

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00861

## 小麦分子遗传图谱的加密

李艳秋<sup>1</sup> 苏志芳<sup>1,2,\*\*</sup> 王立新<sup>1</sup> 季伟<sup>1</sup> 姚骥<sup>3</sup> 赵昌平<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 北京市农林科学院北京市杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097; <sup>2</sup> 河套大学农牧科学系, 内蒙古临河 015000; <sup>3</sup> 华中农业大学生命科学技术学院, 湖北武汉 430070

**摘要:** 高密度的分子标记遗传图谱是 QTL 定位、图位克隆和分子标记辅助选择等研究的基础。以小麦品种“京花 1 号/小白冬麦”的双单倍体(DH)群体和“农大 015/复壮 30”的重组自交系(RIL)群体为作图群体, 选用在 DH 群体双亲间的 339 个多态性标记和在 RIL 群体双亲间的 343 个多态性标记分析作图群体各个株系的基因型, 对本中心近年开发的 SCAR、EST-SSR 标记以及他人开发的 SSR、EST-SSR 标记进行了染色体定位, 并利用连锁分析软件 Joinmap 4.0 将 2 个作图群体的结果整合, 最终构建了 10 个连锁群, 将 217 个 SSR、EST-SSR 和 SCAR 位点定位在 9 条染色体上, 进一步提高了小麦遗传图谱的密度。

**关键词:** 小麦; SSR; EST-SSR; SCAR; 遗传图谱

## Increasing Density of Wheat Genetic Linkage Map with Molecular Markers

LI Yan-Qiu<sup>1</sup>, SU Zhi-Fang<sup>1,2,\*\*</sup>, WANG Li-Xin<sup>1</sup>, JI Wei<sup>1</sup>, YAO Ji<sup>3</sup>, and ZHAO Chang-Ping<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing 100097, China; <sup>2</sup> Department of Farming-Grazing Science, Hetao University, Linhe 015000, China; <sup>3</sup> College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** High density genetic linkage map is the groundwork for mapping gene or quantitative trait loci, map-based cloning and marker-assisted selection. To increase the marker density on genetic linkage map of wheat (*Triticum aestivum* L.), the double haploid (DH) population derived from Jinghua 1/Xiaobai Dongmai and the recombinant inbred lines (RILs) of Nongda 015/Fuzhuang 30 were used in this study. A total of 339 polymorphic markers between the DH lines and 343 polymorphic markers between the RIL lines were detected. Using the DH population, 208 markers were mapped on 21 chromosomes, covering 3493.6 cM; and using the RIL population, 299 markers were mapped on 34 linkage groups with the average distance of 15.5 cM. The two linkage maps had 56 consistent markers in the similar regions of chromosomes. Using Joinmap 4.0 software, ten linkage groups from the two linkage maps were integrated. This linkage map was composed of 217 markers and covered 956.2 cM of wheat genome with an average distance of 4.4 cM between markers. The proportion of segregation distortion loci was 3.2–55.6% on eight chromosomes. Most markers in this map had the consistent locations with those mentioned in previous report, however, five SSR markers were located on different chromosomes. The results enhance the density of wheat linkage map and provide more information for users.

**Keywords:** Wheat; SSR; EST-SSR; SCAR; Linkage map

小麦遗传图谱既是小麦遗传理论研究的重要内容, 又是基因定位和基因图位克隆的基础, 最先用于小麦遗传作图的分子标记是限制性片段多态性(RFLP)标记<sup>[1-3]</sup>, 之后, 随着基于 PCR 技术的分子标记的诞生, 如随机扩增多态性 DNA(RAPD)<sup>[4]</sup>、扩增片段长度多态性(AFLP)<sup>[5]</sup>和简单重复序列(SSR)<sup>[6-8]</sup>, 这些具有耗时短、成本低、操作简单等优点<sup>[9]</sup>的分子标记成了构建小麦遗传作图的首选分子标记。

SSR、表达序列标签(EST)-SSR 和序列特征化扩增区域(SCAR)均为基于 PCR 技术的分子标记。近年来, 采用 SSR、EST-SSR 标记构建遗传图谱为小麦进行基因或 QTL 定位的研究很多。Somers 等<sup>[9]</sup>将 4 个作图群体的结果整合到一起绘制了包含 1 235 个 SSR 标记, 全长 2 569 cM, 标记间平均遗传距离 2.2 cM 的遗传连锁图谱。Yu 等<sup>[10]</sup>将 90 对 EST-SSR 引物的 149 个位点整合到了国际小麦作图计划的“Opata85

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA100102)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 赵昌平, E-mail: BJHWC2003@yahoo.com.cn \*\* 共同第一作者

Received(收稿日期): 2008-10-15; Accepted(接受日期): 2008-12-31.

× W7984”作图群体遗传框架图上并利用缺体-四体定位了 80 对 EST-SSR 引物的 104 个位点。Gao 等<sup>[11]</sup>利用小麦 3 个作图群体将 88 个引物的 101 个位点定位于硬粒小麦的 20 个染色体, 并进一步将这些标记定位到已有 450 个 SSR 位点的小麦遗传图谱上; 陈海梅等<sup>[12]</sup>利用中国春缺体-四体将 93 个 EST-SSR 引物的 193 个位点定位到除 4A、4B 外的 19 条染色体并利用 RIL 群体将 43 个 EST-SSR 位点绘制到遗传图谱的 11 条染色体上。SCAR 标记遗传连锁图谱的构建在西瓜 (*Citrullus lanatus*)<sup>[13]</sup>、橄榄 (*Canarium album*)<sup>[14]</sup>、葡萄 (*Vitis vinifera*)<sup>[15]</sup>等作物中已经展开, 在小麦中报道很少。分子标记遗传连锁图谱为小麦 QTL 和基因定位等研究奠定了基础, 如小麦抗病性<sup>[16]</sup>、抗旱性<sup>[17]</sup>、产量<sup>[18]</sup>、籽粒品质<sup>[19]</sup>等的 QTL 或基因定位均借助于分子标记遗传连锁图谱, 不断加密小麦的遗传连锁图, 有助于更多的 QTL 或基因得以定位。本研究旨在为北京杂交小麦工程技术研究中心近年开发的 SCAR、EST-SSR 标记以及他人开发但尚未定位的 SSR、EST-SSR 标记进行染色体定位, 进一步加密小麦遗传图谱。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和引物

作图群体分别是以京花 1 号和小白冬麦为亲本构成的 153 个 DH 系群体及以农大 015 和复壮 30 为亲本构成的 185 个 F<sub>7</sub> 代 RIL 系群体。小白冬麦为新疆农家品种, 京花 1 号为北京农林科学院作物所培育的冬小麦花培品种。农大 015 为中国农业大学以长丰 1 号和北鉴 131 杂交选育的强筋栽培小麦品种, 复壮 30 为陕西泾惠农场由农家种泾阳 30 系统选育的抗白粉病小麦品种。

SSR 引物 1 125 对, 其中 gwm 系列 265 对, wmc 系列 561 对, psp 系列 2 对, gdm 系列 33 对, barc 系列 123 对, cfa 系列 28 对, cfd 系列 96 对, dp 系列 14 对, cn 系列 2 对, Dupw 系列 1 对。EST-SSR 引物 348 对, 其中 cwm 系列 31 对, wes 系列 31 对, kusm 系列 85 对, swes 系列 47 对, cni 系列 44 对, cwem 系列 46 对, 本中心开发的 EST-SSR 引物 64 对。北京杂交小麦工程技术研究中心分子育种研究室开发的 AFLP-SCAR 引物 72 对。引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

### 1.2 总 DNA 提取及 PCR 扩增

于苗期取亲本及各株系叶片, 用简化 CTAB 法<sup>[20]</sup>

提取总 DNA。

PCR 扩增体系 20 μL, 含 10 ng μL<sup>-1</sup> 模板 DNA 6 μL, 10×buffer 2 μL, 10 mmol L<sup>-1</sup> dNTP 0.4 μL, 1.25 μmol L<sup>-1</sup> 的 SSR 引物 4 μL, 2 U μL<sup>-1</sup> *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL, H<sub>2</sub>O 7.1 μL (采用试剂购自北京鼎国生物责任有限公司)。在 Eppendorf 的 5331 型 PCR 仪上进行降落式 PCR, 扩增反应前于 94 进行 DNA 变性 5 min, 其后包括两个环节, 环节一是 94 变性 30 s, 65~55 退火 45 s, 每次循环降低 0.7 , 共 11 个循环, 72 延伸 45 s; 环节二是 94 变性 30 s, 55 退火 45 s, 72 延伸 45 s, 共 14 个循环; 环节二之后 72 延伸 5 min, 最后在 4 保存。

PCR 产物经 6% 的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离, 电压为 2 000 V, 电泳 2.0~2.5 h (根据 SSR 片段的大小确定电泳时间), 硝酸银染色<sup>[20]</sup>。

### 1.3 连锁图谱的构建与整合

构建合并遗传图谱的软件为 Joinmap 4.0。按软件要求录入一个作图群体各株系各分子标记的基因型, 同父本的基因型记作 a, 同母本的基因型记作 b, 不同于父母本的记作 “.”。作图函数为 Kosambi, 设置 LOD > 3.0, 最大遗传距离为 50 cM, 其他的参数选择默认。运行 “计算图谱” 的命令, 绘制该群体的遗传图谱; 采用同样方法构建另一个作图群体的遗传图谱; 通过对两个图谱的核查比对, 运行 “合并图谱” 的命令, 逐一合并两个图谱相同染色体的连锁群, 完成图谱的整合。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子标记连锁图的构建

从 1 545 对 SSR、EST-SSR、SCAR 引物中筛选出在京花 1 号和小白冬麦之间多态性引物 370 对, 在农大 015/复壮 30 间多态性引物 461 对, 用双亲间多态性引物分别对 2 个作图群体各个株系进行 PCR 扩增, 通过凝胶电泳分离 PCR 产物, DH 群体双亲间的 339 个多态性标记和 RIL 群体双亲间的 343 个多态性标记的产物清晰度和重复性较好, 利用上述双亲间筛选的多态性标记分析了两个作图群体中各个株系的分子标记基因型, 采用分析软件 Joinmap 4.0, 对分子标记进行连锁分析, 参考 Somers 等<sup>[9]</sup>整合的小麦高密度 SSR 标记遗传图谱, 分别绘制了两个作图群体构建的遗传连锁图。以京花 1 号/小白冬麦 DH 系群体绘制的遗传图谱全长 3 493.6 cM, 208 个标记位点定位到小麦的 21 条染色体的 21 个连锁群

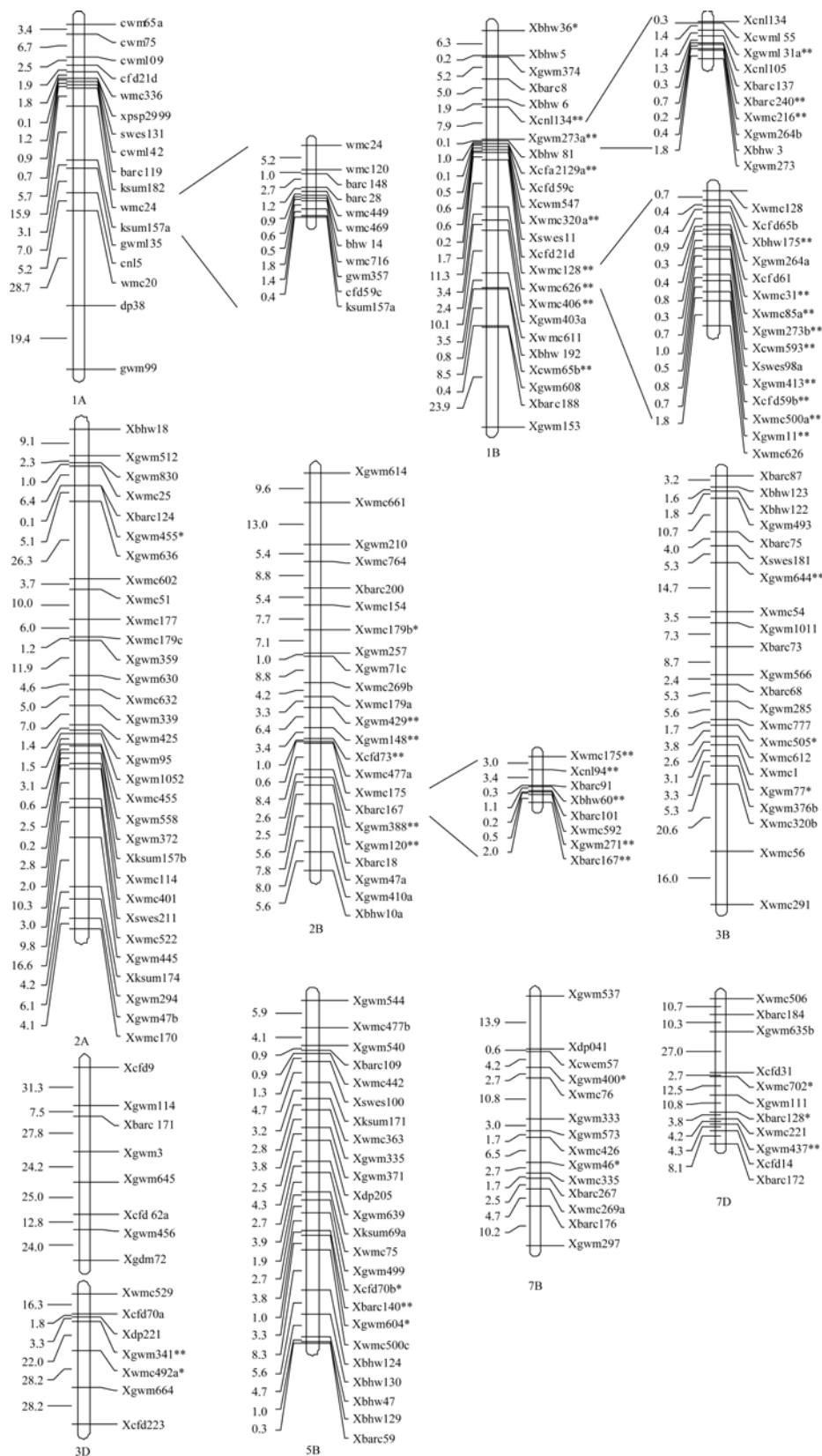


图 1 用 Joinmap 4.0 整合的小麦 9 条染色体遗传连锁图谱

Fig. 1 Genetic linkage map on 9 chromosomes of wheat integrated by Joinmap 4.0  
染色体左边数字为遗传距离(cM)。"\*"和"\*"\*表示显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )偏分离位点。

The genetic distances (cM) between marker loci are listed on the left of chromosomes.

"\*" and "\*"\*: significantly segregation distortion loci at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

中, 标记间平均遗传间距是 16.8 cM。以农大 015/复壮 30 RIL 系群体绘制的遗传图谱全长 4 633.4 cM, 299 个标记位点分布于 34 个连锁群中, 位点间平均距离为 15.5 cM。两张图谱上相同标记 56 个, 定位在两张图谱的相同染色体上。

## 2.2 图谱整合

两张遗传连锁图谱经分析和整合, 最终绘制了分布于小麦 9 条染色体的 10 个连锁群(图 1), 覆盖小麦基因组的 956.2 cM, 共有 217 个分子标记位点定位于本图谱, 标记间平均图距 4.4 cM, 两张连锁图的整合, 使 10 个连锁群上标记密度增加, 在 1A、1B、2B 染色体上形成了 4 个标记高密度区域, 区域内标记之间的平均图距小于 1.0 cM。SSR 位点 Xcfd61 和 Xwmc25 与他人定位于同一同源染色体群但在不同染色体上, SSR 位点 Xdp041 与他人定位结果完全不同(表 1)。Xbhw47 和 Xbhw60 与作者用遗传分析软件 QGA station 1.0 所定的染色体位置不同, 在本图谱上, Xbhw47 和 Xbhw60 分别定位在 5B 和 2B 染色体, 在用 QGA station 1.0 绘制的遗传图谱上, 分别定位在 6A 和 2A 染色体。

## 2.3 标记偏分离分析

作图群体双亲之间多态性标记的 2 种基因型在作图群体中之比应符合 1 : 1, 对整合图谱上 217 个标记两种基因型在作图群体中的分布进行卡方测验

表明, 在 0.01 概率水平上 41 个标记表现为偏分离, 占总标记位点的 18.9%(表 2)。在 41 个偏分离标记位点中, 12 个标记位点来自 DH 群体, 占偏分离标记位点数的 29.3%, 其余 29 个标记位点均来自 RIL 群体, 占偏分离标记位点数的 70.1%。

## 3 讨论

本研究中连锁图的构建是利用已知染色体位置的 SSR、EST-SSR 标记为框架, 根据标记之间的连锁关系将未定位的 SSR、EST-SSR、SCAR 标记标定在图谱中完成的。绝大多数标记的定位同已经发表的结果基本一致, 但部分标记在染色体上的顺序与他人的报道有所差异。由于连锁图上标记间距离和顺序是采用三点测验法计算而来, 分析软件给出的是标记之间的相对距离和位置, 不同的研究者采用不同的群体和不同的分子标记, 都可能导致不同遗传连锁图间标记顺序的差异。这种情况在每个分子标记遗传图谱上都曾发生<sup>[21-22]</sup>。本研究与他人的结果相比, 3 个位点定于不同的染色体, 其中 2 个定在相同同源群的不同染色体上。小麦同源群的染色体间同源性较高, 很容易发生重组与交换, 成为一些分子标记定在相同同源群的不同染色体的主要原因。此外, 小麦的非同源染色体之间也会发生异位, Nelson 等<sup>[23-25]</sup>的研究表明在 4AL、5AL 和 7BS 染色

表 1 与已报道结果不同的 SSR 标记位点  
Table 1 SSR marker loci different from those reported in previous reports

标记 Marker	本研究染色体定位 Chromosome location in this study	已报道结果 From previous report	
		染色体 Chromosome	信息来源 Source
Xcfd61	1B	1D	<a href="http://wheat.pw.usda.gov">http://wheat.pw.usda.gov</a>
Xwmc25	2A	2B	<a href="http://wheat.pw.usda.gov">http://wheat.pw.usda.gov</a>
Xdp041	7B	4D	Li et al.

表 2 偏分离位点的分布  
Table 2 Distribution of segregation distortion markers

染色体 Chromosome	定位的位点数目 Number of located loci	偏分离位点数 Number of segregation distortion loci			偏分离比例 Proportion of segregation distortion (%)
		总数 Total	DH 群体 DH population	RIL 群体 RIL population	
1B	45	21	1	20	46.7
2A	31	1	0	1	3.2
2B	29	11	10	1	37.9
3B	22	3	1	2	13.6
3D	15	2	0	2	13.3
5B	24	3	0	3	12.5
7B	14	2	0	2	14.3
7D	11	3	0	3	27.3

体上检测到大片段的相互易位现象, 这也许是本研究中 Xdp041 定于不同染色体的原因。采用不同作图软件也是造成定位结果不同的原因之一, 如本文提到的 Xbhw47 和 Xbhw60。

此外, 遗传作图的准确性也会受到标记偏分离现象的影响, 宋宪亮等<sup>[26]</sup>认为偏分离可以影响标记间的重组距离, 也会影响到连锁群上标记的顺序。本研究中源于重组自交系的偏分离位点明显高于双单倍体群体, 这可能与重组自交系群体构建过程中人为抽样造成的偏差或一个亲本某位点在某些株系中缺失等原因有关。

采用一种分子标记很难构建覆盖全基因组的遗传连锁图谱, 多种分子标记的联合运用增加了标记的数量, 为建立一个比较饱和的连锁图谱提供了良好的物质基础。本文利用 SSR、EST-SSR 和 AFLP-SCAR 标记共同构建图谱, 标记数量和密度符合 QTL 定位的要求, 且作图群体双亲间的产量相关性存在显著差异, 群体较大, 可以用于小麦产量等性状的 QTL 定位, 并有望得到 QTL 的精细定位。

#### 4 结论

采用“京花 1 号/小白冬麦”的 DH 群体和“农大 015/复壮 30”的 RIL 群体为作图群体, 构建了位于小麦 9 条染色体的 10 个连锁群, 覆盖小麦基因组 956.2 cM, 图谱中定位的标记位点共有 217 个, 标记间平均距离 4.4 cM。在 1A、1B、2B 染色体的 4 个标记高密度区域内, 标记之间的平均图距小于 1.0 cM, 进一步增加了小麦分子标记遗传连锁图的密度。标记偏分离现象不严重, 绝大部分标记的染色体位置和顺序同他人已发表的结果一致, 定位的准确性较高。

#### References

- [1] Chao S, Sharp P J, Worland A J, Koebner R M D, Gale M D. RFLP-based genetic maps of homoeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 495–504
- [2] Devos K M, Millan T, Gale M D. Comparative RFLP maps of homoeologous group 2 chromosomes of wheat, rye, and barley. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 784–792
- [3] Devos K M, Gale M D. Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Boil*, 1997, 35: 3–15
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531–6535
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res*, 1995, 23: 4407–4414
- [6] Röder M S, Korzun V, Wandehake K, Planschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2007–2023
- [7] Pestsova E, Ganal M W, Röder M S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, 2000, 43: 689–697
- [8] Gupta P, Balyan H, Edwards K, Isaac P, Korzun V, Röder M, Gautier M F, Joudrier P, Schlatter A, Dubcovsky J, De la Pena R, Khairallah M, Penner G, Hayden M, Sharp P, Keller B, Wang R, Hardouin J, Jack P, Leroy P. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 413–422
- [9] Somers D J, Isaac P, Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1105–1114
- [10] Yu J K, Dake T M, Singh S, Benscher D, Li W, Gill B, Sorrells M E. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome*, 2004, 47: 805–818
- [11] Gao L F, Jing R L, Huo N X, Li Y, Li X P, Zhou R H, Chang X P, Tang J F, Ma Z Y, Jia J Z. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1392–1400
- [12] Chen H-M(陈海梅), Li L-Z(李林志), Wei X-Y(卫宪云), Li S-S(李斯深), Lei T-D(雷天东), Hu H-Z(胡海州), Wang H-G(王洪刚), Zhang X-S(张宪省). Exploitation, chromosomal location and genetic mapping of EST-SSRs in wheat. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2005, 50(20): 2208–2216 (in Chinese)
- [13] Levi A, Thomas C, Joobeur T, Zhang X, Davis A. 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, 105: 555–563
- [14] Wu S B, Collins G, Sedgley M. A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite and SCAR markers. *Genome*, 2001, 47: 26–35
- [15] Fischer B, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards K, Töpfer R, Zyprian E. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 501–515
- [16] Ma J-C(马骥超), Chang N-T(常迺滔), Jiang J-L(姜俊龙), Li D-H(李大海), You X-Y(尤雪颜). Application of SSR marker in wheat resistant disease QTL and locating resistant gene. *China Plant Prot (中国植保导刊)*, 2007, 27(6): 11–15(in Chinese with English abstract)
- [17] Yang S-Z(杨随庄). Advance on study of molecular marker, gene location and gene engineering in drought resistance in wheat. *Chin Agric Sci Bull (中国农学通报)*, 2007, 23(4): 59–63 (in Chinese with English abstract)
- [18] Li W-C(李文才), Li T(李涛), Zhao F-T(赵逢涛), Li X-F(李兴锋), Wang H-G(王洪刚). QTL of wheat yield traits in D genome.

- Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2005, 20(1): 23–26 (in Chinese with English abstract)
- [19] Li W-H(李卫华), Liu W(刘伟), Liu L(刘丽), Cao L-P(曹连莆). A review of qtl research for wheat quality traits. *J Shihezi Univ (Nat Sci)* (石河子大学学报·自然科学版), 2005, 23 (3): 389–394 (in Chinese with English abstract)
- [20] Ji W(季伟), Wang L-X(王立新), Sun H(孙辉), Wang M-Y(王茅雁), Zhao C-P(赵昌平). Predigestion of wheat SSR analysis protocol. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2007, 15(5): 907–908 (in Chinese with English abstract)
- [21] Li W-H(李卫华), Liu W(刘伟), You M-S(尤明山), Xu J(许杰), Liu C-L(刘春雷), Li B-Y(李保云), Liu G-T(刘广田). Construction of wheat molecular linkage map using different SSR markers and the polymorphism of the markers. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2007, 27(1): 1–6 (in Chinese with English abstract)
- [22] Wang Z-L(王竹林), Liu S-D(刘曙东), Liu H-Y(刘惠远), He Z-H(何中虎), Xia X-C(夏先春), Chen X-M(陈新民). *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2006, 26(5): 886–892(in Chinese with English abstract)
- [23] Nelson J C, Sorrells M E, Van-Deynze A E, Lu Y H, Atkinson M, Bernard M, Leroy P, Faris J D, Anderson J A. Molecular mapping of wheat: Major genes and rearrangements in homeologous 4, 5 and 7. *Genetics*, 1995, 141: 721–731
- [24] Kojima T, Nagaoka T, Noda K. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 37–45
- [25] Blanco A, Bellomo M P, Cenci A, De Giovanni C, D'Ovidio R, Iacono E, Laddomada B, Pagnotta M A, Porceddu E, Sciancalepore A, Simeone R, Tanzarella O. A genetic linkage map of durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 721–728
- [26] Song X-L(宋宪亮), Sun X-Z(孙学振), Zhang T-Z(张天真). Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2006, 14(2): 286–292 (in Chinese with English abstract)