

桃分子连锁图的构建与分析

吴俊^{1,3} 束怀瑞¹ 张开春^{2*} 姜立杰² 周晓航² 辛翠花²

(¹ 山东农业大学园艺学院, 泰安 271018; ² 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093; ³ 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 以‘大久保’与‘兴津油桃’杂交的 F₂ 代 109 株群体为试材, 采用 AFLP、RAPD、SSR 分子标记进行遗传分析。筛选扩增稳定、多态性丰富的 36 对 AFLP 引物、3 对 SSR 引物、2 对 RAPD 引物进行群体分离分析, 获得分离标记 136 个, 卡方检验 27 个标记偏离孟德尔分离比例。应用 Mapmaker 分析软件将符合孟德尔遗传分离比例的标记构建了包含 11 个连锁群的连锁图谱, 每个连锁群包含 3~21 个标记, 平均为 8.73 个标记。该图谱覆盖基因组 1061.8 cM, 11 个连锁群的平均长度为 96.5 cM, 标记间平均图距为 11.0 cM, 与果实毛/油桃 (G/g)、白/黄肉 (Y/y) 连锁的 RAPD 标记、非酸/酸 (D/d) 性状连锁的 AFLP 标记分别定位在第 3、7、9 连锁群上。

关键词: 桃; 连锁图谱; AFLP; RAPD; SSR

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 05-0593-05

Construction and Analysis of Peach Genetic Map

Wu Jun^{1,3}, Shu Huairui¹, Zhang Kaichun², Jiang Lijie², Zhou Xiaohang², and Xin Cuihua²

(¹ College of Horticulture, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China; ² Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China; ³ College of Horticulture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A linkage map of peach was constructed with AFLP, SSR and RAPD markers in 109 F₂ population derived from the cross of ‘Okubo’ and ‘Xingjin’ nectarine. The selected primers including 36 AFLP, 3 SSR and 2 RAPD with rich polymorphism and steady bands were tested in progeny. 136 markers were scored, of which 27 markers were skewed segregation by χ^2 test. Mapmaker were used to assigned the expected segregation markers to 11 linkage groups, the number of loci mapped in the 11 linkage group was 3 - 21 and there was 8.73 (average value) loci per group. Whole length of linkage map was 1061.8 cM, The average length of 11 groups was 96.5 cM, and average interval between markers was 11.0 cM. RAPD markers linked to G/g, Y/y and AFLP markers linked to D/d gene were located in group 3, group 7 and group 9 respectively.

Key words: Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]; Linkage map; AFLP; RAPD; SSR

关于桃的遗传连锁图国外已有多篇报道^[1~4], 但就目前发表的图谱来看群体数目都比较小, 许多标记不能定位在连锁图上。作者利用‘大久保’和‘兴津油桃’杂交的 F₂ 代 109 株群体, 构建由 AFLP (扩增片段长度多态性, Amplified Fragment Length Polymorphism)、RAPD (随机扩增长度多态性, Random Amplified Polymorphic DNA)、SSR (简单序列重复, Simple Sequence Repeat) 标记组成的遗传图谱, 旨在丰富分子标记资料, 构建较高密度的分子遗传图, 为重要性状基因定位奠定基础。

1 材料与方法

以‘大久保’ [*Prunus persica* (L.) Batsch ‘Okubo’] 与‘兴津油桃’ [*P. persica* (L.) Batsch

收稿日期: 2003 - 11 - 04; 修回日期: 2004 - 05 - 08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270921); 北京科技合同项目 (954830300); 北京市科技新星计划资助项目 (95382200)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangkaichun@baafs.net.cn)

var. *nectarina* Maxim 'Xingjin') 杂交获得 F_1 代植株京玉, 京玉自交得到 F_2 代群体 350 株, 随机选取 109 株作为构图群体。取春梢或秋梢幼嫩叶片, 采用 CTAB 法^[6]提取基因组 DNA。采用本实验室建立的桃 AFLP 分析体系^[6], 扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染法检测。AFLP 扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成, 核心序列为 Mse : 5' GATGAGTCCTGAGTAA-NNN3'; EcoR : 5' GACTGCGTACCAATTC-NN3' 或 5' GACTGCGTACCAATTC-NNN3' (N 为选择性碱基)。

RAPD 反应随机引物购自上海生工。扩增反应体系为 15 μL , 包括 1.5 μL dNTP (2.5 mmol L^{-1}), 1.5 μL 10 \times PCR buffer, 1.2 μL MgCl_2 (25 mmol L^{-1}), 1.5 μL 随机引物 (7.5 ng μL^{-1}), 20 ng 模板 DNA, ddH₂O 补足体积。反应扩增条件为: 94 40 s, 36 90 s, 72 2 min, 39 个循环, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测分析。

根据已发表的桃 SSR 引物序列合成引物 (在上海生工完成)。扩增反应体系为 20 μL , 包括 1.6 μL dNTP (2.5 mmol L^{-1}), 2.0 μL 10 \times PCR buffer, 1.2 μL MgCl_2 (25 mmol L^{-1}), 正负链引物各 7.5 μL (10 mmol L^{-1}), 20 ng 模板 DNA, ddH₂O 12.5 μL 。94 30 s, 55 60 s, 72 60 s, 35 个循环, 扩增产物先用 4% 琼脂糖凝胶检测, 如检测不到多态性则用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

根据软件 Mapmaker/ Exp 3.0 的要求, 将各标记的分析结果转换为符号形式。 F_2 单株带型按亲本类型归类, 用 'A' 代表来源于父本 (P_2) 的隐性纯合标记, 'C' 代表相应的显性纯合标记和杂合标记, 'B' 代表来源于母本 (P_1) 的隐性纯合标记, 'D' 代表相应的显性纯合标记和杂合标记, 'H' 代表杂合标记, 带型不清或数据缺失者记为 '-'。调用转换的数据文件。设定 LOD 3.0, 重组率

0.4, 使用 group 命令推测可能的连锁群, 然后利用三点和多点分析构建连锁群, 采用 compare 和 try 命令对连锁群的标记排序, map 命令作图。作图后, error detection 命令用以检测误差, 错误检测水平设为 1%。使用函数 Kosambi^[7], 将重组率转成遗传距离 (cM)。

2 结果与分析

2.1 亲本的多态性分析

采用 128 对 AFLP 引物在两亲本间扩增, 所有引物均可扩增出清晰可辨的带型, 扩增条带总数为 9867, 平均每对引物产生 77 条扩增条带。其中 94 对引物在两亲本间表现多态, 比率为 73.4%, 获得多态性标记 273 个, 包括与果实非酸/酸性状连锁的 2 个 AFLP 标记^[6], 每对引物平均多态检出率为 2.90 条。85 个 RAPD 引物中 10 个引物在亲本中产生多态性, 其中包括与果实白/黄肉以及毛/油桃连锁的两个 RAPD 标记引物; 每个引物一般只有 1 条多态性带, 多态性引物的比率为 11.8%。16 对 SSR 引物中有 6 对在亲本中产生多态性, 其中 3 对引物在 4% 的琼脂糖凝胶上检测出差, 且表现为共显性。本研究选用扩增带型清晰、多态性丰富的 36 对 AFLP 引物、3 对 SSR 引物 (琼脂糖电泳检测)、两个 RAPD 引物用于遗传图谱的构建。图 1、2、3 分别显示了 AFLP、SSR、RAPD 标记在后代群体中的分离。

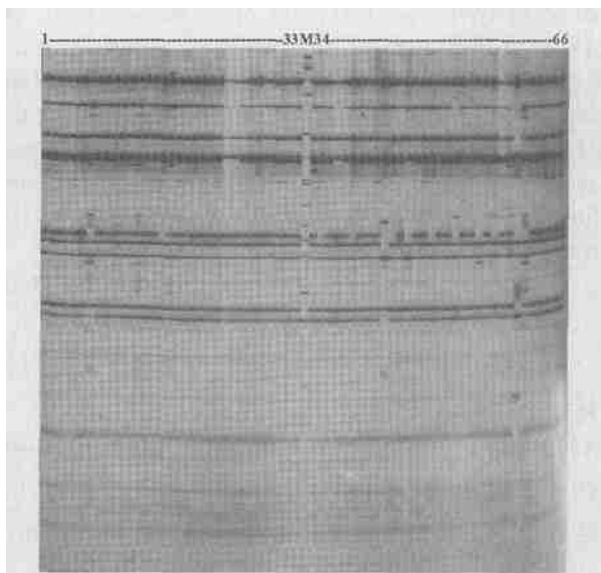


图 1 AFLP 引物 E-AAG/M-CAC 在 F_2 群体中的扩增图谱
M. Marker (pUC19 DNA/Msp I); 1~66. 不同个体。

Fig. 1 DNA band patterns amplified by primers combination
E-AAG/M-CAC in F_2 population

M. Marker (pUC19 DNA/Msp I); 1 - 66 different individuals.

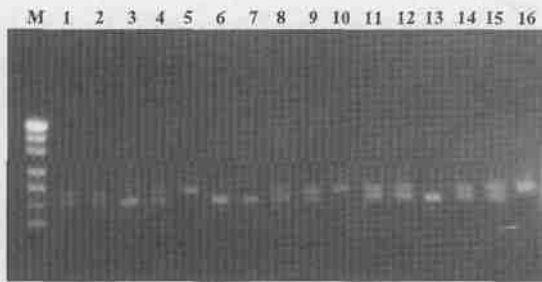


图2 SSR 引物 UDP96-008 在 F_2 群体中的扩增图谱

M. Marker (pUC19 DNA/Msp I); 1~16. 不同个体。

Fig. 2 DNA band patterns amplified by SSR primers UDP96-008 in F_2 population

M. Marker (pUC19 DNA/Msp I);
1~16 different individuals.

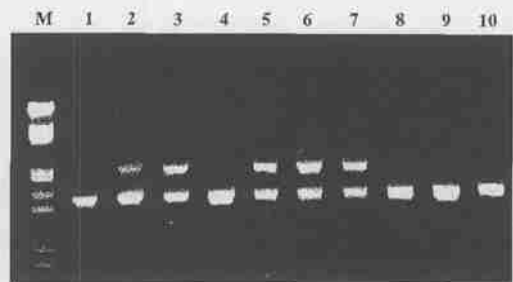


图3 毛/油桃 RAPD 引物 OPP-20 在 F_2 群体中的分离

M. Marker (Lambda DNA/EcoR I + HindIII marker); 1~10. 不同个体。

Fig. 3 Segregation of RAPD markers OPP-20 which linked to peach/nectarine in F_2 population

M. Marker (Lambda DNA/EcoR I + HindIII marker);
1~10 different individuals.

选用的 36 对 AFLP 引物多态性选择性碱基组合如下：M-CAC/ E-AAG (或 E-ACA、E-ACT、E-TG)，M-CAG/ E-ACA (或 E-ACG、E-AGG、E-AG、E-TA)，M-CTA/ E-ACA (或 E-ACC、E-AC、E-AA、E-AT)，M-CTG/ E-ACC (或 E-TA、E-TT、E-AC)，M-CTC/ E-ACC (或 E-ACG、E-AGG、E-AC、E-AT、E-TA)，M-CAT/ E-ACC (或 E-AC、E-TT、E-TG、E-ACT、E-AGC)，M-CAA/ E-ACT (或 E-TA)，M-CTT/ E-ACT (或 E-AC、E-AT、E-TG)；与果实非酸/酸性状连锁的两个 AFLP 标记引物组合为 E-TA/ M-CTC 和 E-AT/ M-CTA。3 对 SSR 引物序列为 UDP96-008，正链 5' TTGTACACACCTCAGCCTG3'，负链 5' TGCTGAGGTTCAGGTGAGTG3'；UDP96-018，正链 5' TTCTAATCTGGGCTATGGCG3'，负链 5' GAAGT-TCACATTTACGACAGGG 3'；UDP96-005，正链 5' GTAACGCTCGCTACCACAAA3'，负链 5' CCTGCATA-TCACCACCCAG3'。白/黄肉 RAPD 标记引物 OPU-03 序列为 CTACGCCGAC，毛/油桃 RAPD 标记引物 OPP-20 序列为 GACCTAGTC。

2.2 群体中分子标记的分离

36 对 AFLP 引物共获得标记 131 个，AFLP 标记为显性标记，在 F_2 代群体中应表现 3:1 的遗传比例，卡方检验结果有 26 个标记位点分离比率不符合孟德尔遗传分离比例，占标记总数的 19.8%。统计 131 个 AFLP 标记的表现型分布，来自兴津油桃的位点占标记总数的 43.1%，来自大久保的位点占标记总数的 56.9%，符合 1:1 的分离比。表明两亲本在该杂交组合后代中占同等重要的比重，也说明该杂交组合中后代基因的均衡性。果实的毛/油桃和白/黄肉 RAPD 标记为显性标记，统计结果表明符合 3:1 的分离比率。两个 SSR 标记为共显性，在 F_2 代群体中符合 1:2:1 的遗传规律。因此，在获得的 136 个标记中，109 个符合遗传分离比率，有效位点率为 80.1%。

2.3 遗传连锁图的构建

将符合遗传规律的 105 个 AFLP 标记、两个 RAPD 标记和两个 SSR 标记，使用 Mapmaker/ Exp 3.0，执行作图命令，推测可能的连锁群。109 个有效位点中 96 个标记构成 11 个连锁群（如图 4），有 13 个标记未能在连锁群上定位，作图位点率为 88.1%。在 11 个连锁群中，标记最多的连锁群含有 21 个标记，标记数最少的连锁群只有 3 个标记，平均每个连锁群标记数为 8.73 个；最长的连锁群长度为 198.4 cM，最短的连锁群长度为 29.7 cM。平均间距最大的为第 8 连锁群，间距达 18.4 cM；平均间距最小的为第 2 连锁群，间距只有 5.8 cM。96 个连锁标记覆盖基因组总长为 1061.8 cM，大约覆盖了基因组范围的 88.5%。连锁群的平均长度为 96.5 cM，标记间平均图距为 11.0 cM。与果实非酸/酸性状连锁的两个 AFLP 标记定位在第 9 连锁群上；与果实毛/油桃性状连锁的 RAPD 标记定位在第 3 连锁群上，而白/黄肉 RAPD 标记定位在第 7 连锁群上。

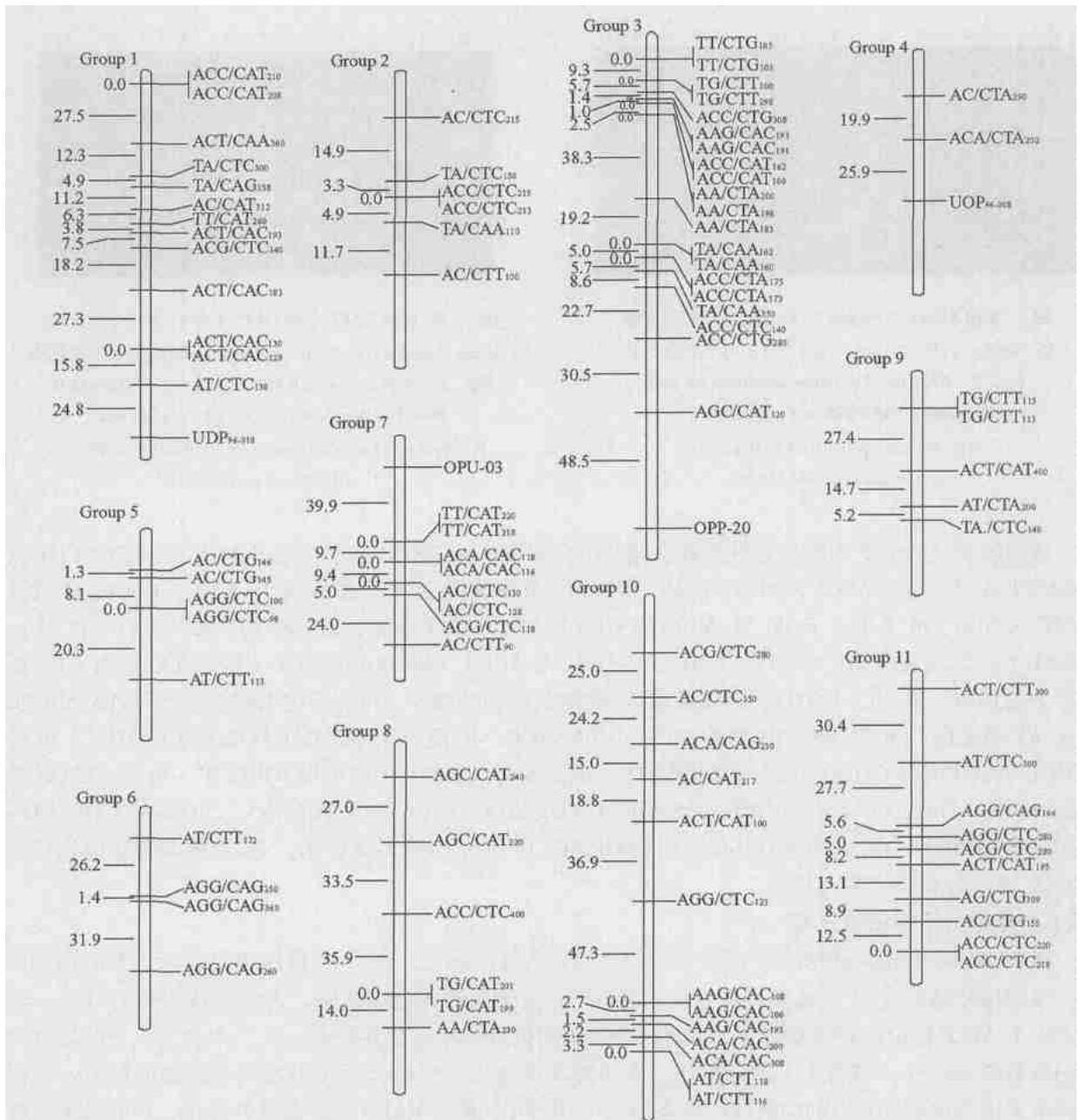


图4 桃分子遗传图谱

Fig. 4 Molecular genetic map of peach

3 讨论

本试验群体是从 350 株杂交后代中随机选择的 109 株个体, 多态性分析表明, 来自两亲本的位点符合 1:1 比例, 总体上未出现严重的偏分离。从验证的多态性片段结果来看大多数符合孟德尔遗传规律, 表明群体的大小符合构建连锁图的要求。

本试验中 RAPD 标记在两亲本间表现出低水平的多态性, 这与 Chaparro^[8]等对桃的多态性研究结果一致, 与桃同工酶的低水平多态性也相符合。与 RAPD 标记相比, AFLP 标记在亲本及后代群体中则表现较高水平的多态性, 但两种标记的多态性检出率均低于苹果、杏等树种, 这种低水平的多态性主要是因为桃栽培品种中高度的近交所引起的。

在已发表的桃遗传连锁图上, Dirlewanger 等^[1]将控制果实毛/油桃 (G/g)、非酸/酸 (D/d) 性

状基因定位在第 5 连锁群上, 而本图谱中将与 G 位点连锁的 RAPD 标记、D 位点连锁的 AFLP 标记分别定位在第 3、9 连锁群上, 推测这两个连锁群共同对应于 Dirlewanger 等构建的第 5 连锁群。Warburton 等^[2]曾将黄/白肉 (Y/y) 基因位点定位在其构建的第 3 连锁群上, 本研究中将该位点的 RAPD 标记定位在第 7 连锁群上, 这两个连锁群检测的可能是同一基因组区域。本研究中建立的连锁框架图覆盖基因组 1061.8 cM, 与国外发表的桃连锁图相比, 长度仅次于 Lu 等^[3]发表的一张全长 1297 cM 的 AFLP 连锁图, 这进一步体现了 AFLP 标记具有扩大图谱基因组覆盖范围的优越性。但是 AFLP 标记一般为显性标记, 不利于来自不同群体的图谱间交换, 所以图谱的整合还依赖于共显性标记。

标记的偏分离在作图过程中是普遍存在的^[9,10]。Foolad^[4]等报道的利用桃 × 扁桃的杂交后代构图时偏分离比例达到 37%。本试验得到的 136 个标记中有 27 个在后代中的分离不符合孟德尔遗传, 占标记总数的 19.9%, 偏分离比例属于正常范围, 并且低于种间杂交群体的偏分离比例。目前对于偏分离的遗传机制尚不清楚, 有研究者认为, 与影响偏分离的遗传因子紧密连锁的分子标记则表现有严重的偏分离^[11]。另外, 各种原因造成的带型缺失或模糊不清的数据、作图群体数量较小、染色体的转位、某一位点的扩增片段代表几个基因位点、酶切不彻底、DNA 本身存在大量的断裂片段等也会引起标记的偏分离。本研究中分子标记的偏分离是否是由上述原因引起, 尚需进一步研究。

桃完整的基因组应包括 8 个连锁群, 本研究得到了 11 个连锁群, 这表明至少有 3 条染色体中存在着频繁交换或标记空缺区段。与已构建的桃遗传连锁图比较, 本试验获得的连锁群跨度较大, 多处存在着较大空隙 (>25 cM), 部分连锁群出现了标记密集区如第 1、3、10 连锁群。本研究建立的图谱主要来自 EcoR - Mse 酶切产生的 AFLP 标记, 这种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。利用其它内切酶产生的标记可以对其进行完善补充, 例如 Pst - Mse 内切酶组合。与 EcoR 相比, Pst 可以在非甲基化的常染色质区识别酶切位点, 产生的 AFLP 标记表现出较高的随机分布比例, 但是多态性检出率有所降低, 因此使用不同酶切的互补作用, 有利于构建覆盖全基因组的饱和连锁图。另外, 分子标记分布的不均匀也可能是因为所用亲本之间在某些染色体区段缺乏多态性, 某些染色体结构发生大的变异, 导致这一段染色体上分子标记不能用连锁规律定位。因此, 发展来源于不同杂交组合的作图群体, 以及发展新型分子标记是填补图谱中的空缺、构建饱和图谱的有效手段, 这也是本研究进一步努力的方向。

参考文献:

- 1 Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C, et al. Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 888 ~ 895
- 2 Warburton L M, Becerra Velasquez V L, Goffreda J C, et al. Utility of RAPD markers in identifying genetic linkage to genes of economic interest in peach. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 93: 920 ~ 925
- 3 Lu Z X, Sosinski B, Reighard G L, et al. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, 1998, 41: 199 ~ 207
- 4 Foolad M, Arulsekar S, Becerra V, et al. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.*, 1995, 91: 262 ~ 269
- 5 Murry M G, Thompson W F. Rapid isolation of high weight DNA. *Nucl. Acids Res.*, 1980, 8 (19): 4331 ~ 4235
- 6 吴 俊, 束怀瑞, 张开春, 等. 桃果实非酸/酸性状 AFLP 标记的筛选. *果树学报*, 2004, 21 (4): 298 ~ 301
- 7 Kosambi D D. The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.*, 1944, 12: 172 ~ 175
- 8 Chaparro J X, Werner D J, O' Malley D, et al. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, 87: 805 ~ 815
- 9 Gebhardt C, Ritter E. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.*, 1989, 78: 65 ~ 75
- 10 Voorrips R E. 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. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 75 ~ 82
- 11 Xu S J, Singh R J, Hymowitz T, et al. Establishment of a cytogenetic map soybean: progress and prospective. *Soybean Genet. Newslet*, 1997, 24: 121 ~ 122