

苦荞 SSR 分子遗传图谱的构建及分析

杜晓磊^{1,2}, 张宗文^{2,3}, 吴斌², 李艳琴¹, 王安虎⁴

(¹山西大学生物技术研究所, 太原 030006; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

³国际生物多样性中心东亚办事处, 北京 100081; ⁴西昌学院, 四川西昌 615013)

摘要: 构建苦荞遗传连锁图谱, 为今后有关苦荞基因组结构、重要农艺性状 QTL 定位、分子标记辅助育种和基因克隆等研究工作奠定基础。以栽培苦荞‘滇宁一号’和苦荞野生近缘种杂交产生的 119 份 F₄ 代分离材料为作图群体, 利用 SSR 分子标记来构建苦荞的分子遗传连锁图谱。本研究构建的连锁图谱包含 15 个连锁群, 由 89 个标记组成, 其中偏分离的标记有 22 个, 占 24.7%, 每条连锁群上的标记在 2~16 之间。连锁群长度在 6.9~165.8 cM 的范围, 覆盖基因组 860.2 cM, 总平均长度 9.7 cM。本研究构建了首张苦荞 SSR 遗传连锁图谱, 为苦荞 QTL 定位、基因克隆、遗传选育等研究奠定了基础。

关键词: 野生苦荞; ‘滇宁一号’; SSR; 分子遗传图谱

中图分类号: S517

文献标志码: A

论文编号: 2012-3373

Construction and Analysis of Genetic Linkage Map in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) Using SSR

Du Xiaolei^{1,2}, Zhang Zongwen^{2,3}, Wu Bin², Li Yanqin¹, Wang Anhu⁴

(¹Institute of biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006;

²Institute of Crop Science of Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081;

³Bioversity International, Office for East Asia, Beijing 100081;

⁴Xichang College, Xichang Sichuan 615013)

Abstract: The present study was aimed to construct a molecular linkage map of tartary buckwheat, which would provide essential tools for investigating genomic structure and evolution, and facilitate QTL mapping, marker-assisted selection and map-based cloning of important gene. In this study, a population of F₄ generation including 119 individual plants was derived from the cross between ‘Dianning 1’ and a tartary buckwheat wild species. SSR markers were used to construct the molecular genetic linkage map. The genetic linkage map consisted 15 linkage groups with 89 markers including 22 (24.7%) distorted markers in the whole map and 2–16 markers in each linkage group. The total length of the map was 860.2 cM. The length of linkage groups varied from 6.9 to 165.8 cM, with a mean marker interval distance of 9.7 cM between markers. The current study constructed a first tartary buckwheat genetic linkage map, which provided the basis for the research on gene location and molecular breeding of tartary buckwheat.

Key words: tartary buckwheat; ‘Dianning 1’; SSR; molecular genetic map

基金项目: 国际生物多样性中心合作项目“小宗作物种质资源研究能力建设”(APO2009/004); 现代农业产业技术体系建设专项“燕麦荞麦产业体系岗位”(CARS-08-A-3); 山西省科技攻关项目“小杂粮豆制品育种技术研究”(20120311006-1)。

第一作者简介: 杜晓磊, 男, 1986 年出生, 硕士研究生, 研究方向为生物种质资源评价研究。通信地址: 100081 北京市海淀区中关村南大街 12 号作物科学研究所, Tel: 010-82105751, E-mail: 450659711@qq.com。

通讯作者: 张宗文, 男, 1958 年出生, 内蒙古赤峰人, 研究员, 博士, 主要从事荞麦和燕麦种质资源研究。通信地址: 100081 北京市海淀区中关村南大街 12 号作物科学研究所, Tel: 010-82105751, E-mail: zongwenz@163.com。李艳琴, 女, 1960 年出生, 山西太原人, 教授, 主要从事植物分子生物学及植物功能成分的研究。通信地址: 030006 山西省太原市坞城路 92 号山西大学生物技术研究所, Tel: 0351-7016679, E-mail: yanqin@sxu.edu.cn。

收稿日期: 2012-10-15, **修回日期:** 2012-12-15。

0 引言

苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 属于蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill), 是一种起源于中国西南地区的小宗粮食作物, 中国拥有丰富的苦荞种质资源及其野生近缘种, 广泛分布于西南地区的云南、四川、贵州、西藏等省区。苦荞不但营养均衡, 而且含有其他粮食作物稀缺或不具备的保健功能, 即苦荞富含黄酮类物质, 如芦丁、槲皮素、异槲皮素和花青素等。黄酮类物质能够有效抑制葡萄糖苷酶和淀粉酶活性^[1], 具有预防糖尿病发生, 降低血糖, 调节血脂、血压的作用^[2-3]。近年来, 苦荞研究持续升温, 苦荞加工产业迅速发展, 苦荞米、苦荞面、苦荞茶等产品深受广大消费者欢迎, 从而进一步促进了苦荞研究与产业发展。

随着分子技术的广泛应用, 苦荞种质资源评价和有用基因发掘研究有了快速发展。SSR (Simple sequence repeat, SSR) 又叫微卫星 (Microsatellite), 是一种以 1~6 个核苷酸为重复单位组成的串联序列^[4], 均匀的分布于整个真核生物基因组中, 其两侧具有保守的 DNA 序列, 由于重复基序的数目和位置的变化, SSR-PCR 图谱显示出较强的多态性^[5], 已经成为常用的分子标记, 被广泛应用于遗传图谱构建及 QTL 分析^[6]、遗传多样性分析^[7]、杂种优势预测^[8]、指纹图谱分析^[9]、品种鉴定等领域。

近年来, 越来越多作物的遗传图谱被成功构建, 有些作物拥有多张利用不同遗传标记或不同作图群体构建的遗传图谱, 并已开展了利用高密度遗传图谱进行数量性状定位的研究工作^[10-11]。对于荞麦的研究, 国内外的相关报道也多集中在甜荞和野生荞麦方面。Yasui 等^[12]利用 20 对 AFLP 引物组分别构建了甜荞及其野生近缘种 *F. homotropicum* 遗传图谱, 两图谱都含有 8 个连锁群 (遗传距离分别为 508.3 cM 和 548.9 cM, 分别含 224 和 214 个 AFLP 标记)。Konishi 等^[13]同时利用 AFLP 和 SSR 2 种标记构建了甜荞的遗传连锁图谱, 父母本均含有 12 个连锁群, 其中, 母本含 131 个标记 (54 个 SSR 和 77 个 AFLP), 遗传距离为 911.3 cM; 父本含 71 个标记 (37 个 SSR 和 34 个 AFLP), 遗传距离为 909.0 cM。Pan 等^[14]以二倍体花柱异长型自交不亲和品种 Sobano 与野生的自交亲和品种 Homo 产生的 225 个 F₂ 代作为作图群体, 构建了一张甜荞的连锁图谱, 该图谱包含 87 个 RAPD 标记, 12 个 STS 标记, 4 个种子蛋白亚基标记, 3 个形态等位基因, 总长 655.2 cM。然而在苦荞的图谱构建研究方面至今仍未见报道。本研究以苦荞‘滇宁一号’与苦荞野生近缘种 (*F. tataricum* ssp. *potanini* Batalin) 杂交得到的 119 株 F₄ 代作为作图群体, 构

建苦荞 SSR 遗传连锁图谱, 为苦荞产量及其相关性状 QTLs 定位、杂种优势机理等研究提供工具和平台, 同时也为综合利用苦荞的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究以苦荞‘滇宁一号’为母本, 苦荞野生近缘种 (*F. tataricum* ssp. *potanini* Batalin) 为父本, 进行杂交, 经几年株行繁殖, 获得基本稳定的 F₄ 品系 119 份, 构成该杂交种的分离群体。本研究以该分离群体为材料, 进行遗传图谱构建。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 使用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (BioTeke) 提取苦荞基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 紫外分光光度计测定其浓度。将基因组 DNA 原液于 -20℃ 保存, PCR 扩增时取适量稀释为 30 ng/μL 备用。

1.2.2 SSR 分析 参照韩瑞霞等^[15]的方法, 进行 SSR 分析。实验所用的 SSR 序列由本实验室设计, 并由 Introvingen 公司合成。反应体系 (20 μL) 中含 10×buffer 2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μL, 引物 (10 μmol/L) 0.6 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.4 μL, DNA 模板 50 ng, ddH₂O 13.8 μL。PCR 反应程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 7 min; 4℃ 保存。PCR 扩增在 biorad (MyCycler) 型 PCR 仪进行。扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 银染显影, 照相保存。

1.2.3 数据记录 分子标记数据: 对于显性标记, 若两亲属于无带 (母本) × 有带 (父本) 时, 则用 “A” 表示无带, “C” 表示有带; 若两亲本属于有带 (母本) × 无带 (父本) 时, 则用 “B” 表示无带, “D” 表示有带。对于共显性标记, 与母本相同的带型记为 A, 与父本相同的带型记为 B, 杂合型记为 H。缺失的带型记为 “-”。

1.2.4 遗传图谱构建 采用 Joinmap3.0 软件构建连锁群体; 将 LOD 最小值设为 2.0, 可根据实际情况调整 LOD 值; 选用 Kosambi 函数计算图距; 用 MapDraw 软件绘制连锁图谱。

2 结果与分析

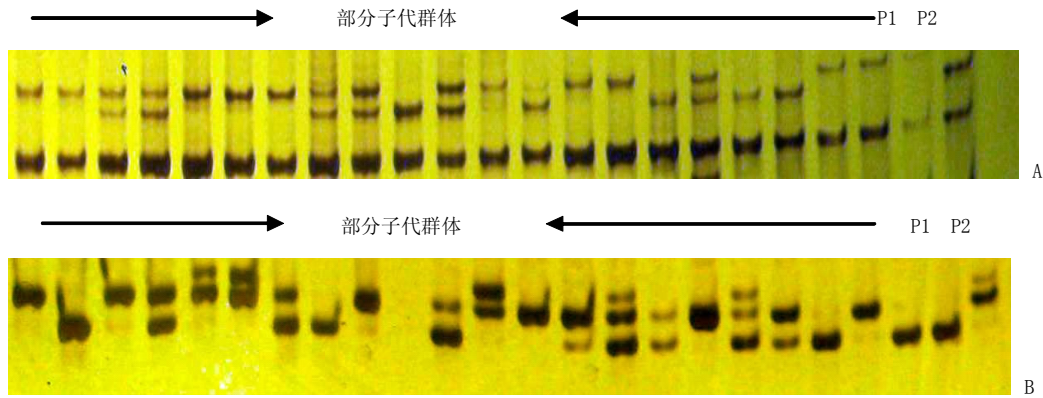
2.1 分子标记的多态性分析

SSR 为共显性的单座位标记, 能够很好反映基因的杂合性。本研究选用 500 对 SSR 引物在亲本间进行多态性筛选, 共有 176 对 SSR 引物在双亲间表现多态, 多态率为 35.2%。用这些标记扩增群体, 有 120 对引物在群体中表现多态性, 得到 215 条多态性条带, 共 130 个标记, 其中显性标记 45 个, 共显性标记 85 个。经卡

平方(χ^2)测验($P=0.01$),在 130 个标记中,偏离孟德尔分离规律的标记有 48 个,占 36.9%。图 1 为 SSR 引物在作图亲本与部分子代群体中的扩增结果。

2.2 遗传连锁图谱的构建

采用 Joinmap3.0 软件构建连锁图,得到的连锁图谱包含 15 个连锁群,由 89 个标记组成,其中偏分离的



PI: 野生苦荞; P2: 滇宁一号; 其他为子代; A: 引物 BM114 扩增结果; B: 引物 BM460 扩增结果

图 1 SSR 引物在作图亲本与部分子代群体中的扩增结果

标记有 22 个,占 24.7%。所获得图谱总图距为 860.2 cM,标记间平均间距为 9.7 cM。每条连锁群上的标记在 2~16 个之间,最大连锁群的图距为 165.8 cM,最小连锁群的图距为 6.9 cM,平均每个连锁群的长度为 57.3 cM。15 个连锁群中, LG1 包含标记最多,有 16 个, LG14、LG15 包含最少,都为 2 个。LG14 平均图距最大,为 12.9 cM, LG3 平均图距最小,为 6.6 cM。标记在 LG6、LG7、LG8、LG9、LG10、LG11、LG13、LG15 上均出现大于 20 cM 的间隙(表 1、图 2)。

2.3 偏分离分析

连锁群上的所有 89 个标记位点中,在 1% 水平上有 22 个位点不符合孟德尔分离比例,即表现显著偏分离,比例为 24.7%。在所有的偏分离标记中,偏向母本的有 10 个,偏向父本的有 12 个。从偏分离位点的分布来看,除 LG5、LG9、LG14 3 个连锁群没有偏分离位点,其余连锁群上都有分布(图 2)。

3 讨论与结论

目前对于苦荞的研究还处于起步阶段,主要集中在苦荞的栽培技术、栽培品种的鉴定、化学成分的提取工艺和遗传多样性的研究上,对于遗传图谱的研究几乎还是一片空白。作图亲本选择与作图群体是构建遗传图谱的基础,关键是选用具有较宽广遗传基础及遗传差异的亲本杂交,将有益于 SSR 多态性引物的筛选和性状基因定位。据赵佐成等^[9]的研究表明,栽培苦荞之间的遗传一致度极高,所以通过栽培品种间的杂交来获得产量高且有优良性状的品种难度较大。因此本研究选用的 2 个杂交材料分别为野生近缘种和栽培品

表 1 各连锁群的基本特征

连锁群	图距/cM	标记数	平均图距/cM	偏分离标记数	偏分离标记频率/%
LG1	165.8	16	10.4	4	25
LG2	96.6	13	7.4	4	30.8
LG3	66.2	10	6.6	2	20
LG4	63.4	7	9.1	1	14.3
LG5	81.7	7	11.7	0	0
LG6	44.4	4	11.1	1	25
LG7	79.1	7	11.3	2	28.6
LG8	51.4	5	10.3	1	20
LG9	46	4	11.5	0	0
LG10	42.5	3	14.2	1	33.3
LG11	37.5	3	12.5	2	66.7
LG12	22.9	3	7.6	1	33.3
LG13	30	3	10	2	66.7
LG14	25.8	2	12.9	0	0
LG15	6.9	2	3.5	1	50
总数	860.2	89	9.7	22	24.7

种,而且材料都是在苦荞起源中心中国西南部采集,这样不仅可以增加遗传丰富度,也可以选育出产量高、有优良性状的品种。

构建遗传图谱是开展 QTL 定位、图位克隆和分子标记辅助选择育种等研究工作的基础。图谱的饱和度和、标记数量的多少以及分布的均匀程度等决定了遗

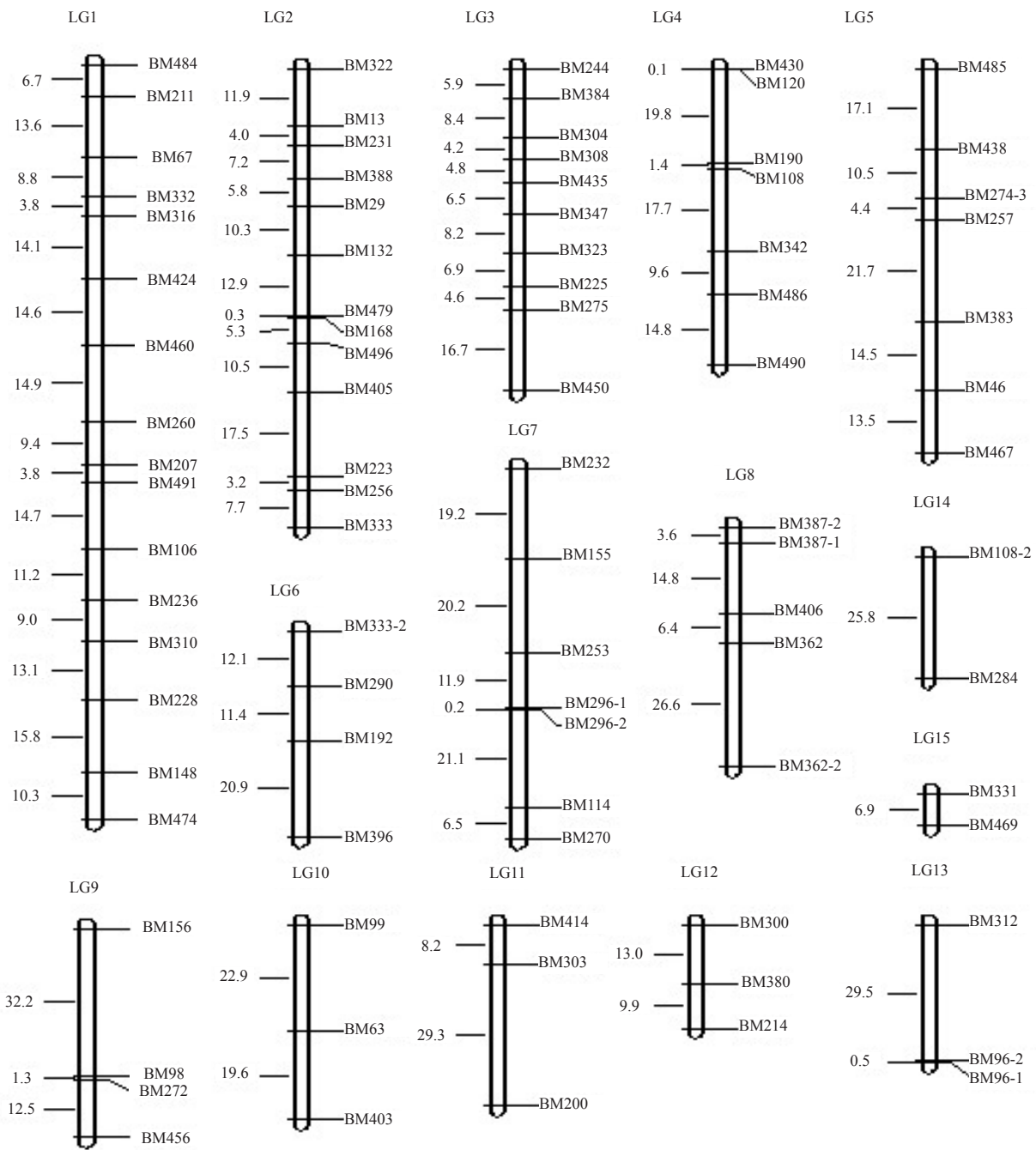


图2 苦荞的SSR分子连锁图谱

传图谱的应用价值。一个基本的连锁框架图的标记间平均间距要在 20 cM 以下,如果是定位主基因,那么标记的平均间距要在 10~20 cM 或者更小。本研究构建的图谱包含 89 个标记,标记在连锁群上分布并不均匀,标记间平均间距 9.7 cM,符合连锁框架图谱的要求,为下一步构建苦荞高密度遗传图谱奠定了基础。现在只有零星报道苦荞性状与基因之间的控制关系,如杨鹏^[17]关于查尔酮合成酶与苦荞黄酮含量关系的研究。构建高密度的遗传图谱可以加快重要农艺性状 QTL 定位、基因克隆、分子育种的研究,节省大量的劳

力与财力,为苦荞产业的发展做出贡献。

由于分子标记在染色体上分布的随机性及染色体不同区段交换异质性的存在,分子标记在染色体上不是均匀分布,这样连锁群上常常会产生较大的间隙,严重者则出现小片段的连锁群,于是将一条完整的染色体分成了若干小的连锁片段^[18]。苦荞的基本染色体数目是 8 条,这和本实验构建的 15 个连锁群并不相符,说明至少有 5 条染色体中存在频繁交换或标记空缺区段,而且在连锁群上还存在大于 20 cM 的间隙,同时各连锁群标记个数相差太大,比如 LG1、LG2 分别有 16、

13 个标记,而 LG14、LG15 只有 2 个标记,说明本实验所构建的连锁图谱尚未饱和,还需对图谱进一步加密。

在许多植物的遗传图谱构建过程中经常出现偏分离现象,孙秀峰等^[19]研究表明,其原因可能是孢子和配子的选择、遗传搭车效应、染色体丢失、环境因素和群体的随机效应等引起的。实验中 130 个标记,偏离孟德尔分离规律($P=0.01$)的标记有 48 个,占 36.9%,其中定位在连锁群上的有 22 个表现为显著偏分离,比例为 24.7%。本实验的偏分离比例较其它作物如水稻、玉米、甜荞偏高,这可能和笔者选用的亲本为野生种与栽培种间杂交,其性状差异性较大和遗传距离较远有关。Konish 等^[13]研究表明偏分离位点的选择作用对共显性标记间重组率估计的影响小于显性标记,显性标记更易发生偏分离。本实验 22 个偏分离标记中显性标记的偏分离有 20 个,远远大于共显性标记的比率,与其结果一致。倪会娟^[20]指出偏分离位点在染色体上的分布形式经常会出现成簇现象(两标记间距 ≤ 5 cM),易形成热点区域。本实验除了在 LG4、LG9 和 LG14 连锁群中未发现偏分离标记外,其他连锁群上均存在偏分离标记,并没有出现偏分离标记成簇现象,这可能与本实验所定位的标记少和标记间距过大而导致一部分标记没定位在连锁群上有关。

本研究基于 SSR 标记构建了一张初级苦荞遗传图谱,包含 89 个标记,涉及 15 个连锁群,基因组长度 860.2 cM,标记间平均间距 9.7 cM,并在 8 个连锁群上还存在大于 20 cM 的间隙。选用单一标记构建遗传图谱,可能会造成图谱标记间距比较大。因此,进一步增加特异分子标记,或构建重组自交系(RIL)群体,将会填满这些间隙,使构建的遗传连锁图更加饱满,标记分布更加均匀。所有作图也可使用相同的群体完成,有利于增加图谱的密度,进行图谱之间的比较与整合。因此,接下来会继续设计 SSR 引物并筛选和选用有效扩增苦荞基因组不同区域的其他分子标记技术如 AFLP、SRAP、SNP 等来加密遗传图谱,为苦荞产量及其相关性状 QTLs 定位、杂种优势机理等研究提供了一个良好的平台,同时也为综合利用苦荞相关研究信息奠定基础。

参考文献

- [1] Li Y Q, Zhou F C, Gao F, et al. Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009(57):11463-11468.
- [2] 石峻,唐福美,常玉荣,等.荞麦叶总黄酮对糖尿病并高脂血症大鼠血糖、血脂及血液流变性的影响[J]. *微循环学杂志*, 2003,13(3): 30-31.
- [3] 陕方,李文德,林汝法,等.苦荞不同提取物对糖尿病模型大鼠血糖的影响[J]. *中国食品学报*, 2006,6(1):208-211.
- [4] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis[J]. *Genome Research*, 2000(10): 967-981.
- [5] Weber J L, May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction[J]. *Am J Hum Genet*, 1989,44(3):388-396.
- [6] 王峰,官春云.甘蓝型油菜遗传图谱的构建及单株产量构成因素的 QTL 分析[J]. *遗传*, 2010,32(3):271-277.
- [7] 谢文刚,张新全,陈永霞.鸭茅杂交种的 SSR 分子标记鉴定及其遗传变异分析[J]. *草业学报*, 2010,19(2):212-217.
- [8] 张涛,韩磊,徐建策,等.杂交水稻亲本遗传距离与产量杂种优势的相关性研究[J]. *中国农业科学*, 2006,39(4):831-835.
- [9] 侯成香,李木旺,张月华,等.利用 SSR 标记进行家蚕部分品种资源的指纹图谱分析[J]. *中国农业科学*, 2006,39(10):2124-2131.
- [10] Kapoor R, Banga S S, Banga S K. A microsatellite (SSR) based linkage map of Brassica rapa[J]. *New Biotechnology*, 2009,26: 239-243.
- [11] Zhang Z S, Hu M C, Zhang J, et al. Construction of a comprehensive PCR-based marker linkage map and QTL mapping for fiber quality traits in (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Mol Breed*, 2009(24):49-61.
- [12] Yasui Y, Wang Y J, Ohnishi O. Amplified fragment length polymorphism linkage analysis of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its wild self-pollinated relative *Fagopyrum homotropicum* [J]. *Genome*, 2004(47):345-351.
- [13] Konishi T, Ohnishi O. A linkage map for common buckwheat based on microsatellite and AFLP markers[J]. *Fagopyrum*, 2006(23):1-6.
- [14] Pan S J, Chen Q F. Genetic mapping of common buckwheat using DNA, protein and morphological markers[J]. *Hereditas*, 2010(147): 27-33.
- [15] 韩瑞霞.苦荞种质遗传多样性与 CHI 基因多样性分析[D].太原:山西大学, 2012:15-18.
- [16] 赵佐成,周明德,罗定泽,等.四川省凉山州北部栽培苦荞麦的遗传多样性研究[J]. *遗传学报*, 2000,27(12):1084-1093.
- [17] 杨鹏.荞麦种质 CHS 基因遗传多样性研究[D].太原:山西大学, 2011:23-41.
- [18] 盛云燕.甜瓜遗传图谱的构建及雌雄异花同株基因定位[D].哈尔滨:东北农业大学, 2009:57-60.
- [19] 孙秀峰,陈振德,李德全.利用大白菜抗感干烧心病 F2 群体构建 AFLP 遗传连锁图[J]. *分子植物育种*, 2006,4(1):65-70.
- [20] 倪会娟.陆地棉重组近交系群体 SSR 标记遗传图谱构建与产量性状 QTL 定位[D].重庆:西南大学, 2011:31-33.