

○ 尹伟伦
胡建军
著



YANGSHU YICHUAN TUPU GOUJIAN

杨树遗传图谱构建 与数量性状基因定位

YU SHULIANG XINGZHUANG JIYIN DINGWEI

北京林业大学优秀博
士论文基金资助丛书

中国环境科学出版社

北京林业大学优秀博士学位论文基金资助丛书

杨树遗传图谱构建与数量 性状基因定位

尹伟伦 胡建军 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

杨树遗传图谱构建与数量性状基因定位/尹伟伦, 胡建军著.
—北京: 中国环境科学出版社, 2005. 7
(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)
ISBN 7-80209-129-2

I. 杨… II. ①尹… ②胡… III. 树木学: 遗传学
IV. S718. 46

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 055443 号

出版发行	中国环境科学出版社
	(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址:	http://www.cesp.cn
电子信箱:	bjzhouyu@126.com
电话 (传真):	010—67112738
印 刷	北京中科印刷有限公司
经 销	各地新华书店
版 次	2005 年 9 月第一版 2005 年 9 月第一次印刷
印 数	1—3000
开 本	850×1168 1/32
印 张	5
字 数	128 千字
定 价	20.00 元

【版权所有, 请勿翻印、转载, 违者必究】
如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

编辑委员会

主 任 朱金兆

副主任 尹伟伦 马履一

委 员 (按姓氏笔画)

王礼先 王向荣 任恒祺 张启翔 李凤兰 孟宪宇

罗菊春 赵广杰 顾正平 续九如 翟明普 贾黎明

秘 书 何艺玲

序 言

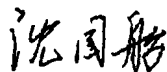
科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北大建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目中的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着—所高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看作是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还依此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才倍受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自

己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长，野外条件难于严格控制，工作条件难苦等等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士



2002年8月10日

前 言

近年来,分子标记技术发展迅速,采用分子标记技术构建的遗传图谱得到了广泛的应用。杨树(*Populus* spp.)许多性状如生长、抗病虫性以及次生代谢物的产生等,一般被认为是受微效多基因控制,多运用数量遗传学的方法来研究。通过分子遗传图谱和数量性状基因定位(quantitative trait loci, QTLs)方法研究性状与基因的关系,获得与某性状连锁的分子标记和 QTLs,对深入理解杨树抗病虫性、次生代谢产物以及生长等性状的分子机理和相互关系具有重要意义。

杨树是我国重要的造林绿化、工业用材树种之一,我国杨树人工林种植面积达 667 万公顷。但杨树病虫害十分严重,其中天牛虫害和溃疡病是制约杨树人工林发展的不利因素。如光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)和黄斑星天牛(*A. nobilis* Ganglbauer)已给我国“三北”防护林造成了毁灭性的打击。因此,防治天牛和培育抗虫速生杨树新品种刻不容缓。杨树溃疡病病原菌(*Dothiorella gregaria* Sacc.)侵入树体后能否使树木感病取决于树木的抗病性强弱,不同杨树对杨树溃疡病的抗性不同。目前,对于造成这种抗性差异的机制还不完全清楚。因此,通过分子遗传图谱的建立,进行抗病虫数量性状位点基因定位,对于杨树抗病虫基因克隆、抗性遗传基础研究和分子标记辅助选择等具有重要的理论和实践意义。

美洲黑杨(*Populus deltoides* Marsh.)为杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus* L.)黑杨派(Aigeiros)树种,原产北美洲,在我国没有天然分布(徐伟英, 1998),20 世纪 70 年代初开始从国

外引种栽培, 80 年代达到了引种高潮。现在, 美洲黑杨及其杂交种在我国各地大面积种植, 成为我国林业生产重要的造林、育种资源。其中 I-69 杨 (*P. deltoides* Bartr.Cl. 'Lux' (I-69/55)) 和 I-63 杨 (*P. deltoides* Bartr.Cl. 'Harvard' (I-63/51)) 是我国最早成功引种栽培的两个优良美洲黑杨无性系。适合在我国南方各地生长, 属南方型美洲黑杨。20 世纪 80 年代初, 中国林业科学研究院林业研究所这两个无性系为材料进行种内控制授粉杂交, 经过 10 多年培育, 选育出适合我国黄河流域以南地区和长江流域生长的抗云斑天牛 (*Batocera horsfieldi* (Hope)) 美洲黑杨无性系——南抗杨系列 (南抗 1-3 号 *P. deltoides* Cl. 'Nankang'); 90 年代初, 通过与北方型美洲黑杨杂交获得 F_2 代, 从中培育出适合我国华北、西北等地生长的抗光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*) 美洲黑杨无性系——北抗杨 (*P. deltoides* Cl. 'Beikang1') 和创新杨 (*P. deltoides* Cl. 'Chuangxin1')。90 年代末, 通过人工接种试验和自然感虫, 研究了另两个美洲黑杨无性系 50 号杨 (*P. deltoides* Cl. '55/65') 与 36 号杨 (*P. deltoides* Cl. '2KEN8') 杂交群体 F_1 代对桑天牛 (*Apriona germari* Hope) 的抗性遗传规律。

化学防御是植物抗虫的一种重要机制, 在杨树与天牛的相互关系中也不例外。杨柳科植物体内存在一类含量丰富的次生代谢物——酚甙 (phenolic glycosides) 化学物质, 被认为在植物抵御害虫危害方面发挥介导作用。这些物质已被分离鉴定, 国外通过几十年的研究, 发现该类物质对鳞翅目和鞘翅目昆虫的生长发育具有负面作用。1999 年, 我们从法国引进酚甙类物质测定技术和标准样品, 开始从美洲黑杨树皮中提取、分离酚甙, 并测定酚甙类物质种类和含量, 通过生物测定和抗性鉴定, 研究酚甙与天牛的关系, 为将来以生化为基础抗虫育种奠定基础。

我们以美洲黑杨回交群体 (BC_1) 为试验材料, 运用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)

分子标记技术和拟测交策略 (two-way pseudo-testcross), 构建了林木第一张整合遗传连锁分子图谱, 该图由 19 个主要连锁群 (相当于杨树单倍体染色体数) 和 24 个次要连锁群组成, 19 个主要连锁群覆盖 2 927 cM 的距离, 平均两个标记间的距离为 23.3 cM。通过对该群体的叶面积、生长量、酚甙类物质、抗虫性等表型性状的测定, 开展了数量性状基因定位研究。

对美洲黑杨回交群体组培苗形态、生根等性状多态型进行了研究, 首次报道美洲黑杨种子生根的性状为质量性状, 推测受一对完全显性等位基因控制。同时开展杨树对天牛抗性、酚甙类次生代谢产物和生长的相互关系的研究。由于杨树树皮酚甙种类和含量的不同造成了杨树对两种天牛 (光肩星天牛和桑天牛) 的抗性差异, 并且酚甙含量在机械损伤或天牛危害条件下具有诱导效应。

利用美洲黑杨回交群体 AFLP 整合遗传连锁图谱, 对叶片、生长、酚甙次生代谢产物和抗虫性共 18 个性状进行了 QTL 分析。通过单因素方差分析, 检测到共有 103 个标记与这 18 个性状相连锁, 贡献率为 5.22%~29.53%, 其中 69 个标记定位于连锁群上。通过区间作图检测到控制这些性状共 61 个 QTLs, 可解释表型变量的 6.2%~27.2%, 其中当 LOD 值大于 2 时, 对于叶片长度、叶长宽比、第一年地径、组成型水杨甙、组成型柳皮甙、诱导型柳皮甙、总酚甙、对桑天牛抗虫率、桑天牛虫口密度和光肩星天牛虫口密度共 11 个性状各检测到 1 个 QTL。

首次对美洲黑杨的抗虫 (桑天牛) 性状进行了基因定位, 并比较了对两种天牛抗性的遗传差异和抗虫生化基础。运用区间作图检测到几类酚甙和两次桑天牛虫口密度的一个 QTL 均定位于第 14 连锁群相同的区间 (标记 AAC/AGT-179 和 CAA/ACC-204 之间), 可解释表型变量的 8.5%~16.6%。对于两种天牛的抗虫指标都在第 10 连锁群检测到一个 QTL。

利用我国乡土树种毛新杨 (*Populus tomentosa* × *P. alba* var.

pyramidalis) × 毛白杨 (*P. tomentosa*) 的杂交群体构建了毛新杨 × 毛白杨的遗传图谱。在双亲整合的图谱中, 239 个标记形成 22 个含 4 个以上标记的连锁群, 总图距 4 418 cM, 标记间的平均图距是 18.5 cM。通过对毛新杨 × 毛白杨杂交后代人工接种溃疡病, 进行了抗溃疡病 QTL 定位初步研究。通过单因素方差分析, 共检测到与抗溃疡病性状相关联的标记 6 个。为将来杨树抗溃疡病基因的克隆及辅助选择育种奠定了基础。

目 录

1 林木遗传图谱构建及数量性状基因定位技术与应用	1
1.1 引言	1
1.2 分子标记技术与遗传图谱构建理论基础	2
1.2.1 分子标记技术	2
1.2.2 遗传图谱构建理论基础	6
1.3 林木遗传图谱构建技术研究进展	6
1.3.1 针叶树分子遗传图谱构建研究进展	8
1.3.2 阔叶树分子遗传图谱构建研究进展	10
1.4 数量性状基因定位技术在林木遗传育种中的应用	11
2 杨树抗虫育种与抗虫生化基础	17
2.1 杨树抗天牛育种研究进展	17
2.1.1 引言	17
2.1.2 杨树对天牛抗性研究	17
2.1.3 杨树抗天牛育种策略	20
2.2 杨树抗虫机理研究	23
2.2.1 形态结构	23
2.2.2 营养物质	24
2.3 杨树抗虫生化基础	26
2.3.1 引言	26
2.3.2 酚貳类物质种类、结构与性质	27
2.3.3 酚貳类物质多态性	27

2.3.4 酚酞类物质对昆虫的作用	31
2.3.5 酚酞类物质测定提取方法	32
2.3.6 酚酞类物质研究前景	33
3 美洲黑杨回交群体后代多态型及性状相关研究	34
3.1 引言	34
3.2 植物材料	34
3.3 试验方法	35
3.3.1 美洲黑杨回交群体组培苗形态及生根性状 多态型调查	35
3.3.2 美洲黑杨回交群体叶片性状测定	35
3.3.3 美洲黑杨回交群体生根能力差异试验	35
3.3.4 美洲黑杨回交群体酚酞类物质测定	36
3.3.5 美洲黑杨回交群体抗虫生物测定	37
3.4 结果与分析	38
3.4.1 美洲黑杨回交群体组培苗形态及生根性状 多态型	38
3.4.2 美洲黑杨回交群体生根能力差异	39
3.4.3 叶片数量性状统计分析及叶面积与生长的关系 ...	42
3.4.4 美洲黑杨回交群体酚酞类物质研究	44
3.5 结论	48
3.6 讨论	49
4 美洲黑杨回交群体 AFLP 遗传图谱的构建	51
4.1 引言	51
4.2 作图群体	52
4.3 实验方法	52
4.3.1 AFLP 实验	52
4.3.2 AFLP 标记统计	53

4.3.3 图谱构建方法	53
4.4 结果与分析	53
4.5 图谱构建	56
5 美洲黑杨回交群体数量性状基因定位研究	58
5.1 引言	58
5.2 数量性状基因定位方法	58
5.2.1 单向分组方差分析法	58
5.2.2 区间作图法定位	59
5.3 结果与分析	60
5.3.1 定位性状的正态分布检验	60
5.3.2 单因素方差分析	62
5.3.3 区间作图基因定位	80
5.3.4 数量性状基因定位方法的比较	93
5.4 结论	94
5.5 讨论	96
6 毛白杨杂交群体遗传图谱构建及抗溃疡病基因定位	98
6.1 引言	98
6.2 材料和方法	99
6.2.1 材料	99
6.2.2 方法	99
6.3 结果与分析	108
6.3.1 AFLP 标记的多态性	108
6.3.2 AFLP 分子遗传图谱构建	113
6.4 毛白杨抗溃疡病基因定位	119
6.5 结论	121
参考文献	122

1 林木遗传图谱构建及数量性状基因定位技术与应用

1.1 引言

遗传图谱 (genetic map) 又称连锁图谱 (linkage map) 或遗传连锁图谱 (genetic linkage map), 是指基因组内基因以及专一的多态性 DNA 标记相对位置的图谱, 其研究经历了经典遗传图谱到现代的 DNA 标记连锁图谱的过程。长久以来, 各种生物的遗传图谱几乎都是根据诸如形态、生理和生化等常规标记来构建, 经典遗传图谱主要是研究多样性的相互关系、基因所构成的连锁群以及连锁群中各多样性基因的线性关系。过去几十年, 经典遗传图谱研究发展极为缓慢, 所建成的遗传图谱仅限于少数种类的生物, 而且图谱的分辨率大都很低, 表现为标记少、图距大、饱和度低, 不能准确定位某个基因的具体位置, 更不能克隆这一基因, 因而应用价值有限。

20 世纪 80 年代初, 随着 DNA 重组技术的问世, 利用 DNA 分子水平上的变异作为遗传标记进行遗传作图取得了重大进展。1980 年, Bostein 首先提出利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 标记构建遗传图谱的设想, 1987 年, Donis-Keller 等发表了第一张人类的 RFLP 连锁图谱。植物的分子连锁图谱构建工作的发展速度超过了动物的同类研究, 这主要是因为植物可很方便地建立和维持较大的分离群体。目前, 已经

构建图谱的植物达几十种，几乎包括了所有重要的农作物。相对农作物，大多数林木是长期异交的树种，遗传负荷（genetic load）较高，很难象农作物那样利用纯系、近交系或高世代群体进行遗传作图。有关林木遗传作图起步相对较晚，但发展迅速。迄今为止，已有近 20 个树种构建了遗传图谱，如苹果树、杨树、桉树、松树、云杉等。林木遗传图谱的建立，可以对林木抗逆、抗病虫和其他性状进行数量性状基因定位研究，为分子标记辅助选择奠定基础，为数量性状的遗传改良和抗性基因的克隆提供理论依据。

1.2 分子标记技术与遗传图谱构建理论基础

1.2.1 分子标记技术

广义地讲，分子标记（molecular marker）包括以生物基因组 DNA 多态性为基础的 DNA 标记和以蛋白质（或酶）多态性为基础的生化标记。一般的分子标记为狭义概念，即是指 DNA 标记，现在已被广泛采纳。分子标记与形态学标记相比具有许多优越性：（1）分子标记数量大，可为育种提供足够的选择标记；（2）不受环境因素影响，可提高选择的准确性；（3）可以在植物生长的任何时期、任何器官进行检测，使对基因型的早期选择成为可能；（4）分子标记呈共显性或显性遗传，有利于对隐性基因的选择。

理想的分子标记必须达到以下几个要求：（1）具有高的多态性；（2）共显性遗传，即利用分子标记可鉴别二倍体中杂合和纯合基因型；（3）能明确辨别等位基因；（4）遍布整个基因组；（5）除特殊位点的标记外，要求分子标记均匀分布于整个基因组；（6）选择中性（即无基因多效性）；（7）检测手段简单、快速（如实验程序易自动化）；（8）开发成本和使用成本尽量低廉；

(9) 在实验室内和实验室间重复性好 (便于数据交换)。

尽管目前已开发出的分子标记种类很多, 但迄今发现的任何一种分子标记均不能同时满足以上所有要求。现在分子标记主要有限制性酶切片段长度多态性 (RFLP)、随机引物扩增多态性 (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、DNA 重复序列多态性、原位杂交 (ISH) 及同工酶等, 这些技术各具特点, 都可以对育种后代材料的基因型进行直接选择。

1.2.1.1 限制性片段长度多态性

限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, 缩写 RFLP) 是发展最早的分子标记技术, RFLP 技术的原理是检测 DNA 被限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小。因此凡是可以引起酶切位点变异的突变如点突变 (新产生和去除酶切位点) 和一段 DNA 的重新组织 (如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化) 等均可导致 RFLP 的产生。此技术及其从中发展出来的一些变型均包括以下基本步骤: DNA 的提取、用限制性内切酶酶切 DNA、用凝胶电泳分开 DNA 片段、把 DNA 片段转移到滤膜上、利用放射性标记的探针显示特定的 DNA 片段 (通过 Southern 杂交)、分析结果。

1.2.1.2 随机扩增多态性 DNA

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 缩写 RAPD), 是由美国杜邦公司 Williams 等人 (1990) 和加利福尼亚生物研究所 Welsh 等 (1990) 领导的两个小组同时发展起来的一种新的 DNA 指纹技术。该技术用一个 (有时用两个) 随机引物 (一般 8~10 个碱基) 非定点地扩增 DNA 片段, 然后用凝胶电泳分开扩增片段。其特点包括: (1) 不需 DNA 探针, 设计引物也不需要知道序列信息; (2) 用一个引物就可扩增出许多片段 (一般一个引物可扩增 6~12 条片段, 但对某些材料可能

不能产生扩增产物), 总的来说 RAPD 在检测多态性时是一种相当快速的方法; (3) 技术简单, RAPD 分析不涉及 Southern 杂交、放射自显影或其他技术; (4) 与 RFLP 分析相比, RAPD 分析只需少量 DNA 样品; (5) 成本较低, 因为随机引物可在公司买到, 其价格不高; (6) RAPD 标记一般是显性遗传 (极少数是共显性遗传的), 这样对扩增产物的记录就可记为“有/无”, 但这也意味着不能鉴别杂合子和纯合子; (7) RAPD 分析中存在的最大问题是重复性不太高, 因为在 PCR 反应中条件的变化会引起一些扩增产物的改变; 但是, 如果把条件标准化, 还是可以获得重复结果的 (Lowe *et al.*, 1996); (8) 由于存在共迁移问题, 在不同个体中出现相同分子量的带后, 并不能保证这些个体拥有同一条 (同源) 的片段; 同时, 在胶上看见的一条带也有可能包含了不同的扩增产物, 因为所用的凝胶电泳类型 (一般是琼脂糖凝胶电泳) 只能分开不同大小的片段, 而不能分开有不同碱基序列但有相同大小的片段。

DAF (DNA amplification fingerprinting) 是一种与 RAPD 技术相近的分子标记, 所不同的是, 在 DAF 分析中, 引物浓度更高, 长度更短 (一般 5~8 个碱基), 只有两个温度循环 (在 RAPD 中是三个温度循环), 并且往往用聚丙烯酰胺凝胶电泳, DAF 通常会产生非常复杂的带型。在 DAF 技术的基础上, 又发展出了 ASAP 技术 (arbitrary signatures from amplification profiles) (使用了不同引物)、AP-PCR (arbitrarily primed polymerase chain reaction)。在 AP-PCR 分析中, 扩增分为三个部分, 每个部分要求的条件和组分的浓度存在差异; 在第一个 PCR 循环中, 引物浓度较高; 引物长度不定, 并且常常来自为其他目的而设计的引物 (如 M13 通用测序引物)。

1.2.1.3 扩增片段长度多态性

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism,