

小叶杨雄性特异序列在杨树早期性别鉴定中的应用

王子玥¹, 雷一婧¹, 刘冠卿^{2,3}, 宁仪杭¹, 倪润欣¹, 张韬^{2,3}, 席梦利^{1*}

(1. 南京林业大学,南方现代林业协同创新中心 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室 江苏 南京 210037; 2. 扬州大学农学院,江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室/生物育种钟山实验室/植物功能基因组学教育部重点实验室 江苏 扬州, 225009; 3. 扬州大学,江苏省作物遗传生理重点实验室/江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心 江苏 扬州, 225009)

摘 要: 基于小叶杨 (*Populus simonii*) 雌株和雄株基因组, 开发杨树幼苗期早期鉴定性别的技术体系, 并检验该方法在青杨派 (*Tacamahaca*) 和黑杨派 (*Aigeiros*) 树种性别鉴定中的可靠性, 为控制杨絮污染提供辅助手段, 有助于对不同性别的杨树进行合理应用。利用高通量测序技术和生物信息学分析手段, 筛选小叶杨雄株特异的基因组 DNA 序列, 并设计引物, 以已知性别的杨树基因组 DNA 为模板进行 PCR 验证, 利用 Sanger 测序分析序列特点, 通过荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization) 技术, 定位小叶杨雄株特异序列在染色体上的位置。1) 使用第三代纳米孔测序技术对小叶杨雌株和雄株基因组进行测序并采用生物信息学方法分析, 筛选出一段小叶杨雄株特异的基因组 DNA 序列, 该序列可以准确鉴定小叶杨和美洲黑杨 (*Populus deltoides*) 的性别。2) 使用小叶杨雄株特异性序列及其引物在已知性别的 32 个杨树中进行 PCR 扩增检测, 每个杨树代表一个单独的基因型。电泳结果显示, 在被检测的所有雄株 (19 个) 中都可以扩增出一条清晰明亮约 400 bp 的片段, 而在所有雌株 (13 个) 中没有扩增出任何条带。3) 选取代表性的 7 个雄株, 分别以其基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 并对扩增产物进行 Sanger 测序。测序结果显示, 小叶杨雄性特异序列在小叶杨和以小叶杨为父本、美洲黑杨为母本的杂交后代中保持一致, 说明这段序列在减数分裂的过程中没有发生重组, 即该区域发生了重组抑制。尽管该序列在美洲黑杨树种中没有发生变异, 但青杨派与黑杨派树种之间, 这段雄性特异序列存在 3 个碱基的差异。4) 以杨树 19 号染色体特异的寡核苷酸库和小叶杨雄株特异的 DNA 序列为探针, 通过荧光原位杂交技术, 将这段小叶杨雄株特异的 DNA 序列定位在了小叶杨雄株 19 号染色体的短臂末端。本研究筛选出了一段小叶杨雄株特异的 DNA 序列, 并通过 PCR 扩增、Sanger 测序和荧光原位杂交等技术手段发现这段特异序列显示出性别连锁遗传的特点, 可以作为青杨派及黑杨派树种性别鉴定的分子标记, 该序列在杨树早期性别鉴定中具有重要应用价值, 并为进一步揭示杨属植物性别决定的分子机制以及性染色体演化奠定了工作基础。