

文章编号: 1005-0906(2006)03-0006-04

玉米分子遗传图谱的构建

张帆¹, 万雪琴², 潘光堂¹

(1. 四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学林学系, 四川 雅安 625014)

摘要: 以 R15(抗)和 Ye478(感)为亲本配制 F₂ 分离群体并以该群体为作图群体。利用 778 对 SSR 引物对亲本 R15、Ye478 之间的多态性进行了检测, 筛选出 159 对多态性 SSR 引物用于 F₂ 群体分析。利用这 159 对(20.4%)多态性标记构建玉米的遗传连锁图谱, 其中有 9 个 SSR 标记没连锁上。其余 150 个标记分布于玉米的 10 条染色体上, 覆盖玉米基因组 1 775.7 cM, 标记间平均距离为 11.8 cM。

关键词: SSR; 遗传图谱; 玉米**中图分类号:** S513.032**文献标识码:** A

Construction of the Molecular Linkage Map with SSR Markers in Maize

ZHANG Fan¹, WAN Xue-Qin², PAN Guang-Tang¹

(1. Maize Research institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Department of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: 230 F₂ individuals derived from the single cross between resistant R15 and susceptible Ye478 maize inbred lines, were genotyped using simple sequence repeat(SSR). 778 SSR primers pairs were used to detect the polymorphisms between parents R15 and Ye478. 159 (20.4%) SSR primers showed polymorphisms. We constructed the molecular linkage map using the 159 SSR primers, of which 9 SSR were false linkage. The others 150 SSR markers distribute among 10 linkage groups in maize and span genome about 1 775.7 cM with average distance of 11.8 cM between markers.

Key words: SSR; Linkage map; Maize

玉米是目前世界上单产最高的谷类粮食作物, 也是禾谷类作物中增产潜力最大的作物。但近年来, 在我国玉米生产上发生的病害多达 30 余种, 每年因各种病害造成的损失占总产量的 10%以上, 且严重降低了玉米的品质^[1]。玉米穗腐病是其中的一个重要病害。玉米穗腐病不仅影响玉米的产量, 其病原菌产生的真菌毒素也严重威胁人畜健康^[2,3]。特别是在西南地区, 由于气候潮湿, 穗腐病越来越严重, 已成为玉米生产的制约因素。实践证明, 培育和种植抗病品种是防治穗腐病的有效途径。因抗玉米穗腐病性状是一个数量性状, 从育种角度看, 获得多基因抗性是培育高抗品种的关键。要提高玉米抗穗腐病特性, 就

必须多个抗病基因协同表达, 若采用常规育种技术将它们聚合于一个优良自交系中, 不仅周期长、效率低, 而且由于连锁累赘会不可避免地将一些不利性状的基因带入优良材料中; 而且, 控制数量性状的基因效应较小, 易受环境的影响, 使得根据表型选择的准确率大大降低。如果选用分子标记构建玉米抗病基因饱和遗传图谱, 把大量玉米抗病虫基因或数量性状位点(QTL)定位在染色体上, 在此基础上进行精细定位和克隆单个 QTL, 再利用分子标记辅助育种提高育种效率, 将给传统育种带来革命性的变化。

简单序列重复, 又称微卫星(SSR)标记, 由于其多态性高、共显性、广泛分布在整个基因组中、操作简单, 已经广泛用于构建各种图谱^[4-6]。本实验的目的就是选用 SSR 标记构建玉米的分子遗传连锁图谱, 为进一步精细定位目标基因和分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期: 2005-06-24; **修回日期:** 2005-08-17**基金项目:** 国家自然科学基金项目(30370889)、国家 863 计划项目(2003AA207070)、四川省生物技术开发项目

作者简介: 张帆(1978-), 女, 博士研究生, 生物化学与分子生物学专业。Tel: 13628157559 E-mail: nolady@163.com
潘光堂为本文通讯作者。Tel: 13608269331
E-mail: pangt@sicau.edu.cn

以优良抗病自交系 R15 和感病自交系掖 478 组配的 230 个 F₂ 单株作为作图群体。

1.2 DNA 提取

DNA 的提取在参照 Hoisington^[7]的方法基础上作一定的改变。

1.3 SSR 分析

PCR 体系参数参照 Qian^[8]的方法。SSR 引物由上海生工合成。SSR 引物序列来源于 <http://www.Maize.gdb.org>, PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min, 然后进入循环:94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环;4℃保温。3%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色;或 6%的聚丙烯酰胺糖凝胶电泳,硝酸银染色。

1.4 SSR 数据的转化

根据 SSR 分析的琼脂糖凝胶电泳或者聚丙烯酰胺糖凝胶电泳带谱结果, 将其转换为数据结果: 与亲本 R15 相同的带型记为 A, 与亲本掖 478 相同的带型记为 B, 杂合(F₁)带型记为 H, 缺失或模糊记为 -。对所有 F₂ 单株带型按孟德尔分离比例 1:2:1 (显性标记按 3:1)进行 X² 检验。

1.5 连锁分析与图谱构建

图谱构建分析所用软件为 MAPMAKER/EXP 3.0b。本研究在 LOD≥3.0, r≤0.4 的情况下进行连锁群估计。对已确定顺序的连锁群, 采用 Kosambi 函数, 将重组率转换成图距单位(centiMorgan, cM), 最后用 The Map Chart 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 SSR 分析

本实验共选用 778 对 SSR 引物。其中有 159 对表现多态性, 多态性频率为 20.4%; 11 对(7.5%)表现偏孟德尔分离比例。

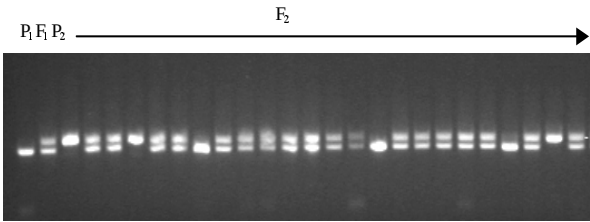


图 1 引物 bnlg1810 对 F₂ 分离群体基因型检测

表 1 部分引物检测的基因型偏分离

引物名	节 点	基因型(个)				总 数 (个)	卡方检验 (X ²)
		来源于 R15 等位基 因的同源纯合体	异质杂合体	来源于掖 478 等位 基因的同源纯合体	缺失		
Bnlg1803	1.02	57	124	36	13	217	8.49**
Umc1756	2.02	60	112	36	22	208	6.77**
Umc1825	3.07	34	136	40	20	210	18.65**
Umc1294	4.02	45	135	43	7	223	9.94**
Bnlg1847	5.06	58	123	35	14	216	9.06**
Bnlg386	5.09	48	124	40	18	212	6.72**
Umc1083	6.02	53	125	47	5	225	3.10*
Umc2160	7.01	51	131	34	14	216	12.47**
Umc1607	8.07	68	111	42	9	221	6.12*
Bnlg1714	9.04	33	126	53	18	212	11.32**
Umc2126	10.07	60	121	36	13	217	8.19**

注: X²_{0.05,1}=3.84, X²_{0.01,1}=6.63, *, **表示在 0.05 和 0.01 水平上显著。

2.2 R15×掖 478 遗传图谱构建

利用 230 个 F₂ 单株, 159 个 SSR 标记进行 R15×掖 478 遗传图谱构建。在 LOD≥3.0 条件下进行连锁分析, 其中有 9 个 SSR 标记没连锁上。其余 150 个标记分布于玉米的 10 条染色体上, 覆盖玉米基因组 1 775.7 cM, 标记间平均距离为 11.8 cM。

3 讨 论

3.1 SSR 标记偏分离

等位基因的偏分离在生物圈中是普遍存在的。在玉米中偏离孟德尔分离比例的现象已有很多报道^[9~11], 在其他作物中也有类似的报道^[12~14]。偏分离的产生主要是由配子体或孢子体选择以及基因型分类错误引起的^[15]。在分子标记基因型中不存在表型

鉴别等基因型分类错误, 因而其偏分离完全是由配子体或孢子体选择造成的。本研究共观察到 11 个偏分离的 SSR 标记。通过对这 11 个共显性标记进行等位点频率相等以及它们形成 F₂ 时的 X² 检验表明, 这 11 个 SSR 标记在等位点频率相等, 而 F₂ 基因型频率分布差异显著或者极显著, 说明 SSR 标记发生偏分离的原因是由于孢子体选择造成的。

是否需要在进行图谱构建时将表现偏分离的标记剔除, 在构建图谱中没有明确的限定。早期的遗传图谱大多使用偏分离标记进行遗传图谱构建。偏分离会给出或多点重组频率造成大的正偏差^[16], 降低表现的交叉干扰从而导致位点排序错误, 影响图谱的构建和后续基因定位。笔者认为, 在对影响偏分离的基础不了解的情况下尽量避免使用偏分离标记。

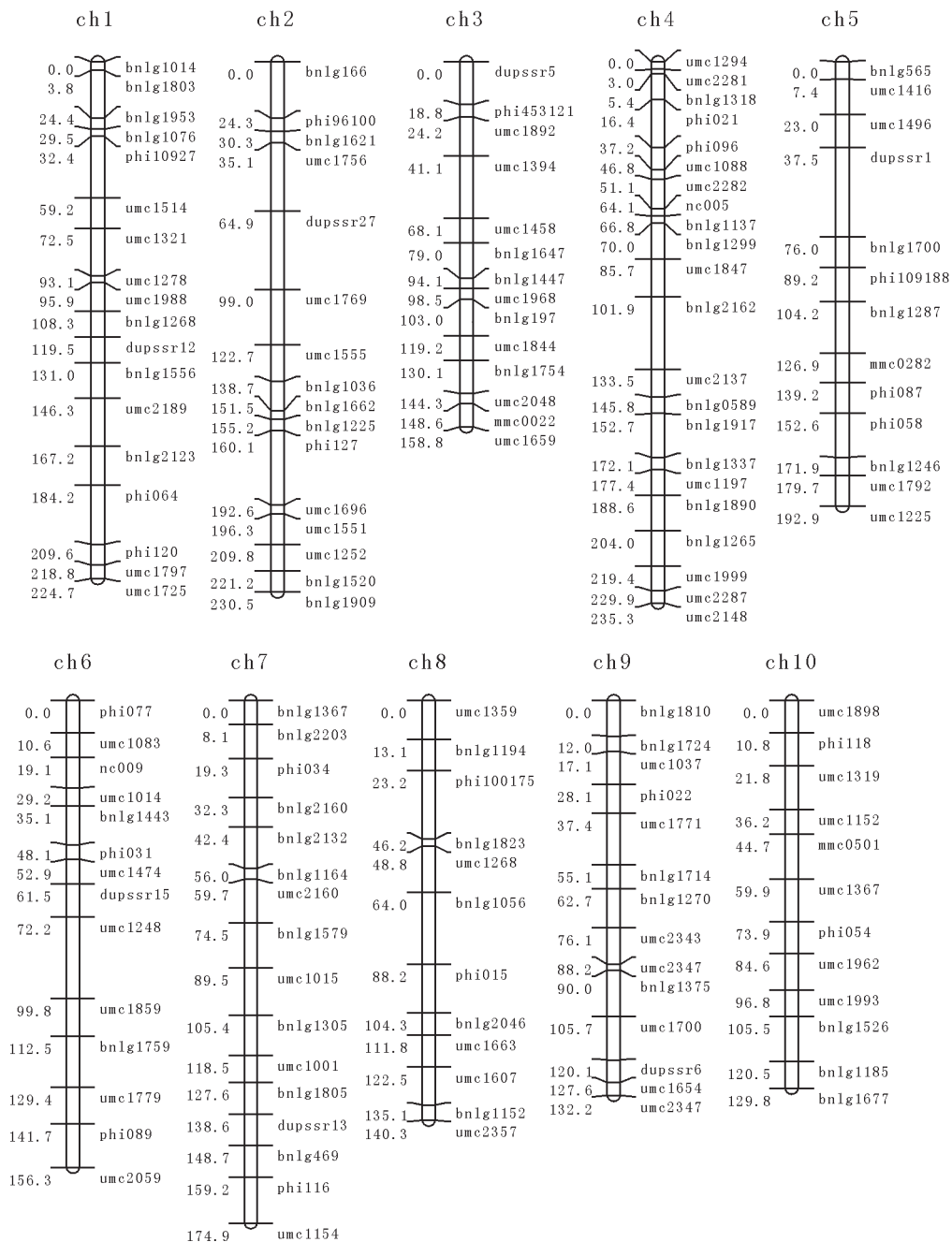


图2 玉米分子遗传图谱

3.2 图谱构建

一个基本的连锁遗传图谱大概要求染色体上标记间的平均距离为 20 cM。但如果作图的目的是为了精确定位目标基因,染色体上标记间的平均距离必须小于 1 cM^[7],因此有必要构建饱和的遗传图谱。要得到饱和的遗传图谱,其可行的办法大概有以下 3 点:①根据定位的目标基因,在染色体上目标区域内筛选标记;②最好选用极端亲本,即所用的亲本遗传关系较远;③增加标记的数量、群体样本量和标记种类。

国内外已经构建完成的玉米遗传图谱已经不下

50 张,目前,最缺乏的是对这些遗传图谱的综合利用,如能利用这些图谱进行基因组比较研究,以及将其整合成一张玉米通用遗传连锁图谱具有重要意义。要实现这样的目标,就必须利用 SSR、SNP、EST 和 ISH 等单拷贝位点的标记。本研究所构建的连锁图上共有 150 个 SSR 标记,分属于 10 个连锁群。其中 Group1 上的两个 SSR 标记(bnlg2123、dupssr12)也出现在杨俊品^[18-20]等 2004 年构建的 48-2 × 5003 玉米连锁群中,意味着这两个连锁群都属于相同的染色体,也表明在图谱间共同标记较多时实现图谱整合是可行的。

参考文献:

- [1] 吴建宇. 玉米抗病育种的研究[J]. 玉米科学, 1999, 7(2): 6-11.
- [2] 胡 南, 章 红. 吉林省玉米穗腐病原菌中镰刀菌毒素的研究[J]. 玉米科学, 1997, 5(2): 66-68.
- [3] 文成敬, 陈晓娟, 陈文瑞. 玉米镰刀菌性穗腐及其抗病性测定方法[J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(4): 321-323.
- [4] 黄秦军, 苏晓华, 张香华. 利用 AFLP 和 SSR 标记构建美洲黑杨 × 青杨遗传图谱[J]. 林业科学研究, 2004, 17(3): 291-299.
- [5] 宛煜嵩, 王 珍, 肖英华, 等. 一张含有 227 个 SSR 标记的大豆遗传连锁图[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 15-20.
- [6] ZHU Zhen-Dong, HUO Yun-Long, WANG Wiao-Ming, et al. Analysis of simple sequence repeats markers derived from phytophthora sojae expressed sequence tags, Chinese Science Bulletin, 2004, 49(19): 2041-2046.
- [7] Hoisington D, Khairallah M, Gonzalez D. Laboratory protocols: CIM-MYT applied molecular genetics laboratory. 2nd edn. -Cimmyt, Mexico, D F. 1994, 51.
- [8] Qian Q, Li Y H, Zeng D L. Isolation and genetic characterization of a fragile plant mutant in rice (*Oryza sativa* L.). Chinese Science Bulletin, 2001, 46(15): 1273-1276.
- [9] Bentolila S, Hardy T, Guitton C. Comparative genetic analysis of F₂ plants and anther culture derived plants of maize. Genome, 1992, 35: 575-582.
- [10] Gardiner J, Coe E H, Melia-Hancock S. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F₂ population. Genetics, 1993, 134: 917-930.
- [11] Sibov S T, de Souza Jr C T, Garcia A A F, et al. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. Hereditas, 2003, 139: 96-106.
- [12] Konishi T, Abe K, Matuura S, Yano Y. Distorted segregation of the esterase isozyme genotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.) Genet, 1990, 65: 411-416.
- [13] Faris J D, Laddomada B, Gill B S. Molecular mapping of segregation distortion loci in *aegilops tauschii*. Genetics, 1998, 149: 319-327.
- [14] Bernadette J, Sandrine F, Philippe B, et al. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. Plant Biology, 2003, 3: 9-14.
- [15] Lyttle T W. Segregation distorters. Annual Review of Genetics, 1991, 25: 511-557.
- [16] Lincoln S E, Lander E S. Systematic detection of errors in genetic linkage data. Genomics, 1992, 14: 604-610.
- [17] 方宣钧, 吴为人. 分子选择[J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 1-5.
- [18] 杨俊品, 荣廷昭, 黄烈健, 等. 玉米分子遗传框架图谱构建[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 82-87.
- [19] 王庆华, 杨继良, 尹小燕, 等. 玉米大斑病抗性基因的 DNA 分子标记研究进展[J]. 玉米科学, 2002, 10(2): 93-96.
- [20] 要向拓, 毛建昌, 吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用[J]. 玉米科学, 2004, 13(1): 26-29.