同混合上样检测,提高检测效率,实现高通量分型,同时节约时间和成本。

## 具体实施方式

[0050] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, Molecular Cloning:a Laboratory Manual,2001),或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0051] 实施例1烟蚜茧蜂SSR标记及其引物的获得

[0052] 本发明选择21条微卫星特异性引物合成,进行筛选。经过有效性、多态性检验,最终获得16条特异性微卫星引物。其中位点S6多态性偏低,位点S12,S20,S29,S35偏离哈迪温伯格平衡,这对后续烟蚜茧蜂种群遗传分析带来偏差,会对结果产生一定的影响。

[0053] 1、烟蚜茧蜂材料来源

[0054] 烟蚜茧蜂初步有效性引物筛选,采用8个来自不同地区且具有代表性的样本,分别是贵州毕节黔西繁蜂工厂,云南红河州弥勒东风农场,贵州毕节黔西林泉镇,黑龙江牡丹江市宁安市宁安镇张家村繁蜂工厂,广东梅州市五华县河东镇,山东泰安农大南校区,浙江嘉兴桐乡乌镇镇东潘,浙江绍兴嵊州东茗乡。微卫星引物进行有效性检测之后,用于多态性检验。烟蚜茧蜂多态性引物筛选,用24个样本,来自山东泰安农大南校区。

[0055] 2、烟蚜茧蜂基因组DNA提取

[0056] 将烟蚜茧蜂雌成蜂单头样本置于2ml研磨管中,加入一大一小研磨珠,使用研磨仪(上海净信实业发展有限公司,Tissuelyser-32),参数为60Hz,80s,进行研磨。使用上海天根血液/细胞/组织/基因组DNA提取试剂盒(DP304)进行DNA提取。

[0057] 3、微卫星引物在烟蚜茧蜂群体中扩增

[0058] 对微卫星引物进行荧光染料(任选一个FAM、HEX、ROX)标记,将荧光染料标记加在上游引物5'端,合成荧光引物。

[0059] PCR反应体系(反应体系10 $\mu$ l)如下:

[0060]

成分	体积( $\mu$ l)
2 $\times$ Taq PCR MasterMix	5
上游引物(10 $\mu$ mol/L)	0.16

下游引物 (10 $\mu$ mol/L)	0.16
模板	0.5-1.0
ddH <sub>2</sub> O	补足至10 $\mu$ l

[0061] PCR反应程序如下：

预变性	35 个循环			最后延伸
	变性	退火	延伸	
94℃	94℃	56℃	72℃	72℃
2 min	30 s	45 s	45 s	7 min

[0063] PCR产物进行毛细管电泳荧光检测。

[0064] 用GeneMapper 3.2进行数据条带分析。用FreeNA软件分析位点的无效等位基因频率。用软件GenAlEx 6.502分析,获得引物的期望杂合度 (He),观测杂合度 (Ho),等位基因数 (N),哈迪-温伯格平衡检验 (HWE),多态性信息含量 (PIC) 等遗传多样性参数。

[0065] 4、烟蚜茧蜂微卫星扩增结果

[0066] 微卫星引物有效性的验证,不同地区的8个烟蚜茧蜂样本的PCR产物,经毛细管荧光检测,条带分析能够获得有效数据 (有扩增条带,且片段大小在有效范围内)。有效的微卫星引物,使用24个个体进行多态性分析。

[0067] 微卫星引物多态性的分析

[0068] 微卫星位点S12,S20,S29,S35偏离哈迪-温伯格平衡。多态性信息含量 (PIC) 是衡量位点变异程度的指标,其中有12个位点的PIC大于0.5,属于高多态位点,S6的PIC小于0.25,属于低多态性位点。综上所述,至少16个位点 (S1,S3,S5,S8,S10,S13,S15,S18,S30,S36,S38,S39,S40,S41,S42,S44),可以用于烟蚜茧蜂品种选育、大规模释放遗传评估,也可以用于后续的烟蚜茧蜂遗传多样性分析 (表2)。

[0069] 表2微卫星位点遗传多样性信息



	locus	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	HWE	Null Allele Frequencies	PIC
[0070]	S1	4	0.6516	0.619	0.151	0.0449	0.5666
	S3	4	0.5936	0.5294	0.173	0.0235	0.5197
	S5	6	0.7621	0.5	0.061	0.1365	0.6946
	S6	2	0.0455	0.0455	0.913	0.0000	0.0434
	S8	4	0.5603	0.45	0.804	0.0493	0.4439
	S10	4	0.3476	0.3889	0.984	0.0000	0.3208
	S12	7	0.7937	0.8947	0.005	0.0000	0.7423
	S13	2	0.3044	0.2727	0.696	0.0266	0.2533
	S15	5	0.7476	0.7778	0.149	0.0000	0.6765
	S18	5	0.6205	0.6364	0.894	0.0000	0.5477
	S20	5	0.6643	0.3684	0.000	0.1654	0.5862
	S29	5	0.6302	0.2632	0.000	0.2256	0.551
	S30	6	0.7085	0.8095	0.896	0.0000	0.6507
	S35	4	0.346	0.1111	0.003	0.1891	0.3173
	S36	3	0.522	0.3684	0.372	0.0850	0.4032
	S38	7	0.8079	0.6667	0.693	0.0634	0.7512
	S39	8	0.7766	0.6667	0.942	0.0550	0.7266
	S40	5	0.6984	0.6667	0.778	0.0000	0.6219
[0071]	S41	4	0.4492	0.3333	0.133	0.0407	0.393
	S42	3	0.4964	0.4211	0.791	0.0404	0.3893
	S44	3	0.4218	0.35	0.788	0.0480	0.3448

[0072] 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,可以对之做一些修改或改进,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围。

## 序列表

<110> 中国农业大学

云南省烟草公司玉溪市公司

<120> 烟蚜茧蜂SSR标记及其应用

<130> KHP201110011.7

<160> 32

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

aggcatgaat acagtgaatc aaca 24

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

tgtctgagct ttcacatcc aa 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

acgtgataat ttcttgagcc gg 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

taccacgcca cctggattag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gccaggcat catcgtcgta 20

<210> 6

<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 6  
acacgaccgg ttgttcattg 20  
<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 7  
ctctcagatg gtggtgctga 20  
<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 8  
ggcagacgaa ctcccagaat 20  
<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 9  
gtatatccgg cgggcgtt 18  
<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 10  
gaagatcgat ccggcattcg 20  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 11  
acctgaatga gcaccaccat 20  
<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 12  
ggaccaccaa tgaataatat ggca 24  
<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 13  
catcttgtcg tggaacaggc 20  
<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 14  
tccgttcgtc caatgggtaa 20  
<210> 15  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 15  
tctgcttgac tatcagcacc a 21  
<210> 16  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 16  
tgggtacaag agtaactcgt tca 23  
<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 17  
ttgacgagtt cttcagttgg c 21  
<210> 18  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 18  
gttgctatca agatggtttg ggt 23  
<210> 19

<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 19  
acgcttgagt gataaatctg gg 22  
<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 20  
ggctggacct gtttcacttt 20  
<210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 21  
ggcatcatca acatcatcac ca 22  
<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 22  
gctgggaaat ataacaccac ga 22  
<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 23  
cgacagacgt gacaactgaa 20  
<210> 24  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 24  
acatttcttg aagatggtgt tggt 24  
<210> 25  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 25  
agtgttgatc gttcattgtg gg 22  
<210> 26  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 26  
acgtggttga taatcaagtg ct 22  
<210> 27  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 27  
aaacatctgt ttctggcgac a 21  
<210> 28  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 28  
aatttaagtg aagcaaaggg tggt 24  
<210> 29  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 29  
tcgtgttgat ttgagtggat taga 24  
<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 30  
tcctctgtgc tgtcttgtgg 20  
<210> 31  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 31  
tcatcgttta ccatcatcag gt 22  
<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 32

tgcactcatt tcaccaagtg a 21