

高粱 AFLP 分子连锁图谱的构建

崔江慧, 薛 薇, 段西飞, 王静华, 常金华

(河北农业大学, 河北 保定 071000)

摘要: 利用感蚜高粱品种千三与抗蚜品种河农 16 杂交获得的 100 个 F_2 单株作为图谱构建群体, 以 AFLP 标记构建高粱连锁图谱。通过对 192 对 AFLP 引物组合进行筛选, 共得到 75 对多态性引物, 利用筛选出的 75 对引物进行选择扩增, 得到了 154 个 AFLP 多态性位点。经 Map maker/EXP 3.0 软件处理, 构建了包含 12 个连锁群, 93 个遗传标记的连锁图谱, 该图谱覆盖 686 cM, 平均图距为 7.38 cM。

关键词: 高粱; 连锁图谱; AFLP 标记

中图分类号: S514.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0120-04

Construction of an Amplified Fragment Length Polymorphism Linkage Map of Sorghum

CUI Jiang-hui, XUE Wei, DUAN Xi-fei, WANG Jing-hua, CHANG Jin-hua

(Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: A molecular genetic map for sorghum was constructed based on AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers using DNA samples extracted from 100 F_2 population which derived from the cross between QS and HN-16. By screening 192 AFLP primer combinations, 154 polymorphic bands were obtained from 75 pairs of primers. The highly dense linkage map constructed by using Map maker 3.0 software analysis which consisted of 12 linkage groups, a total of 93 newly screened markers and covered 686 cM of sorghum genome, with the average interval of 7.38 cM.

Key words: Sorghum; Linkage map; AFLP makers

高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 是一个世界性的重要粮食作物^[1]。其产量仅次于玉米、小麦、水稻和大麦, 名列第五。高粱对环境具有广泛适应性, 抗旱性强、产量高, 在禾本科作物中, 高粱基因组较小, 约 750 Mbp, 仅次于水稻基因组 (440 Mbp), 逐渐成为禾谷类作物基因组研究的一个模式作物^[2]。一张完整的高粱分子遗传图谱是性状定位、标记辅助选择、目标基因分离及高粱基因组完全测序的基础^[3]。本试验利用 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性) 标记技术, 采用千三和河农 16 杂交获得的 F_2 群体来构建高粱的遗传图谱, 为高粱抗蚜基因的精确定位奠定基础。

1 材料和方法

1.1 作图群体

用于构建连锁图谱的群体是红粒感蚜品种千三

(千斤红和三尺三杂交选育而成的品系) 和白粒抗蚜品种河农 16 (冀梁 2 号) 为亲本构建的 100 个 F_2 单株作为作图群体, 这两个品种均由河北农业大学遗传育种系选育而成。

1.2 高粱基因组 DNA 的制备

用 CTAB^[4] 法提取高粱的基因组 DNA 并纯化 DNA。用紫外分光光度计 (Backman, 德国) 检测 DNA 提取质量和浓度。将样品浓度调为 100 ng/ μ L。

1.3 AFLP 分析

1.3.1 主要试剂和仪器 EcoRI 内切酶 (大连宝生物公司); MseI 内切酶 (NEB 公司); T₄ DNA 连接酶, TaqDNA 聚合酶, dNTPs (大连宝生物公司); 丙烯酰胺 (amresco), 双丙烯酰胺 (amresco), 尿素。PCR 仪为 Programmable Thermal Controller (PTG-100), 电泳仪为 DYY-12 型电泳仪, 还有 DYCp^z-20A 型电泳槽。

1.3.2 AFLP 技术参照 Vos^[5] 的方法 引物序列由

收稿日期: 2007-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (30170498); 河北省自然科学基金资助项目 (2005000254)

作者简介: 崔江慧 (1981-), 女, 河北藁城人, 在读硕士, 主要从事高粱遗传方面研究工作

通讯作者: 常金华 (1965-), 女, 河北高碑店人, 教授, 硕士生导师, 主要从事作物遗传育种研究工作。

上海生工合成。人工接头的序列如下: *Eco*R I 接头 5'-CTCGTAGACTGCGTACG-3'; 3'-CTGACGCATGGT-TAA-5'; *Mse* I 接头 5'-GACCATGAGTCCTGAG-3'; 3'-TACTCAGGACTCAF-5' 预扩增引物序列: *Eco*R I 预扩引物 5'-GACTGCGTACCAATTG-3'; *Mse* I 预扩引物 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。

表 1 选择性扩增中使用的引物

Tab. 1 Primers used in the selective amplification

引物名称 Name	<i>Mse</i> I 序列 Primer <i>Mse</i> I sequence	引物名称 Name	<i>Eco</i> RI 序列 Primer <i>Eco</i> RI sequence
E36	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	M47	5'-GATGAGTCCTAGGTAACAA-3'
E39	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'	M48	5'-GATGAGTCCTAGGTAACAG-3'
E42	5'-GACTGCGTACCAATTCAGT-3'	M49	5'-GATGAGTCCTAGGTAACAG-3'
E47	5'-GACTGCGTACCAATTCCAA-3'	M50	5'-GATGAGTCCTAGGTAACAT-3'
E58	5'-GACTGCGTACCAATTCCTG-3'	M51	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCA-3'
E60	5'-GACTGCGTACCAATTCCTG-3'	M52	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCG-3'
E61	5'-GACTGCGTACCAATTCCTG-3'	M53	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCG-3'
E63	5'-GACTGCGTACCAATTCGAA-3'	M54	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCF-3'
E71	5'-GACTGCGTACCAATTCGGA-3'	M55	5'-GATGAGTCCTAGGTAACGA-3'
E80	5'-GACTGCGTACCAATTCFAG-3'	M56	5'-GATGAGTCCTAGGTAACGG-3'
E81	5'-GACTGCGTACCAATTCFAG-3'	M57	5'-GATGAGTCCTAGGTAACGG-3'
E87	5'-GACTGCGTACCAATTCFAG-3'	M58	5'-GATGAGTCCTAGGTAACGF-3'
		M59	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCTA-3'
		M60	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCTG-3'
		M61	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCTG-3'
		M62	5'-GATGAGTCCTAGGTAACCTF-3'

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测 AFLP 选择性扩增产物采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 80 W 恒功率预电泳 30 min, 上样后电泳 1~ 1.5 h。银染检测采用强碱法^[6]。晾干后, 即可获得清晰的电泳谱带。

1.4 分子标记数据的收集和统计

AFLP 标记谱带记录: 1 表示为有带; 0 表示为无带, - 表示为缺失。用 Map maker/ EXP 3.0 软件处理, 绘制连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 AFLP 多态性引物的筛选

利用亲本千三和河农 16 对 192 对引物组合进行筛选, 选出 75 对多态性较好的引物(图 1), 用于连锁群的构建。

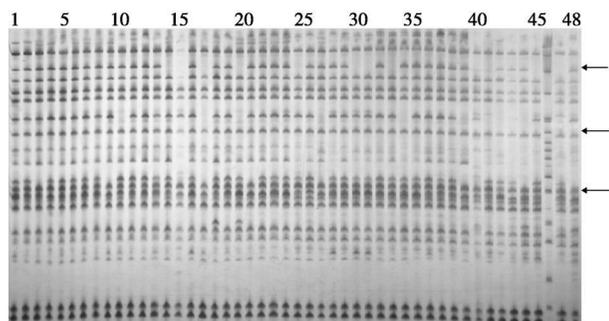
2.2 高粱连锁图谱的构建

通过亲本千三和河农 16 对 192 对引物进行筛选, 得到 75 对多态性引物, 用这 75 对引物进行选择扩增, 共得到 154 个 AFLP 标记。使用 Map maker/ Exp(Version 3.0) 进行连锁分析后, 得到高粱的 AFLP 连锁图谱(图 2)。得到的 154 个标记中的 93 个标记构成了 12 个连锁群, 平均每个连锁群的标记数为 7.75 个。还有 61 个标记不连锁, 未能进入连锁群,

选择性扩增中, *Eco*R I 选扩引物为 12 个, *Mse* I 选扩引物为 16 个, 共选用 192 个引物组合。

引物来源于 www.sorgblast2.tamu.edu 网站。这 192 个引物组合均已经定位在连锁群上, 集合了目前高粱上所有的 AFLP 标记引物组合。选择性扩增引物序列见表 1。

作图位点率为 60.39%。12 个连锁群的 93 个连锁标记覆盖基因组 686 cM, 2 个标记间平均图距为 7.38 cM。连锁群的平均长度为 57.17 cM。在 12 个连锁群中, 遗传距离最长的连锁群长度为 119 cM, 遗传距离最短的为 19 cM。最大的连锁群有 28 个标记, 最小的有 2 个标记。平均图距最大的连锁群是第 11, 12 连锁群, 间距是 13.5 cM; 平均图距最小的连锁群是第 1 连锁群, 间距是 4.25 cM。



箭头所指是特异性带; 自左向右 1~ 45 泳道为 F₂ 单株;
46. Maker (PBR322); 47. 千三; 48. 河农 16

Arrows show the polymorphic band; From left to right: 1~ 45 are F₂ individuals; 46. mAKER (plr322); 47. QS; 48. HN 16

图 1 E42/M55 引物扩增片段在群体的分离
Fig. 1 E42/M55 prime amplified fragment segregation

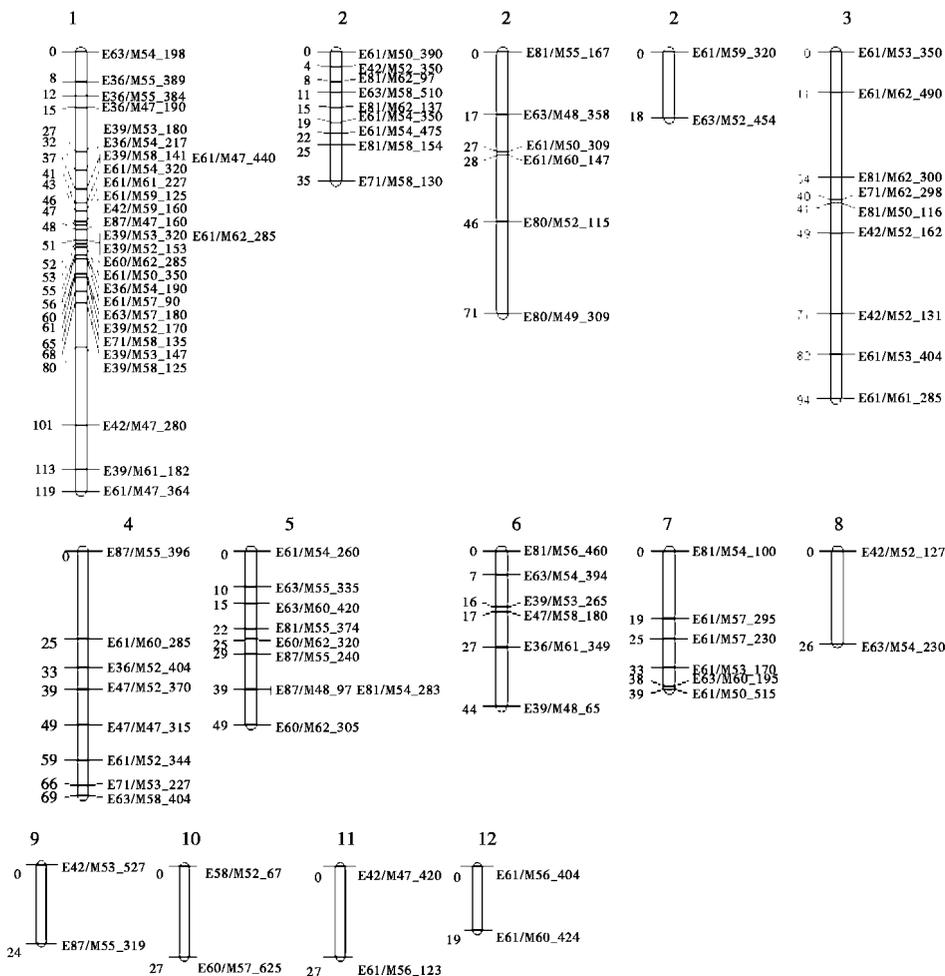


图 2 高粱的分子遗传图谱

Fig. 2 Molecular map of sorghum

3 讨论

3.1 图谱构建

当前用于构建高粱分子连锁图谱的主要分子标记有 RFLP, RAPD, AFLP 和 SSR^[7]。其中 AFLP 效率较高, 一对引物可以检测染色体上几十个位点的差异, 其扩增产物有更多和更稳定的多态性, 远远高于 RAPD 标记。由于试验条件不同而引起的 RAPD 标记具有多变性, 目前 RAPD 标记在构建遗传图谱方面还毫无价值^[8]。与 RFLP 技术相比, 在 AFLP 分析中显示多态性的 DNA 片段不是由于限制性内切酶酶切基因组 DNA 产生的, 而是通过 DNA 多聚酶链式反应(PCR) 扩增基因组 DNA 的模板产生的。研究表明: AFLP, RFLP, RAPD 这 3 种分子标记的多态性比率依次为 AFLP> RFLP> RAPD。SSR 标记往往在图谱中的标记间距比较大, 用 AFLP 技术可以扩增染色体末端标记, 填充空隙, 故 AFLP 标记技术在构建高密度的分子连锁图谱中无疑是一个非常有效的工具^[9]。目前, 国内外利用 RFLP, SSR, RAPD 等分子标记技术构建的高粱连锁图谱有几张^[10-12],

也有整合的图谱^[13]。但比较完整、权威的仅两张连锁图谱, 均出自于国外: 一张是 Menzetal (2002) 发表的以 AFLP 为主要标记, 包含 2 926 个标记位点的遗传图谱。该连锁图长度为 1 713 cM, 用 BTx623 XIS3620C 的 RIL 群体构建; 另外一张是 Bowersetal (2003) 发表了一张由 2 050 个同源和异源 RFLP 探针构成的, 连锁图长度为 1 059 cM^[3]。国内还无以 AFLP 标记建立连锁图谱的例子。此外, 由于本研究只采用 AFLP 标记, 很多 AFLP 标记聚集在一起, 相应地增加了聚集区以外的标记间距。从而形成比较大的空隙区域(gap)^[14]。有待于开发新的引物, 进一步加密图谱。

3.2 与高粱已构建的分子标记连锁图的比较和分析

本试验是用对蚜虫表现免疫的河农 16 和对蚜虫表现高感的千三做亲本材料进行杂交, 获得 F₂, 采用 AFLP 标记来构建高粱连锁图谱的。试验中的 192 个引物组合来自 www. sorghblast2. tamu. edu 网站, 利用亲本千三和河农 16 对这 192 对引物进行筛选, 选用 73 对多态性引物构建高粱的连锁图谱, 与

www.sorghblast2.tamu.edu 网站公布的高粱连锁图谱 (BTx623 和 IS3620C 的 RIL 群体构建) 比较, 结果表明: 在本试验定位到连锁图中的 93 个标记中, 70 个是已经定位在连锁群上的, 23 个是原来未定位在连锁群上的。而且本试验利用 AFLP 标记构建的连锁图谱与已有的高粱连锁图谱相比, 其标记位置及标记之间连锁距离存在较大差异, 其原因可能有以下四点: 其一, 构建的连锁图谱之间的差异与所用的亲本有关, 不同的品种之间基因组 DNA 存在差异, 使得酶切位点也不同, 所以利用同一引物在不同品种及其后代个体 DNA 中所扩增条带也有差异。本试验采用的亲本是千三和河农 16, 与 www.sorghblast2.tamu.edu 网站公布的图谱构建所用亲本 BTx623 和 IS3620C 在遗传上存在一定差异, 由此造成构建的高粱连锁图谱的不同。其二, 构建连锁图谱利用的作图群体不同也有可能在本构建的图谱间产生差异^[15], 一般常用的作图群体有测交群体、F₂群体、DH 群体、RIL 群体、BC₁群体等, 不同群体在构建时又各具其特点, 势必会影响其后图谱的构建工作, 影响程度尚不清楚; 其三, 作图群体大小是影响作图精度和作图效率的一个重要因子。群体越小, 图谱精度越低, 图谱的分辨率越差^[16]。选用群体的大小不同也会造成构建的连锁图谱有差异。其四, 构建图谱所用的标记数量多少也直接影响到图谱的密度和图谱覆盖基因组的长度。标记数量越多, 图谱密度就越高, 覆盖基因组越长。在本试验中构建了 12 个连锁群, 比 Menzetal(2002) 发表的高粱图谱多出 2 个连锁群, 随着标记密度的加大, 其中有些连锁群可能会连成一个连锁群。本试验构建的高粱图谱, 标记数量较少, 还有待于进一步开发新的引物, 增加标记数量, 加密此图谱。从这几点可以看出, 在接下来做抗蚜基因定位工作时, 如果利用原有的高粱图谱进行定位, 其精确度必然会降低。所以, 以对蚜虫表现免疫河农 16 和对蚜虫表现高感千三为亲本构建高粱的连锁图谱, 为高粱抗蚜基因的定位奠定了坚实的基础。

参考文献:

[1] Doggett H. Sorghum[M], 2nd edn. New York: Jhon Wiley &

Sons, 1988.

- [2] Taramino G, Tarchini R, Ferrario S, *et al.* Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in Sorghum bicolor [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 66–72.
- [3] 仪治本, 梁小红, 赵威军. 高粱基因组遗传图谱构建的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14 (2): 279–285.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D M. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407–4414.
- [6] 韩永亮, 常金华. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的两种染色方法对 SSR 标记的影响[J]. 杂粮作物, 2006, 26(3): 176–177.
- [7] Haussmann B, Hess D, Seetharama N, *et al.* Construction of a combined sorghum linkage map from two recombinant inbred populations using AFLP, SSR, RFLP and RAPD markers, and comparison with other sorghum maps [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(4): 629–637.
- [8] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰. 小麦株高近等基因系的 RAPD 标记研究[J]. 华北农学报, 2000, 15(1): 7–11.
- [9] 周延清. DNA 分子标记技术在植物中的应用[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2005: 99–100.
- [10] Boivin K, Deu M, Rami J F, *et al.* Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98(2): 320–328.
- [11] Menz M A, Klein R R, Mullet J E, *et al.* A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(5–6): 483–499.
- [12] 赵妹华, 李明莹, 邹剑秋. 高粱分子遗传图谱的构建[J]. 杂粮作物, 2005, 25(1): 11–13.
- [13] Dinakar Bhatramakki, Jianmin Dong, Ashok K Chhabra, *et al.* An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench [J]. Genome, 2000, 43(6): 988.
- [14] 王美, 张凤兰, 孟祥栋. 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.
- [15] 詹秋文. 高粱分子遗传图谱研究进展[J]. 安徽技术师范学院学报, 2005, 19(6): 12–17.
- [16] 朱玉芳, 谭远德, 万春玲, 等. 家蚕 AFLP 连锁框架图谱的构建[J]. 昆虫学报, 2001, 44(4): 483–493.