

西瓜重组自交系群体的 AFLP 分子图谱构建

易克¹ 许勇^{2*} 卢向阳¹ 肖浪涛¹ 徐向利¹ 宫国义² 张海英²

(¹ 湖南农业大学生化与发酵工程实验室, 长沙 410128; ² 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 以可溶性固形物含量高、皮薄、感枯萎病的栽培西瓜自交系 (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) 97103 和可溶性固形物含量低、皮厚、抗病的野生西瓜种质 (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) PI296341 为亲本构建获得 F₂S₇ 的重组自交系群体, 通过 AFLP 技术对该群体进行扩增, 建立了一个包括 150 个标记组成的分子图谱。该图谱包括 17 个连锁群, 覆盖基因组范围 1240.2 cM, 两个标记间的平均图距为 8.3 cM。图谱的建立对于西瓜高密度遗传图谱的构建、重要农艺性状的 QTL 定位以及重要基因的图谱克隆均具有重要的参考价值。

关键词: 西瓜; AFLP 标记; RIL 群体; 连锁图谱

中图分类号: S 651 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 01-0053-06

Construction of AFLP Molecular Genetic Map for RIL Population of Watermelon

Yi Ke¹, Xu Yong^{2*}, Lu Xiangyang¹, Xiao Langtao¹, Xu Xiangli, Gong Guoyi², and Zhang Haiying²

(¹ Department of Biotechnology of Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; ² National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100089, China)

Abstract: A recombinant inbred lines of 117 F₂S₇ progenies derived from the cross 97103 (which is a cultivar with higher total soluble solids concentration, thin rind, susceptible to *Fusarium* wilt disease) × PI296341 (which is an African wild germplasm with lower total soluble solids concentration, thick rind, resistant to *Fusarium* wilt disease) was used to construct a map containing 150 AFLP markers. This map consists of 17 linkage groups, covering 1240.2 cM with an average distance of 8.3 cM between locus. It will contribute to construction of a high-density map of watermelon, QTL analysis of important agronomic traits and map-based gene clone.

Key words: Watermelon; AFLP marker; Recombinant inbred lines; Linkage map

分子遗传图谱可用来定位和标记目标基因^[1], 同时也是克隆重要基因并揭示多基因性状遗传基础的重要工具^[2,3]。在园艺作物当中, 葫芦科是一类研究较为滞后的植物, 西瓜尤其如此。尽管这样, 目前已有几张西瓜图谱的相关报道^[4~8]。然而, 这些连锁图采用的群体基本为 F₂ 或 BC₁ 群体, 这种暂时性的分离群体存在多种不足, 如无法重复和比较利用, QTL 定位也不准确等。因此, 从应用的角度来看, 结合西瓜遗传狭窄的实际情况, 利用野生种质西瓜资源和稳定的栽培自交系产生的永久性作图群体, 如重组自交系群体 (RILs)、双单倍体群体等十分必要。

目前, 用于构建图谱的分子标记主要有 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR。其中, AFLP 标记技术结合了 RAPD 的高效性和 RFLP 的稳定性, 其多态信息量极为丰富^[9]。作者在利用 97103 × PI296341 的 F₂ 群体所构建的遗传图谱^[5]基础上, 首次利用西瓜重组自交系群体获得了以 AFLP 标记为主的西瓜分子遗传框架图谱。

收稿日期: 2003 - 04 - 24; 修回日期: 2003 - 09 - 26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070527); 国家 863 计划项目 (2001AA241174); 农业部 948 项目 (201024); 北京市自然科学基金重点项目 (5991017)。

* 通讯联系人, 电话: 010 - 51503035, Email: xuyong@nervc.com。本研究在国家蔬菜工程技术研究中心完成。

1 材料与方法

供试材料以野生西瓜种质 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld var. *citroides*] 为父本 (由美国 Clemson 大学 B. B. Rhodes 教授赠送, 代号为 PI296341。该材料来源于非洲, 农艺性状较差, 生长势旺, 可溶性固形物含量低, 皮厚, 耐贮运, 是国际上唯一高抗枯萎病 3 个生理小种的材料), 普通西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld var. *lanatus*] 感枯萎病高品质材料 97103 为母本 (由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供, 是 ‘京欣一号’ 的父本自交系)。97103 与 PI296341 杂交获得杂种, 其后代通过单粒传的形式获得 117 个 F_2S_7 代重组自交系。

西瓜 DNA 的提取和质量检测: 采用 CTAB 法提取亲本及群体的总 DNA, 按 Murry 等的方法^[10]进行。

银染 AHP 分析体系: AHP 多态性引物的筛选主要通过银染 AHP 方法进行。AHP™试剂盒购自美国 GIBCO BRL 公司, rTaqE 和 dNTP 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (Takara, Dalian)。酶切、连接及预扩增的技术路线按照试剂盒说明书进行。AHP 扩增产物在 Sequi-GT 型电泳槽 (Bio-Rad, America) 上分离, 结果利用银染方法进行分析。

荧光 AHP 分析体系: AHP 多态性引物在群体的选择性扩增采用荧光 AHP 方法, 体系共 5 μ L, 包括: 1 \times buffer, 1.25 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTP, 0.4 μ mol/L IRD - 标记的 Eco - 引物, 15 ng 未标记的 Mse - 引物, 0.5 μ L 20 倍稀释的预扩增产物, 0.25 U rTaqE。扩增结果利用 6% 聚丙烯酰胺凝胶在 4200-02G NEN Global IR² DNA 分析仪 (2 dye, Li-CoR, America) 上进行分离分析。标准分子量标记 (50 ~ 700 bp, IR dye 700, Li-CoR, America) 购自基因公司。

数据收集、编码及命名: AHP 扩增产物以 “A”, “B”, “-” 统计建立数据库。来自父本 PI296341 的纯合带型记为 “A”, 来自母本 97103 的纯合带型记为 “B”, 模糊不清或者丢失的带记为 “-”。统计每个引物扩增出的总带数和其中的多态性带数, 建立数据库。应用 Mapmaker/ Exp version 3.0 软件进行分析, 在最小 LOD 值 5.0 和最大重组率 0.30 的前提下, 先用 “Group” 命令将标记进行分组。对于较小的连锁群, 直接利用 “order” 命令计算出每组内标记的相对位置, 并用 “ripple” 命令确定最佳顺序。最后利用 “Kosambi” 函数计算图距, 用 “Map” 命令建立连锁图。对于较大的连锁群, 先利用三点 (three point) 进行分析。利用 Mapchart version 2.0 软件绘制连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 引物筛选与亲本间多态性分析

首先通过银染方法选择了 11 个多态性丰富且稳定的 EcoRI/MseI 引物组合。之后将这些引物组合的扩增产物进行荧光标记, 在 DNA 测序仪上进行验证 (图 1)。通过对双亲间有差异标记的统计表明, 这 11 个引物组合的多态性为占 51.3%, 共获得 287 条多态性条带, 平均每个引物组合产生有多态性的标记 26.1 个, 大小范围在 40 ~ 650 bp 之间 (表 1)。和银染 AHP 分析体系相比较, 荧光检测法具有非常高的灵敏度, 并且基本避免了非特异性扩增条带的产生。

表 1 西瓜 97103 \times PI296341 RI 群体分析的荧光标记引物组合

Table 1 Infrared dye-labeled primers tested in RI population from 97103 \times PI296341

引物组合 Primers	总条带数 Total bands	多态条带数 Polymorphic bands	引物组合 Primers	总条带数 Total bands	多态条带数 Polymorphic bands
E-AAC/M-CAA	75	41	E-AAG/M-CTA	61	25
E-AAC/M-CAT	46	25	E-AAG/M-CTC	46	22
E-AAC/M-CTC	39	24	E-AAG/M-CTT	54	26
E-AAC/M-CTT	58	29	E-ACA/M-CAC	35	23
E-AAG/M-CAC	43	25	E-ACC/M-CAA	48	23
E-AAG/M-CAT	54	24	Total	559	287

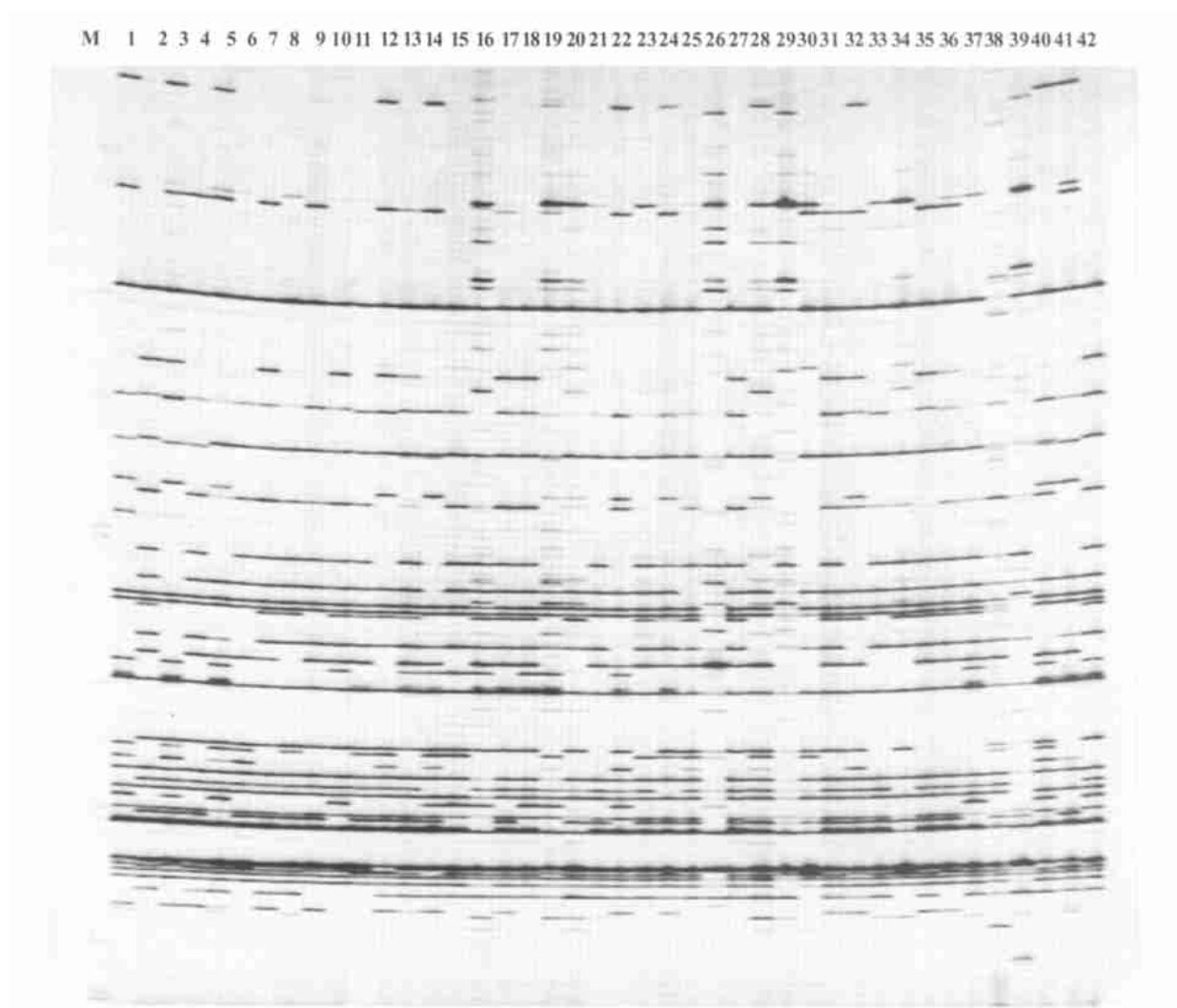


图1 E-AAG与M-CAC组合在双亲及 F_2S_7 代群体中AFLP扩增产生的带型

M: 100 bp DNA Ladder; 1: PI296341; 2: 97103; 3: F_1 ; 4~42: 部分RIL群体

Fig. 1 AFLP profiles generated by E-AAG与M-CAC in RI population

M: 100 bp DNA Ladder; 1: PI296341; 2: 97103; 3: F_1 ; 4 - 42: parts of RIL population

2.2 AFLP标记在RIL群体中偏分离分析

在总共 221 个 AFLP 标记中, 有 67 个标记表现出偏分离, 占 30 % ($0.05 > P > 0.01$)。其中, 有 57 个标记偏向于 97103, 占 85 %; 10 个标记偏向于 PI296341, 占 15 %。偏向于 97103 的标记中, 19 个未归入任何连锁群, 分别有 21 个 (AC_AA₁₄₁, AC_AA₃₆₆, CA_AC₇₆, CA_AC₈₄, CA_AC₈₉, CA_AC₂₀₀, CC_AA₉₄, AC_AT₁₄₅, AC_AT₁₈₈, AC_TC₇₈, AC_TC₁₀₁, AC_TT₂₅₀, AC_TT₄₃₈, AC_TT₄₇₂, AG_AC₁₀₀, AG_AC₁₂₆, AG_AT₉₇, AG_AT₁₁₂, AG_TA₁₄₂, AG_TA₁₆₃, AG_TC₂₃₅) 分布在第 1 连锁群, 5 个 (AC_AA₉₁, AC_AA₁₂₀, AC_AA₁₈₁, AC_AA₁₂₃, AG_AC₆₃) 分布在第 2 连锁群, 1 个 (AC_AT₉₆) 分布在第 3 连锁群, 3 个 (AG_TT₈₁, AC_TC₉₇, AC_TT₂₇₉) 分布在第 6 连锁群, 1 个 (AC_AA₈₄) 分布在第 7 连锁群, 1 个 (AC_TC₁₀₇) 分布在第 8 连锁群, 1 个 (AG_TA₃₉₁) 分布在第 9 连锁群, 1 个 (AG_TA₈₀) 分布在第 12 连锁群, 1 个 (AC_AA₁₆₀) 分布在第 14 连锁群, 3 个 (AC_AA₁₃₄, AC_AT₁₄₂, AG_TT₁₃₃) 分布在第 17 连锁群。偏向于 PI296341 的 10 个标记中, 3 个未归入任何连锁群, 1 个 (CC_AA₂₈₀) 分布在第 1 连锁群, 3 个 (AG_AT₁₄₂, AG_AC₃₅₄, AC_AT₁₅₉) 分

布在第 11 连锁群, 3 个 (AG_TT₁₃₁, AC_TC₁₇₀, AG_AC₂₇₀) 分布在第 3 连锁群。这种偏分离选择可能是配子体选择的结果^[11]。

2.3 遗传图谱构建

应用 221 条清晰且重复性好的条带进行连锁分析, 结果共有 150 个 AFLP 标记进入遗传图谱, 其中 96 个来自于 PI296341, 54 个来自于 97103。该图谱由 17 个连锁群组成, 总图距达 1240.2 cM, 平均图距为 8.3 cM (图 2)。从结果上看, AFLP 在连锁群上分布并不均匀, 除 LG1 和 LG2 外, 其余连锁群上均无标记密集区。LG1 是最大的一个连锁群, 分布有 44 个 AFLP 标记, 图距达 372.7 cM, 平均图距为 8.7 cM。由结果可知标记间仍有空隙, 可进一步饱和。

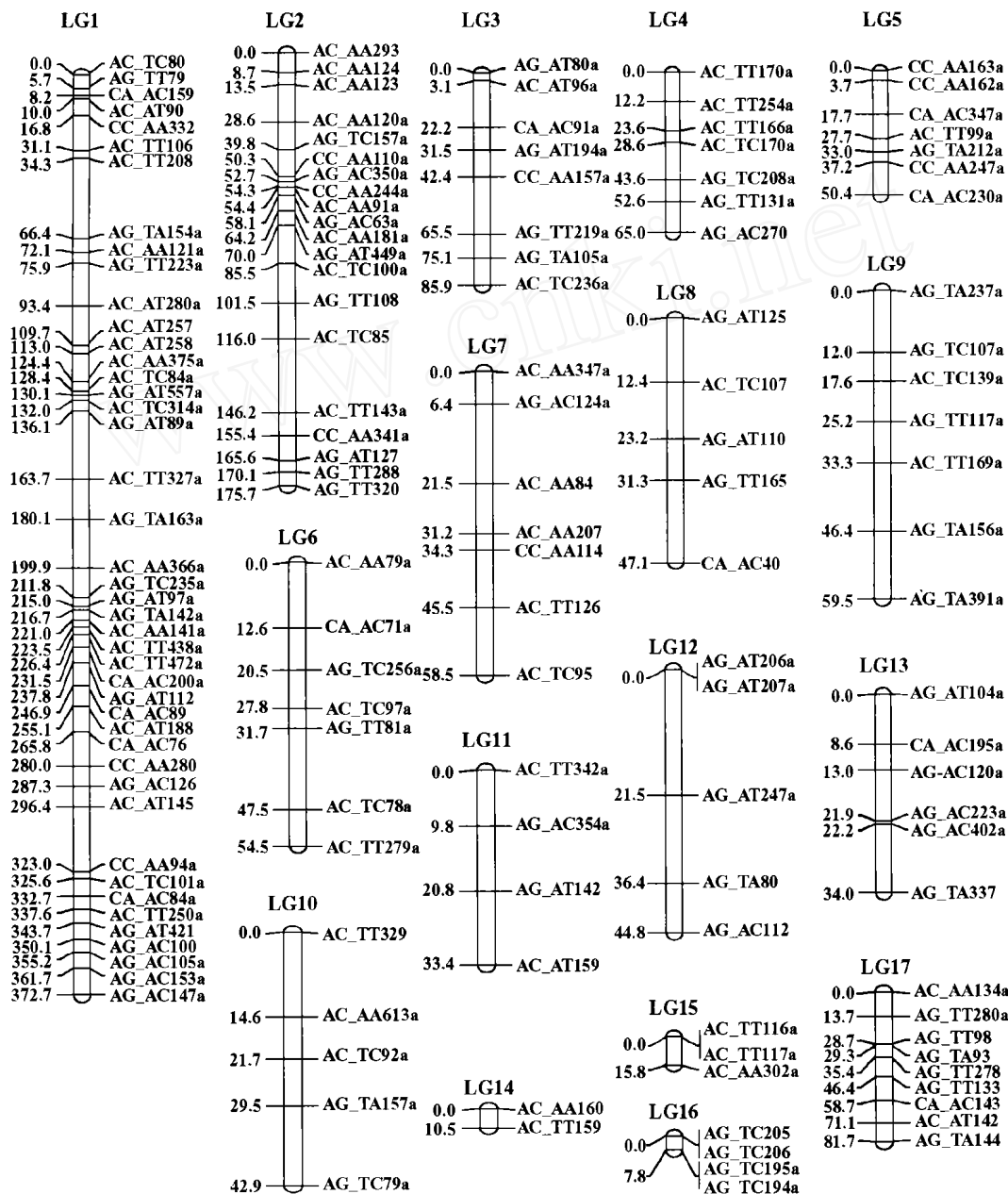


图 2 西瓜 (97103 × PI296341) RIL 群体的 AFLP 图谱

Fig. 2 AFLP molecular map for RILs of watermelon

3 讨论

3.1 图谱构建群体分析

遗传图谱的构建是作物育种及基因组研究的一个基础。在以往对西瓜的研究中, 所构建的几个图谱基本都是以暂时性的分离群体如 F_2 或 BC_1 群体为材料^[4~8], 群体类型的限制使得 QTL 分析和重要性状的基因定位难以精确, 同时也无法在各实验室之间进行合作比较研究。因此, 采用永久群体如重组自交系 (RIL) 与 DH 群体进行分子图谱的构建已成为目前国际上图谱构建的主流方向。

重组自交系是将杂种后代经连续自交或与同胞交配直至完全纯合的一系列品系, 由此构成的群体可以永久使用, 也就是说, 对于亲本等位基因连锁区段的不同组合方式, 每个 RIL 是固定的。正因为此, RIL 是构建遗传图谱和 QTL 定位的最佳材料。本研究在通过 F_2 群体构建的遗传图谱的基础上^[5], 通过重组自交系构建了一张以 AFLP 标记为主的分子图谱。因为西瓜是一种基因组较小的作物, 约为 4.3×10^5 kb, 而该图谱跨度为 1240.2 cM, 基本遍布了整个西瓜基因组。也应该看到, 平均图距为 8.3 cM 的图谱还不够密集, 这有可能使连锁群因为某一部分的标记不能连锁而被打断。要获得和 F_2 群体相当的信息量 ($r=0.05$), 还需要作进一步的饱和, 为基因的染色体定位及分子标记辅助育种提供更有价值的信息。

3.2 AFLP 遗传图谱构建效率和稳定性评价

综合考虑遗传稳定性、多态性检测效率和标记系统机制 (速度、费用、可靠性) 等因素, 认为 AFLP 是当今世界四大标记系统综合效用最高的标记技术^[12,13]。它可在一次反应中获得 50~100 条带, 信息量极其丰富。本研究得出了同样的结果, 通过荧光 AFLP 检测在双亲中一共获得 287 个多态性条带, 多态性检出率高达 51.3%, 远远超过 RAPD、SSR 和 ISSR 标记。也应该看到, AFLP 扩增结果因检测方法的不同而有所差别。放射性同位素的检测灵敏度极高, 是目前最常使用的检测手段, 然而放射性危害始终局限了其应用。银染方法灵敏度较低, 有时结果中还出现若干非特异性结合条带。不过其成本相对低廉, 如果在检测过程中能较好地控制反应体系, 同样能获得比较理想的结果。利用荧光标记进行 AFLP 分析是近年被推出的一种新的检测手段, Huang J. C. 等对其作了进一步改进, 认为该检测方法的分辨率高于其他检测系统^[14]。

本研究分别采用银染 AFLP 和荧光 AFLP 方法, 前者主要是进行引物筛选, 后者则是利用选定的引物组合进行图谱构建。从研究的结果来看, 荧光 AFLP 方法能够尽可能多地保留多态信息, 并具有较强的特异性。同时, 相对于其他标记系统, AFLP 的一个最大优势是只要获得高质量的完整模板, 就能够得到稳定性极高的结果, 我们多次重复试验论证了这一观点。此外值得注意的是, 本研究所建立的图谱中有一个最大的连锁群, 长达 372.7 cM, 这与本实验室利用同样亲本建立的 F_2 群体所构建的图谱^[5]有相似之处, 在其它实验室所做的多个西瓜图谱均有类似现象^[4~8], Levi 等在西瓜的回交和测交群体上获得的最大的连锁群分别为 207.9 cM 和 225.6 cM^[6,7], 上述相同的结果表明目前获得的图谱中的最大连锁群可能是一条染色体。我们推测西瓜可能具有某个较大染色体组, 或在其上发生的交换频繁, 从而促进西瓜作物的进化。这些推论有待于对西瓜进行深入的核型分析与遗传研究来证实。

3.3 偏分离分析

偏分离是作物中一种常见的现象, 被认为是生物进化的动力之一^[15]。自交不亲和是用来阐述该现象的一种观点。在对番茄耐盐性的 QTL 定位过程中, 就发现有 41% 和 23% 的耐盐和盐敏感类型明显偏离孟德尔分离比例, 而且连锁串在一些特定的连锁群上集中分布^[16]。本研究也发现有近 36% 的 AFLP 偏分离标记集中在第四连锁群上, 这可能是在这个连锁群上存在一个自交不亲和位点的原因。遗传搭车效应 (hitchhiking) 是解释偏分离现象的另一种假说, 即分子标记偏分离程度与影响等位基因频率的遗传因子连锁有关^[17]。在一些连锁群中存在着控制配子生活力和竞争力的座位, 其结果是导致配子选择从而产生偏分离。Xu 指出, 如果检测到的标记与这些座位紧密连锁, 则表现出严重的

偏分离^[18]。在本研究中有 30 % ($0.05 > P > 0.01$) 偏分离标记, 其中在 AHP 偏分离标记中, 大多数偏向于母本栽培品种 97103, 占 85 % ($P < 0.05$), 出现偏向于 97103 偏分离标记多的缘故, 可能是其中一个亲本 PI296341 是源于非洲的野生品种, 在连续自交过程中带有野生性状多的植株座瓜比较困难, 致使群体后代自然选择偏向于栽培种 (97103)。也有人认为偏分离一般是由雄配子体选择所引起的^[11]。

一般而言, RL 群体偏分离的比率要高于 F_2 群体, 这主要是在遗传和环境因素的作用下, 前者通过多次传代而表现出来的一种累积效应。因此在 RL 群体中很难区分偏分离是遗传还是环境因素造成。总之要更深入更准确地阐明其机制, 就必须发展含有偏分离基因座位的近等基因系 (near-isogenic lines, NIL), 从而系统地研究偏分离遗传因子在不同遗传背景和环境条件下的作用机理, 并为这些遗传因子的克隆及结构和功能分析创造条件。

参考文献:

- 1 Lindhout P. Perspectives of molecular marker assisted breeding for earliness in tomato. *Euphytica*, 1994, 79: 279 ~ 286
- 2 Martin GB, Brommonschenkel SH. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 1993, 262: 1432 ~ 1436
- 3 邢永忠, 徐才国. 作物数量性状基因研究进展. *遗传*, 2001, 23 (5): 498 ~ 502
- 4 Hashizume T, Skimamoto I, Harashima Y, et al. Construction of a linkage map for watermelon [*Citrullus* (Thunb) Matsum & Nakai] using RAPD. *Euphytica*, 1996, 90: 265 ~ 273
- 5 范敏, 许勇, 张海英, 等. 西瓜果实性状 QTL 定位及其遗传效应分析. *遗传学报*, 2000, 27 (10): 902 ~ 910
- 6 Levi Amnon, Claude E Thomas, Zhang X P, et al. A genetic linkage map for watermelon based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2001, 126 (6): 730 ~ 737
- 7 Levi Amnon, Thomas Claude E, Joobeur T, et al. A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population: (*Citrullus lanatus* var. *citroides* × *C. lanatus* var. *lanatus* × *Citrullus colocynthis*). *Theor. Appl. Genet.*, 2002, (10): 1 ~ 19
- 8 Hashizume T, Shimamoto I, Hirai M. Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using RAPD, RFLP and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, (10): 122 ~ 135
- 9 Siegfried L K, Rod P. An evaluation of the AHP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (Proteaceae). *Aust. J. Bot.*, 1998, 46: 533 ~ 546
- 10 Murry H G, Thompson WF. Rapid isolation of weight DNA. *Nucleic Acid. Res.*, 1980, 8: 4321 ~ 4322
- 11 张德水, 陈受宜, 惠东威, 等. 栽培大豆与半野生大豆间的杂种 F_2 群体中 RFLP 标记的偏分离及其形成原因的分析. *遗传学报*, 1997, 24: 362 ~ 367
- 12 Garcia-Mas J, Oliver M, Gomez-Paniagua H, et al. Comparing AHP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 101: 860 ~ 864
- 13 Powell W, Morgante M. The comparison of RFLP, AHP and SSR Markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 225 ~ 238
- 14 Huang J, Sun M. A modified AHP with fluorescence-labelled primers and automated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants. *Biotechnology Technique*, 1999, 13: 277 ~ 278
- 15 Lytle T W. Segregation distorters. *Annu. Rev. Genet.*, 1991, 25: 511 ~ 557
- 16 Foolad M R, Chen F Q, Lin G Y. RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during germination in an interspecific cross of tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 1133 ~ 1144
- 17 Xu Y, Zhu L, Xiao J, et al. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F_2 , backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 253: 535 ~ 545
- 18 Xu S J, Singh R J, Hymowitz T. Establishment of a cytogenetic map of soybean: progress and prospective. *Soybean Genet. Newslet.*, 1997, 24: 121 ~ 122

新书推荐

《分子克隆实验指南》(第三版)

作者对图书内容进行了全面升级, 修订了试验的每条方案, 增加了大量新的材料, 拓宽了所涉及试验的领域。前面的章节描述了一些基本的技术, 后面的几章是关于 cDNA 克隆和外显子截留、核酸探针的使用、突变和 DNA 测序的介绍。最后的章节主要解决筛选表达文库、克隆基因在原核和真核细胞的表达、转录物和蛋白质分析、探测蛋白质与蛋白质的相互作用, 附录中包含了试剂、载体、培养基、技术支持等基本信息。定价: 187 元 (上、下册, 含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。