

T/JSF

团 体 标 准

T/JSF XXXX—2XXX

美洲黑杨性别早期鉴定的微卫星分子标记 技术规程

Technical regulations for molecular markers for early sex identification in *Populus
deltoides*

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

江苏省林学会 发 布

前 言

本标准严格按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写规则》的要求进行起草。

本标准的某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由江苏省林学会提出并发布。

本标准由南京林业大学；江苏省黄海农场有限公司；泗洪县半城马浪湖林场起草。

本标准主要起草人：尹佟明；吴怀通；李淑娴；凌杰；王淼；戴晓港；陈赢男；侯静；韦素云

美洲黑杨性别早期鉴定的微卫星分子标记技术规范

1 范围

本标准规定了以美洲黑杨(*Populus deltoides*)幼嫩组织(叶片、芽等)为材料,利用分子标记法对美洲黑杨性别进行分子鉴定的术语、原理、主要仪器和设备、试剂与溶液、操作程序和鉴定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

3.1 分子标记 Molecular Markers

指以直接检测 DNA 核苷酸序列的差异为基础的遗传标记。

3.2 微卫星 microsatellite

简单重复序列 simple sequence repeats; SSR

也称基因组中由 2 个~6 个核苷酸组成的 DNA 串联重复序列。

3.3 性别鉴定 sex discrimination

指对雌雄异株植物通过分子标记技术鉴定性染色体确定植株性别。

4 原理

美洲黑杨属于雌雄异株植物,为 XY 性别决定型,其性别二态性主要体现在花器官差异。雌性花器官由多个雌蕊构成的柔荑花序,不含雄蕊;雄性花器官由多个雄蕊构成的柔荑花序,不含雌蕊。在达到性成熟后,雌性花器官授粉产生大量包裹种子的飞絮,造成了严重的环境污染;雄株则不产生飞絮。所以,通过选育不飞絮雄性良种进行现有品种的更新替代,可以从根本上杜绝杨絮的产生,推动杨树产业的发展。但是,美洲黑杨的童期一般是 5-7 年,无法在性成熟前通过外观直接鉴定性别。所以在品种的选育过程中,由于不能在苗期进行性别鉴定,往往需要等到植株开花后才能选育不产生杨絮的雄株,淘汰产生杨絮的雌株,该做法既浪费了一半的财力人力,也提高了一倍的工作量。另外,对市场上 1~3

年生的商品树苗不能鉴定其性别，容易存在雌株混入雄性品种中，造成飞絮对环境的污染。因此，建立美洲黑杨性别早期鉴定的标准体系，不仅可以提高不飞絮雄性良种的选育效率，还有助于对美洲黑杨商品苗性别的检测，减少雌性商品苗的流通。

项目申请团队以美洲黑杨为材料，通过群体遗传学和全基因组关联分析，发现美洲黑杨的性别决定区间（SDR）位于 19 号染色体（Chr.19）的末端。同时对性别决定区间的 X 和 Y 单倍型拆分，结合区间预测基因的时空表达模式和遗传转化功能验证，确定美洲黑杨性别由 SDR-Y 单倍型中一段 42Kb 的特异序列上的两个基因（*FERR* 和 *MSL*）决定，在 X 单倍型上不存在等位基因序列。因此，我们在美洲黑杨性别决定基因所在的 Y 单倍型 42Kb 区间内开发通用 SSR 引物（NJFU582、NJFU600 和 NJFU602），在自然群体中进行实验检测，结果显示所开发的 3 对通用 SSR 引物均在雄株中可以获得单一扩增产物，均在雌株中不能获得任何扩增产物。综上，当依据本标准进行美洲黑杨性别鉴定时，可采集待测植株根茎叶等任一幼嫩组织提取 DNA 为模板，以本标准公布的微卫星引物进行 PCR 扩增，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物，若待测样品检测到单一扩增产物，即为雄株；若未检测到扩增产物，则为雌株。

5 主要仪器和设备

5.1 样品快速研磨仪（样品量 48×2ml，速度 10-70HZ/秒）

5.2 双板夹芯式垂直电泳槽（凝胶板 120mm×180mm，40 齿，1.00mm 厚）。

5.3 离心机 12000 r/min。

5.4 微量可调移液器(2 μL、10 μL、100 μL、1000 μL)。

5.5 PCR 扩增仪。

5.6 EPS-300 数显式稳压稳流电泳仪(电压 10V~300V，电流 10mA~400mA)。

5.7 全自动数码凝胶图像分析系统(透射紫外波长：302nm，透射紫外面积：20 cm×20cm)。

5.8 微量核酸蛋白检测仪(波长范围：190nm~840nm，波长精度 1nm，检测范围 2ng/μL~15000ng/μL)。

6 试剂与溶液

6.1 除非另有说明，在分析中所使用的所有试剂均为分析纯。实验中所使用的水均为无菌超纯水。

6.2 1mol/L Tris-HCl (pH8.0): 称取 121.1 g 三羟基甲烷（Tris）溶解于 800 mL 超纯水，约加入 42ml 的浓盐酸将 pH 值调到 8.0，定容到 1 L，200 mL 分装后高压灭菌，室温保存。

6.3 0.5mol/L Na-EDTA(pH8.0): 称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠（Na.EDTA）溶解到 700 mL 超纯水，约加入 20g 氢氧化钠（NaOH）调 pH 值至 8.0，定容到 1 L，分装后高压灭菌，室温保存。

- 6.4 5mol/L NaCl: 称取 58.44 g 氯化钠用 150 mL 超纯水溶解, 定容到 200 mL 后高温灭菌, 室温保存。
- 6.5 10% CTAB: 10g 溴代十六烷基三甲胺 (CTAB) 用双蒸水溶解后定容到 100 mL 后高压灭菌。
- 6.6 3mol/L 乙酸钠 (NaAc): 称取 40.8 g 三水乙酸钠溶解到 40 mL 超纯水, 加冰乙酸调 PH 至 5.2, 加去离子水定容到 100 mL 后高压灭菌, 室温保存。
- 6.7 三氯甲烷: 异戊醇: 240 mL 三氯甲烷和 10 mL 异戊醇, 混匀后在棕色瓶中室温保存。
- 6.8 10% PVP: 称取 10 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 粉末, 双蒸水溶解后定容到 100 mL, 高温灭菌。
- 6.9 CTAB 提取液: CTAB 提取液的主要成分为 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0)、20 mmol/L Na-EDTA (pH 8.0)、1.4 mol/L NaCl、2% CATB、2% PVP、1% β -巯基乙醇。在 50 mL 的超纯水中加入 10 mL 1 mol/L 的 Tris-HCl, 4 mL 0.5 mol/L 的 Na-EDTA, 28 mL 5 mol/L 的 NaCl, 20 mL 10% 的 CTAB, 20 ml 10% 的 PVP-40 溶液, 1 mL β -巯基乙醇 (用前加入), 定容到 100 mL。
- 6.10 TE 缓冲液: 1 mL 0.5 mol/L Na-EDTA, 5 mL 1mol/L Tris-HCl, 用双蒸水定容到 500 ml, 高压灭菌。
- 6.11 TBE 缓冲液 (5 $\times$): 称取 Tris 碱 270g, 硼酸 137.5g, 溶解到 800ml 的超纯水中, 再加 0.5 mol/L Na-EDTA 100ml, 在磁力搅拌器上溶解, 后用超纯水定量至 5L, 室温保存。
- 6.12 30%聚丙烯酰胺: 称取 580g 丙烯酰胺和 20g 双丙烯酰胺, 在磁力搅拌机的作用下, 溶解到 900ml 的超纯水中, 后用超纯水定容至 2L, 室温保存。
- 6.13 10%过硫酸铵溶液: 称取 15g 过硫酸铵 (AP), 溶解在 145ml 的超纯水中, 室温保存。
- 6.14 0.25%溴酚蓝: 称取 0.25g 二甲苯腈、0.25g 溴酚蓝和 40g 蔗糖, 溶解在 80ml 超纯水中, 定容至 100ml, 室温保存。

7 操作程序

7.1 取样

采集美洲黑杨待测植株的幼嫩叶片或其它幼嫩器官和组织 1.0g-5.0g, 放入 10ml 离心管或样品保存袋中, 先在液氮速冻后, 于-80℃超低温冰箱保存。

7.2 DNA 的提取、纯化及定量

7.2.1 CTAB 法提取 DNA:

- a) 取美洲黑杨新鲜幼嫩叶片 2-3 片或其它幼嫩组织 0.5-1.0 g, 放在 2ml 离心管中, 并加入直径 3mm 的氧化锆球 3 颗, 在液氮中迅速冷冻后, 放置在样品快速研磨仪中, 调整频率是 50 次/秒, 持

续研磨 1min。

- b) 向研磨后的离心管中加入 650 μL CTAB 提取液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol/L Na-EDTA, pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl; 2% CATB; 2% PVP; 1% β -巯基乙醇)。
- c) 加入 10 mg/mL Rnase 10 μL , 充分混匀。
- d) 放置在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中, 水浴 45 min 以上, 其间温和混匀 2-3 次。
- e) 向离心管中加入 500 μL 三氯甲烷:异戊醇(24: 1) 混合液, 上下颠倒混匀, 9800 rpm 离心 10 min, 转移离心上清液至新的 2.0 ml 离心管中。
- f) 向上清液中加入 600 μL 预冷异丙醇和 80 μL 的 3 mol/L 的 NaAc 溶液, 轻轻混匀, 静止 10 min 以上。
- g) 用 9800 rpm 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀即为提取到的 DNA。加入 70%的酒精清洗 DNA 两次。
- h) 待 DNA 风干后, 加入 200 μL TE 缓冲液溶解 DNA (4 $^{\circ}\text{C}$, 1~2 天), -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.2.2 DNA 定量及质量检测:

- a) 取 2 μL DNA 用微量核酸蛋白检测仪检测, 可以直接读出 DNA 浓度和 A260/280 的比值。若 A260/280=1.8 时, 证明提取 DNA 质量高; 若 A260/280=2.0 时, 证明提取 DNA 中含有大量 RNA; 若比值低于 1.8 或 2.0, 表示存在蛋白质或酚类物质的影响。
- b) 另取 3 μL DNA 加 3 μL 溴酚蓝, 在 1%的琼脂糖凝胶上电泳, 稳压 100 V, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE, 电泳结束后用凝胶成像系统记录拍照。
- c) 植物总 DNA 样品只呈现一条相对分子质量较大而迁移速率很小的整齐清晰条带。
- d) 对照微量核酸蛋白检测仪的定量结果, 将样品稀释成浓度为 20 ng/ μL , 在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

7.3 SSR 分子标记分型鉴定性别

7.3.1 SSR 引物是在美洲黑杨性别决定区间的 Y 特异区域开发的通用性引物, 并经过美洲黑杨种质资源群体库材料验证, 对美洲黑杨的性别鉴定实现 100%的准确性, 具体的引物编号、引物序列和扩增产物片段大小见附表 A

7.3.2 PCR 反应体系为 10 μL , 具体见表 1。

表 1 PCR 反应体系

成份	浓度	用量（μL）
PCR buffer	10×	1.0
MgCl ₂	25 mmol/L	1.0
dNTP	2 mmol/L	0.2
Primer F	5 μmol/L	1.0
Primer R	5 μmol/L	1.0
rTaq 酶	5 U/μL	0.1
DNA 溶液	20 ng/μL	1.0
H ₂ O		4.7

7.3.3PCR 反应程序：

反应液加入到 PCR 板后，在 2000 rpm 下离心 5 s，将 PCR 板用乳胶盖盖好后放入 PCR 仪中，PCR 的程序为：

- a) 95 ℃ 预变性 4 min。
- b) 94 ℃ 变性 40 s，57℃ 退火 45 s，72 ℃ 延伸 60 s，共 35 个循环。
- c) 72 ℃延伸 10 min，4 ℃ 保存。

7.3.4PCR 扩增产物检测：

PCR 产物检测采用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳，凝胶浓度为 30%，使用双板夹芯式垂直电泳槽，凝胶大小 120mm×180mm×1.0mm，电泳缓冲液为 0.5×TBE，电压 180V，电泳时长 1.5 小时，具体过程为：

- a) 使用胶条和螺杆组装电泳槽，对玻璃板与胶条接触处进行琼脂糖凝胶封边。
- b) 配置聚丙烯酰胺凝胶液 50ml（5×TBE 10 ml，30%聚丙烯酰胺 15 ml，超纯水 25 ml，10% AP 溶液 500 μL， TEMED 40 μL），灌入玻璃夹板层，插入梳子。
- c) 待聚丙烯酰胺凝胶凝固后，把 0.5×TBE 缓冲液倒入垂直电泳槽中间及两侧，缓慢拔出梳子。
- d) 向 PCR 扩增完成体系中，加 2.0 μL 溴酚蓝指示剂，混匀。
- e) 吸取混匀后的 PCR 扩增产物 2.0 μL 加入到聚丙烯酰胺凝胶点样孔中，同时吸取 1.0 μL 的 DNA Marker（分子量范围 50 bp- 1000 bp）上样在凝胶起始点样孔。

- f) 点样完成后，聚丙烯胺凝胶两极链接电泳仪，使用 180 V 恒压电泳 90 min。
- g) 电泳结束后，凝胶在 AgNO_3 溶液（1.0g AgNO_3 溶于 1000 ml 水中）中银染 12min。
- h) 用显色液（15gNaOH，加水至 1000 ml）和 10ml 甲醛(现用现加)显色，共 5-8min。
- i) 用自来水洗凝胶 2-3 次，放置在 LED 观片灯箱上进行扩增产物条带分型或拍照。

8 待检样品检测的一般程序

待检样品检测的一般程序为：

- a) 在附表 A 中随机选取一对引物，对待检样品进行 PCR 扩增。
- b) 通过聚丙烯胺凝胶电泳检测扩增产物，若扩增产物特异，且扩增片段大小与附表 A 中列出一致，则该待测样品性别为雄性；若未检测到扩增产物，则该待测样品性别为雌性。

附录 A

(规范性附录)

美洲黑杨性别鉴定的 SSR 引物表

表 A 美洲黑杨性别鉴定的 SSR 引物表

序号	引物名称	引物序列	扩增产物片段大小
1	NJFU582F	5'- CAATATTTGTATTGCCCCGTAG -3'	165 bp
2	NJFU582R	5'- CCACTGTTCCATGTTTAAAGG -3'	
3	NJFU600F	5'- GGACAACACACAAGGCTCTGC -3'	179 bp
4	NJFU600R	5'- TCGTGGGTTGATGTGTAGAGG -3'	
5	NJFU602F	5'- TGCAAGTACAACAGGAGTTCAA -3'	238 bp
6	NJFU602R	5'- TCCACCGACAAGAGACAAAGA -3'	