



(21) 申请号 202410685845.2

(22) 申请日 2024.05.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118853928 A

(43) 申请公布日 2024.10.29

(73) 专利权人 上海市农业科学院
地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号
专利权人 江汉大学

(72) 发明人 王瑞娟 彭海 陆欢 李甜甜
尚晓冬 方治伟 刘建雨 周俊飞
徐珍 谭琦

(74) 专利代理机构 南京灿烂知识产权代理有限公司 32356
专利代理师 王江南

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 118516490 A, 2024.08.20

审查员 李红卫

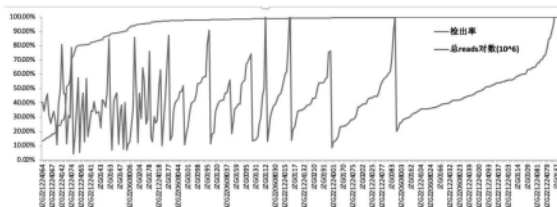
权利要求书1页 说明书15页 附图3页

(54) 发明名称

一种金针菇品种的MNP标记鉴定方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种金针菇品种的MNP标记鉴定方法及其应用,通过实测319株金针菇菌株的数据,确定350个位点的标记用于金针菇品种鉴定。每个标记位点的测序500次以上,精确到单个碱基,结果高度精准,准确率达99.98%以上,实现精准数字化,突破信息化、自动化、智能化、网络化、区块链等现代种业治理的基础性技术难题。



1. 一种金针菇品种的MNP标记鉴定方法,其特征在于:采用SEQ ID NO:1~700所示的350对MNP标记引物对各待鉴定金针菇品种进行PCR扩增并测序;当两个待鉴定金针菇品种之间遗传相似度GS大于或等于92%但小于96%,则判定为待鉴定品种之间为实质性派生品种;当待鉴定金针菇品种之间遗传相似度GS大于或等于96%,则判定为待鉴定品种之间为同一品种。

2. 根据权利要求1所述的金针菇品种的MNP标记鉴定方法,其特征在于:遗传相似度 $GS = n/N \times 100\%$,其中,N为采用所述MNP标记引物对两个待鉴定金针菇品种共同扩增出的MNP位点个数,n为两个待鉴定金针菇品种共同扩增出的MNP位点中基因型完全相同的MNP位点个数。

3. 根据权利要求1或2所述的金针菇品种的MNP标记鉴定方法,其特征在于:所述鉴定方法由以下步骤组成,

- (1) 提取待测金针菇品种的DNA;
- (2) 采用所述的350对MNP标记引物进行PCR扩增;
- (3) 对PCR扩增产物进行纯化、测序;
- (4) 对测序结果进行遗传相似度分析。

4. 根据权利要求3所述的金针菇品种的MNP标记鉴定方法,其特征在于:当某一待鉴定金针菇品种中检出MNP标记位点的比例大于或等于95%时,判定该测序数据合格。

5. 根据权利要求4所述的金针菇品种的MNP标记鉴定方法,其特征在于:当某一待鉴定金针菇品种中检出MNP标记位点的比例小于95%时,若两次重复实验检出MNP标记位点的重现率大于或等于95%时,判定该测序数据合格。

6. 根据权利要求1所述的方法在金针菇品种鉴定中的应用。

7. 根据权利要求1所述的方法在鉴定待测金针菇品种是否为同一品种中的应用。

8. 根据权利要求1所述的方法在鉴定待测金针菇品种是否为同一实质性派生品种中的应用。

一种金针菇品种的MNP标记鉴定方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术技术领域,具体涉及一种金针菇品种的MNP标记鉴定方法及其应用。

背景技术

[0002] 金针菇是最早实现工厂化生产的食用菌品种,近年工厂化栽培方式的快速发展使得其产量实现跳跃式的增长,居食用菌工厂化栽培品种之首。工厂化金针菇成为目前工业化水平最高、市场竞争最激烈的品种之一。

[0003] 组织(基质)分离是食用菌产业广泛采用的获得菌株的方式,由此在生产上造成大量“同物异名”(同一菌株不同名称)现象,造成了生产用种的混淆,育种者的权益也难以保障。

[0004] 实质性派生品种是指由原始品种实质性派生,或者由该原始品种的实质性派生品种派生出来的品种,与原始品种有明显区别,并且除派生引起的性状差异外,在表达由原始品种基因型或者基因型组合产生的基本性状与原始品种相同,判别实质性派生品种成为金针菇种业健康发展的关键点之一。

发明内容

[0005] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。

[0006] 作为本发明其中一个方面,本发明提供一种金针菇品种的MNP标记鉴定方法,其中:采用SEQ ID NO:1~700所示的350对MNP标记引物对各待鉴定金针菇品种进行PCR扩增并测序;当两个待鉴定金针菇品种之间遗传相似度GS大于或等于92%但小于96%,则判定为待鉴定品种之间疑似为实质性派生品种;当待鉴定金针菇品种之间遗传相似度GS大于或等于96%,则判定为待鉴定品种之间疑似为同一品种。

[0007] 作为本发明所述的金针菇品种的MNP标记鉴定方法的一种优选方案:遗传相似度 $GS = n/N \times 100\%$,其中,N为采用所述MNP标记引物对两个待鉴定金针菇品种共同扩增出的MNP位点个数,n为两个待鉴定金针菇品种共同扩增出的MNP位点中基因型完全相同的MNP位点个数。

[0008] 作为本发明所述的金针菇品种的MNP标记鉴定方法的一种优选方案:所述鉴定方法由以下步骤组成,

[0009] (1)提取待测金针菇品种的DNA;

[0010] (2)采用所述的350对MNP标记引物进行PCR扩增;

[0011] (3)对PCR扩增产物进行纯化、测序;

[0012] (4)对测序结果进行遗传相似度分析。

[0013] 作为本发明所述的金针菇品种的M N P标记鉴定方法的一种优选方案:当某一待鉴定金针菇品种中检出M N P标记位点的比例大于或等于95%时,判定该测序数据合格。

[0014] 作为本发明所述的金针菇品种的M N P标记鉴定方法的一种优选方案:当某一待鉴定金针菇品种中检出M N P标记位点的比例小于95%时,若两次重复实验检出M N P标记位点的重现率大于或等于95%时,判定该测序数据合格。

[0015] 本发明还提供所述的方法在金针菇品种鉴定中的应用。

[0016] 本发明还提供所述的方法在鉴定待测金针菇品种是否为同一品种中的应用。

[0017] 本发明还提供所述的方法在鉴定待测金针菇品种是否为同一实质性派生品种中的应用。

[0018] 本发明的有益效果:本发明针对金针菇品种鉴定的实际需求和难点,选取21株白色菌株、9株黄色菌株进行重测序,根据多态性高、引物区保守、单拷贝、退火温度一致、分布均匀等原则,开发了530个位点的MNP标记。通过实测319株金针菇菌株的数据,确定350个位点的标记用于金针菇品种鉴定。每个标记位点的测序500次以上,精确到单个碱基,结果高度精准,准确率达99.98%以上,实现精准数字化,突破信息化、自动化、智能化、网络化、区块链等现代种业治理的基础性技术难题。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,其中:

[0020] 图1为319个样品中金针菇MNP标记的检出率和分布序片段数量图。

[0021] 图2为M N P结果聚类图。

[0022] 图350721对金针菇样品间M N P标记位点差异分布。

[0023] 图4为样品JZG01和样品JZG02的DNA电泳图。

[0024] 图5为样品JZG01和样品JZG02的高通量测序文库电泳图。

具体实施方式

[0025] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0026] 1. 金针菇标记位点的开发及筛选

[0027] 为设计M N P标记引物,我们从金针菇授权品种与野生菌株库中,选择了9个黄色品种和21个白色菌株,对每个菌株均进行基因组重测序,测序深度设置为50倍。通过与金针菇参考基因组进行比对,筛选出SN P位点。根据扩增区多态性高、引物区保守、扩增区单拷贝、扩增长度不超过250bp、扩增区包含2个及以上的不连续的S N P标记、引物退火温度保持一致、分布均匀、标记序列和引物序列之间相互不干扰等标记筛选与引物设计原则,共筛选得到530个MNP标记位点,并设计引物进行实测。通过实测319株金针菇菌株的数据,确定350个位点的核心标记用于金针菇品种及实质性派生品种的鉴定,引物序列见表1。

[0028] 表1金针菇M N P标记引物序列

[0029]

位点编号	染色体	SEQ ID NO:	正向引物(5->3)	反向引物(5->3)
AMPL1690001	scaffold3	1-2	cgcaatttctgattccgaagcttc	ttttgttctctcccaccatctttg
AMPL1690002	scaffold5	3-4	cagctgtattccgaatgccatg	atgatgaattcgttaaagcttccg
AMPL1690003	scaffold5	5-6	cattgctagagacgctccatttag	gccgtaccgttctaataaagatgtg
AMPL1690004	scaffold5	7-8	acataccaggactcataaactgctt	atttctagcggacatttctaccaga
AMPL1690005	scaffold6	9-10	cattggatctaggcgcatttactg	gatgtgtcggtaataagggtcagg
AMPL1690007	scaffold7	11-12	taatcatggagttcgcgttaacatg	gatcaaggcgtcgaatacaatgaac
AMPL1690008	scaffold1	13-14	cgcctctaacaagtacgtttcatt	tttgaagataggccaggacatctt
AMPL1690009	scaffold11	15-16	gcgaagagtaccgttggatca	ctaaaccggctcatctcttctt
AMPL1690010	scaffold3	17-18	gttatcgtgtcacatcggttaagat	agcgtaggttgtgtggtgagc
AMPL1690011	scaffold3	19-20	ttgatccaggaaatgtcaaaaacgt	tatctgtccatcaactgtcagtacg
AMPL1690012	scaffold3	21-22	gcaagccaagaaatccaaaacg	ccttcttggattttggggaagattc
AMPL1690013	scaffold5	23-24	cggattgatatcgcgaatgtcttc	ttctacaccaatgacctatgtgtcc
AMPL1690015	scaffold6	25-26	gtcacttatcctcacctacctgatt	caccatcaacctcatcttcaacaa
AMPL1690016	scaffold7	27-28	cccatactcactattcgttctctca	tgggtccaggtaaagtcttcttga
AMPL1690017	scaffold2	29-30	gagacgcatttgagcaccttttag	aatatctaaggaaacgaggagacg
AMPL1690018	scaffold7	31-32	aagggaagatcattatagagcgacgg	gttggagtactagatcccgatgttg
AMPL1690019	scaffold1	33-34	cactacttaacgaacatacgaagcc	gcattcacttcttctatcgttga
AMPL1690020	scaffold1	35-36	cctctcttacttttaaacgatccgc	cgcataacatcatacttttctgtgt
AMPL1690022	scaffold1	37-38	gatcttctcaagaaccagtcctacc	gatgagagaggctgcttggtc
AMPL1690025	scaffold2	39-40	cattggttcgattctgttcttacc	tcgcaaggatagtttaccacata
AMPL1690026	scaffold3	41-42	gtaaacattgaggctatcataccgc	gggtatatcattcgctagatgcaga
AMPL1690027	scaffold3	43-44	taaagaagtactgaggctgacgac	aatcagcttgttggattcggtaag

[0030]

AMPL1690028	scaffold3	45-46	ggaattgctcttctacaggatttt	tgaacgtgtatatgggctatgtgta
AMPL1690029	scaffold3	47-48	ttgttgactttctccagttccattg	gaaacatctcttcaaatggccagg
AMPL1690030	scaffold3	49-50	aactttgatgtgtagcttattcgt	ctttaacagccgcttcgctac
AMPL1690031	scaffold6	51-52	cctctgtcatccttcagaagatga	aactccaggcttgacaaatccc
AMPL1690032	scaffold6	53-54	acaaaagtgaatacagcatccaaca	ctatctctgggctgctatggtgat
AMPL1690033	scaffold6	55-56	attgtaaatagttgaagtgcgcct	cactgacagctctcaagattgaatt
AMPL1690034	scaffold7	57-58	tctcaacgatataatcttcccaca	gtcctgagacttctacgagtac
AMPL1690035	scaffold7	59-60	taaaactaggctcttctcttctat	atttagtagtggtaaagcgcgaaa
AMPL1690036	scaffold8	61-62	gtcaatcatgaagtggctgaagtg	agaataacctggacaagaaagctgtc
AMPL1690038	scaffold1	63-64	tatgacaggatgcaaaggaggtaat	tgggtttcatcaccaaagtittcaa
AMPL1690039	scaffold3	65-66	atcctagataaatgtctccagtgc	tgttatccatctgcctcctcatcat
AMPL1690040	scaffold3	67-68	ggattgtttccattgtttggct	ctcttggctgctgtcctgac
AMPL1690041	scaffold4	69-70	aagagggaaggaacacgcgtgg	ccatttctgaccaagcaagaacag
AMPL1690042	scaffold4	71-72	tatcaactccaaagaatattgcgcc	ggctggattggatatgattttctgg
AMPL1690043	scaffold6	73-74	cactccagcttcttattcacatc	aataatggcgaggagtttgtgaatg
AMPL1690044	scaffold6	75-76	gcacaataagagctttcgtatgta	tattgtctctgctcatttccga
AMPL1690045	scaffold6	77-78	tcccaaggatacgtatataccgtg	atagtaactcacataccgagcagag
AMPL1690047	scaffold7	79-80	aagggaatacatataataccgcca	gacggaccatacaatgtgtgtaaat
AMPL1690048	scaffold3	81-82	ctagtgcagaaggttcgaagagtaa	ctgggtgggaagaaggaattttatcg
AMPL1690049	scaffold3	83-84	gaaatagacactgccgtcaacttc	tcgataagcaagttggtctccaa
AMPL1690050	scaffold3	85-86	gtattttgctatagctgaagggcc	cgatcctaatacggaccaaatgatg
AMPL1690051	scaffold3	87-88	gaatagttgagcacatgagcatgag	tatcactatcgtcttcggactgtc
AMPL1690052	scaffold3	89-90	tcctacgtctgttatagtttatgt	ccaatgacggtactatgattcatgc
AMPL1690053	scaffold4	91-92	caaaatgtctgttacgctcagtc	tttttagctctgctccttgaattc
AMPL1690054	scaffold6	93-94	ctcacaatccgacgtcgttttag	gataacctcccaacgtctctc
AMPL1690055	scaffold6	95-96	atgatctacgggtgtctacgaaaca	ggaaagtcgtccaactgaaggtatc
AMPL1690056	scaffold7	97-98	gcgtcgttgatcctcttataagttg	tgaacgttgagctgtagagtaaa
AMPL1690057	scaffold7	99-100	gactccatacctatctccttcgac	tcatacacaatgcatacctatggt
AMPL1690058	scaffold7	101-102	aatgcgaaggcgtaaatgaatc	acagcgtcttctcaatttctcatt
AMPL1690059	scaffold7	103-104	gttacttttggtcagctcagaact	ctacgagttgagagaagatggaacg
AMPL1690060	scaffold1	105-106	tctactttggaggaatgaagaacc	tacatttgttgagagcgagaagaga
AMPL1690062	scaffold3	107-108	ctttctttgttgaggacatcacagg	actcacttaataccttaggatgtgga
AMPL1690063	scaffold3	109-110	ggcgcgtactctttctcaataggat	cttagccatctcctcagcctttt
AMPL1690064	scaffold3	111-112	ctgtctaacgggtgttgactcaaat	cagaccacagctcgtatgtataga
AMPL1690065	scaffold3	113-114	tagtcatttctgctgacctgtgt	tacttcatgcataatctgaggggtc
AMPL1690066	scaffold3	115-116	gagaaggagagagatcgagaagg	aaactgtagtcttatgaatgcctcg
AMPL1690067	scaffold3	117-118	atccatatctacacaacaaccca	cgagattacagctcctcacttctaa
AMPL1690068	scaffold4	119-120	gataatacgtacaggatcgtgcacg	aagctacgaacaaaaagaacaggt
AMPL1690069	scaffold6	121-122	ctttggctgctgcaatagaatcata	caacaaaaatctgccgaagaaagg
AMPL1690070	scaffold6	123-124	catgaccacgttccgggatg	cgagatggccaatatcaagattgta
AMPL1690071	scaffold7	125-126	gtaacgatatacagtggttttcca	cttctactcgtccgaacagtta
AMPL1690072	scaffold7	127-128	gggtggaagacggagacaagattc	tgtctttctcaagtattcaagcaca
AMPL1690073	scaffold8	129-130	cattgacaggaacagcaacacc	gagaaaaagtctatgaaccagccc
AMPL1690074	scaffold10	131-132	cacgatgaagactagacgactgag	catctttccacgtagcagcg
AMPL1690075	scaffold19	133-134	caagttggacctgtcgggaaatac	tcccgctcctcctctcaaaag

[0031]

AMPL1690076	scaffold2	135-136	gaaccatttgcaggcaggtc	aagaaaattcttccgtctcacc
AMPL1690077	scaffold3	137-138	agaagaaaggaccaaggaaatgacta	tcgatagtcagtggaatacgtttt
AMPL1690079	scaffold3	139-140	tctgttgcaaaagagattcagttgtc	tctttgctgccgtagacatatatgt
AMPL1690080	scaffold3	141-142	ctatggtagctcgaacactatcgtc	ataactgacgatactcccatgtgag
AMPL1690081	scaffold3	143-144	gtaggattggacgaagaagacatga	catgaaacacataccaagtgggaat
AMPL1690082	scaffold3	145-146	gatttgcctaactttacaagcgggc	tatgttacagtgacgttgtgggg
AMPL1690083	scaffold3	147-148	gggtgtacaaaataccggcttaga	tattaattaacgcgtcacactgtcg
AMPL1690084	scaffold3	149-150	ggtagcagatgtttagaagacactg	cgacgttccctgtcttttctaate
AMPL1690085	scaffold3	151-152	cattctttgcgagcaaacataatg	atactcttatttcccttgaagcc
AMPL1690086	scaffold6	153-154	tttggtatgtatcggtcaagaac	gttacattgaggcattagcgggaag
AMPL1690087	scaffold6	155-156	gttcccgacacagatggagtag	atcgttactgaggaaacgaggtc
AMPL1690088	scaffold6	157-158	tatgcataatggctctggttatcact	ccacgctctatgataactttgactg
AMPL1690089	scaffold6	159-160	gatctagaatgagcaaaagtggagc	gagttgagcactcgggtttctt
AMPL1690090	scaffold6	161-162	taaatcactcgattctcggattcgt	gtcttcgagtcctcatcgaagag
AMPL1690091	scaffold6	163-164	tgtacaacttaacatcggacactct	cgacctatataattacacagcgcg
AMPL1690092	scaffold6	165-166	ctcagatttaattcctcatgcacgg	ttcttgataggtccggattgatgg
AMPL1690093	scaffold7	167-168	aaaaatttgccttcgcacctccatc	tagaagcagactggcataacctcat
AMPL1690094	scaffold7	169-170	agaatatatagaggatcggaggaggt	atgacgatggcagagatacaaaaac
AMPL1690095	scaffold7	171-172	atcggttggtgaatgtctcggtat	atcatatgaagggttggtccatgat
AMPL1690096	scaffold2	173-174	gaaaccacattcttgatgcctgaat	attaatcacatgctcctgagatcga
AMPL1690097	scaffold3	175-176	gcgtaacaagttgataggcaatctt	gccacactgtgaaaacattgttag
AMPL1690098	scaffold3	177-178	tttacgctccttcgcacc	tacgtccttgatgtataccgttacc
AMPL1690099	scaffold3	179-180	tcaagaagaagaaccattgccttc	cacaagggtatgtggatgaatattct
AMPL1690100	scaffold3	181-182	ccaatcctcatcgatccatttgaag	tcgcaagactagagaggtattttcg
AMPL1690101	scaffold3	183-184	acagtataacattcagcactcgtga	ccgggatattcaaaaactagcaciaa
AMPL1690102	scaffold3	185-186	gaggatcctgctacgcttcttc	cagactcgccttaaaaccttcagaa
AMPL1690103	scaffold3	187-188	gtatgcattttcgaagccattgac	gaccgcgaaggagaagtataaaat
AMPL1690104	scaffold3	189-190	tatgtcttgctcggaaactgtgtga	tggagtgtaggcgattgtagatc
AMPL1690105	scaffold3	191-192	gttcgagatacgttcattgcctatt	gataccgaccaagagcattgaca
AMPL1690106	scaffold6	193-194	attcatcacgaagaacacgaaaaca	gggtgaaaggatgttacattgaggg
AMPL1690107	scaffold6	195-196	cgtttggaagagattctgcgtg	gtaggaaattcaaactgaggctgaag
AMPL1690108	scaffold6	197-198	ctctcgacgaagaacaggaagatat	agttcgacaaatctgtattacatgc
AMPL1690109	scaffold6	199-200	tagactgttctcagacataggtcct	tttatcgctgttgatagacctagt
AMPL1690110	scaffold7	201-202	catgatggtgtagaaagcaagag	gtaaagttcgcgatacacgttcaag
AMPL1690111	scaffold7	203-204	acggagaagatacatcatcactctg	aagaaataacacgtgggtaaagggtg
AMPL1690112	scaffold7	205-206	gtaataatcaacgtcggcgcaaatc	agtttccgtcttgtataacacat
AMPL1690113	scaffold7	207-208	atgttagaacagctattcaaggcg	gagactgaattcccacctgaacc
AMPL1690114	scaffold7	209-210	cgaacacatgatatgcacgtaga	gcagtcgcatctcatcattacta
AMPL1690115	scaffold7	211-212	cctttcttgccttcgagaactctt	gttccgaagatcccaattcaaat
AMPL1690116	scaffold8	213-214	cccagtacatcaaacagaaaatca	cctcagattatgttgcgtattgtt
AMPL1690117	scaffold8	215-216	tggacctgtcaatcctaataatcaat	tttgtctgttctacagctctgc
AMPL1690118	scaffold8	217-218	agaaaaccaagtcacgaaatggc	atgtggcgcaacaattatatcacat
AMPL1690119	scaffold8	219-220	caagatggcatcttcttgggaa	gatgaatggagaagccgtatgtac
AMPL1690120	scaffold5	221-222	aactcatctacttagcttcgcacaa	gtagctcgaagaagagtgtaac
AMPL1690121	scaffold7	223-224	gaacttgaagtcgatgctcaaatg	tatatcatctcaactatgccctgg

[0032]

AMPL1690123	scaffold15	225-226	tggtctatcccggtatcttactc	atccaacgaatgtagaaagcagaat
AMPL1690124	scaffold2	227-228	tattcccttctcttcacaaaagat	gacctaggcaaaaatgacaaggaaa
AMPL1690125	scaffold2	229-230	cttgaactacgacttttcagcctac	acitggaaacagttcgtgataaaac
AMPL1690126	scaffold3	231-232	gcagatcagtcagtagatctccaag	ttgtttgatggactagtctgttgaa
AMPL1690127	scaffold3	233-234	ccgtcaactcaacaccttattctt	ttttagctacgcccaattccaaat
AMPL1690128	scaffold3	235-236	acagttacagtgtagtgaaggaaacga	aatagtggtcagttgttttgcctgg
AMPL1690129	scaffold3	237-238	cttcgcttacaccgaggcttcac	ctaggaggaggaggaatgagacg
AMPL1690130	scaffold3	239-240	tagtggttaagtagaaaggagagga	tcctaacagtgagtcattctgtgag
AMPL1690131	scaffold4	241-242	gcctaccaatattttacgctgtctc	tattctaggaaacgcgtacgaglac
AMPL1690132	scaffold6	243-244	atatgagagtcgaattgtccaggt	cagaatgccacgcactatattcat
AMPL1690133	scaffold6	245-246	gatgtgataagggaagaacagtg	ttggtggcaataatgtgagctaaag
AMPL1690134	scaffold6	247-248	tcaagtaagtactcacgaccagatg	tcactcagtagtctcttgtatgc
AMPL1690135	scaffold6	249-250	tggtgaaagacaaagggttagatat	gggcatctcaattcgtgaaatgtta
AMPL1690138	scaffold6	241-252	cattacggtgcgtcaaggataag	ttgaccttactgtctactttctcg
AMPL1690139	scaffold7	253-254	taatgtctccctgtctccatcgaat	tgatcagtggtactgttcaagatcg
AMPL1690140	scaffold7	255-256	ctgaatcagctacaagaaacggt	ctatgagtgctgatatcaggctca
AMPL1690141	scaffold8	257-258	cattcccgctactattcagatacgt	tcctgttactctagacttaticgcg
AMPL1690142	scaffold8	259-260	ttttcaacctggagacgaagattga	aacaatacgaatcgataccaagac
AMPL1690143	scaffold8	261-262	aaatccagggcgctgtgttc	tatcacgaatgtccaatccctcttc
AMPL1690144	scaffold8	263-264	tagctcgatgtttgtatggttgat	tatagctcgatcgaatcagctgtc
AMPL1690145	scaffold8	265-266	gattgagtggtcagcagaatcttg	tgtagacagataggacacgaagac
AMPL1690150	scaffold10	267-268	catcaaagaatgcagagtcgtactc	atggtaccaaaaggagacatgaac
AMPL1690151	scaffold2	269-270	cagttctgtcatacacggaatgaa	aactttgcaaatccgtctatcagtc
AMPL1690152	scaffold3	271-272	gacatacacaaaactctacgctctg	gtaatgcaaatggatgatgggaa
AMPL1690154	scaffold6	273-274	cgtcagacacacctggtatatttc	ccaagcggaaacaacaatattcc
AMPL1690155	scaffold6	275-276	gagcgtgattgtagctgtcgatag	gacatacctccagccttgaag
AMPL1690156	scaffold8	277-278	gtataaagcccacagccttctact	aacacgtagacaagatccatatct
AMPL1690157	scaffold1	279-280	aaatggtgcatggcgataaatataa	aatcaaaataactggcgtgcagtac
AMPL1690159	scaffold5	281-282	cttctgcataccccgtactctat	ataactctcaaccacctgtcttc
AMPL1690160	scaffold7	283-284	gcagggatcttgaggatagattcaa	gcccattacatcacggttatcaag
AMPL1690161	scaffold7	285-286	cgttggaaaggaaatatgaagaagg	gagactaattttagcacgtgagtcg
AMPL1690162	scaffold3	287-288	aatacaacggtgtagctacggatt	acctgggatattttacaagtaactgg
AMPL1690164	scaffold12	289-290	gaggatcagcatgggtttgc	aaacaccttcgcattagacaaaaa
AMPL1690168	scaffold5	291-292	cagcatattggcacatacgtagttt	atcgttccaaagttttacgtaggtca
AMPL1690169	scaffold7	293-294	gactgaccttaatctccacctcg	cacatcgtacccaatgtgtacttg
AMPL1690170	scaffold9	295-296	tctatgtcaccaccaacatctactc	caaccatagtagcagaggatacc
AMPL1690172	scaffold4	297-298	tatctctcatcttcacgttcgt	agatggagatgggaagtagctctat
AMPL1690173	scaffold1	299-300	tatatctaacgcctcctagattggc	aaaccacgacctaaatttcgcc
AMPL1690174	scaffold10	301-302	gaacggcaccatcatcttcga	tggcgcgaagacttggagt
AMPL1690175	scaffold6	303-304	gagtcacgacatcatagtaagct	cttgatcagcattgccaactatacg
AMPL1690176	scaffold8	305-306	ttcaggtgatccttggttccaata	gactaggcttctatctgtggaag
AMPL1690178	scaffold6	307-308	gaagtacagcagcataggaacttac	atacattttgaaccgttgcaatcga
AMPL1690180	scaffold1	309-310	ggttttgaagacaatatgaaacccgt	gttttcgaaacgggtatatacagtt
AMPL1690181	scaffold10	311-312	gacttgataccacctgggttagag	ttgaggagcaacaagtgtgtcctt
AMPL1690184	scaffold5	313-314	gacctctcgtactctcacatttat	gcgtctgactacgatgaaatttgta

[0033]

AMPL1690185	scaffold5	315-316	tccataaacctggatgcgaagag	aacaccccaaaacaatgagaaaaa
AMPL1690186	scaffold9	317-318	attcatcaaatgtgacacccttg	taatttcgcaaaagattgtatgcgc
AMPL1690187	scaffold7	319-320	cgatatctggggagggttcgac	aagacttagggcttaatacaccgt
AMPL1690191	scaffold1	321-322	cgattgatagcattggccacataat	tcctgtacgatctgttctcttga
AMPL1690192	scaffold4	323-324	cgctgtgttcttagtacctacacta	catgtaagtatatgtccaacgagg
AMPL1690193	scaffold5	325-326	actcagttcccgtttaccataagaa	tatttggcgacgacgggtata
AMPL1690196	scaffold11	327-328	ctatgccgataatgccaaaaacat	acacagacagatagtactctggaac
AMPL1690199	scaffold8	329-330	ttgagataaaaaagcaaaagccaagt	agaggggcttttatacattcaccat
AMPL1690200	scaffold3	331-332	taagcgacaaagtgtgaggtgtagta	aacaggaagatagcactccctaata
AMPL1690201	scaffold1	333-334	ttccatgcaagtcccatagagtatt	aaagagagaacatagaggaggagg
AMPL1690202	scaffold2	335-336	ggatgatcaatctaacgggatggtt	tccagcatgagcagcatcttate
AMPL1690203	scaffold2	337-338	atacatctgggtggtatccgtcaaaa	ttgacattgctgaagtataccac
AMPL1690204	scaffold1	339-340	ctgtggctacgtctactgaggag	gctgaagaaaatgagctgtgtgata
AMPL1690206	scaffold2	341-342	tggaaatgtataaatcacgagggga	ctggctggctgttaggtatgtaata
AMPL1690207	scaffold5	343-344	agtcagtttcgacgaagtacaaga	atcatgtgactgtgagttcgtcaa
AMPL1690208	scaffold5	345-346	gaacagttcttacatgtcttctgca	gatcttgaagtcgggttaagcg
AMPL1690209	scaffold2	347-348	ccgtggaagatggttgcactataat	tactagctttcacacgtcgaaagt
AMPL1690210	scaffold4	349-350	aattatgttcgttttggagcacct	tccaggctctatatgaacgacg
AMPL1690211	scaffold5	351-352	gaagcgagaggttcttcgagtcaaaa	ctgcttggatctgtttaaatacggc
AMPL1690212	scaffold12	353-354	cgacaagtttacaggaggactatgt	aatcttgggtgtggagtaaggatga
AMPL1690213	scaffold2	355-356	tagaagacttgatcataggcgctac	ttctattaattcaaacgagccgagc
AMPL1690218	scaffold4	357-358	gggtcgtactgtgtctatttgcatt	cagtacaatgcatgtgtcagtag
AMPL1690221	scaffold1	359-360	ttgagagaacactcctcgttaaatc	gatgatggctccctctaagagatg
AMPL1690222	scaffold1	361-362	caatgatgcacatacagtcggtac	gagaacctgttatccgcttctc
AMPL1690223	scaffold1	363-364	ctagctgcagtgatgatatttgg	taggtcggaggactctgtcgc
AMPL1690225	scaffold5	365-366	tagctatggatgaggatctgcaaat	gtgttcataggctggtcgaaattg
AMPL1690227	scaffold8	367-368	ttcaactagatgccaaactttctga	aagttgacggtgtgagcagaatatg
AMPL1690228	scaffold8	369-370	aatcagatgcgaatacacaaggtac	tctcttcgaagttcatctgttgaa
AMPL1690229	scaffold5	371-372	ctcatccaaattccaagatgatgca	agacacaagaaagatgctaacga
AMPL1690230	scaffold1	373-374	gtatcatgtcaaaaggaggtgaacg	ccaatgccatcggtttgtagaata
AMPL1690231	scaffold10	375-376	aagggtcaagatgaaacacagcaaat	attgcttttaggaagctgcctattt
AMPL1690233	scaffold2	377-378	tttgaggacgataggactcctttt	tcaatgtctcagctggtcaatctcat
AMPL1690234	scaffold4	379-380	ctagcaactgtgtagtcgtactagg	tttactatcaaggagttggcaatgg
AMPL1690235	scaffold7	381-382	aaggggaaaatgaagaggatagtgt	cgacactgttctccatcttgtta
AMPL1690238	scaffold8	383-384	tggcagaaaaactatgccaatctt	cgcaacacaacaaggaaatacattc
AMPL1690240	scaffold5	385-386	caacagtcaagttcagtggtagttc	tacttctcattcctgagaccaagg
AMPL1690241	scaffold5	387-388	ggaacaataataacttctgcgggaa	ttcatttataggcgcgacaaaagac
AMPL1690242	scaffold10	389-390	gagaagactatcgacacttcttc	catacctccctctcttcacaagac
AMPL1690243	scaffold1	391-392	agtgtatgcccatctcaatcttta	gtatggatgaaatcgcgagg
AMPL1690244	scaffold11	393-394	ttcctggatagagaaatggcagaat	gtccatgtgtgtatcgggaactct
AMPL1690245	scaffold12	395-396	gggatcatctctataggctcttc	gggtgagcagccagactatgaag
AMPL1690246	scaffold7	397-398	agtgggaatagttgcattggagg	aataatgcggctatagacaaggcta
AMPL1690249	scaffold5	399-400	gaagctaaaggaccttacatcatgc	cactgttactaatgtcatctgcac
AMPL1690250	scaffold8	401-402	attcttgttacgtcgttgaatcga	gagtatcaatcctctctcgcagag
AMPL1690251	scaffold8	403-404	atggtcagaagacgattcatgtaga	tggcagttacaaagactttgacatc

[0034]

AMPL1690252	scaffold8	405-406	atttcgtcaacagaacattggcatc	ttattgagtcggggatcaagag
AMPL1690253	scaffold5	407-408	tggcagggtacatctctaaatcctc	gagacactctatgggcaacaattct
AMPL1690254	scaffold8	409-410	cgtacgtcttcattattggtgactg	ccagattctcgacgttgtccaag
AMPL1690258	scaffold1	411-412	gtctgtaaagcgcttgagattcaaa	aaaacctcatcgttctgtcctttg
AMPL1690259	scaffold4	413-414	gtgtcgtcagatctacactgttcta	ccatgggtcatagataagtagcga
AMPL1690260	scaffold5	415-416	agattcatagctgctaggatgctag	cgtgagaactgctttcatgatctt
AMPL1690262	scaffold1	417-418	gcaatgggtctgtgaacacaatgag	ggacaggtagtagataccgattatcg
AMPL1690263	scaffold11	419-420	tcaaatttttctgcgcacaattg	aacacgactagctatcttacctact
AMPL1690264	scaffold5	421-422	attcagtggcactaacgatacgaa	cctactcgaagcatagtagcgttga
AMPL1690265	scaffold8	423-424	tgtactacttgctacatagacacgg	ctgtccggaattcgtagattttgtc
AMPL1690268	scaffold2	425-426	gtagcgattaatgggagagatggat	gtcttgacatgacagaatcgagg
AMPL1690269	scaffold2	427-428	tgtcgtatttgcaggctctctttt	gtcaacggaatggaggatcctt
AMPL1690270	scaffold4	429-430	gagagccattgcgatattgtatgg	agacgtgtacgatgtgggaattt
AMPL1690272	scaffold8	431-432	gagccctaaaaatccaatcagtcag	gcatgatcctcgtcaagaattctt
AMPL1690273	scaffold8	433-434	gtgggtgggaaatgtcagagaattt	tcatcatgattcacattgaaagccc
AMPL1690274	scaffold1	435-436	attggcataatacatctgatcgtgg	ttcccgttcgaagtagtttgatga
AMPL1690275	scaffold1	437-438	ctggacggatattctgtctatgtgt	gcactaacagaagtcttcccaaa
AMPL1690279	scaffold1	439-440	aacttttgactggcaattgtctgaa	catgtggcctgaacgaacatc
AMPL1690280	scaffold11	441-442	gccgagatgatgaatcattgaatgt	caaatttgagtaccaccagatcacc
AMPL1690282	scaffold1	443-444	ctatgccaccggttatctttgtac	catacagctctcaagggtgttttcg
AMPL1690283	scaffold4	445-446	ggactcgttgacatagagatacat	gatttcacccataggcattgattcg
AMPL1690285	scaffold1	447-448	tcatgattgtagtcaatgaacgca	atgtgttcaacaatgtcgacgaaa
AMPL1690287	scaffold8	449-450	tctggatcctgaaccagacattc	gccatagagcataagggtggtaaatc
AMPL1690288	scaffold1	451-452	atgggcttcatactacgtgattggt	gagaggtgcgtaagtggaacttc
AMPL1690289	scaffold12	453-454	acatcacgataactgactccaagta	ctcgaatggtgtgaccagtatc
AMPL1690290	scaffold14	455-456	gtttaacgacgctgtgtgaagat	ttttgaaggcagagatatactggaa
AMPL1690291	scaffold11	457-458	agaacgcccgatgatgatacaga	tatacatctcagggtgtgtgtgga
AMPL1690292	scaffold11	459-460	acgcattctctcttttcgacatat	gattcggaccatcgacattttac
AMPL1690294	scaffold2	461-462	gccatgggttacattctgatgtatg	gattcccaagagatctacagcatct
AMPL1690297	scaffold1	463-464	gaaagcacgaaggcaatctaattt	tttaaacggtgatgatcccgtaac
AMPL1690298	scaffold10	465-466	gccagaacgagagccattatatgta	cgccgaatagcatgcttatgaac
AMPL1690300	scaffold8	467-468	tgtgcatctgcctacataccattat	acttatagcatggttaacgttgacg
AMPL1690301	scaffold11	469-470	tgtttctctgtactctgtctcta	gcgaatctgaagacaccattatgag
AMPL1690303	scaffold11	471-472	cttagctaaagcaatggccatagtc	cgtccatctatttaaacggtcactg
AMPL1690304	scaffold11	473-474	cgtaggctctgagtaaaaatagga	gttaattttcgggtgtgaagagctc
AMPL1690305	scaffold16	475-476	gcattctagcgttcattacaatccc	ggttcaagacgttgttatctcttc
AMPL1690306	scaffold10	477-478	tatctatcaaatgaggtagggtgcg	tggaaagtcgtctgtgtgtatatt
AMPL1690311	scaffold5	479-480	tcgcatacaatgtccataattgcaa	gtgtattacgatgggtatctgatgt
AMPL1690312	scaffold8	481-482	catagcataggtggataaaatcg	gtcttgaagatggcaaccaatctg
AMPL1690313	scaffold1	483-484	aagtcgtaacgatatattcccgga	gtgagtcgaattcattctccgattc
AMPL1690314	scaffold3	485-486	ttttataggcccttctttacaca	gagggtagacgataatgctgactg
AMPL1690315	scaffold1	487-488	tattttgtcacatttgtccgttc	gcgaatgtacttagcacggaattat
AMPL1690316	scaffold11	489-490	attccctcagggtgatgaagaac	atcaaggactttatgtcccaaggag
AMPL1690317	scaffold12	491-492	cggacatgattttgagttttgtcc	gagcttgcacgcagaggttc
AMPL1690319	scaffold5	493-494	cagtagtaaaagaaaagaccgtcaa	gcttgacgagtcctataacaagt

[0035]

AMPL1690320	scaffold4	495-496	agagtagagtgtatgcgattcc	taaaccatggatctgtagtctg
AMPL1690323	scaffold10	497-498	ccttctcattcgtcaagatacatg	gactacgaggggtgatgcaag
AMPL1690325	scaffold2	499-500	cgtatcagtgatgaccggaattac	cttcaaaactgtgctcgatcgatc
AMPL1690328	scaffold14	501-502	catcgctcagtgaccataacctaaaga	cagcgtcgtatgtatggggaac
AMPL1690329	scaffold1	503-504	gaaatgtccgggaagaactagacat	ctggagaagggtcatattcaggtga
AMPL1690330	scaffold8	505-506	ataaagcccatgttgagtcattgct	gtcgatgaagacaacgttagactttg
AMPL1690331	scaffold8	507-508	cccagagtgctctagttagggagta	cgtattctgaatgaagggtccactc
AMPL1690332	scaffold10	509-510	aagagtcacataagcatacccggaag	gtagccgatgggtcacctggataaac
AMPL1690334	scaffold2	511-512	gttcattcatccgtttatggacatcc	ttcattaggcctacgtcatctcta
AMPL1690335	scaffold4	513-514	taatgaaccaaattggcattgaagct	tattagcatcgtcggtatcctttgt
AMPL1690336	scaffold1	515-516	aacagttgtcagctaccattcttg	aatgggtgtgggtgcaagatcg
AMPL1690339	scaffold2	517-518	tacataggaccaatagcactcagac	gagcttcaagcctacgcga
AMPL1690340	scaffold2	519-520	tcatgggctctgatggatctttt	agggtcagatcgacgagtg
AMPL1690341	scaffold12	521-522	aatccagtatgcaccataaagcaag	accgcttttaccctttttgaatct
AMPL1690342	scaffold18	523-524	agacatgaagattatccgctgtaa	gggtaccatctccatctgtaaaacct
AMPL1690344	scaffold14	525-526	gaagcagacgtaccactatcaa	cttgatgtatgggaccaggtttgtc
AMPL1690349	scaffold12	527-528	agaagaactgacgagtaccacaa	cttgacttccctgggtatcctcac
AMPL1690350	scaffold5	529-530	ctcaaggatgttttgacagctg	gcatttcaattctccatctacgtgt
AMPL1690353	scaffold1	531-532	atcggtagctcaagaaggatagcg	atttccatcatcatttacacaggtg
AMPL1690355	scaffold4	533-534	aacagctatatacctgtaccggaac	cagcgttaggcatatagggtgg
AMPL1690358	scaffold14	535-536	ttgctttgcttacaactcttgctat	aagtagaagggttagcacgtcagtta
AMPL1690359	scaffold2	537-538	tctagttcgaagataccctgtttgg	actaccagatagcgacgatatcaag
AMPL1690362	scaffold5	539-540	cgacaacatggactatcatcctgat	agctgtaaaatacattggggatctt
AMPL1690363	scaffold1	541-542	tctcgatacgatcctcttcaacatg	tccaagtacaaactcgtatttcca
AMPL1690364	scaffold18	543-544	attaactaagtcaatctctgcctgc	aaaagggtatctttaggtgtgctggg
AMPL1690367	scaffold10	545-546	tagctatctgagtcctttcgtcttc	ttgaatgaatcgtcttgaatgggg
AMPL1690368	scaffold11	547-548	gaagaacagtgcacctgttcg	ccctgttattctcttattccatta
AMPL1690369	scaffold4	549-550	gccgcttcaagtagagagtaaagta	cagcagaagaggagaattaccagt
AMPL1690370	scaffold7	551-552	tactacaagacacgcaggatgac	agagaaaacgcagaacatagaaagc
AMPL1690373	scaffold14	553-554	gatgagacgtttactgatttggctt	acagcttagccctaacagctctacaa
AMPL1690375	scaffold1	555-556	gtgtcgaaattgaacatcacgatagg	ctttcgactcgtacttggcttatt
AMPL1690376	scaffold1	557-558	ttgatgtcacctttggatcgaactt	tgatcatgacgattttagcacac
AMPL1690378	scaffold14	559-560	acaataagaatatcttttcggcgaac	ccttgattaccaatacgggaacgaag
AMPL1690380	scaffold2	561-562	acaagactagggcacttcgaaatta	ggcatactcctaactatttcgcaga
AMPL1690390	scaffold2	563-564	cacttgaaccattctacttgaacg	tatgttcatcgagacatcagccc
AMPL1690392	scaffold11	565-566	gatcacacttgctgtcatgttt	attctctcagggtccttctattgc
AMPL1690395	scaffold4	567-568	tttctacgtgaatgttcttatagc	aagaagctttatcgtgtccagagg
AMPL1690396	scaffold12	569-570	ccggataacaaaacctaaccaaca	agcgtttaccctcttttattcttcg
AMPL1690398	scaffold1	571-572	gatgcatttcacgtctctgtagac	tgagaatgggcaaaagagaaagt
AMPL1690400	scaffold5	573-574	cagtggtgtctctacgtctctat	ttttgaagatagggtgtgtggat
AMPL1690401	scaffold1	575-576	tcgcgttctctcttataccaatac	ggaaactaataccggccggttac
AMPL1690403	scaffold4	577-578	aaagcaataatctgtccaacgaaa	ctagtcatagccaacgcttctttg
AMPL1690404	scaffold1	579-580	ctcgccaaacgggttaaacc	gtcaattctctgtataccatggtg
AMPL1690407	scaffold11	581-582	gcgaggtgtatataatgtagacgtga	cggagtatcatagttactgacgct
AMPL1690408	scaffold5	583-584	acgggtatgggtgtacaagaaataga	acatacacaggagagaaatgaacga

[0036]

AMPL1690409	scaffold2	585-586	ttggatttacgattgaagacagcag	gataggcaatttcaccttctcttc
AMPL1690410	scaffold2	587-588	gagcacagacggcgagattatt	caacacagcatcatcgccaag
AMPL1690416	scaffold5	589-590	caagttccagagacgatgcttttag	ctcttactaccaccagacgatg
AMPL1690417	scaffold1	591-592	gcgtgaaaacttgagtaccac	atggctttatgaactcccttgaaa
AMPL1690418	scaffold9	593-594	caaaagctctgggtgatgggaatg	attgttaagccttaaaagtcgcgc
AMPL1690419	scaffold10	595-596	ctcgacgtggtgatgagcc	cccagagtagcgcgacattatg
AMPL1690422	scaffold2	597-598	cttgcgtgtgttgcataaactc	aaattgctaagactgtgcttctacg
AMPL1690423	scaffold15	599-600	ttcaagaccatgctgtaagtgtgc	aatgcacaggatagaggagatagag
AMPL1690424	scaffold2	601-602	cagacaggaaaaacagcaatatgga	gatagccttttcaaaactcgttcgc
AMPL1690425	scaffold4	603-604	caattgtaaagatagttgcgcaagg	cgtcgtataactctggatagtcctc
AMPL1690426	scaffold15	605-606	tagggctacggaaaatgctgtgata	cataaaactcgaatgtctgggaagt
AMPL1690427	scaffold11	607-608	caagtctcaagagctgtacgc	gtcccttgaagatccttaccagaa
AMPL1690428	scaffold4	609-610	atggctgttgagggaagttagaattt	cagggaagatgagtgttacatgat
AMPL1690429	scaffold1	611-612	cccttctgaacactttgagacgaa	catcaagatcgaggaatatagcacg
AMPL1690432	scaffold10	613-614	ggagaaggattcgttgaggataac	aagtagtgagtggaggaatagagc
AMPL1690433	scaffold14	615-616	gactttgaatatgggtgacgagcag	acccaaagagaacaacatacactg
AMPL1690434	scaffold2	617-618	atggttttgtgtagattattgccg	cctagtgaacaccagacaatgagat
AMPL1690438	scaffold11	619-620	ggatctttaatgactgggagacgc	gagccaccaccattcgagaatc
AMPL1690440	scaffold1	621-622	accattgaagaaaagtaaaactcgt	gctcgcattgtagtattatcatagtg
AMPL1690441	scaffold4	623-624	cacctgttgagacaggtagag	gaatgatatactctgacttgcgc
AMPL1690442	scaffold1	625-626	ggagaaaacatttgatcctgctt	gcctgaaattcaacgtggctatat
AMPL1690443	scaffold11	627-628	gatgctgggagtggtgacag	acaactgtgtctacccatttgt
AMPL1690446	scaffold3	629-630	cttgacggcttcttgaatgtgat	caattctatcattaccacaccgaa
AMPL1690447	scaffold1	631-632	tctacagtggcgaactaaatgtaa	cgaaggagctttgtcgtc
AMPL1690452	scaffold2	633-634	tagaagattaggactcggatgcttg	tcaaggccaacgagatcaataactt
AMPL1690457	scaffold5	635-636	cttcttgatgatattgatggcgac	ctcgtgaactctcccaatcgag
AMPL1690460	scaffold1	637-638	ccttgatcatcttgacaaacctgag	cttcttgcgtacgactcgtgtat
AMPL1690462	scaffold4	639-640	gtctttcaggacacgatagca	gattcgtgatagaccatgatacgc
AMPL1690464	scaffold4	641-642	aactcgttgggcatgaagaattcta	ggacgacttctgtgactacatcaa
AMPL1690467	scaffold5	643-644	ttgaagcagtcagagtggtcaag	gacgctagggaactctacagtttg
AMPL1690468	scaffold11	645-646	ttgatttctggtgcatccttatgg	cagcggaaatgtcttatcaacgaaat
AMPL1690469	scaffold12	647-648	acaacatacagagacaagaggaa	gcacgaagataatcagaggtaggat
AMPL1690472	scaffold12	649-650	ctcttcgtcgtcgtcatcatc	atctcaaatatcggatagactcgc
AMPL1690473	scaffold12	651-652	ttagcatgcatacaaagcatggtag	aaattctgagttcgagcttctctgg
AMPL1690474	scaffold10	653-654	ttcttctcttggtagacctgtatt	acttctgactacaacgtatagtcgat
AMPL1690475	scaffold4	655-656	ttgctatgcactgtaattgtaggc	gcattctccaaattataccagtct
AMPL1690476	scaffold5	657-658	cgaagcagagataatgaacttggg	tccagattgctcacaatactacat
AMPL1690477	scaffold4	659-660	catgtcatcctcctcgtgcaag	cgtaattgtcggacgtgtgtg
AMPL1690478	scaffold5	661-662	gagacgggtttatgtagaaggaaga	gaatattagctggcgtctgaaagtg
AMPL1690479	scaffold1	663-664	ggtaaggtggaagagaaagactta	gaggctaccatcagtttccagaatg
AMPL1690480	scaffold1	665-666	gcacatgatctgagcgtctatttc	ggatgttgccttctcctgttatac
AMPL1690483	scaffold1	667-668	gctgagacaagttcgtcgtga	aggacaacctcagacaacgac
AMPL1690485	scaffold5	669-670	catcactattcaactttcactgcc	ctggaaggctctgtagatcattcat
AMPL1690487	scaffold4	671-672	atgattgtgatcgacctatgacta	tcattcctgaacactgattaccatt
AMPL1690488	scaffold4	673-674	ggggtaaggagtatatcatgaccc	aatatcagaggaaaagcagccgatc

[0037]

AMPL1690492	scaffold11	675-676	gcctcaaaatttctgttctgactt	gtcaacttttcttccccaaagatg
AMPL1690493	scaffold1	677-678	tcctattatgtttacaaggggatggt	acgcgtctagactaatcatcttacc
AMPL1690494	scaffold7	679-680	ccatgtatgtttccatcttctctcg	tagaggactcatcagtacacgacta
AMPL1690495	scaffold2	681-682	aatgtcttcttccctctctgacagg	cgaacgaagtcgaaataaccttg
AMPL1690497	scaffold14	683-684	cggcaatgaaggataaaagtctgt	aaccgacgataacctaacaacaaagc
AMPL1690499	scaffold12	685-686	cttggttgatggtgatgtgtcatgg	tttgaagcatgggtttggcac
AMPL1690503	scaffold4	687-688	caacaactgacgtacgtctcttg	cacaattgcatccactcgttttagta
AMPL1690508	scaffold7	689-690	taaagatgcaacgggagagctag	tcttcagaagtatcctgagcaatgt
AMPL1690509	scaffold12	691-692	gagggaagtggtacacgaacattagg	aaacagccgtcacaatcatcaag
AMPL1690510	scaffold1	693-694	gggcaacagggttgatgattagaat	gagaaatgtggcgcaatattagaca
AMPL1690513	scaffold7	695-696	gccaatcttgttaaaagtgcacaa	gcattccagcgtctcaaatatac
AMPL1690514	scaffold4	697-698	tgaaatgtcctgacaatagatcggt	gattcgagaagactgggatgaggat
AMPL1690523	scaffold4	699-700	gattctctcccctgtgacgaatc	gaaaattcctttgacatgcttgagc

[0038] 2. 金针菇MNP标记验证

[0039] 利用合成的350对金针菇MNP标记引物,对收集的319份金针菇菌株进行了多重扩增、二代高通量测序与数据分析,每个样品的测序平均覆盖倍数达4791倍。对样品的MNP-Seq数据进行分析,所筛选的350个标记都能被检出,其中平均每个样品可以检出326个(93.27%)MNP标记,检出率达90%以上的样品占比84.3%。图1为319个样品中金针菇MNP标记的检出率和分布序片段数量图(横坐标为品种)。

[0040] 3. 关于质控参数检出率R1与R2的设置

[0041] 本发明中的R1指样品中检出标记位点的比例,规定R1大于或等于95%时,判定测序数据合格。若R1小于95%时,用样品两次实验检出标记位点的重现率,R2大于或等于95%时,判定测序数据合格。

[0042] 本发明中的R1指样品中检出标记位点的比例,规定R1大于或等于95%时,判定测序数据合格,其理由如下:位点检出率对鉴定结论影响见表2。按350个位点中最大缺失率5%计算,缺失位点数目为17.5个;缺失位点中,差异位点分布服从实验次数为17.5且发生频率为(1-真实的遗传相似度)的二项分布;根据二项分布,计算获得在95%的概率保障下,缺失位点中的差异位点的最小值和最大值分别为1个和6个,观察到的遗传相似度介于79.25%和80.75%之间;最终推断出遗传相似度的最大偏差为0.75%,表明在R1大于或等于95%时,检出位点缺失率对鉴定结论的重现性影响不大。

[0043] 表2位点检出率对鉴定结论稳定性影响

[0044]

检测位点总	真实的遗传相似度	真实差异位点数	缺失率	检出位点数	缺失位点数
-------	----------	---------	-----	-------	-------

[0045]

数	(GS)	(n_{ij})		(N_{ij})	
350	80%	70	5%	332.5	17.5
缺失位点中的差异位点			观察到的差异位点数 (n_{ij})		
概率保障	最小值	最大值	最大值	最小值	
95%	1	6	64	69	
观察到的遗传相似度 (GS)		遗传相似度 (GS) 偏差			
最大值	最小值	最小值	最大值		
80.75%	79.25%	0.75%	0.75%		

[0046] 关于质控参数R2的设置:本发明中R2指样品的两次重现性实验中,检出标记位点的重现率。本发明规定R2大于或等于95%时,判定测序数据合格。位点检出稳定性(R2的值)对鉴定结论稳定性的影响见表3。当R1值较低时,表明存在大量位点不可检出,假设可检出位点数量为280个;当R2值为95%时,那么,非共同检出位点数量为14个;根据二项分布,在95%的概率保障下,非共同检出位点中,差异位点最多为5个,由此观察到的遗传相似度最大值为80.64%,遗传相似度(GS)偏差为0.98%。由此可见,R2值确保了遗传相似度的稳定性,保障了检出位点缺失率对鉴定结论重现性影响不大。

[0047] 表3位点检出稳定性对鉴定结论稳定性的影响

[0048]

可检测位点 总数	真实的遗传 相似度 (GS)	真实差异位 点数 (n_{ij})	R2 的值	共同检出位点 数 (N_{ij})	非共同检出位 点数
280	80%	56	95%	266	14
非共同位点中, 差异位点数			观察到的遗传相似度 (GS)		遗传相似度 (GS)偏差最大 值
概率保障	最小值	最大值	最小值	最大值	
95%	1	5	79.21%	80.64%	

[0049] 4.MNP标记分型准确性

[0050] 为了检验开发的金针菇MNP标记位点及检测方法的准确性,对5个样品进行了重现性实验,每份品种的同一份DNA分别构建了2次文库,编号-11、-12;2个文库不同时间测序两次。统计不同批次文库第一次和第二次测序的位点差异数目极小,同一样品的不同文库间检出相同的MNP标记基因型是可重现的,按照重现性计算公式 $r=n/N$, n :可重复的基因型对数, N :比较的基因型总对数。准确率为99.94%。结果说明开发的MNP标记位点以及检测方法准确性高。

[0051] 表4 MNP标记位点以及检测方法准确性

样品名称	文库		共同位点数	差异位点数	可重复的基因型对数	重现性	准确性
	重复 1	重复 2					
[0052]	T002	JZG220608001-11	JZG220608001-12	414	0	414	100.00%
	8	JZG220608003-11	JZG220608003-12	415	0	415	100.00%
	T011	JZG220608004-11	JZG220608004-12	394	1	393	99.75%
	YH03	JZG220608005-11	JZG220608005-12	411	0	411	100.00%
	2304	JZG220608008-11	JZG220608008-12	453	1	452	99.78%
	合计			2087	2	2085	99.90%

[0053] 5.MNP标记的多态性

[0054] 一组DNA标记组合的核心功能是品种鉴定,而DNA标记多态性越高,品种区分能力就越强。我们利用319个金针菇菌株,检测了350个MNP标记的等位基因型数量,结果表明,在319个金针菇菌株中,MNP标记的等位基因型的平均值为17.05个。

[0055] 6.MNP标记法的品种区分能力

[0056] 对319份金针菇样品进行两两比较,分析样品间MNP标记位点的差异,共得到50721对比较结果,50721对样品的遗传距离的差异位于0%~100%之间,共有45,245(占比89.20%)对品种间遗传相似系数低于96%,判定为不同品种;共有5,476对品种的遗传相似系数高于96%,占比为10.79%,表明MNP标记法具有很强的品种区分能力。图2为编号为AMPL1690064位点MNP结果聚类图。图3为50721对金针菇样品间MNP标记位点差异分布。

[0057] 7.关于金针菇品种及实质性派生品种的判定阈值

[0058] 本发明将遗传相似度(GS)大于或等于92%的品种判定为“待测品种疑似为对照品种的实质性派生品种”。

[0059] 本发明将遗传相似度(GS)大于或等于96%的品种判定为“待测品种与对照品种疑似同品种”。

[0060] 实例分析:

[0061] 1.操作程序

[0062] 1.1样品准备

[0063] 送检样品宜为新鲜的菌丝体或子实体,供检菌种与对照菌种在相同条件下培养,培养量可共做3个平行试验。

[0064] 从金针菇品种群体中抽取的个体数量宜满足NY/T 2594要求。

[0065] 抽取的样本可以混合后检测。

[0066] 1.2DNA提取及质检

[0067] 利用核酸提取试剂提取待测样品DNA。提产物放于-20℃冰箱,以防DNA降解。用分光光度计测定并计算样品JZG01和JZG02的DNA溶液在260nm与280nm处的吸光度比值,分别为1.96和1.97。在260nm与230nm处的吸光度比值分别为1.84和1.76;取4μL DNA在1%的琼脂糖凝胶上电泳,检测DNA条带是否完整,结果如图4所示;取1μL DNA用Qubit荧光定量仪测

定JZG01和JZG02的DNA浓度,分别为27.6ng/ μ L和20.8ng/ μ L。

[0068] 图4为样品JZG01和样品JZG02的DNA电泳图。

[0069] 1.3多重PCR扩增与文库构建

[0070] 1.3.1多重PCR扩增

[0071] 由于JZG01与JZG02的多重PCR扩增与文库构建实验流程完全一样,因此,除特别说明,下面仅就JZG01的实验流程进行说明。

[0072] 1) 配制多重PCR扩增体系。在PCR管中加入4 μ L表1中的多重PCR引物混合物(每条引物浓度为0.2 μ M)、4 μ L样品JZG01的基因组DNA、10 μ L GenoPlexs 3 $\times$ T Master Mix和12 μ L水,振荡混匀。

[0073] 2) 多重PCR扩增反应。多重PCR扩增程序:95 $^{\circ}$ C,3min;(95 $^{\circ}$ C,20s,60 $^{\circ}$ C,4min) $\times$ 15个循环;72 $^{\circ}$ C,4min。反应结束后,获得多重PCR扩增产物。

[0074] 1.3.2多重PCR扩增产物纯化

[0075] 1) 向获得的多重PCR扩增产物中加入12 μ L GenoPrep DNA Clean Beads,震荡混匀后,室温静置5min。

[0076] 2) 将PCR管置于磁力架上吸附磁珠,直至溶液澄清。

[0077] 3) 用移液器吸取上清液至新的1.5mL离心管中,避免吸到磁珠。

[0078] 4) 向上清液中加入18 μ L GenoPrep DNA Clean Beads,震荡混匀后,室温静置5min。

[0079] 5) 用磁力架吸附磁珠,直至溶液澄清。用移液器小心吸取上清液,弃上清,留磁珠。

[0080] 6) 加入40 μ L GenoPlexs BW10 Buffer,悬浮磁珠,室温静置5min。用磁力架吸附磁珠,直至溶液澄清。用移液器小心吸取上清液,弃上清,留磁珠。

[0081] 7) 加入100 μ L 80%乙醇,用移液器小心去除上清液,避免吸到磁珠。

[0082] 8) 室温放置,直至乙醇挥发干净,避免过干,获得纯化的多重PCR扩增产物。

[0083] 1.3.3高通量测序文库构建

[0084] 向获得的纯化的多重PCR扩增产物10 μ L GenoPlexs 3 $\times$ T Master Mix、2 μ L浓度为5 μ M的P5 primer、2 μ L浓度为5 μ M的P7 barcode primer和16 μ L水。将配制好的反应体系震荡混匀并短暂离心,按如下程序进行PCR反应:95 $^{\circ}$ C,3min;(95 $^{\circ}$ C,15s;58 $^{\circ}$ C,15s;70 $^{\circ}$ C,30s) $\times$ 8个循环;72 $^{\circ}$ C,5min。反应结束后,即构建好30 μ L样品JZG01的高通量测序文库。

[0085] 1.3.4高通量测序文库纯化

[0086] 图5为样品JZG01和样品JZG02的高通量测序文库电泳图。图中,最左边条带为分子量标准,其由下至上分子量大小分别为100bp,250bp,500bp,750bp,1,000bp和2,000bp。

[0087] 1.4高通量测序

[0088] 对获得的高通量测序文库进行高通量测序。高通量测序的平均覆盖倍数设置为700倍以上,测序长度不小于300bp。

[0089] 2数据分析

[0090] 2.1测序数据拆分

[0091] 高通量测序仪将测序数据拆分到样品JZG01和样品JZG02(样品JZG01和样品JZG02为同一品种)。由于采用双末端测序模式,因此,每个样品的每个测序片段均包括正向和反向测序序列。其中,样品JZG01的正向和反向测序序列存放文件的名称分别为JZG01_

1.fq.gz和JZG01_2.fq.gz;样品JZG02的正向和反向测序序列存放文件的名称分别为JZG02_1.fq.gz和JZG02_2.fq.gz。

[0092] 2.2测序数据比对

[0093] 金针菇参考基因组Genbank登录号JBDPIE000000000,文件名为LedB17.fna。

[0094] 数据比对软件为Bowtie2 (版本号2.1.0),需要该软件的索引构建模块bowtie2-build和序列比对模块bowtie2。

[0095] 在Linux窗口中输入以下命令行:bowtie2-build LedB17.fna LedB17.fna,构建金针菇参考基因组索引。

[0096] 在Linux窗口中输入以下命令行:bowtie2-q-p 2-×Led B17.fna-1JZG01_1.fq.gz-2JZG01_2.fq.gz-S JZG01.sam,将样品JZG01的测序数据比对到金针菇参考基因组上。其中,参数“-q”表示输入文件是fastq格式;参数“-p 2”表示采用2个线程做比对;参数“-×LedB17.fna”指定比对参考基因组序列;参数“-1JZG01_1.fq.gz-2JZG01_2.fq.gz”指定样品JZG01的测序结果文件;参数“-S JZG01.sam”把比对结果输入到JZG01.sam文件中。

[0097] 按类似方法,将样品JZG02的测序数据比对到金针菇参考基因组上。

[0098] 依次判定样品JZG01与样品JZG02的 N_{ij} =344个共同检出位点中,每个共同检出位点的基因型是否有差异。统计样品JZG01与样品JZG02中均检出的但基因型无任何差异的标记位点的数目 n_{ij} =338个,差异位点数为6个。

[0099] 计算样品JZG01与样品JZG02的遗传相似度:

$$[0100] \quad GS = \frac{n_{ij}}{N_{ij}} \times 100\% = \frac{338}{344} \times 100\% = 98.26\%$$

[0101] 结果表述:

[0102]

序号	待测品种	对照品种	比较位点数	差异位点数	遗传相似度(GS)	结论
	样品编号	样品编号				
1	JZG01	JZG02	344	6	98.2%	待测品种与对照品种疑同品种

[0103] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

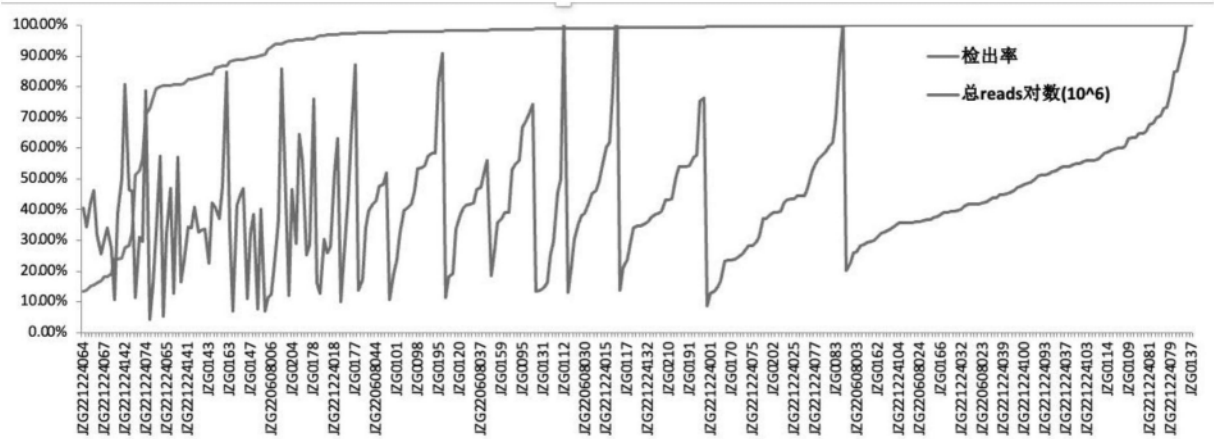
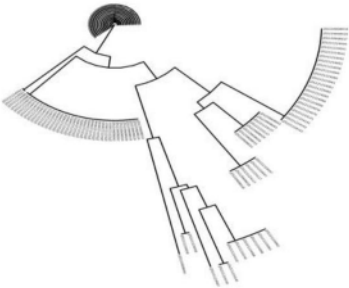


图1

50

100

150



200

0

图2

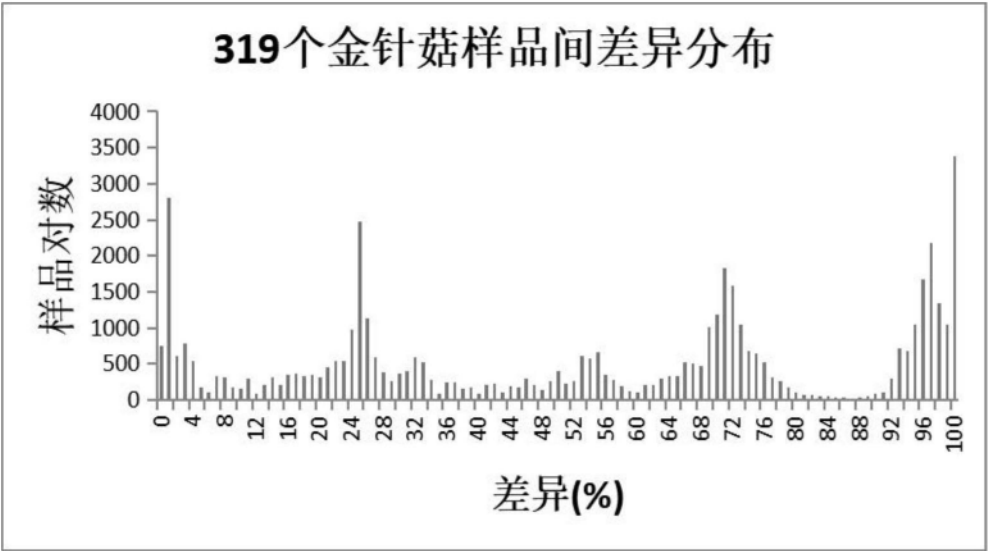


图3



图4



图5