

二倍体马铃薯分子连锁图谱的构建

金黎平¹, 刘杰^{1,2}, H. De Jong³, 方智远¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018; ³ Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Fredericton, NB E3B4Z7, Canada)

摘要: 利用二倍体马铃薯亲本 08675-21 与 09901-01 及其 125 份杂交一代无性系进行 AFLP 分析, 按亲本来源构建与 24 条染色体对应的 AFLP 分子连锁图谱, 母本图谱含有 75 个标记, 覆盖基因组全长 512 cM, 平均图距为 6.83 cM; 父本图谱含有 95 个标记, 覆盖基因组全长 578 cM, 平均图距为 6.08 cM。

关键词: 马铃薯; 分子连锁图谱; 限制片段长度多态性

中图分类号: S 532 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0397-06

Construction of a Molecular Linkage Map in *Solanum tuberosum* L.

J N Li-ping¹, L U Jie^{1,2}, H. De Jong³, and FANG Zhi-yuan¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Agronomy College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; ³ Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Fredericton, NB E3B4Z7, Canada)

Abstract: Based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, a molecular linkage map of potato was initially developed by using F₁ segregating population from the cross between the diploid potato parents of 08675-21 and 09901-01. The genetic map included 24 main linkage groups, and the female maps covered 512 cM with an average distance of 6.83 cM between adjacent markers while the male maps covered 578 cM with an average distance of 6.08 cM between adjacent markers.

Key words: Potato; *Solanum tuberosum* L.; Molecular linkage map; AFLP

20 世纪 80 年代末以来, 许多重要农作物的分子遗传图谱已被成功构建。由于马铃薯在遗传上的复杂性和特殊性, 多采用二倍体种的杂种后代群体进行遗传作图分析。自 1988 年第一张马铃薯 RFLP 遗传图谱公开发表以来 (Bonierbale et al, 1988), 世界上已有多张马铃薯分子图谱问世。其中比较典型的有: Gebhardt 等 (1991) 利用 2 个回交群体构建的包括 340 个 RFLP 标记和 1 个形态标记 (块茎皮色) 的分子连锁图谱; Tanksley 等 (1992) 构建的高密度马铃薯 RFLP 遗传连锁图谱; Chen 等 (2001) 利用 69 个已知序列基因构建的马铃薯功能图谱; Menendez 等 (2002) 用 RFLP 和 AFLP 标记相结合构建的两张遗传图谱和荷兰瓦赫宁根大学完善的马铃薯“超密图谱” (van Os et al, 2006)。

作者以二倍体马铃薯为材料, 利用 AFLP 技术构建分子连锁图谱, 为今后马铃薯重要农艺性状的 QTL 定位、基因克隆和分子标记辅助育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

作图群体 02018 为二倍体马铃薯群体, 父母本均为经遗传改良的二倍体无性系, 母本 08675-21 含有 Merrimack、Chippewa 等多个四倍体品种和原始栽培种 *S. goniacalyx* 的血缘, 父本 09901-01 含有

收稿日期: 2006 - 07 - 12; 修回日期: 2007 - 01 - 30

基金项目: 农业部蔬菜遗传与生理重点实验室项目

品种 Katahdin 和 *S. phureja* 的血缘, 父母本间许多农艺性状和加工品质性状差异显著。02018 群体及父母本由加拿大农业和食品部弗雷德里克顿马铃薯研究中心 H. De Jong 博士提供。杂种实生种子于 2002 年秋保湿催芽后温室育苗, 移栽至大棚收获实生薯 (F_1 分离群体), 2003 年播种实生薯繁殖成无性系, 每个无性系为群体中的不同基因型, 2004 年秋用不同基因型的新鲜叶片提取 DNA 用于试验研究。共有 125 个基因型用于作图分析。

1.2 方法

DNA 提取采用 CTAB 小量提取法 (Stacey & Isaac, 1994)。用 Rnase 处理后, 以 DNA 作对照, 1.2% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 浓度和纯度。

AFLP 分析参照 Vos 等 (1995) 的方法, 并对反应体系进行了优化。对预扩增产物进行稀释倍数筛选后, 选择最佳浓度的稀释产物为模板进行选择性的扩增。扩增产物用 5.5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 银染法检测。限制性内切酶为 NEB 公司的 *Mse* 和 *EcoR*。AFLP 连接和扩增所用接头、引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 引物的核心序列为 *Mse*: 5'-GATGAGTTCCT-GAGTAA-NNN-3'; *EcoR*: 5'-GACTGCGTACCAATTC-NNN-3' (N 为选择性碱基)。

用 MS-Excel 2003 和 JoinMap 3.0 软件进行数据分析及连锁图谱构建, 图谱按 CP 群体遗传模型构建, JoinMap 3.0 中的 CP 群体即指通过两个异源杂合或纯合的二倍体亲本杂交得到的一个二倍体群体。

2 结果与分析

2.1 亲本多态性分析

利用 256 对引物组合对双亲及 8 个随机单株进行 AFLP 多态性分析, 根据扩增多态性条带的数目、清晰度及重复性共选择 10 对引物组合对群体进行选择性的扩增, 共获得 231 条多态性条带, 平均每对引物组合产生 23.1 条多态性条带, 其中引物组合 E38/M50 产生多态性带最多, 为 34 条。图 1 示出了引物组合 E38/M50 在 F_1 群体的部分基因型的扩增结果。

2.2 群体中分子标记的分离

所获得 231 条多态性条带中, 来自母本的 59 条, 来自父本的 78 条, 来自双亲的 94 条。来自双亲的位点数基本符合 1:1 比例, 表明双亲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。来自单亲的标记在 F_1 群体中应表现 1:1 的遗传比例, 来自双亲的应表现 3:(2+1) 的遗传比例。卡方检验结果有 56 条带呈现不同程度的偏分离, 偏分离比例达到 24.24% ($P < 0.01$)。

2.3 遗传图谱的构建

将 231 个标记数据用 MS-Excel 2003 和 MS-Word 2003 整理转换成 LOC 格式文件, 用 JoinMap 3.0 按 CP 群体遗传模型进行分析, 按亲本来源构建与 24 条染色体对应的连锁图谱。

母本图谱含有 75 个标记, 覆盖基因组全长 512 cM, 最大图距为 33 cM, 最小图距为 0 cM, 平均图距为 6.83 cM。

父本图谱含有 95 个标记, 覆盖基因组全长 578 cM, 最大图距为 40 cM, 最小图距为 0 cM, 平均图距为 6.08 cM。

最长的连锁群 LGMa1 覆盖基因组 116 cM, 含有 19 个标记, 最短的连锁群 LGMa4 为 7 cM, 标记最少的连锁群仅 3 个标记。

标记在图谱中分布基本均匀, 有个别密集区, 图谱质量较好 (图 2)。

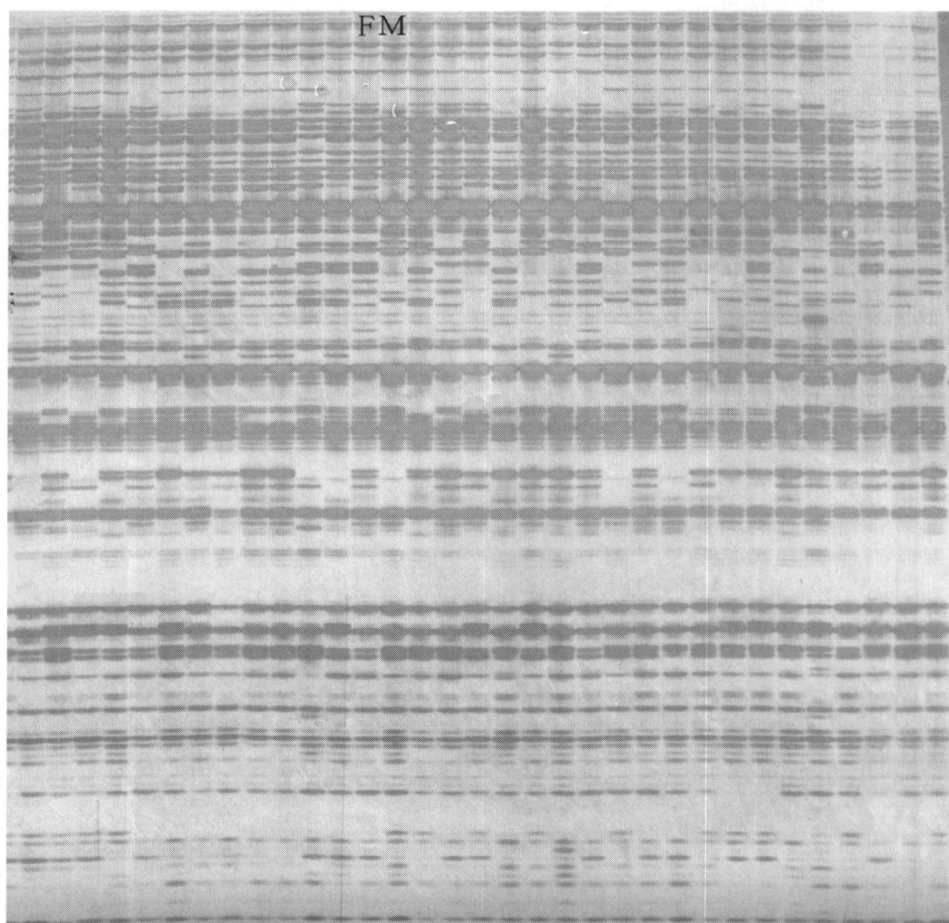
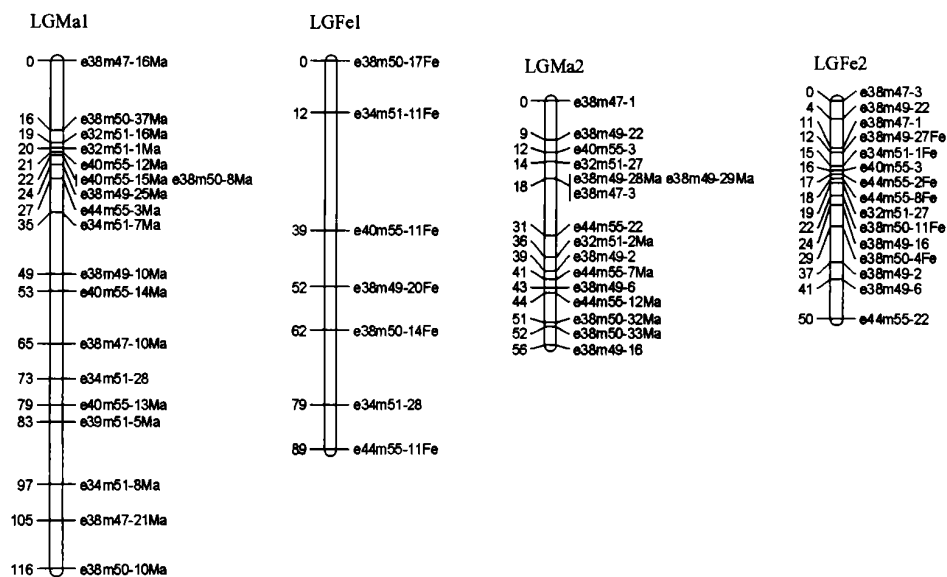


图 1 引物组合 E38/M50 在双亲及 F_1 (02018) 群体部分基因型的扩增结果

F 母本; M 父本; 其它泳道均为 F_1 分离群体单株系。

Fig 1 The segregation of E38/M50 primer combination in 02018 population and parents

F. Female; M. Male; The rest lanes are from F_1 segregating clones



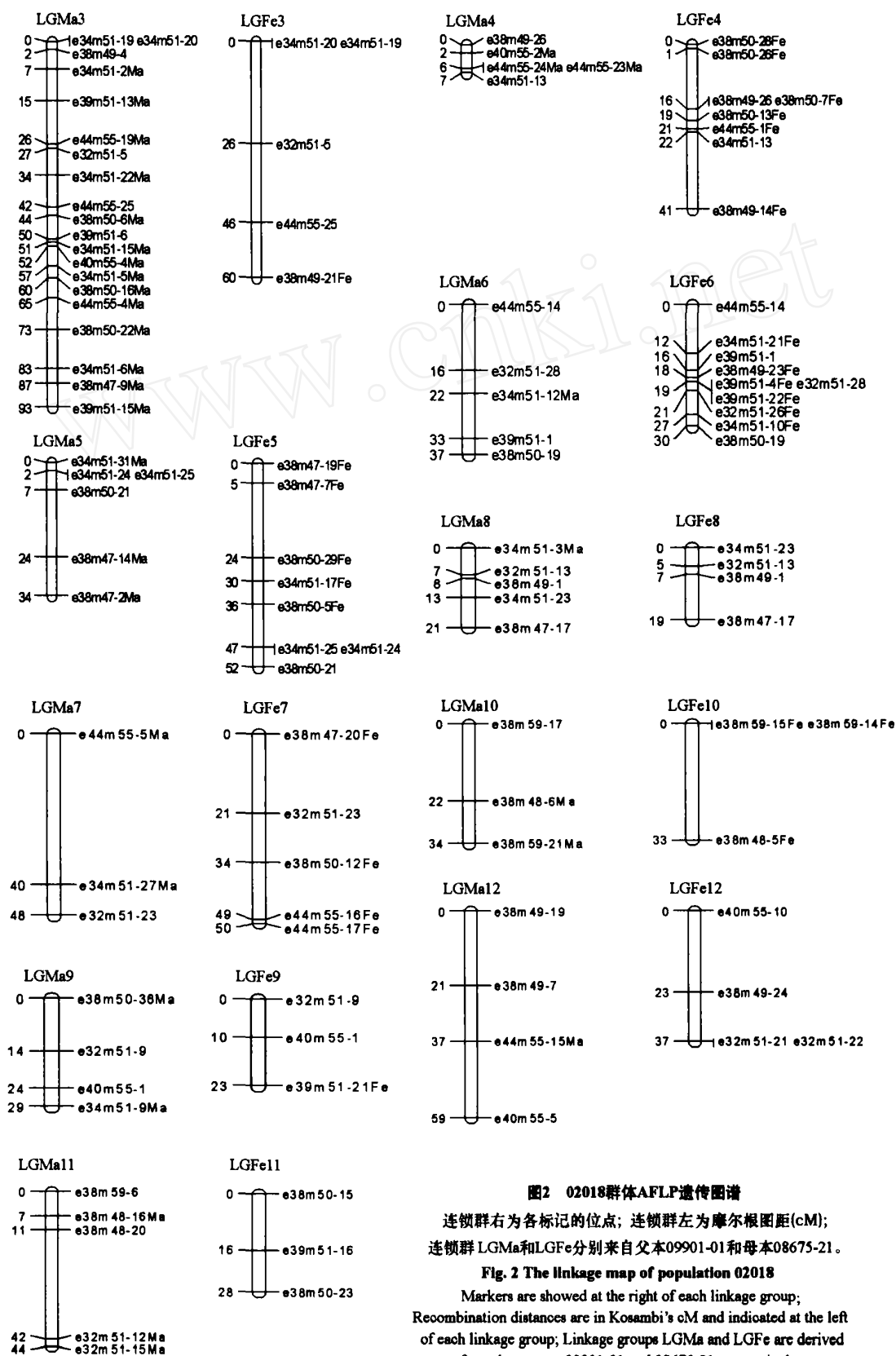


图2 02018群体AFLP遗传图谱

连锁群右为各标记的位点; 连锁群左为摩尔根图距(cM);
连锁群 LGMa 和 LGFe 分别来自父本 09901-01 和母本 08675-21。

Fig. 2 The linkage map of population 02018

Markers are showed at the right of each linkage group;
Recombination distances are in Kosambi's cM and indicated at the left
of each linkage group; Linkage groups LGMa and LGFe are derived
from the parents 09901-01 and 08675-21, respectively.

3 讨论

等位基因的偏分离是生物界普遍存在的现象,被认为是生物进化的动力之一(王晓武等, 2005)。主要有两种观点解释偏分离产生的原因。一些研究者用自交不亲和和来阐述该现象:在许多作物的遗传图谱中偏分离的标记多集中在1个或少数几个连锁群上,说明这些区域可能存在自交不亲和位点。另一种解释是所谓的遗传搭车效应(hitchhiking),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。在一些连锁群中存在着控制配子生活力和竞争力的座位,其结果是影响配子选择产生偏分离。

标记在连锁图中偏分离的比例一般在30%以内,但有的也远远高出这一比例,这与所用标记类型及选用作物及群体相关。本研究中偏分离比例达到24.24% ($P < 0.01$),而且多集中在连锁群LGMa1、LGMa2、LGMa3、LGF6和LGF10上。在偏分离标记中,不存在偏向单一亲本的情况,但在来自单亲的偏分离标记中90%的标记都偏向有带的亲本,这一现象可能由配子体或孢子体选择造成,也可能与马铃薯作物本身的遗传高度杂合性有关。

对一般作物而言,作图群体分为临时性分离群体(F_2 、衍生家系 F_3 、 F_4 及回交群体等)和永久性分离群体(重组近交系RLs、双单倍体群体DH、回交近交系BLs及近等基因系NLs)。但对于马铃薯而言,由于其高度杂合, F_1 实生果中的每颗种子都是完全不同的基因型,所以无法得到一般作物的常规作图群体。

作图群体的大小直接影响图谱的饱和度,作图群体越大,可以检测重组的最小图距越小,可以辨别的最大图距越大。因此, F_1 群体成了马铃薯遗传图谱构建的常用群体。国外发表的多张马铃薯图谱,作图群体个体数多在90~256之间(Mahmood et al, 2003; Costanzo et al, 2005; Frary et al, 2005)。本研究所用作图群体有125个单株系,基本满足构建框架图谱的要求。由于所用群体的亲本系谱中有许多共同亲本,亲缘关系较近,另外只利用了EcoRI和MseIAHLP标记,EcoRI和MseIAHLP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,因此所得231条多态性条带只有140条被定位到图谱上,导致图谱覆盖基因组面积较小,平均图距较大。

目前,我们正在利用SSR、CAPS和SCARS等共显性遗传标记对图谱进行加密,整合已发表的马铃薯遗传图谱。同时,对作图群体一些重要农艺性状及加工品质性状进行统计调查,进而定位克隆主效QTL或目标基因,最终通过辅助育种或基因工程途径加快马铃薯育种进程。

References

- Bonierbale M W, Plaisted R L, Tanksley S D. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*, 120: 1095 - 1103.
- Chen X, Salamini F, Gebhardt C. 2001. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet*, 102: 284 - 295.
- Costanzo S, Simko I, Christ B J, Haynes K G. 2005. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* \times *S. stenotomum*. *Theor Appl Genet*, 111 (3): 609 - 617.
- Frary A, Xu Y, Liu J, Mitchell S, Tedeschi E, Tanksley S D. 2005. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theor Appl Genet*, 111 (2): 291 - 312.
- Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debener T, Schachtschabel U, Kaufman H, Thompson R D, Bonierbale M W, Ganal M W, Tanksley S D, Salamini F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theor Appl Genet*, 83: 49 - 57.
- Mahmood T, Ekuere U, Yeh F, Good A G, Stringam G R. 2003. RFLP linkage analysis and mapping genes controlling the fatty acid profile of *B. nassica juncea* using reciprocal DH populations. *Theor Appl Genet*, 107 (2): 283 - 290.
- Menendez C M, Ritter E, Schafer-Pregl R, Walkemeier B, Kalde A, Salamini F, Gebhardt C. 2002. Cold sweetening in diploid potato: mapping quantitative trait loci and candidate genes. *Genetics*, 162 (3): 1423 - 1434.

- Stacey J, Isaac P G 1994. Isolation of DNA from plants. *Methods Mol Biol*, (28): 9 - 15.
- Tanksley S D, Ganal M W, Prince J P, de Vicente M C, Bonierbale M W, Broun P, Fulton T M, Giovannoni J J, Grandillo S, Martin G B. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132 (4): 1141 - 1160.
- van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrena I, Bryan G J, Carmel B, Ghareeb B, Isidore E, De Jong W, van Koert P, Lefebvre V, Milboume D, Ritter E, Rouppe van der Voort J, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R, Visser R G F, Bakker J, van Eck H J. 2006. Construction of a 10 000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genome-wide physical map. *Genetics*, 173: 1075 - 1087.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23 (21): 4407 - 4414.
- Wang Xiao-wu, Lou Ping, He Hang-jun, Yang Bao-jun, Zhang Yan-guo, Zhao Jian-jun. 2005. Construction of an AFLP-based genetic linkage map using a doubled-haploid (DH) population derived from a cross between Chinese kale and broccoli. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (1): 30 - 34. (in Chinese)
- 王晓武, 娄平, 何杭军, 杨宝军, 张延国, 赵建军. 2005. 利用芥蓝×青花菜 DH 群体构建 AFLP 连锁图谱. *园艺学报*, 32 (1): 30 - 34

(上接 310 页)

CNKI 中国引文数据库 《园艺学报》高被引频次论文

(截至 2007 年 4 月)

序号	被引文献题名	被引文献作者	被引文献来源	被引频次
21	百合的组织培养和试管内诱发多倍体试验	黄济明	园艺学报 /1983/02	69
22	PP333——一种新的植物生长延缓剂	黄卫东	园艺学报 /1988/01	69
23	应用 RAPD 技术评价丁香品种间遗传关系	陈新露, 赵祥云	园艺学报 /1995/02	69
24	细胞膜热稳定性及保护酶和大白菜耐热性的关系	吴国胜, 曹婉虹, 王永健, 姜亦巍, 张丽蓉	园艺学报 /1995/04	68
25	低温对黄瓜幼苗膜脂过氧化的影响	马德华, 卢育华, 庞金安	园艺学报 /1998/01	65
26	植物花青素基因的克隆及应用——文献综述	包满珠	园艺学报 /1997/03	65
27	运用 RAPD 对核桃属种间亲缘关系的研究	吴燕民, 裴东, 奚声珂, 李嘉瑞	园艺学报 /2000/01	65
28	杏 43 个品种资源的 RAPD 分类	沈向, 郭卫东, 吴燕民, 李嘉瑞, 郑学勤	园艺学报 /2000/01	65
29	观赏植物色香形基因工程研究进展 文献综述	傅荣昭, 马江生, 曹光诚, 李文彬, 孙勇如	园艺学报 /1995/04	64
30	桃种质的亲缘演化关系研究——花粉形态分析	汪祖华, 周建涛	园艺学报 /1990/03	64
31	利用 RAPD 技术快速鉴定番茄杂种纯度	栾雨时, 苏乔, 李海涛, 安利佳, 何孟元	园艺学报 /1998/03	64
32	低温弱光对番茄叶片光合作用和叶绿素荧光参数的影响	胡文海, 喻景权	园艺学报 /2001/01	63
33	大白菜细胞核基因互作雄性不育系选育及应用模式	张书芳, 宋兆华, 赵雪云	园艺学报 /1990/02	62
34	蔗糖代谢相关酶在温州蜜柑果实糖积累中的作用	赵智中, 张上隆, 徐昌杰, 陈昆松, 刘拴桃	园艺学报 /2001/02	61
35	玻璃化法 园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径 文献综述	王君晖, 黄纯农	园艺学报 /1994/03	61
36	白菜及其相邻类群基因组 DNA 的 RAPD 分析	曹家树, 曹寿椿, 易清明	园艺学报 /1995/01	61
37	低温胁迫对温州蜜柑光合作用的影响	郭延平, 张良诚, 沈允钢	园艺学报 /1998/02	60
38	几种落叶果树光合特性的探索	牟云官, 李宪利	园艺学报 /1986/03	59
39	保护地黄瓜叶片光合作用温度特性的研究	徐克章, 史跃林, 许贵民, 张志安, 崔秋华	园艺学报 /1993/01	59
40	百合珠芽组培及脱毒研究	赵祥云, 程廉, 邢尤美, 谢丽萍, 贾学文	园艺学报 /1993/03	59
41	光强对黄瓜光合特性及亚适温下生长的影响	李长缨, 朱其杰	园艺学报 /1997/01	59
42	中国枣种质资源的 RAPD 分析	彭建营, 束怀瑞, 孙仲序, 彭士琪	园艺学报 /2000/03	59
43	银杏光合特性的研究	陶俊, 陈鹏, 余旭东	园艺学报 /1999/03	56
44	钙渗入对香梨果实贮藏期间生理生化的影响	陈发河, 张维一, 吴光斌	园艺学报 /1991/04	56
45	葡萄幼树若干光合特性的研究	王春清, 祖容, 张贤泽	园艺学报 /1989/04	55
46	番茄多聚半乳糖醛酸酶反义 cDNA 克隆的遗传转化与转基因植株再生	叶志彪, 李汉霞, 周国林	园艺学报 /1994/03	55
47	主要蔬菜作物光合与蒸腾特性研究	张振贤, 周绪元, 陈利平	园艺学报 /1997/02	55
48	DNA 提纯方法对 9 种菊属植物 RAPD 的影响	戴思兰, 陈俊愉, 高荣孚, 马江生, 李文彬	园艺学报 /1996/02	54
49	月季切花开花和衰老进程中乙烯变化类型初探	高俊平, 张晓红, 黄绵佳, 叶新民, 孙自然	园艺学报 /1997/03	54
50	浸钙对猕猴桃果实硬度变化影响的生化机制	王贵禧, 韩雅珊, 于梁	园艺学报 /1995/01	53

(下转 460 页)