

林木遗传图谱构建的技术与策略

何祯祥 施季森

(南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

邱进清 肖石海

(福建省林业厅林木种苗总站)

摘要 对林木遗传图谱构建中的有关概念、实验技术与策略及计算机分析软件等进行了系统阐述。全面总结了当前国内外林木遗传图谱构建研究的现状,指出了目前林木遗传图谱的应用价值及图谱构建中存在的主要问题,并对下一步的发展进行了一些探讨。

关键词 林木; 遗传学图; 基因组; 分子标记; 遗传标记; 树木育种; 技术; 策略
中图分类号 S722.3

在本世纪 100 a 间,科学的发展可以分为 2 个明显的阶段:前 50 a 物理学迅速发展,以爱因斯坦相对论为主要标志,使现代物理学达到一个光辉的顶点;而后 50 a 则转移到生物学,以 1953 年 DNA 双螺旋结构的发现为主要标志,生物学的发展从此进入分子水平。分子生物学作为时代的诞生儿得到飞速发展,对人类的生存和发展起了极其重大的作用。尤其是 80 年代分子标记技术的形成和发展,在以美国 1986 年启动的被人们视为与“曼哈顿计划”和“阿波罗计划”相媲美的人类基因组研究计划(HGI)的带动下,全球范围内掀起了生物基因组研究的热潮。生物基因组的研究对于人类彻底认识生命现象和本质、利用和改造生物有着不可估量的作用^[1,2]。

林木与农作物相比,其研究在深度与广度上均相差悬殊。但近几年来,分子生物学不断涌现的新技术受到林木育种界专家和学者的重视。有关行政部门和机构注重资金投入,林木遗传图谱构建及其利用的研究很快成为当今林木分子遗传学领域研究的热点,成为林学学科发展的前沿^[3-7]。本文拟对林木遗传图谱构建中有关概念、技术与策略、发展现状、应用前景和存在问题与发展对策进行总结和探讨。

1 林木遗传图谱构建有关基本概念

1.1 基因组(genome): 一个特定有机体染色体上所有的遗传物质

收稿日期: 1997-11-12

第 1 作者简介: 何祯祥,男,1964 年生,讲师,在职博士生

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 标记 (marker): 能够通过表型、细胞学或分子技术容易检测的任何遗传元件 (位点、等位基因、DNA序列或染色体特征), 在遗传分析时用来追踪染色体或染色体片段。

1.3 遗传标记 (genetic marker): 在生物学实验上作为探针来追踪一个个体、组织、细胞、细胞核、染色体或基因的等位基因、DNA标记或细胞遗传学上的标记。

1.4 DNA标记 (DNA marker): 能够用来进行杂交、PCR或限制性作图中可识别的任何特定的DNA序列。

1.5 分子标记 (molecular marker): 通常指以DNA多态性为基础的遗传标记, 如RFLPs, RAPDs, AFLPs等。

1.6 基因组图谱 (genome map): 标明染色体上基因或其他DNA标记的有序排列图。

1.7 遗传连锁图 (genetic linkage map): 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一条染色体或基因组内位点的相对位置线性排列图。

1.8 物理图谱 (physical map): 能够展示可识别标记 (基因或短的DNA序列) 定位的DNA图谱。低分辨率的物理图谱能够揭示不同染色体上的带型; 高分辨率的图谱可揭示染色体完整的核苷酸序列。

2 林木遗传图谱构建中的实验技术

目前, 以DNA多态性为基础的分子标记实验技术发展很快, 用于构建遗传图谱的分子标记有很多种。在林木遗传图谱构建中广泛采用的主要有: RFLP (restriction fragment length polymorphism 限制性片段长度多态性)、RAPD (randomly amplified polymorphic DNA 随机扩增多态性DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism 扩增片段长度多态性)、SSR (simple sequence repeat 简单序列重复) 等技术。已发表的很多文章和书籍对这几种实验技术均进行了较好的综述及专题论述^[1, 6, 8-11]。这里对上述几种实验技术的优劣及效率作一比较 (表1)。

表1 DNA标记 (RFLP, RAPD, SSR, AFLP) 的比较

Table 1 Comparison of DNA markers (RFLP, RAPD, SSR, AFLP)

标记	每次反应多态性的数量	图谱分辨率 (个基因组的标记数量)	标记类型
RFLP	1~2	1 000	共显性
RAPD	4~6	10 000	显性
SSR	3~10	10 000	共显性
AFLP	10~50	> 100 000	显性

RFLP是开发最早、应用较多、比较有效的共显性分子标记, 具备其他分子标记共同的优点, 但过程繁琐, 花费时间长, 费用高, 而且需要依不同物种来制备不

同的探针以及使用放射性同位素。

RAPD是Williams等人在1990年发展起来的新型遗传标记, 是目前各种分子标记中应用最广泛的分子标记之一。试验操作流程简单, 方便快捷, 引物通用性强, 对模板DNA需要量极少且质量要求不高。它为显性标记, 不能提供完整的遗传信息, 重复性差。但后者通过反复筛选、控制条件可以获得较高的重复性。

SSR, 又称微卫星 (microsatellite) DNA, 为共显性标记, 需测序、制备探针等。

AFLP是一种新颖和强大的DNA指纹技术, 是基于对基因组酶切后的限制性片段进行选择性的扩增, 结合了RFLP和RAPD的优点, 具有快速、重复性高的特点, 可以为目的性状

的标记辅助选择产生高密度遗传图谱。目前这项技术正在得到广泛应用,但它需要使用同位素标记和放射自显影等,相对于 RAPD来说比较费时。典型的 AFLP与 RAPD一样为显性标记。据最新报道,这项技术可以大大减少人力,进行自动化操作。

显而易见,各种分子标记技术均具有其优缺点,从人力、物力、财力以及时间上相比来看,RAPD标记有着它特有的优势,其快速是其他任何标记都无法比拟的,因此在世界各地林木基因作图和定位中广泛被采用^[12-14]。

3 林木遗传图谱构建的策略

3.1 林木作为遗传图谱构建材料的优缺点

林木与农作物及其他动植物相比,世代周期长,异花授粉,基因组较大,遗传背景材料知之甚少,给遗传图谱构建带来一定的难度和不便,要像农作物那样在短时间内建立高世代育种群体非常困难。但大多数林木都可以进行无性繁殖,因此对保存作图群体非常有利,而且一旦作图群体建立后便可以永久性保存,可以进行性状的反复测定。对林木来说很多重要的经济性状皆为数量性状,这样比较易于进行 QTL(数量性状位点)定位的研究;另外可以使实验不受样品数量的限制和影响。在针叶树中,由于大配子体为单倍体,在这种情形下,显性标记与共显性标记具有相同的遗传行为,因此可以利用单株树的种子进行遗传作图以及进一步进行 QTL定位。

3.2 作图群体

选择和建立一个比较理想的分离群体是构建遗传图谱的前提条件和关键因子。林木世代周期长,开花迟,不可能像农作物那样在较短的时间内就能得到高世代作图群体。限制当前林木遗传图谱构建研究的重要因素之一就是缺乏合适的作图群体。林木遗传育种学家通过多种途径克服这一困难,尽可能利用各种可能的作图群体进行林木遗传图谱构建的研究。目前用于林木遗传作图的群体主要有单倍体作图群体(针叶树)、F₂群体和回交一代(BC₁)群体、回交二代群体(BC₂)、全同胞交配群体、F作图群体、半同胞作图群体。

确定作图群体的原则是根据研究的目的,结合所研究树种本身的生物学特性来选择和建立合适的群体。

3.3 作图群体大小

作图群体的大小影响到作图精度和图谱应用范围。关于作图群体的大小,目前尚无定论,主要与群体类型、亲本的杂合度及标记的分离等因素有关。从目前已构建的林木遗传图谱来看,常用的分离群体一般不超过 100个单株,但增大作图群体是遗传作图的发展趋势。从研究目的、工作量及效率上考虑,框架连锁图的构建可基于大群体中的一个随机小群体,如 100个;当我们对某些性状感兴趣,需要精细作图时,可通过 BSA法,有针对性地扩大作图群体,如 500个以上。

3.4 遗传标记的选择

确定合适的遗传标记是构建理想的遗传图谱的另一个关键。在 DNA标记出现以前,林木上仅有少量以针叶树树脂乳为材料,以同工酶和部分形态标记构建的遗传连锁图,如火炬松、加勒比松、北美红松、日本黑松、日本柳杉、马尾松等。随着各种分子标记的大量开发,实验技术的

改进和发展,在林木遗传图谱构建中广泛应用的一些新的分子标记技术,主要有 RFLP, RAPD, AFLP, SSR, STS等,从作图效率上看用得最多的还是 RAPD标记。

3.5 作图分子位点的遗传分析

每个作图群体在各个位点上都有一个特定的分离比。了解分离比对决定该群体在某个位点上是否为偏分离十分重要。表 2为不同类型群体在每个位点上共显性和显性标记的期望分离比。

表 2 不同类型群体共显性位点和显性位点的期望分离比

Table 2 The segregation ratio of codominant and dominant locus among different populations

群体类型	共显性位点	显性位点
F ₂ 群体	1: 2: 1	3: 1
回交群体	1: 1	1: 1
F ₂ 群体	1: 1(纯合)	1: 1(纯合)
	1: 2: 1(杂合)	3: 1(杂合)
单倍体群体	1: 1	1: 1

说明:在回交群体中要得到一个显性标记,必须用 F₁与隐性亲本杂交,因此,要得到 RAPD位点必须建立 2个群体,用 F₁分别与 2个亲本杂交,从这点考虑,回交群体不适合用于进行 RAPD位点作图

个体的 DNA 每个混合的 DNA 样本应包括一个除这个特定基因区域外,所有基因组位点的随机样本,因此,如果这 2个混合 DNA 样品在 RFLP或 RAPD上表现上有差异,则表明和该位点相连锁,该方法推出后很快被广泛接受和采用。

3.7 构建林木遗传图谱的作图软件

当我们对分离群体用合适的遗传标记分析,获得各位点分离的数据后,便可进行作图,用计算机编辑软件整理好数据,计算标记间连锁关系。自从 70年代第 1个“一般连锁分析软件”出现以后,与连锁分析有关的软件的数量迅猛增长。据因特网(Internet)上的网点—<http://linkage.rockefeller.edu/soft/list.html>(美国 Rockefeller大学统计遗传实验室)所提供的信息有 100多种,而且新的功能更强大的软件不断涌现。

目前在林木遗传图谱构建中使用的软件有 5种。

3.7.1 MAPMAKER/EXP(3.0版) 由 Lander, Green, Abrahamson 等开发。处理的群体类型包括 BC, F₂, RILs等全同胞等。该软件可以因特网上免费下载(<ftp://ftp-genome.wi.mit.edu/distributions/software/mapmaker> 3或 <http://www-genome.wi.mit.edu/genome-software>),并且有一个在线辅导教程—<http://linkage.rockefeller.edu/soft/mapmaker/>

3.7.2 G-Mendel

3.7.3 JoinMap(2.0版) Stam 和 Van Ooijen 开发。适合 BC₁, F₂, RILs(双)单倍体全同胞等群体,每个连锁组它能处理 500个标记。详细资料参见网点 <http://www.bib.wau.nl/cpro/mapping>

3.7.4 CRI-MAP 由 Green 开发,主要用于构建多位点连锁图谱

3.7.5 MapQTL(3.0版) 功能特别强大,由 Van Ooijen 等开发,可以用 3种不同的方法——

区间, MQM和非参数法进行 QTL作图。处理的群体类型包括 BC1, F2, RILs, (双)单倍体、全同胞等。详细资料参见网站 <http://www.bib.wau.nl/cpro/mapping>

4 林木遗传图谱研究现状

林木遗传图谱构建的研究开展时间虽短,但研究进展非常迅速。国外已经构建的图谱中针叶树有白云杉、湿地松、挪威云杉、日本柳杉、糖松、土耳其松、南欧海松、紫杉、欧洲赤松、火炬松、辐射松、花旗松、海岸松、长叶松等;阔叶树种有桉树、杨树和美洲栗等;经济树种有油橄榄、油棕、橡胶、可可树、乌饭树、核桃等;果树有苹果、桃、李等。表 3列出的图谱是已进入美国国家农业图书馆数据库的。

国内目前已经构建的林木遗传图谱有马尾松^[11]、杨树^[11]、银杏^[10];正在构建的有杉木、火炬松等树种。

表 3 国外已构建的林木遗传图谱*

Table 3 The genetic maps of tree species constructed in foreign contries

树 种	单倍体染色体数	图谱名称	连锁群个数	位点总数
日本柳杉 <i>Cryptomeria japonica</i>	11	FPRSCJ	14	132
湿地松 <i>Pinus elliottii</i>	12	GPT8-7	13	55
长叶松 <i>Pinus palustris</i>	12	GPT356	16	122
火炬松 <i>Pinus taeda</i>	12	IFGBAS	20	
土耳其松 <i>Pinus brutia</i>	19	IFGPBR	38	107
火炬松 <i>Pinus taeda</i>	12	IFGQTL-F	17	
火炬松 <i>Pinus taeda</i>	12	IFGQTL-M	23	
火炬松 <i>Pinus taeda</i>	12	NCS756	19	232
糖松 <i>Pinus lambertiana</i>	12	IFGSPR	1	10
短叶红豆杉 <i>Taxus brevifolia</i>		IFGTBR	17	102
挪威云杉 <i>Picea abies</i>	12	MIGMAP	17	145
巨桉 <i>Eucalyptus grandis</i>		NCSEUG	14	240
尾叶桉 <i>Eucalyptus urophylla</i>		NCSEUU	11	251
海岸松 <i>Pinus pinaster</i>	12	NCSMP	3	22
海岸松 <i>Pinus pinaster</i>	12	NCSMPI	12	
北美乔松 <i>Pinus strobus</i>		RHIP18	17	69
白云杉 <i>Picea glauca</i>	12	UBCTUL	12	47
美洲山杨 <i>Populus tremuloides</i>	19	UMNASP	14	57
美洲黑杨 /毛果杨 <i>Populus deltoides trichocarpa</i>	19	UW APOP	19	343

* 本表中信息取自因特网上美国国家农业图书馆数据库 <http://probe.nalusda.gov:8300/cgi-bin/browse/treegen>

5 林木遗传图谱应用价值

林木遗传图谱,对人们从分子水平认识了解树木特性和生长发育规律,更好地利用森林为人类造福,具有重大意义。林木许多重要的经济性状皆为数量性状,利用遗传图谱可以进行数量性状位点(QTLs)定位,确定控制数量性状的基因数目、在染色体上的位置以及各位点贡献的大小和基因间相互关系。已定位的 QTLs包括生长、木材密度、抗干旱胁迫、抗病等,涉及的树种有火炬松、湿地松、辐射松、糖松、杨树、桉树等造林树种,还有苹果、柑橘、桃等果树。

早期选择一直是育种学家关心和感到棘手的问题之一,长期以来林木早期选择的精确和可靠程度一直没有很好解决.利用遗传图谱使选择直接基于 DNA 水平,大大提高了选择的可靠性,从而加速了育种进程,提高了选择效果.

通过构建高密度遗传图谱还可有效地快速定位和克隆目的基因,为有效地进行遗传资源的收集和保存提供科学依据.

6 存在的问题与对策

如上所述,林木遗传图谱起步晚而发展较快,但与农作物等相比还有相当大的差距.

6.1 由于在过去缺乏对林木经典遗传学和细胞遗传学等方面的研究,目前大多数已构建的遗传连锁图谱仅仅是一个框架图,大都没有和染色体相对应,因此构建的图谱离应用还有一段距离.因此在今后的一段时间内,在开展分子标记研究的同时必须加强一些基础研究^[3].

6.2 林木世代周期长,在短时间内不可能像农作物那样建立高世代作图群体.目前林木中真正较理想的作图群体比较少,有的甚至对亲本的一些基本信息了解不够,在作图中会带来很多麻烦.因此摆在我们面前的选择有 2 个:其一去寻找在过去长期遗传育种中已建立的适合用来作图的群体;其二是选择理想的亲本着手建立作图群体.

6.3 在当前林木图谱构建中使用的一些标记产生的 DNA 多态性频率仍然较低,有一些如 RAPD 存在稳定性问题,因此还有待于我们利用和寻找新出现的分子标记,以及综合利用各种标记进一步提高标记的多态性和稳定性,提高作图效率,降低作图成本.

6.4 林木生长在各种复杂的环境中,与农作物不同.从过去相当长的时间内,对林木数量和群体遗传学的研究表明,林木基因型与环境交互效应明显,有些达到极显著.而目前在图谱构建中从群体选择、实验技术、分析方法和计算机程序基本上都是利用农作物、动物和人类基因组的研究.林木有它本身的生物学特性,与其他植物、动物和人类都有着明显的不同,因此亟待发展适合林木自身特点的理论和分析方法.

6.5 未来的林木育种将是现代分子生物学理论和技术与已经建立起来的传统育种技术和体系有机结合,相互补充,因此在实践中必须将分子标记技术与常规育种相结合,在战略上应该考虑到充分利用已经构建好的连锁图谱,把人力、物力和财力集中在一些影响较大,又可能通过分子标记技术解决的重大问题上.

可以预见,不久的将来通过育种学家们的努力,人们对森林的认识、改造和利用会迈上一个新台阶.

参 考 文 献

- 1 谭晓风,胡芳名.分子标记及其在林木遗传育种研究中的作用.经济林研究,1997,15(2): 19~ 32
- 2 苏晓华,张绮纹.林木遗传图谱研究的现状与展望.林业科技通讯,1995,(5): 10~ 12
- 3 尹佟明,黄敏仁.林木遗传图谱构建和数量性状基因定位.世界林业研究,1995,8(3): 6~ 12
- 4 尹佟明,黄敏仁,朱立煌.利用显性分子标记和 F 群体进行林木遗传连锁图谱的构建.生物工程进展,1996,16(4): 12~ 16
- 5 李汝刚.分子标记在苹果品种鉴定中的应用.生物技术通报,1997,(1): 17~ 20
- 6 陆朝福,朱立煌.植物育种中的分子标记辅助选择.生物工程进展,1995,15(4): 11~ 16
- 7 戴思兰. DNA 遗传标记在林业生产中的应用.生物工程进展,1996,16(3): 44~ 48

- 8 林鸿宣,郑康乐. RFLP遗传标记与数量性状基因定位. *生物工程进展*, 1993, **13**(4): 37~ 40
- 9 徐吉臣,朱立煌. 遗传图谱中的分子标记. *生物工程进展*, 1992, **12**(5): 1~ 3, 39
- 10 谭晓风. 银杏 RAPD分子遗传图谱的构建及主要栽培品种和雌雄株的分子鉴别: [博士学位论文]. 株洲: 中南林学院, 1997
- 11 尹佟明. 杨树和马尾松遗传图谱构建研究: [博士学位论文]. 南京: 南京林业大学, 1997
- 12 尹佟明,黄敏仁,王明庥. 利用 RAPD标记和单株树大配子体构建马尾松的分子标记连锁图谱. *植物学报*, 1997, **39**(7): 607~ 612
- 13 Carlson J E. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Tag*, 1991, **83**: 194~ 200
- 14 Tingey S V, Del Tufo J P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol*, 1993, **101**: 349~ 352

He Zhenxiang (Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, PRC), Shi Jisen, Qiu Jinqing, and Xiao Shihai. **Technique and strategy of genome mapping in forest trees.** *Journal of Zhejiang Forestry College*, 1998, **15**(2): 151~ 157

Abstract The concepts, experimental techniques, strategies and computer software were expounded on genome mapping of forest trees. The research improvements on genome mapping in forest trees were summarized. The application value of genome map and main problems in the constructing of genome map were pointed out. Some suggestions on the genome mapping were also put forward.

Key words forest trees; genetic map; genome; molecular marker; tree marker; tree breeding; technique; strategies