

## 利用 AFLP 标记构建家蚕分子连锁图谱

万春玲<sup>1</sup>, 谭远德<sup>1,2</sup>, 朱玉芳<sup>1</sup>, 贺一原<sup>4</sup>, 鲁成<sup>3</sup>, 周择扬<sup>3</sup>, 向仲怀<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; <sup>2</sup>湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081;

<sup>3</sup>农业部蚕桑学重点实验室, 西南农业大学蚕桑学院, 重庆 400716; <sup>4</sup>中国农业科学院蚕业科学研究所, 镇江 212018)

**摘要:** AFLP 技术构建了家蚕分子标记连锁图谱, 在扩增中使用了 18 组双引物及两个单引物在家蚕品系 782 和 *od* 100 的回交后代中得到了 1177 个扩增位点, 有 359 个非分离位点, 818 个分离位点。分离位点中有 292 个位点符合孟德尔 1:1 分离比例。用 MAP-MAKER 软件将 292 个标记位点及形态标记基因 *od* 分成 26 个连锁群, 19 个二联体及 81 个未进入连锁关系的标记。每个连锁群包含 3~14 个标记。平均为 6.5 个标记。该连锁图总图距为 3285.5cM。标记间平均距离为 20.0cM。形态标记 *od* 被定位于该图谱中 3 号连锁群上, 而 *od* 基因位于家蚕 Z 染色体上, 故可确定该分子标记连锁群对应于传统的家蚕形态标记图谱中的 Z 染色体。

**关键词:** 家蚕; 分子标记连锁图; 扩增片段长度多态性; 回交

**中图分类号:** S881.2; Q755 **文献标识码:** A **文章编号:** 0578-1752(2001)03-0338-04

## Construction of Molecular Map of the Silkworm (*Bombyx mori*. L.) Using AFLP Markers

WAN Chun-ling<sup>1</sup>, TAN Yuan-de<sup>1,2</sup>, ZHU Yu-fang<sup>1</sup>, HE Yi-yuan<sup>4</sup>, LU Cheng<sup>3</sup>,  
ZHOU Ze-yang<sup>3</sup>, XIANG Zhong-huai<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097;

<sup>2</sup>College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081;

<sup>3</sup>Key Lab of Agricultural Ministry, College of Sericulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716;

<sup>4</sup>Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Zhenjiang 212018)

**Abstract:** An AFLP linkage map of *Bombyx mori*. L. was constructed using *Pst* I and *Taq* I to digest genome DNA and 18 primer combinations and 2 single primers. 1177 clear polymorphic bands in the BC<sub>1</sub> population of No. 782 and *od* 100 cross were detected. Of which 292 bands fell the expected segregation ratio of 1:1 at P=0.05 level. The "GROUP" command (LOD 2.5, maximum recombination value 0.3) was used to segregate these 292 informative markers into 26 linkage groups. The "COMPARE", "TRY", "ORDER", "RIPPLE" commands were used to map markers per group typing error was detected using ERROR DETECTION option. Map distance between neighboring loci was calculated using the Kosambi mapping function. The AFLP map consists of 169 loci and the *od* gene, and the total length of the map is 3285.5 cM. Linkage group 3 on our map corresponds to chromosome Z on the conventional linkage map due to the *od* gene.

**Key words:** Silkworm; Molecular linkage map; AFLP; Backcross

遗传图谱的构建在过去的十几年里由于分子标记系统的出现而大大得到加强。这些系统的出现提高了检测 DNA 多态性的效率, 并构建了大量高密度的遗传图谱。在家蚕遗传图谱构建方面, Gold-

smith 等<sup>[1]</sup>得到了 16 个连锁群和 8 个非连锁的 RFLP 标记图谱。Promboon 等<sup>[2]</sup>利用 RAPD 技术对家蚕品种 C108 和 P50 杂交产生的 F<sub>2</sub> 代个体得到了 168 个 RAPD 标记, 这些标记构成了 29 个连

收稿日期: 1999-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870568)、重点项目(39730730), 江苏省科委(A1078)和省教委(21075)自然科学基金课题资助项目

作者简介: 万春玲(1974-), 女, 江苏淮阴人, 博士生, 从事人类遗传学研究。现联系地址为中国科学院遗传研究所, 北京, 100101。Tel: 010-64880089; Fax: 010-64880089; E-mail: clwan@genetics.ac.cn

锁群,总长达 900cM。AFLP 标记由于其稳定、方便和高效多态检出率特性而被广泛应用于分子生物学各个研究领域。现已有 10 多个物种构建了 AFLP 连锁图谱,但家蚕的 AFLP 连锁图谱国内外迄今未见报道,本研究将报道第一张 AFLP 标记家蚕连锁图谱的构建。

## 1 材料与方 法

### 1.1 家蚕材料

利用生态型差异较大的两个家蚕品系 782(由四川省重庆市北碚蚕种场提供)和 *od* 100(由西南农业大学蚕桑研究所基因库提供)作正反杂交,得到  $F_1$ ,  $F_1$  雄蚕与带 *sch* 和 *od* 双隐性标记的 *od* 100 回交,得到 10 多个蛾圈的回交子代,每个蛾圈 100 到 300 个个体 [这部分工作在西南农业大学,广西蚕业研究所(春蚕,原种繁殖和  $F_1$  制种)和西安安康蚕研所(夏蚕,  $BC_1$  制种)完成]。谭远德等(1998)<sup>[3]</sup>在这一回交群体中使用 *sch* 和 *od* 两对标记基因将影响全茧量和茧层量的两个 QTL 定位于 Z 染色体上。本研究所用材料是在回交群体中以锚定 *od* 基因方式随机抽取的 47 个个体(样本大小取决于凝胶胶板大小和电泳泳道数,在此小样本中难以根据这两个标记基因连锁图距锚定 4 种基因型的个体,因此本研究未考虑 *sch* 标记类型)。

### 1.2 基因组 DNA 的制备

参考 Sambrook 等<sup>[4]</sup>的方法,通过重复多次 DNA 提取过程,提取蚕蛹基因组 DNA。

### 1.3 人工接头与引物

人工接头序列为:

5'-G A CGTGACGGCCGTC ATGCA-3'  
3'-GCACTGCCGGCAG T-5'

*Pst* I adapter

5'-GA CG ATGAGTCCTGA G-3'  
3'-TACTCAGGACT CGC-5'

*Taq* I adapter

引物序列为:

Primer-*Pst* I -1 5' GACGGCCGTCA TGCAG A 3'  
Primer-*Taq* I -1 5'GATGAGTCCTGAG CGA A 3'  
Primer-*Pst* I -2 5' GACGGCCGTCA TGCAG ANN 3'  
Primer-*Taq* I -2  
5' GATGAGTCCTGAG CGA ANN 3'

### 1.4 AFLP 模板制备、酶切片段扩增与凝胶分析

主要实验操作参见文献[5,6]。

### 1.5 连锁分析

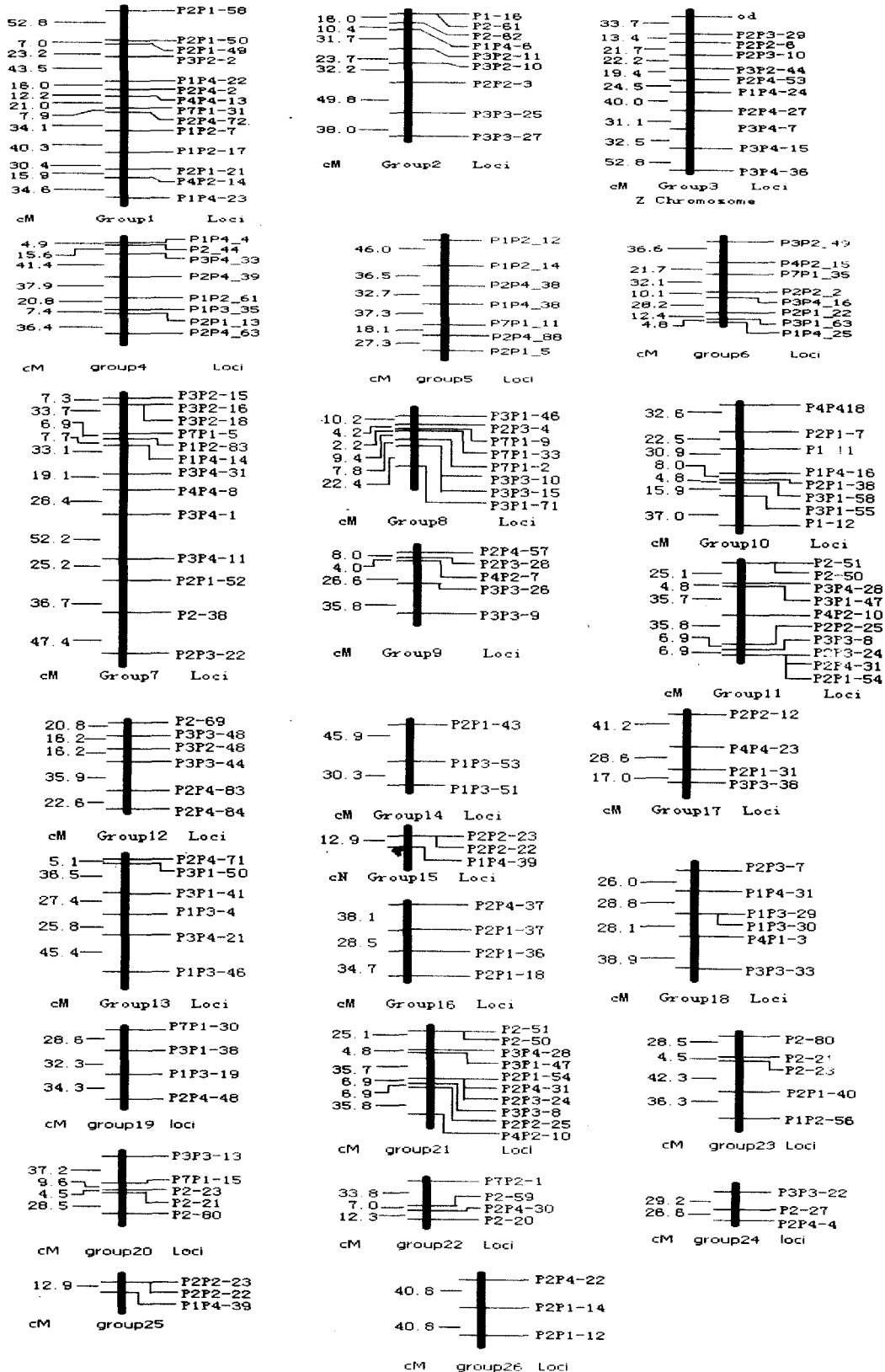
根据变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,将  $BC_1$  个

体电泳带型的有无分别赋值为“H”和“A”,带型不清或数据缺失赋值为“-”。利用 Excel 统计软件,依据  $\chi^2$  检测删除偏分离的位点。对回交子代群体中符合 1:1 分离位点,应用 Mapmaker/Exp(Version3.0b)作连锁分析。参数设置如下:两点分析的最小 LOD 值 > 2.5,最大重组值为 0.35,分析模型按回交群体进行。采用软件中的“compare”、“order”、“try”等命令对同一连锁群上的位点进行合理排序,用“map”命令计算出位点之间的重组值,通过 kosambi 函数转换成图谱距离。

## 2 结果与分析

经 18 组双引物及两个单引物扩增,共获得 1177 个扩增位点,其中有 359 个非分离位点,818 个分离位点。用  $\chi^2$  检验,在 95% 的置信水平上有 292 个位点符合孟德尔分离比例,偏分离位点占 64.3%。而 Voorrips 等用 AFLP 作 Clubroot 的连锁图谱时得到 64% 的偏分离位点<sup>[7]</sup>。我们用 MAPMAKER 分析软件中的“group”命令,取 LOD > 2.5,最大重组值为 0.3,将 292 个位点分成 26 个连锁群,21 个二联体和 81 个没有连锁关系的标记。使用“compare”、“ripple”和“try”命令将连锁群内的非连锁标记插入到各连锁群上,然后用“ERROR DETECTION”命令对作图结果进行错误检测,得到了 26 个连锁群的家蚕 AFLP 遗传图谱。该连锁图中平均每个连锁群包含 6.5 个标记,总图距为 3285.5cM(图 1)。本研究还将家蚕的 *od* 基因定位于 3 号连锁群的端部。相邻标记是 P2P3-29,两位点间距离为 33.7 cM。由于 *od* 基因位于家蚕经典连锁图谱的 Z 染色体上,因此 3 号连锁群为 Z 染色体(图 1)。谭远德等已将影响家蚕全茧量  $q(w)$  和茧层量  $q(wc)$  的位点定位于 *od* 基因的两侧<sup>[8]</sup>,这样,影响家蚕  $q(w)$  和  $q(wc)$  的位点通过 *od* 基因可被定位于该 3 号连锁群上。由于对家蚕赤蚁基因(*sch*)未能进行定位,所以这两个数量性状位点在 3 号连锁群中具体位置还不能确定,但可在此图谱基础上构建高密度 AFLP 标记图谱和进行形态基因与 QTL 定位。

本研究采用的作图群体为回交一代群体,得到的标记位点均来自非回交亲本。用回交群体作图可克服由于家蚕雌不发生交换所带来的  $F_2$  群体作图不能检测亲本中互斥位点连锁关系的缺陷,而且目前通用的一些作图软件均未考虑雌不发生交换对使用  $F_2$  群体作图所产生的影响<sup>[8]</sup>。小群体作图虽然会导致偏分离位点比例较高、可检测到的最大遗传距



连锁群 3 确定为性连锁群,即 Z 染色体,连锁群右为标记名称,左为标记间的距离。标记用引物名称和该标记对应条带在凝胶上的序号表示,其中第一个 P 表示 *Pst*I 对应的引物,第二个 P 表示 *Taq*I 对应的引物

Linkage group3 was determined to be a sex linkage group1, Z chromosome. The loci are listed on the right of the linkage groups and the Kossambi Centimorgan distances on the left. The name of locu corresponding to *Pst*I and the second P, the one corresponding to *Taq*I

图 1 家蚕的 AFLP 连锁图谱

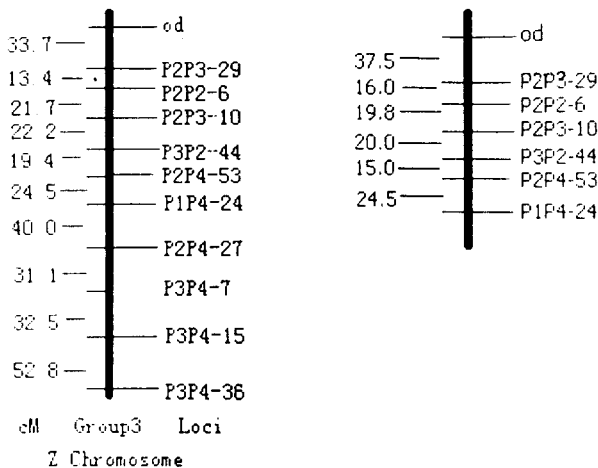
Fig. 1 Linkage map of AFLPs in *B. mori*

离较小、可分辨的最小遗传距离较大及连锁图谱距离精度偏低的问题,但用 AFLP 标记作图,扩增的电泳带谱极为丰富,大群体作图需要使用多个电泳胶板,在一般实验中会由于电压、温度、电泳缓冲液等系统误差及人为误差而导致胶板间同一电泳带谱间难以找到对应关系,降低判读的准确性,造成大量的错误位点,即假位点,这样所构建的将是一张假连锁图谱。本研究使用 47 个个体的作图群体,在同一电泳胶板上检测多态位点。在已构建的分子标记连锁图谱中,有许多是采用小样本作图群体的<sup>[8]</sup>。为探讨小群体对遗传作图精确性的影响,我们再从 47 个回交个体中随机取含有油蚕基因的正常与隐性个体 34 个,且确定它们的比例为 1:1,然后用  $\chi^2$  检测这 34 个个体的 292 个位点,对满足 1:1 的位点用 MAPMAKER 软件在 LOD 值为 2.9 的情况下作图分析,结果原来 3 号连锁群中 6 个相连锁的标记和 *od* 基因仍然连锁。这 6 个标记是 P1P4-24、P2P2-6、P2P3-10、P2P3-29、P2P4-53、P3P2-44。两幅图中这些标记不仅顺序一致,且位点两两之间的距离也十分接近(图 2)。这说明在一大群体中随机抽取相对小群体虽然对位点间的连锁群关系有所改变,但对位点的连锁排序关系没有影响,对较紧密连锁位点的图距影响较小。虽然日本已报道了家蚕高密度 RAPD 标记连锁图谱,以及用 RAPD、RFLP 和同工

酶等标记整合的连锁图谱,但本研究所构建的图谱是目前国际上第一家蚕 AFLP 标记框架图谱。由于 RAPD 和同工酶标记受实验和环境因素影响较大,因此用其所标记连锁图谱的可靠性远不如 RFLP 和 AFLP 标记连锁图谱。用 RFLP 标记作图受技术和可检测位点的限制,因而在家蚕作图工程中进展不大。AFLP 作图可靠性和效率都高,可在短时期内获得大量的标记位点,因此是一种功能极强的作图工具。我们可在 AFLP 标记框架图谱上提高位点的密度,才有可能对具有重要经济价值的 QTL 和家蚕抗病基因进行精确定位,得到与 QTL 和抗病基因有连锁关系的 AFLP 标记,据此辅助育种。

### References:

- [1] Goldsmith M R, Shi J. A molecular map for the silkworm: constructing new links between basic and applied research [A]. *Silk: Biology, Structure, Properties and Genetics* [M]. American Chemical Society Symposium Series, 1994.
- [2] Promboon A, Shimada T, Fujiwara H, et al. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *L. Genet. Res. Camb.* 1995, 66:1-7.
- [3] Tan Y D, Li F D, Lu C, et al. Localization of silkworm QTL by application of frequency distribution method [J]. *Journal of Biomathematics*, 1998, 13(1): 97-103. (in Chinese) 谭远德,李发德,鲁成,等.应用频数分布面积法定位家蚕 QTL [J]. *生物数学学报*, 1998, 13(1): 97-103.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Wan C L, Tan Y D. An improved method for AFLP [J]. *Journal of Nanjing Normal University*, 1999, 22(2): 88-91. (in Chinese) 万春玲,谭远德. AFLP 的一种改进方法 [J]. *南京师范大学学报*, 1999, 22(2): 88-91.
- [6] Wan C L, Zhu Y F, Tan Y D, et al. Application of AFLP markers in genetic polymorphic loci of silkworm (*Bombyx mori*. L.) [J]. *Biotechnology*, 1999, 9(5): 4-9. (in Chinese) 万春玲,朱玉芳,谭远德,等. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用 [J]. *生物技术*, 1999, 9(5): 4-9.
- [7] Voorrips R E, Jongerius M C, Kanne H J. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 94: 75-82.
- [8] Tan Y D, Wan C L, Lu C, et al. Maximum likelihood method for mapping dominant-recessive molecular markers of lepidopteran species without genetic recombination in female using  $F_2$  population [J]. *Journal of Biomathematics*, 2000, 15(2): 180-188. (in Chinese) 谭远德,万春玲,鲁成,等.用  $F_1$  雌不发生交换的  $F_2$  群体作图显隐性分子标记连锁图谱的极大似然(ML)法 [J]. *生物数学学报*, 2000, 15(2): 180-188.
- [9] Keim P, Schupp J M, Travis S E, et al. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers [J]. *Crop Sci.* 1997, 37: 537-543.



左图是基于 47 个个体构建的连锁群,右图是基于 34 个个体构建的连锁群

The map in the left is performed on a 47 backcross progenies and the right on a 34 backcross progenies

图 2 作图群体的大小对作图的影响

Fig. 2 The effect of sample size on mapping