

研究报告

A Letter

毛白杨基因组内转录区域遗传杂合水平估算

江锡兵[✉], 李博[✉], 宋跃朋[✉], 王泽亮[✉], 安新民[✉], 张志毅[✉]

北京林业大学林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京, 100083

✉ 通讯作者: zhangzy209@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 55 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0055

收稿日期: 2011 年 03 月 09 日

接受日期: 2011 年 04 月 25 日

发表日期: 2011 年 05 月 09 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

江锡兵等, 2011, 毛白杨基因组内转录区域遗传杂合水平估算, 分子植物育种 Vol.9 No.55 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0055)

摘要 分子标记技术的迅速发展, 为研究林木基因组遗传结构提供了重要手段。本研究首次利用 cDNA-AFLP 技术对毛白杨及毛新杨基因组转录区多态性水平和遗传杂合水平进行分析。结果显示: 47 对引物一共获得清晰可读条带 1 564 条, 标记平均多态性水平为 19.6%, 为整个基因组多态性水平的 71.5%, 且不同引物之间差异明显。利用这些引物, 对毛新杨×毛白杨回交群体进行分析, 估算出毛白杨及其杂种毛新杨基因组转录区内的平均遗传杂合水平分别为 12.47% 和 7.16%。与整个基因组的遗传杂合水平相比, 毛白杨降低了 33.4%, 毛新杨降低了 15.5%, 转录区杂合程度显著降低, 表现出在更强的选择压力下序列突变率的显著下降。本研究为进一步了解毛白杨基因组内转录区遗传结构提供了重要信息, 并为针对杨树基因组结构分析奠定了基础。基因组内转录区的遗传杂合水平反映了等位基因杂合程度, 而等位基因的杂合程度与杂种优势密切相关, 研究最后对利用转录区内遗传杂合程度研究杨树杂种优势可行性进行了探讨。

关键词 杨树; cDNA-AFLP; 多态性水平; 杂种优势

Estimating the Heterozygosity Level Within the Transcribed Regions of the Whole Genome of *Populus tomentosa* Carr.

Jiang Xibing[✉], Li Bo[✉], Song Yuepeng[✉], Wang Zeliang[✉], An Xinmin[✉], Zhang Zhiyi[✉]

National Engineering Laboratory for Tree Breeding, NDRC, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, MOE, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory, SFA, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P.R. China

✉ Corresponding author, zhangzy209@163.com; ✉ Authors

Abstract The rapid development of molecular markers technology provided a powerful tool to decipher the genomic structure of woody plants. In this study, the heterozygosity levels within the transcribed regions of the whole *Populus* genome had been analyzed with a backcross population of *P. tomentosa* by utilizing cDNA-AFLP technology for the first time. 1 564 unambiguous bands had been amplified with 47 primer combinations and the average polymorphism in transcribed regions reached 19.6%, which was 71.5% of the polymorphism of the whole genome. The results showed that the heterozygosity levels of *P. tomentosa* and *P. tomentosa* × *P. balleana* are 12.47% and 7.16% respectively. Compared with that in the whole genome scale, the heterozygosity within transcribed regions declined 33.4% and 15.5% for *P. tomentosa* and *P. tomentosa* × *P. balleana*, which indicated mutation rate slowed down in these certain region because of higher selection pressure had been focused on functional regions. This study provided basic knowledge for genetic structure of *P. tomentosa* and built a platform for further exploration in genome structure of *Populus*. The heterozygosity of transcribed regions reflected the heterozygous feature of allele which had a closed relation with heterosis, so this approach had been discussed for its role in unveiling the mechanism of heterosis of *Populus*.

Keywords Poplar; cDNA-AFLP; Polymorphism; Heterosis

研究背景

杨属树种发生在距今约 0.5~1 亿年前 (Schoell et al., 1994; Shevenell et al., 2004), 在如此漫长的进化过程中, 由于种间种内杂交频繁, 长期以来造成了遗传背景复杂, 基因组杂合程度较高, 遗传负荷较大等特点, 使得杨属树种的遗传结构研究十分困

难。遗传杂合度可以反映同源染色体相同位置上核苷酸序列的结构, 通常作为研究某一群体遗传多样性时的重要指标。与之类似, 遗传杂合水平同样可以用来研究某一种(或个体)的遗传杂合程度, 从而研究其遗传结构, 揭示其进化规律。分子标记的飞速发展, 为研究林木遗传结构提供了高效的研究手

段, 包括RAPD、AFLP、SSR等分子标记系统, 已广泛应用于杨树群体遗传学研究中。cDNA-AFLP是一种基于AFLP发展起来的分子标记系统(Bachem et al., 1998), 它继承了AFLP众多优点, 如多态性高, 通用性好, 无需序列信息等, 并且该标记反映的是表达水平上的多态性, 属于功能性分子标记。起初, cDNA-AFLP被当作研究基因表达差异的方法, 广泛应用于不同组织、不同发育阶段、不同处理之间的差异表达基因搜索及克隆(Geuna et al., 2005; de Diego et al., 2006; Xiao et al., 2009)。Brugmans等(2002)首次将该方法应用于遗传连锁图谱构建, 称之为“转录组图谱”(transcriptome map), 结果表明cDNA-AFLP是一种研究遗传基因组学(genetical genomics)稳定高效的方法。

毛白杨(*P. tomentosa*)是我国重要的乡土树种, 主要分布于我国北方地区。由于其生长迅速, 材质优良, 且干形优美, 成为我国重要的用材林种和城市绿化树种之一。何承忠(2005)对毛白杨种内的遗传多样性水平进行了分析, 发现毛白杨种内蕴藏着丰富的遗传变异。张德强等(2003)利用AFLP标记技术对毛白杨及其杂种毛新杨的遗传杂合度进行估算。本研究采用cDNA-AFLP分子标记技术, 对相同的毛白杨回交群体进行毛白杨与毛新杨基因组转录区遗传杂合程度分析。据我们所知, 这是首次针对转录区域进行遗传结构分析的研究。该研究的结

果有助于进一步了解毛白杨基因组功能区遗传杂合程度、等位基因结构, 也可以为毛白杨进化、杂种优势机理研究提供重要理论基础。

1 结果与分析

1.1 标记多态性

利用筛选出的47对AFLP引物组合, 共扩增出1 564条清晰的条带, 其中, 在后代中分离的多态性条带共307条(表1)。cDNA-AFLP检测到的多态性总水平为19.6%。多态性水平最高的为E_{AAT}/M_{AT}引物组合, 为40%, 其次是E_{ATC}/M_{CA}引物组合, 为38.5%, 多态性水平最低的是E_{ATC}/M_{TC}和E_{GAA}/M_{AA}, 两对引物均为10.5%。表1详细列出了47对引物的cDNA-AFLP标记多态性水平。AFLP标记体系中, 引物的选择十分重要, 因为物种基因组结构的差异, 酶切位点的数量和多态性上均有很大区别。对于杨树来说, *EcoR* I 和 *Mse* I 是最常用的两种内切酶, 利用这两种酶进行筛选时, 获得的可扩增片段数量可观。由表1可以看出, 不同引物之间的扩增情况差异很大, 可检测的清晰谱带数22~51不等, 多态性标记数量3~15不等, 平均扩增多态性标记数为6.5。对于cDNA-AFLP来说, 由于检测的材料由cDNA取代基因组DNA, 理论上来说, 多态性水平应该呈下降趋势。张德强等(2003)利用30对AFLP引物对该群体进行了检测, 所获得的多态性平均水平

表1 毛白杨与毛新杨基因组转录区遗传杂合水平分析

Table 1 Analysis of heterozygosity levels within transcribed regions for *P. tomentosa* and *P. tomentosa* × *P. bolleana*

引物组合 Primer combination	AFLP 片段总 数 Total number of amplified loci	多态性片段总 数 Total number of polymorphic loci	多态性水平(%) Polymorphism (%)	毛新杨杂合水平 Heterozygosity level of <i>P.</i> <i>tomentosa</i> × <i>P. bolleana</i>		毛白杨杂合水平 Heterozygosity level of <i>P.</i> <i>tomentosa</i>	
				杂合位点 Loci	杂合度(%) Heterozygosity (%)	杂合位点 Loci	杂合度(%) Heterozygosity (%)
E _{AA} M _{AAA}	39	8	20.5	2	0.051	6	0.154
M _{AAG}	33	6	18.2	3	0.091	3	0.091
E _{AG} M _{AGC}	37	4	10.8	1	0.027	3	0.081
M _{CGC}	38	7	18.4	2	0.052	5	0.132
E _{CA} M _{CGC}	42	7	16.7	4	0.095	3	0.071
M _{GCC}	40	6	15.0	3	0.075	3	0.075
E _{CG} M _{GCC}	39	5	12.8	1	0.026	4	0.103
E _{GA} M _{TGC}	38	6	15.8	3	0.079	3	0.079
E _{GC} M _{TGC}	33	7	21.2	4	0.121	3	0.091
E _{AAA} M _{AA}	32	7	21.9	2	0.063	5	0.156
M _{AC}	51	8	15.7	3	0.059	5	0.098

续表 1

Continuing table 1

引物组合 Primer combination	AFLP 片段总 数 Total number of amplified loci	多态性片段总 数 Total number of polymorphic loci	多态性水平(%) Polymorphism (%)	毛新杨杂合水平 Heterozygosity level of <i>P.</i> <i>tomentosa</i> × <i>P. bolleana</i>		毛白杨杂合水平 Heterozygosity level of <i>P.</i> <i>tomentosa</i>	
				杂合位点 Loci	杂合度(%) Heterozygosity (%)	杂合位点 Loci	杂合度(%) Heterozygosity (%)
				M_{AT}	39	7	17.9
M_{GC}	30	6	20.0	2	0.067	4	0.133
M_{TC}	28	4	14.3	2	0.071	2	0.071
$E_{AAG}M_{AA}$	29	4	13.8	2	0.069	2	0.069
M_{AG}	27	7	22.2	1	0.037	6	0.222
M_{AT}	29	7	27.6	3	0.103	4	0.138
M_{GA}	32	7	21.9	1	0.031	6	0.188
M_{TC}	36	5	13.9	2	0.056	3	0.083
M_{TT}	36	4	11.1	0	0.000	4	0.111
$E_{AAT}M_{AA}$	37	6	16.2	1	0.027	5	0.135
M_{AC}	31	5	16.1	2	0.065	3	0.097
M_{AG}	30	9	30.0	6	0.200	3	0.100
M_{AT}	25	10	40.0	2	0.080	8	0.320
M_{CT}	26	9	34.6	3	0.115	6	0.231
M_{GG}	25	7	28.0	3	0.120	4	0.160
M_{GT}	22	8	36.4	2	0.091	6	0.273
$E_{ATC}M_{AA}$	40	9	22.5	5	0.125	4	0.100
M_{AG}	41	12	29.3	4	0.098	8	0.195
M_{CA}	39	15	38.5	6	0.154	9	0.230
M_{GC}	37	4	10.8	1	0.027	3	0.081
M_{GG}	35	7	20.0	2	0.057	5	0.143
M_{GT}	31	5	16.1	0	0.000	5	0.161
M_{TA}	38	5	13.2	2	0.053	3	0.079
M_{TC}	38	4	10.5	3	0.079	1	0.026
$E_{CCA}M_{CA}$	26	7	26.9	3	0.115	4	0.154
M_{CC}	26	9	34.6	3	0.115	6	0.231
$E_{CCT}M_{CG}$	38	6	15.8	0	0.000	6	0.158
$E_{GAA}M_{AA}$	38	4	10.5	1	0.026	3	0.079
M_{AC}	38	5	13.2	2	0.053	3	0.079
M_{AT}	38	6	15.8	3	0.079	3	0.079
M_{CA}	36	5	13.9	2	0.056	3	0.083
M_{CC}	30	6	20.0	3	0.100	3	0.100
M_{CT}	25	4	16.0	1	0.040	3	0.120
M_{GA}	24	5	20.8	2	0.083	3	0.125
M_{GC}	27	6	22.2	3	0.111	3	0.111
M_{TA}	27	3	11.1	1	0.037	2	0.074
$E_{GGC}M_{GA}$	26	5	19.2	0	0.000	5	0.192
总和 Total	1564	307	—	112	0.072	195	0.125
平均 Average	33.28	6.53	19.6	2.4	—	4.1	—

为27.4%，平均多态性标记数为17.9。对两者进行比较结果发现：对于平均多态性标记数，DNA水平上所获得的多态性标记数量是cDNA水平的2.74倍，而对于平均多态性水平，DNA水平上的仅为cDNA水平的1.4倍。造成这种差异的来源有两个：一是cDNA的多态性标记数量统计上，去除了偏分离较严重的标记($P < 0.01$ 以上)，因此对于多态性标记数量相对估计偏低；二是在检测扩增条带时，cDNA标记的带型相比DNA的带型较为复杂，存在着表达量上的差异，因此在数据统计时显影较弱的条带被去除，这一部分标记的排除使得cDNA标记的多态性水平估计偏高。另外，引物选择上的差异也会影响两者之间的比较。尽管存在着统计上的差异，但是整体水平上，基因组DNA中的多态性水平远高于发育过程中木质部RNA的多态性水平，这一结论是符合前面理论上的预测的。

1.2 遗传杂合水平

根据cDNA-AFLP标记技术的特点，该实验所得到的杂合度估算是针对基因组内转录区域遗传杂合水平的估算。本研究的遗传杂合水平由亲本各自的分离标记数与可检测标记总数进行比较估算，结果如表1所示。不同引物组合获得不同数量的杂合位点，亲本毛新杨为母本，结果显示，47对引物共获得112个杂合位点数，平均杂合位点2.4个，杂合位点数从0到6个不等，其中E_{AAG}/M_{TT}、E_{ATC}/M_{GT}、E_{CCT}/M_{CG}以及E_{GGC}/M_{GA} 4对引物未检测到杂合位点；而在父本毛白杨中，47对引物共检测到195个杂合位点，每对引物杂合位点数从1到9不等，平均位点数为4.1个。计算得出毛新杨平均遗传杂合水平为7.16%，毛白杨平均遗传杂合水平为12.47%，毛白杨平均遗传杂合水平为毛新杨的1.74倍。此外，对毛新杨杂合位点数量检测最多的引物组合是E_{AAT}/M_{AG}、E_{ATC}/M_{CA}、E_{AAA}/M_{AT}和E_{ATC}/M_{AA}，分别为6、6、5和5个，而引物组合E_{ATC}/M_{CA}、E_{ATC}/M_{AG}和E_{AAT}/M_{AT}对毛白杨杂合位点检测数量最多，分别为9、8和8个。前人研究发现，当AT、AG、TC存在于选择性碱基内时，便出现数量较多的扩增条带与多态性条带，由此推断毛白杨和毛新杨基因组内可能富含以上重复序列(张德强等, 2003)。在本实验中，当AT出现在选择性碱基序列中时，便扩增出相对较多的可检测标记和多态性标记，表明AT或TA

重复序列大量存在于毛白杨和毛新杨基因组转录区内；此外，在碱基位点AT上，毛新杨与毛白杨之间表现出较大的变异，表明该位点相对于其他碱基具有较高的突变概率。对比毛新杨和毛白杨基因组与基因组内转录区遗传杂合水平发现，毛新杨和毛白杨基因组内转录区遗传杂合水平分别为各自全基因组遗传杂合水平的84.5%和66.6%。毛新杨和毛白杨全基因组与转录区域遗传杂合水平的详细比较结果如表2所示，虽然在进行cDNA-AFLP扩增时减少了一个选择性碱基，然而全基因组可检测标记以及多态性标记数仍然显著高于位于转录区内检测水平，分别为转录区的2或3倍左右。另外，其他方面的比较结果均存在明显差异，反映出转录区内存在的特有遗传结构。

2 结论与讨论

本文利用cDNA-AFLP技术对毛白杨及其杂种毛新杨基因组转录区的遗传杂合水平进行了分析，获得了与DNA水平上接近的结果。毛白杨的遗传杂合水平高于毛新杨(1.74倍)，但相比整个基因组水平(2.14倍)有所下降。毛新杨与毛白杨基因组转录区的遗传杂合程度，与整个基因组相比，均有不同程度的下降，表现出在进化过程中，该区域受到的选择压力更大，基因变异受到更大程度的制约。对于检测的全部1 564个基因位点(loci)来说，毛白杨一共有195个等位基因位点表现为杂合型，毛新杨为112个杂合等位基因位点。根据张德强等(2003)的分析，利用cDNA-AFLP同样只能检测Aa×aa、aa×AA以及Aa×Aa三种类型的分离标记。本研究没有统计Aa×Aa类型的分离标记。因此，该遗传杂合水平(杂合型等位基因座位)为最低估计值。为了更为准确的评估物种基因组结构，开发更加高效的、揭示遗传信息更为丰富的共显性标记十分必要。SSR是目前应用最为广泛的共显性标记，随着杨树基因组测序完成，对杨树基因组内的SSR数量和分布也进行了深入研究。结果表明，大约有150 985个SSR标记均匀分布在杨树基因组中，平均每1 883 bp出现1个SSR标记，其中位于基因间隔区(intergenic regions)的SSR数量占85.4%，其余分布在内含子区域(10.7%)，外显子区域(2.7%)以及基因调控区域(1.2%)(Li and Yin, 2007)。此外，SNP作为另一种共显性标记，被认为是数量最为丰富的分子标记。随着测序

表 2 全基因组和转录区域内毛白杨及毛新杨遗传杂合水平分析比较

Table 2 Comparison of the results of heterozygosity analysis between whole genome and transcribed regions

	全基因组 Whole genome	转录区域 Transcribed region			
可检测标记均数 Average number of detectable markers	65.73	33.28			
多态性标记均数 Average number of polymorphic markers	17.87	6.53			
扩增条带数最多引物 PCs with max detectable bands	E _{AAT} /M _{ATC} (110)	E _{AAA} /M _{AC} (51)			
扩增条带数最少引物 PCs with min detectable bands	E _{AAG} /M _{AAC} (50)	E _{AAT} /M _{GT} (22)			
检测多态性片段最多引物 PCs with max polymorphic bands	E _{AAG} /M _{TCT} (50)	E _{ATC} /M _{CA} (15)			
检测多态性片段最少引物 PCs with min polymorphic bands	E _{AAT} /M _{ATC} (26)	E _{ATC} /M _{CA} (15)			
平均多态性水平(%) Average level of polymorphism	E _{ATC} /M _{ATT} (26)	E _{ATC} /M _{CA} (15)			
	E _{GAA} /M _{CTG} (26)	E _{GAA} /M _{TA} (3)			
	E _{AAG} /M _{TCT} (8)	E _{GAA} /M _{TA} (3)			
平均多态性水平(%) Average level of polymorphism	27.41	19.60			
平均多态性标记 Average Number of loci	5.57	毛新杨 <i>P. tomentosa</i> × <i>P. bolleana</i>	毛白杨 <i>P. tomentosa</i>	毛新杨 <i>P. tomentosa</i> × <i>P. bolleana</i>	毛白杨 <i>P. tomentosa</i>
平均杂合水平(%) Average heterozygosity (%)	8.47	12.30	7.16	2.40	4.10
		18.71	7.16	12.47	

注: 表中全基因组部分数据引自张德强等(2003)

Note: Data of whole genome in the table were cited from Zhang D.Q., et al. (2003)

成本的降低, SNP已经越来越广泛的应用于群体遗传学研究中(Baird et al., 2008)。

杂种优势是指杂种子代在生长、适应性以及抗性方面优于其亲本的一种遗传学现象。目前, 对于杂种优势的解釋最主要的是显性假说和超显性假说。对于杨树杂种优势研究的结果普遍支持显性假说, 表现为显性基因对不利隐性基因的掩盖作用是导致杂种优于亲本的原因。美国华盛顿大学在1980年利用毛果杨和美洲黑杨作亲本, 杂交获得了具有明显杂种优势的F₁代, 1993年再通过从F₁代中选出的优良无性系自交, 获得346个F₂代个体。之后, 对该杨树三代谱系进行了较为系统的杂种优势研究。Bradshaw等(1994, 1995)利用RFLP、STS和RAPD标记构建了毛果杨和美洲黑杨的遗传图谱, 并对重要的经济性状和物候性状进行了QTL定位分析。分子标记的杂合度与杂种表现之间的关系可以用来推测杂种优势是否由超显性效应起主要作用。分析结

果显示F₂代个体中基因组杂合度与F₂代个体表现不存在相关, 由此推测杨树杂种优势的遗传学基础是显性效应, 而不是超显性效应。然而, 以前的研究多数是建立在DNA标记上的杂种优势预测和分析。而这些标记作为中性标记(neutral markers), 无法判断其来源于转录区还是非编码区, 也不知道是否与所研究的性状相关, 因此对杂种优势的预测容易产生偏差。如果仅利用编码区的“功能性标记”(functional markers)进行与杂种优势的连锁分析, 势必会提高杂种优势预测的效率。本研究利用cDNA-AFLP技术估算了转录区的杂合度, 接下来的工作是利用回交群体的杂合度与各性状进行相关分析, 从而为杨树杂种优势研究提供参考。

3材料与方法

3.1实验材料

本研究实验材料为7年生毛新杨与毛白杨回交群体, 群体的父母本分别为毛白杨无性系雄株鲁毛

50 (种植于山东冠县全国毛白杨基因库)和毛新杨无性系雌株TB01 (种植于中国农业大学校园内)。张德强等(2003)于2000年通过人工水培杂交获得694株种间回交子代, 并将子代与亲本共同定植于北京林业大学苗圃内。2007年6月, 对该群体进行调查, 随机选择其中的132株进行遗传杂合度估算。

提取未成熟木质部组织的RNA作为cDNA-AFLP分析的起始材料。参照Sterky (2002)的方法并进行相关改进, 对未成熟木质部进行取样。具体方法如下: 用解剖刀在树干胸径处向南一侧树皮上(同一方向取样)切割出5 cm×5 cm大小的方块, 拨开树皮后木质部外的几层水状细胞即为未成熟木质部组织, 刮取、收集未成熟木质部组织并迅速冻存至液氮中, 带回北京林业大学实验室进行RNA提取工作。

3.2 RNA提取

RNA提取采用RNasy Plant Mini Kit (Qiagen), 操作步骤参见试剂盒说明书, 在提取过程中, 加入DNA酶(Qiagen)完全清除残留的DNA, 50 μL去离子水洗脱后, 取2 μL用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 其余放入-80℃冰箱中待用。

3.3 cDNA合成

对提取的总RNA进行电泳检测, 选取质量较高的总RNA进行cDNA合成, 采用Reverse Transcription System (Promega)合成cDNA第一链, 具体操作方法见试剂盒说明书; cDNA第二链的合成参照Sambrook等(2002)方法。

3.4 cDNA-AFLP分析

cDNA-AFLP操作参考Bachem等(1998)的方法, 内切酶为EcoR I 和Mse I。电泳条件为恒功率95 w, 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h, 硝酸银染色, 碳酸钠溶液显影后进行结果统计分析。

3.5 杂和水平分析

根据Cervera等(2001)研究方法, 在子代中分离的总标记数与所观察到的总标记数之比被定义为平均遗传杂合水平。

作者贡献

江锡兵、李博、宋跃朋和王泽亮是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 江锡兵及李博完成数据分析, 论文初稿

的写作; 宋跃朋、王泽亮和安新民参与实验设计, 试验结果分析; 张志毅是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家林业公益性科研专项经费项目(201004009)资助, 作者感谢张德强教授在本实验过程中的技术支持和有益的建议。

参考文献

- Bachem C., Oomen R., and Visser R., 1998, Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step by step protocol, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16(2): 157-173
- Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., Selker E.U., Cresko W.A., and Johnson E.A., 2008, Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers, *PLoS ONE*, 3(10): e3376 (doi:10.1371/journal.pone.0003376)
- Bradshaw H.D., and Stettler R.F., 1995, Molecular genetics of growth and development in *Populus*, IV, Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree, *Genetics*, 139(2): 963-973
- Bradshaw H.D., Villar M., Watson B.D., Otto K.G., Stewart S., and Stettler R.F., 1994, Molecular genetics of growth and development in *Populus*, III, A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.*, 89(2-3): 167-178
- Brugmans B., Carmen A.F., and Bachem C.W.B., 2002, A novel method for the construction of genome wide transcriptome maps, *The Plant Journal.*, 31(2): 211-222
- Cervera M.T., Storme V., Ivens B., Gusmao J., Liu B.H., Hostyn V., Slycken J.V., Montagu M.V., and Boerjan W., 2001, Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and Microsatellite markers, *Genetics*, 158(2): 787-809
- De Diego J.G., Rodriguez F.D., Lorenzo J.L.R., Granppin P., and Cervantes E., 2006, cDNA-AFLP analysis of seed germination in *Arabidopsis thaliana* identifies transposons and new genomic sequences, *Journal of Plant Physiology*, 163(4): 452-462
- Geuna F., Banfi R., and Bassi Daniele., 2005, Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit, *Tree Genet Genomes*, 1(2): 69-78
- He C.Z., 2005, Study on Genetic Diversity and Origin of *Populus tomentosa* Carr., Dissertation for Ph.D., Beijing Forestry University, Supervisor: Zhang Z.Y., pp.58-71 (何承忠, 2005,

毛白杨遗传多样性及起源研究, 博士学位论文, 北京林业大学, 导师: 张志毅, pp.58-71)

- Li S.X., and Yin T.M., 2007, Map and analysis of microsatellites in the genome of *Populus*: The first sequenced perennial plant, *Sci. China Ser. C (Life Sci.)*, 50(5): 690-699
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T., eds., Jin D.Y., Li M.F., et al., trans., 2002, *Molecular cloning: A laboratory manual (Version 2)*. Science Press, Beijing, China, pp.403-408 (萨姆布鲁克 J., 弗里奇 E.F., 曼尼阿蒂斯 T., 主编, 金冬雁, 黎孟枫等, 主译, 2004, 分子克隆: 实验指南(第二版), 科学出版社, 中国, 北京, pp.403-408)
- Schoell M., Schouten S., Damste J.S.S., Deleeuw J.W., and Summons R.E., 1994, A molecular organic carbon isotope record of miocene climate changes, *Science*, 263(5150): 1122-1125
- Shevenell A.E., Kennett J.P. and Lea D.W., 2004, Middle miocene southern ocean cooling and antarctic cryosphere expansion, *Science*, 305(5691): 1766-1770
- Sterky F., Regan S., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A., Holmberg A., Amini B., Bhalerao R., Larsson M., Villarreal R., Van Montagu M., Sandberg G., Olsson O., Teeri T.T., Boerjan W., Gustafsson P., Uhlen M., Sundberg B., and Lundeberg J., 1998, Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(22): 13330-13335
- Xiao X.H., Li H.P., and Tang C.R., 2009, A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the Latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree), *Mol. Biotechnol.*, 42(1): 91-99
- Zhang D.Q., Zhang Z.Y., Song W., and Yang K., 2003, Estimation of the genetic heterozygosity of *Populus tomentosa* and its hybrid *P. tomentosa* × *P. bolleana* using AFLP technique, *Scientia Silvae Sinicae*, 39(3): 48-52 (张德强, 张志毅, 宋婉, 杨凯, 2003, 运用 AFLP技术估计毛白杨及其杂种毛新杨的遗传杂合水平, *林业科学*, 39(3): 48-52)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>