

# 基于BSA混池测序分析开发胡杨性别鉴定的标记

陈向向<sup>1,2,3#</sup>, 张山河<sup>1,2,3#</sup>, 韩晓莉<sup>1,2,3</sup>, 翟军团<sup>1,2,3</sup>, 吴智华<sup>1,4</sup>, 焦培培<sup>1,2,3\*</sup>, 李志军<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔

<sup>2</sup>塔里木大学胡杨研究中心, 新疆 阿拉尔

<sup>3</sup>塔里木大学生命科学与技术学院, 新疆 阿拉尔

<sup>4</sup>浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华

收稿日期: 2022年4月15日; 录用日期: 2022年5月18日; 发布日期: 2022年5月26日

## 摘要

胡杨是中国西北地区重要的乔木树种, 其在新疆的分布最为广泛, 具有较强的耐旱、耐寒、抗盐碱的能力, 在遏制沙漠扩展、保护生物多样性、保障工农业生产生态安全等诸多方面具有不可替代的作用。为了能够在胡杨幼苗阶段对雌雄个体进行性别鉴定, 本研究提取雌雄胡杨叶片高质量的基因组DNA, 分别构建文库以进行Illumina、PacBio和Hi-C测序。基于PacBio测序得到的reads进行初步组装。并采用Illumina测序得到的reads对组装结果进行纠错得到草图版本的基因组。利用Hi-C测序技术将雌雄基因组组装, 对雌雄基因组进行注释、评估, 获得到染色体水平的高质量雌雄基因组序列。基于BSA混池测序分析, 以胡杨雄株高质量基因组为参考, 对96个雌株和97个雄株的BSA-seq数据进行关联分析, 筛选出雌性混池深度连续为0, 同时雄性混池深度连续大于10的区域。对这些区域提取包括上下游150 bp在内的序列作为性别鉴定候选区域, 将性别候选区域与胡杨高质量雌株基因组进行Blast同源比对, 根据性别候选区最终筛选出胡杨雌雄共有的3对特异性引物和雄性性别连锁的4对特异性引物。结果表明胡杨待测样品在雌雄共有引物对扩增出条带的基础上, 若扩增出100~300 bp大小的特有条带则为雄性, 若未扩增出目标条带, 则为雌性。这在幼苗期对胡杨性别进行鉴定提供了重要的理论依据, 为解决行道树旁胡杨飞絮污染问题和商业化种植与应用提供了可靠的解决方案。

## 关键词

胡杨, 雌雄异株, 混池测序分析, 性别鉴定

## A Novel Method for Gender Identification of *Populus euphratica* Oliv. Based BSA Mixed Pool Sequencing Analysis

#第一作者。

\*通讯作者。

文章引用: 陈向向, 张山河, 韩晓莉, 翟军团, 吴智华, 焦培培, 李志军. 基于 BSA 混池测序分析开发胡杨性别鉴定的标记[J]. 植物学研究, 2022, 11(3): 319-328. DOI: 10.12677/br.2022.113038

Xiangxiang Chen<sup>1,2,3#</sup>, Shanhe Zhang<sup>1,2,3#</sup>, Xiaoli Han<sup>1,2,3</sup>, Juntuan Zhai<sup>1,2,3</sup>, Zhihua Wu<sup>1,4</sup>,  
Peipei Jiao<sup>1,2,3\*</sup>, Zhijun Li<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Alaer Xinjiang

<sup>2</sup>Desert Poplar Research Center, Tarim University, Alaer Xinjiang

<sup>3</sup>College of Life Science and Technology, Tarim University, Alaer Xinjiang

<sup>4</sup>College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

Received: Apr. 15<sup>th</sup>, 2022; accepted: May 18<sup>th</sup>, 2022; published: May 26<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

*Populus euphratica* is an important tree species in northwest China, among which Xinjiang is the most widely distributed, with strong drought, cold, and salinity resistance. It plays an irreplaceable role in many aspects such as curbing the expansion of deserts, protecting biodiversity, and ensuring the ecological security of industrial and agricultural production. To enable sex identification of male and female individuals at the seedling stage of *P. euphratica*, high-quality genomic DNA from male and female *P. euphratica* leaves was extracted, and libraries were constructed for Illumina, PacBio, and Hi-C sequencing. Preliminary assembly was performed based on the reads obtained by PacBio sequencing, and the reads obtained by Illumina sequencing were used to correct the assembly results to obtain a draft version of the genome. The male and female genomes were assembled by Hi-C sequencing technology, and the male and female genomes were annotated and evaluated to obtain high-quality male and female genome sequences at the chromosome level. Taking the assembled male genome as a reference, the BSA-seq data of 96 female plants and 97 male plants were subjected to association analysis using the BSA mixed pools. The candidate sequences of sex identification are where the depth of the female pool was continuously 0, while the depth of the male pool was continuously greater than 10 was obtained. Sequences including upstream and downstream 150 bp were extracted from these regions as candidate gender markers. Blast the candidate sequences to the assembled female genome. Finally, three pairs of specific primers shared by male and female and four pairs of specific primers linked by male sex were designed according to the screened sex candidate sequences. The results show that, On the basis of amplifying the bands from the male and female common markers, if a 100~300 bp male-specific marker band is amplified, it will be a male; if the target band is not amplified by the primer pair of the male marker, it will be a female. These provide an important theoretical basis for the sex identification mechanism of *P. euphratica* in the seedling stage, and provide a solution for solving the pollution problem of flying fuzz seeds near street trees and commercial planting and application.

## Keywords

*Populus euphratica*, Dioecious Plant, Mixed Pool Sequencing Analysis, Gender Identification

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)别名胡桐、异叶杨, 是古地中海残遗植物种[1], 被称为“第三纪活化石”。胡杨的世界分布范围横跨亚、非、欧三个大陆, 主要分布在中亚、西亚, 其次是北非和南欧[2]。

胡杨的中国分布在北纬 37°~47° (特别集中在 37°~42°), 从天山南北向东经罗布泊低地和哈密嘎顺戈壁至甘肃河西走廊西端敦煌以及内蒙古, 形成东西走向的狭长、曲折、断续的廊状林地, 主要分布在新疆塔里木盆地和准格尔盆地[3]。胡杨为雌雄异株植物, 具有根孽繁殖能力强、个体相对集中、群体相对分散、雌雄异步开始, 近同期结束的特性[4], 为抵御在开花期出现不利自然条件, 避免胡杨、灰杨授粉中断创造了有利的条件, 体现了胡杨群体适应荒漠化环境所采取的一种生殖策略[5]。胡杨因其能够适应干旱荒漠区恶劣的自然环境, 市场上对胡杨苗木的需求在逐年增加, 然而胡杨种子实生苗性状分离严重、成材困难, 难以满足市场需求[6], 因此在幼苗期能够鉴定出胡杨性别对于市场需求或者生态效益而言都是至关重要的。

植物性别的表现形式较为复杂, 在植株水平上, 可分为雌雄同株同花、雌雄异株、雌雄异花同株、雌花两性花同株、雄花两性花同株[7] [8]。雌雄异株植物因其不同性别具有不同的植株表型, 因此在人类的生产实践活动中具有极其中重要的价值, 例如当以获取农作物种子和果实为目的栽培时, 则需要大量的雌花或者雌性植株, 如黄瓜(*Cucumis sativus* L.)作为蔬菜, 人们在实际生产中往往通过激素处理诱导雌花的分化, 以获取更多果实; 在获取番木瓜(*Carica papaya* L.)和银杏(*Ginkgo biloba* L.)的果实时[9] [10], 生产者往往需要在幼苗期对其性别进行早期鉴定, 来调节其种植比例以达到最大的经济效益; 以道路绿化景观设计为目的时, 雄株银杏长势旺盛, 在栽培中应以雄株为佳[10]; 大麻(*Cannabis sativa* L.)的雄株纤维质量更优[11], 因此在实际的生产栽培中也以雄株大麻的需求为主。总的来说, 雌雄异株植物在形态学以及经济价值方面都存在一定差异, 有针对性的对植物性别进行鉴定有利于满足实际生产需求[12]。

植物性别决定机制是一个错综复杂的调控过程, 由于其易受营养状况、水分、光照、温度、激素等环境因子的影响, 因此植物的性别决定机制往往比动物更为复杂[13]。前人对于植物性别鉴定的研究方法主要集中在分析雌雄株外部形态、生理代谢产物、同工酶、核苷酸序列差异等方面[14]。DNA 分子标记因其具有准确度高、重复性好、受环境影响小等优势, 已被广泛应用于雌雄异株植物的早期性别鉴定中[15]。当前, 雌雄异株植物早期性别鉴定的分子标记技术主要有 RAPD 标记[10] [16] [17]、SCAR 标记[18]、AFLP 标记[19]。ISSR 标记因其揭示物种的多态性高, 已应用于基因定位[20]、遗传作图[21]、种质资源鉴定[22]、进化和系统发育[23]方面, 而 ISSR 标记在植物性别鉴定中的应用中也尚未见报道。由 Michlmore 等人首次提出的 BSA 混池分组分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA), 是指对所研究的表型性状, 选择表型差异显著的亲本构建表型分离群体, 在分离群体中选择极端表型的一定数量的个体, 分别混合构建 DNA 池, 比较不同表型 DNA 池之间基因突变频率的差异, 存在差异的区段即为目的基因或数量性状位点(Quantitative Trait Locus, QTL)所在的染色体候选位置, 对锁定到的候选区间内的基因进行功能注释, 实现性状决定基因的快速定位。例如早期应用于干旱胁迫下的水稻产量[24]、耐旱性[25] [26] [27]和耐热性[28]、小麦的水分胁迫[29]和埃及棉的耐盐性[30]等方面的研究。随着新一代测序技术的迅猛发展, 人们提出了 BSA 混池测序分析的方法, 即对样本进行 BSA 混池分组分析的基础上, 对极端性状分别构成的混合池进行下一代测序(next-generation sequencing, NGS), 辅助高通量基因分型, 从而达到能够快速、准确识别性状决定基因, 显著降低研究成本的新策略。例如 Yang 等[31]从 10800 个样本量中挑出对低温极端敏感 430 株对和对极端耐受低温的 385 株水稻幼苗, 对大约 45 万个 SNP 进行基因分型, 最终获得 6 个低温 QTL, 也鉴定出 4 个部分抗稻瘟病 QTL 和 2 个苗木活力 QTL。Song 等[32]在大豆中鉴定出控制种子子叶黄色和绿色颜色的两个定性基因, 结果表明, 即使一个性状受多个基因座控制, BSA-seq 也可以加速控制定性性状的基因定位。

胡杨作为荒漠地区特有的珍贵乔木树种, 它具有耐寒、耐旱、耐盐碱、抗风沙, 有很强的生命力等特性, 特别是叶形多变、叶色美丽, 是新疆当地行道树中首选的树种。胡杨的雌株在果实成熟期散布大量带冠毛的种子, 这些带冠毛的种子随风飘扬, 给人们生活出行带来了许多不便, 因此在行道绿化建设中

急需要选择胡杨的雄株，但是胡杨幼苗阶段雌雄在形态上无差异、难以辨别。本研究基于城市绿化建设中的需求，拟从分子水平，采用 BSA 混池测序分析方法，探究胡杨雌雄株中与性别连锁的特异性引物条带，为胡杨在幼苗期间性别鉴定提供理论依据，为后期大规模种植及其他杨树的性别鉴定提供技术支撑。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 样品的采集及 DNA 提取

基于本课题组分别对 96 个雌株和 97 个雄株样本 DNA 的混池测序数据分析(BIG-GSA nos. CRR330932 和 CRR330933)，同时在 2020 年 7 月份，从不同地区采集带有果实的胡杨雌树 10 株和无果实的雄树 10 株(表 1)，采集标准为胡杨叶片无明显的病虫害侵染，带回实验室进行 DNA 提取。

**Table 1.** Sampling sites of different dioecious *populus euphratica* individuals

**表 1.** 不同胡杨雌雄株的采样地点

群体	泳道	物种(学名)	性别(符号)
阿克苏地区柯坪县	1	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
阿克苏地区沙雅县	2	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
阿克苏地区拜城县	3	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
喀什地区伽师县	4	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
喀什地区莎车县	5	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
喀什地区岳普湖县	6	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
喀什地区英吉沙县	7	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
喀什地区叶城县	8	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
和田地区皮山县	9	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
和田地区策勒县	10	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雌株(♀)
阿克苏地区柯坪县	1	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
阿克苏地区沙雅县	2	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
阿克苏地区拜城县	3	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区伽师县	4	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区莎车县	5	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区岳普湖县	6	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区英吉沙县	7	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区叶城县	8	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区巴楚县	9	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)
喀什地区巴楚县	10	胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	雄株(♂)

### 2.2. 引物设计

以雄基因组(GWH accession ID: GWHBHOO0000000)为参考，以本课题组研究的 96 个雌株和 97 个雄株的 BSA-seq 数据进行关联分析，得到雌性混池深度连续为 0，同时雄性混池深度连续大于 10 的区域。

对这些区域提取包括上下游 150 bp 在内的序列作为候选的性别标记。对所得标记与组装所得雌株基因组 (GWH accession ID: GWHBHN00000000) 进行 Blast 比对序列比对, 初步将得到的 30 个候选标记, 采用 Primer 5 软件以 30 个候选性别标记为目的片段设计引物, 其中引物长度为 18~22 bp, GC 含量为 35%~48%。随后将设计的引物送公司进行合成, 引物具体分为雌雄共有标记 16 个, 雌雄可能共有标记 10 个, 以及雄性特有标记 4 个。

### 2.3. PCR 体系的构建

利用合成的 30 对引物对胡杨雌雄各 10 个样品提取的 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系如下(表 2)。PCR 的产物取 5  $\mu$ L, 采用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 在 80 V 稳压下电泳 30 min, 电泳完毕后, 通过凝胶成像系统进行拍照并记录结果。分别找出在胡杨雌雄株各 10 个样品中均能扩增出明亮、清晰的目的条带以及仅能在雄株 10 个样品中均能扩增出的引物对。

**Table 2.** PCR reaction system

**表 2.** PCR 反应体系

试剂	体积
2 $\times$ Taq PCR Master Mix	12.5 $\mu$ L
上游引物	1 $\mu$ L
下游引物	1 $\mu$ L
模板	1 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ L
总体积	25 $\mu$ L

## 3. 结果与分析

### 3.1. 雌雄共有标记的开发与检测

利用胡杨雌雄株共有标记的 16 对引物, 以不同地区胡杨群体待测雌雄株各 10 个样品提取的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增实验。最终从预先设计的 16 对引物中, 发现能够准确扩增出清晰、明亮条带的 3 对候选核心引物, 其分别对应的图(图 1)和对应的引物序列如下(表 3), 结果表明候选的这三对引物(F1, F2, F3)中的任意一对, 都能够有效的检测出是否从待测雌雄株样品中提取出胡杨 DNA 样品。

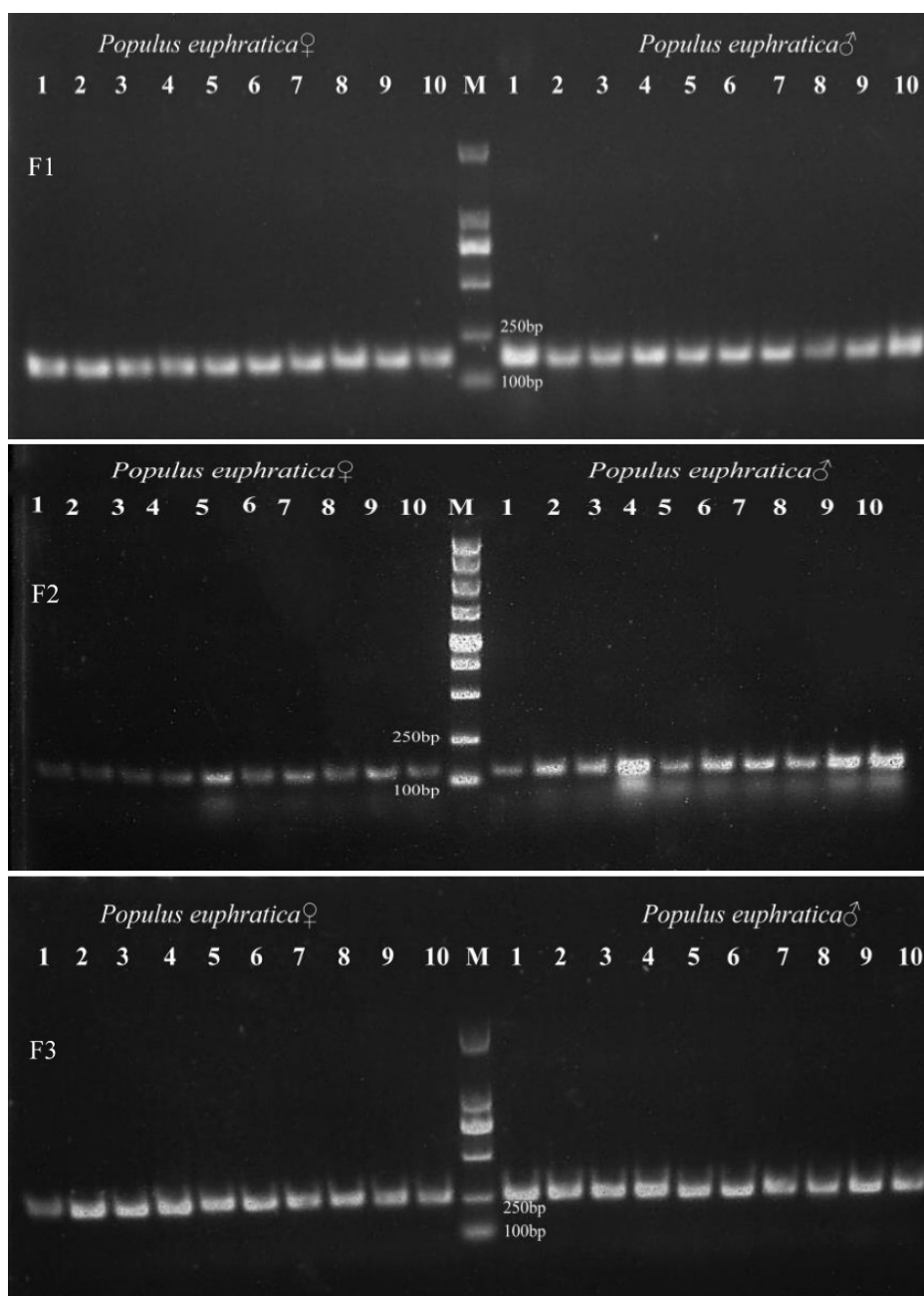
**Table 3.** Specific primer sequences shared by dioecious *populus euphratica*

**表 3.** 胡杨雌雄株共有的特异性引物序列

标记名称	引物名称	引物序列(5'-3')
F1	上游引物	TAACCCATCTAACGAGCTT
	下游引物	TGAGTTGAGGAGAAAAGC
F2	上游引物	TAGTGGTGAATCTAAGGCAAAG
	下游引物	TCTCCCATCTTCTTCTTGATT
F3	上游引物	ATGAAAGTGGGAGAAGTGG
	下游引物	CAGAACAGAATCAGGTCGTA

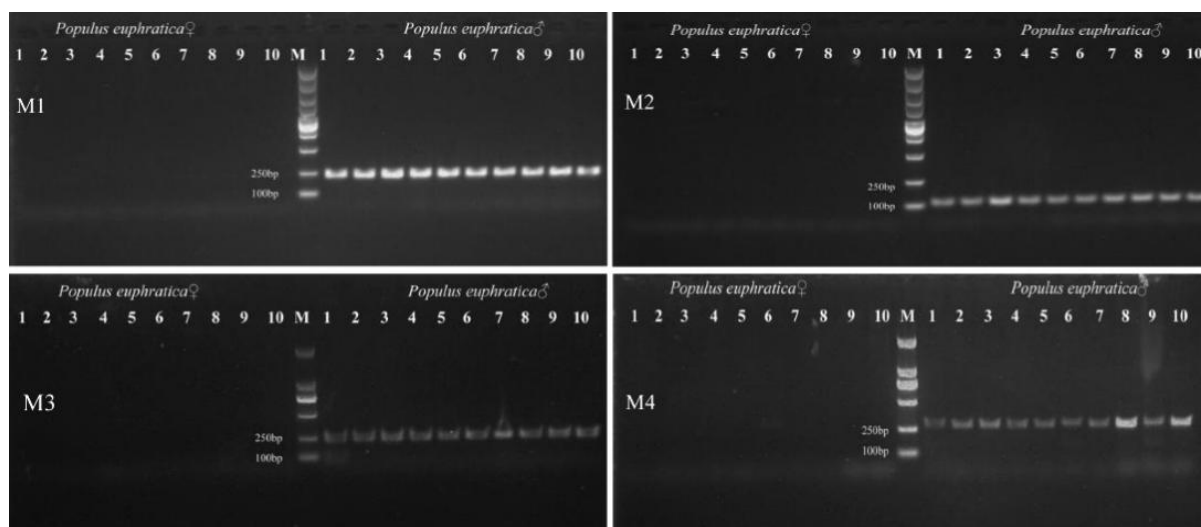
### 3.2. 雄性特有标记的开发与检测

利用胡杨雌雄株可能共有的 10 对引物及雄性特有的 4 对引物共 14 对引物, 以不同地区群体待测胡杨雌雄株各 10 个样品提取的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增实验。最终从预先设计的 14 对引物中, 发现能够准确扩增出具有清晰、明亮条带的 4 对雄性特异性核心引物, 其分别对应的图(图 2)和对应的引物序列如下(表 4)。结果表明, 在雌雄共有标记扩增出条带的基础上, 若扩增出 100~300 bp 大小的雄性特有标记的条带, 则为雄性; 若雄性标记的引物对未扩增出目标条带, 则为雌性。



**Figure 1.** Amplification profile of 20 untested *populus euphratica* samples in three pairs of primers shared by females and males

**图 1.** 20 个胡杨待测雌雄株样品在三对雌雄共有性引物中的扩增谱



**Figure 2.** Amplification profile of 20 untested samples in four pairs of male-sex primers shared by *populus euphratica*  
**图 2.** 20 个胡杨待测雌雄株样品在四对雄性特异性引物中的扩增谱

**Table 4.** Primers sequences for male-specific markers of *populus euphratica*

**表 4.** 胡杨雄性特异性标记的引物序列

标记名称	引物名称	引物序列(5'-3')
M1	上游引物	AAAGCACCTTAGTAACATTG
	下游引物	GTCATCCACAAACGAAAT
M2	上游引物	ATAACCCGAGAACTGTTTCA
	下游引物	GTTGACGATTACAAGGCTACT
M3	上游引物	GACTACAAGAAATAAGCAAACG
	下游引物	ATGCCTCAATCGCAATCT
M4	上游引物	ATCACAACAACAGCGAGTC
	下游引物	GAAAGAATCAGCGTAAAGA

## 4. 讨论

杨属在世界的分布范围广、木材应用广，仅中国的面积就已超过  $7 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ，为研究杨树物种性别决定提供了丰富的材料来源[33]，杨属物种多为雌雄异株植物，其中胡杨群体在中国主要分布于西北地区，对维系极端干旱区生态平衡具有重要的生态价值。尽管胡杨的二代基因组测序[34]及其他杨属的基因组测序已经基本完成，然而对于杨属物种的雌雄性别鉴定报道却少之又少，当前有关杨属报道的是银白杨早期性别鉴定的雌性特异的两个 DNA 分子标记，但尚未见有关胡杨性别鉴定相关分子标记的开发和应用。因此本研究利用 BSA 混池测序分析 96 个雌株和 97 个雄株样本，开发出 3 对雌雄共有的核心引物及 4 对雄性特异性引物，该方法有助于快速且经济高效地鉴定胡杨的性别，也有助于进一步对胡杨性别决定的分子机制和繁殖机制的研究。

相比于传统胡杨性别的识别方法，分子水平上胡杨性别鉴定的准确度更高，例如通过解剖学方法对胡杨雌雄株叶片进行分析，发现胡杨雌株叶片的表皮细胞厚度、角质层厚度、叶片厚度等均明显大于雄株，且雌株叶片早生结构特点更明显[35]。同时对胡杨雌雄株叶片气孔的差异进行比较，发现雌株下表皮气孔

密度显著高于雄株,雌株上表皮气孔长度显著长于雄株气孔长等结果[36]。然而研究表型性状的群体数量有限、人为观察测量误差大、物种的表型性状易受不同种源地环境因子的影响而发生可塑性变化[37],更为重要的是研究的对象一般为胡杨成熟阶段的表型性状,而非胡杨的幼苗阶段,这些因素对辨别胡杨群体雌雄株带来了很大的困难。而在分子水平上,因不受个体发育时期以及取材部位的限制,不用考虑环境因素以及基因表达与否等因素,因此在本研究中,利用分子手段从基因组水平上来对胡杨雌雄群体早期发育阶段进行鉴定显得更为准确和重要。

近年来 RAPD 分子标记因其在不同物种中含有丰富的多态位点信息,而被广泛用于雌雄异株植物的性别早期鉴定中[16] [17]。然而 RAPD 技术需要严格标准化 PCR 条件,因为不同浓度的 DNA 聚合酶、DNA 模板和引物比例或退火温度会导致扩增结果的差异,从而导致指纹的重复性低[38],例如 Sharma 等[39]利用 RAPD 分子标记获得与沙棘雄性特异性基因连锁 OPD20-911 标记基因,然而它仅限于鉴定五种雄蕊和雌蕊基因型。因此 RAPD 分子标记对于植物的鉴定性别并不具有广泛的可靠性和稳定性,RAPD 分子标记也逐渐转向为更稳定的 SCAR 标记。Korekar 等[40]分别从沙棘雌雄混池样本中筛选出 60 对 RAPD 引物,最终确定了两个与雌性连锁的 SCAR 标记。Jiang 等[41]在芦笋(*Asparagus officinalis* L.)的混池样本中,利用 RAPD 标记获得的 760 对引物进行用于批量分离分析,最终获得 1 个与雄性连锁的 SCAR 标记。当然 SCAR 标记也存在一定的缺陷,例如待测样品的 DNA 降解,则会引起目的片段的 PCP 扩增失败,导致植物性别鉴定结果错误,然而在本实验研究中,首先用雌雄共有的 3 对特异性引物中的任意一对来检验不同地区群体胡杨样品是否存在提取的 DNA 降解或者成功提取,其次用 4 对与胡杨雄性别连锁的特异性引物中任意一对来鉴定待测胡杨样品的雌雄性别,同时本研究的优势是用极少的引物却可以获得较多的性别连锁的特异性标记。因此本实验研究方法很好地克服了 RAPD 标记中的结果不稳定和 SCAR 标记中需要设计大量的引物进行筛选的繁琐程序和防止 DNA 降解的等缺点。

## 5. 结论

本研究在分子水平上,分别对胡杨雌雄株的 DNA 混合样本进行 BSA 混池测序分析,最终获得了与胡杨雄株性别连锁的特有引物条带,成功解决了胡杨幼苗阶段雌雄性别鉴定难这一问题,为后期在荒漠区大规模种植胡杨幼苗及其他杨树的性别鉴定提供了技术上的支撑和理论上的指导。

## 致 谢

感谢盖中帅、孙健皓、邱晨、郭雪飞、李秀、董晓山、王子健、王佳宁、张晋龙、杨宇琦等同学在采样过程中的协助。

## 基金项目

兵团财政科技计划资助(2022CB001-10),塔里木大学校长基金自然科学基金项目(TDZKKY202202),塔里木大学研究生科研创新项目(TDGRI201901, XJ2021G292)资助。

## 参考文献

- [1] 高润宏,张巍,郭晓红. 额济纳胡杨林生态效益评价及保护对策探讨[J]. 干旱区资源与环境, 2000(s1): 74-77. <https://doi.org/10.13448/j.cnki.jalre.2000.s1.016>
- [2] 魏庆莒. 胡杨[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990, 1-99.
- [3] 李志军. 新疆胡杨林[M]. 北京: 中国林业出版社. 2020: 12-13.
- [4] 张昊,李俊清,李景文,张玉波,孙立,吴平,等. 额济纳绿洲胡杨种群繁殖物候节律特征的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2007, 28(2): 60-66.
- [5] 周正立,李志军,龚卫江,高山. 胡杨、灰叶胡杨开花生物学特性研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(2): 163-168.



- [6] 陈元宏, 路静. 胡杨温室扦插育苗技术[J]. 辽宁农业科学, 2019(1): 91-92.
- [7] Aryal, R. and Ming, R. (2014) Sex Determination in Flowering Plants: Papaya as a Model System. *Plant Cell*, **217-218**, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.10.018>
- [8] Barrett, S.C.H. and Hough, J. (2013) Sexual Dimorphism in Flowering Plants. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 67-82. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers308>
- [9] 任朝兴, 黄建昌, 肖艳, 李凌. 番木瓜雄性性别的 RAPD 和 SCAR 标记[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 72-75.
- [10] 王晓梅, 宋文芹, 刘松, 陈瑞阳. 与银杏性别相关的 RAPD 标记[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2001, 34(3): 116-117.
- [11] 陈其军, 韩玉珍, 傅永福, 赵德刚, 国凤利, 孟繁静, 等. 大麻性别的 RAPD 和 SCAR 分子标记[J]. 植物生理学报, 2001, 27(2): 173-178.
- [12] 秦瑞云, 杨金华, 贾彦彦, 张准超, 高武军, 卢龙斗, 等. 菠菜性别相关的 RAPD 标记[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1121-1126
- [13] 寿森炎, 汪俏梅. 高等植物性别分化研究进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(6): 528-535
- [14] 尹立辉, 詹亚光, 李彩华, 孙亚峰, 郭聃. 植物雌雄株性别鉴定研究方法的评价[J]. 植物研究, 2003, 23(1): 123-128
- [15] 董莉娜, 苏雪, 孙坤, 张建清, 张辉, 陈纹. DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的应用[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 63-68
- [16] Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., *et al.* (2002) A Male and Hermaphrodite Specific RAPD Marker for Papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 281-285. <https://doi.org/10.1007/s001220100693>
- [17] Alstrom-Rapapor, C., Lascoux, M., Wang, Y.C., *et al.* (1998) Identification of A RAPD Marker Linked to Sex Determination in the Basket Willow. *Journal of Heredity*, **89**, 44-49. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.1.44>
- [18] Wu, Z., Wang, Y., Zhang, G., Luan, G., Chen, S., Meng, J., *et al.* (2018) Molecular Sex Identification in Dioecious *Hippophae rhamnoides* L. via RAPD and SCAR Marker. *Molecules*, **23**, Article No. 1048. <https://doi.org/10.3390/molecules23051048>
- [19] 王晓梅, 宋文芹, 刘松, 李秀兰, 陈瑞阳. 利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分子标记[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2001, 34(1): 5-9.
- [20] 马渐新, 周荣华, 董玉琛, 贾继增. 小麦抗条锈病基因定位及分子标记研究进展[J]. 生物技术通报, 1999(1): 1-6.
- [21] 陈美霞, 张广庆, 祁建民, 张晓琛, 林荔辉, 兰涛, 等. 红麻 SRAP、ISSR 遗传连锁图构建的初步研究[J]. 中国麻业科学, 2008, 30(3): 121-127.
- [22] 刘本英, 王丽鸾, 周健, 唐一春, 成浩, 王平盛, 等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 458-464.
- [23] 包颖, 葛颂. 利用多基因序列探讨稻属药稻复合体二倍体物种的系统发育关系[J]. 植物分类学报, 2003, 41(6): 497-508.
- [24] Bernier, J., Kumar, A., Ramaiah, V., Spaner, D. and Atlin, G. (2007) A Large-Effect QTL for Grain Yield under Reproductive-Stage Drought Stress in Upland Rice. *Crop Science*, **47**, 507-518. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.07.0495>
- [25] Kanagaraj, P., Prince, K.S.J., Sheeba, J.A., Biji, K.R., Babu Paul, S., Alagarwamy, S., *et al.* (2010) Microsatellite Markers Linked to Drought Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.). *Current Science*, **98**, 836-839.
- [26] Venuprasad, R., Dalid, C.O., Valle, M.D., *et al.* (2009) Identification and Characterization of Large-Effect Quantitative Trait Loci for Grain Yield under Lowland Drought Stress in Rice Using Bulk-Segregant Analysis. *Theoretical & Applied Genetics*, **120**, 177-190. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1168-1>
- [27] Vikram, P., Swamy, M.B., Dixit, S., Uddin Ahmed, H., Teresa Sta Cruz, M., Singh, A.K., *et al.* (2011) *qDTY<sub>1.1</sub>*, A Major QTL for Rice Grain Yield under Reproductive-Stage Drought Stress with A Consistent Effect in Multiple Elite Genetic Backgrounds. *BMC Genetics*, **12**, Article No. 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-89>
- [28] Zhang, G.L., Chen, L.Y., Xiao, G.Y., Xiao, Y.-H., Chen, X.-B. And Zhang, S.-T. (2009) Bulk Segregant Analysis to Detect QTL Related to Heat Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using SSR Markers. *Agricultural Sciences in China*, **8**, 482-487. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60235-7](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60235-7)
- [29] Altinkut, A. and Gozukirmizi, N. (2003) Search for Microsatellite Markers Associated with Water-Stress Tolerance in Wheat through Bulk Segregant Analysis. *Molecular Biotechnology*, **23**, 97-106. <https://doi.org/10.1385/MB:23:2:97>
- [30] El-Kadi, D.A., Afiah, S.A., Aly, M.A. and Badran, A.E. (2006) Bulk Segregant Analysis to Develop Molecular

- Markers for Salt Tolerance in Egyptian Cotton. *Arab Journal of Biotechnology*, **9**, 129-142.
- [31] Yang, Z., Huang, D., Tang, W., Zheng, Y., Liang, K., Cutler, A.J., *et al.* (2013) Mapping of Quantitative Trait Loci Underlying Cold Tolerance in Rice Seedlings via High-throughput Sequencing of Pooled Extremes. *PLoS ONE*, **8**, Article ID: e68433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068433>
- [32] Song, J., Li, Z., Liu, Z.X., Guo, Y. and Qiu, L.-J. (2017) Next-Generation Sequencing from Bulk-Segregant Analysis Accelerates the Simultaneous Identification of Two Qualitative Genes in Soybean. *Frontiers in Plant Science*, **8**, Article No. 919. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00919>
- [33] 卢孟柱, 胡建军. 我国转基因杨树的研究及应用现状[J]. 林业科技开发, 2006, 20(6): 1-4.
- [34] Ma, T., Wang, J., Zhou, G., Yue, Z., Hu, Q., Chen, Y., *et al.* (2013) Genomic Insights into Salt Adaptation in A Desert Poplar. *Nature Communications*, **4**, Article No. 2797. <https://doi.org/10.1038/ncomms3797>
- [35] 杨赵平, 刘琴, 李志军. 胡杨雌雄株叶片的比较解剖学研究[J]. 西北植物学报, 2011, 31(1): 79-83.
- [36] 刘一凡, 冯俊鑫, 王斌强, 文嘉禄, 张晓玮. 胡杨雌雄株叶片气孔特征差异比较[J]. 甘肃林业, 2022(1): 39-41.
- [37] Chen, X.X., Gai, Z.S., Zhai, J.T., Wu, Z. H. and Li, Z. J. (2022) Phenotypic Variation of Natural *Populus Pruinosa* Schrenk Populations Shaped by Geographical and Climatic Factors. *Applied Ecology and Environmental Research*, **20**, 1065-1083.
- [38] Lynch, M. and Milligan, B.G. (1994) Analysis of Population Genetic Structure with RAPD Markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>
- [39] Sharma, A., Zinta, G., Rana, S. and Shirko, P. (2010) Molecular Identification of Sex in *Hippophae Rhamnoides* L. Using Isozyme and RAPD Markers. *Forestry Studies*, **12**, 62-66. <https://doi.org/10.1007/s11632-010-0012-7>
- [40] Korekar, G., Sharma, R.K., Kumar, R., Meenu, Bisht, N.C., Srivastava, R.B., *et al.* (2012) Identification and Validation of Sex-Linked SCAR Markers in Dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae). *Biotechnology Letters* **34**, 973-978. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0852-4>
- [41] Jiang, C. and Sink, K.C. (1997) RAPD and SCAR Markers Linked to the Sex Expression Locus M in Asparagus. *Euphytica*, **94**, 329-333. <https://doi.org/10.1023/A:1002958007407>