

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00213

白桦 AFLP 遗传连锁图谱的构建

高福玲, 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: 以 80 个中国白桦(*Betula platyphylla* Suk)×欧洲白桦(*Betula pendula* Roth)的 F_1 个体为作图群体, 利用扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记, 按照拟测交作图策略, 分别构建了中国白桦和欧洲白桦的分子标记遗传连锁图谱。从 64 对 AFLP 引物组合中筛选出 34 对多态性丰富的引物组合, 这些入选的引物组合在分离群体中共检测到 451 个多态性位点。 χ^2 检验结果表明, 有 362 个位点符合 1:1 分离(拟测交分离位点), 41 个位点符合 3:1 分离, 20 个位点符合 1:3 分离, 28 个位点属偏分离位点。在符合拟测交分离的位点中, 201 个位点来自中国白桦, 161 个位点来自欧洲白桦。利用 2 点连锁分析, 来自中国白桦的 201 个标记构成了 14 个连锁群(4 个以上标记), 10 个三连体和 14 个连锁对, 45 个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总图距为 1 296.1 cM, 平均图距 15.5 cM。而来自欧洲白桦的 161 个标记构成了 17 个不同的连锁群(4 个以上标记), 8 个三连体和 4 个连锁对, 15 个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总图距为 1 035.8 cM, 平均图距 12 cM。

关键词: 中国白桦; 欧洲白桦; AFLP; 遗传连锁图谱

Construction of genetic linkage maps of silver birch based on AFLP markers

GAO Fu-Ling, 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 using a pseudotestcross mapping strategy. A segregating population including 80 progenies from the cross between *Betula platyphylla* Suk and *B. pendula* Roth was obtained. A set of 64 primer combinations were screened, and 34 pair primer combinations were selected to generate AFLP markers within a sample of 80 F_1 progenies. A total of 451 segregating sites were identified. Among them, 362 belonged to 1:1 segregating site, and 41 belonged to 3:1 segregating site, 20 belonged to 1:3 segregating site, and others were found distorted from the Mendelian ratio. Altogether 362 sites segregating 1:1 (testcross configuration) were used to construct parent-specific linkage maps, 201 for *B. platyphylla* and 161 for *B. pendula*. One linkage maps resulted consisted of 201 marker sites in 14 groups with four or more sites per group, 10 triples and 14 pairs for *B. platyphylla*, which covered a map distance about 1 296.1 cM (Kosambi units), and the average map distance between adjacent markers was 15.5 cM. Another linkage maps resulted consisted of 161 marker site for *B. pendula* were mapped onto 17 groups with four or more sites per group, 8 triples

收稿日期: 2008-06-01; 修回日期: 2008-07-14

基金项目: 黑龙江省重点科技攻关项目(编号: GB06B303-5)和哈尔滨市自然科学基金项目(编号: 2007RFLXN001)资助

作者简介: 高福玲(1979-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 林木遗传育种。E-mail: gaofuling2007@163.com

通讯作者: 姜廷波(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物遗传育种与基因工程。E-mail: tbjiang@yahoo.com

and 4 pairs, which covered a map distance about 1 035.8 cM, and the average map distance between adjacent markers was 12 cM. Those maps can be used in QTL analysis and molecular assistant selection in birch breeding.

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

扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记技术是在限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术和随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术基础上发展起来的一种高效分子标记, 该标记技术克服了 RAPD 分子标记不稳定和 RFLP 分子标记技术 DNA 用量大、探针来源受限制的缺点。AFLP 标记既有 RAPD 标记方便快捷的特点, 又具有 RFLP 标记的稳定性和可靠性^[1-4]。特别是在对生物遗传背景不甚了解的情况下, AFLP 标记技术更可以显示出高效性和稳定性的特点。因此, AFLP 分子标记被广泛用于生物遗传研究, 如遗传连锁图谱的构建、目的基因定位、品种鉴别、分类和系统发育研究等多个方面。目前, AFLP 标记因显色方法不同分为同位素标记、荧光染料标记和硝酸银染色等 3 种方法。Li-Cor 4300 DNA 分析系统通过红外荧光检测技术分析 AFLP 标记, 可直接读取多态性条带, 节省了染色或曝光等步骤, 减少了放射性污染和银离子污染。同时, 由于灵敏度高使获得的 DNA 指纹与相应的放射自显影和银染相比具有更强的可重复性。

白桦(*Betula platyphylla* Suk) 是我国北方的乡土树种, 主要分布在东北、华北、西北, 其材质致密、洁白、表面光滑, 在林业生产和木材工业中具有重要价值。白桦还具有喜光、耐寒、速生、根系发达、萌芽力强、天然更新好等特点, 是我国北方阔叶次生林的先锋树种, 在恢复火迹地和恢复被毁坏的林地生态等方面具有重要作用^[5]。目前, 有关中国白桦分子标记方面的研究仅限种源区划、桦树亲缘关系^[6-7], 及白桦长纤维性状与分子标记的关系等方面^[8]。有关开发和利用 AFLP 标记分析白桦遗传结构、构建白桦遗传连锁图谱及定位重要经济性状 QTLs 的研究很少。本研究以 80 个中国白桦和欧洲白桦的杂种 F_1 为作图群体, 筛选可用于遗传图谱构建的多态性 AFLP 分子标记, 采用拟测交作图策略, 分别构建中国白桦和欧洲白桦遗传图谱, 为重要性

状基因的图位克隆和分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料和方法

1.1 亲本检测及作图群体建立

亲本选择和人工控制授粉在东北林业大学白桦强化育种园进行。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。通过 RAPD 标记检测, 发现两亲本间存在较高的遗传多态性。2005 年 4 月中旬进行控制授粉, 8 月上旬采集成熟果穗, 次年 5 月进行播种育苗, 共获得 400 株生长发育正常的个体。本研究利用了其中的 80 个个体作为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 AFLP 分析

白桦组织富含多糖和酚类物质, 基因组 DNA 较难提纯。为此, 本研究采用 CTAB 法与试剂盒相结合的方法分离 DNA, 即先将液氮中研磨的叶片用 $2 \times$ CTAB 高盐溶液洗涤, 去除多糖, 然后结合 Universal genomic DNA extraction kit(Ver.3.0, Takara, Dalian)试剂盒的膜技术纯化 DNA, 提高 DNA 的提取质量。利用模板准备试剂盒(Template Preparation Kit, LincoIn, Nebraska, USA)制备预扩增模板: 酶切反应体积为 $12.5 \mu\text{L}$, 含有基因组 DNA 100 ng, 限制性内切酶 *Eco* R 和 *Mse* 各 1.25 U, 在 37 条件下消化 2 h; 75 加热 15 min 后转移至冰上, 加入 $25 \mu\text{L}$ 接头和 T4 DNA 连接酶混合液, 20 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 变性 30 s, 56 复性 1 min, 72 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, Nebraska, 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 变性 30 s, 65 复性 30 s, 72 延伸 1 min, 随后每次循环复性温度

降低 0.7 共 12 个循环; 接下来继续 23 个循环: 94 变性 30 s, 56 复性 30 s, 72 延伸 1 min, 72 延伸 7 min。预扩增和选择性扩增均在 ABI 9700 型 PCR 仪上进行。选择性扩增产物加入 2.5 μ L 凝胶加样缓冲液混匀, 94 变性 3 min, 然后迅速置于冰上, 取 1 μ L, 用 7% 的标准测序胶进行电泳分离, 电泳及数据分析在 Li-cor 4300 DNA 分析系统上进行。电泳结束后图像信息自动保存或进行多态性分析。先用 2 亲本 DNA 为模板从 64 个引物对中筛选出了 34 对在双亲间多态性丰富的引物组合, 然后用这些入选的引物组合对杂种分离群体进行检测。

1.2.2 AFLP 标记数据的统计与分析

将一个 AFLP 分子标记视为等位基因进行多态性分析。每对引物分别对所有个体基因组 DNA 进行扩增, 特定位置扩增出带的作为 1 个分子标记, 并代表 1 对等位点, 扩增出带的个体为杂合型记为 1, 未扩增出带的个体为纯合型记为 0, 对于部分模糊不清等原因造成判读较难的带型用“-”代替, 以此作为数据记录的标准, 将全部带型数据录入 Excel 表中。根据孟德尔遗传分离规律对个体间的 AFLP 标记分离进行 χ^2 检验($\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$), 确定各位点的分离类型。

1.2.3 分子标记的赋值和连锁图谱构建

图谱构建分析所用软件为 MAPMAKER/EXP (version 3.0b)^[9]。根据 AFLP 引物组合代码和扩增片段的大小对标记位点进行命名, 根据扩增谱带的有无对个体标记基因型进行赋值, 将某一谱带出现的个体在该位点的标记基因型赋值为 H(杂合型), 该谱带不出现的个体在该位点的基因型赋值为 A(纯合型)。难于判读的谱带和缺失数据赋值为“-”。在 $LOD = 4.0$, 重组率 $r = 0.35$ 条件下估算连锁群。确定连锁群顺序后, 用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位(Centi Morgan, cM)^[10], 用 Map Draw Ver.2.0 绘制图谱^[11]。

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物组合的扩增效果

从 8 个 *Eco*R 引物和 8 个 *Mse*I 引物组成的 64 个引物对中筛选出 34 对扩增效果较好的引物组合, 其扩增产物的分布范围在 38~911 bp 之间(图 1, 表 1), 而多态性位点主要分布在 50~500 bp 之间, 图 1 是引物组合 M-CTG/ E-ACA 在中国白桦和欧洲白桦

及其 F_1 群体中的分离情况。34 对引物组合在 2 个白桦亲本中共扩增出 1 951 个位点。不同引物对的扩增效果存在很大差异, M-CAA/E-ACA 扩增位点最丰富, 扩增出 94 个位点; 引物组合 M-CTA/E-AGG 和 M-CTC/E-AAC 扩增效果最差, 扩增出 37 个位点, 34 对引物平均扩增位点 57 个。不同引物组合扩增的多态性位点数差异很大, 同 E-ACA 或 M-CTG 进行组合的引物扩增效果最好, 来自这 2 个引物的多态性位点分别是 104 个和 83 个; 而同 E-ACG 组合的扩增效果较差, 其扩增产生的多态性位点为 22 个。可见不同引物组合的多态性扩增效果相差非常大, 进行引物组合的筛选非常重要。

2.2 扩增位点的多态性

在中国白桦和欧洲白桦中共扩增出 1 951 个位点(表 1)。其中, 在两个个体中均有扩增产物的非分离位点 1 500 个, 占扩增位点总数的 76.9%。在两白桦亲本及其杂种个体中有扩增产物的分离位点 451 个, 占扩增位点总数的 23.1%。对分离位点进行 χ^2 检验($\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$)表明, 符合 1:1 分离的位点 362 个, 占分离位点的 80.2%; 符合 3:1 分离的位点为 41 个, 占 9%; 符合 1:3 分离的位点为 20 个, 占 4.5%; 偏分离位点 28 个, 占 6.2%。按照拟测交作图策略, 符合 1:1 分离的多态位点, 可用于白桦分子标记连锁图谱的构建。

2.3 连锁图谱构建

利用 MAPMAKER/EXP (version 3.0b) 软件设置最小 LOD 值为 4.0 和最大重组率为 0.35 进行遗传作图, 通过对拟测交分离位点进行两点连锁分析, 确定相关的连锁群。来自中国白桦的 201 个标记构成了 14 个连锁群(4 个以上标记), 10 个三连体和 14 个连锁对, 45 个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总图距为 1 296.1 cM, 平均图距 15.5 cM(图 2A)。而来自欧洲白桦的 161 个连锁标记构成了 17 个不同的连锁群(4 个以上标记), 8 个三连体和 4 个连锁对, 15 个为非连锁位点, 连锁标记覆盖的总图距为 1 035.8 cM(图 2B), 平均图距 12 cM。中国白桦中有 2 对(4 个)标记间的图距为 0, 欧洲白桦中有 5 对(6 个)标记间的图距为 0, 这些标记分别由不同引物扩增而来。标记的图位相同, 可能是因为本研究作图群体较小, 不能分辨相距很近的标记(<1.3 cM) 之间的距离造成的。

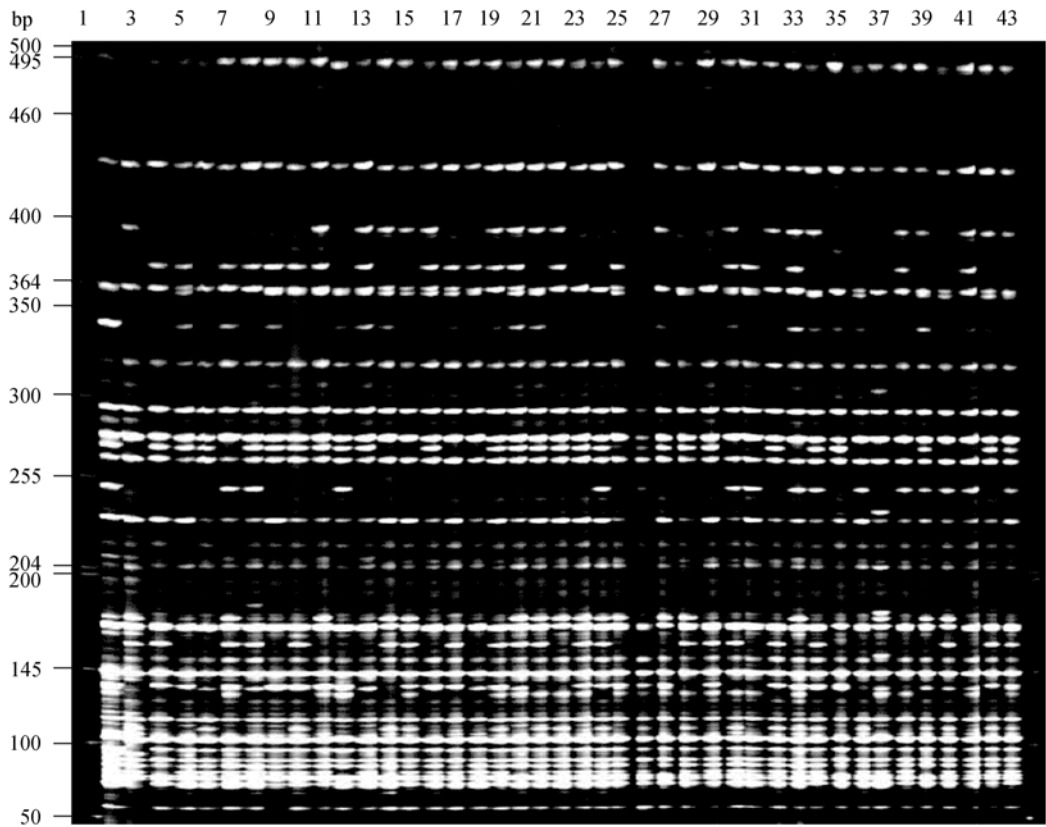


图 1 来自引物 M-CTG/E-ACA 组合的 AFLP 标记在白桦 F₁ 群体中的分离
1, 44: 分子量标记; 2: 中国白桦; 3: 欧洲白桦; 4~43: 中国白桦和欧洲白桦的杂种 F₁ 代个体。

表 1 白桦 AFLP 引物组合的多态性分析

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)	8(49)	10(46)	10(37)	21(53)	—	17(55)	—	—	66(240)
M-CAC (M2)	—	14(57)	5(57)	8(48)	—	14(44)	—	—	41(206)
M-CTA (M3)	8(37)	17(67)	16(39)	14(58)	—	13(46)	—	—	68(247)
M-CTG (M4)	8(41)	15(58)		11(45)	11(66)	11(45)	10(75)	17(61)	83(391)
M-CAG (M5)	—	—	—	9(57)	9(62)	—	12(54)	—	30(173)
M-CTT (M6)	11(47)	16(48)	—	14(72)	—	—	—	26(87)	67(254)
M-CTA (M7)	12(44)	12(82)	—	—	10(59)	—	—	—	34(185)
M-CAA (M8)	—	20(94)	25(84)	—	17(77)	—	—	—	62(255)
合计	47 (218)	104 (452)	56 (217)	77 (333)	47 (264)	55 (190)	22 (129)	43 (148)	451 (1951)

注: 表中的数字表示引物组合在白桦双亲中扩增出的多态性片段的数目, 括号中数字表示扩增片段总数。

3 讨 论

许多木本植物, 特别是白桦的茎叶组织含有大量的多糖、多酚及其他次生代谢产物, 用 CTAB 等常规方法或 DNA 提取试剂盒获得的 DNA 往往含有较多的多糖成分, 使得 DNA 埋的多糖的粘稠胶状物中而难以溶解, 严重影响了 DNA 的酶切效果和 PCR

效果。能否提取出高纯度 DNA 是制约白桦分子标记遗传图谱构建和分子标记辅助育种研究进程的重要因素之一。AFLP 标记多态性丰富、灵敏度高、DNA 用量少, 但对 DNA 纯度的要求较高。本研究发现利用高盐 CTAB 去除多糖, 结合 DNA 提取试剂盒的膜技术能够明显提高白桦 DNA 的质量, 实验结果表明

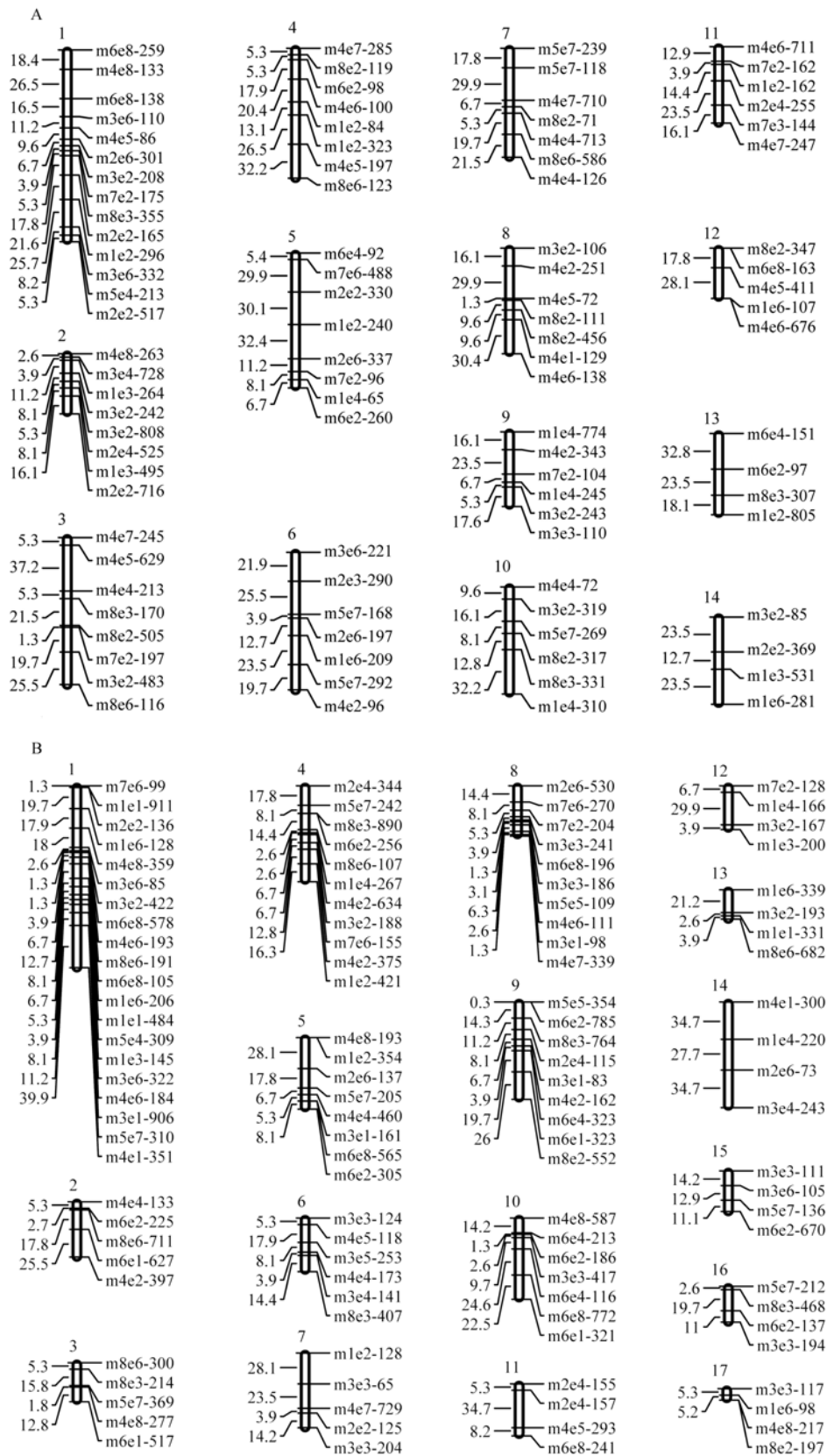


图 2 白桦 AFLP 标记连锁图谱

A: 中国白桦; B: 欧洲白桦。连锁群的右侧为分子标记名称, 左侧为遗传距离(cM)。

用该方提取的白桦基因组 DNA 质量很高, 能够满足 AFLP 的要求。

关于分子标记技术应用于白桦遗传连锁图谱构建及重要经济性状基因定位的报道很少, 其主要原因是获得的分子标记少。有学者为研究白桦的基因结构开发了 54 对 SSR 引物, 其中芬兰学者开发了 23 对欧洲白桦(*Betula pendula* Roth)SSR 引物^[12], 日本学者开发了 13 对日本白桦(*Betula platyphylla* var. *japonica*)SSR 引物^[13], 中国学者开发了 18 对中国白桦(*Betula platyphylla* Suk)EST-SSR 引物^[14]。第一张白桦遗传图谱是 2005 年发表的欧洲白桦遗传图谱^[15], 该图谱包含 89 个 AFLP 标记和 19 个 SSR 标记, 由于该图谱的作图信息来自 3 个无关的 2 代家系, 且每个家系的个体仅为 30 个, 使得该图谱的参考值和应用价值受到了限制。迄今为止密度最高的白桦遗传连锁图谱是姜廷波等^[16]发表的白桦 RAPD 遗传连锁图谱, 有 195 个 RAPD 标记被定位在连锁群上。但普遍认为 RAPD 标记的稳定性和重复性都较差, 因此进一步开发重复性好和稳定性强的分子标记可以提高现有白桦遗传连锁图谱密度和应用价值。本研究利用红外荧光标记和 Li-cor 4300 DNA 分析系统在 2 个白桦亲本及其杂种群体中检测到 451 个 AFLP 分离位点, 其中符合 1:1 分离比位点 362 个。按照拟测交作图策略构建的白桦分子标记连锁图谱, 有 212 个标记被定位在连锁群上, 比以往的白桦遗传连锁图谱在密度和精度上都有了较大的提高, 如果将该图谱与前期获得的 RAPD 遗传连锁图谱加以整合, 可进一步提高白桦遗传连锁图谱的密度。由于前期研究利用的作图群体与本研究的作图群体不同, 整合两图谱需要开发利用共线性标记, 对两群体同时进行 AFLP 和 RAPD 分析是重要途径, 相关研究正在进行中。同时, 开发和利用高度保守的 EST-SSR 和 ESTP 等共显性标记, 可以根据拟测交策略构建的遗传图谱整合成更高密度的遗传图谱, 将更能满足白桦分子标记辅助选择育种及基因定位和克隆的需要^[17]。

当前, 在白桦遗传育种研究中, 指纹图谱、遗传图谱、数量性状基因定位虽未进入实用阶段, 但随着研究的不断深入, 利用高效的分子标记构建高密度白桦遗传图谱, 利用分子标记进行数量性状、质量性状的基因定位, 开展分子标记辅助选择育种将使白桦遗传育种研究产生一次新的飞跃。

参考文献(References):

- [1] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414. [\[DOI\]](#)
- [2] 王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及其应用. *杂交水稻*, 1996, (5): 27-29.
- [3] 张锦, 丁毅. 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*, 2007, 29(6): 725-730.
- [4] 梁宇, 刁亚瑞, 刘公社, 刘杰. 中国东北羊草自然种群的扩增片段长度多态性研究. *草业学报*, 2007, 16(2): 124-134.
- [5] 李萍, 房桂平, 孙成志. 制化学机械浆有关材性研究 III. *林产化学与工业*, 1995, 15(增刊): 13-18.
- [6] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 刘玉喜, 任旭琴. 利用 RAPD 标记技术对桦树种间亲缘关系的分析. *林业科学*, 2001, 38(1): 154-156.
- [7] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 刘玉喜, 任旭琴. 利用 RAPD 标记技术对白桦种源遗传变异的分析及种源区划. *植物研究*, 2001, 21(1): 126-130.
- [8] 魏志刚, 杨传平, 潘华. 利用多元回归分析鉴定与白桦纤维长度性状相关的分子标记. *分子植物育种*, 2006, 6(4): 835-840.
- [9] Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1 (2): 174-181. [\[DOI\]](#)
- [10] Kosambi DD. The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen*, 1944, 12(3): 172-175.
- [11] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw: 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏. *遗传*, 2003, 25(3): 317-321.
- [12] Kulju KKM, Pekkinen M, Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae). *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(3): 471-473. [\[DOI\]](#)
- [13] Wu B, Lian C, Hogetsu T. Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). *Mol Ecol Notes*, 2003, 2(3): 413-415. [\[DOI\]](#)
- [14] 王艳敏, 魏志刚, 杨传平. 白桦 EST-SSR 信息分析与标记的开发. *林业科学*, 2008, 44(2): 78-84.
- [15] Pekkinen M, Varvio S, Kulju KKM, Kärkkäinen H, Smolander S, Viherä-Aarnio A, Koski V, Sillanpää MJ. Linkage map of birch, *Betula pendula* Roth, based on microsatellites and amplified fragment length polymorphisms. *Genome*, 2005, 48(4): 619-625. [\[DOI\]](#)
- [16] 姜廷波, 李绍臣, 高福玲, 丁宝建. 白桦 RAPD 遗传连锁图谱的构建. *遗传*, 2007, 29(7): 867-873.
- [17] Konstantin V, Krutovsky, Troggio M, Brown GR, Jermstad KD, Neale DB. Comparative mapping in the Pinaceae. *Genetics*, 2004, 168(1): 447-461. [\[DOI\]](#)