

文章编号:1001-1498(2004)03-0291-09

利用 AFLP 和 SSR 标记构建 美洲黑杨 × 青杨遗传图谱

黄秦军, 苏晓华^{* *}, 张香华

(中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:以美洲黑杨 × 青杨 F_2 代为作图群体, 利用 AFLP 和 SSR 标记技术构建分子连锁图谱。连锁图共有 19 个较大的连锁群, 16 个二联体 (Doublets), 7 个三联体 (Triplets) 和 5 个较小的连锁群。19 个较大的连锁群上包括 356 个 AFLP 标记和 12 个 SSR 标记, 总图距为 3 382.4 cM, 标记间的平均间距为 9.69 cM。估计基因组长度为 2 607 ~ 3 319 cM, 平均为 3 042 cM, 同时采用 Lander 和 Bishop 的方法计算期望基因组覆盖度, 平均值分别为 96.7% 和 98.4%。

关键词:美洲黑杨 × 青杨; AFLP; SSR; 遗传图谱

中图分类号: S792.11 **文献标识码:** A

建立生物详尽的遗传连锁图一直是遗传学家和育种者们研究的目标, 是对基因组进行系统研究的基础, 也是标记辅助选择和利用基因重组来加速育种的一个强有力的工具, 为目的基因的分离、检测及利用提供了基础。本研究利用 AFLP 和 SSR 分子标记技术构建美洲黑杨 × 青杨杂种遗传连锁图谱, 为其遗传改良研究工作提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 研究材料

1973 年, 以美洲黑杨 (*Populus deltoides* Bartr.) 为母本, 青杨 (*P. cathayana* Rehd.) 为父本杂交产生 F_1 代杂种。1996 年, 利用 F_1 中的中黑防 3 号 ZHF3 () 与中黑防 1 号 ZHF1 () 杂交产生 F_2 , 建立了美洲黑杨 × 青杨 F_2 群体。亲本及其 F_1 代 4 个个体和 F_2 代近 200 个个体均种植于中国林业科学研究院 (北京) 苗圃内, 取 87 个 F_2 代、4 个 F_1 代以及亲本共 91 个单株为作图群体。

1.2 基因组 DNA 提取

采用常规的 CTAB 法提取样品总 DNA, 将 DNA 样品用 0.8% 的琼脂糖胶检测质量, 并挑选几个有代表性的样品在紫外分光光度计上测定浓度。最后把 DNA 浓度调整到大约为 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.3 AFLP 和 SSR 分析与检测

AFLP 分析采用美国生命技术公司 (Life Technologies, Inc.) 的 AFLP 分析系统 试剂盒。具

收稿日期: 2004-01-12

基金项目: 国家“973”项目 (G199901600004) 和“863”课题 (2002AA241071) 资助

作者简介: 黄秦军 (1971—), 男, 云南昭通人, 助理研究员, 博士。

* * 通讯作者: Email: Suxh@caf.ac.cn

体操作步骤按照分析系统 使用说明进行,并略有修改(增加选择性扩增的循环数到 35)。经变性胶聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用银染方法显带。

SSR 的引物序列、名称来自于 PMGC 数据库。扩增反应体系总体积为 25 μL (其中 dNTPs 0.2 mM;前后引物 0.2 μM ;模板 DNA 50 ng;Taq 酶 1 unit)。反应程序:94 预变性 5 min,然后进入循环:94 30 s,60 30 s,72 1 min,40 个循环。3%的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色。

1.4 分子标记数据的收集与处理

当获得电泳分离谱带后,须将电泳谱带数值化,以便于利用计算机和相关的遗传分析软件进行遗传连锁分析。AFLP 标记为显性标记,一般数据记录用 1 来表示带的存在,用 0 来表示带不存在。SSR 标记属于共显性标记,两个亲本各有 1 条带,而 F_2 群体中存在三种带型,分别赋值为 A、B 和 H。对于谱带模糊不清或由于其他原因造成的数据缺失,赋值为 3。

1.5 连锁分析与图谱构建

图谱构建分析所用软件为 MAPMAKER 3.0^[1]。本研究在 LOD 3.0, r (重组率) 0.4 的情况下进行连锁群估计。对已确定顺序的连锁群,采用 Kosambi 函数,将重组率转换成图距单位 (centiMorgan, cM),最后用 Genemap 软件绘图。

1.6 基因组长度和图谱覆盖度估计

估计基因组长度^[2]:

$$G_e = N(N-1)X/K \quad \text{置信区间}^{[3]}: I_{0.05}(G) = G_e(1 \pm 1.96/K)$$

期望基因组覆盖度^[4,5]:

$$C_{el} = 1 - e^{-XN/1.25G_e}$$

$$C_{eb} = 1 - \left[\frac{2R}{N+1} \left(\left(1 - \frac{X}{2G_e} \right)^{N+1} - \left(1 - \frac{X}{G_e} \right)^{N+1} \right) + \left(1 - \frac{RX}{G_e} \right) \left(1 - \frac{X}{G_e} \right)^N \right]$$

N 为遗传连锁图上的标记数量, X 为在固定的 LOD 值条件下观察到的最大标记间距, K 为在同一 LOD 值条件下观察到的标记对数, R 则为该物种单倍体的染色体数目。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

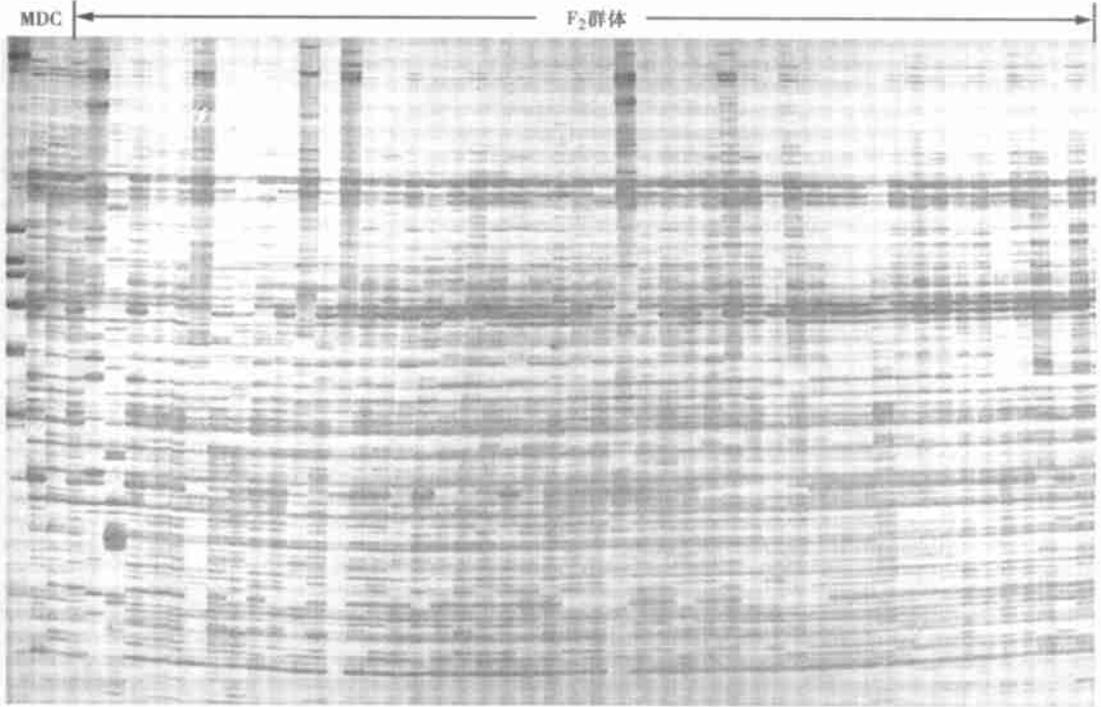
利用双亲和 F_1 代的 4 个单株进行 64 对 AFLP 引物筛选的结果表明:所有的引物组合均能得到 PCR 扩增产物,有 41 对引物组合的 PCR 扩增片段分布均匀、电泳检测清楚,多态性好,且多态性条带在 5 条以上,比较适合于美洲黑杨 \times 青杨杂种遗传图谱构建(图 1)。

在 132 对 SSR 引物中有 38 对引物没有扩增产物,有 94 对引物有 PCR 扩增产物,但在两亲本间表现出差异引物只有 76 对(图 2),表明 SSR 引物在杨属中具有一定的特异性和保守性。

2.2 标记多态性分析与分离检测

在筛选出的 41 对 AFLP 引物组合中一共检测到 AFLP 多态标记 873 个,平均每对引物组合产生多态标记 21.3 个。标记片段大小范围为 42~989 bp,平均片段长度为 227.4 bp。² 检验 ($\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$) 结果表明,在 873 个 AFLP 多态标记中,符合孟德尔分离比例的标记有 784 个,偏分离标记 89 个,占 10.2%。有 76 对 SSR 引物在两亲本间有差异,但 SSR 标记是共显性标记,为满足作图软件的需求,只有某引物在两亲本间都只扩增出一条带且表现出差异时才作

为遗传图谱构建的分子标记,符合这样条件的引物有 39 对。² 检验 ($\chi^2_{0.05(2)} = 5.99$) 结果表明在 39 个多态标记中,符合孟德尔遗传分离比例的标记有 26 个。



注:引物:E36M48;M为标准 marker;D为母本美洲黑杨;C为父本青杨

图1 AFLP 标记在 F₂ 群体中的分离



注:引物:PMGC2675;M为标准 marker;D为母本美洲黑杨;C为父本青杨

图2 SSR/标记在 F₂ 群体中的分离

2.3 美洲黑杨 ×青杨遗传图谱构建

利用 87 个 F₂ 代单株,810 个标记进行美洲黑杨 ×青杨遗传图谱构建。在重组率 $r = 0.4$, LOD = 3.0 条件下对 810 个标记进行两点连锁分析,确定相关的连锁群。结果得到 16 个二联

体 (Doublets), 7 个三联体 (Triplets), 5 个较小的连锁群和 19 个较大的连锁群 (表 1, 图 3)。

表 1 美洲黑杨 × 青杨遗传图谱标记

连锁群	标记数	AHP 标记	SSR 标记	最大间距/cM	最小间距 /cM	总图距/cM	平均间距/cM
GROUP1	44	42	2	28.3	0.8	374.1	8.70
GROUP2	38	35	3	26.3	1.3	366.1	9.89
GROUP3	37	37		19.3	3.5	319.4	8.87
GROUP4	29	27	2	27.6	2.3	243.2	8.69
GROUP5	26	26		30.3	0.5	256.4	10.26
GROUP6	20	18	2	30.8	1.1	181.9	9.57
GROUP7	18	18		25.3	2.4	158.4	9.32
GROUP8	17	17		17.0	2.6	134.2	8.39
GROUP9	15	15		30.1	4.2	170.3	12.16
GROUP10	15	15		17.1	4.5	129.5	9.25
GROUP11	15	15		20.8	2.2	125	8.93
GROUP12	14	13	1	21.3	4.6	122.5	9.42
GROUP13	13	13		18.4	2.2	110.1	9.18
GROUP14	13	12	1	20.0	4.6	129.7	10.81
GROUP15	13	13		15.9	3.7	113.4	9.45
GROUP16	12	11	1	29.0	5.3	143.4	13.04
GROUP17	11	11		39.2	0.8	119.6	11.96
GROUP18	10	10		30.2	4.9	117.6	13.07
GROUP19	8	8		13.7	3.9	67.6	9.66
总计	368	356	12			3 382.4	
平均	19.37						9.69

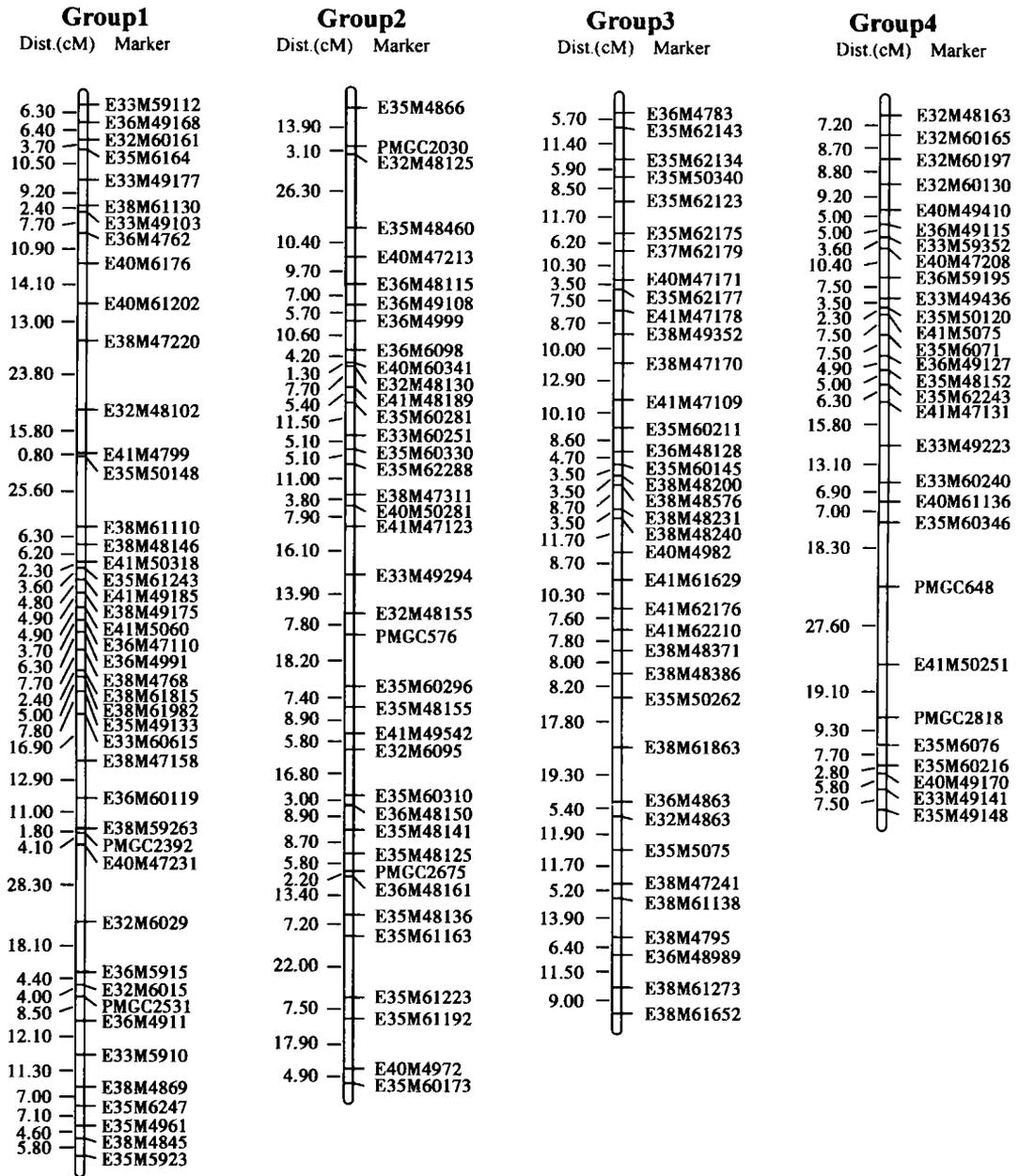
19 个主要连锁群上标记数最少为 8 个, 最多为 44 个; 连锁群按标记从多到少排序, 并分别命名为 Group1- Group19。19 个主要连锁群上共有 368 个标记, 包括 356 个 AHP 标记和 12 个 SSR 标记。这 19 个连锁群中图距最大的是 Group1, 图距为 374.1 cM, 最小的是 Group19, 图距为 67.6 cM; 框架图总图距为 3 382.4 cM。遗传图谱上最大标记间距为 39.2 cM, 最小标记间距为 0.5 cM, 平均标记间距为 9.69 cM。

2.4 基因组长度预测和图谱覆盖度估计

在 LOD 值分别为 3、4、5 的条件下美洲黑杨 × 青杨估计基因组长度为 3 319、3 200、2 607 cM, 平均为 3 042 cM (表 2)。期望基因组覆盖度同时采用 Lander 和 Bishop 的方法计算, 两种方法在不同 LOD 值下计算的期望基因组覆盖度均在 96% 以上, 平均值分别为 96.7% 和 98.4%。结果表明, 该图谱比较完整地覆盖了美洲黑杨 × 青杨 F₂ 杂种的全基因组, 完全可应用于数量性状的定位研究以及标记辅助育种选择等研究领域。

表 2 基因组长度和图谱覆盖度

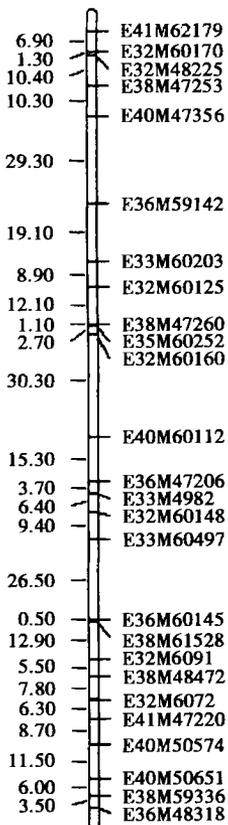
基因组情况	LOD 值			平均
	3.0	4.0	5.0	
估计基因组长度				
<i>N</i>	368	368	368	
<i>K</i>	1 973	1 749	1 558	1 760
<i>X</i> /cM	48.48	41.44	30.07	40.0
<i>G_e</i> /cM	3 319	3 200	2 607	3 042
置信区间/cM	3 319 ±146	3 200 ±150	2 607 ±129	
期望基因组覆盖度				
Lander 图谱覆盖度 (<i>C_{el}</i>) / %	96.6	97.3	96.3	96.7
Bishop 图谱覆盖度 (<i>C_{eb}</i>) / %	98	98.2	99	98.4



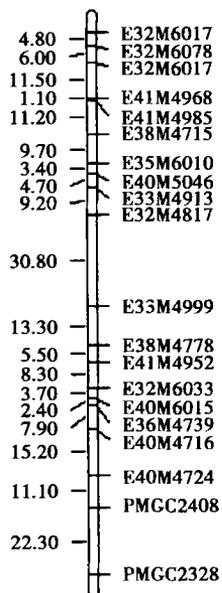
注: 左列为标记间距(cM), 右列中 PMGC 表示该标记为 SSR 标记, 其余为 AFLP 标记; AFLP 标记名称中的前 6 位代表引物组合, 第 6 位以后的数字表示该标记在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上的迁移率。

图 3a 美洲黑杨 × 青杨分子连锁图谱

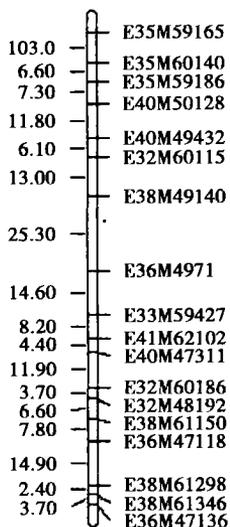
Group5
Dist.(cM) Marker



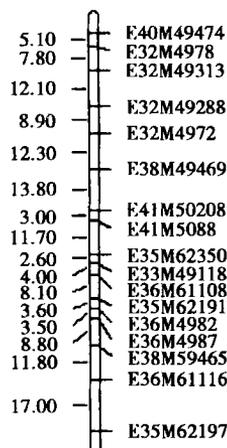
Group6
Dist.(cM) Marker



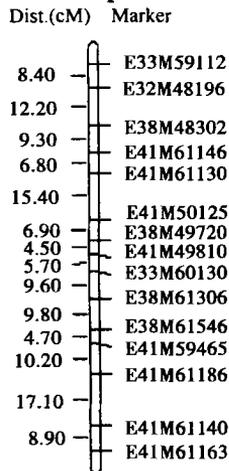
Group7
Dist.(cM) Marker



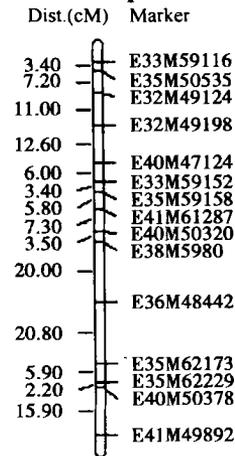
Group8
Dist.(cM) Marker



Group10
Dist.(cM) Marker



Group11
Dist.(cM) Marker



Group9
Dist.(cM) Marker

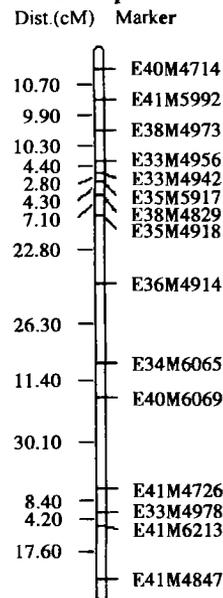


图 3b 美洲黑杨 × 青杨分子连锁图谱 (图注同 3a)

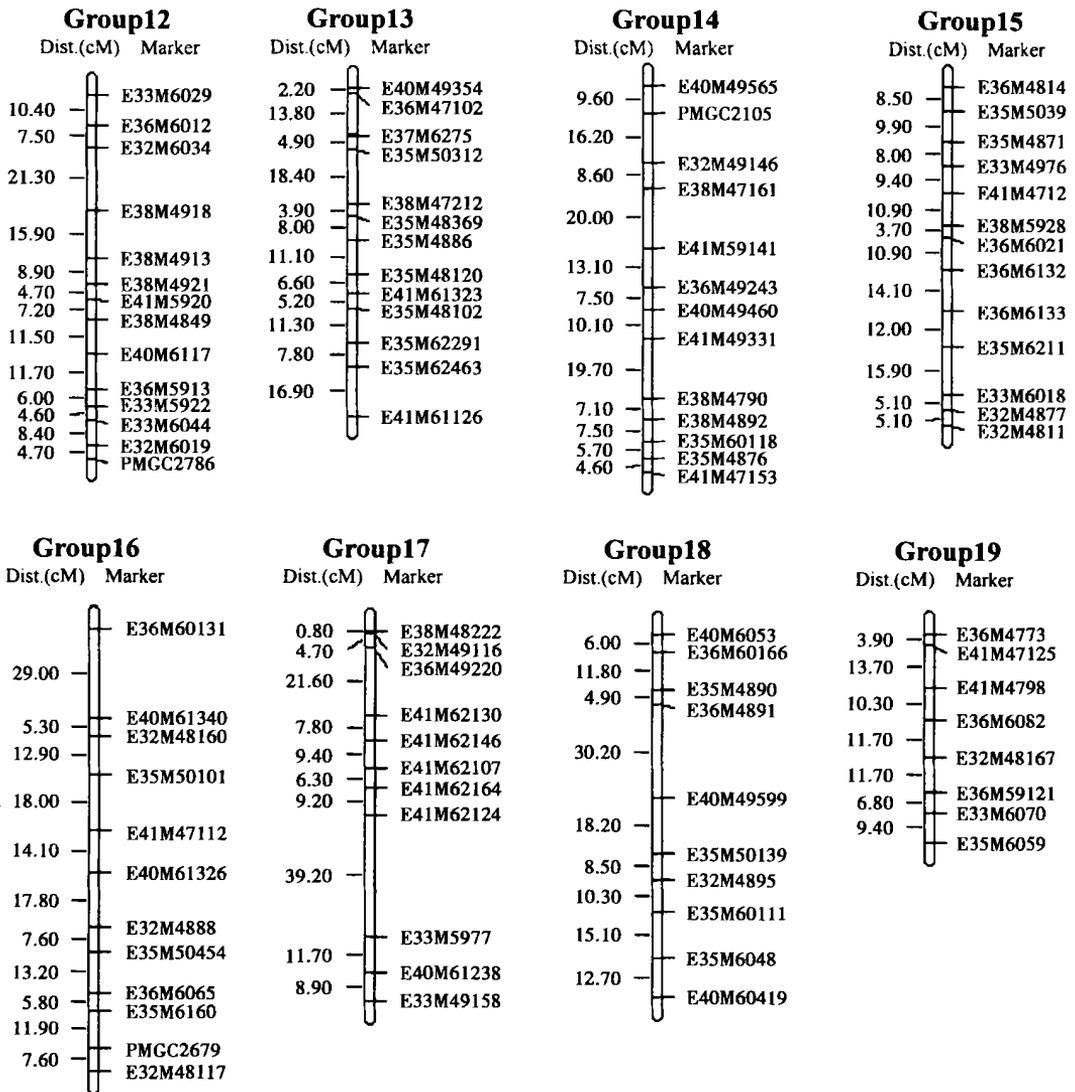


图 3c 美洲黑杨 × 青杨分子连锁图谱 (图注同 3a)

3 讨论

3.1 偏分离标记成因及其对连锁图的影响

在生物遗传图谱构建中,偏分离标记普遍存在。偏分离的原因目前有多种解释,主要是从试验误差、人为因素以及生物因素三方面着手。生物因素则包括染色体缺失、遗传分离机制、发育基因、隐性致死基因等。在本文中有 10.2% 的 AFLP 标记属于偏分离标记,而 SSR 偏分离标记有 33.3%,其主要原因为:首先亲本组合为派间杂交,其亲缘关系较远,由此产生的杂交

后代有可能出现非整倍体,从而造成偏分离;其次, F_2 群体生活力降低也可能是造成偏分离的原因之一。作图群体建于 1996 年,初始群体很大(大于 1 000 株),随后逐年减小(最后不到 100 株)。此外,AFLP 标记中也有不到 3%的共显性标记存在^[6],当无法确定某一片段是属于显性标记还是共显性标记时也将导致偏分离标记的出现。

是否将偏分离标记用于图谱构建,在林木和农作物构图中没有明确的限定。早期的遗传图谱大多使用偏分离标记进行遗传图谱构建^[7,8]。偏分离标记往往会使连锁的检验受到影响,一些本来不连锁的标记由于偏分离标记的存在可能会出现连锁现象,而一些本来连锁的标记由于偏分离标记的存在确无法检测到连锁^[9]。另外,偏分离标记的应用会导致连锁群上标记间的距离不真实^[10]。目前大部分研究者认为,在对影响偏分离的基础不了解的情况下尽量避免使用偏分离标记。

3.2 标记对连锁图的影响

AFLP 标记被认为是随机分布且能覆盖整个基因组^[11],但一些研究表明 AFLP 标记在遗传图谱上存在簇集现象^[12,13]。本文在 Group 3 上有 6 个 E38M48 引物组合标记,其中有 4 个标记紧密相连,E41M62 引物组合在 Group 17 上的 32.7 cM 的区间内有连续的 5 个标记,E41M61 引物组合 Group 10 上有 5 个标记,E35M48 引物组合在 Group 13 上的 42.2 cM 的区间有 4 个标记,E38M49 引物组合 Group 12 上有连续 3 个标记。除 Group 3 外,上述的连锁群标记数量均不超过 20。由此看出,AFLP 标记在连锁群上的分布并非是完全随机分布。在构建遗传图谱时要多选用不同种类标记,尽可能覆盖整个基因组,这样构建的连锁图谱才具有完整性和代表性,也才具有很高的实用价值。

国内外已经构建完成的杨树遗传图谱已经不下 20 张,目前,最缺乏的是对这些遗传图谱的综合利用,如能利用这些图谱进行基因组比较研究,以及将其整合成一张杨树通用遗传连锁图具有重要意义。要实现这样的目标,就必须利用 SSR、SNP、EST 和 ISH 等单拷贝位点的标记。本研究所构建的连锁图上共有 12 个 SSR 标记,分属于 7 个连锁群。其中 Group 4 上的一个 SSR 标记(PMGC684)也出现在 Bradshaw^[7]等 1994 年构建的毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. et Groy) × 美洲黑杨连锁群 M 中,意味着这两个连锁群都属于相同的染色体,也表明在图谱间共同标记较多时实现图谱整合是可行的。

随着林木遗传图谱构建研究的深入开展,超高密度遗传连锁图谱构建完成和对重要性状的精细定位,分子标记辅助林木早期选择和基于遗传图谱的图位克隆将会很快在林木中实现,林木遗传图谱在林木育种改良研究的重要地位更加突出,前景更为广阔。同时现代分子生物学技术与传统育种技术的有机结合、相互补充将极大地推动林木遗传改良进程的发展,提高林木育种效率,促进林业可持续发展。

参考文献:

- [1] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations[J]. *Genomics*, 1987, 1: 174 ~ 181
- [2] Hulbert S H, Iltot T W, Legg E T, et al. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphism[J]. *Genetics*, 1988, 120: 692 ~ 705
- [3] Gerber S, Rodolphe F. Estimation and test for linkage between markers: a comparison of lod score and χ^2 test in a linkage study of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 293 ~ 297

- [4] Lange K, Boehnke M. How many polymorphic genes will it take to span the human genome[J]. *AMJ Hum Genet*, 1982, 34: 842 ~ 845
- [5] Bishop D T, Cannings C, Skolnick M, et al. The number of polymorphic DNA clones required to map the human genome[A]. *Statistical analysis of DNA sequence data*[M]. New York:Springer Verlag Weir,BS,Editor,1983
- [6] Frewen B E, Chen T H H, Howe G T, et al. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus* [J]. *Genetics*, 2000,154:837 ~ 845
- [7] Bradshaw H D, Stettler R F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 167 ~ 178
- [8] 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: 1121 ~ 1137
- [9] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京:中国农业出版社, 1994. 64
- [10] Cervera M T, Storme V, Ivens B, et al. Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers[J]. *Genetics*, 2001, 158: 787 ~ 809
- [11] Bert P F, Charmet G, Sourdilli P, et al. A high density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99:445 ~ 452
- [12] Wu R L, Han Y F, Hu J J, et al. An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(8):1249 ~ 1256
- [13] 熊立仲, 王石平, 刘克德, 等. 微卫星 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分布[J]. *植物学报*, 1998, 40(7): 605 ~ 614

Genetic Linkage Mapping in F₂ Population of *Populus deltoides* × *P. cathayana* by Using AFLP and SSR Marker

HUANG Qirjun, SU Xiaohua, ZHANG Xianghua

(Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: Based on the techniques of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and microsatellite (SSR) marker, a hybrid molecular linkage map of *Populus deltoides* × *P. cathayana* was constructed. 19 major groups, 16 doublets, 7 triplets and 5 small groups were identified in this map. 356 AFLP makers and 12 SSR markers, total 368 makers, were ordered on the 19 major groups. This map covered 3 382.4 cM of genome length, and the average distance between two markers was 9.69 cM. The estimated genome length was between 2 607 cM and 3 319 cM and was 3 042 cM in average. The expected genome coverage was calculated and it was 96.7% with the equation of Lander, and it was 98.4% with method of Bishop et al.

Key Words: *Populus deltoides* × *P. cathayana*; AFLP; SSR; linkage map