

梨 AFLP 分子连锁图谱的构建与分析

孙文英¹, 张玉星¹, 李秀根², 王 龙²

(1. 河北农业大学 园艺学院 河北 保定 071001; 2. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘要: 遗传图谱是数量性状基因定位、基因图位克隆及分子辅助育种等研究的基础, 而目前国内在梨树上这方面的研究尚属空白。试验以早美酥×八月红的杂交 F₁ 92 株实生苗为作图群体, 采用了扩增稳定、多态性丰富的 16 对 *Mse* I / *Eco* R I 引物组合, 对分离群体进行 AFLP 多态性检测, 共获得 208 条多态性带, 其中偏离孟德尔遗传的比率 29.8% ($P < 0.01$)。应用 Joinmap 3.0 软件且结合“双假测交”策略, 对 208 个 AFLP 分子标记进行了遗传连锁分析, 构建了一张包含 145 个 AFLP 标记, 分属 20 个连锁群的梨分子遗传连锁图谱, 每个连锁群包含 4~20 个标记, 平均为 9.06 个标记, 图谱总长度覆盖梨基因组 618.7 cM, 标记间平均图距为 6.58 cM。此图谱为梨树基因定位、比较基因组学和重要农艺性状的 QTL 定位等研究奠定了基础。

关键词: 梨; 分子连锁图谱; AFLP

中图分类号: S661.203 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)03-0179-05

Construction and Analysis of AFLP Molecular Linkage Map in Pear

SUN Wen-ying¹, ZHANG Yu-xing¹, LI Xiu-gen², WANG Long²

(1. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Zhengzhou Fruit Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: Genetic linkage map was the foundation of locating quantitative trait loci, genes map-based cloning and marker assisted selection, while the research had done little on the pear. In order to accelerate the molecular breeding study on pear, a genetic map for pear (*Pyrus* L.) has been developed based on 92 F₁ plants derived from an interspecific cross between the cultivars Zaomeisu and Bayuehong. The linkage map was constructed based on 208 polymorphic AFLP markers and the "double pseudo-testcross" strategy by using Joinmap version 3.0 software. The map in this study covered 618.7 cM of pear genome harboring 145 AFLP markers on the twenty linkage groups, which the length of linkage group varied from 2.06 cM to 79.3 cM and an average genetic distance between adjacent markers was about 6.58 cM of Kosambi genetic distance. And also the markers on the linkage group varied from 4 to 20. Compared with the reports of pear genetic maps, the pear linkage map in this study was not saturated, but it was currently the first integrated linkage map in pear comprising 47 3:1 and 98 1:1 AFLP markers by using Joinmap 3.0 setting CP (cross pollination) type data.

Key words: *Pyrus* L.; Molecular linkage map; Amplified fragment length polymorphic

梨 (*Pyrus* L.) 是原产我国的重要果树之一, 栽培历史悠久, 是我国继苹果、柑桔之后的第三大栽培果树。由于大多数梨树自交不亲和, 所以选育新品种常以种间杂交选育为主, 而种间杂交选育往往是通过表型值进行的, 多数控制梨果实经济性状基因属于数量性状基因, 因此要培育出既提高果实经济性状的品质同时又不失抗虫、抗病性等抗性的梨品种, 这在一定程度上给育种工作者带来较大困难。而利用分子技术对梨杂交后代的果实经济性状进行分析, 找寻与目标基因紧密连锁的分子标记, 通过分

子辅助育种将会解决这一问题。

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 是由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos^[1] 发展起来的一种新的检测 DNA 多态性的方法, 它结合了 RFLP 和 RAPD 技术的优点, 既有 RFLP 的可靠性, 也具有 RAPD 的简便性, 可以在不需要预先知道 DNA 的序列信息的情况下, 短时间内获得大量的信息, 所以 AFLP 被认为是一种十分理想的、高效的分子标记技术。目前, 应用 AFLP 技术进行了很多梨属种质资源遗传多样性分析及构建指纹图谱的研究^[2-4], 而有关构建梨

收稿日期: 2008-12-22

基金项目: 河北省自然科学基金(303240); 河北农业大学“将帅”计划基金

作者简介: 孙文英(1979-), 女, 河北衡水人, 博士, 主要从事果树结实生理与分子生物学的研究。

通讯作者: 张玉星(1961-), 男, 河北保定人, 教授, 博士生导师, 主要从事果树结实生理与分子生物学的研究。

遗传连锁图谱方面仅见到西洋梨、日韩梨连锁图谱的报道^{5-7]}。所以,本研究以早美酥为母本、八月红为父本杂交得到的 92 株实生苗为试材,利用 AFLP 标记构建梨树分子连锁遗传图谱,以期为我国进一步构建高密度的梨树分子遗传图谱及重要经济性状的基因定位奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验所用群体为中国农业科学院郑州果树研究所用早美酥×八月红杂交所得的 F₁ 实生苗共计 92 个个体。杂交群体于 2001 年春季授粉,秋季收集种子冬藏,2002 年 2 月出芽经温室培育后,春季移栽至田间定植。

试验所用的引物组合为:(ME12: M-CAG/E-AGC; ME23: M-CAT/E-AAT; ME24: M-CAT/E-ACT; ME26: M-CAT/E-AGG; ME32: M-CTC/E-AGC; ME34: M-CTC/E-ACT; ME35: M-CTC/E-ACC; ME41: M-CTG/E-ACG; ME42: M-CTG/E-AGC; ME45: M-CTG/E-ACC; ME51: M-CTT/E-ACG; ME52: M-CTT/E-AGC; ME53: M-CTT/E-AAT; ME54 :M-CTT/E-ACT; ME62: M-CCA/E-AGC; ME63: M-CCA/E-AAT),引物核心序列为: Mse I 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'; EcoR I 5'-GACTGCCTACCACTTC-3'。以上所用引物由上海生物工程技术有限公司提供和合成。

1.2 方法

1.2.1 AFLP 扩增程序 反应体系参照了鲁凤娟^[8]建立的梨 AFLP 优化体系,使用 580BR0519 型 Bio-RAD 公司生产的 PCR 扩增仪进行扩增,其扩增程序为:模板 DNA 450 ng 经酶切 5 h 后再连接 10 h; 95℃ 2 min, 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共计 30 个循环; 95℃ 2 min, 95℃ 50 s, 65℃ 40 s (每循环降低 0.7℃), 72℃ 1 min , 13 个循环, 95℃ 2 min, 95℃ 50 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min , 31 个循环。

1.2.2 银染方法 脱色:在新配制的 1.5 L 10%无水乙醇中加 10 mL 乙酸,脱色 20~30 min,然后蒸馏水冲刷 2 次,每次 5 min。

染色:1.5 L 蒸馏水中加 3 g 硝酸银,银染 12 min 后用蒸馏水迅速的冲刷一下。显影:1.5 L 蒸馏水中加 22.5 g 氢氧化钠、6 mL 37%的甲醛显影约 10 min。定影:在含有 11.25 g 碳酸钠的 1.5 L 溶液中加入冲刷一下,最后用蒸馏水洗板两次,每次不超过 2 min。干燥:室温下自然干燥。

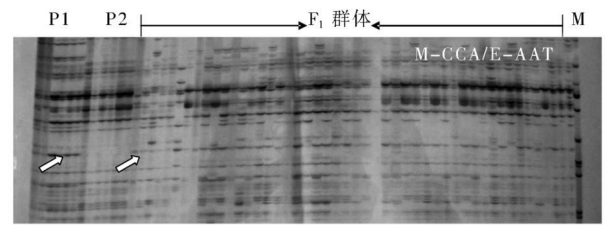
1.2.3 数据统计 在进行数据统计时,电泳条带清晰的记为“1”,无带记为“0”,不清楚或缺失的记为

“—”。AFLP 标记采用“引物组合+分子量(pBR322 DNA/Msp I markers 的条带序号)”表示,后缀“P”“M”“F”分别表示父母共同杂合带、母本特征带和父本特征带。将数据转化成 hk×hk (双亲均为杂合的基因型, h 对 k 为显性)、lm×ll (母本为杂合基因型 lm, 父本为纯隐性基因型 ll, m 对 l 为显性)和 np×nn (父本为杂合基因型 np, 母本为纯隐性基因型 nn, p 对 n 为显性)的形式,然后应用 Joinmap 3.0 软件构建早美酥×八月红杂交群体的连锁图谱,选用 LOD 值为 3.0~8.0 的连锁群,采用 Kosambi 函数计算图谱距离。

2 结果与分析

2.1 实生后代的杂交纯度的鉴定

本试验采用能够清晰辨出父本八月红特征带的一个纯合显性标记对 92 株早美酥×八月红的 F₁ 进行了 AFLP 分析。此引物在各亲本的主带清晰一致,且 F₁ 个体均扩增出明显的父本特征带。引物 ME63 在父本、母本及部分实生后代中的分离情况如图 1 所示。

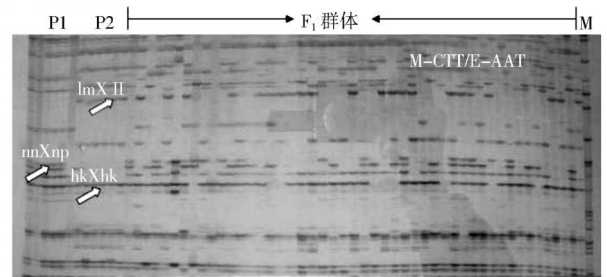


P1. 父本; P2. 母本; M. Marker.

P1. Paternal; P2. Maternal; M. Marker.

图 1 引物 ME63 扩增的八月红特征带及部分早美酥实生后代分离

Fig. 1 The characteristic band by ME63 primer pairs in paternal and segregation of the part of F₁ hybrid individuals



P1. 父本; P2. 母本; M. Marker.

P1. Paternal; P2. Maternal; M. Marker.

图 2 引物对 ME53 扩增的 hk×hk, lm×ll, np×nn 分离类型位点

Fig. 2 The segregation patterns, hk×hk, lm×ll, np×nn, generated by ME53 primer pairs

2.2 AFLP 标记在 F₁ 群体的多态性与分离

利用 30 对引物组合,对 1 株父本、1 株母本及 3 株实生后代进行引物筛选,经 0.8% 变性聚丙烯酰

胺凝胶电泳与银染检测后,选择其中的16对引物组合进一步对F₁群体扩增,共扩增出多态性带208条,平均每对引物扩增13条多态带。经卡方检验后符合孟德尔1:1与3:1分离方式的总带数为146条,占多态位点的70.2%。其中1:1孟德尔分离的位点数为99条,占孟德尔分离位点的67.8%。孟德尔3:1分离的位点数为47条,占孟德尔分离位点的

32.2%,占多态位点的22.6%。如图2为引物ME53对F₁群体部分个体扩增的多态性带。

2.3 遗传图谱的构建

结合“双假测交”理论^[9],采用Joinmap 3.0软件“CP(Cross pollinators)”作图模型,将208个AFLP多态性标记执行作图命令,选用LOD 3.0~8.0合适的连锁群,构建了由145个标记、20个连锁群构成的

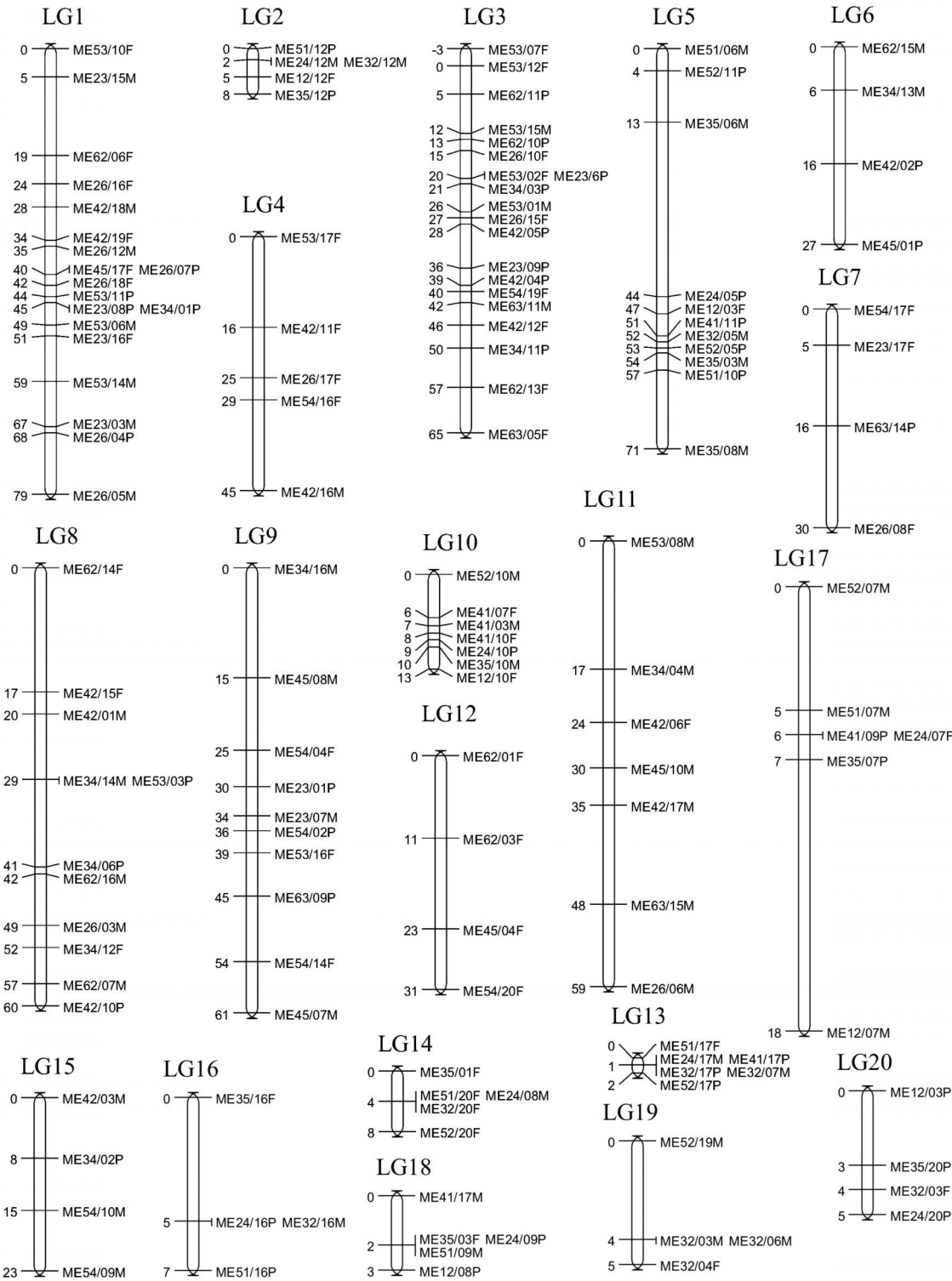


图3 梨 AFLP 分子遗传图谱

Fig.3 Molecular genetic map of pear based on AFLP markers

梨分子遗传图谱(图3),其中符合孟德尔分离的标记106个,作图位点率为72.6%;偏分离标记39个,作图率为62.9%。在20个连锁群中,hk×hk类型标记44个,lm×ll类型标记53个,np×nn类型标记48个,连锁群标记数为4~20个,平均每个连锁群标记数为9.06个;连锁群长度2.06~79.3,平均长度为30.9 cM;20个连锁群覆盖基因组总长为618.7 cM,连锁群的标记间平均间距为6.58 cM,间距最大的标记在第5连锁群上,间距达31.2 cM;间距最小的在第3连锁群上,只有0.019 cM。

3 讨论

对杂交后代纯度鉴定是构建遗传图谱的前提,杂交实生苗纯度的鉴定一般可分为母本特征带和父本特征带两种方式,因构建遗传图谱亲本已知,这样鉴定就相对简单一些,仅需排除外来花粉和自交的干扰。张开春等^[10]在应用RAPD技术鉴定无融合生殖型平邑甜茶的有性后代研究中得出:使用杂合的显性标记要鉴定出97%的有性杂种至少要使用5个父本标记,而使用纯合显性标记只需一个即可鉴定出全部的普通型杂种后代,杨朝东等^[11]应用AFLP技术鉴定了以雪梅×多曹朱砂梅杂交所得12株F₁子代的真实性及纯度,鹿金颖等^[12]利用AFLP技术扩增出的金丝小枣10条特征带和尖枣的7条特征带分别鉴定出冬枣×金丝小枣,冬枣×尖枣杂交实生苗。本试验选用能够清晰辨出父本八月红特征带的一个纯合显性标记对早美酥F₁群体进行了AFLP的分析,F₁群体均扩增出明显的父本特征带,这表明作图群体没有外来花粉和自交的干扰。

本研究得到的208个标记中有62个在后代中的分离不符合孟德尔遗传,偏分离标记占多态性位点的29.8%。在作图过程中偏分离现象是普遍存在的,有研究者曾经比较过14个种间构图群体,发现平均有25.3%的标记发生偏离,造成偏分离的原因现有多种假设解释,但其共同原因是染色体的某些区域重组率下降或不发生重组;而且模板纯度不高酶切不彻底、作图群体数量较小、试验操作造成的带型缺失或模糊不清等都会造成偏分离标记;另外,环境因素和群体的随机效应也会引起偏分离^[13]。

目前,有关梨树遗传图谱已报道不多,Iketani等^[5]利用Kinchaku和Kosui杂交一代82个群体分别构建Kinchaku和Kosui遗传图谱。Kinchaku图谱由118个RAPD标记和2个形态学标记,总长为768 cM的18个连锁群构成;Kosui遗传图谱含有78个位点,22个连锁群,总长508 cM。Yamamoto等^[6]利用

63株F₁实生苗构建了Bartlett和Hosui的遗传图谱。其中Bartlett图谱由226个标记组成,分别为175个AFLP标记,32个梨SSR标记,12个苹果SSR标记,3个桃SSR标记,2个樱桃SSR标记,1个同工酶标记和1个自花不结实S位点,共18个连锁群,覆盖梨基因组949 cM;Hosui图谱由154个标记,17个连锁群构成,包括105个AFLP标记,42个SSR标记(29个梨SSR标记,7个苹果SSR标记,4个桃的SSR标记,2个樱桃SSR标记),3个同工酶标记,1个叶色Lc标记和S位点,图谱总长926 cM。Dondini等^[7]使用SSR、MFLP、AFLP、RGA和AFLP-RGA标记构建了Passe Crassane和Harrow Sweet图谱。Passe Crassane遗传图谱包含155个位点,18个连锁群,总长912 cM;Harrow Sweet图谱含有156个位点,19个连锁群,全长930 cM。以上研究构建的遗传图谱虽然分子标记数相对较多,覆盖梨基因组也较长,但是这些研究中只利用了F₁群体的“拟测交1:1分离位点”分别建立父本和母本的遗传图谱,而对大量的“拟F₂3:1分离位点”没有进行分析。目前我国与构建遗传图谱的有关研究中也多数只利用F₁群体的“拟测交1:1分离位点”,采用Mapmarker.exe BC₁模型分别构建父本和母本的遗传图谱,虽然房经贵等^[14]利用两个芒果品种间杂交F₁的3:1分离位点进行连锁相分析后,应用Mapmarker.exe作图软件建立起了“拟F₂作图模型”,但是由于“拟F₂图谱”和“拟BC₁图谱”没有共同标记而无法进行整合。而本研究采用了JoinMap version3.0作图软件中的“CP(Cross pollinators)”作图模型,即为由两个杂合基因型或一个杂合基因型与一个纯合基因型二倍体亲本杂交产生的一类群体,此模型可对显性标记(如AFLP标记)三种分离类型同时进行分析,是一种适用于异交果树及树木的F₁作图群体构建高密度图谱的作图模型。因此,本研究采用了Joinmap3.0“CP”作图模型将208个多态性标记成功的构建了含有145个AFLP标记,分属20个连锁群的梨连锁图谱。

本研究构建的连锁群中在第13,14,18小连锁群上出现了AFLP标记聚集区,这可能与本研究采用的Mse I/EcoRI双酶切有关,因为这种酶切所得标记检测的位点多聚集在着丝粒两侧甲基化较高的重复序列区域^[15],也可能是只采用了Mse I和EcoRI后面带有3个选择性碱基的引物组合造成了标记分布的不均匀。并且20个连锁群总长只覆盖了梨基因组的618.7 cM,而梨完整的基因组应包括17个连锁群,这说明某些染色体中存在频繁交换或

标记空缺区段。因此, 为构建覆盖全基因组的饱和连锁图, 今后可以从以下几方面做进一步的研究: 首先采用多种分子标记尤其是一些共显性的标记填补图谱中的空缺; 二是利用 AFLP 标记不同酶切组合的互补作用进行标记加密; 三是采用多种型式及前人研究过的较优引物组合进行分析以便于今后图谱的比较和整合; 四是对遗传图谱进行加密的基础上利用原位杂交技术确定与梨 17 条染色体相对应的连锁群。

参考文献:

- [1] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting[M] . European Patent Application 92402629. 7 (Publication No. 0534858A1). Paris: European Office, 1993.
- [2] 王 斐, 林盛华, 方成泉, 等. 梨新品种及其亲本本的 AFLP 分析[J] . 园艺学报, 2007, 34(4): 847—852.
- [3] 王艳芳, 朱立武, 贾 兵, 等. 砀山酥梨 AFLP 技术体系建立及变异检测[J] . 安徽农业大学学报, 2006, 33(3): 360—363.
- [4] 马明臻. 梨品种 AFLP 指纹图谱的构建[D] . 保定: 河北农业大学, 2005.
- [5] Iketani H, Abe K, Yamamoto T, *et al.* Mapping of the disease-related genes in Japanese pear using a molecular linkage map with RAPD markers[J] . Breeding Science, 2001, 51: 179—184.
- [6] Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, *et al.* Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears[J] . Theor Appl Genet, 2002, 106: 9—18.
- [7] Dondini L, Pierantoni L, Gaiotti F, *et al.* Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map[J] . Molecular-Breeding, 2004, 14(4): 407—418.
- [8] 鲁凤娟. 梨(*Pyrus* L.) AFLP 反应体系的建立及在品种鉴定中的应用[D] . 保定: 河北农业大学, 2004.
- [9] Hemmat M, Weeden N F, Manganis A G. Molecular marker linkage map for apple[J] . J Heredity, 1994, 85: 4—11.
- [10] 张开春, 李荣旗, 毕晓颖, 等. RAPD 技术鉴定无融合生殖型平邑甜茶的有性后代[J] . 农业生物技术学报, 1997, 5(4): 392—396.
- [11] 杨朝东, 张俊卫, 熊彩凤, 等. AFLP 技术对梅花杂交种的快速鉴定[J] . 北京林业大学学报, 2004, 26(增刊): 45—47.
- [12] 鹿金颖, 毛永民, 申莲英, 等. 用 AFLP 分子标记鉴定冬枣自然授粉实生后代杂种的研究[J] . 园艺学报, 2005, 32(4): 180—183.
- [13] 王 美, 张凤兰, 孟祥栋, 等. 中国白菜 AFLP 分子遗传图谱的构建[J] . 华北农学报, 2004, 19(1): 28—33.
- [14] 房经贵, 刘大钧, 马正强. 利用双杂合位点标记资料构建芒果遗传图谱[J] . 分子植物育种, 2003, 1(3): 313—319.
- [15] Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, Van Wijk R. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution[J] . Theor Appl Genet, 1999, 99: 425—431.