评述

鹅掌楸属树种分子生物学研究进展

钟永达, 胡淼, 余发新*

江西省科学院生物资源研究所, 江西省观赏植物遗传育种重点实验室, 南昌 330096

* 联系人, E-mail: fxyu2000@126.com

收稿日期: 2015-10-09; 接受日期: 2015-11-16; 网络版发表日期: 2016-03-04

国家自然科学基金(批准号: 31260188)和江西省学术带头人计划(批准号: 20133BCB22012)资助

摘要 鹅掌楸属树种是珍稀的第三纪孑遗树种, 也是优良的用材兼园林绿化树种. 开展鹅掌楸属树种研究, 不仅具有重大科学意义, 而且具有重要的经济和生态价值, 但该属的分子生物学研究相对缓慢. 本文从分子标记、转录组学、蛋白质组学、基因克隆和转基因等方面对鹅掌楸属树种的分子生物学研究进展进行综述, 并就当前亟需解决的问题进行讨论, 以期加快分子生物学技术在鹅掌楸属乃至其他树种研究中的应用提供参考.

关键词 鹅掌楸属, 分子标记, 组学, 转基因, 基因组

鹅掌楸属(*Liriodendron*)树种现仅存两个种, 即鹅掌楸(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.)和北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera* Linn.), 分别分布在中国长江流域及越南北部和美国东部至加拿大东南部, 是典型的东亚-北美间断分布“种对”^[1]. 鹅掌楸属树种被认为是被子植物中最原始的类群, 是珍稀的第三纪孑遗树种, 对研究有花植物的起源、分布和系统发育有重要价值; 同时, 鹅掌楸属树种也是优良的用材和园林绿化树种. 因此, 基于其在植物分类中的特殊地位、优良材性和美观树形, 开展鹅掌楸属树种的分子生物学研究, 不仅对古植物学、植物系统学和植物地理学等进化研究方面具有极高的科学价值, 而且在用材和观赏品种的遗传改良方面具有重要的经济和生态价值.

鹅掌楸属树种研究时间相对较短, 引起学者的关注始于 1963 年叶培忠教授种间杂交试验的成功^[2],

热点的兴起为 20 世纪 90 年代至今的二十余年. 鉴于鹅掌楸属树种的生长和分布情况, 国内学者主要开展鹅掌楸及杂交鹅掌楸的研究, 包括种质资源、系统进化和杂交育种等方面, 国外学者的研究对象基本为北美鹅掌楸. 该属的分子生物学研究时间更短, 最早的报道见于 1990 年美国 Parks 和 Wendel^[1]对鹅掌楸属树种的遗传分化研究, 国内的研究从 21 世纪初才开始. 学者们力求利用现代先进生物技术加快鹅掌楸属树种的研究进程, 也取得了诸多有益的成果和突破, 但受到林木自身特性和资源洲际隔离的影响, 总体进展相对缓慢, 其更多的价值还有待挖掘. 本文按照分子生物学的技术领域从分子标记、转录组学、蛋白质组学、基因克隆和转基因等方面对现有的研究成果进行综述, 并就当前亟需解决的问题进行讨论, 以期加快分子生物学技术在鹅掌楸属乃至其他树种研究中的应用提供参考.

引用格式: 钟永达, 胡淼, 余发新. 鹅掌楸属树种分子生物学研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 260–268

Zhong Y D, Hu M, Yu F X. Research advances in molecular biology of *Liriodendron*. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 260–268, doi: 10.1360/N052015-00292

1 分子标记

分子标记是一类以 DNA 多态性为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传变异的直接反映. 目前, 国内外学者利用分子标记对鹅掌楸属树种的遗传多样性、系统地理学、遗传图谱及指纹图谱构建、生殖生物学、杂种优势及亲本选配等方面进行了研究.

1.1 遗传多样性研究

遗传多样性的研究对于了解鹅掌楸属树种的种源适应性、基因资源分布、种质资源的利用和保护等具有重要的理论和实际意义^[3]. 从 20 世纪 80、90 年代开始, 国内外学者对鹅掌楸属树种的种质资源分布进行了调查收集, 并对其遗传多样性进行了初步研究^[4,5]. 此后, 国内学者利用随机扩增多态性 DNA (random amplification polymorphic DNA, RAPD)、简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR) 和限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 等分子标记开展了深入研究. 结果表明, 鹅掌楸属树种具有丰富的遗传多样性, 北美鹅掌楸的遗传多样性水平高于鹅掌楸; 鹅掌楸的遗传变异主要来自种源间, 西部种群遗传多样性明显高于东部种群, 核心居群高于边缘居群^[6-12]. 但与其他物种相比, 鹅掌楸的遗传多样性稍低, 这表明, 鹅掌楸种群仍处于“濒危”生境中, 急需开展鹅掌楸种质资源保护^[8]. 随着高通量测序技术的发展, 简化基因组重测序等新型分型技术的出现为大样本量的遗传多样性研究提供了新的方法和思路, 此外, 鹅掌楸属核心种质资源的建立和保存仍有待加强.

南京林业大学研究团队利用 SSR 分子标记首次对鹅掌楸群体的遗传多样性动态变化趋势进行了研究. 李博等人发现鹅掌楸亲本群体遗传多样性高于子代群体, 表明鹅掌楸群体间遗传分化有增大的趋势^[13,14]. 与此相反, 陈龙^[15]研究表明, 子代群体遗传多样性略大于亲本天然群体, 推测在自然状况下, 鹅掌楸具有遗传多样性自我保持的机制. 两者结论不同, 可能与两者所用的群体种源以及来源不同有关, 而且相对于天然群体, 人工群体的自我保护机制要低, 其子代的遗传多样性很可能会低于亲本. 当然, 关于鹅掌楸遗传多样性的动态变化趋势尚需进一步研究证实^[14].

1.2 系统地理学研究

Sewell 等人^[16]利用叶绿体基因组 (chloroplast DNA, cpDNA) 上的 RFLP 标记对北美鹅掌楸地理分布格局的形成进行了研究, 认为在更新世冰期时期, 阿巴拉契亚山脉南部和佛罗里达中部地区存在 2 个相互隔离的避难所. 而惠利省结合 cpDNA 上的 RFLP 和 SSR 标记研究认为, 鹅掌楸同样可能存在东、西部 2 个不同的避难所, 分别位于武夷山脉南麓、云贵高原和四川南部. 冰期后, 2 个避难所鹅掌楸向北方的不同方向扩散, 并交汇于重庆、贵州、湖南、湖北交界处^[8]. 李康琴^[7]利用 2 个叶绿体基因 (*psbA-trnH*, *trnT-trnL*) 的序列变异信息研究结果也认为, 鹅掌楸东、西部群体的第四纪冰期避难所位于福建武夷山南麓和贵州习水大娄山北坡. 但杨爱红^[11]基于 cpDNA SSR 标记的研究认为, 云贵高原、大巴山区、天目山、武夷山、大别山及罗霄山脉北部地区均为鹅掌楸的主要冰期避难地, 且在末次大冰期不存在明显南迁, 冰后期无显著扩张. 尽管 cpDNA 标记由于其单倍型、不发生等位基因重组等优点而被认为是植物系统地理学研究的首选标记, 但由于其单系遗传, 不能反映另一亲本对种群遗传结构的贡献; 另一方面, 利用单个核基因组内转录间隔区 (internal transcribed space, ITS) 基因序列信息也不能对鹅掌楸属 2 个种进行有效区分^[7], 因此, 越来越多学者开始将多个不同来源或不同功能的 DNA 序列标记组合, 以期得到更接近真实的系统发育历史^[1,7]. 李康琴^[7]结合 2 个叶绿体基因 (*psbA-trnH*, *trnT-trnL*) 及 1 个核基因 ITS 的序列变异信息研究认为, 鹅掌楸属树种早期分东亚和北美两支, 随后在这两个大陆上各自分布扩散, 独立进化, 且冰期后均经过群体扩张, 成为现在的鹅掌楸和北美鹅掌楸.

1.3 遗传图谱与 DNA 指纹图谱的构建

对于鹅掌楸属树种而言, 建立高密度的遗传图谱可以加快全基因组的研究, 实现对特定性状的遗传分析与基因定位. 南京林业大学林木遗传育种实验室利用鹅掌楸属种间杂交组合的作图群体, 首次构建了分子标记遗传图谱. 李兴鹏^[17]和杨建^[18]分别以鹅掌楸属种间正反交组合 F_1 群体为材料, 利用表达序列标签的 SSR (expressed sequence tags-SSR, EST-SSR) 和相关序列扩增多态性 (sequence-related

amplified polymorphism, SRAP) 标记, 构建得到了 2 个鹅掌楸遗传连锁图谱. 然而, 由于 2 个图谱所采用的标记数目太少, 两个标记之间距离大于 20 cM 的很多, 构建的连锁群和鹅掌楸的 19 条染色体不能一一对应, 图谱质量不高, 尚需进一步加密和完善. 而且, 鹅掌楸属树种特定性状作图群体仍有待建立.

利用分子标记构建鹅掌楸属树种无性系的指纹图谱, 不但可以阐明无性系间在分子水平上的遗传变异, 而且对于无性系鉴定和知识产权保护具有重要意义. 李周岐和王章荣^[19]利用 RAPD 分子标记首次构建得到了杂交鹅掌楸无性系指纹图谱, 聚类分析表明, 其在一定程度上反映了无性系间的亲缘关系. 此后, 王龙强^[20]利用 16 对 EST-SSR 标记组合构建了 330 个杂交鹅掌楸无性系的指纹图谱, 其中 13 个无性系仅用 1 对标记就能够与其他无性系完全区分. 谭飞燕^[21]利用 ISSR 标记 UBC826 区分出 41 个鹅掌楸无性系, 而 UBC807 和 UBC826 标记组合能区分出全部 53 个无性系, 说明了分子标记在无性系基因型鉴定上的高效性. 然而, 目前鹅掌楸属树种无性系指纹图谱可利用的分子标记仍偏少, 标准指纹图谱、检测标准和规范仍需进一步完善.

1.4 生殖生物学研究

在人工授粉状态下, 鹅掌楸属树种种间杂交授粉的污染率极低^[22]. 而在自由授粉状态下, 鹅掌楸属树种具有自交、种内交配和种间交配等多种交配方式, 但以异交为主, 且种内交配比例大于种间交配. 鹅掌楸属树种母本和北美鹅掌楸父本存在明显的性选择倾向, 而鹅掌楸父本的性选择倾向则不明显^[23,24]. 冯源恒等人^[25]也认为鹅掌楸繁殖性能主要受母本效应影响, 但张红莲^[14]认为优势种存在更强的基因渐渗趋势. 与北美鹅掌楸天然自交完全不亲和相比, 鹅掌楸存在一定的自交率, 且在居群中引入适当的传粉者, 可显著提高花粉流的散布范围和传粉效率. 推测鹅掌楸在种群规模小且距离分散的特殊环境下, 为提高种群的短期适合度, 可能在一定程度上提高了自交亲合性^[23,26]. 但与种内异交和种间杂交子代相比, 无论是生长量还是存活率, 鹅掌楸属树种均存在明显的自交衰退^[27].

1.5 杂种优势及亲本选配

杂交鹅掌楸及其回交子代和 F_2 代均表现出明显

的杂种优势, 而且家系间在性状表现上变异很大^[28]. 南京林业大学李火根教授团队^[29,30]利用 EST-SSR 分子标记对鹅掌楸属杂种优势与亲本选配进行了广泛而深入的研究. 他们认为, 用亲本间遗传距离进行杂种优势和亲本选配预测是可行的, 子代生长量与亲本间遗传距离呈二次曲线相关, 但并非所有的种间杂种子代都表现出杂种优势. 在进行杂交育种亲本选配时, 亲本对之间最适的遗传距离应为 1.0 左右^[25,31]. 同时, 应兼顾亲本的遗传组成, 尽可能选择遗传组成高度纯合的个体作为杂交亲本^[32]. 这在一定程度上印证了杂种优势的基因网络假说, 亲缘关系太远则导致遗传体制不相容增加, 难以产生杂种优势, 若亲缘关系太近则不具有互补性, 无法彼此促进和调整, 也不会存在杂种优势^[33].

2 功能基因组学研究

2.1 转录组学研究

通过转录组学的研究, 不仅可以提供大量候选 EST 序列, 对重要功能基因进行挖掘, 还可促进全基因组研究. 国际花卉基因组计划于 2005 年首次构建了北美鹅掌楸 cDNA 文库^[34]. 随后, 宾夕法尼亚州立大学的 Liang 等人^[35,36]和韩国大学 Jin 等人^[37]构建了北美鹅掌楸花芽、果实、顶芽、叶、形成层、木质部、根、种子等多个组织器官的 cDNA 文库, 获得大量的 EST 序列, 筛选出一大批与花发生发育、木材形成及次生木质部发育相关的基因. 本课题组^[38]首次构建了杂交鹅掌楸不定根均一化 cDNA 文库, 共获得 2921 个 unigenes, 筛选到获得一系列不定根发育相关基因. 随着第二代测序技术的出现, 南京林业大学 Yang 等人^[39]首次进行了鹅掌楸转录组测序, 拼接后获得 87841 条 unigenes. 3386 个 unigenes 在花和叶子中的表达具有显著差异, 其中 25 条 unigenes 可能与类胡萝卜素合成相关. 而随着对 microRNA(miRNA) 在调控植物生长发育中的作用的不断深入, 南京林业大学 Li 等人^[40]利用高通量测序技术对杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生过程中的 miRNA 进行了测序, 发现其中 273 个 miRNA 为鹅掌楸属所特有, 基因芯片结果进一步证明这些 miRNA 大多在胚胎中表达, 暗示这些 miRNA 可能在调控杂交鹅掌楸体胚发生的整个过程中起着重要的作用. 武汉植物园的 Wang 等

人^[41]对鹅掌楸花各个发育阶段的 miRNA 进行了测序, 共得到 498 个 miRNA, 其中大部分 miRNA 的表达与生殖生长显著相关. 这两个新发现的 miRNA 中, 1 个以前被认为是裸子植物特有的, 但对其功能还有待进一步研究. 这些结果不仅填补了基部被子植物 miRNA 研究的空缺, 有助于更深入理解 miRNA 的进化过程, 也为今后深入了解鹅掌楸属树种有性生殖和体胚发生的调控机制, 研究相关基因的功能和分子机理奠定了基础, 同时为分子育种提供了丰富的后备基因.

2.2 蛋白质组学研究

蛋白质组学的概念最早是 Marc Wilkins 在 1994 年提出, 标志着生命科学进入后基因时代. 国际上蛋白质组学的研究进展十分迅速, 无论是基础理论还是技术方法, 都在不断进步和完善. 然而, 鹅掌楸属树种的蛋白质组学研究目前仍处于起始阶段, 主要集中于生殖生物学方面. 武汉植物园 Li 等人^[42]通过对鹅掌楸有性生殖授粉过程中雌蕊的蛋白质组学分析, 对鹅掌楸自然结籽率低下的原因进行了探讨. 通过质谱定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)和双向凝胶电泳技术, 分别鉴定到 51 和 468 个蛋白质的表达量在授粉前后发生变化. 对这些差异表达的蛋白质进行功能分类发现, 有 66 个蛋白质与有性生殖过程相关. 结合雌雄蕊发育和花粉萌发等形态学观察结果, 进一步分析发现, 二硫键异构酶 A6(disulfide-isomerase A6)和胚胎发育缺陷蛋白(embryo-defective)等蛋白质的差异表达与低结实率高度相关, 推测这些蛋白质调控了鹅掌楸的受精过程. 南京林业大学 Zhen 等人^[43]对杂交鹅掌楸无性繁殖体胚发生过程中的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织的蛋白组进行了比较分析, 共鉴定得到 14 个参与胚性愈伤组织形成的蛋白质, 包括细胞骨架动力学(profilin)、细胞增殖和分化(eIF-5A)、细胞程序性死亡(cathepsin b-like cysteine proteinase)、活性氧平衡(peptide Msr)、钙信号等. 这些研究结果为揭示鹅掌楸属树种生殖生物学的分子机制提供了重要的理论基础.

2.3 基因克隆与功能研究

(1) 木质素代谢相关基因. 木质素对植物生长

发育具有重要的作用, 北美鹅掌楸作为美国重要的用材树种^[44], 对其开展木质素代谢相关基因的研究具有重要的应用价值. 肉桂醇乙醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)是木质素合成特异途径中的关键酶. Xu 等人^[45]通过同源克隆的方法, 从北美鹅掌楸中得到 7 个 CAD 同系物, 但只有 *LtuCAD1* 与控制木质素合成的基因真正的 CAD(bona fide CAD)聚为一类, 且在木质部中表达量最高. 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *cad4cad5* 双突变体中过表达此基因, 转基因植株的木质素含量增加、S/G 木质素比例降低, 表明 *LtuCAD1* 基因参与木质素的形成. 漆酶(laccases)参与了木质素的合成和降解, LaFayette 等人^[46]从北美鹅掌楸的木质部中克隆得到 4 个编码漆酶的同功酶基因, 尽管这些基因的蛋白序列具有很高的相似性(79%~91%), 但这些漆酶基因在木质部组织中表达并不一致, 暗示这些漆酶基因的功能可能发生了分化. 有意思的是, Hoopes 和 Dean^[47]将北美鹅掌楸中类漆酶多铜氧化酶(laccase-like multicopper oxidase, LMCO)基因在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中进行表达, 发现 *Ltlacc2.2* 转基因烟草细胞同时具有铜和铁氧化酶活性, 暗示漆酶家族的一些成员可能除具有化酵素活性外, 还具有其他功能. 而且, LMCO 在植物维管组织中的高水平表达可能反映了组织中铁离子高效吸收和正常发育过程中进行木质化的需要, 这种机制能够最大程度减少木质素沉积和单体产生过程中的活性氧自由基对植物的伤害. 然而, 限于鹅掌楸属树种组培苗生根困难等因素, 转木质素相关基因植株的获得仍比较困难, 离实际应用还有较大距离.

(2) 体细胞胚胎发生相关基因. 目前, 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生技术已比较成熟^[48]. 然而, 关于杂交鹅掌楸体胚发生的分子机理的研究仍少见报道. 魏丕伟^[49]以杂交鹅掌楸的胚性愈伤组织为材料, 成功分离克隆了多个杂交鹅掌楸的体细胞胚胎发生标记基因, 包括 C-重复序列结合因子(C-repeat binding factor, CBF)转录复合物 HAP3 亚基多子叶相关基因(*leafy cotyledon 1-like*, *LEC1-LIKE*)、B3 转录因子(B3 domain-containing transcription factor, *FUSCA3*)基因、同源异形框基因(*WW domain-containing oxidoreductase*, *WOX1*, *WOX4*, *knotted*, *KN1* 和 *KN2*)等 6 个转录因子, 以及体细胞胚胎发生类受体蛋白激酶基因

(somatic embryogenesis receptor-like kina, *SERK1* 和 *SERK2*)、在植物受精中介导雌雄配子结合的信号受体(*ferroplasma acidarmanus*, *FER1* 和 *FER2* 基因)、泛素基因的 5 个成员(*ubiquitin*, *UBI1-5* 基因)和扩展蛋白基因(α -*expansin1*, *LhEXPI*)等。表达谱分析表明, *LhFUS3* 基因在胚性愈伤组织中被诱导高水平地表达, 具有较好的胚胎发育特异性。杂交鹅掌楸体胚发生标志基因的克隆和表达分析, 为进一步深入揭示“已分化体细胞-脱分化细胞-胚性细胞”中细胞改变发育命运的分子机理奠定研究基础。然而, 这些基因的功能仍有待下一步研究。

(3) 其他基因。此外, 随着测序成本的降低, 人们依靠获得的 EST 序列, 通过 RACE 技术对相关基因进行了克隆。本课题组通过 RACE 方法获得了 (F-box, *FBI*) 基因的全长 cDNA 序列, 经比对后发现 *LHFB1* 基因与其他物种中 F-box 家族蛋白具有高度同源性。表达谱分析发现, *LHFB1* 在不定根中的表达水平最高, 推测可能参与了杂交鹅掌楸不定根的发生过程^[38]。罗群凤^[50]运用 RACE 技术克隆获得了北美鹅掌楸 *Chs* 基因家族 *Chs1*, *Chs2* 及 *Adh* 基因的全长序列。 *Chs1* 基因只在北美鹅掌楸中表达, 而 *Chs2* 基因则在鹅掌楸中表达, 杂交鹅掌楸中 2 个基因均有表达。而 Liang 等人^[51]利用前期构建的北美鹅掌楸细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)文库, 通过测序获得了北美鹅掌楸 *GIGANTEA* 基因序列, 基因结构和进化树表明, *GIGANTEA* 可能是一个祖先基因, 在单子叶植物和双子叶植物分化之后发生了基因分离, 且更接近双子叶植物。然而, 这些基因的功能都还有待验证。

2.4 转基因研究

自 1983 年首次获得转基因植株至今, 植物的转基因研究已经得到飞速发展。然而, 目前鹅掌楸属树种转基因的报道仍较少。Wilde 等人^[52]首次通过基因枪的方法成功地将报告基因 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase, *GUS*)和新霉素磷酸转移酶(*neomycin phosphotransferase II*, *NPT II*)基因转入北美鹅掌楸胚性悬浮培养的单细胞, 获得了北美鹅掌楸的转基因植株。Rugh 等人^[53]同样通过基因枪的方法成功地将改造过的汞离子还原酶 *merA* 基因导入到北美鹅掌楸的原胚团中, 转基因植株在含有正常毒

性水平的汞离子培养基中萌发和生长极为良好, 抗汞能力也提高了 3~4 倍, 并且释放汞原子的量是对照植株的 10 倍。南京林业大学研究团队通过其他遗传转化方法同样获得了转基因植株。吕伟光^[54]首次通过 PEG 介导方法将报告基因 *GFP* 成功转入鹅掌楸和北美鹅掌楸的原生质体中, 细胞表现出绿色荧光。陈志等人^[55]通过农杆菌介导的方法将具有广谱抗性的天麻抗真菌蛋白(*gastrodia antifungal protein*, *GAFP*)和兔防御素(*rabbit defensin*, *NPI*)双价基因成功导入到杂交鹅掌楸中, 并对影响遗传转化效率的因素进行了初步研究。结果表明, 在预培养阶段使用乙酰丁香酮有利于提高转化效率, 但侵染菌液浓度和侵染时间对转化结果无显著影响。有意思的是, 带正电荷的 CdSe/ZnS 纳米颗粒可以通过细胞的液相胞吞作用进入杂交鹅掌楸细胞内, 且不影响细胞的活性, 在培养溶液中添加 20% 聚乙二醇, 可进一步提高鹅掌楸细胞胞吞 CdSe/ZnS 纳米颗粒的量和减轻 CdSe/ZnS 纳米颗粒的细胞毒性。因此, 以表面携带正电荷的 CdSe/ZnS 量子点纳米材料的基因载体, 有可能广泛应用于未来的鹅掌楸转基因研究中^[56]。

3 结语与展望

近年来, 随着新一代高通量测序技术的出现, 颠覆传统分子生物学研究的手段被不断开发, 甚至在不依赖于参考基因组序列和物种的情况下实现基因定位, 有力地推动了林木包括鹅掌楸属树种的分子生物学研究。例如, 转录组测序(RNA-Seq)技术的出现, 不仅使得在基因组信息未知的非模式植物中进行低廉、高效、大规模地发掘基因成为可能^[57], 而且还能进行突变基因位点的识别, 确定基因的表达水平和选择性剪接对于突变表型的影响。该技术已经在拟南芥^[58,59]、水稻(*Oryza sativa*)^[60,61]、玉米(*Zea mays*)^[62,63]、杨树(*Populus L.*)^[64]、桉树(*Eucalyptus robusta*)^[65]等中得到了广泛应用。利用 RNA-Seq 技术, 中国学者获得了大量鹅掌楸花和叶子的 unigenes^[39], 并且首次对鹅掌楸属树种的 miRNA 进行了研究^[40,41], 这些转录组数据不仅为鹅掌楸属树种表达谱分析、分子标记辅助选择育种和基因克隆与功能研究奠定了基础, 也为今后基因组注释提供了参考序列。

然而, 由于鹅掌楸属树种自身特性和地理分布

的限制, 加上其分子生物学研究团队力量薄弱, 资金投入不足等原因, 分子生物技术在鹅掌楸属树种中的应用仍存在诸多难点. 相对于杨树等模式树种, 全基因组的破译和高效稳定的遗传转化体系的建立成为鹅掌楸属树种分子生物学研究能否深入展开的两个关键因素. 鉴于此, 笔者认为在今后的研究中以下 6 个方面亟需加强: (i) 全基因组的破译. 根据本研究, 鹅掌楸属树种全基因组较大(约为 1.6 G), 且高杂合重复(unpublished), 未来解决问题的关键在于有效的测序材料选择和高效组装软件的开发, 为鹅掌楸属树种功能基因组学研究和其生物学基础阐释奠定基础. (ii) 高效稳定的遗传转化体系的构建. 鹅掌楸属树种组培体系中最大的难题在于组培苗褐化严重、生根困难. 通过在培养基中添加活性炭等外源物质和改变外部光照等条件的进一步优化, 获得高效稳定的组培体系是可能的, 同时通过提高基因转化效率, 建立成熟完善的遗传转化体系, 为充分利用获得的 EST 序列, 解析相关基因的功能奠定技术基础. (iii) 濒危机理的研究. 利用分子标记和蛋白组学, 国内学者对鹅掌楸的遗传多样性和濒危机理进行了探讨, 但尚未涉及基因的表达调控^[23,42]. 利用表观遗传学如全基因组甲基化测序(whole genome bisulfite sequencing/methylated DNA immunoprecipitation sequencing/reduced representation bisulfite sequencing, WGBS/MeDIP-Seq/RRBS), 结合转录组图谱分析, 开展鹅掌楸属树种生物学性状基因表达调控机制的研究, 特别是鹅掌楸濒危机理的探讨, 为改善鹅掌楸濒危环境提供理论基础. (iv) 高密度遗传图谱的构建.

目前, 鹅掌楸属树种的遗传图谱分子标记过少^[17,18], 可利用的信息不多, 重要性状相关功能基因挖掘仍未见报道. 利用简化基因组测序(restriction-site associated DNA/genotyping-by-sequencing, RAD/GBS)技术, 开发全基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)分子标记, 进行超高密度遗传图谱构建、群体遗传和群体 GWAS 分析等, 推动基因分型技术和全基因组关联研究, 挖掘与诸多重要性状相关的功能基因, 为鹅掌楸属的分子育种奠定基础. (v) 特异种质筛选和特异基因发掘. 鹅掌楸属树种无性繁殖困难^[38]、自然结籽率低下^[66,67]、水淹条件下极易死亡^[68]. 扩大种质资源收集, 重点开展不同特性的育种材料筛选, 如高生根率、高发芽率以及抗逆性强(耐涝、耐旱)等特异种质, 结合高通量测序技术, 通过直接比较突变体和野生型基因组鉴定突变位点, 进行相关领域的分子机理研究, 为开展鹅掌楸属树种的定向选育研究提供科学依据. (vi) 蛋白组学及分子传导途径研究. 通过蛋白乙酰化、糖基化等高通量测序技术, 开展鹅掌楸重要功能蛋白的结构与功能、蛋白质的翻译后修饰调控机制(磷酸化和脱磷酸化等)、功能蛋白的互作网络、重要蛋白质的亚细胞分布及其调控等研究, 是鹅掌楸属树种分子生物学进一步深入研究的重要内容. 随着分子生物学技术的快速发展和以上问题的逐步解决, 鹅掌楸属树种有关分子机理将得到阐明, 并在种质资源保护、亲本选择利用、分子标记辅助育种和转基因育种等方面发挥重要作用, 加快鹅掌楸属树种的育种进程.

参考文献

- 1 Parks C, Wendel J. Molecular divergence between Asian and North American species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with implications for interpretation of fossil floras. *Am J Bot*, 1990, 77: 1243–1256
- 2 南京林产工业学院林学系育种组. 亚美杂种马褂木的育成. *林业科技通讯*, 1973, 12: 10–11
- 3 葛颂. 遗传多样性. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1997
- 4 郝日明, 贺善安, 汤诗杰, 等. 鹅掌楸在中国的自然分布及其特点. *植物资源与环境*, 1995, 4: 1–6
- 5 Parks C, Miler N, Wendel J, et al. Genetic divergence within the genus *Liriodendron* (Magnoliaceae). *Ann Mo Bot Gard*, 1983, 70: 658–666
- 6 李建民, 周志春, 吴开云, 等. RAPD 标记研究马褂木地理种群的遗传分化. *林业科学*, 2002, 38: 61–66
- 7 李康琴. 鹅掌楸属群体遗传结构及分子系统地理学研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2013
- 8 惠利省. 马褂木遗传多样性及系统地理学研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2010
- 9 石晓蒙. 马褂木遗传多样性研究. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2013
- 10 赵亚琦, 成铁龙, 施季森, 等. 鹅掌楸属 SRAP 分子标记体系优化及遗传多样性分析. *林业科学*, 2014, 50: 37–43
- 11 杨爱红. 孑遗植物鹅掌楸的居群遗传结构与谱系地理格局研究. 博士学位论文. 武汉: 中国科学院大学武汉植物园, 2014
- 12 Li K, Chen L, Feng Y, et al. High genetic diversity but limited gene flow among remnant and fragmented natural populations of

- Liriodendron chinense* Sarg. Biochem Syst Ecol, 2014, 54: 230–236
- 13 李博. 鹅掌楸群体空间遗传结构研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2013
- 14 张红莲. 利用 SSR 分子标记探测鹅掌楸种间渐渗杂交. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2009
- 15 陈龙. 利用 SSR 分子标记研究鹅掌楸天然群体遗传结构. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2008
- 16 Sewell M, Kparks C, Khasem W. Intraspecific chloroplast DNA variation and biogeography of north American *Liriodendron* L.(Magnoliaceae). Evolution, 1996, 50: 1147–1154
- 17 李兴鹏. 鹅掌楸分子标记开发及遗传连锁框架图谱构建. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2007
- 18 杨建. 鹅掌楸分子标记遗传图谱构建. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2009
- 19 李周岐, 王章荣. 杂种马褂木无性系随机扩增多态 DNA 指纹图谱的构建. 东北林业大学学报, 2001, 29: 5–8
- 20 王龙强. 杂交鹅掌楸优良遗传型选择及无性系指纹图谱构建. 南京: 南京林业大学, 2010
- 21 谭飞燕. 中国马褂木无性系多性状变异研究及 ISSR 指纹图谱的构建. 南宁: 广西大学, 2013
- 22 李周岐, 王章荣. 用 RAPD 标记检测鹅掌楸属种间杂交的花粉污染. 植物学报, 2001, 43: 1271–1274
- 23 孙亚光. 利用 SSR 分子标记检测鹅掌楸属树种交配格局与基因流. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2007
- 24 Xu M, Sun Y, Li H. EST-SSRs development and paternity analysis for *Liriodendron* spp. New Forest, 2010, 40: 361–382
- 25 冯源恒, 李火根, 王龙强, 等. 鹅掌楸属树种繁殖性能的遗传分析. 林业科学, 2011, 47: 43–49
- 26 黄双全, 郭友好, 陈家宽, 等. 用 RAPD 方法初探鹅掌楸的花粉流. 科学通报, 1998, 43: 1517–1519
- 27 潘文婷, 姚俊修, 李火根. 鹅掌楸属树种自交衰退的 SSR 分析. 林业科学, 2014, 50: 32–38
- 28 李周岐, 王章荣. 鹅掌楸属种间杂种苗期生长性状的遗传变异与优良遗传型选择. 西南林学院学报, 2001, 16: 5–9
- 29 王晓阳, 李火根. 鹅掌楸苗期生长杂种优势的 SSR 分析. 林业科学, 2011, 47: 57–62
- 30 李周岐. 鹅掌楸属种间杂种优势的研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2000
- 31 姚俊修. 鹅掌楸杂种优势分子机理研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2013
- 32 朱其卫, 李火根. 鹅掌楸不同交配组合子代遗传多样性分析. 遗传, 2010, 32: 183–188
- 33 刘乐承, 董德坤, 曹家树. 作物杂种优势机理研究进展. 湖北农业科学, 2007, 46: 645–650
- 34 Albert V A, Soltis D E, Carlson J E, et al. Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. BMC Plant Biol, 2005, 5: 5
- 35 Liang H, Carlson J E, Leebens-Mack J H, et al. An EST database for *Liriodendron tulipifera* L. floral buds: the first EST resource for functional and comparative genomics in *Liriodendron*. Tree Genet Genomes, 2008, 4: 419–433
- 36 Liang H, Ayyampalayam S, Wickett N, et al. Generation of a large-scale genomic resource for functional and comparative genomics in *Liriodendron tulipifera* L. Tree Genet Genomes, 2011, 7: 941–954
- 37 Jin H, Do J, Moon D, et al. EST analysis of functional genes associated with cell wall biosynthesis and modification in the secondary xylem of the yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) stem during early stage of tension wood formation. Planta, 2011, 234: 959–977
- 38 余发新. 杂种马褂木生根性状遗传变异及相关基因筛选. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2011
- 39 Yang Y, Xu M, Luo Q, et al. De novo transcriptome analysis of *Liriodendron chinense* petals and leaves by Illumina sequencing. Gene, 2014, 534: 155–162
- 40 Li T, Chen J, Qiu S, et al. Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. PLoS One, 2012, 7: e43451
- 41 Wang K, Li M, Gao F, et al. Identification of conserved and novel microRNAs from *Liriodendron chinense* floral tissues. PLoS One, 2012, 7: e44696
- 42 Li M, Wang K, Wang X, et al. Morphological and proteomic analysis reveal the role of pistil under pollination in *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. PLoS One, 2014, 9: e99970
- 43 Zhen Y, Li C, Chen J, et al. Proteomics of embryogenic and non-embryogenic calli of a *Liriodendron* hybrid. Acta Physiol Plant, 2015, 37: 211
- 44 Liang H, Carlson J E, Leebens-Mack J H, et al. An EST database for *Liriodendron tulipifera* L. floral buds: the first EST resource for functional and comparative genomics in *Liriodendron*. Tree Genet Genomes, 2007, 4: 419–433
- 45 Xu Y, Thammanagowda S, Thomas T P, et al. *LtuCAD1* is a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase ortholog involved in lignin biosynthesis in *Liriodendron tulipifera* L., a basal angiosperm timber species. Plant Mol Biol Report, 2013, 31: 1089–1099
- 46 LaFayette P R, Eriksson K-E L, Dean J F. Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). Plant Mol Biol, 1999, 40: 23–35
- 47 Hoopes J T, Dean J F. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. Plant Physiol Biochem, 2004, 42: 27–33
- 48 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究. 林业科学, 2003, 39: 49–53

- 49 魏丕伟. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生标志基因克隆及表达分析. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2009
- 50 罗群凤. 鹅掌楸属基因进化差异研究——基于 *Chs*、*Adh* 序列证据. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2013
- 51 Liang H, Barakat A, Schlarbaum S E, et al. Comparison of gene order of *GIGANTEA* loci in yellow-poplar, monocots, and eudicots. *Genome*, 2010, 53: 533–544
- 52 Wilde H D, Meagher R B, Merkle S A. Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. *Plant Physiol*, 1992, 98: 114–120
- 53 Rugh C, Senecoff J, Meagher R, et al. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 925–928
- 54 吕伟光. 鹅掌楸属内种间体细胞原生质体融合研究. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学, 2010
- 55 陈志, 陈金慧, 李婷婷, 等. 杂交鹅掌楸转双价抗病基因影响因子研究. *分子植物育种*, 2007, 5: 588–592
- 56 董琛, 施季森, 陆叶, 等. 聚乙二醇介导鹅掌楸悬浮细胞与 CdSe/ZnS 量子点纳米颗粒共孵育的互作特征. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 494–501
- 57 Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 57–63
- 58 Bhargava A, Clabaugh I, To J P, et al. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 162: 272–294
- 59 Loraine A E, McCormick S, Estrada A, et al. RNA-seq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1092–1109
- 60 Magbanua Z V, Arick M 2nd, Buza T, et al. Transcriptomic dissection of the rice-*Burkholderia glumae* interaction. *BMC Genomics*, 2014, 15: 755
- 61 Xu R, Zhang S, Huang J, et al. Genome-wide comparative in silico analysis of the RNA helicase gene family in *Zea mays* and *Glycine max*: a comparison with *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *PLoS One*, 2013, 8: e78982
- 62 Kakumanu A, Ambavaram M M, Klumas C, et al. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq. *Plant Physiol*, 2012, 160: 846–867
- 63 Liu X, Xu X, Li B, et al. RNA-Seq transcriptome analysis of maize inbred carrying nicosulfuron-tolerant and nicosulfuron-susceptible alleles. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 5975–5989
- 64 Zhang W, Chu Y, Ding C, et al. Transcriptome sequencing of transgenic poplar (*Populus x euramericana* “Guariento”) expressing multiple resistance genes. *BMC genet*, 2014, 15 Suppl 1: S7
- 65 Mizrahi E, Hefer C A, Ranik M, et al. *De novo* assembled expressed gene catalog of a fast-growing *Eucalyptus* tree produced by Illumina mRNA-Seq. *BMC genomics*, 2010, 11: 681
- 66 尤录祥, 樊汝汶, 邹觉新. 人工辅助授粉对鹅掌楸结籽率的影响. *江苏林业科技*, 1995, 22: 12–14
- 67 方炎明, 尤录祥, 樊汝汶. 中国鹅掌楸天然群体与人工群体的生育力. *植物资源与环境*, 1994, 3: 9–13
- 68 李彦强, 高柱, 孙小艳, 等. 淹水胁迫下北美鹅掌楸幼苗形态和生长的响应. *西南林业大学学报*, 2015, 35: 8–13

Research Advances in Molecular Biology of *Liriodendron*

ZHONG YongDa, HU Miao & YU FaXin

*Jiangxi Key Laboratory of Horticultural Plant Genetic and Improvement, Institute of Biology and Resources, Jiangxi Academy of Sciences,
Nanchang 330096, China*

Liriodendron spp., a relic species of the Tertiary, is one of the most important afforestation and ornamental trees. *Liriodendron* research has scientific significance as well as great economic and ecological benefits. However, research in molecular biology of *Liriodendron* has advanced slowly. This review summarizes the research progress in molecular biology of *Liriodendron* from aspects of molecular markers, transcriptomics, proteinomics, gene clone and transgenesis. The problems to be solved are proposed and discussed for accelerating the application of molecular biological technologies in *Liriodendron* and other tree species.

***Liriodendron*, molecular marker, omics, transgenesis, genome**

doi: 10.1360/N052015-00292