

运用ISSR分子标记鉴定杉木 × 侧柏远交杂种

齐明

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 为了对杉木 *Cunninghamia lanceolata* 与侧柏 *Platycladus orientalis* 远交杂种的真实性进行鉴定, 进行预备试验, 从 100 条 UBC primer Set#9(800 ~900) 引物中, 筛选出 9 条多态性引物。对杉木 ×侧柏远交组合 A4(1419) ×B1 所得杂交后代中选择的 4 株超级苗等材料, 提取 DNA, 进行聚合酶链式反应(PCR) 扩增, 并按母本、远交子代和父本顺序, 对 PCR 产物进行电泳实验。结果发现, 4 株超级苗在 7 条引物中, 共找到 16 条父系特征谱带, 在另外 2 条引物中检测到父母的共同谱带。由此可以肯定, 杂交所得超级苗是杉木与侧柏远缘杂交产生的杂种。杉木与侧柏远缘杂交是可配的, 杉木远缘杂交育种是一条多性状改良途径。图 3 表 1 参 17

关键词: 林木育种学; 杉木; 侧柏; 远交杂种; ISSR 分子标记; 分子鉴定

中图分类号: S722 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)05-0666-04

Hybrid identification of *Cunninghamia lanceolata* × *Platycladus orientalis* based on ISSR markers

Qi Ming

(Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: To identify truthfulness of distant hybrids for *Cunninghamia lanceolata* (Chinese fir) × *Platycladus orientalis*, a series of exploratory experiments were conducted with 9 intersimple sequence repeat (ISSR) primers having polymorphism screened out from 100 University of British Columbia (UBC) primer Set # 9 (800 - 900). For A4 (1419) × B1 distant cross combinations of *C. lanceolata* × *P. orientalis*, four outstanding seedlings were selected. Analysis of the parents and the four outstanding seedlings was done with DNA extraction; polymerase chain reaction (PCR) amplification using 9 polymorphism primers; polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) based on the following order of maternal: A4, seedlings (No. 2, 3, 11, 12), paternal, and ethylene dibromide (EB) staining; and DNA band observations with an ultraviolet lamp. Then, these were recorded with an FR-200A Bio-electrophoresis Image Analysis System. Experimental results of the four outstanding seedlings (No. 2, 3, 11, 12) showed that for the combination of A4 × B1: (1) there were 16 paternal special bands in 7 of the 9 polymorphic primers and (2) there were no paternal special bands with the other 2 primers, but some common bands of their parents were detected within the four seedlings. Thus, (1) all selected outstanding seedlings were distant hybrids; (2) distant hybridization between *C. lanceolata* × *P. orientalis* was compatible; and (3) wide cross breeding of Chinese fir could be used for multiple-trait genetic improvement of forest trees. [Ch, 3 fig. 1 tab. 17 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Cunninghamia lanceolata* (Chinese fir); *Platycladus orientalis*; distant hybrids; intersimple sequence repeat (ISSR) molecular marker; hybrid identification

叶培忠等^[1,2]进行过一系列的杉木 *Cunninghamia lanceolata* 远缘杂交试验, 虽没有获得优良品

收稿日期: 2007-09-17; 修回日期: 2007-12-09

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y306064)

作者简介: 齐明, 副研究员, 从事林木多性状遗传改良等研究。E-mail: youqingyi1962@163.com

种, 但他们经连续 4 a 的试验, 证明杉木与侧柏 *Platycladus orientalis* 间的杂交是可配的。这一结论在目前杉木的多性状改良中具有重要价值。侧柏为耐干旱瘠薄树种, 且材质优良, 利用杉木 × 侧柏进行远缘杂交, 可以克服常规杂交育种的局限性, 向杉木转移耐贫瘠基因和材质优良的基因, 为杉木三优品种(生长快, 材质优, 抗性强的)选育创制新材料。目前, 我们已获得了几百株杉木 × 侧柏控制杂交子代的苗木, 但是与杉木 × 柳杉 *Cryptomeria fortunei* 杂种一样, 杂交后代苗木在形态上偏母, 这让人怀疑杂种的真实性。因此, 本研究采用内部简单序列重复 (ISSR) 标记对远交杂种进行分子鉴定, 以夯实杉木远缘杂交的育种基础。ISSR (inter-simple sequence repeats) 是近期发展起来的一种基于聚合酶链式反应 (PCR) 技术的分子标记, 可以客观地揭示参试材料间的真实差异, 已在植物种质鉴别、物种起源与演化、物种间的亲缘关系和遗传多样性等分析方面得到了广泛的应用^[3-12]。相对于随机扩增多态性 DNA (RAPD, rapid amplification polymorphism DNA) 而言, ISSR 多态性高, 遗传稳定性好, 受实验环境条件的影响相对较小; 相对于扩增片段长度多态性 (AFLP, amplified fragment length polymorphism) 而言, ISSR 不需要预知基因组序列信息, 实验操作相对简单, 成本也略低。

1 材料与方法

1.1 研究材料

杉木母本选自浙江遂昌 1.5 代种子园, 有 A1 (龙 15), A2 (1366), A3 (1339) 和 A4 (1419) 等。

侧柏父本是在优良种源中选择的优良单株, 有 H1, H2 和 B1 等优株。在一系列的杉木与侧柏远交组合中, 我们挑选了 6 个组合, 每组合挑选杂种超级苗 1 ~ 4 株不等, 共 12 个优株。由于各远交组合的分子鉴定结果大致相同, 因此, 为了节约篇幅, 本文着重报道组合 A4 (1419) × B1 的研究结果。在该组合杂种中挑选出 4 株超级苗, 编号为 2, 3, 11 和 12。

1.2 研究方法

DNA 的提取: 取新鲜叶样, 采用 SDS (十二烷基磺酸钠) 法提取 DNA^[13]。引物筛选: 本研究所用的 9 条 ISSR 引物, 是从 UBC primerSet#9 (800 ~ 900) 100 条引物中, 按通常方法筛选而来^[14-16]。它们是 812: (GA)₈G; 827: (AC)₈G; 834: (AG)₈YT; 842: (GA)₈YG; 848: (CA)₈RG; 850: (GT)₈YC; 855: (AC)₈YT; 856: (AC)₈YA; 857: (AC)₈YG。其中: Y = (C, T), R = (A, G)。优化后的 ISSR 分析的反应体系和组成如下: 总反应体积为 20 μL, 其中有 10 × buffer (pH 8.4) 2.0 μL, C260-1 Taq 20 nkat, 样品 DNA 模板 70 ng。在总反应体积中, 以下各成分的最终浓度分别为: 50 μmol·L⁻¹ 氯化钾; 2.0 mmol·L⁻¹ 氯化镁; 200 μmol·L⁻¹ dNTP; 0.4 μmol·L⁻¹ 引物。PCR 扩增程序, 采用 touchdown 程序^[17], 不同引物设置不同的退火温度。PCR 扩增产物用 1.5 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶分离, 150 V 稳压电泳 2.0 ~ 2.5 h, 电泳结束后, 采用常规的溴化乙锭 (EB) 染色, 染色时间为 10 ~ 20 min。最后利用 FR-200 紫外与可见光分析成像系统拍照, 记录分析结果。远缘杂种鉴定方法: 根据母本 (A4)、子代 (2, 3, 11, 12)、父本 (B1) 的电泳检测结果, 在 PCR 扩增的 DNA 图谱中寻找父系特征谱带。

2 结果与分析

图 1 ~ 3 是 A4 (1419) × B1 组合和杂种超级苗 (2, 3, 11 和 12) 在 3 条不同的引物 (857, 834 和 842) 进行扩增的结果。图 1 中, 引物为 857, 4 个杂种都能扩增出 1 454 和 1 137 bp 父本特征谱带, 另外在约 550 bp 处, 子代 2 和 11 有父系谱带, 但谱带较弱, 故不计。图 2 中, 引物为 834, 杂种 2 和 3 能扩增到 1 657 bp 父系特征谱带; 2, 3 和 11 号杂种能扩增到 1 016 bp 父系特征谱带; 除 12 杂种外, 其他杂种都能扩增到 634 bp 父本特征谱带。图 3 中, 引物为 842, 杂种 3, 11 和 12 均扩增出 1 537 bp 父本特征谱带; 3 和 11 号杂种可扩增到 1 397 bp 父系特征谱带; 3 号杂种可扩增出 1 085 bp 父系特征谱带; 2 和 11 号杂种可扩增出 895 bp 父系特征谱带; 4 个杂种都可扩增出 787 bp 父系特征谱带; 2, 11 和 12 的远交子代可扩增出 500 bp 父系特征谱带; 2 号杂种可扩增出 411 bp 父系特征谱带。

进一步分析发现: 分子谱带在上下代间表现出复杂的亲子遗传现象。在大多数的引物上, 在父系不同的特征位点间, 特征谱带在远交杂种的表达遗传结果不一致, 由此可以推断, 这些特征位点间

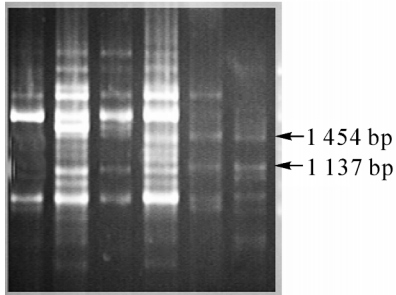


图1 引物 857 在 A4 ×B1 组合的双亲及杂种后代上的扩增结果

Figure 1 PCR-products of primer 857 in the combination A4 ×B1

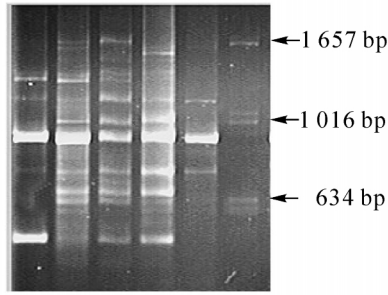


图2 引物 834 在 A4 ×B1 组合的双亲及杂种后代上的扩增结果

Figure 2 PCR-products of primer 834 in the combination A4 ×B1

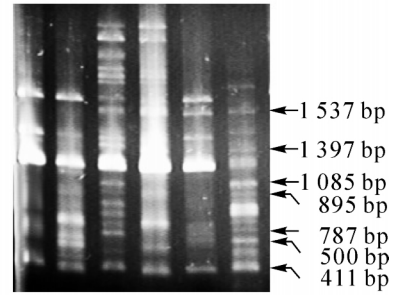


图3 引物 842 在 A4 ×B1 组合的双亲及杂种后代上的扩增结果

Figure 3 PCR-products of primer 842 in the combination A4 ×B1

可能不存在紧密连锁关系。而在有些父系特征位点(如:引物 857 的 2 个特征位点)上子代的表达结果一致,故它们有可能是连锁的。父系特征谱带指在父本中存在,母本中不存在,并在杂种子代中可以观察到它的表达的谱带。本研究中,利用 9 条引物, A4 ×B1 杂交组合所得 4 个后代中检测到父系特征谱带的结果列于表 1。由表 1 可见,使用 9 条引物,经 PCR 扩增,其中 7 条引物共检测到 16 条父系特征谱带,另外 2 条引物未能检测出父系特征谱带,这 2 条引物的 PCR 扩增结果是:子代拥有双亲的共同谱带,同时拥有母本的特征谱带,而无父系特征谱带。

由于 A4 ×B1 组合中 4 个优株利用 9 条引物检测到多条父系特征谱带,因此可以肯定,这些远交子代是杉木和侧柏的杂交后代。其他研究材料扩增结果与 A4 ×B1 杂交组合基本相同,但综合整个研究结果发现,远交子代从父本继承来的谱带要比从母本继承来的谱带数少,同时拥有的父本特征谱带富于变化,这一现象为杉木远交杂种产生的遗传机理提出了研究课题。

3 讨论

杂种的分子识别,理想的分子标记是使用共显性标记。笔者使用日本扁柏 *Chamaecyparis obtusa* 中开发出来的简单序列重复(SSR, simple sequence repeat)引物(侧柏与日本扁柏同科),进行杂种分子鉴定时,结果发现:杉木、侧柏、杂种和日本扁柏 PCR 扩增结果表现出惊人的单态性,这一结果无法对远交杂种加以识别。

与 RAPD 分子标记一样,ISSR 也是显性标记,但 ISSR 可以正确地将远交杂种鉴别出来^[10,11]。在本研究中发现,在有些 ISSR 引物上,父系特征带在所有的超级苗中都有显现,而在另外的一些 ISSR 引物中,其父系特征带在一些超级苗中显现,而在另外的超级苗中不表达。这并不是说这些子代不是远交后代,而是印证了 ISSR 是显性标记的理论,即当父系特征谱带为 AA 时,aa(母本) × AA(父本)杂交,其后代均为 Aa;当父系特征谱带为 Aa 时,aa(母本) × Aa(父本),会发生分离,后代比例为 Aa : aa = 1 : 1。因此使用 1 条 ISSR 引物(或 1 条父系特征谱带)进行远交杂种的鉴定,不是十分严谨可靠。因此使用显性分子标记鉴定远交杂种时,应该采用多条引物多个父系特征谱带进行杂种识别。

表 1 PCR 扩增后远交子代中检测到的父系特征谱带

Table 1 Paternal special bands in all ISSR primers of A4 ×B1

引物	父系特征谱带/条
UBC827	1
UBC834	3
UBC842	7
UBC848	1
UBC855	1
UBC856	1
UBC857	2
UBC812	0
UBC850	0

通过 ISSR 分析, 在远交后代中检测到多条父系的特征谱带, 这在 DNA 水平上证实了杂交后代中确实已渗入了父系的 DNA, 有力支持了杉木与侧柏可以成功进行远缘杂交的观点, 并获得了它们的远缘杂交后代。这为杉木育种提供了一种简便廉价的转入外源基因的方法, 今后可以通过与侧柏的远缘杂交来改变杉木的材性, 增强抗贫瘠干旱特性。

参考文献:

- [1] 南京林产工业学院. 树木遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 136 - 362.
- [2] 叶培忠. 杉木与柳杉属间杂交试验报告[J]. 林业科学, 1963, 8 (3): 214 - 221.
- [3] 伍晓明, 许鲲, 王汉中, 等. 甘蓝型油菜与新疆野生油菜属间杂种的获得与分子鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24 (4): 5 - 9.
- [4] 钱前, 陈洪, 孙宗修, 等. 真、假杂交水稻 优 63 的 RAPD 鉴定[J]. 中国水稻科学, 1996, 10 (4): 241 - 242.
- [5] 郑雪芳, 张木清, 李奇伟, 等. 甘蔗斑茅的杂交利用及其杂种后代鉴定系列研究(二): 甘蔗斑茅远缘杂交真实杂种的分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2004, 2 (1): 35 - 42.
- [6] 程志芳, 钱春桃, 陈学军. 辣椒属种间杂交及杂种鉴定的研究[J]. 园艺学报, 2007, 34 (4): 883 - 888.
- [7] 李周岐, 王章荣. 用 RAPD 标记进行鹅掌楸杂种识别和亲本选配[J]. 林业科学, 2002, 38 (5): 169 - 174.
- [8] SOTO A, LORENZO Z, GIL L. Nuclear Microsatellite Markers for the Identification of *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L. hybrids[J]. *Silvae Genet*, 2003, 52 (2): 63 - 66.
- [9] CONGIU L, DUPANLOUP I, PATARNELLO T, et al. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon[J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 2 355 - 2 359.
- [10] 索志立, 周世良, 张会金, 等. 杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 林业科学研究, 2004, 17 (6): 700 - 705.
- [11] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24 (5): 613 - 616.
- [12] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 研究[J]. 生物多样性, 2003, 11 (4): 276 - 287.
- [13] 尤勇, 洪菊生. 杉木 DNA 的简便提取方法[J]. 林业科学研究, 1998, 11 (1): 111 - 113.
- [14] 姚明哲, 王新超, 陈亮, 等. 茶树 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 茶叶科学, 2004, 24 (3): 172 - 176.
- [15] 宣继萍, 章镇. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理通讯, 2002, 38 (6): 549 - 550.
- [16] 朱柏芳, 朱笃, 邓荣根, 等. 穗花杉 ISSR 引物反应条件的优化与筛选[J]. 植物研究, 2006, 26 (3): 318 - 322.
- [17] CRESTE S, TOLMANNNETO A, FIGUEIRA A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2001, 19: 299 - 306.