

用 AFLP 标记构建白桦遗传连锁图谱

吕澈妍, 周博如, 王雷, 吴丽丽, 姜廷波*

东北林业大学, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 用 AFLP 的方法分析中国白桦 × 欧洲白桦的 78 个 F_1 个体, 并按照拟测交作图策略, 建立了中国白桦和欧洲白桦遗传连锁图谱。从群体的 45 对引物组合中分离出 343 个分离位点, χ^2 检验表明, 其中有 311 个符合 1:1 拟测交分离位点。在这些位点中 168 个来自中国白桦, 143 个来自欧洲白桦。软件分析表明, 中国白桦的 168 个位点构成 9 个连锁群, 11 个三联体和 14 个连锁对, 55 个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总距离为 1 909.2 cM, 平均图距为 16.9 cM; 来自欧洲白桦的 143 个位点构成 12 个连锁群, 4 个三联体和 9 个连锁对, 21 个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总距离为 1 857.3 cM, 平均图距为 15.2 cM。

关键词: AFLP; 遗传连锁图谱; 中国白桦; 欧洲白桦

Construction of Genetic Linkage Maps of Silver Birch Based on AFLP Markers

LÜ Che-Yan, ZHOU Bo-Ru, WANG Lei, WU Li-Li, JIANG Ting-Bo*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Based on the inheritance and segregation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, the first middensity linkage map for silver birch was constructed by using a pseudotestcross mapping strategy. A segregating population including 78 progenies from the cross between *Betula platyphylla* and *B. pendula* was obtained. 45 primer pair combinations were selected to generate AFLP markers within a sample of 78 F_1 progenies and 343 segregating sites were identified. Among the identified sites, 311 segregating sites belonged to 1:1 segregating site including 143 sites for *B. pendula* and 168 sites for *B. platyphylla*. The resulting linkage maps were consisted of 168 marker sites in 9 groups, 11 triples, 14 pairs and 55 mon-linkage sites for *B. platyphylla*, which covered the map distance about 1 909.2 cM (Kosambi units). The average map distance between adjacent markers was 16.9 cM. 143 linked marker-sites of *B. pendula* were mapped onto 12 groups, 4 triples, 9 pairs and 21 mon-linkage sites, which covered the map distance about 1 857.3 cM. The average map distance between adjacent markers was 15.2 cM.

Key words: amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic linkage map; *Betula pendula* Roth; *Betula platyphylla* Suk

扩增的限制性内切酶片段长度的多态性标记 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一种分子标记技术, 它是限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 两项技术的结合, 它综合了这两个标记的优点, 方便、快捷、稳定而可靠 (张镛和丁毅 2007; Liang 等 2007), 而且 DNA 的用量少, 稳定性高, 重复性好, 多态性丰富 (王婷等 2008)。这项技术已在许多领域中广泛应用, 如农作物品种鉴定、基因定位和遗传连锁图谱的构建等。AFLP 技术在多种植物的研究中, 如美洲黑杨 (Wu 等 2000) 和火炬松 (Remington 1999)

中也有应用, 但用于树木中白桦研究的报道还比较少。因此我们用此技术初步分析和构建了白桦的遗传连锁图谱。

材料与方法

母本为中国白桦 (*Betula platyphylla* Suk), 来自中国帽儿山种源, 父本为欧洲白桦 (*Betula pendula* Roth), 来自芬兰种源。两个亲本的选择和人工授粉在本校白桦强化育种园内进行。RAPD 标记检

收稿 2009-04-27 修定 2009-06-19

资助 黑龙江省重点科技攻关项目 (GB06B303-5)。

* 通讯作者 (E-mail: 634728407@qq.com; Tel: 0451-82190607)。

测表明, 两亲本间存在较高的遗传多态性。2005年4月中旬控制授粉, 8月上旬采集成熟果穗, 次年5月播种育苗, 共获得400株生长发育正常的个体, 随机挑选出78个个体作为待测植株。

分离DNA采用CTAB法与试剂盒相结合的方法, 即先将研磨碎的叶片用2×CTAB高盐溶液洗涤, 以去除多糖, 然后结合Universal Genomic DNA Extraction Kit (Ver.3.0, TaKaRa, Dalian)试剂盒的膜技术提高DNA的提取质量。用模板准备试剂盒(Template Preparation Kit, LincoIn, Nebraka, USA)制备预扩增模板: 酶切反应体积为12.5 μL, 含有100 ng基因组DNA, 限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI* 各1.25 U, 在37 °C条件下消化2 h; 75 °C加热15 min后转移至冰块中, 加入25 μL接头和T4 DNA连接酶混合液, 20 °C下保温连接2 h; 用具有一个选择性碱基的引物对连接产物进行预扩增。预扩增程序为: 94 °C变性30 s, 56 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 20个循环。选择性扩增用AFLP选择扩增试剂盒(AFLP Selective Amplification Kit, LincoIn, Nebraka, USA)进行。以稀释10~20倍的预扩增产物为模板, 用700 nm红外染料标记的含3个选择性碱基的选择性扩增引物进行选择扩增。扩增程序为: 第一次循环为94 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 随后每次循环退火温度降低0.7 °C, 共12个循环; 以后继续23个循环: 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min; 72 °C延伸7 min。预、选择性扩增均以ABI 9700型PCR仪进行。选择性扩增产物加入2.5 μL的凝胶加样缓冲液混匀, 94 °C变性3 min, 然后迅速置于冰块中, 取1 μL, 用7%的标准测序胶, 凝胶电泳和数据分析均用LI-COR 4300 DNA分析系统。电泳结束后图像信息均可自动保存, 或直接读取多态性数据。先用2个亲本的DNA为模板, 从64个引物对中筛选出45对存在双亲间的多态性的引物组合, 然后用这些多态性引物组合检测杂种分离群体。

电泳结束后, 图像会自动保存在电脑中, 78个模板DNA分2次运行。图像保存后, 可在电脑上读取多态性条带, 有条带的记为1, 没有条带的记为0, 模糊不清的记为“-”。这些数据输入Excel表上, 再根据孟德尔定律检验 χ^2 ($\chi^2_{0.05(1)}=3.84$), 确定分离类型。大于3.84的去掉, 小于3.84的保留。保留下的数据再进行分析, 将数据中的1替换为A,

0替换为H, “-”不替换。用软件MAPMAKER/EXP (Version 3.0b) (Lander等1987)确定连锁群体, 然后用Kosambi函数将重组率转换成图距单位(centimorgan, cM) (Kosambi 1944), 再用Map Draw Ver. 2.0绘制图谱(刘仁虎和孟金陵2003)。

本文中用的LI-COR 4300 DNA电泳仪通过红外荧光检测技术分析AFLP标记, 仪器运行结束后, 电泳图像会自动保存在电脑中, 可直接读取多态性条带, 既减少了染色和暴光等步骤, 又减少了污染, 从而大大提高了实验效率。

结果与讨论

1 AFLP引物组合的扩增

从图1和表1可见, 45对引物组合在2个白桦亲本中共扩增出2 729个位点。不同引物对的扩增效果有很大差异, M-CAA/E-ACA的扩增位点最丰富, 引物组合M-CTA/E-AGG和M-CTC/E-AAC扩增效果最差, 45对引物的平均扩增位点为61个。多态性位点数不同的引物组合其扩增效果的差异也很大, 与E-ACA或M-CAA组合的引物扩增效果最好, 这2个引物产生的多态性位点分别是62个和51个; 而与E-ACG组合的较差, 其多态性位点为17个。

2 连锁图谱的构建

在中国白桦和欧洲白桦扩增出的2 729个位点中(表1), 两个亲本和不同的杂种个体所扩增出的多态性分离位点为343个, 占扩增位点总数的12.6%。 χ^2 检验($\chi^2_{0.05(1)}=3.84$)表明, 分离位点符合拟测交1:1分离的位点为311个, 占分离位点的90.7%。按照拟测交作图策略, 符合1:1分离的多态位点, 据此认为可用于白桦分子标记连锁图谱的构建。中国白桦的168个标记构成9个连锁群(4个以上标记)、11个三连体和14个连锁对, 55个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总图距为1 909.2 cM, 平均图距为16.9 cM(图2)。而欧洲白桦的143个连锁标记构成12个不同的连锁群(4个以上标记)、4个三连体和9个连锁对, 21个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总图距为1 857.3 cM(图3), 平均图距为15.2 cM。

由于白桦叶片中含有大量的糖分, 常常影响DNA的分离, 因此能否提取到高质量的白桦基因组DNA是十分关键的一步。用传统的DNA提取方

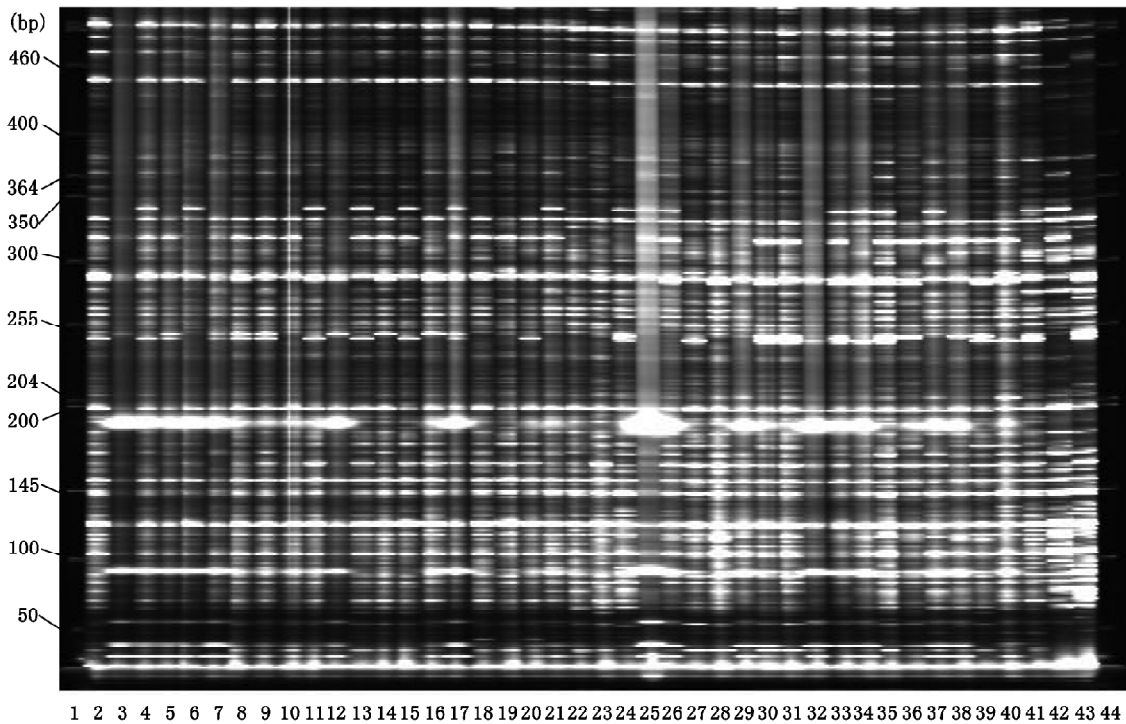
图1 白桦 F_1 群体中引物 M-CTG/E-ACG 组合中 AFLP 标记的分离

Fig.1 Segregation of AFLP markers amplified with primer M-CTG/ E-ACG in the F_1 families of silver birch
泳道1 和 44 为分子量标记; 泳道2 为中国白桦; 泳道3 为欧洲白桦; 泳道4~43 为中国白桦和欧洲白桦的杂种 F_1 代个体。

表1 白桦中 AFLP 引物组合的筛选

Table 1 The selection of primer combinations of AFLP for silver birch

引物名称(代码)	E-AGG (E1)	E-ACA (E2)	E-AAC (E3)	E-AAG (E4)	E-AGC (E5)	E-ACT (E6)	E-ACG (E7)	E-ACC (E8)	合计
M-CTC (M1)	6 (49)	-	6 (37)	15 (53)	-	12 (55)	-	-	39 (194)
M-CAC (M2)	6 (60)	13 (57)	4 (57)	4 (48)	7 (59)	7 (44)	4 (56)	4 (79)	49 (460)
M-CTA (M3)	5 (37)	7 (67)	6 (39)	8 (58)	-	10 (46)	-	-	36 (247)
M-CTG (M4)	-	7 (58)	-	5 (45)	5 (66)	13 (45)	8 (75)	9 (61)	47 (350)
M-CAG (M5)	7 (84)	-	2 (62)	7 (57)	2 (62)	7 (53)	5 (54)	7 (60)	37 (432)
M-CTT (M6)	6 (47)	11 (48)	-	14 (72)	-	-	-	12 (87)	43 (254)
M-CAT (M7)	9 (44)	13 (82)	10 (55)	-	5 (67)	4 (81)	-	-	41 (329)
M-CAA (M8)	-	11 (94)	15 (84)	4 (73)	11 (86)	6 (52)	-	4 (74)	51 (463)
合计	39 (321)	62 (406)	43 (334)	57 (406)	30 (340)	59 (376)	17 (185)	36 (361)	343 (2 729)

表中的数字为白桦双亲中扩增出的多态性片段的引物组合数, 括弧中为扩增片段总数。

法, 根本无法分离出白桦叶片基因组DNA, 这样就会影响酶切反应、接头连接、预扩增和选择性扩增等一系列 PCR 反应的效果。为此我们用 CTAB 法与试剂盒相结合的方法, 提取出的 DNA 纯度较高, 质量较好, 符合实验的要求。还有, 图谱的构件常直接依赖于数据分析, 数据分析不准确, 图谱的构建会出现偏差。所以读取多态性条带时, 条带

有时不十分清晰, 这样会导致读取的偏差, 从而影响作图结果。更有在读取多态性条带时, 常出现许多的“-”, 即不清楚的条带, 这种情况的出现可能有 3 种原因: ①提取的白桦个体 DNA 含有杂质, 纯度不够, 从而影响 PCR 反应的结果; ②选择性扩增时, 加入的模板 DNA 量过少, 没有发生反应; ③模板长期冻溶, 会导致降解失效。

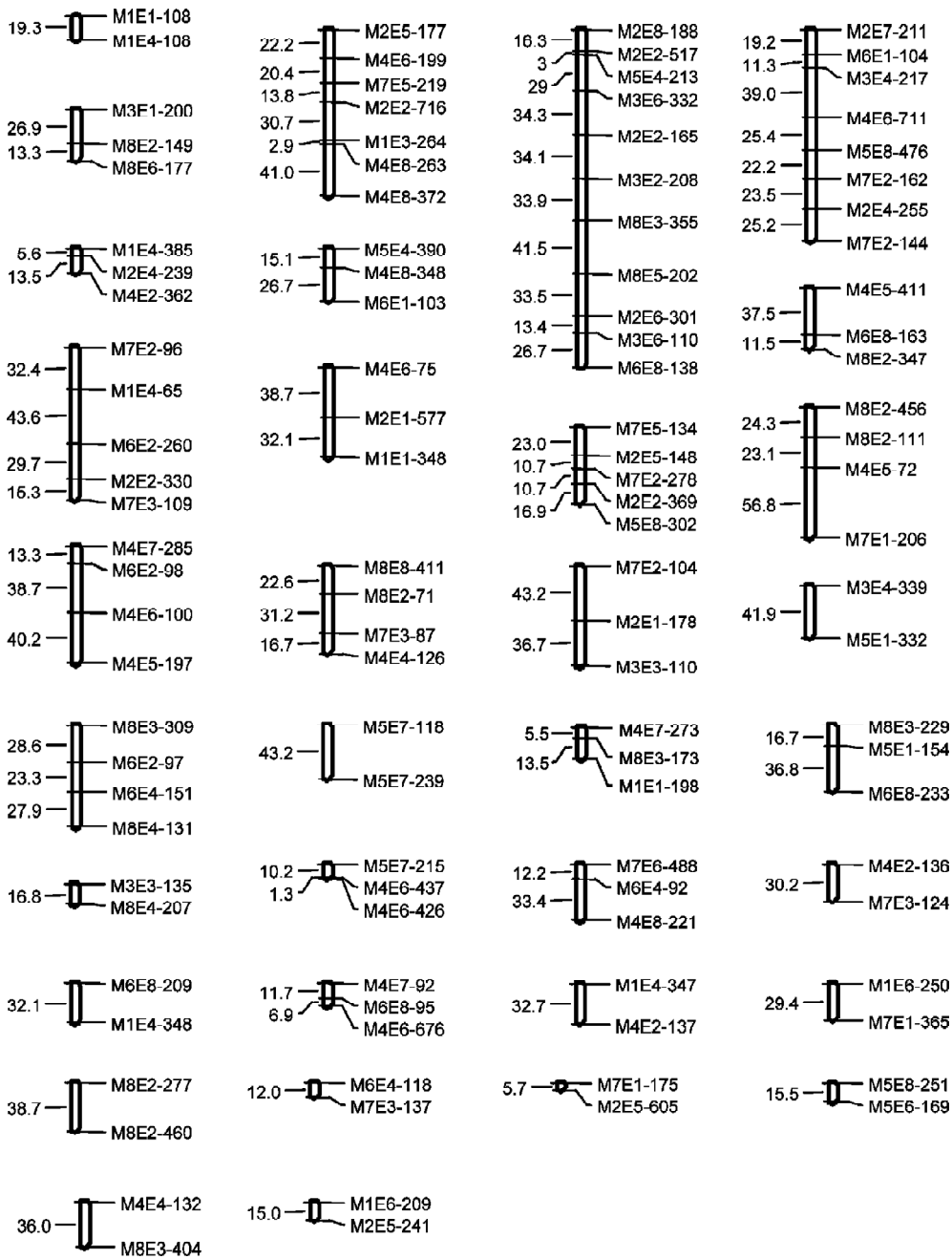


图2 中国白桦中 AFLP 标记的连锁图谱
 Fig.2 The AFLP linkage maps of *Betula platyphylla*
 右侧为分子标记名称, 左侧为遗传距离(cM)。

RAPD和AFLP分子标记技术已广泛用于林木遗传图谱的构建。但RAPD和AFLP标记在林木杂种F₁中普遍发生偏分离和异常分离(李绍臣等2008)。本文结果表明AFLP标记在F₁杂种中必有偏分离和异常分离现象。偏分离的原因有多种,作图群体小可能是造成偏分离现象发生的原因之一。偏分离位点能否用于作图,还不清楚。早期的遗传

图谱大多将偏分离位点用于遗传图谱的构建(Bradshaw和Stettler 1994; Grattapaglia和Sederoff 1994; 苏晓华等1998)。但是偏分离位点会影响作图的准确性,以致作图出现偏差。本文按照拟测交策略,由于分析软件的限制,未曾用3:1,而仅以符合1:1分离的位点用于连锁分析。到目前为止,白桦密度最高的遗传连锁图谱是姜廷波等发表的用

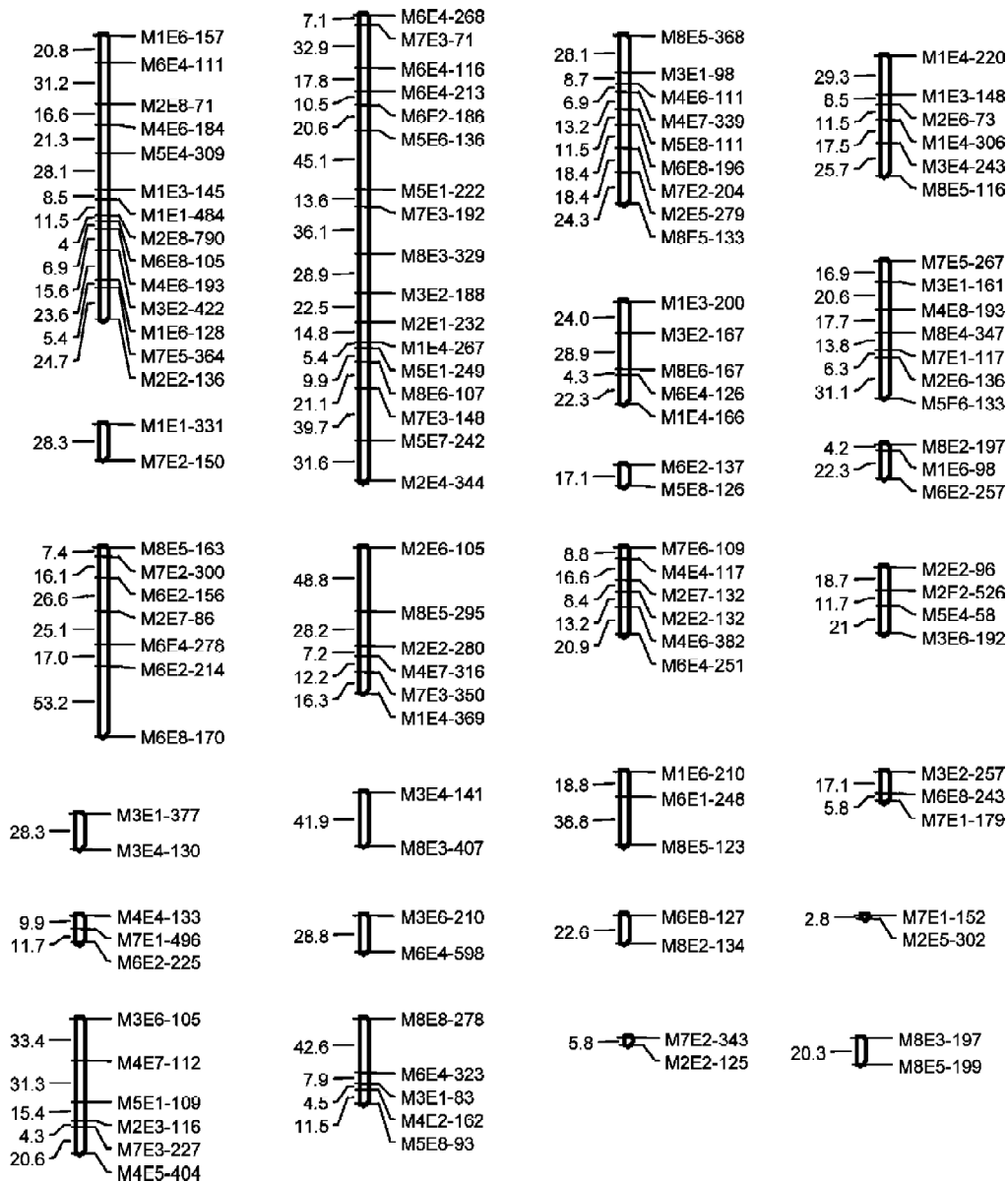


图3 欧洲白桦中 AFLP 标记的连锁图谱

Fig.3 The AFLP linkage maps of *Betula pendula*

右侧为分子标记名称, 左侧为遗传距离(cM)。

RAPD 分子标记技术构建的白桦遗传连锁图谱 (Jiang 等 2007)。本文在 2 个白桦亲本及杂种群体中检测到 343 个多态性分离位点, 其中 311 个符合 1:1 分离。如果将该图谱与之前来自不同群体的 RAPD 遗传连锁图谱加以整合, 就会在很大程度上提高白桦遗传连锁图谱的密度。

参考文献

李绍臣, 高福玲, 姜廷波(2008). 基于 RAPD 标记的白桦遗传连锁群分析. 林业科学, 44 (5): 155~159

刘仁虎, 孟金陵(2003). MapDraw: 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏. 遗传, 25 (3): 317~321
 苏晓华, 张绮纹, 郑先武, 张香华, Harris SA (1998). 美洲黑杨 (*Populus deltoides* Marsh)×青杨(*P. cathayana* Rehd.)分子连锁图谱的构建. 林业科学, 34 (6): 29~37
 王婷, 李爱贤, 鞠建峰, 周凤琴(2008). AFLP 分子标记技术及其在药用植物研究中的应用. 齐鲁药事, 27 (1): 32~34
 张镛, 丁毅(2007). 基于 AFLP 标记的中国西藏近缘野生大麦遗传多样性分析. 遗传, 29 (6): 725~730
 Bradshaw Jr HD, Stettler RF (1994). Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II: Segregation distortion due to genetic load. Theor Appl Genet, 89: 551~558

- Grattapaglia D, Sederoff R (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137: 1121~1137
- Jiang TB, Li SC, Gao FL, Ding BJ, Qu YJ, Tang XH, Liu GF, Jiang J, Yang CP (2007). Genetic linkage map of *Betula pendula* Roth and *Betula platyphylla* Suk based on random amplified polymorphisms DNA markers. *Hereditas*, 29 (7): 867~873
- Kosambi DD (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen*, 12: 172~175
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg LA (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1 (2): 174~181
- Liang Y, Diao YR, Liu GS, Liu J (2007). AFLP variations within and among natural populations of *Leymus chinensis* in the northeast of China. *Acta Pratacul Turae Sin*, 16 (2): 124~134
- Remington DL, Whetten RW, Liu BH, O'Malley DM (1999). Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theor Appl Genet*, 98: 1279~1292
- Wu RL, Han YF, Hu JJ, Fang JJ, Li L, Li ML, Zeng ZB (2000). An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet*, 100: 1249~1256