

## 分子标记技术在杉木研究中的应用\*

王晓丽

马祥庆\*\*

(西南林学院 昆明 650224) (福建农林大学林学院 福州 350002)

**摘要** 综述了分子标记技术在杉木种质资源鉴定、群体遗传多样性研究、遗传连锁图谱构建和数量性状位点(QTL)定位及分子标记辅助选择育种等方面的应用进展,指出目前该方面研究存在的问题,并展望了分子标记技术在杉木研究中的应用前景。

**关键词** 分子标记 杉木 应用

**Application of molecular genetic maker techniques in Chinese fir research.** WANG Xiao-Li(Southwest Forestry College, Kunming 650224, China), MA Xiang-Qing(College of Forestry, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China), *CJEA*, 2005, 13(2): 39~42

**Abstract** The application of molecular marker techniques in Chinese fir is stated, i. e. the identification of genetic resource, genetic diversity research of populations, construction of genetic linkage maps, loci mapping of quantitative trait and marker-assisted selection. The problems in current research are discussed and the application trends of molecular genetic marker techniques in Chinese fir research are put forward.

**Key words** Molecular marker, Chinese fir, Application

(Received Nov. 26, 2003; revised Dec. 31, 2003)

分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记,是 DNA 水平上遗传变异的直接反映。20 世纪 70 年代 Grodzicker 等首创 DNA 限制片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术,开创了应用分子标记作为遗传标记的新阶段,并开始应用于植物遗传育种的研究。随着 PCR (Polymerase chain reaction)技术的发展,又产生各种新型的分子标记。目前应用最普遍的 DNA 分子标记技术主要有 RFLP、RAPD (Random amplified polymorphic DNA)和 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)等,分子标记技术的发展使林木分子遗传学的应用范围更广,并成功应用于林木遗传多样性检测、基因定位、品质鉴定、遗传图谱构建和系统学研究等诸多领域。杉木是我国南方特有的重要用材树种,众多学者已对杉木遗传改良进行了系统研究<sup>[1]</sup>,但从分子水平研究杉木目前尚少见报道。本文综述了近年来分子标记技术在杉木研究中的应用进展及存在的问题,并展望了分子标记技术在杉木研究中的应用前景。

### 1 杉木种质资源鉴定及群体遗传多样性研究

林木个体基因型高度杂合,存在着大量的多态性,传统分类方法很难对其进行准确的分析和鉴定,从而限制了林木种质资源的获得、保护和充分利用。随着分子标记技术的发展,尤其是 RAPD 分子标记技术的产生和发展为林木品种(系)的鉴定提供了简易、快速且有效的手段。杉木具有萌芽性强、易于无性系繁殖的特点,长期以来许多杉木栽培区用杉木无性系苗造林,而杉木无性系苗造林配置中由于存在不同无性系形态相似的特点,造成有时无法从形态上进行无性系个体识别;同时由于各杉木产区之间开展科研合作及种子调拨,相互引入其他省的优良杉木并各自命名,造成杉木优良无性系来源不清且管理混乱,因此进行杉木无性系鉴别更为迫切。黄发新<sup>[2]</sup>等用 RAPD 分子标记技术进行杉木无性系识别研究表明,运用 8 个引物的 17 个分子标记可对 40 个杉木无性系中的 38 个无性系进行识别,说明杉木遗传资源变异幅度较大,这为今后进一步利用分子标记技术进行杉木无性系识别和品系管理奠定了基础,加快了杉木遗传改良的进程。为探讨杂种起源,尤勇<sup>[3]</sup>利用 RAPD 分子标记技术鉴定杉木与侧柏类杂交后代,认定父本侧柏的花粉并未

\* 国家自然科学基金项目(30001132)和福建省自然科学基金项目(B0110023)资助

\*\* 通讯作者

收稿日期:2003-11-26 改回日期:2003-12-31

参与受精过程,其杂种形成是由于杉木花粉的污染所致。由于杉木杂合度高,杂种鉴定对杉木基因资源收集、保存尤为重要。尤勇<sup>[3]</sup>以杉木总 DNA 为模板标记探针,首次构建了杉木基因组文库,且从基因组文库中筛选的单拷贝探针 SP1 和 SP2 可准确区分杉木种源,为杉木种源的鉴定提供了准确的方法。

遗传多样性是表示群体内遗传结构的信息参数之一,为一定基因库内每个基因位上等位基因数目和频率的函数<sup>[16]</sup>,在群体遗传学上又称为基因多样性。分子标记技术的发展,使准确评价林木群体遗传结构和遗传变异成为可能。由于地理生殖隔离、长期自然和人工选择的结果,使不同种源杉木的形态、生理和生态学等特性不同,尤其在杉木生长量、光合特性与抗性方面表现出显著差异<sup>[4~7]</sup>。近年来有关学者开始用分子标记技术研究杉木种源的遗传多样性。尤勇等<sup>[8]</sup>利用 23 个不同随机引物对杉木 7 个种源的 DNA 序列多态性分析研究结果表明,杉木种源间遗传多态性水平较高,在被检测的 114 个 RAPD 位点中多态位点占 79.8%,并根据种源间遗传相似度而构建的聚类图得知,分布于南岭山脉西部周围的 4 个种源相对聚在一起。陈由强等<sup>[9]</sup>从 80 个随机引物中筛选出 20 个引物对 12 个有代表性的杉木地理种源遗传多样性进行分析研究,共扩增出 149 个 DNA 片段,其中具多态性的片段有 115 个,占 77.18%,表明杉木地理种源间具有丰富的 DNA 序列多态性,12 个杉木地理种源间遗传距离变幅为 0.1932~0.4667。以 RAPD 分子标记技术研究分析杉木地理种源间的遗传多态性特征,进一步了解生物基因组水平变异特征与生态地理因素之间的关系,可为林木保护和遗传育种提供重要信息。同时也应注意到运用 RAPD 分子标记技术虽可揭示各杉木地理种源间的遗传多样性,但对确定杉木起源中心的研究尚有局限性,无法确定杉木地理种源的真实来源。故在今后的研究中尚待寻找和利用新出现的分子标记技术,并综合利用各种分子标记技术进一步提高标记的多态性,以便更全面掌握杉木地理种源遗传变异规律及其内在原因,为合理利用、保护杉木基因资源及其遗传改良提供科学依据,并在杉木良种选育、适地适树和提高林分生产力等方面发挥其重要作用。鉴于分子标记技术是解决杉木分类较模糊、有争议问题的有效方法,尤勇<sup>[10]</sup>利用 RAPD 分子标记技术对林木有争议的“种”——德昌杉木进行分类研究,选用 40 个随机引物在杉木和德昌杉木中获得 182 个位点,其中多态位点 98 个,遗传相似系数为 0.644198,略低于杉木 7 个地理种源之间的平均遗传相似系数(0.688),据此认为德昌杉木不能划分为 1 个新种,只能视其为杉木特殊种源之一。这表明分子标记技术可为 DNA 水平验证、林木分类及类群的正确划分提供科学依据,并将对林木分类学的发展产生深远的影响。

## 2 杉木遗传图谱构建与数量性状位点定位研究

遗传图谱构建是当前生物学研究领域的热点之一,遗传图谱是对基因组进行系统研究的基础,可利用它进行数量性状基因位点的研究、生物体主要性状的早期测定以及快速有效地定位和克隆目的基因。遗传连锁图谱是以遗传标记(已知性状的基因或特定 DNA 序列)间重组频率为基础的 1 条染色体或基因组内位点的相对位置线性排列图。构建理想遗传图谱的关键之一是选择合适的遗传标记,在 DNA 标记出现以前主要以同功酶和部分形态标记进行图谱构建。随着分子标记技术的发展,各种分子标记技术在遗传图谱构建中被广泛应用。由于林木自身生物学特性的限制(基因组较大、世代周期长、杂合度高且缺少 2 个世代以上谱系清楚的材料等),使得林木遗传图谱构建存在诸多限制因子,故林木遗传改良中利用分子标记技术构建遗传图谱比其在农作物的研究中应用晚十几年,林木遗传图谱构建的研究虽开展时间较短,但其研究进展非常迅速,目前国内外已构建图谱的树种有云杉、湿地松、火炬松、马尾松、杉木、桉树、杨树和银杏等几十种。何祯祥等<sup>[11,12]</sup>利用具有特殊类型的杉木无性系  $J_0$  和  $F_{11}$  作为亲本杂交形成的  $F_1$  群体为作图群体,以杉木叶为提取基因组 DNA 的材料,从 1040 个随机引物中筛选出 78 个引物,对 78 个  $F_1$  群体及双亲样本进行 DNA 扩增,共获得 129 个 RAPD 标记,首次构建了杉木分子遗传连锁框架图,其中  $J_0$  亲本包含 8 个连锁群,其标记覆盖的基因组总长度约为 595.2cm,  $F_{11}$  亲本包含 4 个连锁群,其标记覆盖的基因组总长度约为 315.3cm,129 个 RAPD 标记中偏分离标记占 14.7%,但该研究中所获得的连锁标记较少,有 94 个标记未被连锁到任一连锁群上,故其仅构建了 1 个遗传连锁框架图,而并未与染色体相对应,离实用阶段尚有一定距离。因此在今后的研究中应增加标记数目,使连锁标记增多,使不连锁标记逐步定位到连锁群上;并需通过 AFLP、RFLP 等其他标记技术继续补充标记,提高标记的多态性和稳定性及其作图效率。此外针叶树胚乳是 1 种天然的优良作图材料,胚乳仅有 1 个染色体组且来源于母体,不受外源花粉的干扰,任何单株树种子胚乳均可用于作图研究,故针叶树研究中可利用单株树种子大配子体进行遗传作图。杉木作为 1 种针叶树种,今后也可尝试利用大配子体作图,以补充原有遗传连锁框架图。

数量性状点定位(Quantitative trait loci, QTL)即采用类似单基因定位方法将数量性状定位在遗传图谱上,确定其数量性状与遗传标记间的距离(以重组率表示)<sup>[13]</sup>。随着分子标记技术的发展,已有多种 DNA 分子标记应用于数量性状点定位,目前主要有 RFLP、AFLP、RAPD、Microsatellite、SSR (Simple sequence repeats)等分子标记技术。大多数林木的许多重要性状表现为连续变异的数量性状,由多基因控制且易受环境影响。近年来在林木数量性状点定位的研究中,利用遗传图谱为工具和日益完善的数量性状点定位分析方法已取得较大进展,但在杉木的研究中应用较晚且相对较少。何祯祥等<sup>[14]</sup>在构建杉木遗传连锁框架图基础上运用 RAPD 分子标记技术,采用 ANOVA 方法对杉木树高、胸径和材积等生长性状相关联的分子标记进行检测,单标记分析检测出与树高生长相关联的分子标记有 3 个,与胸径相关联的有 5 个,与材积相关联的有 2 个,其累积贡献率分别为 15.8%、24.36% 和 10.63%;双标记分析共检测出 286 对标记组合,其中与杉木生长性状紧密关联的树高有 96 对,胸径 94 对,材积 96 对,与杉木生长性状相关的标记互作效应十分显著,研究表明杉木树高、胸径和材积等生长性状可能受多个基因控制,但未发现主效基因。对作物以及作为林木模式树种杨树的数量性状点定位虽可把控制 1 个复杂性状的多个数量性状点分解开来并确定每个数量性状点的贡献大小以及多个数量性状点(QTLs)间的相互关系,但就杉木而言其数量性状点定位的研究则刚刚起步,何祯祥等的研究是对与杉木生长性状相关联的分子标记初步探索,进一步开展数量性状点精细定位研究还有赖于高密度遗传连锁图谱的构建以及更有效的统计方法提出。同时有关杉木抗病虫、营养等其他性状研究尚有待于深入到分子水平,利用数量性状点定位弄清控制数量性状的基因及其行为,并在一些重要基因附近找到紧密连锁的标记,直接用分子标记辅助进行育种策略制定和目标性状早期选择,对杉木遗传改良具有重要意义。

### 3 杉木分子标记辅助选择育种

分子标记辅助选择(Marker-assisted selection)育种是利用与目标性状紧密连锁的分子标记对目标性状进行跟踪选择的 1 项育种技术,是基因组研究在常规育种和杂交育种中的直接应用。分子标记辅助选择育种使选择直接基于 DNA 水平上,并提高其可靠性,克服了林木世代长的局限性,加速了林木育种进程。分子标记辅助选择育种的应用使杉木遗传改良的研究有望获得集多种优良性状于一体的优良品系。李梅等<sup>[15]</sup>利用 RAPD 分子标记技术研究了杉木第 2 代育种群体内 30 个杂交亲本和第 3 代育种群体内 182 个个体遗传变异,并结合第 2 代育种群体内 30 个杂交亲本部分双列杂交子代的生长表现,研究亲本间遗传变异与子代生长的相关关系结果表明,杉木第 2 代育种群体内 30 个杂交亲本间遗传变异较大,多态位点比例达 66.9%,在遗传距离 0.4800 处可将 30 个亲本分成 6 组;杉木第 3 代育种群体内 182 个个体间多态位点比例达 78.78%,在遗传距离为 0.5270 处将 182 个个体归为 5 个亚群体,亲本间遗传距离与子代生长相关显著,表明按遗传距离分组的组间亲本之间分子遗传变异对亲本选配有一定参考作用。这不仅阐明了利用分子标记进行杉木杂交亲本选配的可行性,且对杉木育种群体经营和育种策略的制定有重要作用。随着更加有效的分子标记技术产生、发展和完善,分子标记辅助选择育种的研究将逐步拓展,必将极大地提高杉木育种目的性和精确性及其遗传改良效率,分子标记辅助选择育种在杉木遗传改良的研究中具有广阔应用前景。

### 4 存在的问题与前景展望

综上所述,分子标记技术在杉木种质资源鉴定、群体遗传多样性分析、遗传图谱构建、数量性状位点定位及分子标记辅助育种等研究中已取得较大进展,但相对于分子标记技术在农作物中的研究而言,分子标记技术在杉木研究中的应用尚为起步阶段。目前该方面研究存在的主要问题一是该研究中尚需等待材料,尤其是遗传图谱构建和重要数量性状定位研究所需材料缺乏,其原因一方面是长期以来育种学家和林业工作者在传统思维模式指导下产生的现有材料很多时候无法满足遗传图谱构建和 QTLs 研究的需要,另一方面由于林木世代周期长,短期内无法获得如农作物的高世代群体,这在一定程度上限制了其研究进程。为此林业工作者应有意识地从长远角度考虑尽快培育一些可用于该方面研究的群体材料;同时有赖于新型分子标记技术的产生和发展,使该方面研究尽可能地利用现有材料。二是该研究中所用分子标记技术较单一,多采用 RAPD 分子标记技术,而 RAPD 分子标记技术虽以其简易、快速、经济且有效特点而获得广泛应用,但其本身又有一定局限性,首先是重现性和稳定性较差,陈由强等<sup>[9]</sup>认为获得稳定实验结果,该研究要尽可能地保持条件恒定,使用相同的 PCR 仪和引物等。但笔者认为这在实际操作中很难实现,若某种实验方法不能在不同实验室进行广泛交流和重现,那么它则难以成为完全成熟的技术方法,故 RAPD 分子标

记技术的准确性和可靠性尚有待于进一步提高。其次 RAPD 为显性标记,无法区分杂合型与纯合型,因此单用 RAPD 1 种方法进行标记研究,在很多遗传分析方面会受到限制,且所获得的遗传信息也不全面。因此必须与其他分子标记技术相配合,综合利用各种分子标记技术乃是今后该研究的发展趋势。三是该研究目前尚处于理论阶段,离实用阶段仍有一定距离。由于缺乏对林木经典遗传学和细胞学等方面的研究,已构建的杉木遗传连锁图谱并未与染色体相对应,因此离遗传连锁图谱应用尚有一定距离。故今后杉木研究中首先应加强遗传基础学科的研究,使杉木遗传图谱的研究尽快从理论阶段进入实用阶段,为后续的目的基因克隆、探针制备和转基因研究奠定基础。其次随着杉木研究的深入和分子标记技术的发展,今后应加强综合利用各种分子标记技术继续补充遗传图谱,使之达到较高饱和度,同时应利用遗传图谱上的分子标记进行数量性状基因定位,为进一步开展数量性状位点精细定位和数量性状位点克隆分离打下基础;再次应开展杉木属类群系统进化方面的研究,分析类群间亲缘关系以指导育种,并对育种过程中近交衰退进行有效监测,积极开展分子标记辅助选择育种,使杉木遗传改良研究产生新的飞跃。

### 参 考 文 献

- 1 俞新妥主编. 杉木栽培学. 福州:福建科学技术出版社,1997
- 2 黄发新,张新叶,何村 嘉一郎. 运用 RAPD 技术进行杉木无性系识别研究. 湖北林业科技,2000(增刊):14~19
- 3 尤 勇,洪菊生. 杉木 rDNA ITS-1 区的克隆及序列测定. 林业科学,2000,36(1):46~51
- 4 梁一池,洪菊生. 杉木种源生长稳定性研究. 林业科学研究,1994,7(专刊):44~51
- 5 陈建新,洪菊生. 杉木种源抗旱性研究. 林业科学研究,1994,7(专刊):52~57
- 6 李晓储,洪菊生. 杉木种源抗寒性研究. 林业科学研究,1994,7(专刊):58~69
- 7 李晓储. 杉木种源抗炭疽病的初步研究. 林业科学研究,1994,7(专刊):70~77
- 8 尤 勇,洪菊生. RAPD 标记在杉木种源遗传变异上的应用. 林业科学,1998,34(4):32~37
- 9 陈由强,叶冰莹等. 杉木地理种源遗传变异的 RAPD 分析. 应用与环境生物学报,2001,7(2):130~133
- 10 尤 勇. 应用 RAPD 标记对杉木属两个种遗传多态性的研究. 聊城师院学报(自然科学版),1998,11(4):72~74
- 11 何祯祥,施季森等. 林木遗传图谱构建的技术与策略. 浙江林学院学报,1998,15(2):151~157
- 12 何祯祥,施季森等. 杉木杂种群体分子框架遗传连锁图初报. 南京林业大学学报,2000,24(6):22~26
- 13 盛志廉,陈瑶生编著. 数量遗传学. 北京:科学出版社,1999. 340~347
- 14 何祯祥,施季森等. 杉木生长性状相关联遗传标记的检测. 浙江林学院学报,2000,17(4):350~354
- 15 李 梅,施季森等. 杉木杂交亲本分子遗传变异与子代生长相关的研究. 林业科学研究,2001,14(1):35~40
- 16 Rieger R., Michaelis A., Gree M. M. Glossary of genetics. Fifth edition. Springer-Verlag, German, 1991. 209

### 敬告广大作者与读者

自 2005 年第 1 期始《中国生态农业学报》主办单位由原中国科学院石家庄农业现代化研究所更名为中国科学院遗传与发育生物学研究所,其他办刊内容事项均不变。通讯地址仍为(050021)河北省石家庄市槐中路 286 号《中国生态农业学报》编辑部,电话:(0311)5818007。欢迎广大作者与读者继续踊跃投稿和征订。

《中国生态农业学报》编辑部