



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104293774 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201310298732. 9

(22) 申请日 2013. 07. 16

(71) 申请人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 35 号
北京林业大学 118 信箱

(72) 发明人 张德强 杜庆章 徐煲铎

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 吴贵明 张永明

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

A01H 1/04 (2006. 01)

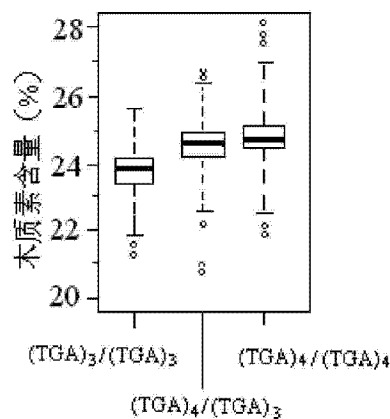
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记、其应用及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记、其应用及试剂盒。其中,该功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,7A-SSR2 位于杨树 CesA7-A 外显子 3 区域,为 (TGA)_n;7B-SSR1 位于 CesA7-B 内含子 4 区域,为 (TTAA)_m。本发明确定的这些功能标记位点为早期筛选优异种质,缩短林木育种周期提供了新的技术手段,同时也为改良木材品质性状的分子研究提供遗传学证据,对于提高我国林木遗传育种工程的发展,以及当前林木育种战略实施具有重要的意义。



1. 一种杨树 *CesAs* 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记,其特征在于,所述功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,所述 7A-SSR2 位于杨树 *CesA7-A* 外显子 3 区域,为 $(TGA)_n$;所述 7B-SSR1 位于 *CesA7-B* 内含子 4 区域,为 $(TTAA)_m$, n 和 m 为正整数。

2. 根据权利要求 1 所述的功能 SSR 标记,其特征在于,所述 7A-SSR2 为 $(TGA)_3$ 或 $(TGA)_4$;所述 7B-SSR1 为 $(TTAA)_3$, $(TTAA)_4$ 或 $(TTAA)_5$ 。

3. 一种筛选杨树木材品质性状的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1,提取毛白杨的基因组 DNA;

S2,测定毛白杨 *CesAs* 基因内的功能 SSR 标记,所述功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,所述 7A-SSR2 位于杨树 *CesA7-A* 外显子 3 区域,为 $(TGA)_n$;所述 7B-SSR1 位于 *CesA7-B* 内含子 4 区域,为 $(TTAA)_m$, n 和 m 为正整数;

S3,根据所述步骤 S2 的测定结果进行筛选。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述 7A-SSR2 含有 $(TGA)_4$ 的杨树个体木质素含量高,所述 7B-SSR1 含有 $(TTAA)_5$ 的杨树个体 α -纤维素含量和综纤维素含量高。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述 7A-SSR2 含有纯合基因型 $(TGA)_3/(TGA)_3$ 的杨树个体木质素含量低,所述 7B-SSR1 含有 $(TTAA)_3/(TTAA)_3$ 或 $(TTAA)_3/(TTAA)_4$ 的杨树个体 α -纤维素含量和综纤维素含量低。

6. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述步骤 S2 中在测定 7A-SSR2 用的引物为 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2;在测定 7B-SSR1 用的引物为 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4。

7. 一种筛选杨树生长和木材品质性状的试剂盒,其特征在于,包括用于扩增权利要求 1 所述的功能 SSR 标记的碱基序列为 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 的引物。

8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,其特征在于,所述引物的 PCR 扩增体系为:引物对浓度为 $0.3\text{mol}/\mu\text{l}$, $2.0\mu\text{l}$ $12\times\text{PCR}$ 扩增混合液, $1.0\mu\text{l}$ 基因组 DNA,无菌水补至 $10\mu\text{l}$ 。

9. 位于杨树 *CesA7-A* 外显子 3 区域的 $(TGA)_n$ 和位于 *CesA7-B* 内含子 4 区域的 $(TTAA)_m$ 功能 SSR 标记在杨树分子标记辅助选择育种中的应用。

杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记、其应用及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及植物分子育种领域,具体而言,涉及一种杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记、其应用及试剂盒。

背景技术

[0002] 杨树生长迅速、轮伐期短、种间杂交与无性繁殖比较容易和便于遗传操作,在北半球被认为是最具前途的纤维质能源树种(Li et al.,2008, The Plant Journal, 54:569-581)。特别是随着我国经济的迅猛发展,当前的林木产量及质量已远不能满足工业的需求,因此选育优良用材新种质,发展优良工业用材人工林,提高林地单位面积产量是解决该问题的重要应对策略。然而,传统的以表型性状标准或杂交常规育种选择方式进行优良种质选育,具有育种周期长、稳定性差、片面注重生长性状而忽略木材品质性状、无法消除环境效应影响等缺点,严重限制了林木的遗传改良进程,因此,深入研究木材生物合成途径,阐明木材纤维性状形成的分子机制是加速木材品质遗传改良的基础。

[0003] 在常见的分子标记技术中,简单序列重复(Simple Sequence Repeats,SSRs)也称微卫星 DNA,由于具有多态性高、共显性遗传、重复性强、检测容易且结果稳定等优点,在分子标记辅助育种研究中被认为是一种理想的分子标记类型。先前开发的 SSR 位点多来自基因组的随机区域,而这些 SSR 多呈中性进化,与物种表型性状的形成连锁不太紧密。与此不同,基因内的 SSR 由于在进化过程中,一般会受到较强烈的选择压,造成与物种的表型性状紧密连锁(Li et al.,2004;Molecular Biology and Evolution,21:991-1007.),被认为具有功能重要性。因此,建立杨树纤维素合酶基因内功能 SSR 标记的鉴定技术,开发木材形成相关候选基因内 SSR 位点,发掘候选基因内与重要性状显著关联的等位变异位点,并进行基因型效应分析,可直接应用于分子标记定向辅助育种。

[0004] 开发出在杨树生长的早期就能够高效、准确地鉴定出木材品质好的单株的分子标记是本领域技术人员一直努力的方向。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记、其应用及试剂盒,以在杨树生长的早期就能够高效、准确地鉴定出木材品质优良的单株。

[0006] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记。该功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,7A-SSR2 位于杨树 CesA7-A 外显子 3 区域,为 $(TGA)_n$;7B-SSR1 位于 CesA7-B 内含子 4 区域,为 $(TTAA)_m$,n 和 m 为正整数。

[0007] 进一步地,7A-SSR2 为 $(TGA)_3$ 或 $(TGA)_4$;7B-SSR1 为 $(TTAA)_3$, $(TTAA)_4$ 或 $(TTAA)_5$ 。

[0008] 根据本发明的另一个方面,提供一种筛选杨树木材品质性状的方法。该方法包括

以下步骤:S1,提取毛白杨的基因组 DNA ;S2,测定毛白杨 CesAs 基因内的功能 SSR 标记,功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,7A-SSR2 位于杨树 CesA7-A 外显子 3 区域,为 (TGA)_n; 7B-SSR1 位于 CesA7-B 内含子 4 区域,为 (TTAA)_m;S3,根据步骤 S2 的测定结果进行筛选。

[0009] 进一步地,7A-SSR2 含有 (TGA)₄ 的杨树个体木质素含量高,7B-SSR1 含有 (TTAA)₅ 的杨树个体 α-纤维素含量和综纤维素含量高。

[0010] 进一步地,7A-SSR2 含有纯合基因型 (TGA)₃/(TGA)₃ 的杨树个体木质素含量低,7B-SSR1 含有 (TTAA)₃/(TTAA)₃ 或 (TTAA)₃/(TTAA)₄ 的杨树个体 α-纤维素含量和综纤维素含量低。

[0011] 进一步地,步骤 S2 中在测定 7A-SSR2 用的引物为 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2; 在测定 7B-SSR1 用的引物为 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4。

[0012] 根据本发明的再一个方面,提供一种筛选杨树生长和木材品质性状的试剂盒。该试剂盒包括碱基序列为 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 的引物。

[0013] 进一步地,引物的 PCR 扩增体系为:引物对浓度为 0.3mol/μl,2.0 μl 2×PCR 扩增混合液,1.0 μl 基因组 DNA,无菌水补至 10 μl。

[0014] 根据本发明的再一个方面,提供一种位于杨树 CesA7-A 外显子 3 区域的 (TGA)_n 和位于 CesA7-B 内含子 4 区域的 (TTAA)_m 功能 SSR 标记在杨树分子标记辅助选择育种中的应用。

[0015] 本发明采用连锁-连锁不平衡(Linkage-Linkage disequilibrium)作图策略在杨树纤维素合酶基因(CesAs)内确定了与木材品质性状(木质素含量、α-纤维素含量、综纤维素含量)显著关联的功能 SSR 标记(7A-SSR2 和 7B-SSR1),为研究该候选基因的功能机制及其大规模开展林木关联作图研究提供了重要的理论研究基础。本发明确定的这些功能标记位点为早期筛选优异种质,缩短林木育种周期提供了新的技术手段,同时也为改良木材品质性状的分子研究提供遗传学证据,对于提高我国林木遗传育种工程的发展,以及当前林木育种战略实施具有重要的意义。

附图说明

[0016] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0017] 图 1 示出了 7A-SSR2 标记在关联作图群体的木质素含量上的基因型效应;

[0018] 图 2 示出了 7A-SSR2 标记在杂交作图群体的木质素含量上的基因型效应;

[0019] 图 3 示出了 7B-SSR1 标记在关联作图群体的综纤维素含量上的基因型效应;

[0020] 图 4 示出了 7B-SSR1 标记在杂交作图群体的综纤维素含量上的基因型效应;

[0021] 图 5 示出了 7B-SSR1 标记在关联作图群体的 α-纤维素含量上的基因型效应;以及

[0022] 图 6 示出了 7B-SSR1 标记在杂交作图群体的 α-纤维素含量上的基因型效应。

具体实施方式

[0023] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0024] 鉴于树木高度杂合、周期长、异交体系等特点,在作物遗传学研究中开发的一些方法难以在林木中实施,因此,目前在林木分子遗传学方面的主要进展是通过分子标记辅助选择策略将影响木材纤维性状的多个基因剖分开来,可以像研究质量性状基因位点一样,对这些数量性状基因位点进行的研究,研究这些基因在染色体上的位置,并寻找与其紧密连锁的分子标记,以此来对林木进行遗传改良。其主要应用方法为基于家系群体遗传连锁图谱的数量性状定位,及其基于自然群体的连锁不平衡作图方法。但家系连锁作图的 QTL 分析虽然可以确定功能区域位置,但分辨率较低,群体遗传信息仅限于父母本的分组合。相比而言,基于关联群体的连锁不平衡作图涵盖了该物种所有历史进化事件,在等位点变异方面具有较高的分辨率,但群体结构、样本群体规模等因素易造成关联结果的假阳性。

[0025] 本发明针对传统以表型性状标准或杂交常规育种选择方式进行优良种质选育周期长、稳定性差、片面注重生长性状而忽略木材品质性状、无法消除环境效应影响等缺点,组合利用连锁-连锁不平衡(Linkage-Linkage disequilibrium)作图策略,确定与重要木材品质性状显著关联的功能变异位点,首次系统的对杨树纤维素合酶基因家族(CesAs)内的 SSR 标记进行了与生长及其木材品质性状的关联分析,最终确定了与木材品质性状(木质素含量、 α -纤维素含量、综纤维素含量)显著连锁的功能 SSR 标记(7A-SSR2 和 7B-SSR1),为改良木材纤维质的数量及其质量以及优良种质资源的早期选择提供了科学理论依据及高效技术体系。

[0026] 分别包含功能 SSR 标记 7A-SSR2 和 7B-SSR1 的 CesA7-A 及 CesA7-B 基因属于与杨树木材形成中纤维素合成直接相关的纤维素合酶基因家族成员,上述序列分别命名为 SEQ ID NO. 5 及 SEQ ID NO. 6。

[0027] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记。该功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,7A-SSR2 位于杨树 CesA7-A 外显子 3 区域,为 $(TGA)_n$;7B-SSR1 位于 CesA7-B 内含子 4 区域,为 $(TTAA)_m$,n 和 m 为正整数。应用本发明确定的这些功能标记位点为早期筛选优异种质,缩短林木育种周期提供了新的技术手段,同时也为改良木材品质性状的分子研究提供遗传学证据,对于提高我国林木遗传育种工程的发展,以及当前林木育种战略实施具有重要的意义。

[0028] 其中,7A-SSR2 为 $(TGA)_3$ 或 $(TGA)_4$;7B-SSR1 为 $(TTAA)_3$, $(TTAA)_4$ 或 $(TTAA)_5$ 。

[0029] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种筛选杨树木材品质性状的方法。该方法包括以下步骤:S1,提取毛白杨的基因组 DNA;S2,测定毛白杨 CesAs 基因内的功能 SSR 标记,功能 SSR 标记包括 7A-SSR2 和 7B-SSR1,7A-SSR2 位于杨树 CesA7-A 外显子 3 区域,为 $(TGA)_n$;7B-SSR1 位于 CesA7-B 内含子 4 区域,为 $(TTAA)_m$;S3,根据步骤 S2 的测定结果进行筛选。应用本发明确定的这些功能标记位点为早期筛选优异种质,能够缩短林木育种周期。

[0030] 本发明的发明人发现,当 7A-SSR2 含有 $(TGA)_4$ 的杨树个体木质素含量高,7B-SSR1 含有 $(TTAA)_5$ 的杨树个体 α -纤维素含量和综纤维素含量高。当 7A-SSR2 含有纯合基因型 $(TGA)_3/(TGA)_3$ 的杨树个体木质素含量低,7B-SSR1 含有 $(TTAA)_3/(TTAA)_3$ 或 $(TTAA)_3/(TTAA)_4$ 的杨树个体 α -纤维素含量和综纤维素含量低。

[0031] 优选地,步骤 S2 中在测定 7A-SSR2 用的引物为 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2;在测定 7B-SSR1 用的引物为 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4,引物的具体信息见表 1。

[0032] 表 1

[0033]

编号	引物序列(5'-3')	重 复 基元	片 段 长 度(bp)	退 火 温 度 (°C)	SSR 来源
7A-SSR2	SEQ ID NO.1: (F:AGGGAGTCCAAGGGTTGAG) SEQ ID NO.2: (R:AAGCATTGCCTCGGTGAGG)	TGA	118-130	56.0	<i>CesA7-A</i> 外显子 3
7B-SSR1	SEQ ID NO.3: (F: GAGTGCACCCATATCCAGTT) SEQ ID NO.4: (R: CCCATCTTGCACTTCCTGTT)	TTAA	140-156	56.0	<i>CesA7-B</i> 内含子 4

[0034] 采用上述引物,能够高效、准确地鉴定出本发明的功能 SSR 标记。

[0035] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种筛选杨树生长和木材品质性状的试剂盒。该试剂盒包括碱基序列为 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4 的引物。采用上述引物,能够高效、准确地鉴定出毛白杨 *CesAs* 基因内与杨树木材品质性状关联的功能 SSR 标记,可以在杨树生长的早期就能够高效、准确地鉴定出木材品质好的单株,从而大大加速育种进程,缩短了选育周期。

[0036] 优选地,该试剂盒的引物在下述 PCR 扩增体系中扩增:引物对的浓度为 0.3mol/ μ l,2.0 μ l 2 $\times$ PCR 扩增混合液(QIAGEN Multiplex PCR Master Mix),1.0 μ l 基因组 DNA,无菌水补至 10 μ l。

[0037] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种位于杨树 *CesA7-A* 外显子 3 区域的 (TGA)_n 和位于 *CesA7-B* 内含子 4 区域的 (TTAA)_m 功能 SSR 标记在杨树分子标记辅助选择育种中的应用。

[0038] 本发明中提及的分子生物学技术,本领域技术人员均可按照常规操作进行,以下对本发明优选的实验步骤做详细的描述。

[0039] 具体地,本发明的杨树纤维素合酶基因(*CesAs*)内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记,通过以下步骤获得:

[0040] (1) 构建作图群体。

[0041] 关联作图群体为 460 株随机选自于全国毛白杨种质资源基因库的毛白杨基因型个体。该种质资源库建立于 1982 年,由北京林业大学毛白杨研究所依靠全国毛白杨协作组从我国十个省份一百万平方公里的毛白杨分布区域内选取 1047 株基因型个体构成,利用根繁方式种植在山东省冠县国营苗圃。杂交作图群体为 1200 株来自于以银腺杨(*Populus alba*×*P. glandulosa*)为母本,鲁毛 50 (*P. tomentosa*)为父本的杂交 F1 代。

[0042] (2) DNA 提取。

[0043] 利用 CTAB 法(Doyle 等,Phytochemistry Bulletin. (1987)9,1-15)或植物 DNA 快速提取试剂盒对所有基因型个体进行基因组 DNA 提取。

[0044] (3) 基因内 SSR 的发现及引物设计。

[0045] 以最大程度地反映毛白杨 (*Populus tomentosa*) 自然分布区域的 40 株天然毛白杨个体为材料,利用毛果杨全基因组序列网站 (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/>)

Poptr1.home.html, Tuskan et al., 2006) 进行 17 个杨树纤维素合酶基因 (CesAs) 序列的克隆、拼装, 利用 MEGA5.0 对测序片段比对分析, 发现并确定 CesAs 基因内的微卫星位点, 并依据微卫星 DNA 位点两侧的保守区域设计 SSR 扩增引物, 其中正引物 5' 端的 FAM 为荧光修饰基团, 在氩激光照射下分别会显示蓝色, 用于微卫星 DNA 标记基因型分型。

[0046] 上述位点位于杨树 CesAs 基因内的不同区域 (包括 5' UTR、3' UTR、内含子、外显子等), 相比于分布于基因组随机区域的 SSR 标记, 上述基因内标记因长期参与该基因的进化历程, 被认为具有一定的功能性; 可通过对多个基因型个体 CesA 基因家族直接测序的方法确定, 通过比对分析获取所有候选基因内 SSR 标记。

[0047] (4) 建立基因型数据库

[0048] 利用其所述 PCR 扩增的体系为: 所述多态性微卫星 DNA 引物对的浓度均为 $0.3 \text{ mol}/\mu\text{l}$, $2.0 \mu\text{l} \times \text{PCR QIAGEN Multiplex PCR Master Mix}$, $1.0 \mu\text{l}$ 基因组 DNA, 无菌水补至 $10 \mu\text{l}$; 所述 PCR 扩增的条件是: 94°C 预变性 5min, 94°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 35 个循环, 然后 72°C 延伸 10min, 进行 PCR 扩增。取 $2 \mu\text{l}$ PCR 扩增产物进行毛细管电泳检测 (ABI3730xl DNA Analyzer), 以 Liz Standard Size600 (Applied Biosystems) 为内标, 利用软件 GeneMapper 读出片段长度, 建立两个群体的基因型数据库。

[0049] (5) 建立表型数据库

[0050] 表型数据数量性状包括木材品质、生长性状共 9 个指标, 其中, 利用近红外光谱测定仪测定每个基因型个体的木质素含量、 α -纤维素含量、综纤维素含量三个木材化学性状指标; 利用 X 射线衍射仪测定微纤丝角, 利用纤维测定仪测定纤维长、纤维宽两个物理性状; 利用生长性状测定工具测定其胸径、树高、材积三个指标; 建立关联及杂交群体的表型数据库, 用于基因内 SSR 标记的关联及连锁分析。

[0051] (6) 关联作图群体亚结构及连锁不平衡水平检测

[0052] 利用 STRUCTURE 模型确定最佳群体亚结构, 获取代表每个基因型个体在群体结构中的成员概率值 Q (Du et al., 2012; Journal of Heredity, 103:853-862), 利用 SPAGED1.2 计算该群体内个体间的亲缘关系值 K 。 Q 和 K 矩阵用来作为关联分析模型中的协变量, 消除群体结构及其群体亲缘关系差异对关联作图结果的影响。利用 DNASP 软件检测对该基因家族进行了连锁不平衡水平检测, 发现其基因的连锁不平衡水平较低, 在基因内部就衰退至不明显, 表明位点之间的联合分离距离较近, 有利于开展基于候选基因的关联分析, 其关联作图分析的分辨率较高。

[0053] (7) 利用连锁-连锁不平衡 (Linkage-Linkage disequilibrium) 作图方法获取显著关联 SSR 标记。

[0054] 首先, 利用 TASSEL 软件中的混合线性模型 ($Q+K$ 模型), 以 (6) 中计算得到的 Q 和 K 矩阵为协变量, 进行表型与基因型数据的关联分析, 获取 $P < 0.05$ 的显著关联位点, 进一步利用 FDR 假阳性多重检测, 在 $Q < 0.10$ 范围内, 确定来自于 7 个 CesAs 内的 10 个 SSR 标记与除胸径及材积性状以外的其他七个表型性状的 15 个关联, 解释表型变异的 2.9% 到 8.7%。

[0055] 其次, 将在关联群体中获取的 10 个显著 SSR 位点在 1200 株杂交作图群体内进行孟德尔遗传检测 ($P < 0.01$), 发现其符合孟德尔遗传分离比例, 随后对符合孟德尔遗传规律的标记位点, 进行与表型性状的单标记分析, 并进行 FDR 假阳性多重检测, 在 $Q < 0.10$ 范围内, 确定了与三个表型性状 (木质素含量、 α -纤维素含量和综纤维素含量) 显著关联的两个

标记位点 7A-SSR2 和 7B-SSR1,其分别来自于 CesA7-A 及 CesA7-B。最后,对这两个标记位点在关联及其杂交作图群体内均进行了基因型效应计算,并进行显著性检验,保证了在两个群体内具有相同的基因型效应。

[0056] 其中, CesA7-A 外显子 3 区域内的标记 7A-SSR2 与木质素含量显著相关,其中,含有 $(TGA)_3/(TGA)_3$ 基因型的个体具有显著的低木质素含量(23.90%);含有 $(TGA)_4$ 的常见基因型 $(TGA)_3/(TGA)_4$ 和 $(TGA)_4/(TGA)_4$ 的个体木质素含量较高(24.79%和 24.82%),且差异不明显;不同基因型所对应的木质素含量相差达 1%。

[0057] CesA7-B 内含子 4 区域的标记 7B-SSR1 与 α -纤维素含量和综纤维素含量显著相关,且在这两个表型指标上,基因型效应具有一致性。含有 $(TTAA)_5$ 的基因型个体具有较高的 α -纤维素含量(45.28%)和综纤维素含量(73.40%);包含其他常见基因型 $(TTAA)_3/(TTAA)_3$ 和 $(TTAA)_3/(TTAA)_4$ 的个体则对应较低的 α -纤维素含量(44.20%)和综纤维素含量(72.64%),且差异不显著。

[0058] 因此我们可以通过对两个功能位点基因型数据的分析,并根据育种需要进行组合,获取不同类型的木材,标记位点可直接应用于杨树的早期的选择。

[0059] 图 1-6 表明上述功能位点在两种不同类型作图群体中被检测出与同一性状指标显著相关,且在该性状上具有相同的基因型效应,说明该位点所包含的等位基因型具有不同的表型控制能力,上述方法进一步确定了该位点为功能性位点,该位点可稳定地应用于相关性状的早期选择。

[0060] 在群体遗传学研究中,大规模的群体数目,及其较精确的表型测定技术,将会极大的提高关联作图研究的精度,提高作图分辨率。本发明的发明人选择了 460 株的关联作图群体,以及 1200 株的杂交作图群体,另外,利用当前最先进的木材材性性状测定方法(X 射线衍射仪等),实验重复 3 次,并进行了正态分布检验,对于显著不符合正态分布的数值进行了剔除。且相比于利用一般线性模型计算易出现假阳性关联结果,在充分考虑群体内存在的亚群体结构及其个体亲缘关系差异的基础上,利用混合线性模型(Q+K model)保证了关联结果的准确性,并进一步利用 FDR 假阳性多重检测,随后,对这些标记又在杂交群体内进行了关联验证,对重复出现的标记位点在关联及其杂交作图群体内均进行了基因型效应计算,并进行显著性检验,保证了在两个群体内具有相同的基因型效应。因此,本领域技术人员可以根据实际需要,联合两个功能标记位点选择纤维素含量高、木质素含量低的优良个体。

[0061] 下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0062] 利用本发明确定的功能标记位点 7A-SSR2 和 7B-SSR1 在毛白杨幼龄种质资源库中选择优良用材新种质。

[0063] (1) 构建检测群体。毛白杨幼龄种质资源库始建于 2010 年,是在原来毛白杨种质资源基因库进行嫁接更新的基础上,增加了一些毛白杨种质资源及地方优良品种。本发明中,利用从该种质资源库随机选择的 100 株毛白杨基因型个体为实验材料,选择具有优良木材品质的新种质。

[0064] (2) DNA 提取、PCR 扩增及基因型分型。利用植物 DNA 快速提取试剂盒对所有基因型个体进行基因组 DNA 提取。利用本发明表 1 中列出的 7A-SSR2 和 7B-SSR1 引物序列,对所有个体进行基因型分型。

[0065] (3) 根据个体基因型数据对实验样品进行分类,其中,第一组为位点 7A-SSR2 含有 (TGA)₃/(TGA)₃,并且位点 7B-SSR1 含有 (TTAA)₅的所有基因型个体,共 13 株。另外一组为位点 7A-SSR2 含有 (TGA)₄,并且位点 7B-SSR1 上不含有 (TTAA)₅的所有基因型个体,为 35 株。

[0066] (4) 表型数据测定。从每组中随机选择 10 个样品,利用近红外光谱测定仪对其进行木材化学性状的测定,并利用 T 检验对两组数据进行显著性检验,结果如表 2 所示:

[0067] 表 2

[0068]

木材品质性状	第一组(平均值)	第二组(平均值)	T- 检验(P 值)
木质素	23.30%	24.65%	0.000**
α-纤维素含量	45.26%	44.51%	0.025*
综纤维素含量	73.60%	72.49%	0.008**

[0069] 通过对分组数据表型数据的比较,显示了利用本发明确定的功能标记 SSR 位点进行毛白杨木材品质性状的早期选择是可行的。

[0070] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0071] 序列表

[0072] <110> 北京林业大学

[0073] <120> 杨树 CesAs 基因内与木材品质性状显著关联的功能 SSR 标记、其应用及试剂盒

[0074] <130> P73598LYEDX

[0075] <160> 4

[0076] <170> PatentIn version 3.2

[0077] <210> 1

[0078] <211> 19

[0079] <212> DNA

[0080] <213> artificial

[0081] <220>

[0082] <223> 引物

[0083] <400> 1

[0084] agggagtcca agggttgag

19

[0085] <210> 2

[0086] <211> 19

[0087] <212> DNA

[0088] <213> artificial

[0089] <220>

[0090] <223> 引物

[0091] <400> 2

[0092] aagcattgcc tcggtgagg

19

[0093] <210> 3

[0094]	<211>	20	
[0095]	<212>	DNA	
[0096]	<213>	artificial	
[0097]	<220>		
[0098]	<223>	引物	
[0099]	<400>	3	
[0100]	gagtgcaccc	atatccagtt	20
[0101]	<210>	4	
[0102]	<211>	20	
[0103]	<212>	DNA	
[0104]	<213>	artificial	
[0105]	<220>		
[0106]	<223>	引物	
[0107]	<400>	4	
[0108]	cccatcttgc	acttcctggt	20。

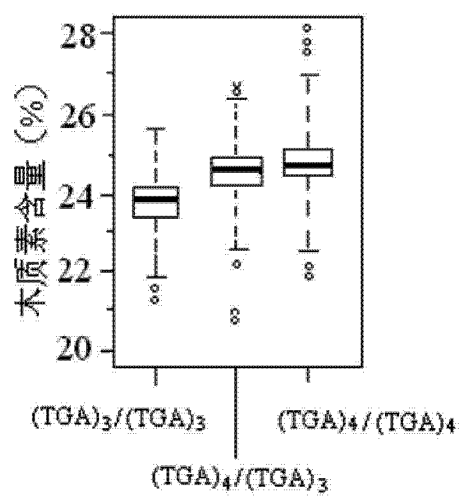


图 1

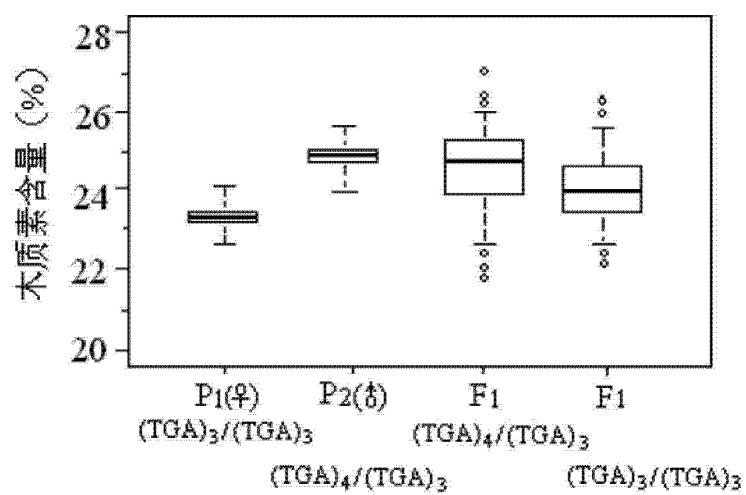


图 2

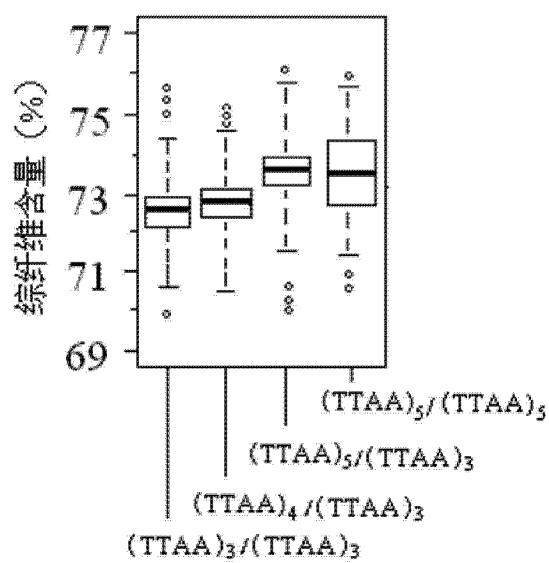


图 3

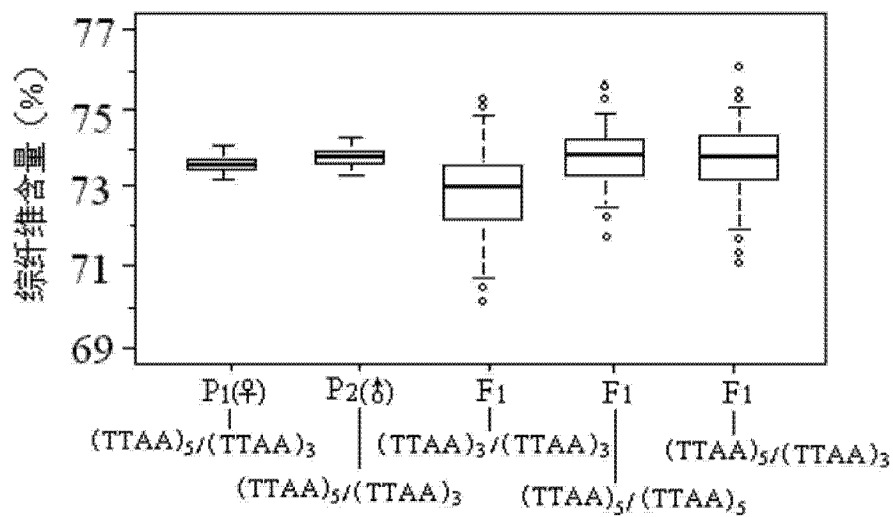


图 4

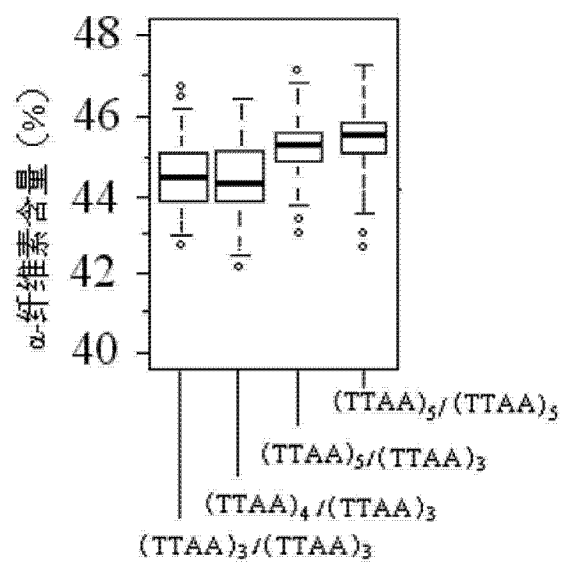


图 5

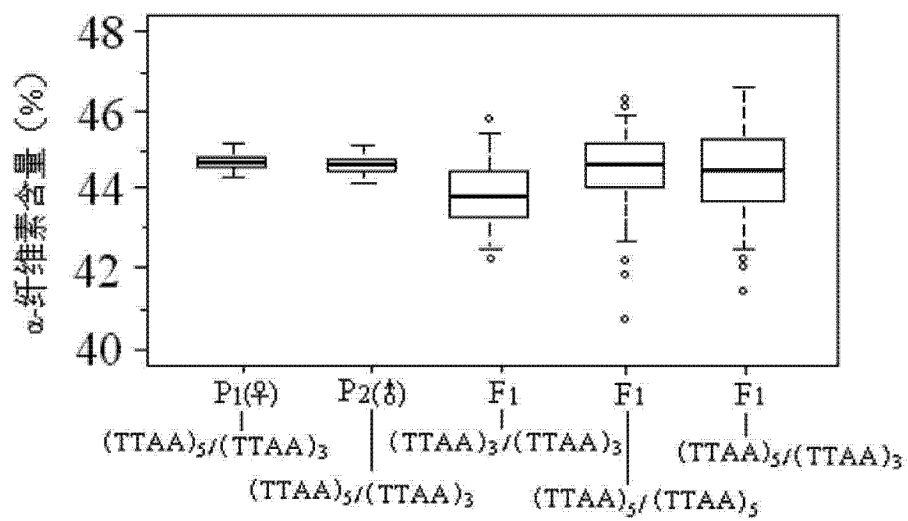


图 6