

杜仲遗传作图群体的建立

李 煜, 王大玮, 李周岐*, 魏永成

(西北农林科技大学 林学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:通过对 7 个杜仲 F_1 家系生长和叶片性状及总黄酮含量变异分析, 结合亲本 AFLP 多态性检测, 选出综合变异程度较高的杂交组合小叶 \times 秦仲 1 号作为构建杜仲遗传连锁图谱的作图群体, 为杜仲遗传连锁图谱构建和重要性状的分子标记研究奠定基础。

关键词:杜仲; 变异; AFLP; 作图群体

中图分类号: S722.34

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2012)02-0062-04

Establishment of Mapping Population in *Eucommia ulmoides*

LI Yu, WANG Da-wei, LI Zhou-qi*, WEI Yong-cheng

(College of Forestry, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Based on the variation analysis of the growth and leaf traits and the contents of total flavonoids among seven F_1 families of *Eucommia ulmoides*, and combining the detection of the levels of polymorphisms between parents using AFLP, cross combination of Xiaoye \times Qinzhong No. 1 was selected as the mapping population, whose variation was higher than others. It is the basic step in mapmaking and identifying the molecular markers linked to some important traits.

Key words: *Eucommia ulmoides*; variation; AFLP; mapping population

杜仲(*Eucommia ulmoides*)是一种以药用为主并具有多种用途的植物, 具有极高的开发利用价值^[1]。和许多其他栽培植物一样, 选育优良品种是杜仲资源开发中一项十分重要的基础性工作。传统的杜仲育种主要采取无性系选育的方法, 已取得丰硕的成绩^[2-4]。但是, 林木个体大、生长周期长、生长环境较难控制, 长期以来是林木遗传改良研究中最主要的限制因素, 因此, 寻找有效的早期选择方法、提高选择效率、缩短育种周期, 一直是林木育种者所关注的问题。由于杜仲的遗传基础研究比较薄弱, 对其许多性状(诸如叶片大小、树皮厚度、含胶量、药用有效成分含量、树木生长量和性别决定等)的早期选择和高效遗传改良等问题仍无法从根本上得到解决, 从而制约着杜仲良种选育工作的进程。

遗传连锁图谱构建是现代遗传学研究中一个非

常重要的领域, 可为数量性状基因定位、基因克隆、分子标记辅助选择以及基因组结构和功能等研究奠定基础^[5-7]。这不仅使在幼年期对成年期性状进行选择成为可能, 同时也可以有预见性地、更加科学合理地选配杂交亲本, 从而大大缩短选育时间、提高选择精度并降低选育成本^[8]。同所有遗传连锁图谱构建研究一样, 建立具有一定规模在表型和 DNA 水平上均发生较大分离的永久性作图群体是成功和高效率作图的基础。目前, 用于林木遗传作图的群体有 F_1 、 F_2 、回交群体和单倍体群体等^[9]。综合看来, F_1 群体对林木而言是一个比较理想的作图群体, 这种群体可以利用现成的杂合度较高的个体与相应的较远亲缘关系的个体通过一代杂交得到, 对许多树种都有现成的材料或可以在短期内建成^[10]。因此, 本研究通过对杜仲 F_1 家系生长和叶片性状和标志性

收稿日期: 2011-01-24 修回日期: 2011-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771751)。

作者简介: 李煜, 男, 在读博士, 研究方向: 林木遗传育种。

* 通讯作者: 李周岐, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事林木遗传育种教学与研究。E-mail: lzhouqi@yahoo.com.cn

功效成分总黄酮含量分化程度测定,结合亲本 AFLP 多态性检测,初步确定适宜的作图分离群体,从而为杜仲遗传连锁图谱构建和重要性状的分子标记研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2007 年春,选择性状差异较大的 12 个杜仲优良品种(无性系)各 1 株^[3,11-12]作为杂交亲本,按析因交配设计组成 35 个杂交组合进行人工杂交,得到 7 个较大的 F₁ 全同胞家系(因部分杂交组合未得到杂种苗或数量有限,所以未在表 1 中列出)。其中优良品种秦仲 1 号、秦仲 2 号生长于西北农林科技大学林学院苗圃(由张康健教授提供);优良无性系闫雌、小叶、南阳 1 号、洛超 3 号和龙拐生长于河南灵宝(由灵宝市天地科技有限责任公司提供)。

表 1 杜仲 F₁ 家系编号

Table 1 Number of F₁

母本 /父本	秦仲 1 号	秦仲 2 号	南阳 1 号	洛超 3 号	龙拐
闫雌	—	1	—	2	—
小叶	3	4	5	6	7

1.2 方法

1.2.1 试验地概况及田间试验设计 试验地位于西北农林科技大学林学院苗圃,该地海拔 530.1~403.2 m,年平均气温 12.9℃,日照 2 196 h,年平均降水量 660 mm,属于大陆性暖温带季风半湿润气候区。雨量适中,四季分明,土层深厚,质地均一,中壤或重壤,地下水 17 m 左右,为杜仲生长的适宜区。

将获得的杂交种子于 2008 年 3 月在营养杯内播种,6 月移栽。田间试验采用完全随机区组设计,10 株小区,3 次重复,株行距 20 cm×20 cm。

1.2.2 生长量与叶片性状的测定 2008 年 10 月,调查苗高、地径、叶片数;取苗木顶端起第 6~11 之间的叶片 3 片,测定叶长、叶宽、叶面积、叶柄长和叶

脉数,叶面积用美国 CID, Inc. 公司的 CI-202 叶面积仪测量。

1.2.3 总黄酮含量测定 2008 年 10 月,按家系分单株采取叶片(取苗木顶端起第 6 片叶),在 105℃ 烘 90 min 杀青,剪碎、研磨后备用。采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法^[13]测定标志性功效成分总黄酮含量。

1.2.4 亲本 AFLP 多态性检测 于 3 月份采集供试品种(无性系)枝条,室内水培,收集嫩叶,放入超低温冰箱中冷冻保存备用。模板 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法^[14]。杜仲 AFLP 反应体系参照 P. Vos 等^[15]的方法,仅对体系进行了优化^[16]。采用 *EcoR* I/*Mse* I 酶切组合进行基因组限制性酶切,酶切反应 37℃ 6 h,连接反应 16℃ 6 h,预扩增反应选用引物组合 *EcoR* I+00/*Mse* I+00,选择性扩增反应采用引物组合 *EcoR* I+3/*Mse* I+3,选择性扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳 120 min,采用 B. J. Bassam^[17] 等方法进行银染检测。

1.2.5 数据处理及作图群体的确定 利用 SPSS 13.0 软件对各家系的表型数据进行统计分析,并计算变异系数。在 AFLP 分析电泳图谱上选择清晰可见且可重复的条带,以 1 和 0 记录多态片段的有和无,生成由 1 和 0 组成的原始矩阵;应用 NT-SYSPc2.10e 软件计算遗传相似系数,并按照 UPG-MA 法进行聚类分析,绘制树状聚类图。最后,选取 F₁ 个体间在表型性状上及其亲本在 DNA 水平上均差异较大的分离群体作为构建杜仲遗传连锁图谱的作图群体。

2 结果与分析

2.1 F₁ 家系生长和叶片性状的变异

由表 2 可以看出,家系 2、家系 6、家系 3 的平均变异系数较高,分别为 26.21%、24.02%、22.87%;家系 1、家系 7、家系 4 的平均变异系数较低,分别为 22.04%、20.11%、20.03%;家系 5 的变异系数(18.28%)最小。在平均变异系数较高的 3 个家系中,家系 2 虽然叶片数、叶长、叶柄长和叶脉数的变

表 2 不同家系生长和叶片性状的变异系数

Table 2 Variation coefficient of the growth and leaf traits in families

性状/家系	1	2	3	4	5	6	7
苗高	23.22	37.60	25.27	25.80	18.71	37.62	24.86
地径	45.18	24.73	23.56	18.12	15.96	26.74	19.73
叶片数	29.93	50.44	34.38	43.76	31.16	30.37	17.24
叶长	12.59	21.48	19.02	16.62	13.28	21.29	20.98
叶宽	16.82	22.05	20.29	15.49	14.31	23.22	18.07
叶长/叶宽	12.68	10.37	12.05	12.75	9.23	13.97	12.42
叶面积	23.57	27.09	34.38	0.67	32.62	26.03	35.08
叶柄长	19.73	25.18	22.85	17.77	17.16	22.17	19.95
叶脉数	14.59	16.98	14.07	9.29	12.12	14.72	12.70
平均值	22.04	26.21	22.87	20.03	18.28	24.02	20.11

异系数都在 7 个家系中最大,但叶长/叶宽的变异系数则排在第 6 位。家系 6 除了叶面积的变异系数排在第 5 位外,其他指标的变异系数均较大,其中苗高、叶宽和叶长/叶宽在 7 个家系中最大。家系 3 除了叶长/叶宽的变异系数较小外,其他性状的变异系数均较大,大部分性状的变异系数高于 20%。

2.2 F₁ 家系总黄酮含量的变异

通过分别对各家系杜仲叶总黄酮含量的变异分析(表 3),各家系内总黄酮含量的变异程度普遍比较高。其中变异程度最高的为家系 6,变异系数 31.89%;变异程度最小的为家系 1,变异系数 5.17%。生长和叶片性状变异系数较高的家系 2 总黄酮含量变异系数较小,为 15.48%;家系 3 总黄酮含量变异系数较高,为 19.63%。

2.3 亲本 AFLP 多态性分析

利用 10 对 AFLP 引物组合对 7 个亲本进行多态性检测,应用 NTSYSpc2.10e 软件计算遗传相似系数。结果表明,7 个杂交亲本两两间的遗传相似系数分布在 0.222 973 0~0.810 810 8 之间(表 4),其中家系 3 的亲本小叶与秦仲 1 号的遗传相似系数最小,为 0.222 973 0,表明两亲本间具有较高的多态性。闫雌与龙拐的遗传相似系数最大,为 0.810 810 8,表明两亲本间的多态性较小。另外,家系 2

的亲本闫雌和洛超 3 号的遗传相似系数为 0.581 081 1,家系 6 的亲本小叶和洛超 3 号的遗传相似系数为 0.486 486 5,二者均小于家系 3 的亲本小叶与秦仲 1 号的遗传相似系数。

表 3 各家系总黄酮含量统计描述

Table 3 Statistical description of the contents of total flavonoids among families

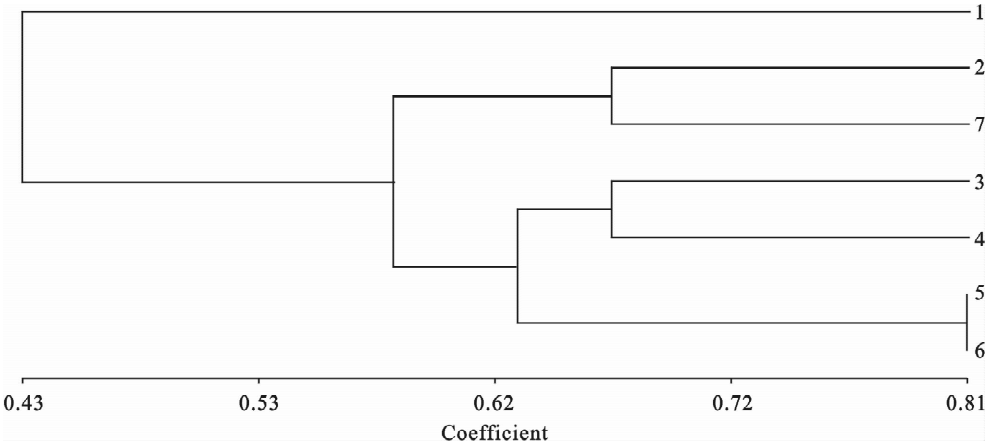
家系	平均值 /(mg·g ⁻¹)	最小值 /(mg·g ⁻¹)	最大值 /(mg·g ⁻¹)	方差	标准差	变异 系数/%
1	11.23	10.18	11.84	0.34	0.58	5.17
2	12.07	9.27	14.96	3.50	1.87	15.48
3	11.12	7.27	13.39	4.80	2.18	19.63
4	11.61	7.24	13.69	3.12	1.77	15.23
5	12.26	5.48	14.58	6.66	2.58	21.05
6	10.60	1.98	14.30	11.42	3.38	31.89
7	11.97	8.19	14.92	3.78	1.94	16.23

按照 UPGMA 法进行聚类分析,并绘制树状聚类图。由图 1 可以看出,在遗传相似系数为 0.43 的水平上,秦仲 1 号自成一个聚类群,说明秦仲 1 号与其他 6 个亲本的亲缘关系较远。在遗传相似系数为 0.58 的水平上将其余 6 个亲本分为 2 个类群。类群 I 包括秦仲 2 号和小叶;类群 II 包括 2 个小组,其中小组 I 由南阳 1 号和洛超 3 号组成,小组 II 由龙拐和闫雌组成。

表 4 亲本之间的遗传相似系数

Table 4 Genetic similarity index of parents

亲本	秦仲 1 号	秦仲 2 号	南阳 1 号	洛超 3 号	龙拐	闫雌
秦仲 2 号	0.472 973 0					
南阳 1 号	0.418 918 9	0.567 567 6				
洛超 3 号	0.614 864 9	0.574 324 3	0.668 918 9			
龙拐	0.439 189 2	0.641 891 9	0.682 432 4	0.621 621 6		
闫雌	0.439 189 2	0.587 837 8	0.641 891 9	0.581 081 1	0.810 810 8	
小叶	0.222 973 0	0.668 918 9	0.547 297 3	0.486 486 5	0.635 135 1	0.621 621 6



1:秦仲 1 号;2:秦仲 2 号;3:南阳 1 号;4:洛超 3 号;5:龙拐;6:闫雌;7:小叶

图 1 亲本的树状聚类图

Fig. 1 Dendrogram of parents

2.4 作图群体的确定

进行遗传图谱构建要有合适的分离群体,即作图群体的表型性状和 DNA 标记都发生较大的分离。通过对所获得的 7 个杜仲 F₁ 家系生长和叶片性状变异情况分析,家系 2、家系 6、家系 3 的生长和叶片性状变异系数较高;总黄酮含量变异分析的结果表明,以上 3 个家系中只有家系 2 总黄酮含量变异系数较小。作图群体亲本间高的多态性和有效的分子标记技术是快速构建高密度遗传连锁图谱的关键。本研究利用高效的 AFLP 标记技术对亲本进行了多态性检测,结果表明家系 3 的亲本小叶与秦仲 1 号的遗传相似系数最小,两亲本间具有较高的多态性。综上所述,以小叶和秦仲 1 号为亲本的家系 3 可以作为构建杜仲遗传连锁图谱的作图群体。

3 结论与讨论

试验利用播种育苗方法对所获得的杂交种子进行繁殖,得到了 7 个分离群体,其中多数群体的个体数超过 150 株。通过对 F₁ 家系生长和叶片性状和总黄酮含量变异分化程度分析,并进一步利用 10 对 AFLP 引物组合对杂交组合亲本的多态性进行了检测,选取了在 DNA 水平及表型差异较大的杂交组合小叶×秦仲 1 号得到的分离群体用于构建第 1 张杜仲遗传连锁图的作图群体。如果在此基础上利用效率高、重复性好的 AFLP 标记技术和拟测交作图策略构建杜仲 AFLP 遗传连锁图谱,利用作图群体的表型资料对 F₁ 杂种重要数量性状的 QTLs 进行分析并研究其随树龄增长的动态变化,找出控制杜仲叶片大小、叶柄长度、树皮厚度、叶片和树皮含胶量及药用有效成分含量、种子大小及其含胶量、苗木生长量、分枝习性、性别决定等性状的分子标记,将对于进一步开展杜仲分子标记辅助选择、控制重要性状基因的图位克隆及其他分子生物学方面的研究具有重要意义。

进行遗传图谱构建要有合适的分离群体,即作图群体的表型性状和 DNA 标记都发生较大的分离。其基础是杂交组合的亲本间在表型性状和 DNA 水平上均存在较大的差异。张德强^[18]等对获得的 3 个杂交群体的亲本进行 AFLP 标记多态性检测及对子代进行田间表型性状调查后,选取了在 DNA 水平、表型等差异较大的杂交组合毛新杨无性系 TB01×毛白杨无性系 LM50 得到的分离群体用于构建第 1 张毛白杨遗传连锁图的作图群体;并在构建遗传图谱的基础上进行了生长性状、叶片性状和木材化学成分含量等性状的 QTL 分析^[19]。目前虽然许多树种都已建立适合的作图群体,但普遍存

在作图个体的数量有限等问题。T. B. Jiang^[20]等以 80 个白桦 F₁ 个体为材料,利用拟测交和 RAPD、AFLP 等分子标记构建了白桦遗传连锁图谱。扩大群体的数量,提高作图的精度,是目前林木遗传图谱构建的一个发展趋势^[21]。

参考文献:

- [1] 张康健. 杜仲[M]. 北京:中国林业出版社,1990
- [2] 杜红岩,张再元,刘本端,等. 华仲 1 号等 5 个杜仲优良无性系的选育[J]. 西北林学院学报, 1994,9(4): 27-31.
DU H Y, ZHANG Z Y, LIU B D, *et al.* Selection and breeding of five excellent clones of *Eucommia ulmoides*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 1994,9(4): 27-31. (in Chinese)
- [3] 张博勇,张康健,张檀,等. 秦仲 1-4 号优良品种选育研究[J]. 西北林学院学报,2004,19(3):18-20.
ZHANG B Y, ZHANG K J, ZHANG T, *et al.* Reaserches on the selection and breeding of superior species of Qinzhong 1-4 [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004,19(3): 18-20. (in Chinese)
- [4] 杜红岩,乌云塔娜,杜兰英. 杜仲高产胶优良无性系的选育[J]. 中南林学院学报,2006,26(1):6-11.
DU H Y, WUYUN T N, DU L Y. Selection of high-yielding gutta-percha clones associated with *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Journal of Central South Forestry University, 2006,26 (1):6-11. (in Chinese)
- [5] TSCHAPLINSKI T J, TUSKAN G A, SEWELL M M, *et al.* Phenotypic variation and quantitative trait locus identification for osmotic potential in an interspecific hybrid inbred F₂ poplar pedigree grown in contrasting environments[J]. Tree Physiology, 2006,26 (5):595-604.
- [6] POT D, RODRIQUES J C, ROSENBERQ P, *et al.* QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) [J]. Tree Genet. Genom., 2006,2(1):10-24.
- [7] BERNATZKY R, MULCAHY K L. Marker-aided selection in a backcross breeding program for resistance to chestnut blight in the American chestnut[J]. Can. J. For. Res., 1992,22: 1031-1035.
- [8] 黄少伟. 松树分子标记辅助育种研究进展[J]. 林业科学研究, 2006,19(6):799-806.
HUANG S W. Progress on the research of marker-aided breeding of *Pinus* spp. [J]. Forest Research, 2006,19(6): 799-806. (in Chinese)
- [9] 王明麻. 林木遗传育种学[M]. 北京:中国林业出版社,2001.
- [10] 尹佟明,黄敏仁,朱立煌. 利用显性分子标记和 F₁ 群体进行林木遗传连锁图谱的构建[J]. 生物工程进展,1996,16(4): 12-16.
YIN T M, HUAN M R, ZHU L H. Construction of genetic linkage map in forest tree using dominant molecular markers and F₁ pedigree[J]. China Biotechnology, 1996,16(4): 12-16. (in Chinese)