



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114752593 A

(43) 申请公布日 2022.07.15

(21) 申请号 202210365754.1

C12Q 1/6858 (2018.01)

(22) 申请日 2022.04.08

(71) 申请人 山东省林业科学研究院

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路42号

申请人 山东华博基因工程有限公司

(72) 发明人 吴德军 燕丽萍 王因花 任飞

李丽 刘翠兰 贺英俊 张波

张子通

(74) 专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理

有限公司 11385

专利代理师 崔玥

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书1页 说明书13页

序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于预测白蜡杂种优势的SSR标记及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于预测白蜡杂种优势的SSR标记及其应用,属于农作物育种技术领域。本发明提供的用于预测白蜡杂种优势的SSR分子标记引物组,包括核苷酸序列如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.28所示的14对引物。本发明基于分子水平的遗传距离分析方法,采用SSR标记快速筛选出白蜡亲本间遗传距离在1.1-1.5的杂交组合,快速获得亲本选配,后代杂种优势显著,林木育种周期缩短4~5年,显著提高了育种效率。

1. 一种用于预测白蜡杂种优势的SSR分子标记引物组,其特征在于,所述引物组包括核苷酸序列如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.28所示的14对引物。

2. 权利要求1所述SSR分子标记引物组在白蜡良种选育或亲本选配中的应用。

3. 权利要求1所述SSR分子标记引物组在白蜡杂种优势预测中的应用。

4. 一种预测白蜡杂种优势的方法,其特征在于,包括如下步骤:利用权利要求1所述的引物组对亲本材料进行PCR扩增,利用Nei遗传距离公式计算各亲本间的遗传距离,筛选出亲本间遗传距离 >1 的杂交组合。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述遗传距离的范围为1.1-1.5。

6. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述白蜡包括绒毛白蜡和美国红栲。

7. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述杂种优势包括树高和胸径。

8. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述PCR的反应程序为94℃预变性3min,94℃变性1min,54℃-58℃退火1min,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10min,4℃10min终止反应。

9. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述PCR的反应体系按照重量份数计为:25mmol/LMg²⁺0.8份、10μmol/L引物0.2份、10mmol/LdNTP 0.3份、5U/μLTaq酶0.05份、5~10ng/μL DNA模板2.00份、10×PCR缓冲液1.0份,ddH₂O 5.45份。

一种用于预测白蜡杂种优势的SSR标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于农作物育种技术领域,尤其涉及一种用于预测白蜡杂种优势的SSR标记及其应用。

背景技术

[0002] 杂种优势是指杂种第一代在体型、生长率繁殖力及行为特征方面均比亲本优越的现象。目前,利用杂种优势进行杂交育种,是提高农作物的产量、抗性和品质的主要途径之一。但经过亲本(父本、母本)的杂交后产生的杂交F1代的遗传性状具有不确定性,不是所有的杂交后代均具有杂交优势,不同亲本组合所产生后代的杂种优势大小也千差万别,有的杂种优势明显,有的不明显,甚至出现退化。

[0003] 利用杂种优势的最关键因素之一是选配出强优势的杂交组合。在林木杂种优势育种实际应用中,往往是通过配制大量的组合后进行田间表型筛选,从而选育出与对照相比更具杂种优势的组合品种,其存在周期长、工作量大、盲目性强、效率低等缺点,这也导致了育种结果的诸多不确定性。而且由于林木杂交育种周期长、遗传背景复杂,盲目的选择杂交亲本,导致林木育种杂种优势利用较低。杂交育种的核心是利用杂种优势,而亲本的选择和选配是获得杂种优势的关键环节。一直以来,怎样能够快速、简洁地获得具有符合生产要求的新性状或优异性状的杂交种,怎样在育种早期世代或杂交种亲本的创新初期来预测组合亲本潜在的杂种优势,是杂交育种中最为关注的问题。

[0004] 白蜡是木犀科白蜡属植物的通称,又称栲,因树上放养白蜡虫,故取名白蜡树,又是固沙树种。白蜡木材坚韧,耐水湿,制做家具、农具、胶合板等用,枝条可编筐,树皮称“秦皮”,中医用作清热药。目前,现有技术并未公开如何能够快速、简洁地获得具有符合生产要求的新性状或优异性状的白蜡杂交种的有关技术内容。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于预测白蜡杂种优势的SSR标记,采用SSR标记快速筛选出亲本间遗传距离在1.1-1.5的杂交组合,快速获得亲本选配,后代杂种优势显著,林木育种周期缩短4-5年。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种用于预测白蜡杂种优势的SSR分子标记引物组,所述引物组包括核苷酸序列如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.28所示的14对引物。

[0008] 本发明还提供了一种上述SSR分子标记引物组在白蜡良种选育或亲本选配中的应用。

[0009] 本发明还提供了一种上述SSR分子标记引物组在白蜡杂种优势预测中的应用。

[0010] 本发明还提供了一种预测白蜡杂种优势的方法,包括如下步骤:利用上述的引物组对亲本材料进行PCR扩增,利用Nei遗传距离公式计算各亲本间的遗传距离,筛选出亲本间遗传距离 >1 的杂交组合。

- [0011] 优选的,所述遗传距离的范围为1.1-1.5。
- [0012] 优选的,所述白蜡包括绒毛白蜡和美国红栎。
- [0013] 优选的,所述杂种优势包括树高和胸径。
- [0014] 优选的,所述PCR的反应程序为94℃预变性3min,94℃变性1min,54℃-58℃退火1min,72℃延伸1min,共35个循环;最后72℃延伸10min,4℃10min终止反应。
- [0015] 优选的,所述PCR的反应体系按照重量份数计为:25mmol/L Mg^{2+} 0.8份、10 μ mol/L引物0.2份、10mmol/L dNTP 0.3份、5U/ μ L Taq酶0.05份、5~10ng/ μ L DNA模板2.00份、10 \times PCR缓冲液1.0份,ddH₂O 5.45份。
- [0016] 本发明的有益效果:
- [0017] 本发明基于分子水平的遗传距离分析方法,采用SSR标记快速筛选出白蜡亲本间遗传距离在1.1-1.5的杂交组合,快速获得亲本选配,后代杂种优势显著,林木育种周期缩短4~5年,显著提高了育种效率。

附图说明

- [0018] 图1为遗传距离与杂种优势、配合力的线性相关图。

具体实施方式

- [0019] 本发明提供了一种用于预测白蜡杂种优势的SSR分子标记引物组,所述引物组包括核苷酸序列如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.28所示的14对引物。
- [0020] 在本发明中,所述14对引物序列的名称以及具体序列如表1所示:
- [0021] 表1本发明SSR分子标记引物组

引物名	引物序列 (5→3')	引物名	引物序列 (5→3')
F82	F:TTGACTCGTGTTTAGGGATGAAT	F144	F:GATAGTGGGGGAAGAATAAGTCC
	R:AGCTCTTGAAGGGAAAATTTGAA		R:TCATTCCAACCTCAATGAACTCCT
F92	F:GATTCTCCATACATGTGCTCTCC	F147	F:GGATAGTGGGGGAAGAATAAGTC
	R:TAAAAAGTGAAACCCTTTCGTTG		R:CTCATTCCAACCTCAATGAACTCC
F93	F:GAAAAGGAGGAGAGTGGGAATAC	F167	F:TGAGCAAATGTGAAGACCGTAG
	R:GCTCCATTTCACTTCAACTCTTC		R:TAATTTTCATCCACCAGTTTCCAC
F95	F:AGAATAGATGAGGATGAAGGGGA	F186	F:TCTTCACGTCTTCTGTTTGTTC
	R:CTAACTCATCCCTCTGCGAAAC		R:GAAAACGTGTGAATGAGTTTGGT
F112	F:CCATTGTCAATTTGCAGATTCTT	F187	F:TCGATCTTTCATCTAAACAAGC
	R:GTCTGGAAATGTTGATCCTGAAA		R:AACGTGTGAATGAGTTTGGTTTT
F120	F:GAATGATCTGGTTGCTGAATACC	F202	F:AGTTTTACCCGCTTTCAGTGTTA
	R:AGAGATTTGGACATCTGATGGAA		R:GGGAATGAACATGAGTTTCAGTA
F123	F:GGACAAAATGGTTCAGAATTTCA	F203	F:GTTATCAGTAGATGCAACCGCAC
	R:AAAGAAAGAATCAAATTCGTCGTC		R:AACACCGGTTTTCAACATTTCT

[0022] 本发明还提供了一种上述SSR分子标记引物组在白蜡良种选育或亲本选配中的应用;以及上述SSR分子标记引物组在白蜡杂种优势预测中的应用。

[0023] 本发明还提供了一种预测白蜡杂种优势的方法,包括如下步骤:利用上述的引物组对亲本材料进行PCR扩增,利用Nei遗传距离公式计算各亲本间的遗传距离,筛选出亲本间遗传距离>1的杂交组合。

[0024] 在本发明中,所述杂种优势优选的包括树高和胸径,所述白蜡优选的包括绒毛白蜡和美国红椴。本发明对于Nei遗传距离公式的具体计算方法没有特殊限定,通过SAS/STAT软件计算各亲本间的遗传距离。在本发明中,所述遗传距离的范围优选为1.1-1.5。

[0025] 本发明对白蜡亲本间遗传距离与子代杂种优势、配合力的相关性进行研究,具体采用7个白蜡亲本进行不完全双列杂交,共配置了10个组合,计算亲本的一般配合力、特殊配合力、杂种优势,并结合SSR标记对7个白蜡亲本无性系进行遗传多样性分析,进而分析亲本遗传距离与子代杂种优势、亲本配合力之间的相关关系。结果表明2组白蜡杂交组合子代的树高、胸径的表型值与杂种优势在不同杂交组合间差异较大,均达到显著或极显著水平。配合力分析发现,白蜡一般配合力和特殊配合力在不同亲本不同性状间存在明显差异。14个微卫星标记在亲本中均呈现高度多态,共检测到49个等位基因,多态位点百分率为87.72%,Nei'S基因有效等位基因指数(Ne)为2.6656,Shannon信息多样性指数(I)为1.0666,遗传多样性水平较高。不同亲本间遗传距离(GD)为0.0565~1.7996,相关性分析发现,遗传距离与杂交子代树高生长量、树高杂种优势、树高父本一般配合力(GCA_{p_2})、树高一般配合力之和及树高特殊配合力SCA均呈显著的正相关关系,相关系数分别为0.637、

0.695、0.700、0.642、0.703。而与树高母本一般配合力和胸径的遗传参数的相关性都不显著。说明利用本发明SSR标记预测白蜡杂种优势是可行的,为白蜡良种选育及亲本选配提供参考依据。

[0027] 在本发明中,利用上述引物组对亲本材料进行PCR扩增时,所述PCR的反应程序优选为94℃预变性3min,94℃变性1min,54℃-58℃退火1min,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10min,4℃10min终止反应。所述PCR的反应体系按照重量份数计优选为:25mmol/LMg²⁺0.8份、10μmol/L引物0.2份、10mmol/L dNTP 0.3份、5U/μL Taq酶0.05份、5~10ng/μL DNA模板2.00份、10×PCR缓冲液1.0份,ddH₂O 5.45份。本发明对于上述各成分的具体来源没有特殊限定,采用本领域常规市售产品均可。

[0028] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0029] 实施例1

[0030] 2013年3月,选取鲁蜡3号(*Fraxinus velutina* ‘Lu la San hao’)、R36-1(*Fraxinus velutina* ‘R36-1’)、R37(*Fraxinus velutina* ‘R37’)为母本,鲁蜡4号(*Fraxinus velutina* ‘Lu la Si hao’)、鲁蜡5号(*Fraxinus pennsylvanica* ‘Lu la Wu hao’)、J2(*Fraxinus velutina* ‘J2’)和J5(*Fraxinus velutina* ‘J5’)为父本,采用不连续的析因交配设计共获得10组杂交组合(见表1),其中鲁蜡3号(品种权号20100013)和鲁蜡4号(品种权号20100014)为山东省林业科学研究院选育的耐盐绒毛白蜡(*Fraxinus velutina*)新品种,鲁蜡5号(品种权号20100015)为山东省林业科学研究院选育的速生美国红栲(*Fraxinus pennsylvanica*)的新品种;R36-1、R37、J2和J5为本研究收集选育的优良绒毛白蜡新种质。

[0031] 2013年11月中旬采收杂交种,同时采集3个母本的半同胞家系种子作为对照。2014年3月底于山东省林业科学研究院试验苗圃育苗。杂交种子用35℃~40℃水浸泡5d~7d,隔天换一次水。采用轻基质无纺布容器进行播种育苗,容器直径12cm、高15cm。基质成份为草炭:蛭石V/V=3:1,用0.15%多菌灵消毒处理基质。播种前一天将容器内基质浇透水,每容器播种2~3粒种子,事先挖穴,穴深1~1.5cm,播种后用1~2cm厚度的蛭石覆盖,随即浇水。

[0032] 2015年4月,将轻基质无纺布容器繁育的杂交种子苗,采用完全随机区组试验设计,每小区10株,4次重复,株行距为3m×4m,定植于山东省林业科学研究院寿光试验基地,及时浇透水,待水渗透后再覆土,试验林采用常规抚育管理。试验林地处于东经118°32′~119°10′,北纬36°41′~37°19′,年均气温13.2℃,年均降水量708.4毫米,立地条件中等。2019年10月底树木落叶后,对5年生10个杂交组合子代及3个亲本的半同胞家系子代逐株调查树高、胸径。

[0033] 杂种优势计算公式(李义良等,2012)为: $H = (F_i - MP) / MP \times 100\%$,式中, F_i 为任意一个组合杂种子代的性状平均值,MP为各亲本的自由授粉子代性状平均值。各性状方差分析线性模型、配合力方差分析及遗传力等参数分析方法参照(董虹好等,2017)。各性状方差分析、配合力方差分析采用SAS/STAT软件。

[0034] 对寿光试验站5年生试验林进行树高和胸径调查,以期选出综合性状表现优良的杂交组合。10个杂交组合子代全同胞家系和母本R37、R36、R36-1半同胞家系5年生树高和胸径见表1,绒毛白蜡与美国红栲种间2号杂交组合R37×鲁蜡5号树高最高为6.42m,其次绒毛白蜡种内1号杂交组合R37×鲁蜡4号为5.93m,而最小组合是16号绒毛白蜡种内组合R36-1

×鲁蜡4号为4.68m;树高变幅6.42m~4.68m,最大相差1.74m,这表明不同杂交组合间树高变异较大。胸径最大组合是种间2号,最小组合是种内7号,变幅8.98cm~6.51cm,最大相差2.47cm。各杂交组合树高的标准差在0.01m~0.59m,变异系数在0.20%~11.72%之间,胸径的标准差在0.03cm~0.97cm,变异系数在0.42%~13.59%间。因此,在各杂交组合间子代生长性状存在广泛变异,选择优良杂交组合是可行的。

[0035] 表1杂交子代性状分析

编号 杂交组合		树高 (m)	标准差	变异系数 (%)	胸径 (cm)	标准差 SD	变异系数 (%)
1	R37×鲁蜡 4 号	5.93	0.49	8.26	7.52	0.51	6.78
3	R37×J5	4.88	0.30	6.15	7.14	0.97	13.59
4	R37×J2	4.95	0.58	11.72	7.05	0.54	7.66
种内	5 鲁蜡 3 号×鲁蜡 4 号	4.84	0.18	3.72	7.66	0.48	6.27
7	R36-1×J5	4.71	0.59	12.53	6.51	0.73	11.21
[0036]	13 R36-1×J2	4.98	0.01	0.20	7.21	0.03	0.42
16	R36-1×鲁蜡 4 号	4.68	0.28	5.98	7.22	0.51	7.06
种间 2	R37×鲁蜡 5 号	6.42	0.43	6.70	8.98	0.91	10.13
6	鲁蜡 3 号×鲁蜡 5 号	5.68	0.23	4.05	8.12	0.28	3.45
14	R36-1×鲁蜡 5 号	4.74	0.48	10.13	6.61	0.75	11.35
对照	17 R37	5.14	0.24	4.67	7.14	0.23	3.22
18	鲁蜡 3 号	5.20	0.16	3.08	7.13	0.09	1.26
19	R36-1	4.80	0.34	7.08	7.02	0.30	4.27

[0037] 杂交组合子代间存在这些变异是否达到了显著水平,需要用方差分析验证,表1中各个性状的方差分析结果见表2。从表中可以看出,树高、胸径性状的杂交组合间的差异均达极显著水平($P < 0.01$)。

[0038] 表2杂交组合各个性状方差分析

		平方和	自由度	均方	F	概率 P 值	遗传力
[0039]	树高						
	组间 (组合)	10.308	12	0.859	6.217	0.000	0.839
	组内	3.592	26	0.138			
	总计	13.900	38				
	胸径						
	组间 (组合)	15.039	12	1.253	3.955	0.002	0.747
	组内	8.238	26	0.317			
	总计	23.277	38				

[0040] 由上述分析可知,杂交组合之间树高和胸径存在广泛变异,并且达到极显著水平。杂交组合之间存在这些变异是由遗传因素引起还是由环境因素引起,需要用遗传力这个参数来证明。遗传力是指遗传方差占表型方差的比率。性状遗传力大,说明该性状受遗传控制较强,受环境影响较弱。由表2可知,树高、胸径性状的遗传力均大于0.7以上。因此表明,白蜡杂交子代的生长性状主要受遗传因素控制,受环境影响较小。

[0041] 各性状的多重比较和杂种优势分析结果见表3,2号杂交组合的树高、胸径与其它杂交组合均达到1%的极显著差异;6号杂交组合的树高、胸径与其它杂交组合均达到5%的显著差异;1号杂交组合的树高与其它杂交组合均达到5%的显著差异,而胸径差异均不显著。表明各杂交组合子代间生长性状存在显著差异,选择优良杂交组合提高杂种优势利用是可行的。

[0042] 从表3杂种优势的结果可以看出,不同组合间的杂种优势差异较大。绒毛白蜡种内树高和胸径的杂种优势变化于-6.92%~15.37%和-7.26%~7.43%。绒毛白蜡和美国红栲种间树高和胸径的杂种优势变化于-1.25%~24.9%和-5.84%~25.77%,种间的杂种优势优于种内杂种优势。2号杂交组合树高和胸径的杂种优势最高,其次为6号,说明这2组杂交组合通过亲本间杂交,可为下一世代的育种创造变异丰富的基本群体,杂交后代易获得较高的杂种优势。

[0043] 表3杂交苗生长性状表现及杂种优势

	编号	杂交组合	树高 (m)	显著水平	杂种优势	胸径 (cm)	显著水平	杂种优势	
[0044]	1	R37×鲁蜡 4 号	5.93	ab	15.37	7.52	bcd	5.32	
	3	R37×J5	4.88	d	-5.06	7.14	bcd	0.00	
	4	R37×J2	4.95	d	-3.70	7.05	bcd	-1.26	
	种内	鲁蜡 3 号×鲁蜡 4 号	4.84	d	-6.92	7.66	bc	7.43	
	7	R36-1×J5	4.71	d	-1.88	6.51	d	-7.26	
	13	R36-1×J2	4.98	d	3.75	7.21	bcd	2.71	
	16	R36-1×鲁蜡 4 号	4.68	d	-2.50	7.22	bcd	2.85	
	2	R37×鲁蜡 5 号	6.42	a	24.90	8.98	a	25.77	
	种间	鲁蜡 3 号×鲁蜡 5 号	5.68	bc	9.23	8.12	ab	13.88	
	14	R36-1×鲁蜡 5 号	4.74	d	-1.25	6.61	cd	-5.84	
	对照	17	R37	5.14	cd	0.00	7.14	bcd	0.00
	18	鲁蜡 3 号	5.20	cd	0.00	7.13	bcd	0.00	
	19	R36-1	4.80	d	0.00	7.02	cd	0.00	

[0045] 注:用spss法测验,同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

[0046] 生长性状配合力分析结果见表4。白蜡一般配合力效应值在不同亲本不同性状间存在明显差异,7个亲本树高的一般配合力效应值依次为鲁蜡5号>R37=鲁蜡3号>J2>鲁蜡4号>J5>R36-1;7个亲本胸径的一般配合力效应值依次为鲁蜡5号>R37>鲁蜡3号>J2>鲁蜡4号>R36-1>J5。这些亲本的遗传特性均存在差别,其中母本“R37”和父本“鲁蜡5号”的树高、胸径一般配合力效应值均较大,因此,母本“R37”、“鲁蜡3号”和父本“鲁蜡5号”是育种值较高的亲本,作为今后杂交育种中的优选亲本,其杂交组合更容易得到优良子代。

[0047] 对10个杂交组合全同胞家系树高、地径的特殊配合力效应进行分析,表4结果表明,不同杂交组合家系的树高、胸径各个性状上的差别较大,树高和胸径的特殊配合力效应值变幅分别为-0.66-1.04,-0.42-0.95。其中R37×鲁蜡5号组合家系在树高和地径上具有最大特殊配合力效应值1.04和0.95,其次鲁蜡3号×鲁蜡5号组合家系在树高和地径上特殊配合力效应值0.79和0.80,特殊配合力效应值越高,杂种优势越明显,因此R37×鲁蜡5号、鲁蜡3号×鲁蜡5号杂交可作为白蜡杂交育种的优选组合。

[0048] 表4杂交苗性状分析

编号	亲本组合	树高一般		树高特殊 配合力	胸径一般		胸径特殊 配合力
		配合力	配合力		配合力	配合力	
		母本	父本		母本	父本	
1	R37×鲁蜡 4 号	0.20	-0.12	-0.09	0.32	-0.15	-0.24
2	R37×鲁蜡 5 号	0.20	0.38	1.04	0.32	0.41	0.95
3	R37×+J5	0.20	-0.27	-0.66	0.32	-0.49	-1.00
[0049]	R37×J2	0.20	-0.10	-0.42	0.32	0.12	-0.32
5	鲁蜡 3 号×鲁蜡 4 号	0.20	-0.12	-0.55	0.22	-0.15	-0.60
6	鲁蜡 3 号×鲁蜡 5 号	0.20	0.38	0.79	0.22	0.41	0.80
7	R36-1×J5	-0.29	-0.27	-0.34	-0.43	-0.49	-0.42
13	R36-1×J2	-0.29	-0.10	0.10	-0.43	0.12	0.46
14	R36-1×鲁蜡 5 号	-0.29	0.38	0.34	-0.43	0.41	0.51
16	R36-1×鲁蜡 4 号	-0.29	-0.12	-0.22	-0.43	-0.15	-0.11

[0050] 实施例2

[0051] 采用表5所示的14对引物序列对实施例1所记载的7个亲本材料进行PCR扩增,具体为:采集上述7个亲本当年生嫩叶,提取DNA进行SSR标记试验。采用CTAB法提取基因组DNA,并略做改进,提取缓冲液中加入2%β-巯基乙醇和2%PVP。紫外分光光度法测定DNA的浓度和纯度,稀释至30ng/μl。

[0052] SSR-PCR采用10μl反应体系:25mmol/l Mg²⁺0.8μl、10μmol/l引物0.2μl、10mmol/l dNTP 0.3μl、5U/μl Taq酶0.05μl、5~10ng/μl DNA模板2.00μl、10×PCR缓冲液1.0μl, ddH₂O 5.45μl;PCR反应条件为94℃预变性3min,94℃变性1min,54℃~58℃退火1min,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10min,4℃10min终止反应。

[0053] 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测:PCR产物用6%的变性PAGE电泳检测,电泳结束后用硝酸银染色观察结果。根据PAGE凝胶电泳结果读取扩增的谱带,将每一个SSR扩增位点看成是1个基因位点,每一个位点标识为AA,BB,CC,AB,BC,AC等等组成原始数据。利用获得的SSR数据,采用POPGENE软件计算多态位点百分率(PPL)、Shannon信息多样性指数(I)、Nei's基因多样性指数(HE)。

[0054] 结果如表5所示,每对引物扩增出的位点数目为76~187条不等,每位点等位基因数2~4,共检测到49个等位基因,每个位点的平均等位基因数为3.5。14对SSR引物在亲本群体中扩增的总条带数为57条,平均每对引物4.07条,多态条带50条,多态位点百分率(PPL)为87.72%,Nei'S基因有效等位基因指数(Ne)为2.6656,Shannon信息多样性指数(I)为1.0666。

[0055] 表5 SSR引物扩增位点数和多态性信息含量

[0056]

引物名	引物序列 (5→3')	片段大小	重复基序	等位基因 Na	有效等位基因 Ne	多样性指数 I
F82	F:TTGACTCGTGTTTAGGGATGAAT	154	CAG(3*5)	4	2.2456	1.0408
	R:AGCTCTGAAGGGAAAATTTGAA					
F92	F:GATTCTCCATACATGTGCTCTCC	138	ACCGGC(6*4)	4	3.3793	1.3013
	R:TAAAAAGTGAAACCCCTTTCGTTG					
F93	F:GAAAAGGAGGAGAGTGGGAATAC	142	GAA(3*5)	3	2.6122	1.0239
	R:GCTCCATTTCACTTCAACTCTTC					
F95	F:AGAATAGATGAGGATGAAGGGGA	150	GAA(3*6)	3	2.3902	0.98
	R:CTAACTCATCCCTCTGCGAAAC					

F112	F:CCATTGTCAATTTGCAGATTCTT	141	ATT(3*5)	3	2.3902	0.98
	R:GTCTGGAAATGTTGATCCTGAAA					
F120	F:GAATGATCTGGTTGCTGAATACC	136	GAG(3*6)	3	2.3902	0.98
	R:AGAGATTTGGACATCTGATGGAA					
F123	F:GGACAAAATGGTTCAGAATTTCA	151	CGG(3*5)	4	3.5556	1.3209
	R:AAAGAAAGAATCAAATTCGTCGTC					
F144	F:GATAGTGGGGGAAGAATAAGTCC	104	AGC(3*5)	4	3.6	1.3297
	R:TCATTCCAACCTCAATGAACCTCCT					
F147	F:GGATAGTGGGGGAAGAATAAGTC	106	AGC(3*5)	4	3.1304	1.2367
	R:CTCATTCCAACCTCAATGAACCTCCT					
F167	F:TGAGCAAATGTGAAGACCGTAG	156	TGG(3*5)	2	3.1304	1.2367
	R:TAATTTTCATCCACCAGTTTCCAC					
F186	F:TCTTCACGTCTTCTGTTTGTTC	114	GTAGAA(6*4)	4	2.3902	1.0547
	R:GAAAACGTGTGAATGAGTTTGGT					
F187	F:TCGATCTTTCCATCTAAACAAGC	151	GTAGAA(6*4)	3	1.8551	0.7775
	R:AACGTGTGAATGAGTTTGGTTTT					
F202	F:AGTTTTACCCGCTTTCAGTGTTA	113	GTG(3*5)	4	3.4286	1.3086
	R:GGGAATGAACATGAGTTTCAGTA					
F203	F:GTTATCAGTAGATGCAACCGCAC	154	GTG(3*5)	4	2.5128	1.1164
	R:AACACCGGTTTTCAACATTCT					
Mean				3.5	2.6656	1.0666

[0057]

[0058] 利用Nei遗传距离公式通过SAS/STAT软件计算亲本间的遗传距离(Dg),结果如表6所示:绒毛白蜡种内6个亲本间(R37、鲁蜡3号、R36-1、鲁蜡4号、J5和J2)遗传距离变幅为0.0565~0.9444,平均遗传距离为0.6472,;绒毛白蜡亲本(R37、鲁蜡3号、R36-1)与美国红椴亲本(鲁蜡5号)种间的遗传距离为1.1985~1.7996,平均遗传距离为1.4753,变异系数为40.74%。表明白蜡属绒毛白蜡与红椴种间亲本的遗传距离要远远大于绒毛白蜡种内亲本的遗传距离。10个杂交组合的亲本间遗传距离存在较大的差异,R36-1与鲁蜡5号遗传距离最大为1.7996,最小的遗传距离为R36-1与鲁蜡4号0.0565。其中杂种优势显著的R37×鲁蜡5号组合和鲁蜡3号×鲁蜡5号组合的亲本遗传距离为1.1985~1.4277之间。

[0059] 表6亲本间的遗传距离

	父本				
	母本	鲁蜡5号	鲁蜡4号	J5	J2
[0060]	R37	1.1985	0.3158	0.9438	0.8753
	鲁蜡3号	1.4277	0.4133	0.7498	0.8602
	R36-1	1.7996	0.0565	0.9444	0.6661

[0061] 实施例3

[0062] 杂种优势与亲本遗传距离的相关分析。在Microsoft Office Excel中构建子代杂种优势随亲本配合力、遗传距离变化的散点图,通过软件检测子代杂种优势与亲本配合力、遗传距离一元线性回归模型的拟合程度,并建立相应的一元线性回归方程。利用sppss21.0统计分析软件将亲本间的遗传距离分别与子代杂种优势、配合力进行相关分析,结果如表7所示。

[0063] SSR标记遗传距离与杂交子代树高生长量、树高杂种优势、树高父本一般配合力、树高一般配合力之和树高特殊配合力均呈显著的正相关关系,相关系数介于0.642~0.703之间,与树高母本一般配合力相关性不显著。SSR标记遗传距离与胸径的遗传参数的相关性分析发现相关性都不显著,比较相关系数发现,SSR标记遗传距离与特殊配合力相关系数最高,父本一般配合力次之。对比SSR标记遗传距离与树高、胸径的相关系数发现,均与父本一般配合力和特殊配合力相关系数最高,相关系数介于0.544~0.703之间;但与母本的一般配合力的相关系数较低在0.241~0.244。进一步通过回归分析发现:亲本间遗传距离与树高杂种优势、胸径杂种优势、亲本 $GCA_{P_1+P_2}$ 和SCA呈显线性相关关系(表7)。其显著性检验结果表明,亲本遗传距离与树高杂种优势、亲本 $GCA_{P_1+P_2}$ 和SCA达到显著或极显著水平,而其他线性方程检验均未达到显著或极显著水平。

[0064] 表7白蜡遗传距离与杂种优势、配合力相关性

遗传参数	相关系 数	Sig.	遗传参数	相关系 数	Sig.
遗传距离&树高			遗传距离&胸径		
Genetic distance & plant height	0.637	0.048	Genetic distance & Diameter at breast height	0.138	0.704
遗传距离&树高杂种优势			遗传距离&胸径杂种优势		
Genetic distance & Heterosis of plant height	0.695	0.032	Genetic distance & Heterosis of diameter at breast height	0.399	0.253
遗传距离&树高母本一般配合力			遗传距离&胸径母本一般配合力		
Genetic distance & GCA _{P1} of plant height	0.241	0.503	Genetic distance & GCA _{P1} of diameter at breast height	0.244	0.497
遗传距离&树高父本一般配合力			遗传距离&胸径父本一般配合力		
Genetic distance & GCA _{P2} of plant height	0.700	0.024	Genetic distance & GCA _{P2} of diameter at breast height	0.559	0.093
遗传距离&树高一般配合力之和			遗传距离&胸径一般配合力之和		
Genetic distance & GCA _{P1+P2} of plant height	0.642	0.045	Genetic distance & GCA _{P1+P2} of diameter at breast height	0.544	0.104
遗传距离&树高特殊配合力			遗传距离&胸径特殊配合力		
Genetic distance & SCA of plant height	0.703	0.023	Genetic distance & SCA of diameter at breastheight	0.586	0.075

[0066] 亲本间SSR遗传距离与子代生长性状的相关性在亲本遗传距离与子代生长性状的散点图中可以得到更直观地反映(图1)。随着亲本间遗传距离的增大,树高杂种优势、亲本GCA_{P1+P2}和SCA呈显著性增加,当遗传距离大于1时,趋于正向相关。散点图可以看出,亲本遗传距离与树高特殊配合力相关系数最大为0.4936,其次为亲本遗传距离与树高父本一般配合力GCA相关系数为0.4899,散点图和回归直线对比分析相吻合。进一步通过回归分析发现:亲本间遗传距离与树高杂种优势、胸径杂种优势、亲本GCA_{P1+P2}和SCA呈显线性相关关系(表7)。其显著性检验结果表明,亲本遗传距离与树高杂种优势、亲本GCA_{P1+P2}和SCA达到显著或极显著水平,而其他线性方程检验均未达到显著或极显著水平。

[0067] 经以上实施例可得,母本“R37”、“鲁蜡3号”和父本“鲁蜡5号”,一般配合力较高,其中R37×鲁蜡5号、鲁蜡3号×鲁蜡5号组合家系在树高和地径上具有最大特殊配合力效应值,其组合杂交优势也最强。亲本一般配合力越高,其特殊配合力效应值也越高,由此说明,亲本一般配合力是影响组合杂种优势的重要因素之一。因此,先选择一般配合力较高的亲本进行配组,再从中选择特殊配合力也高的组合,才能有效提高组合的杂种优势,筛选出强优势的杂交组合。

[0068] 配合力对子代生长性状表现和杂种优势的预测能力较强,可以作为选配亲本、预测子代杂种优势的重要依据。遗传距离与杂种优势、配合力的线性相关结果表明,GD(遗传距离)与子代生长性状表型值、杂种优势、亲本的 $GCA_{P_1+P_2}$ (双亲一般配合力之和)、 GCA_{P_2} (父本一般配合力)、SCA(特殊配合力)呈显著的正相关,GD与 $GCA_{P_1+P_2}$ 、子代表型值、杂种优势的相关性最强, GCA_{P_2} 次之, GCA_{P_1} 最弱,选择育种时用 $GCA_{P_1+P_2}$ 对子代表型值和杂种优势进行预测应较 GCA_{P_1} 和 GCA_{P_2} 更具准确性。因此,在育种时,对于已营建测定林的亲本选配可以优先采用 $GCA_{P_1+P_2}$ 来预测子代生长性状的表型值,采用SCA来预测子代生长性状的杂种优势;而对于未营建测定林的亲本选配,基于一定水平的遗传距离分析也可以较准确地实现对子代生长性状表型值和杂种优势的预测。

[0069] 本发明实施例结果表明,随着亲本间遗传距离的增大,树高和胸径杂种优势均增加,当遗传距离大于1时,趋于正向相关关系,与树高杂种优势呈显著性增加。即亲本遗传距离远的杂交组合得到杂种优势强的几率越大。表明了采用SSR分子标记进行白蜡遗传多样性分析、杂种优势预测等方面的实践可能性。但本研究中得出的遗传距离与杂种优势间的相关系数为0.695,对10个组合杂种优势与遗传距离的对比研究发现,并不是遗传距离越大其杂种优势效应越强,而是遗传距离范围在1.1985~1.4277之间的2个杂交组合表现为强优势。由此说明,遗传距离在一定范围内的亲本间进行组配,更有利于杂种优势的表现。所以筛选母本与父本遗传距离大于1的亲本,可获得明显的杂种优势。特别是本发明基于分子水平的进行遗传距离分析,采用SSR标记快速筛选出亲本间遗传距离1.1~1.5的杂交组合,不需要营建子代测定林即可获得亲本的选配,后代杂种优势显著,可极大地缩短林木育种周期,林木育种周期缩短4~5年。

[0070] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 山东省林业科学研究院

山东华博基因工程有限公司

<120> 一种用于预测白蜡杂种优势的SSR标记及其应用

<160> 28

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

ttgactcgtg tttagggatg aat 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

agctcttgaa gggaaaattt gaa 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gattctccat acatgtgctc tcc 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

taaaaagtga aaccctttcg ttg 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gaaaaggagg agagtgggaa tac 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
gctccatttc acttcaactc ttc 23
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
agaatagatg aggatgaagg gga 23
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
ctaactcatc cctctgcgaa ac 22
<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
ccattgtcaa ttgacagatt ctt 23
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
gtctggaaat gttgatcctg aaa 23
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
gaatgatctg gttgctgaat acc 23
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12

agagatttgg acatctgatg gaa 23
<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 13
ggacaaaatg gttcagaatt tca 23
<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 14
aaagaaagaa tcaaattcgt cgtc 24
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 15
gatagtgggg gaagaataag tcc 23
<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 16
tcattccaac tcaatgaact cct 23
<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 17
ggatagtggg ggaagaataa gtc 23
<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 18
ctcattccaa ctcaatgaac tcc 23
<210> 19
<211> 22

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 19
tgagcaaatg tgaagaccgt ag 22
<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 20
taatttcate caccagtttc cac 23
<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 21
tcttcacgtc ttctgtttgt tca 23
<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 22
gaaaacgtgt gaatgagttt ggt 23
<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 23
tcgatctttc catctaaaca agc 23
<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 24
aacgtgtgaa tgagtttggt ttt 23
<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 25

agttttcacc gctttcagtg tta 23
<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 26
gggaatgaac atgagtttca gta 23
<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 27
gttatcagta gatgcaaccg cac 23
<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 28
aacaccggtt ttcaacattt ct 22

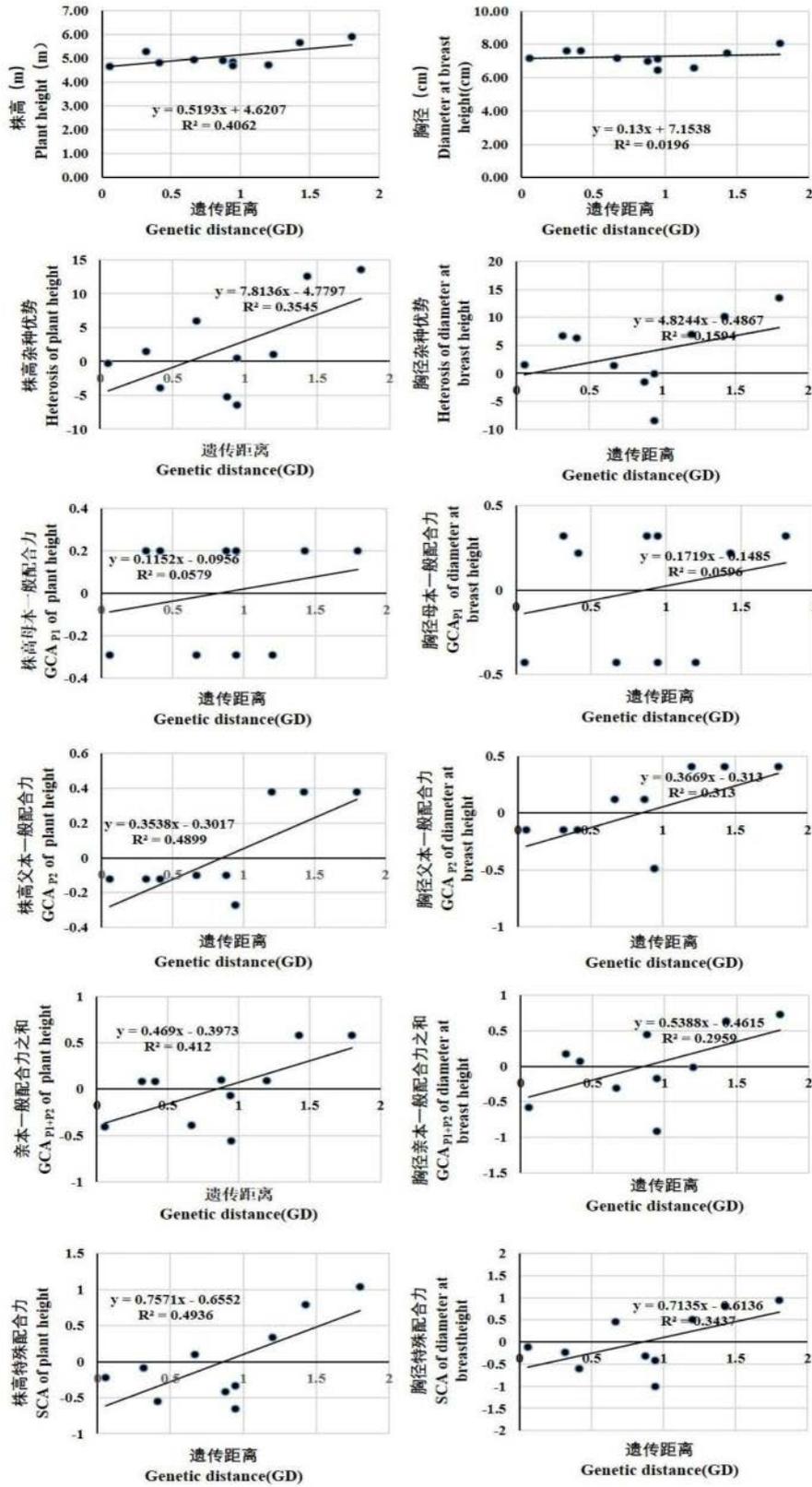


图1