

利用 RAPD 标记构建美洲黑杨 × 欧美杨 分子标记连锁图谱

张新叶¹, 尹佟明¹, 诸葛强¹, 黄敏仁¹, 朱立煌²,
翟文学², 鄢荣领³, 王明麻¹

(1. 南京林业大学林木遗传和基因工程国家林业局重点实验室, 南京 210037; 2. 中国科学院遗传研究所植物
生物技术重点实验室, 北京 100101; 3. North Carolina State University, Raleigh, NC 98195 USA)

摘要: 本文利用 RAPD 标记和美洲黑杨 (*Populus deltoides*) × 欧美杨 (*P. euramericana*) 的 F₁ 群体, 构建了美洲黑杨 × 欧美杨的分子标记连锁图谱。实验过程中对 1040 个寡核苷酸随机引物进行了重复筛选, 共选出 127 个引物用于作图群体 (包括双亲共 92 个无性系) 的随机扩增, 这 127 个引物产生 229 个多态基因座, 其中符合“拟测交”1:1 分离的有 214 个。利用多点连锁分析, 形成 19 个连锁群及 6 个三连体和 14 个连锁对。由 19 个连锁群构成的图谱含标记 129 个, 总图距为 1914.2cM, 覆盖杨树基因组约 73.62%。标记间的平均间距为 14.84cM。本研究获得了中等密度的美洲黑杨 × 欧美杨的一个连锁框架。

关键词: 分子标记连锁图谱; RAPD; 美洲黑杨 × 欧美杨

中国分类号 S718.46 S792.11

文献标识码 A

文章编号 0253-9772(2000)04-0209-05

RAPD Linkage Mapping in a *Populus deltoides* × *Populus euramericana* F₁ Family

ZHANG Xin-ye¹, YIN Tong-ming¹, ZHUGE Qiang¹, HUANG Min-ren¹,
ZHU Li-huang², ZHAI Wen-xue², WU Rong-ling³, WANG Ming-xiu

(1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Institute of Genetics, Chinese Academy of sciences,
Beijing 100101, China; 3. North Carolina State University, Raleigh, NC 98195 USA)

Abstract: A molecular linkage map was constructed for the parents of a *P. deltoides* × *P. euramericana* F₁ family based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. A set of 1040 random oligonucleotide primers were screened and 127 primers were selected to generate RAPD markers within a sample of 90 F₁ progenies. A total of 229 segregating loci were identified. Among the 229 loci, 15 loci were found distorted from the normal 1:1 ratio. Using multiple analysis, the 214 markers formed 19 main Linkage groups (including 129 markers) and b triples and 14 pairs. The resulting Linkage map of *Populus deltoides* × *P. euramericana* (including 129 markers) spanned 1914.2cM (73.62% coverage of genome length) with an average distance of 14.84cM between markers.

Key words: molecular linkage map; RAPD; *Populus deltoides* × *P. euramericana*

杨树是当今世界中纬度平原地区栽培面积最广、木材产量最高的一个树种^[1]。在我国林业生产中, 杨树占有重要的地位, 目前我国杨树人工林已占全国人工林总面积的 1/5, 是世界各国杨树人工林总面积的 4 倍^[2]。杨树是林木遗传研究中比较好的

材料之一, 现已被作为一种模式树种用于林木分子生物学研究, 它具有丰富的遗传多样性, 容易进行种间杂交和无性繁殖, 生长迅速, 并已建立完善遗传转化系统, 基因组相对较小 ($2C = 1.2pg^{[5,6]}$), 染色体数目一致 ($2n = 38$), 易于进行遗传研究, 杨树是严格异

收稿日期: 1999-09-29; 修回日期: 2000-01-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助 (批准号: 39630230)

作者简介: 张新叶 (1973-), 女, 山西新绛人, 南京林业大学林木遗传育种专业硕士研究生, 现通信地址: 湖北省林业科学研究院, 邮编: 430075。

交树种,使位点组成高度杂合,有利于遗传图谱的构建。

鉴于杨树在林木研究和生产中占有重要地位,开展杨树遗传图谱构建研究不仅对于深入开展我国杨树遗传育种研究有重要意义,而且也将促进整个林木遗传研究的发展。本研究以美洲黑杨×欧美杨的 F_1 为材料,利用 RAPD 分子标记构建了遗传连锁图谱。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

作图群体为“三交”群体,以美洲黑杨 (*P. deltoides*) 为母本,欧美杨 (*P. euramericana*) 为父本,其 F_1 代均栽植于南京林业大学杨树育种圃内。从 400 个 F_1 无性系中随机抽取 90 个无性系,包括亲本共 92 个无性系作为作图群体。

1.2 DNA 提取

取新鲜叶片 0.1g 于液氮中迅速研磨成粉末,转入预热的 600 μ l CTAB 提取液 (10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, pH8.0, 1.4mol/L NaCl, 1% CTAB, 5% PVP, 350mmol/L β -mercaptoethanol) 中,于 65 $^{\circ}$ C 下水浴 30min,并不时摇匀振荡;取出样品冰浴至室温加入氯仿:异戊醇 (24:1),充分振荡离心 10 分钟 (10 000r/min),取上清加入等体积的异丙醇或 2 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀,-20 $^{\circ}$ C 冰冻 2h;离心弃水相留沉淀使其自然风干;加 500 μ l TE 溶解沉淀,用等体积饱和酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提一次和氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提两次后,加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc pH5.2 和 2 倍体积的无水乙醇;置 -20 $^{\circ}$ C 冰冻 2h,离心后将沉淀用 70% 乙醇洗 2 次,风干后溶于适量 TE 中保存。

1.3 RAPD 扩增

RAPD 扩增在 Perkin-Elmer9600 扩增仪上进行。反应总体积为 20 μ l:20ng 左右模板 DNA;引物 0.5 μ mol/L;Taq 酶 1.0U (中国农大生物技术实验室产品);dNTP 各 200 μ mol/L;2.0 μ l10 倍反应溶液 (100 μ mol/L Tris-Cl, pH8.3, 500mmol/L KCl, 22.5mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 5.0g/L BSA)^[3]。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,然后进入循环,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,40 $^{\circ}$ C 复性 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,共 38 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min,结束后保存在 4 $^{\circ}$ C 条件下。扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶检测分析。

实验所用的 RAPD 扩增引物购自美国 Operon 公

司。

1.4 引物筛选

用 1 个 DNA 样品对 1040 个寡核苷酸随机引物进行初筛,筛选出有扩增产物的引物;然后用 8 个 DNA 样品 (双亲及 6 个子代) 对有产物的引物进行复筛,即筛选在双亲及 F_1 中存在多态性的引物,利用筛选出的具有稳定多态的引物对 92 个 DNA 样品进行 PCR 反应,获得 RAPD 标记。

1.5 连锁分析与图谱构建

RAPD 扩增产物经电泳检测后,进行数据收集,根据带的有无分别赋值为“1”和“0”,模糊不清或数据缺失者赋值为“-”。利用 χ^2 检验,符合 1:1 分离的 RAPD 标记用于图谱构建,对所得数据均进行互补复制,采用 MAPMAKER/EXPL1.1 软件^[7],在苹果机上对该作图群体进行图谱构建。先利用两点分析,计算所有成对座位的最大重组率和最小 LOD 值,推测可能的连锁群,要求最小 LOD \geq 4.0,最大重组率 \leq 0.25。然后对每个连锁群中的标记进行多点分析,确定最大的似然图谱,并根据 Kosambi 函数^[8],将重组率转换成图距单位 (centimorgan, cM)。

2 试验结果

2.1 引物筛选

通过对 1040 个 RAPD 随机引物的初筛和复筛,结果共获得 127 个有稳定多态且带型清晰的引物。这 127 个多态性引物共扩增出 229 个多态片段。片段大小在 140bp 至 2600bp 之间,平均每个引物产生 1.8 个多态片段。

2.2 RAPD 标记在美洲黑杨×欧美杨群体中的分离

利用 127 个多态性引物对作图群体的 92 个 DNA 样品分别进行 PCR 扩增,结果获得 229 个有分离的 RAPD 标记。经 χ^2 检验,有 15 个标记不符合 1:1 分离,符合 1:1 分离的 214 个 RAPD 标记又可分成 4 种类型:第一类有 90 个标记,其分离谱带来自母本美洲黑杨;第二类有 45 个标记,分离谱带则来自父本欧美杨;第三类有 54 个标记,分离谱带在双亲中皆不表现,而在子代中呈 1:1 分离;第四类有 25 个标记,分离谱带在双亲中皆表现,但在子代中不按 3:1 分离,而呈 1:1 分离。图 1 显示了引物 AL₄₂ 产生标记的分离情况。

2.3 遗传连锁图谱构建

本研究进行连锁分析的 RAPD 标记共有 214

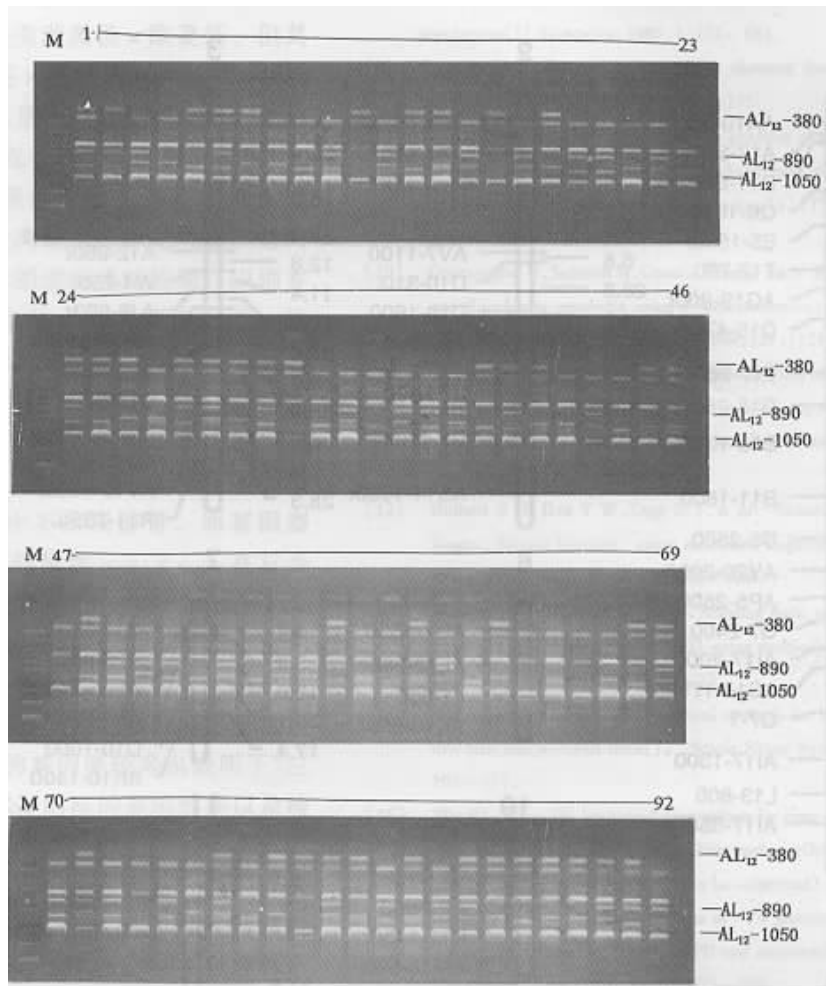


图 1 RAPD 标记在美洲黑杨 × 欧美杨 F_1 群体中的分离

个。虽然在林木作图中有利用偏分离基因座的,如 Bradshaw 等在杨树作图^[9]和 Grattapaglia 等在桉树^[10]作图中都利用了偏分离的 RAPD 标记,但本研究对不符合孟德尔遗传分离规律的标记没有纳入连锁分析,只是按拟测交策略^[11,41],把符合 1:1 分离的基因座用于连锁分析。

采用 MAPMAKER/ EXP1.1 软件^[7],设置最小 LOD 值为 4.0 和最大重组率为 0.25,在苹果机上对 214 个 RAPD 标记进行连锁分析和图谱构建。结果有 129 个标记构成了 19 个连锁群(图 2)。在这 129 个 RAPD 标记中也表现为 4 种类型组成:第一类有 57 个标记;第二类有 24 个标记;第三类有 26 个;第四类 14 个标记。由于标记数量有限,使若干三连体和连锁对暂时未能进入连锁群。这 19 个连锁群构成的图谱总图距为 1914.2cM,最长连锁群达 417.5cM,最短的长 22.6cM。标记间的平均图距约为 14.84cM。根据 Bradshaw 等利用的 Halbert 等^[12]方法估计的杨

树基因组长度 2400 - 2800cM,如取其平均值为 2600cM,那么本研究构建图谱的总长度覆盖基因组约为 73.62% (1914.2cM/2600cM)。

3 讨论

目前国内外在林木遗传图谱研究中一般采用拟测交策略,即分别构建父本和母本两张不同的连锁图,它不能把基于不同亲本的连锁图整合到一张图上,主要是因为缺少足够的信息,而使在亲本 1 中分离而在亲本 2 中固定的分子标记不能与在亲本 2 中分离而在亲本 1 中固定的分子标记关联起来。而通过那些在双亲中均分离的标记,可以使两张图连结成一体^[13]。如果利用共显性标记作为连结桥梁,Wu 等在这方面作了较为深入的阐述^[14]。若利用显性标记(如 RAPD)来连结,需借助马尔可夫链(Markov chain)过程来完成^[15],本研究用该方法将两张图整合为一张图,这在林木作图研究中尚不多见。

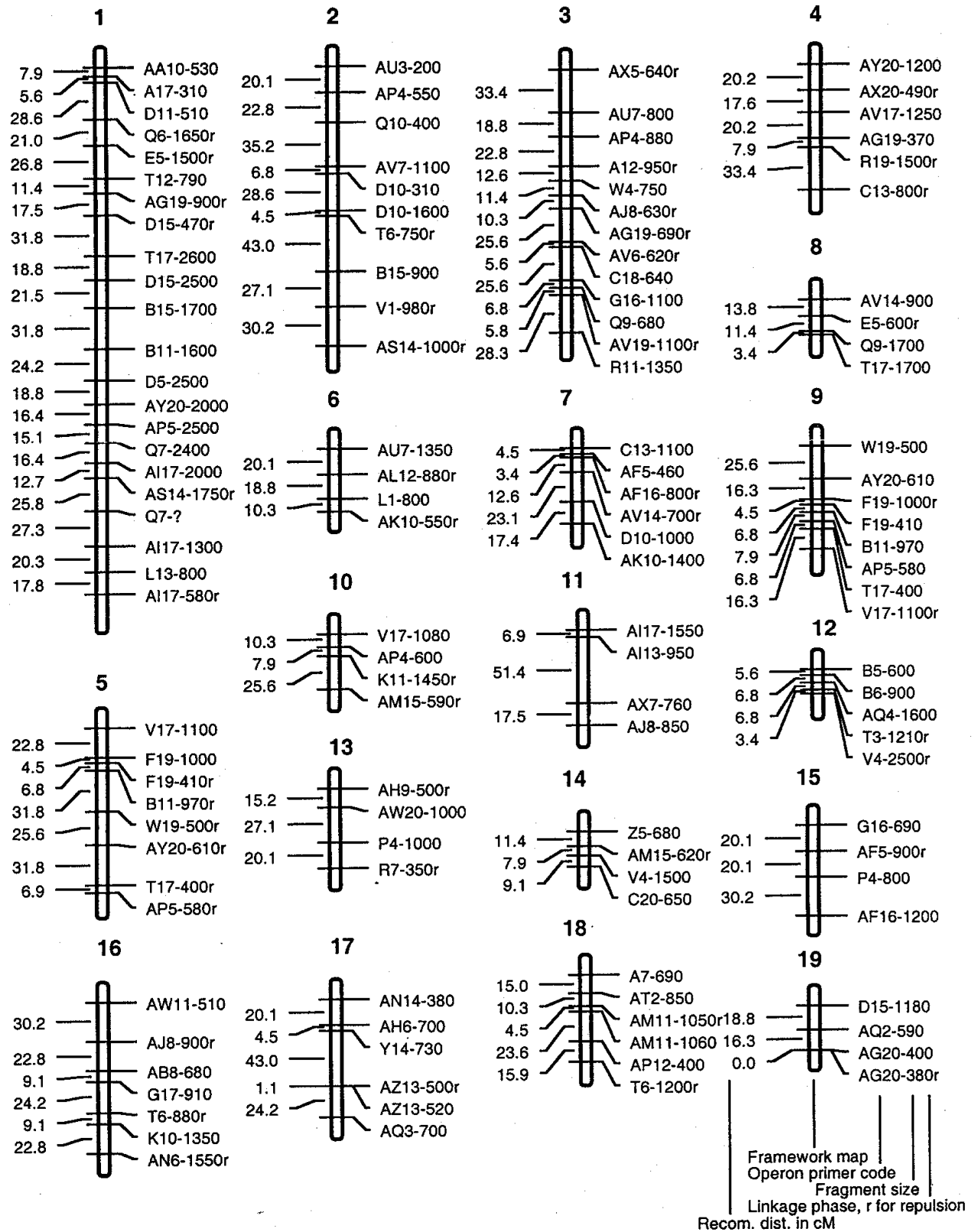


图2 美洲黑 (*P. deltoides*) × 欧美杨 (*P. euramericana*) 遗传连锁图谱

本研究的作图群体是美洲黑杨 × 欧美杨,但其父本欧美杨又是美洲黑杨 × 欧洲黑杨的一个杂种,所以该群体更确切一点说是一个“三交”群体。正因为如此,在 RAPD 分析过程中产生了多种标记类型,其中包括在双亲中均发现谱带和在双亲中均无谱带,但在子代中呈 1:1 分离这两种标记类型。这两类标记均能作为两张亲本图谱的连结桥梁,识别并连结两个亲本的同源染色体,实现两张图的一体化。同时经用其它分离标记的检测,这两类标记在双亲不表现差异,但在子代中呈现 1:1 分离模式,是由于存在多等位基因引起的。假设在一个基因座上存在 4 个不同等位基因 a_1 、 a_2 、 a_3 和 a_4 ,基因型 a_1a_2 和 a_3a_4 在电泳分析中不出现谱带,而基因型 a_1a_3 和 a_2a_4 出现谱带。这样虽然 $a_1a_2 \times a_3a_4$ 在双亲中不出现谱带,但子代呈现 1:1 分离; $a_1a_3 \times a_2a_4$ 在双亲中出现谱带,但子代中亦呈 1:1 分离。这两类标记均可作为两个亲本谱带的连结桥梁。从已发表的林木遗传图谱中,这些类型的基因座是首次报道。在本研究中,此类型的基因座较多也说明了“三交”(tripcross)群体在分离基因座的显示效率以及检测复等位基因分离方面具有高效性。

随着多种遗传标记方法的逐步完善和发展,人们正在努力探索应用多种遗传标记进行基因组研究。在林木中已有相应的图谱构成^[9,16,17]。随着林木遗传图谱构建的深入研究,其使用价值将日益提高,使用范围也将不断扩大,将对林木遗传和育种研究产生深远的影响。

参 考 文 献:

- [1] 徐纬英主编. 杨树[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社,1988.
- [2] 苏晓华,张绮纹,等. 美洲黑杨 × 青杨分子标记连锁图谱的构建[J]. 林业科学,1998,34(6):29~37.
- [3] 尹佟明,黄敏仁,等. 利用 RAPD 标记和单株树大配子体构建马尾松的分子标记连锁图谱[J]. 植物学报,1997,39(7):607~612.
- [4] 尹佟明,黄敏仁,朱立煌. 利用显性分子标记和 F_1 群体进行林木遗传连锁图谱的构建[J]. 生物工程进展,1996,16(4):12~16.
- [5] Bradshaw H D, Steller R F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 301~307.
- [6] Dhillon S S. DNA in tree species. In: Bonga J M, Durzon D J (eds). Cell and tissue culture in forestry vol 1[C]. The Netherlands Martinus Nijhoff pub, Dordrecht, 298~313.
- [7] Lander E S, Green P. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic Linkage maps of experimental and natural

populations[J]. Genomics, 1987, 1: 174~181.

- [8] Kosambi D D. The estimation of map distance from recombination values[J]. Ann Eugen, 1944, 12: 172~175.
- [9] Bradshaw H D, Jr, Villar M. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 167~178.
- [10] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross: Mapping strategy and RAPD markers[J]. Genetics, 1994, 137: 1121~1137.
- [11] Grattapaglia D and Sederoff R. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 933~947.
- [12] Hulbert S H, Iltott T W, Legg E J, et al. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphism[J]. Genetics, 1998, 120: 947~958.
- [13] Maliepaard C, Alston F H, et al. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill) using multi-allelic markers[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 60~73.
- [14] Wu RL, Liu HX, Han YF. Statistical methods for mapping quantitative trait loci in forest trees[J]. Scient Silvae Sini, 1999, 35(2): 101~117.
- [15] Wu RL, Zeng ZB. Statistical algorithms for gene mapping in forest trees using biallelic and microsatellite markers: Ordering markers on genetic maps[J]. For Sci 1999, (to be submitted).
- [16] Devey M E, Bell J C, Smith D N, et al. FA genetic Linkage map for *pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92(6): 673~679.
- [17] Mukai Y, Suyama Y, Tsumura Y, et al. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD, and isozyme loci[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 835~840.

欲知遗传学进展 请阅《遗传》杂志

《遗传》杂志(刊号:ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)为中国科学院遗传研究所和中国遗传学会共同主办的科技期刊(双月刊),全国自然科学核心期刊。主要报道人类与医学遗传、动植物遗传与育种及分子与微生物遗传等领域的最新成果与进展。主要栏目有:研究报告、技术与方法、争鸣与讨论、遗传学教学、综述与专论、重点实验室介绍、品种介绍、成果交流、会议信息、图书信息等。读者对象为基础医学、生物制药、农林牧渔、细胞学、生物化学、生物技术等专业的科研、教学、开发、管理人员,大专院校生物系师生与中学生物教师等。欢迎供稿,欢迎订阅,欢迎刊登广告。

2001年起,《遗传》改为大16开本,80页,每期定价10.00,全年60.00元。国内外公开发行,国内邮发代号:2-810,国外发行代号:BM62。