



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110643728 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 04

(21) 申请号 201910828757.2

A01H 1/02 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.03

A01H 1/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A01G 24/28 (2018.01)

申请公布号 CN 110643728 A

A01G 24/15 (2018.01)

(43) 申请公布日 2020.01.03

(56) 对比文件

(73) 专利权人 北京林业大学

CN 104293887 A, 2015.01.21

地址 100083 北京市海淀区清华东路35号

CN 1858257 A, 2006.11.08

(72) 发明人 张平冬 刘燕 吴剑 周晴

审查员 白静

桑亚茹

(74) 专利代理机构 北京思元知识产权代理事务

所(普通合伙) 11598

专利代理师 余光军 曾晖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书1页 说明书17页

C12N 15/11 (2006.01)

序列表5页 附图2页

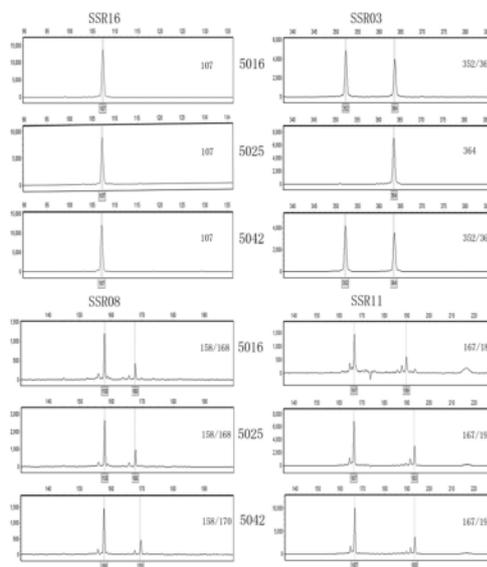
(54) 发明名称

一种提高白杨杂交育种效率的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高白杨杂交育种效率的方法。本发明从366对SSR引物中筛选出扩增条带稳定、多态性好的能够用于混合白杨授粉子代群体的父本鉴定的15对SSR引物,其核苷酸序列为SEQ ID No.1-SEQ ID No.30所示。本发明还提供了一种提高白杨杂交育种效率的方法,包括:

- (1) 收集多个育性相似白杨雄株无性系的花粉;
- (2) 将花粉等质量均匀混合;
- (3) 混合花粉与育性良好的杨树雌株杂交得到杂交子代群体;
- (4) 利用所述SSR引物鉴别出目标性状子代的父本。本发明以混合花粉进行杂交授粉,建立杂交子代群体,再利用分子标记技术,鉴别出具有目标性状的子代父本,从而有效的提高杂交育种效率,减少工作量。



1. 用于白杨雄株无性系混合授粉子代群体的父本鉴定的15对SSR引物,其特征在于,第1对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示;第2对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示;第3对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6所示;第4对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.7和SEQ ID No.8所示;第5对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.9和SEQ ID No.10所示;第6对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.11和SEQ ID No.12所示;第7对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.13和SEQ ID No.14所示;第8对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.15和SEQ ID No.16所示;第9对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.17和SEQ ID No.18所示;第10对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.19和SEQ ID No.20所示;第11对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.21和SEQ ID No.22所示;第12对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.23和SEQ ID No.24所示;第13对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.25和SEQ ID No.26所示;第14对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.27和SEQ ID No.28所示;第15对引物的核苷酸序列为SEQ ID No.29和SEQ ID No.30所示。

2. 权利要求1所述的15对SSR引物在鉴别白杨雄株无性系混合授粉杂交子代的父本中的应用,所述的白杨雄株无性系是:1340、4123、4201、4421、5016、5017、5025、5042、6305或‘鲁毛50’;用于获得所述杂交子代的杨树雌株是银腺杨。

3. 一种提高白杨杂交育种效率的方法,包括以下步骤:

(1) 收集2种以上的育性相似白杨雄株无性系的新鲜花粉;

(2) 称取相同质量的花粉,均匀混合得到混合花粉;

(3) 将混合花粉与育性良好的杨树雌株杂交,获得杂交子代群体;

(4) 利用权利要求1所述的15对SSR引物从杂交子代群体中鉴别出具有目标性状子代的父本;所述白杨树种是银腺杨×毛白杨杂种;所述的白杨雄株无性系是:1340、4123、4201、4421、5016、5017、5025、5042、6305或‘鲁毛50’;所述的杨树雌株是银腺杨。

4. 按照权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(1)收集10种育性相似白杨雄株无性系的新鲜花粉。

5. 按照权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(4)利用所筛选得到的15对SSR引物将杂交子代群体的样品进行扩增反应,利用CERVUS 3.0软件进行分析,通过LOD值筛选父本。

6. 一种鉴定白杨混合授粉子代群体的父本的PCR试剂盒,包括:SSR引物,PCR扩增试剂;其特征在于,所述的SSR引物是权利要求1所述的15对SSR引物。

## 一种提高白杨杂交育种效率的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种杨树育种的方法,尤其涉及一种提高白杨杂交育种效率的方法,属于白杨杂交育种领域。

### 背景技术

[0002] 杂交是创造变异和培育林木新品种的重要手段和方法之一。随着生物技术的蓬勃发展,新的育种技术和方法不断涌现,如SNP分子标记辅助育种技术、基因组选择育种技术、基因编辑技术等。由于林木育种具有周期长,这些新技术还未能能在林木育种中发挥重要作用,至今还未见相关新品种成功培育的报道。杂交仍是林木遗传改良行之有效的方法。

[0003] 杨树是杨柳科杨属树种的统称,具有生长速度快、抗逆性强、适应范围广等特点,是中国北方五大造林树种之一。目前,中国林业生产中推广应用的主要杨树品种,如北林系列、南林系列以及速生杨系列等均系通过父母本两两杂交,并经过多年的田间遗传测定所选育(苏晓华,丁昌俊,马常耕.我国杨树育种的研究进展及对策.林业科学研究,2010,23(01):31-37;王瑞文,郭赞,周忠诚.杨树育种研究进展.湖北林业科技,2016,(06):33-35+80)。当亲本数量较多时,传统的父母本两两杂交存在工作量大,选择效率低等问题,亟待提供一种能够有效提高白杨杂交育种效率的方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供一种能够准确鉴别白杨雄株无性系混合授粉杂交子代的父本的SSR分子标记;

[0005] 本发明的目的之二是应用所筛选出的SSR分子标记建立一种提高白杨杂交育种效率的方法。

[0006] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 根据已知的白杨SSR引物序列,通过数据库(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 查找出366对引物,进行引物的筛选。在筛选过程中,利用父母亲本DNA样本,采用TP-M13-SSR PCR技术进行PCR反应扩增,根据Schuelke(Schuelke M.An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.Nature biotechnology,2000,18(2):233-234.)的方法,SSR共需要三种引物,包括上游引物,下游引物以及标有荧光(ROX,FAM,TAMRA,HEX等)的荧光引物。利用父母本的基因组DNA,对366对多态性好的SSR引物进行扩增,数据结果经GeneMarker V2.2.0软件进行分析,利用CERVUS 3.0软件,筛选可用于子代个体父本鉴定的SSR引物对,最终筛选出15对扩增条带稳定、多态性好的SSR引物对,其核苷酸序列分别为SEQ ID No.1-SEQ ID No.30所示。

[0008] 在所筛选出的15对有效SSR引物中,除了引物SSR14不能确定其所在染色体的位置之外,其余14对SSR引物分布于9条染色上。这15对SSR引物中共检测出91个等位位点,每对引物产生的等位基因位点不等,介于3-11之间变化,平均约为6.07个等位位点。其中,引物SSR01扩增出的等位基因位点数最多,为11个;SSR03扩增出的等位基因位点数最少,仅3个。

[0009] 多态性信息含量(PIC)是某个基因位点变异程度高低的指标之一,且PIC值大于0.5的属于高度多态性位点,介于0.25-0.5的属于中度多态性位点,而小于0.25的属于低度多态性位点(白凤莹,曾青青,康宁,等.毛白杨基因库优树倍性检测及性状对比分析.北京林业大学学报,2015,37(04):113-119)。本试验中,PIC值介于0.459-0.836之间变动,平均多态性信息含量为0.655。只有引物SSR02和SSR03的PIC值小于0.5,分别为0.459和0.484,属于中度多态性位点。其他13对引物的PIC值均大于0.5,均属于高度多态性位点。说明这套引物具有较好的鉴别能力。所筛选得到的这15对多态性引物中,有3对引物的母本位点缺失,由于子代群体的母本相同,所以不影响鉴别结果。利用CERVUS 3.0软件进行子代个体鉴定,确认每一父本的基因型在多父本亲本中是唯一的,因此,能够将筛选出的这15对SSR引物用于混合授粉子代群体的父本鉴定。

[0010] 在此基础上,本发明提供了一种提高白杨杂交育种效率的方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 收集2种以上的育性相似白杨雄株无性系的新鲜花粉;

[0012] (2) 称取相同质量的花粉,均匀混合得到混合花粉;

[0013] (3) 将混合花粉与育性良好的杨树雌株杂交,获得杂交子代群体;

[0014] (4) 利用所筛选得到的15对SSR引物从杂交子代群体中鉴别出具有目标性状子代的父本。

[0015] 所述的白杨树种是毛白杨(*Populus tomentosa*)、响叶杨(*P. adenlpodn*)、毛新杨(*P. tomentosa* × *P. balleana*)、银腺杨(*P. alba* × *P. glandulosa*)、银腺杨 × 毛白杨杂种等。

[0016] 所述的杨雄株无性系包括:1340、4123、4201、4421、5016、5017、5025、5042、6305或‘鲁毛50’。

[0017] 所述的杨树雌株是银腺杨。

[0018] 其中,在步骤(4)中利用筛选出的SSR多态性引物进行扩增反应,利用CERVUS 3.0软件进行分析,通过似然比(LOD)值筛选父本。

[0019] 本发明以等质量方式混合10种毛白杨雄株无性系花粉与银腺杨雌株进行授粉杂交,获得混合授粉杂交子代。利用SSR引物对混合授粉子代进行父本鉴定,根据鉴定结果可见,利用15对SSR引物,可鉴定10个毛白杨雄株无性系混合授粉杂交子代的父本。而在育种实践中,仅仅需要鉴定具有改良目标性状的子代即可。这说明通过以混合花粉进行杂交授粉,建立杂交子代群体,再利用分子标记技术,鉴别出具有目标性状的子代父本,从而有效的提高杂交育种效率,减少工作量。

## 附图说明

[0020] 图1引物SSR16、SSR01、SSR12和SSR15在第一组父本中的扩增效果。

[0021] 图2引物SSR16、SSR03、SSR08和SSR11在第二组父本中的扩增效果。

## 具体实施方式

[0022] 以下结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0023] 实施例1鉴别毛白杨雄株无性系混合授粉杂交子代的父本的SSR分子标记的筛选及在提高白杨杂交育种效率中的应用

[0024] 1. 材料与amp;方法

[0025] 1.1 材料

[0026] 冬季落叶后,从山东冠县毛白杨基因库中采集1340、4123、4201、4421、5016、5017、5025、5042、6305、‘鲁毛50’等10个无病虫害、花芽饱满的毛白杨雄株和银腺杨雌株花枝,塑料布包裹后运输至温室待用。

[0027] 1.2 花粉收集

[0028] 将毛白杨雄花枝水培于10-20℃的温室,3-5d换一次水。待花药成熟开裂后,分别收集各无性系花粉,储存于10mL的离心管内,放入适量硅胶,并做好标记,用保鲜膜密封,置于-20℃冰箱内保存待用。

[0029] 1.3 花粉混合与杂交

[0030] 称取相同质量的毛白杨花粉,均匀混合后,置于-20℃冰箱内保存待用。当银腺杨雌蕊柱头发育至最佳授粉时期,即授以等质量混合的花粉于柱头。授粉后,银腺杨雌花枝继续水培于温室。

[0031] 1.4 种子收集与播种

[0032] 待银腺杨蒴果成熟开裂时,及时套袋,收集种子,置于含有适量硅胶的10mL离心管内保存。

[0033] 将草炭土、珍珠岩和蛭石按5:2:1的比例均匀混合,装入穴盘压实,并用自来水浇透。将种子点播于穴盘,用插签作好标记。播种3-5d后,种子开始发芽。在幼苗生长过程中,注意防止水分亏缺,及时清理杂草。

[0034] 1.5 基因组DNA提取

[0035] 待小苗长至5-10cm,摘取新鲜叶片,采用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组DNA提取试剂盒,提取银腺杨母本、10个毛白杨父本以及杂交子代群体植株的基因组DNA。

[0036] 1.6 多态性引物筛选及父本鉴定

[0037] 根据已知的白杨SSR引物序列,通过数据库(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)查找出366对引物(表3和表4所示的引物)进行引物的筛选。在筛选过程中,利用父母亲本DNA样本,采用TP-M13-SSR PCR技术进行PCR反应扩增,根据Schuelke (Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature biotechnology, 2000, 18 (2) : 233-234.)的方法SSR共需要三种引物,包括上游引物,下游引物以及标有荧光(ROX, FAM, TAMRA, HEX等)的荧光引物。PCR反应体系见表1。

[0038] 表1 PCR扩增反应体系

	成分	体积/ $\mu\text{l}$
[0039]	无菌 ddH <sub>2</sub> O	7.2
	模板 DNA	2
	上游引物	0.08
	下游引物	0.32
	荧光引物 (ROX, FAM, TAMRA, HEX)	0.4
	PCR Mix	10
	总体积	20

[0040] 具体程序如下:94℃ 5min;94℃ 30sec,待测引物的最适退火温度30sec,72℃ 30sec共25个循环;94℃ 30sec,53℃ 30sec,72℃ 30sec共8个循环;72℃ 8min,4℃保存。得到的PCR扩增产物在ABI-3730 x1基因分析仪上进行毛细管电泳检测;数据结果经GeneMarker V2.2.0软件进行分析,利用CERVUS 3.0软件,筛选可用于子代个体父本鉴定的SSR引物对。

[0041] 以子代群体基因组DNA为模板,利用筛选出的SSR多态性引物进行扩增反应,利用CERVUS 3.0软件进行分析,通过似然比 (LOD) 值筛选父本。LOD值表示相比于随机候选父本,疑似父本传递给子代基因的可能性,且LOD值越大,鉴定结果越准确 (Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 1998, 7 (5): 639-655; Jones A G, Small C M, Paczolt K A, et al. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10 (1): 6-30; 韩志强. 基于SSR分子标记分析的毛白杨育种亲本选配策略研究. 北京林业大学, 2018)。

[0042] 2. 实验结果

[0043] 2.1 引物的筛选

[0044] 利用父母本的基因组DNA,对366对多态性好的SSR引物(表2和表3)进行扩增,最终筛选出15对扩增条带稳定、多态性好的SSR引物,这15对有效引物的详细信息见表3,在父母本中的位点信息见表4。

[0045] 表2 SSR16-SSR366引物序列

[0046]

ID	F	R
SSR16	GACAACCATGCAGTCCTATT	AATTGTGTGGCTGGAGATAG
SSR17	TGGGTTCATAAGAAAATTCC	TTAATGGTGAGGATTGAGTG
SSR18	AGAATAATTGTGGATGGACG	TTTAATTGAGATTCGGGCTA
SSR19	GAAAGAGAAGTCATCGTGGA	GAATAAAATGCAAAAATAAACACA
SSR20	CAACGAGCTTGTCTTCTTCT	CTTGGAATGTTAGCCAAAAC
SSR21	CTGCAAGATGTAAGTGATCG	CAGCATTAGAGCCAAGCTA
SSR22	ATGTCACAACCAAAAAGAGG	AATACCTTTACCCGTGGATT
SSR23	GGTCCCATCTTTCTTTTAC	GCCTACCAATACTAAGAGCC
SSR24	CAGGACATTTAACTCCTTCG	TTAAGTCCTCAACAGAGGGA
SSR25	CTAAGTAGTGAAAGAGGCGG	CTCCTGTAAATGTATCCCCA
SSR26	AGGCCTCACTATTTTCAGCC	GCTTTGCTAAGCAGGCTTTC
SSR27	ATGAAATTCGAAAAGTCAGT	AAAAGAGGAAATTACGGTCC
SSR28	AATAGGATGAGGCTTCAATAC	CATTTCAATCTTTTGTGCCGC
SSR29	AAGTTCAAAAGCAAAGCAG	CCATGAAAATTCCTTAGGTG
SSR30	TTTTGGCATTCAAAGACTTGGC	AGTTGATTCCATGTCGTGTCC
SSR31	TCGTTATTGTGTGGATGAGA	ATACAAACAAACAACAGCCC
SSR32	ACAAGCCATATGCCCAAAG	ACAAACAAGCTGTCACGCTG
SSR33	CATTTTTCTGGCTGCATTTT	TTGCTAGTTCACGCCATGAG
SSR34	CCACATTTATGTCCCTCTGT	AAGCTGAAGCTGCTCTTTA
SSR35	ATCTACCAAACACTACATTATCTTG	ACAACATAAAATATAGGCTGCC
SSR36	GTTTGCTGCATTTGTCATGG	ACACGCCTTCCATGACTTTC
SSR37	TTAAAACCTCTGTAACTCTTCG	GTTGAGGTTGTCCTCATGTT
SSR38	TAAACTGCTTTTAGTTGCC	TCCATGTTGTGTGATCTGAG

SSR39	CATGAATTGGGGGTTTCAAG	TCAGCTCAGAAGTAGACCAACC
SSR40	ATGGGCAACAAAATGATTAC	GAACCTGTCATCTTGCAATTTA
SSR41	CCCCTACAAAGATGTTTGGAGAA	ATTTTGTGATTTCGTTGGGGT
SSR42	AGTTTGAATCATGCTGGTCT	TTTACTCATTGAACCGAA
SSR43	TCCTCTCACGTTAACCCAC	GGGCTATGCTTTTGCTCTTG
SSR44	TGGAAGCGAGACTCAGAAGC	TTGGCTCCAGTTTCCTATTCA
SSR45	ACAGATGTAAGTGCAGCAA	ATCTCTGTAATCGCCTTTGA
SSR46	TGTCTTCTCTACAGCAAGG	CACCGAGAAGAACTTTTCAG
SSR47	CCCAAGATCCGATTTTTGGG	CACAATGTACAAATCGCTGTC
SSR48	TTGTAATAAGCCTTTTTGGC	GTGTCTCTTCCTTGATTGA
SSR49	TATGTCAAAGGGTTTGCTT	GTGGTAGAAATTGGAACGAA
SSR50	AAGAACCAGCACTTCCTGTA	ATGACTAATCACTGTGGGC
SSR51	AGTGCAGAGAGCAAGAGAAG	GAATCAATACCAAGAAAGAGC
SSR52	GCCTAATTCTGTCAAAGGAA	ACGCCTCGTGTATAAGTCAT
SSR53	TTACTTGCTAGCTGCCAATC	CCTAAAAGTTTGTCTATGCGA
SSR54	CATATGGTAGAACCGTGTGTT	AAGGTGGGTTTTGTAAAGTA
SSR55	TCCATTTGACAGGCTTTTCC	TCTTGGTTTGCTTGGAAATC
SSR56	GCATACATTTACACAAAACCCC	GGGATGCACAAGGACTGTTT
SSR57	TGTCGAGAAGTAATATTGCACCA	GAAGCATATGCAGGGCAAC
SSR58	ATGACTTCATTGGGAAGAAA	GACGATTTGACTCCACTAA
SSR59	GCCAACATCTTCATTCTGAT	GAACCAGATCCTTCCTTCTT
SSR60	CAGTTTTGCCCTAATCTGAG	CCTCACTTGAGGTTGTGGTA
[0047] SSR61	GTTTCTGCTGCATTTTCTATTC	CTCGTGAAATTGTATGGAT
SSR62	TGATGTTGTGTGAGAGGAAA	AGCCCAGTAAACAAACTGAA
SSR63	CTGAGAAATCCAACCTCTTG	TACAGTAAGAAAGTGCTGCG
SSR64	ATGTGCCAGACACAATTCCA	GTGTTCCCTTGCTTGGTCGTT
SSR65	CCGATGATGACCCTTACGC	ATTAGGTGGCCAAGGACTC
SSR66	TCAGCCATCACTCCTCTAAT	CCTAATGGGAGCAAAAAGAA
SSR67	AGAGCAAAGCCAAGAAACGA	AAGGTGTCGTGACCATTGTA
SSR68	AAGAAGGGTGGTAAGCTTTT	TCCGTAGATCTCTCCTAAA
SSR69	ATAGGCCAATGTAGACCTGA	TGCTTTCTTTGCCATTTCT
SSR70	GCTTAATCAAGCATCCAATC	TGCACGTGCTTACTTAAAAA
SSR71	CCAGTTTATTAAGAGTTTTTTC	GAAAAGAGTGCTCCTCCTC
SSR72	GCCTATCGAAATGGAGCTAT	TTCTTGTTTTGGATTTACCG
SSR73	AAATAAAATTCAGATGCCA	CCCTCTGTTTTCCTTTCTT
SSR74	TATTGCTTTACCGTGATTT	ACATCAACACATCAAAACGA
SSR75	ATGAAGGGAAGGAAGAGAAG	TAAAACCAAGGGAAGATGTG
SSR76	TGGAATACAGCGTGAAATG	AAGCTAGCACAACCCAAAGG
SSR77	CAGTGATTTAGCCGAAAAC	GGAGAACGAGAATGTAATGC
SSR78	AAGAGACATTGTGCATTAAGA	GGAGGTTATTGTGGATGCTA
SSR79	AGAATCATGTGCAAATTAACAA	CACAAGGAATTTATGTGTCTCA
SSR80	TTGAATATTACGCAGAGCCT	TGAAAGAAGAAGCAGAGAGG
SSR81	TGCAATCATATATTCCTCCC	ATAAAATTAAGTGCCTGCCAT
SSR82	GACAGCAAGCTTCTTTTACC	TGCTCATTGATCATGGATTCTC
SSR83	TGCTCTGTATTGTTCCCTT	TCTCAAGTAGGGTCCAGCTA

SSR84	GCTTTAGTTGGATGATGCAG	CACCTAAACCAAACCTCCTCA
SSR85	TGCTGGTACCACTTTGTGTCA	TGTGAAATGGCCACACAGAT
SSR86	ACCTTCCTCAAACCTTGCCAC	AGTGATTGCTGTTGCTGCTG
SSR87	TCCTGGTTAGTTGCCTCTCC	TGTTTGTGCATCCTCGCTTGA
SSR88	GTGGTGTTCTCTGTCAAGT	TTTTCCAGCCAGTTAAAAAG
SSR89	TTGAGTAGAAATGAGGGGAA	TAAAACCAAGGGAAGATGTG
SSR90	AAACAAC TATTATCACAATCATCATCA	GGGGAATAACCCAGAATTGG
SSR91	GTGTGCTCCTCTTCTCGGTC	AGGCGAGCAACTCCATTTTA
SSR92	ACAGGCAGAGATAGACTTGG	CTAATGCTTGAAATGAAGGG
SSR93	GTAGACAGCCTTTTGGTAAA	GAATGAGACCCACTTTCCACC
SSR94	TGCTGCATTTGAAGAGTTTA	GACCGGACTGGATGTAATAA
SSR95	TTCAGAATGTGCATGATGG	GTGATGATCTCACCGTTTG
SSR96	TGTCGTCAGGGATGCATTAG	TTGCTGGATGAAGACTCACG
SSR97	GTCAGTTTGCCCTCTTCGTC	TGAGGGCGTCTCCTCTTTTA
SSR98	CAAATTGGAGACTTCTCTGC	TATTTCAATCTCCCATCGTC
SSR99	GAAATTGTGGAACAAGTGGT	CAGTTGCTAGCTGTGTGTGT
SSR100	GATGGAGTCAGCAAGCAACA	GAATCTGCCACACCACACAG
SSR101	ATCAATCAAGGGCGAAAATG	CCTGCACAGTGGCTTCTACA
SSR102	TAGCATTGGACGTTCCCTTT	AAGCCCTTTTCTCCGACAGT
SSR103	GCTACTGCATTGGCCATCAT	GGTACTCCCACCAGAAGTAT
SSR104	GAGGGTGTGGGGGTGACT	CAAACCATCAATGAAGAAGAC
SSR105	TAAAATCAAACCCAAGCAAT	GCTTGAAAGAGTGAAGTTG
[0048] SSR106	ATTTCCAGCTTCTCTCCCGT	AGGGTTTGTGGCCTTCTGA
SSR107	GTGGGGATCAATCCAAAAGA	CCCATATCAAACCATTTGAAAAA
SSR108	ATCTAAGGGGATGGTCCTAA	GCTTCTTCTTCTCCTCCTC
SSR109	TGTTCCGGGTTATATTGCCATT	TGATTGGGTGTCTCTGCTTG
SSR110	TTAAGTGACAAGGCTTGGAT	AATGGAAGAATGAGAAAGCA
SSR111	CCTCACCTAGCTGAATCCAAA	ACACGACTGGGACATTGTGA
SSR112	TGCTCCACTCAATGTCAATA	GACGGTGATAAGAGGAACTG
SSR113	ACTCTTGTTAAACCAAGCCA	ACTACCTTTCTCCCCTCAC
SSR114	TGGCTTCAGTCCAGAGTCCT	CGACCCCTTCTAGCTCAACA
SSR115	GATATCCACAAAGACAAGGC	TATTGAAGATGAAGAAGGCG
SSR116	TTCTACGGCAAAAGTGGTCC	CTGCAGATCTCCCGAGCTAC
SSR117	TGTAATGGTTCGGTGTTTTT	ACATTTAAACCCGAAATCAA
SSR118	CTACAGATGGCACTAGGGAG	AGTCCTTCACTTGAAAGCAA
SSR119	AGGATATTTGAATGACGCGG	AAGGCCACAATACATGCACA
SSR120	AAGGCTTATAGAATGTGGCA	TCCTTG TAGTTTGTCCACG
SSR121	TGGAGGCTGTCTGTTTTGTG	AGATTTGAGCGACTCCGAAA
SSR122	CAGGTTATACTCCCGACTTG	GGCAGATTTTTCATCCTTTT
SSR123	TTATTTGGATCCTGAAATGG	GATGGTTCGGTATGTGAGTT
SSR124	TGCCTCCTAAATTGTCCAC	TCCAAAACAACAACAACGGA
SSR125	GACACTTTCACAGCCAAGCA	TGAACTAATCCCGATTCTATCAA
SSR126	GGCTCCACTTCTTCCAAATG	TCAAACGCACAGCATAAGGT
SSR127	AGAACCCTTGCTTTTTGGT	GACTCTGGCCCATGCATTAT
SSR128	TGCAGAACCACAGCTTCTTG	TCGCTTGATCAGGTTGTTTG

SSR129	AACATGAACCATGACCCCTC	TCAAGCGTTCTTTTGCAATG
SSR130	TGAATTAAGGTGGTGGTTC	GGGTGAAATTGCATTTGTAT
SSR131	GGTCAAAACCCATAGGAGAT	AAATAATGGTGGAGTGGTTG
SSR132	GGGTTGGACCTGCTCAAATA	CAGCTGCTTTTTCATGGCTA
SSR133	AAACGAGGTTCAAGGAGCAA	TCCAGCATCCAAACACAAAA
SSR134	GCCTCTTGTTGGTTTGTAG	GATTGTGAAGACTTTCGGTC
SSR135	GTCTCTGCCACATGATCCAA	CCCGAAATGGATCAAACAAG
SSR136	GCAAGTTCAATCCTTGCGAT	CGGCTCTTTGACGACAATTT
SSR137	AGCAGGCAAGTGACAAGGTT	TGCATGACCAAACCCATAAA
SSR138	TCTGGATTTTAGCTTTCTGC	AACTTTCTGAAAATGCAAGC
SSR139	TGGTATCATCAGCTTCCAT	CCATAGAATTCTCACCTGA
SSR140	TCTTGAGAGGGCACTAGAAG	TGACAATTAGAATGGAACCC
SSR141	GTGGTGTGGAGACTGCAATG	AAAAAGGTCATCGCATTATGG
SSR142	GGCTAGGAATACCCTGGAGAA	AAGCCATCTCGACTATACACCA
SSR143	ACCATCTTTAAATCTGCCCT	TTTCTAATCGTCACGTTTTT
SSR144	TAGGCGCTTTGACATCCTTT	AAATGCTCAGCCCATGTACC
SSR145	TCCTCCCCTTTTGATTGATTT	TGGGATTGTGGCTTCAAAGT
SSR146	AAGAGTTGAAGGCTGGACGA	AGACATGCATGAAGCCATGA
SSR147	TGTGTGAGAACACCCATGCT	TTGGATTTGCTGGTACCATTT
SSR148	CCAACATTCCTTCGATCTTGA	CAAAATACTGGGCACCCTTG
SSR149	TCTTTTCTCCTCGATCTTTCCA	AGGTGCTAACCTGGGCTTTT
SSR150	CCATATTCAAAGCATCCAT	CAACAAGGAAAAGAAACACC
[0049] SSR151	ATGATCAAATGATGCCTGTT	TAATCCAACGTACACAAGA
SSR152	CGGTTTCGGTTCAGTTTCAGT	CTCCAGGTCTGCTGTTTGGT
SSR153	ATGCCATTTTGAGAGAGAGA	AGAATTACAGCTGATGCTGC
SSR154	GCGATCCCTTTCTGGATGTA	TGTCAAATGTCATTGGTCTCTCT
SSR155	TGTCAAATGTCATTGGTCTCTCT	GCGATCCCTTTCTGGATGTA
SSR156	TCGTGCAAATAAAAAGCATT	ATGGATATTGTCTCCTTTG
SSR157	TGACCCCATCTAAAACAAAC	TGCATTTTCCACACATCTTA
SSR158	CACCTCCTTTGACGAGAACAG	CGGGACCGAAGTTGTTACAG
SSR159	ATCCGACTTCGATATCTTCA	CTACCTGAAACACAGGAAGC
SSR160	GGATGTGCATAACTTGTTACTCT	GGCATATTCCCATATTTGAT
SSR161	GAGATCATGCTGTGGAAGGTAAC	ATATATTCACGGGTTGGTGAT
SSR162	TGCAAATCCAAACACAGATA	ACGAATCATCTTACGCACTT
SSR163	GGCAAAACGCATACCAAAAC	GGGAGCATGATGATGATTGA
SSR164	GTAGCGTTTCCACAGTGGAT	CGGCGGAACCTGAGCTGGT
SSR165	GGGCTGCAGACAAATTAAGG	TGGGACATGCTCCATGGTAT
SSR166	TCATGTGGTCTCAAGGGTGA	ACATAGGGCACGTGGAAAAA
SSR167	GAATTCAAAGAATGAGGATCAA	TTTTTCAATTCACCCGCTT
SSR168	GCTCTCCCTTCTTATTCTCCC	ACGGATTGTGCCACTGATCT
SSR169	TTGGACTATTAGTATTTTCAACAAA	GAAACACATCCCGCTAAAA
SSR170	TGTTTCCATAACAATCCAACG	ACGTGGAAACCAAAATGGAA
SSR171	AATGGGTTTTTGTGTGTGTC	AGGCTTTTAAGATTCCCCTA
SSR172	AGCAAAATCAATTGCTGCAC	AGCGGCATAAAATGTGGTCT
SSR173	GGGAAGTTTTTGTACCGTTTAGG	TCAAAACCTTATTCACCGACC

SSR174	CGAAATGCAGGCATGTTATG	TGGCATGTTGGTTCCTTACA
SSR175	TTGCATAAAACCATATAACCACGA	CTATAATGGGCCAAACCCCT
SSR176	GGCCGTTTCATTCATGTATCC	CAGGCCCCCTAGTCTTCTTT
SSR177	TCCACAACCTCTTGGCTAACCC	GGACTACAATGTGCGTGACC
SSR178	ATTGTTACGTCAGAGCAGGT	ATCGGATGTGATCATCTAGC
SSR179	CCTCCTACCACATATTCCAA	AGTGGTTAAAATGCGAGTGT
SSR180	ATATGTAGCCCATGCAATTT	ATGCTCTGCAAAGTGGTAAT
SSR181	GGGATGAATCAGGAGATGTA	GTGATGCTCTGATACCACCT
SSR182	GATCCGAAAACAACAACAAT	ACCCCTTTCTCTTCTCAATC
SSR183	TTAGAGGAGAGAAGCTGCTGC	TGGTCTGCAACACAAGATT
SSR184	TCAATGATTGGTCTTGTGTA	CAGAATTCAGAATAGAACCCA
SSR185	GGTGATGAAGATCTGGGATA	ACCCAAATTACAGAACAACG
SSR186	CATTCTCCATAATCATTAAATCC	AAAATATTGTGCCTTTGCC
SSR187	ATAGCGATCATCAAAGGAAA	AAATATTCATGTGGAGGCAC
SSR188	ATGGATGGAGACAACAGAGA	TCCTTTAATTATTCATGCCG
SSR189	TTTCCTGTCTTCTTTTTATGGC	CAATCCAAAAGTTTTCATGATTC
SSR190	GGGATGAATCAGGAGATGTA	GAAGAAACCTGTGGGTGATA
SSR191	CGAAGCAGAGGAAGTTATGT	AGGATATGATGTTTGCCATC
SSR192	TCAAAGATCCTCATTTGTCC	CATCGAAGAAAATGCTCTCT
SSR193	AAGCTTCATCGTCCTGCTTG	CGTATCAATTCACGACTCTCG
SSR194	ACATCCGCCAATGCTTCGGTGTTT	GTGACGGTGGTGGCGGATTTTCTT
SSR195	TCCACTGCCTATGAACTTTT	CACCCAATAGCTTCCATATT
[0050] SSR196	ACCATCATTAACCCACATA	AAAGAAACCAGACCACACAC
SSR197	GCTTGGGGCATCTCAAATTA	CCTGGGGAGTAGAAGGTGGT
SSR198	ATTGTTCCGGGTGACTTTATG	TAATTGGTTGCCTCACTTTT
SSR199	TTAAGGAAATCCGAAATCAA	AAACAGCCTTTGATGTGAGT
SSR200	TTGATTCGAGCCTCACGAGC	AAACTCCAACATTTTAAGGACC
SSR201	CGATGTAACCGACAAAATGGA	CTAGGAGCTGTTAGGGTGAA
SSR202	TCTTGGCGAGAGAAGTAGAG	GGATTTGGTGAAAATTGAAG
SSR203	AAAATGCAATCATACGACCT	CATAAAAGGTGTTAAGCCG
SSR204	AGAGAGAAGCTTGTGTCCAG	TGAGGAAGCAGAAGTAGAGC
SSR205	ACATCTAGGCTCTGGCCATT	TAAGTAGGAAAAGCCAGCATT
SSR206	AATTTACATTTCTTTATCATCACC	GCTGTCTAACATGCCATTGC
SSR207	CCTACACAAGCTGCTGCTCA	AATGCAGCCTACCTTCGTTG
SSR208	GTTTAATTTCCACGTCGTTA	CGAATGAAGAAAACCATTG
SSR209	ACCCTTAAAAGGATAGGACG	ATGATGATACCGTTTATGGC
SSR210	TTCAATGGAAAGGGATAATG	TCATTTGTAAAACATCACGC
SSR211	AGAAGTTGTTGAACCCGATGGG	GCTACAAACTTTGTTGTACCC
SSR212	GCTGTCAGAATCAAACACTTC	AAGCAGATAACTAAGACATGCC
SSR213	TTTGGACAGCTTTCTAGGAT	GTGGGATATAACGTGTAAGGT
SSR214	CTACCATCTTGGAGCTATCG	CTTGAACCAGCTCAAGAAAC
SSR215	GGCAATTTAGGTACAACAGC	ACAAGCGAATGCTAATTGAT
SSR216	AAGATATTGATCGTGGATGC	TACTTCAAGCTCAAGGGGTA
SSR217	CAGTGCTAATGTTGTATCGTGGA	CTGTCGCCAGTTGCTAATCC
SSR218	CGATGAGGTTGAAGAAGTCG	ATATATGTACCGGCACGCCAC

SSR219	GAACCTTAAAACCAGAACCC	GAGCCACAGAAATACTGCTC
SSR220	GGAAATGGCAAATACATCAT	ATGAAGGAGTCTGAGCTGAA
SSR221	TCAAGTCAGAAACACTTCCA	TTGATTCTATGGGTTTCACC
SSR222	CATTCGTTCAGTAGTTAAGGC	GGTTAAGCTACCTCTGCTAC
SSR223	TCTGTAAATTTCTCAGCTGTTG	TGCTTTACTAAACTTTTTACTGC
SSR224	AAAGAAACCAGACCACACAC	CGCTTGCCTTAATTAACAGT
SSR225	TCATCAACCTGACCTCTACC	CAAAGCAAAAACAAACACAA
SSR226	GGGGCTAATATCAGTTTCCT	TGAGAAAACCTGGAAAATA
SSR227	CAAGGTAGCTAGCTAATCAAGC	TCGCAAGCTAGTTGTAGGC
SSR228	AAAATGAATTGGCAGAAAGA	GCTTCTTAGCTCAACCAGAA
SSR229	AGGTACATGAAGTCCAGCCG	TGATGCTGTGGAAGCTTTTG
SSR230	GAAACCAGAAAGCAACAATC	TGTTTCAACATCACCATGTC
SSR231	TTTGAGCACTTCAACTACCA	TGTCTTCCCTTAGTCACCAC
SSR232	ATTGTTCTTGTGAAGGACG	AGAGCAAACAAATTGATGGT
SSR233	CAGAGCTCTAACCATGGAAC	GCTACGGTGATGGTTTGTAT
SSR234	TGGTGGAGGCTAGGATAGTA	GCCCAAACCTTTATTTGATG
SSR235	CTCGCAGCTCTTCTCATAGT	CCTACCCATTTATGACCAAA
SSR236	CCCTGGTTTTCTCTCTTGG	CCAGATTGGACTTGGGATTC
SSR237	CCGTGGCCATTGACTCTTTA	GAACCCATTTGGTGCAAGAT
SSR238	AACCCACTTCTCTCTCTGT	GTGAGACTTCCGACTCGTAG
SSR239	AATCTGGGTTGTGATGAGAG	GAGGGCTCATGTACAGAAAG
SSR240	TTTAGGGTCGTAGTGGA AAA	AAACCTGGAGGAGAATTAGAA
[0051] SSR241	TAAGTCCCCTACACCCAAC	GAGTTCGAGAGAGGGAATCT
SSR242	GGTTAACCATAGCGAACGCAA	GACGACCAACTCGGTGTCA
SSR243	TGCAAGTCTTTTTAGGAACC	TTCAAATGCATCAAAGTGT
SSR244	CACAGGACGTTTTGGAGCAG	AATTCGGACAGTCAGTCACC
SSR245	AGCTTCCATGCCTTCTGTGT	TGTTTCATCTACCCTCCACCA
SSR246	AGGCTAGTTGAGTCAGCATGG	TCCCATCTTTGTCACAGCAA
SSR247	CCGTTGAGTTTGTGCCTTT	TTGTACAGCTTATGCGCCAG
SSR248	CAACAGACCCATGAATGCAC	TCACATAACCAGCAAGAAGCG
SSR249	CAAGATCGGTGAGGATTTAC	AAAGAGCAAATCCACTGGTA
SSR250	TGTTGCTTTTGAATGAGAACAGC	CCTGCAATGTGCAAACAG
SSR251	CCAACCTCAATGCTAGGAAC	TGGTAAGCCTGAGGATACAC
SSR252	CAACATGAAATGAGCTGCTA	TCCACATGATGTCTGATTTG
SSR253	ATCCCCACTTTGACATCAA	CAGACGTGCCAATACAAACG
SSR254	GCAGTTGCAGTGGTTGTTGT	AAGCCTTTAAGGGACCCAAA
SSR255	TCCACAATTTTGAAGTACTAGAGTAAA	GTTAGGCAGGGAAGAAAGGG
SSR256	TCCATGCATCATTTCAACTTTT	AGGCCATCTATGCCTTGACA
SSR257	GTGGTGACCCATCTTGGTTT	CCGGTTCTCTGTTTTCGTT
SSR258	CAGAGGGAGCAAATTTGGAC	CCACAACCACACTAGCACCA
SSR259	GATGGGATTTGGAGGGTTTT	ACAGCAGTCACCTGAGGCTT
SSR260	TCGGCAGGTAATGACAGACA	CAGGTCTGCTAGAATGTTCTTCAA
SSR261	ACAAGCTGATCCTCCCACAG	TGTTTGCTCACTTTGGCTTG
SSR262	CAAAAAGTCTCAGTACCACCCA	GCCCCAACCAGATAAAACCT
SSR263	GCAGGGCTGAAAACCACTAA	CGATATTGTTTTGGTCTGCAA

	SSR264	TGGAAGAACATGCATGAGGA	TTTGGTGAACGAGACAGTCG
	SSR265	GTCCTTGCAGCTCTTGAAGC	CAATCCTCGCATCCTTGTTT
	SSR266	AGGCAAGGGAGGAGGTAGAG	CCGCCAACATTACCAAAAAAG
	SSR267	ATGGATGACGATGCTGATGA	CAAAAAGTGGGCACAAGTCA
	SSR268	AGCTGTGGGTAGGAGTGGTG	TCTGAAAAGGGTGGCAGAGT
	SSR269	TGAAACTGTGTTGCATAATCC	TATCGGTGCAGTGAGAGCAG
	SSR270	TGCAAAGAAAACAGCGGAATA	GGATGTGGAAGAGCAAGAGG
	SSR271	ACAACGCGAACATGTCAAAA	AATTCCTTCATGCTGCAACC
	SSR272	AGATTAACCTTAGTTTGCTTGG	AGAAGTTAAGGTAACGCTAGG
	SSR273	GCAGTTTGTGACACCCTCAA	TGCCGGTATAGCTCTTCGTC
	SSR274	CAAAGGTGAAGTTACAGTCAC	CCATTAGGCCATTATAGACAC
	SSR275	ATAATCTCCCTAGCTTAATCC	GAATAACATGGATAATGTGTTTG
	SSR276	AACAAATTTGGCCTGCAGGG	TCAAAATATTATCACTAAACGCG
	SSR277	CTTCTCTCAGCGTTCTCAT	GTATGATACCCCTCTCTCCC
	SSR278	ATTTCTCTAGGAAACAACAACC	CCTTAAGATGTTGCTGAACTC
	SSR279	CTTAGTGGTGAAGTATTC	GAGTGGGTGCTGATTCATCC
	SSR280	TTTGAAAATCCCTAAACTGAA	AGGGGTAAAAGTGAATTTTT
	SSR281	ACACACTTCAATGCTCTTGAT	CATCAAAATCAACAATCCCT
	SSR282	TGAAAAAGGTAGACGTTGGT	CGCTAGGTACTGCTTTTGT
	SSR283	AATTAATTTCTGCGTGGAAT	AGAAATGCAATTAATTCGTG
	SSR284	TTAGCCATTGGATTTTCATT	CATTGCACTCTCACACATTC
	SSR285	TCCATCCCATGTTAGAATGT	AATAACATTTATCCATGCC
[0052]	SSR286	ATGGCCATTTAAGTTGAAAA	CGGCAGGTTTTATTTTATTG
	SSR287	GAGCTTTCTGATGCTCACTT	GACCACCATGGAATAAACAC
	SSR288	TGGTCGGCGAGAGTGACCAG	ATTGATCTCTTTACATCACTC
	SSR289	ACGTCACCGTTCAAAAGATA	TCGTTATTCCATGTTCAAGA
	SSR290	AACAGGCAATAGAGACGAAC	AGCACGGAAGATTATTGAAA
	SSR291	CACTCCACTGCTCTCTCT	AACCGGATGTATAAACCTAAAA
	SSR292	TTAAACTAGAATAACGGCGG	TTAGATCAAGGATGGGTGAC
	SSR293	ATTGAAAATGTTGCAAGTCG	ATGAGAATTGAGATGCCAAC
	SSR294	TCCGATCGAGAATAGAAAGA	GCTTGAATGGATCAGATGTT
	SSR295	GAGAACTCGGTGACTGACTG	CAGCAACATCCACATATTAGC
	SSR296	TAAGGCTCTGTTTGTAGTCAG	GAGATCTAATAAAGAAGGTCTTC
	SSR297	ATAGACTGTAACCCCTTCCC	TTTTCTTGGTGTGCTCTAGG
	SSR298	CTGGTACCGATGGAGAAGAC	CAAACCAACAACCTCACCGTAC
	SSR299	TACACACCATGGGGATTTAT	CTGTGACCCGATCTTTTAGA
	SSR300	AAAAGATTGCTCCTTGTGTGC	GAGGACAATGCCTCTCAGGA
	SSR301	TGTCAAATAGTAGCATCCCC	CCACCTTGACTTTTCTCTG
	SSR302	TAAATTCATGTAGATTGACG	CTTACTATTTTCATGGTTGTC
	SSR303	GAAAGAAAATGAACCCATCA	CCAGGATATAATGTCCCAGA
	SSR304	AATCGCTCTAGTGTGGTAG	ATTTTCCACTTCACTGTGCG
	SSR305	TCGTGTGTTTATTGTTGTGG	CAAACCGTTTTTAAATTGCT
	SSR306	TGGTACAAACAGGGCATTCA	AGCATTGAACGTGTGCCATC
	SSR307	GCTGTTTCCAAGGTAATTAGGG	GCTCTGGGGATAACACGGTA
	SSR308	GGTGGTTCGTAGCCCTGTAA	ATCACGAATGGCTGAGAAG

SSR309	GGACAGCAGAGCTTATGTTT	AAAGATGTTAAAACCTGGCA
SSR310	TTTCTCTCTCTGAAACCCCT	AGCGACTCACTGAGCTTTAG
SSR311	ATGAAATAATCGTTTGGTGC	CACCCGAGTTTATCTCACTC
SSR312	GAGCTGCAAACATAGGCACA	GCCCAGTTTGGAAATTAGAGG
SSR313	TGCATATTTACGTGCCTTT	CAAAGTGAGGAAGCGTCAGA
SSR314	ATCATGCGTTCGGCTACAGC	CTCAAACCTCAAACCTGTTATAAC
SSR315	TTCTAAATATAAGATAACCAATGAATG	TATCCCCGCTTGTAATTCCT
SSR316	CACTACGTGGAAATACCCAT	TAACCATTTTGGTGAAGGTC
SSR317	CCAGCAATGATTGATTGCTCC	GAGCTTTAACTGTCCAGTAGC
SSR318	GCAAAGTTATGGTCATTTCGT	AAGGACAAAATCAAGAACACA
SSR319	TTTTCATCTCTGCCAAGTCT	TATACCAAGGGACTATGCGT
SSR320	CCTCTTCTTACAGAATCAGAC	GGGATGAGTGAATGGGGTTTC
SSR321	CTGTTACCTGGCATTCTGTATCA	TAACTGGGAGCATTAGGCAG
SSR322	CATAAAGTGGTGACCTCCAT	CCGTGTTCCCTTTACTTTTG
SSR323	TCTCGCAGATTCATGTAACCC	GACTGTATGTTGACCATGCC
SSR324	GGAATCCGTTTAGGGATCTG	CGTCTGGAGAACGTGATTAG
SSR325	CCAGAGAAAGAGAGTGCTTC	AATGCAGATGTCGTTGTTTGC
SSR326	AATGTGCGACCACTCCACGC	AGAGGGTTTTCAATAACATACC
SSR327	CTCCCTCGTACTCTGACAAG	AGATTCATGCACCTGCTATT
SSR328	CACAGGAACCTGGTTATCAT	CTGGCATTCTTCTAAGCTA
SSR329	CACAGGAACCTGGTTATCAT	CTGGCATTCTTCTAAGCTA
SSR330	CCCAATATGTTCCCAAATAA	GCCATCACATGAAATAACAA
[0053] SSR331	AAAACAGAAGCAACACCTTC	TATGGTGGAGAGTGGTTTTTC
SSR332	GTCTCGGATTTTCAGTTAC	AAACAGCATGCTTATCTGGT
SSR333	CAACAAAATCAATCGCTCTC	ACCCTAGCAAAAATCAACAAA
SSR334	CATAAAGTGGTGACCTCCAT	CCGTGTTCCCTTTACTTTTG
SSR335	GTTCCACAAGTTTCCACATT	ATCCACCGTATATTCAACCA
SSR336	ATTAGCTTCTTCTAAAGCAGC	TGACTGACTGTCTGTCTCG
SSR337	CTATCCACACACAAAACACG	GATTGAGCTGAAGAGTGGAG
SSR338	GTTGGGAGGTCGTTTAAGTA	CCATCCATTTGGATTATCTG
SSR339	AGATGAACAGTTCGAGGAAA	TTTCCAACGCTTCTTAGTC
SSR340	ATTGGTGTCCACTGAAAATC	GCTGGAAAACAATACCAAAA
SSR341	TCCTAACCCGTGACTCTCTA	GTGGTGTGGTTTTGAGTCT
SSR342	TCAGTTCGCGAAAGTATAA	GTGCTACGGCCTAGAAATTA
SSR343	TGCGAACATTTTTCTTGTGG	CGCAATAGAGCCTTTGGATG
SSR344	GGGATTCTCTGCTCTAAAT	TTGATCATCAGAGGCCTAAT
SSR345	CATGCATCATTAGAGAAGAGG	TAATTGGTGAATCAAAGCCT
SSR346	ATCGGCCCTTCCATCTAAAA	TCAAATTTAGGTGCATCCTCTT
SSR347	AACCAATCAAATAAGCTCCA	CCAGTCCACCTTTTTCAATA
SSR348	TGTGTGTTTTTCGGTGATTATGA	CCAAAGCAAATGCCACATTA
SSR349	TTTCACATCTCCAATTCTCA	ATGGTATAAGGCTCGACTCA
SSR350	ATGCACTTCTTCCAAATTA	ATCAGTTCCTTCCAGCTTCAA
SSR351	ATGTCAACGTCCTGACAAA	ATTAGGCAATGCAGAACACT
SSR352	TGCATTAAGACATCACTTGC	TTCGCTTCTGTATTTCTGT
SSR353	CAAGAACGGTAAAATGCTTC	TCCATTTTCCAAATCCTAAA

	SSR354	CTCCTTAGTTAGGTCCACAAA	CCATTAACGGCTTCAAGG
	SSR355	ATTTGGATTTCCATGTTTCCAG	CATGAGTTAGCAACGAAACA
	SSR356	ATTGCGCTGGTTGTAGTTAT	CATTTGAAAGAAGGGTTTTG
	SSR357	TTTTTCGTATTCTTATCTATCC	CACTACTCTGACAAAACCATC
	SSR358	GTTGCAACCAGGTCTATTTT	CAAACCCTAGAGAATCATGC
	SSR359	GCTTGCAGATAAACCAAAAC	GTTCCCTCAAGATGATCAAA
[0054]	SSR360	GCAAAACAAAGAGAAAAGGA	TGGGTGTTTACCGAAAATAAC
	SSR361	TGTTAATCCAGCTTAGAAGATTT	GTTCTGCTCTGCTACTTTGG
	SSR362	CAAGAGCAAAGAGAGAGCAT	CAGCTGAATCACATGAATTG
	SSR363	TTGATCAAAAACCGATCTTCT	GATGTTTGTATGTCATTCCCT
	SSR364	AATAGCAAGGGGATAGCATA	GTTGGTGATAAACCTGCAAT
	SSR365	TTTAAACAACCAACACCACAA	TGTTGTGGTGGTAAACAATACT
	SSR366	CTCATCCATCGTAACCATT	CGAGTATGTTAGGAGGTTGG

[0055] 从366对引物(表2中的SSR16-SSR366引物和表3中的SSR01-SSR15引物)中进行筛选;最终,入选的有效引物15对(表3中的SSR01-SSR15),未入选的351引物(表2中的SSR16-SSR366)未能区分两组父本,第一组是1340、4123、4201、4421和6305;第二组是5016、5025、5042。

[0056] 从图1可以看出,第一组父本中的每一父本在引物SSR16中均扩增出一个等位位点,且位点均为107,即不能区分第一组的父本。而有效引物SSR01在第一组父本中均扩增出两个等位位点,仅有4123和4421的扩增位点一致,均为308/344,说明SSR01可以区分1340、4201和6305;有效引物SSR12在这五个父本中均扩增出两个等位位点且4201的扩增位点不同于其他父本,因此可用来区分4201与其他父本;在有效引物SSR15中,每一父本均扩增出一个等位位点,1340的位点为298,4123和4201的位点均为294,而4421和6305的位点均为296,综上,即可区分父本1340、4123、4201、4421和6305。

[0057] 从图2可以看出,引物SSR16在第二组父本中均扩增出一个等位位点,且位点均为107,即不能区分第二组的父本,而在有效引物SSR03中,父本5025的扩增位点为364,不同于父本5016和5042;有效引物SSR08中,父本5042的扩增位点为158/170,不同于父本5016和5025;有效引物SSR11中,父本5016的扩增位点为167/189,不同于父本5025和5042,综上,即可区分父本5016、5025和5042。

[0058] BLAST比对结果表明(表3),在15对有效SSR引物中,除了引物SSR14不能确定其在染色体的位置之外,其余14对SSR引物分布于9条染色上。这15对SSR引物中共检测出91个等位位点,每对引物产生的等位基因位点不等,介于3-11之间变化,平均约为6.07个等位位点。其中,引物SSR01扩增出的等位基因位点数最多,为11个;SSR03扩增出的等位基因位点数最少,仅3个。

[0059] 多态性信息含量(PIC)是某个基因位点变异程度高低的指标之一,且PIC值大于0.5的属于高度多态性位点,介于0.25-0.5的属于中度多态性位点,而小于0.25的属于低度多态性位点(白凤莹,曾青青,康宁等.毛白杨基因库优树倍性检测及性状对比分析.北京林业大学学报,2015,37(04):113-119)。本试验中PIC值介于0.459-0.836之间变动,平均多态性信息含量为0.655。只有引物SSR02和SSR03的PIC值小于0.5,分别为0.459和0.484,属于中度多态性位点。其它13对引物的PIC值均大于0.5,均属于高度多态性位点。说明这套引物具有较好的鉴别能力。

[0060]

表 3 SSR01-SSR15 引物序列信息

引物	所在染色体	引物序列	重复单元	产物片段	Na	PIC
SSR 01	Chr05	F: CGCTGCTAGTAGTACCACTA	AT (34)	329	11	0.836
		R: CACGCAACTTTTACCCACCC				
SSR 02	Chr11	F: TTCCTTTTCACACAATGACAA	CTT (8)	162	5	0.459
		R: TTTAAAAAAGTGGTCCGTAA				
SSR 03	Chr16	F: ACAAAATCAAAAATCACAGCCT	AATC (7)	357	3	0.484
		R: ATAGTGTCAATCGGACCTG				
SSR 04	Chr18	F: GAGAACATGTCAGCAGTTCA	TA (11)	225	4	0.572
		R: GCTTAAACATTGAGAAAAGCG				
SSR 05	Chr02	F: TCACAAAAAGGTTAACGACTTCG	GA	184	5	0.685
		R: CAGTACTCAGCTGCAGGTCC				
SSR 06	Chr14	F: AAAATTTATCTCCACCCGACA	TA (25)	178	7	0.759
		R: ATTGTGACTACAAGTTGGGC				
SSR 07	Chr19	F: GGGATAAACGAAAAACACAAG	AT (5)	144	6	0.615
		R: TCCCAGAAAATACATGGAAAC				
SSR 08	Chr16	F: CATCTGCAGAAAATCATCTCTAA	AT (10)	143	7	0.662
		R: TAAAGGCCAATAGAAAAATCG				
SSR 09	Chr19	F: TTCCTTTGCATGTCCTTTAT	TCT (7)	178	5	0.654

[0061]

	R: TGTAACACACGGTTCTACCA				
	F: TTTATTGTCCTCCAAATGCT		AT (11)	164	4
SSR 10	R: GAAGCATAAATGTC CGAATTC	Chr06			0.604
	F: AGTTAATTGCGCATGTTCTT				
SSR 11	R: AAACAAACTCCAGCAAACAT	Chr05	CA (16)	165	6
	F: ATTGTAATTATTGAACACATGCC				
SSR 12	R: GTCAGTTCAGAGTATTGTTG	Chr02	GA	189	9
	F: AGTAATTAATAAATCCTAATTGGCCT				
SSR 13	R: TGTTTTCAAGTCCAATGCTTGT	Chr06	TA (12)	275	6
	F: GGTCATCATGGATTCAATCTC				
SSR 14	R: CACCTCAATGATCCTTCAAT	*	TA (28)	183	8
	F: GTAGGCACGTAAAATCCCAGC				
SSR 15	R: ACGCAAGACCAGCTAGGAAA	Chr19	TA (14)	280	5
Mean				6.07	0.655

注: Na: 等位点数; PIC: 多态性信息含量; \*: 通过 BLAST 比对引物序列与毛果杨基因组序列 (*Populus trichocarpa* v3.0), SSR 位点不能被定位到所在染色体上。

[0062]

表 4 15 对 SSR 引物的亲本位点

引物	父本															母本
	1340	4123	4201	4421	5016	5017	5025	5042	6305	‘青毛 50’					银腺杨	
SSR01	308/328	308/344	308/320	308/344	304/344	308/330	304/344	304/334	308/348	304/342					298/316	
SSR02	182	182	182	182	182/191	182/185	182/191	182/191	182	182/191					173/179	
SSR03	352/364	352/364	352/364	352/364	352/364	352/367	364	352/364	352/364	352/367					364	
SSR04	237/239	237/241	237/239	237/239	237/239	237/241	237/239	237/239	237/239	237/241					233/239	
SSR05	183/198	183/198	183/200	183/198	185	183/198	185	185	183/198	183					181	
SSR06	182/184	182/184	184	180/182	178/180	182/184	178/180	178/180	184/186	182/184					**	
SSR07	167	167	167	167	187/190	193/196	187/190	187	167	167					164	
SSR08	158/166	158/168	158/168	158/168	158/168	158/164	158/168	158/170	158/168	164/184					158/160	
SSR09	169/181	169/181	169/181	169/181	169/178	169/178	169/178	169/178	169/181	166/169					172	
SSR10	178/180	176/178	176/178	176/178	178/180	176/178	178/180	178/180	176/178	176/178					180/182	
SSR11	167/186	167/186	167/186	167/186	167/189	167/189	167/193	167/193	167/186	167/189					172/175	
SSR12	211/233	211/233	211/237	211/233	211/231	229/239	211/231	211/231	211/233	211/247					202/217	
SSR13	288	286	286	286	294	300	294	292	288	309					**	
SSR14	163	163	163	163	186/188	163	188/190	492/194	163	163					165/175	
SSR15	298	294	294	296	292	308	292	292	296	298					**	

注: \*\*表示位点缺失

[0063] 15对多态性引物(SSR01-SSR15引物)中有3对引物的母本位点缺失,由于子代群体的母本相同,所以不影响鉴别结果。利用CERVUS 3.0软件进行子代个体鉴定,确认每一父本

的基因型在多父本亲本中是唯一的,符合下一步试验要求,可用于混合授粉子代群体的父本鉴定。

[0064] 2.2子代群体的父本鉴定

[0065] 以等质量方式混合10种毛白杨雄株无性系花粉与银腺杨雌株进行授粉杂交,获得混合授粉杂交子代。利用所筛选的15对SSR引物(SSR 01-SSR 15)对混合授粉子代进行父本鉴定,鉴定结果如表5所示。

[0066] 从表5可以看出,利用所筛选出的这15对特异性SSR引物可鉴定10个毛白杨雄株无性系混合授粉杂交子代的父本。而在育种实践中,仅仅需要鉴定具有改良目标性状的子代即可。这说明以混合花粉授粉杂交能够有效的减少杂交工作量,提高杂交选种效率。

[0067] 表5等质量混合授粉子代的父本鉴定结果

	父本	子代数量/株	子代比例/%
	1340	29	12.4
	4123	8	3.4
	4201	16	6.9
	4421	3	1.3
[0068]	5016	2	0.9
	5017	2	0.9
	5025	32	13.7
	5042	8	3.4
	6305	17	7.3
	‘鲁毛 50’	116	49.8
	总计	233	100.0

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京林业大学
- [0003] <120> 一种提高白杨杂交育种效率的方法
- [0004] <130> BJ-1006-190604A
- [0005] <160> 30
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] cgctgctagt agtaccacta 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 19
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> Artificial sequence
- [0017] <400> 2
- [0018] cacgcaactt taccacccc 19
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Artificial sequence
- [0023] <400> 3
- [0024] ttcctttcac acaatgacaa 20
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> Artificial sequence
- [0029] <400> 4
- [0030] tttaaaaact ggtccgtaa 20
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 20
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial sequence
- [0035] <400> 5
- [0036] acaaatcaaa gtcacagcct 20
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 20

- [0039] <212> DNA  
[0040] <213> Artificial sequence  
[0041] <400> 6  
[0042] atagtgttca atcggacctg 20  
[0043] <210> 7  
[0044] <211> 20  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> Artificial sequence  
[0047] <400> 7  
[0048] gagaacatgt cagcagttca 20  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 20  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> Artificial sequence  
[0053] <400> 8  
[0054] gcttaaacad tgagaaagcg 20  
[0055] <210> 9  
[0056] <211> 22  
[0057] <212> DNA  
[0058] <213> Artificial sequence  
[0059] <400> 9  
[0060] tcacaaaagg ttaacgactt cg 22  
[0061] <210> 10  
[0062] <211> 20  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> Artificial sequence  
[0065] <400> 10  
[0066] cagtactcag ctgcaggtcc 20  
[0067] <210> 11  
[0068] <211> 20  
[0069] <212> DNA  
[0070] <213> Artificial sequence  
[0071] <400> 11  
[0072] aaaattttatc tccaccgaca 20  
[0073] <210> 12  
[0074] <211> 20  
[0075] <212> DNA  
[0076] <213> Artificial sequence  
[0077] <400> 12

[0078] attgtgacta caagttgggc 20  
[0079] <210> 13  
[0080] <211> 20  
[0081] <212> DNA  
[0082] <213> Artificial sequence  
[0083] <400> 13  
[0084] gggataaacg aaaacacaag 20  
[0085] <210> 14  
[0086] <211> 20  
[0087] <212> DNA  
[0088] <213> Artificial sequence  
[0089] <400> 14  
[0090] tcccagaaat acatggaaac 20  
[0091] <210> 15  
[0092] <211> 22  
[0093] <212> DNA  
[0094] <213> Artificial sequence  
[0095] <400> 15  
[0096] catctgcaga aatcatctct aa 22  
[0097] <210> 16  
[0098] <211> 20  
[0099] <212> DNA  
[0100] <213> Artificial sequence  
[0101] <400> 16  
[0102] taaaggccaa tagaaaatcg 20  
[0103] <210> 17  
[0104] <211> 20  
[0105] <212> DNA  
[0106] <213> Artificial sequence  
[0107] <400> 17  
[0108] ttcctttgca tgcctttat 20  
[0109] <210> 18  
[0110] <211> 20  
[0111] <212> DNA  
[0112] <213> Artificial sequence  
[0113] <400> 18  
[0114] tgtaacacac ggttctacca 20  
[0115] <210> 19  
[0116] <211> 20

[0117] <212> DNA  
[0118] <213> Artificial sequence  
[0119] <400> 19  
[0120] tttattgtcc tccaaatgct 20  
[0121] <210> 20  
[0122] <211> 20  
[0123] <212> DNA  
[0124] <213> Artificial sequence  
[0125] <400> 20  
[0126] gaagcataat gtccgatttc 20  
[0127] <210> 21  
[0128] <211> 20  
[0129] <212> DNA  
[0130] <213> Artificial sequence  
[0131] <400> 21  
[0132] agttaattgc gcatgttctt 20  
[0133] <210> 22  
[0134] <211> 20  
[0135] <212> DNA  
[0136] <213> Artificial sequence  
[0137] <400> 22  
[0138] aaacaaactc cagcaaacat 20  
[0139] <210> 23  
[0140] <211> 23  
[0141] <212> DNA  
[0142] <213> Artificial sequence  
[0143] <400> 23  
[0144] attgtaatta ttgaacacat gcc 23  
[0145] <210> 24  
[0146] <211> 21  
[0147] <212> DNA  
[0148] <213> Artificial sequence  
[0149] <400> 24  
[0150] gtgcagttca gagtattggtt g 21  
[0151] <210> 25  
[0152] <211> 25  
[0153] <212> DNA  
[0154] <213> Artificial sequence  
[0155] <400> 25

[0156] agtaattaaa aatcctaatt ggcct 25  
[0157] <210> 26  
[0158] <211> 22  
[0159] <212> DNA  
[0160] <213> Artificial sequence  
[0161] <400> 26  
[0162] tgttttcaag tccaatgctt gt 22  
[0163] <210> 27  
[0164] <211> 20  
[0165] <212> DNA  
[0166] <213> Artificial sequence  
[0167] <400> 27  
[0168] ggtcatcatg gattcatctc 20  
[0169] <210> 28  
[0170] <211> 20  
[0171] <212> DNA  
[0172] <213> Artificial sequence  
[0173] <400> 28  
[0174] cacctcaatg atccttcaat 20  
[0175] <210> 29  
[0176] <211> 20  
[0177] <212> DNA  
[0178] <213> Artificial sequence  
[0179] <400> 29  
[0180] gtaggcacgt aaatcccagc 20  
[0181] <210> 30  
[0182] <211> 20  
[0183] <212> DNA  
[0184] <213> Artificial sequence  
[0185] <400> 30  
[0186] acgcaagacc agctaggaaa 20

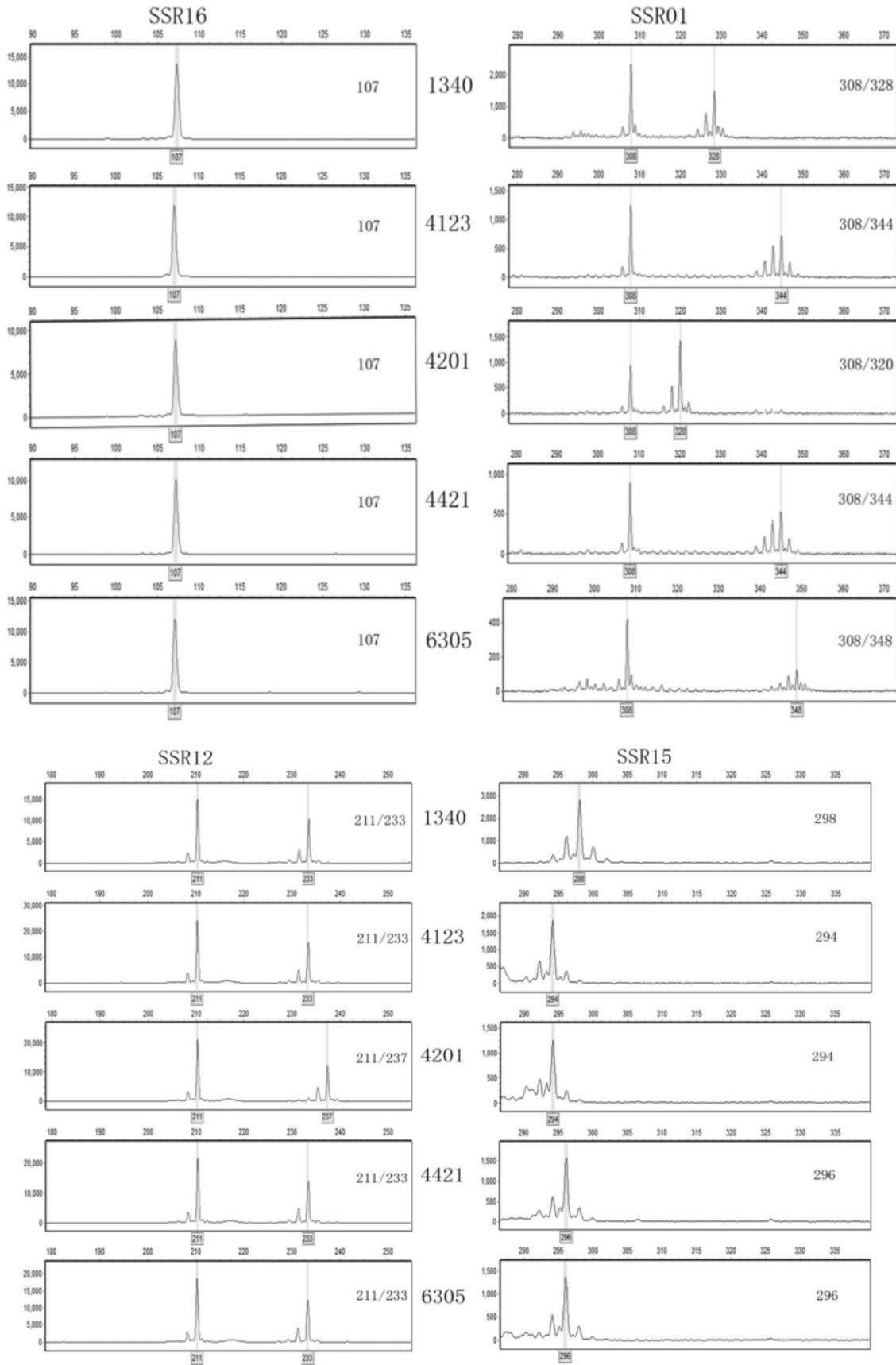


图1

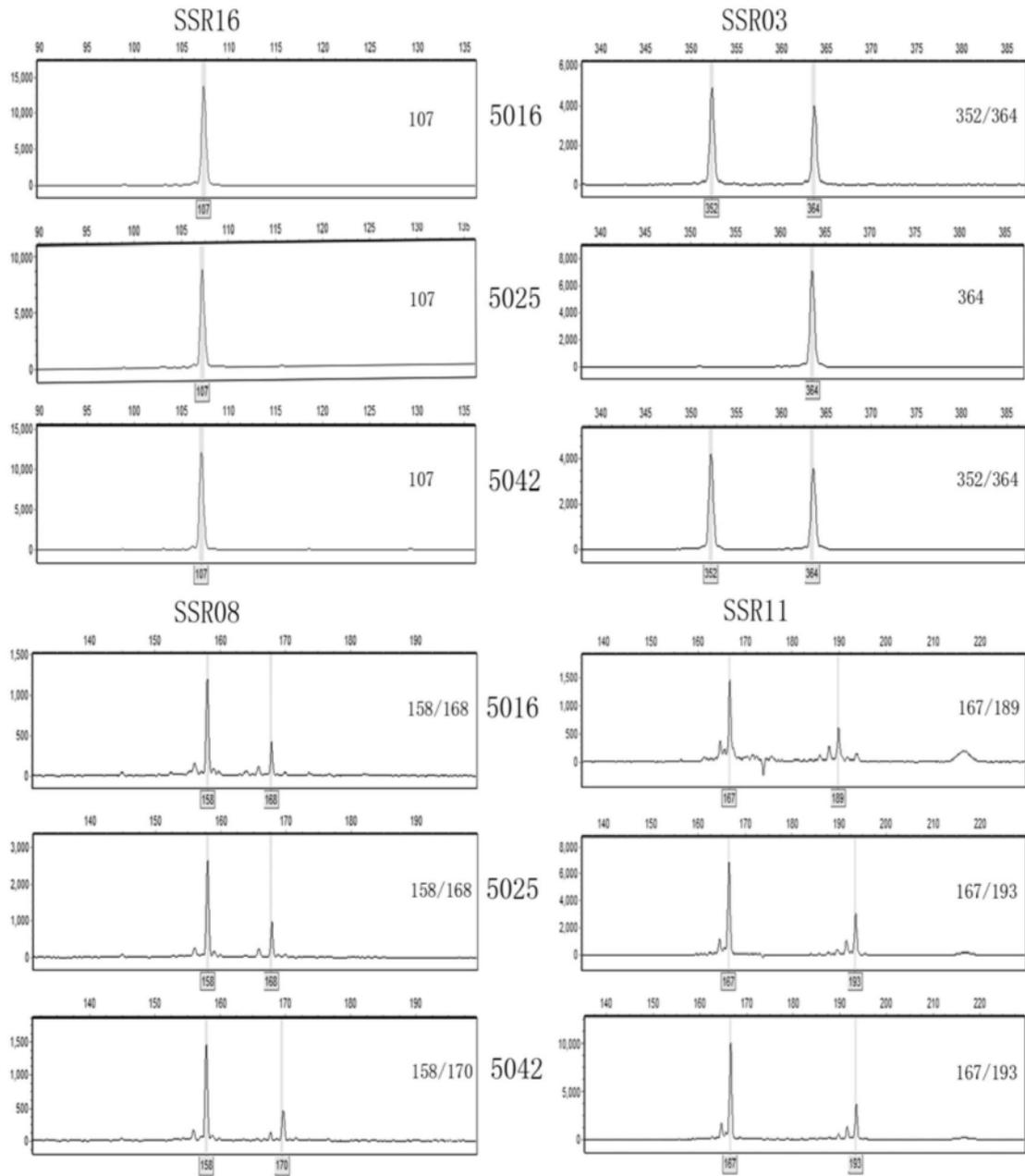


图2