

文章编号: 1001-1498(2007)02-0230-05

## EST-CAPS标记在尾叶桉和细叶桉 遗传图谱构建中的应用\*

张照远<sup>1,2</sup>, 甘四明<sup>1\*\*</sup>, 李发根<sup>1</sup>, 李梅<sup>1</sup>, 翁启杰<sup>1</sup>, 胡哲森<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002)

**摘要:**以已构建的尾叶桉和细叶桉 RAPD 连锁图谱为基础, 利用 CAPS 技术对 54 个细叶桉 EST 序列在尾叶桉和细叶桉遗传图谱上的定位研究表明: 7 个 EST 序列在作图群体中呈等位片段多态性, 包括母本尾叶桉特有的 3 个 (其中 1 个偏分离)、父本细叶桉特有的 2 个和父母本共有的 2 个; 共有 4 个 EST-CAPS 标记整合到尾叶桉 RAPD 连锁图谱, 分散于不同的连锁群, 各连锁群大小均有小幅增加; 细叶桉 RAPD 连锁图谱上也整合了 4 个 EST-CAPS 标记, 分散于不同的连锁群, 各连锁群大小均有不同程度的增加; 另外, 尾叶桉上的 1 个偏分离标记未整合到任何连锁群。EST-CAPS 可以有效用于桉属树种遗传图谱构建。

**关键词:** EST-CAPS; 尾叶桉; 细叶桉; 遗传图谱

**中图分类号:** S792.39 **文献标识码:** A

### Application of EST-CAPS Markers to Genetic Mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus tereticornis*

ZHANG Zhao-yuan<sup>1,2</sup>, GAN Siming<sup>1</sup>, LI Fa-gen<sup>1</sup>, LIMei<sup>1</sup>, WENG Qi-jie<sup>1</sup>, HU Zhe-sen<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. Forestry Faculty, Fujian University of Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** Seven EST-CAPS markers were identified from 54 candidate ESTs for genetic mapping with an F<sub>1</sub> population of *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis*, including three specific in female parent (one being aberrant from normal segregation among the sibs), two specific in male parent, and two shared by both parents. Four EST-CAPS markers were integrated to independent linkage groups on the RAPD linkage map of *E. urophylla* constructed previously, which contributed to some degrees to the extension of linkage group length. Also, four EST-CAPSs were mapped to different linkage groups on the RAPD linkage map of *E. tereticornis*, which gave rise to the increase of linkage group length. In addition, the aberrant marker was found to be unlinked to any linkage group in *E. urophylla*. This study demonstrated the usefulness of EST-CAPS markers in genetic mapping in *Eucalyptus*.

**Key words:** EST-CAPS; *Eucalyptus urophylla*; *Eucalyptus tereticornis*; genetic map

桃金娘科 (Myrtaceae) 桉树属 (*Eucalyptus* L. Hér.) 树种具有轮伐期短、速生和丰产等优点, 是优良的纸浆和纤维板工业原料, 在全球热带和亚热带地区是重要的工业原料林树种<sup>[1]</sup>。尾叶桉 (*E. uro-*

收稿日期: 2005-11-07

基金项目: 国家自然科学基金 (30371173)、863 计划项目 (2006AA100109) 和教育部“留学回国人员科研启动基金”

作者简介: 张照远 (1980—), 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向为森林培育学。

\* 中国林业科学研究院热带林业研究所吴坤明和吴菊英副研究员对杂交和育苗、杨华博士对 DNA 提取以及广东省新会市大泽镇林业站对实验材料保存提供了大力协助, 谨致谢忱!

\*\* 通讯作者, 博士, 副研究员, 主要从事林木育种与分子遗传研究; Email: smggan@pub.guangzhou.gd.cn

*phylla* S. T. Blake) 和细叶桉 (*E. tereticomis* Smith) 是较为重要的 2 个桉属树种, 种间杂交的杂种优势显著<sup>[2]</sup>, 并且尾叶桉及其杂种的世代周期较短, 一般 2 年生时即可开花, 因此, 两树种是林木遗传和育种研究的优良材料<sup>[3~5]</sup>。

近年来, 遗传图谱构建是林木分子生物学研究的热点。桉属中, 已进行遗传图谱构建的树种包括巨桉 (*E. grandis* W. Hill ex Maid)<sup>[6~8]</sup>、亮果桉 (*E. nitens* (Deane & Maid) Maid)<sup>[9]</sup>、蓝桉 (*E. globulus* Labill)<sup>[10~12]</sup>、尾叶桉<sup>[6~8, 13]</sup>、细叶桉<sup>[10, 13]</sup> 和赤桉 (*E. camaldulensis* Dehnh)<sup>[14]</sup>。虽然, 桉树遗传图谱构建已取得较大的进展, 但仍存在标记类型偏少、共显性标记不多、图谱密度不高等问题, 因此, 如何开发更多、更有效的标记是桉树遗传图谱构建中急需解决的问题。

切割扩增多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 也称 PCR-RFLP, 其利用基因组片段在酶切位点上的碱基变异, 对该片段的 PCR 产物进行限制性内切酶酶切从而产生等位片段 (或等位基因) 的多态性, 具有简便、可靠、共显性的特点<sup>[15, 16]</sup>。基于表达序列标签 (Expressed sequence tags, EST) 的 EST-CAPS 可对具有基因功能的 EST 片段进行分析, 已在日本柳杉 (*Cryptomeria japonica* (L. f.) D. Don)<sup>[17, 18]</sup>、火炬松 (*Pinus taeda* L.)<sup>[19]</sup>、云杉 (*Picea abies* (L.) Karst)<sup>[20]</sup> 等树种的遗传图谱中广泛应用; 但是, 目前国内还没有利用 EST-CAPS 标记进行林木遗传图谱构建, 国外也没有用于桉树遗传图谱构建的报道。本研究以前期构建的尾叶桉和细叶桉 RAPD 标记连锁图谱<sup>[13]</sup> 为基础, 增加 EST-CAPS 标记, 探讨 EST-CAPS 标记在桉属遗传图谱构建中的应用潜力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

作图群体包括尾叶桉 (母本, 0030) 和细叶桉 (父本, 4305) 及其杂交产生的 54 个 F<sub>1</sub> 子代。该作图群体原为 82 个子代<sup>[13]</sup>, 由于材料保存过程中部分个体死亡, 仅保留 54 个子代。

备选细叶桉 54 个 EST 序列下载自 Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>)。引物合成由上海生工公司完成。备选 30 种限制性内切酶购自上海生工 (16 种) 和北京鼎国公司 (14 种)。

### 1.2 DNA 提取、PCR 扩增和 CAPS 反应

DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[21]</sup>, 同时参照 Gan 等<sup>[13]</sup> 适当改良。

PCR 采用 10 μL 的反应体系, 包括: 10 × Buffer 1.0 μL (100 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 值 9.0); 100 mmol · L<sup>-1</sup> KCl; 0.5% NP-40; 80 mmol · L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 25 mmol · L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>), 0.2 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs, 前、后向引物各 0.05 μmol · L<sup>-1</sup>, DNA 模板 2 ng, Taq DNA 聚合酶 1 U, 双蒸水补充至 10 μL。PCR 反应程序: 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 56 或 60 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min。PCR 扩增仪为 GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Co.)。

CAPS 酶切反应体系为 10 μL, 包括: 相应限制性内切酶的 10 × Buffer 1.0 μL, 酶 5 U, PCR 产物 5.0 μL。37 恒温 4 h。酶切产物在含有溴化乙锭 (0.5 μg · mL<sup>-1</sup>) 的 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 电泳缓冲液为 0.5 × TBE。电泳结果利用 Photoprint 215SD 成像系统 (法国 Vilber Lourmat Co.) 存盘并打印记录。

### 1.3 位点统计

酶切谱带用“1”表示存在, “0”表示不存在, 对两亲本和子代进行 CAPS 位点统计。标记名称按“EST-EST 名称”记录。统计数据与 Gan 等<sup>[13]</sup> 作图的相应亲本的 RAPD 标记的谱带数据进行整合, 缺失个体数据用“2”表示。

### 1.4 连锁分析

连锁分析利用软件 Mapmaker/EXP 3.0<sup>[22]</sup> 进行。首先, 用“Group”命令进行分群, 参数设置参考文献 [13]; 再利用“Try”命令确定各连锁群内 EST-CAPS 标记的图谱位置, 或者利用“Compare”命令对新的连锁群进行标记排序。图谱绘制利用 Mapchart 2.1<sup>[23]</sup> 完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增和 CAPS 酶切

备选 54 对 EST 引物中, 有 35 对 (64.8%) 能在 1 个或 2 个亲本中扩增出一条清晰的谱带, 谱带大小均不同程度地大于原 EST 序列中引物包含的序列长度 (详细结果未列出)。通过引物酶筛选, 30 种限制性内切酶中, 有 7 种能分别对 7 个 EST 的 PCR 产物进行酶切并在亲本和子代中产生等位片段的多态性 (表 1), 即产生 7 个多态性位点, 其中, 母本尾

叶桉特有 3 个 (其中 EST-CD668433 偏分离), 父本 细叶桉 2 个, 父母本共有位点 2 个。

表 1 引物和限制性内切酶组合

标记名称	前向引物 (5'—3')	后向引物 (5'—3')	退火温度 /	限制性内切酶
EST-CD669233	CAACA GGAA TAACCA GAA GC	TGGGTGTTACTTGA TCGGCA	56	AhaIII
EST-CD668837	ATGA TGCACAA GCGTA TGGT	CTCACAGA TCCGCTTAA TG	56	BsuRI
EST-CD668835	GAAACCGCTGTCA TGAA GT	TTCCCCGTTTTCATCA GG	56	MspI
EST-CD668823	AGATTGGA TTGCTGCTTGCT	GGAA GAGCTGACCTAA TAG	56	Eco72 I
EST-CD668634	TCA GA GA GTCA GACAA GAAAC	ACCA TCCTCACCTCCACTTG	60	PvuII
EST-CD668626	CTCAACCCAAACAAGCAG	GACCCCAACGCTCTTCA TGA	56	MvaI
EST-CD668433	GCGTTGAA GGGCAA GA GTG	AGCCCCCTCACAA GTTCT	60	EcoR130 I

## 2.2 EST-CAPS 标记的图谱定位

母本尾叶桉的 5 个 EST-CAPS 标记中, 有 3 个分别整合到 Gan 等<sup>[13]</sup> 构建的尾叶桉 RAPD 遗传图谱的连锁群 1、11 和 15 中 (图 1), 均为正态分离标记; 有 1 个 (EST-CD668626) 与 3 个偏分离的 RAPD 标记连锁, 虽然 Gan 等<sup>[13]</sup> 未把偏分离的标记用于框架图构建, 但考虑到此标记为父母本共有, 在此仍列出

作为一个新的连锁群, 即连锁群 24 (图 1), 连锁群长度为 19.1 cM; 另外 1 个 (EST-CD668433, 偏分离) 未定位到图谱上。EST-CAPS 标记整合后的新图谱中, 各连锁群长度均有小幅增加, 如第 1、11、15 连锁群分别从 151.3、62.7、42.1 cM 增长到 166.4、63.5、47.8 cM, 标记间的平均间距也由原来的 15.1、10.5、8.4 cM 分别改变成 15.1、9.1、8.0 cM。

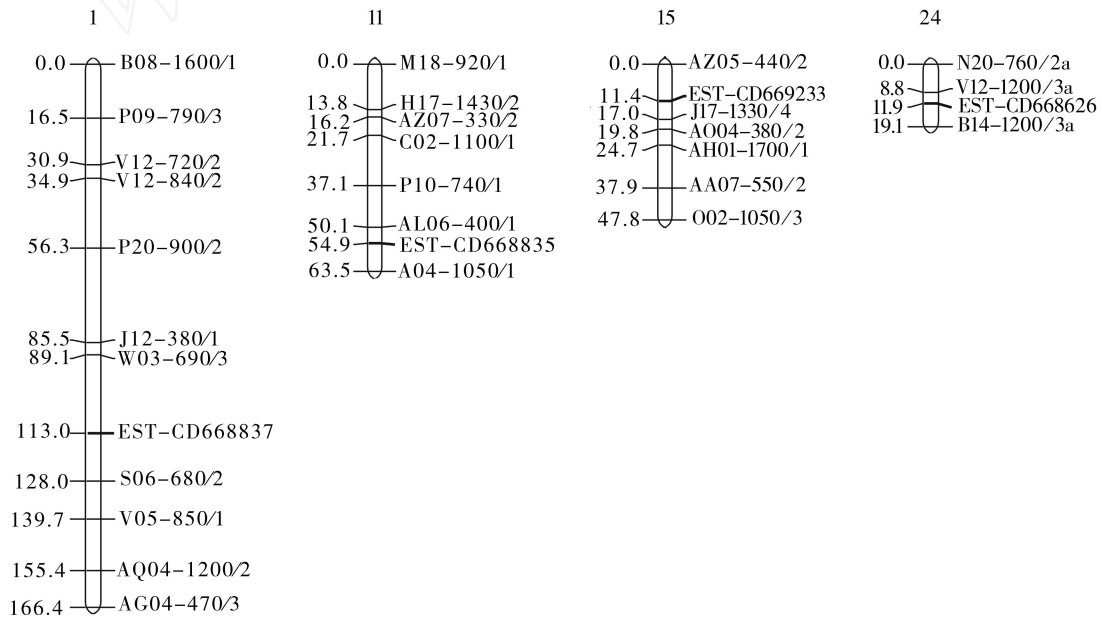


图 1 整合 EST-CAPS 标记的尾叶桉连锁群

父本细叶桉的 4 个 EST-CAPS 标记均整合到 Gan 等<sup>[13]</sup> 构建的细叶桉 RAPD 遗传图谱中, 分别位于连锁群 6、7、8、10 上 (图 2)。整合后的图谱连锁群数量不变, 仍为 23 个。EST-CAPS 标记整合后的新图谱中, 各连锁群长度均有不同程度的增加, 第 6、7、8、10 连锁群分别从 71.9、43.8、36.7、30.4 cM 增长到 94.4、85.8、39.9、50.5 cM, 标记间平均图距也由 10.3、21.9、9.2、10.1 cM 分别改变为 11.8、28.6、8.0、12.6 cM。值得注意的是, 标记 EST-

CD668837 和标记 EST-CD66823 分别整合到第 7 和第 10 连锁群末端, 连锁群长度分别增加了 42.0 cM 和 20.1 cM, 这对提高遗传图谱对基因组的覆盖率具有显著意义。

7 个 EST-CAPS 标记中, EST-CD668837 和 EST-CD668626 为尾叶桉 (母本) 和细叶桉 (父本) 共有, 比例较高 (28.5%), 且都定位到两树种的遗传图谱上, 表明 EST-CAPS 在一定亲缘关系的树种间的比较基因组作图中具有较好的应用潜力。

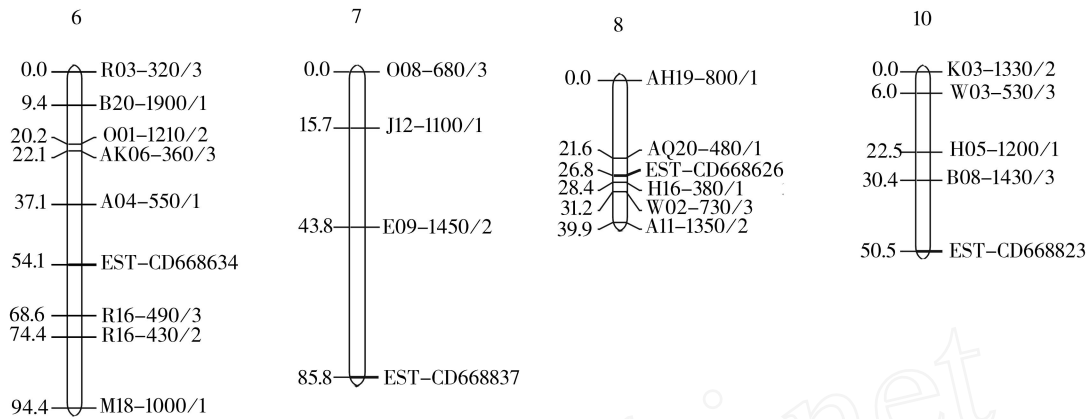


图 2 整合 EST-CAPS 标记的细叶桉连锁群

### 3 结论与讨论

(1) EST-CAPS 标记可以有效用于桉属树种的遗传图谱构建。作为一种共显性的分子标记技术, CAPS 具有操作简单、DNA 模板需要量少、特异性扩增基因编码区等优点<sup>[15-17]</sup>。目前,桉属树种中已经积累了丰富的 EST 数据, EST 序列超过 20 万条<sup>[24,25]</sup>, GeneBank 中已有 6 000 余条可以免费下载 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), 这为桉属树种 EST 作图提供了丰富的资源。因此, EST-CAPS 是桉属树种遗传图谱构建的有效工具。

(2) EST-CAPS 技术中引物酶的筛选工作量较大 (尤其是 EST 序列和备用酶的数量较多时), 这主要与 EST-CAPS 的多态性较低有关。本研究中, 54 对备选引物中只有 35 对 (64.8%) 能在 1 个或 2 个亲本中进行有效 PCR 扩增, 其比例与火炬松类似 (14/21, 66.7%)<sup>[26]</sup>。PCR 成功的 35 对引物中, 只有 7 对产生了 EST-CAPS 多态性 (20%), 其比例与日本柳杉天然群体类似 (20/80, 25%)<sup>[27]</sup>, 多态性较低。EST-CAPS 位点多态性较低, 主要原因是 EST 序列在不同个体间和同一个体内不同等位基因间的碱基变异不能产生限制性酶切位点; 或者即使存在酶切位点, 也因为未使用适当的限制性内切酶而漏检。因此, EST 作图中, CAPS 技术最好能与 SSCP 和 DGGE 技术相结合<sup>[19,28]</sup>, 并且, 当 EST 来自基因家系时, 其 PCR 产物酶切后很可能产生无法解释的谱带类型<sup>[19]</sup>, 这些都是 EST-CAPS 标记实验中需要注意的问题。

### 参考文献:

- [1] 白嘉雨. 中国热带地区桉属树种的遗传改良回顾 [A]. 见: 洪菊生, 王豁然. 澳大利亚阔叶树研究 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 33~48
- [2] 吴坤明, 吴菊英, 甘四明, 等. 桉树种间杂种的比较和选择研究 [J]. 林业科学研究, 2002, 15 (1): 1~6
- [3] 徐建民, 白嘉雨, 甘四明. 尾叶桉家系综合选择研究 [J]. 林业科学研究, 1996, 9 (6): 561~567
- [4] 李光友, 徐建民, 陆钊华, 等. 尾叶桉二代测定林家系的综合评选 [J]. 林业科学研究, 2005, 18 (1): 57~61
- [5] 徐建民, 陆钊华, 李光友, 等. 细叶桉种源一家系综合选择的研究 [J]. 林业科学研究, 2003, 16 (1): 1~7
- [6] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers [J]. Genetics, 1994, 137: 1127~1137
- [7] Verhaegen D, Plomion C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers [J]. Genome, 1996, 39: 1051~1061
- [8] Brondani R P V, Brondani C, Tarchini R, et al. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 816~827
- [9] Byrne M, Murrell J C, Allen B, et al. An integrated genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 869~875
- [10] Margues C M, Araujo J A, Ferreira J G, et al. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticomis* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 727~737
- [11] Bundock P C, Hayden M, Vaillancourt R E. Linkage maps of *Eucalyptus globulus* using RAPD and microsatellite markers [J]. Silvae Genetica, 2000, 49: 223~232
- [12] Thanarus K A, Groom K, Murrell J, et al. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 379~387
- [13] Gan S, Shi J, Li M, et al. Moderate-density molecular maps of *Euca-*

- lyptus urophylla* S. T. Blake and *E. tereticomis* Smith genomes based on RAPD markers [J]. *Genetica*, 2003, 118: 59 ~ 67
- [14] Agrama H A, George T L, Salah S F. Construction of genome map for *Eucalyptus camaldulensis* Dehn [J]. *Silvae Genetica*, 2002, 51: 201 ~ 206
- [15] Tragoonrungs S, Kanazin V, Hayes P M, *et al*. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 1002 ~ 1008
- [16] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping *A. nidulans* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers [J]. *Plant J*, 1993, 4: 403 ~ 410
- [17] Nikaido A M, Ujino T, Iwata H, *et al*. AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 825 ~ 831
- [18] Tani N, Takahashi T, Iwata H, *et al*. A consensus linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) from two pedigrees based on microsatellites and expressed sequence tags [J]. *Genetics*, 2003, 165: 1551 ~ 1568
- [19] Temesgen B, Brown G R, Harry D E, *et al*. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 664 ~ 675
- [20] Acher É V, Rampant P F, Jeandroz S, *et al*. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1602 ~ 1613
- [21] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12: 13 ~ 14
- [22] Lincoln S E, Daly M J, Lander E S. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP 3.0 [Z]. Whitehead Institute, Cambridge MA: Research Technical, 1992
- [23] Voorrips R E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [J]. *J Hered*, 2002, 93: 77 ~ 78
- [24] Strabala T J. Expressed sequence tag databases from forestry tree species [A]. In: Kumar S, Fladung M. *Molecular Genetics and Breeding of Forest Trees* [C]. New York: Food Products Press, 2004: 19 ~ 51
- [25] Camargo L E. The FORESTs genome project in perspective [A]. *Eucalypt Genomic Meeting*, Hobart, Tasmania, Australia, 2004
- [26] Harry D E, Temesgen B, Neale D B. Codominant PCR-based markers for *Pinus taeda* developed from mapped cDNA clones [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 327 ~ 336
- [27] Tsumura Y, Tomaru N. Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on sequenced tagged sites [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 396 ~ 404
- [28] Plimon C, Hume P, Frigerio J M, *et al*. Developing SSCP markers in two *Pinus* species [J]. *Mol Breed*, 1999, 5: 21 ~ 31