

利用四交群体构建陆地棉栽培品种间的 SSR 标记遗传图谱

秦鸿德, 张天真*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/棉花研究所, 江苏 南京 210095)

摘要: 作物遗传作图与 QTL 定位常应用在源于两自交系的单交群体上, 是利用 2 个亲本之间的遗传多态信息; 而育种实践中经常用到的四交群体却很少用于遗传作图。本研究将异交物种中 F_1 分离群体的作图方法应用于常异花授粉作物棉花上, 以 4 个陆地棉栽培品种泗棉 3 号、苏棉 12、中 4133 和 8891 为亲本, 构建陆地棉品种间四交作图群体泗棉 3 号/苏棉 12//中 4133/8891, 利用 JoinMap3.0 构建了 1 张陆地棉栽培品种间的 SSR 标记遗传图谱。该图谱由 56 个连锁群组成, 总长为 2 113.3 cM, 含有 286 个 SSR 多态位点, 覆盖率达 42.3%; 单个连锁群的标记数 2~24 个, 平均 5.2 个; 长度为 0.37~125 cM, 平均 38.4 cM; 标记间的平均距离为 7.4 cM。这是目前报道的第 1 张覆盖率达 40% 的陆地棉栽培品种间的分子标记遗传图谱。

关键词: 陆地棉; 四交群体; 遗传作图

中图分类号: Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2030 (2008) 04-0013-07

Genetic linkage mapping based on SSR marker with a four-way cross population in *Gossypium hirsutum* L.

QIN Hong-de, ZHANG Tian-zhen*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Cotton Research Institute,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Linkage and QTL mapping in crops have been applied mainly to single cross population derived from two inbred lines, and only polymorphism information between two parents was employed to develop linkage map. Four-way cross population was rarely used to construct linkage map in crops. In this paper, the method of linkage mapping used in heterozygous F_1 was applied to cotton, an often-crossed pollination crop, and four upland cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.), Simian 3, Sumian 12, Zhong 4133 and 8891 were used to develop a four-way cross population, Simian 3/Sumian 12//Zhong 4133/8891. A linkage map was constructed based on SSR markers with JoinMap3.0. The linkage map was comprised of 56 linkage groups spanning a distance of 0.37 cM to 125 cM with 286 mapped loci. These loci covered 2 113.3 cM, which was estimated as 42.3% of the total recombination length of the cotton genome. The average genetic distance between two loci was 7.4 cM. This is the first linkage map with distance beyond 40% of the total recombination length of the cotton genome.

Key words: upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.); four-way cross population; genetic mapping

由于亲本间的遗传差异小, 在作物分子标记构建遗传图谱和 QTL 定位中, 很少使用育种群体; 另外, 在 QTL 定位结果应用于分子标记辅助选择时, 还会因遗传背景发生变化而使分子标记辅助选择的效率降低^[1-2]。这一方面是由于在自花授粉或常异花授粉作物的同一栽培种中, 普遍存在遗传基础狭窄、品种间的遗传多态性低的现象; 另一方面则是因为作物遗传作图和 QTL 定位多应用在源于两自交系亲本的衍生群体上, 如 F_2 、BC、RIL、DH 等。这种两自交系亲本的衍生群体只用到 2 个特定亲本之间的遗传多态信息, 得到的结果只反映了 2 个特定亲本之间遗传关系, 而涉及多亲本的育种群体却很少用于遗传作图。

在植物的林木、果树、花卉等物种中, 由于性别分化或自交不亲和, 使得个体高度杂合, 且难以得到自交后代。这些物种在进行遗传作图时常利用 F_1 或全同胞交群体进行分子标记遗传作图^[3-5]。对于

收稿日期: 2007-09-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2006CB101708); 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA100105); 国家自然科学基金杰出青年基金项目 (30025029)

作者简介: 秦鸿德, 博士研究生。* 通讯作者: 张天真, 教授, 博导, 主要从事棉花遗传与分子育种研究, Tel: 025-84395307, E-mail: cotton@njau.edu.cn。

在自交作物育种实践中经常出现的四交群体来说,其遗传结构与异交物种 F_1 或全同胞交群体完全相同,因此四交群体也可以用于构建分子标记遗传图谱。

棉花是世界上重要的经济作物,有 4 个栽培种^[6]。其中陆地棉 (AD)₁ 的产量高,是世界上最主要的棉花栽培类型,占世界棉花产量的 90%^[7]。自 Reinisch 等^[8] 1994 年发表了第 1 个异源四倍体棉花的 RFLP 图谱以来,此后有多张棉花分子标记遗传图谱被报道^[9-13]。这些遗传图谱多是利用种间杂交组合构建,很少用于实际育种。Shappley 等^[14] 1996 利用陆地棉品种间的 F_2 群体,构建了第 1 张陆地棉种内分子标记遗传图谱。至今也有多个实验室报道了陆地棉种内遗传图谱^[15-18]。但是由于陆地棉的遗传基础狭窄,品种间的遗传多态性比较低,这些陆地棉种内遗传图谱所含的标记数较少,覆盖率低,不能满足实际育种的需要。为了提高图谱覆盖率,Ulloa 等^[16] 将 4 张陆地棉种内遗传图谱进行整合作图。尽管如此,构建的整合遗传图谱总的遗传距离也仅为 1 502.6 cM,只覆盖棉花全基因组的 30%。而且整合遗传图谱在用于 QTL 定位时存在诸多困难。

为了提高陆地棉种内分子标记遗传图谱的覆盖率,并使构建的分子标记遗传图谱用于棉花重要育种目标性状的 QTL 检测和分子标记辅助育种,本研究用生产上大面积种植的优良杂交棉组合的亲本,构建了四交 F_1 分离作图群体,利用杂合亲本 F_1 群体连锁分析方法^[19-21],构建了 1 张具有较高覆盖率的陆地棉品种间的 SSR 标记遗传图谱。

1 材料与方 法

1.1 亲本材料

湘杂棉 2 号、皖杂 40、中杂 028 和南抗 3 号是我国长江流域和黄河流域棉区大面积种植的 4 个优良杂交组合(它们的亲本分别来自于长江流域棉区和黄河流域棉区的品种)。本研究选用这 4 个优良杂交组合中来自长江流域的亲本泗棉 3 号、苏棉 12、中 4133 和 8891 建成 1 个四交 F_1 分离作图群体。杂交方式为泗棉 3 号/苏棉 12//中 4133/8891。2003 年在南京农业大学江浦实验站种植亲本,配制 2 个单交组合;2003 年冬在海南种植 2 个 F_1 ,作全同胞交配。2004 年得到四交 F_1 单株若干,除去假杂种后,得到 280 个四交 F_1 单株。

1.2 DNA 提取和 SSR 引物

提取 280 个四交 F_1 单株的叶片 DNA 用于 SSR 分析。DNA 提取采用 CTAB 法^[22]。SSR 引物序列从棉花微卫星标记数据库(Cotton Microsatellite Database, <http://www.cottonmarker.org>)得到^[23-27]。标记的命名包含表示其来源的字母,随后是引物的号码。SSR 分析采用张军等^[28]的分析流程。

1.3 数据处理及遗传图谱构建

在四交 F_1 分离群体中,因为亲本是杂合的,后代标记分离类型有 1:1、1:2:1、3:1(少数显性 SSR 标记)、1:1:1:1 等 4 种情况(表 1,图 1)。根据不同标记类型,按 JoinMap3.0^[29] 软件要求记录标记数据。四交亲本(即 2 个单交 F_1)的各个标记的相态(单倍型)由 2 个单交亲本确定。用 JoinMap3.0 构建连锁图谱,群体类型为 CP(cross pollinators),即由异质性 F_1 组成的分离群体。作图函数为 Kosambi 函数^[30],最大遗传距离为 45 cM,LOD 值 ≥ 4.0 。依据本实验室框架图谱^[13]及染色体定位结果^[31]将连锁群定位到相应染色体上。

2 结果与分析

2.1 标记的分离类型及在陆地棉品种间的多态比率

利用本实验室 6123 对 SSR 及 EST-SSR 引物,从中筛选出多态引物 393 对,产生 398 个多态位点,多态比例为 6.5%。其中,55 对引物的亲本带型为 $aa \times bb$ 型,在四交 F_1 单株中均为 ab 杂合型,不产生分离,不能用于作图。可用于构建遗传图谱的多态引物 338 对,产生 342 个多态位点。加上一个形态标记 P_1 (黄花药),可用于构建图谱的标记(多态位点)共 343 个。这 343 个多态位点中,在四交 F_1 分离群体中呈 2 个等位位点分离类型($aa \times ab$ 或 $ab \times ab$)的占 95.6%,呈多位点分离的比例仅为 4.4%(表 1)。

表 1 标记的分离类型及偏分离比例

Table 1 Segregating type of markers and the ratio of distorted segregating markers

标记类型 Type of markers	后代 Progeny							数目 Numbers	偏分离标记 Distorted segregating markers
	aa	ab	bb	ac	bc	ad	bd		
aa × ab	1	1						243	39
ab × ab	1	2	1					85	21
ab × ac	1	1		1	1			11	3
ab × cd				1	1	1	1	1	0
ab × cc				1	1			3	0
总数 Total								343	63

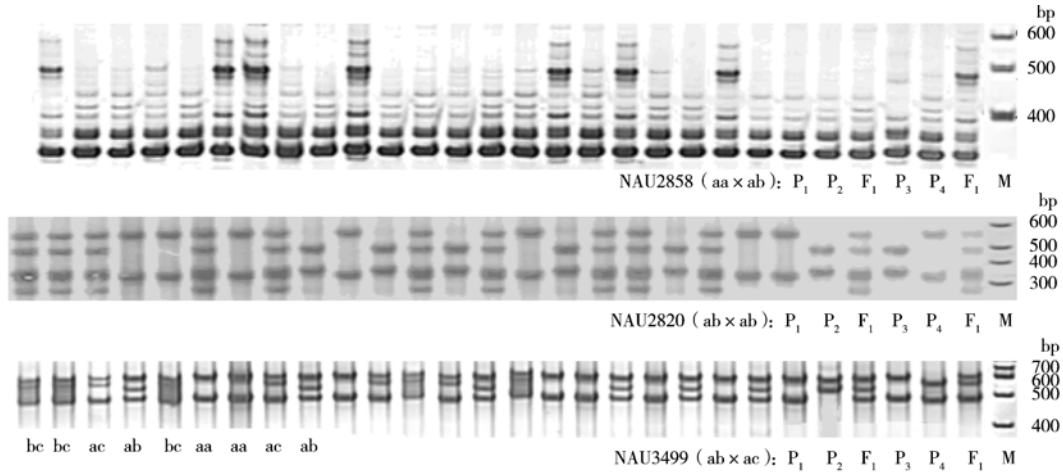


图 1 SSR 引物在四交群体中的扩增图谱

Fig. 1 SSR amplified profile in four-way cross population

P₁: 泗棉 3 号 Simian 3; P₂: 苏棉 12 Sumian 12; P₃: 中 4133 Zhong 4133; P₄: 8891; M: Marker

2.2 陆地棉品种间的遗传图谱

在可用于构建图谱的 343 个标记（多态位点）中，57 个多态位点没能被构建到连锁图上。该图谱总长为 2 113.3 cM，含有 286 个多态位点，覆盖率达 42.3%。图谱由 56 个连锁群组成（图 2）。单个连锁群的标记数为 2~24 个，平均 5.2 个；长度 0.37~125 cM，平均 38.4 cM；其中 51 个连锁群被定位到 26 条染色体上（表 2）。A 亚组由 24 个连锁群组成，总长为 808.3 cM，含有 125 个多态位点，标记间的距离平均为 6.5 cM。D 亚组由 26 个连锁群组成，总长为 1 231.7 cM，含有 151 个多态位点，标记间的距离平均为 8.2 cM。F 测验表明，A、D 亚组间的标记数没有明显差异，D 亚组标记间的平均距离大于 A 亚组。5 个连锁群未定位到任何染色体上。整个图谱标记间的距离平均为 7.4 cM。

表 2 陆地棉栽培品种间遗传图谱中染色体的连锁群、遗传距离和标记分布

Table 2 Distribution of makers on chromosome, linkage groups and genetic distance in the genetic linkage map of upland cotton cultivars

染色体 Chromosome	连锁群 Groups	标记 Markers	遗传距离/cM Distance	染色体 Chromosome	连锁群 Groups	标记 Markers	遗传距离/cM Distance
A1	2	9	36.1	D1	4	12	172.9
A2	2	7	31.3	D2	2	14	61.7
A3	2	5	44.0	D3	1	5	30.9
A4	2	4	43.7	D4	2	8	93.1
A5	3	20	101.1	D5	3	23	182.7
A6	2	8	69.8	D6	2	18	94.8
A7	1	2	12.3	D7	2	11	78.6
A8	2	6	43.1	D8	1	7	77.8
A9	1	6	24.3	D9	1	17	124.5
A10	1	26	110.0	D10	1	6	65.9
A11	3	13	94.4	D11	2	13	54.7
A12	2	11	116.8	D12	4	9	105.1
A13	1	8	81.4	D13	2	8	89.0

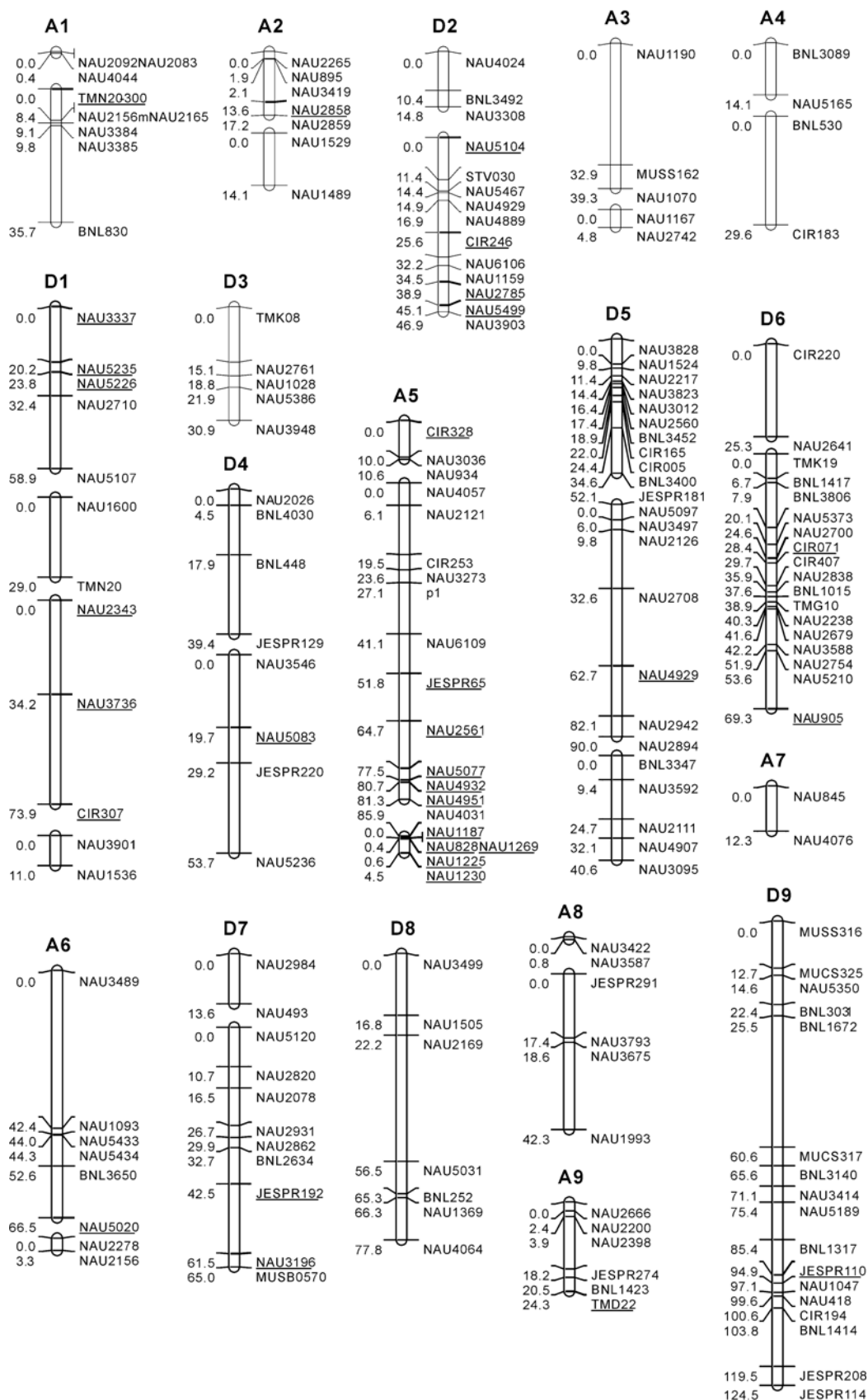
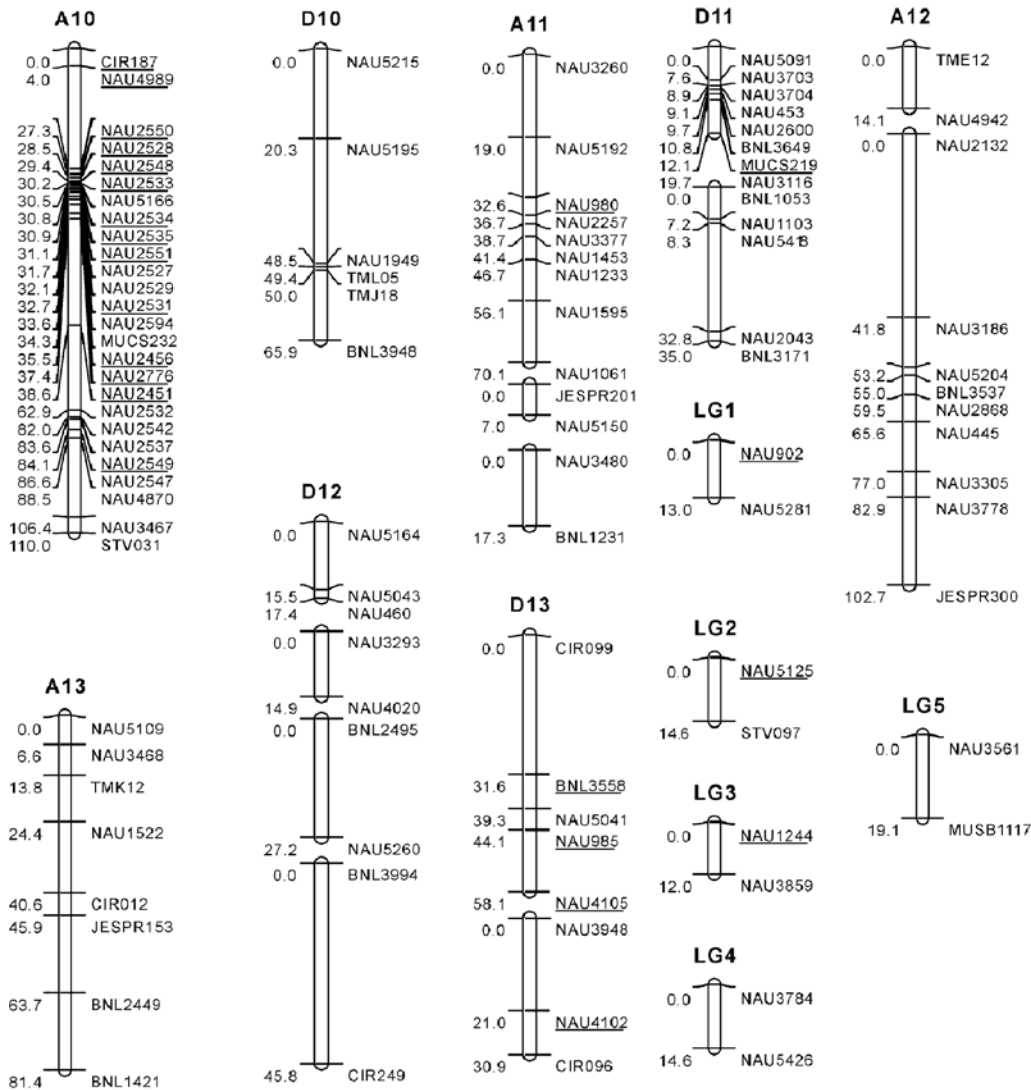


图 2 陆地棉栽培品种间四交群体 SSR 标记遗传图谱

Fig. 2 Genetic linkage map of upland cotton cultivars based on a four-way cross population and SSR markers

续图 2 Fig. 2 continued



2.3 偏分离标记的分布和比例

本研究中共出现有 63 个偏分离位点，占全部分离位点的 18.4%。其中 52 个偏分离位点（31 个偏向于 F_1 ）被定位到 22 个连锁群上。A3、A4、A7、A8、A12 及 D3、D8、D10、D12 上没有出现偏分离标记，34 个偏分离标记集中出现在染色体 A5、A10、D1、D2、D13 上，呈现明显的聚集现象。

2.4 与不同作图群体的图谱比较

Guo 等^[13]利用 TM-1//TM-1/海 7124 构建了 1 张以 SSR 标记为主的棉花种间框架图谱；Wang 等^[17]利用中 12 × 8891 组合 F_2 的重组自交系构建了 1 张以 SSR 标记为主的陆地棉品种间的遗传图谱。为了验证四交群体构建连锁图谱的效果，我们将四交群体连锁图谱与这 2 张图谱进行了比较（图 3）。从图 3 可以看出，在 A5 染色体上，四交群体连锁图谱上仅 NAU4057 和 NAU3273 两个标记与另 2 张图谱上的顺序不同；在 D9 染色体上，仅 NAU3414 和 NAU5189 两个标记与种间框架图谱不同，两染色体上其余相同标记在 3 张图谱上的顺序基本相同。四交群体连锁图谱上标记间的遗传距离与来自于陆地棉品种间重组自交系的遗传图谱相近，大于种间框架图谱上标记间的遗传距离。3 张图谱中其余染色体上相同标记的顺序也大致相同（数据未显示）。

3 讨论

在棉花育种实践中，为了克服遗传基础狭窄的不足，育种者利用多个亲本进行复合杂交或多次杂交，以综合多个亲本的优良性状，并取得了显著成效。以复合杂交或多次杂交育成的品种占新育成品种的 40% 左右。本研究中将异交物种中 F_1 分离群体的作图方法用于四交群体进行遗传作图，将自交作物

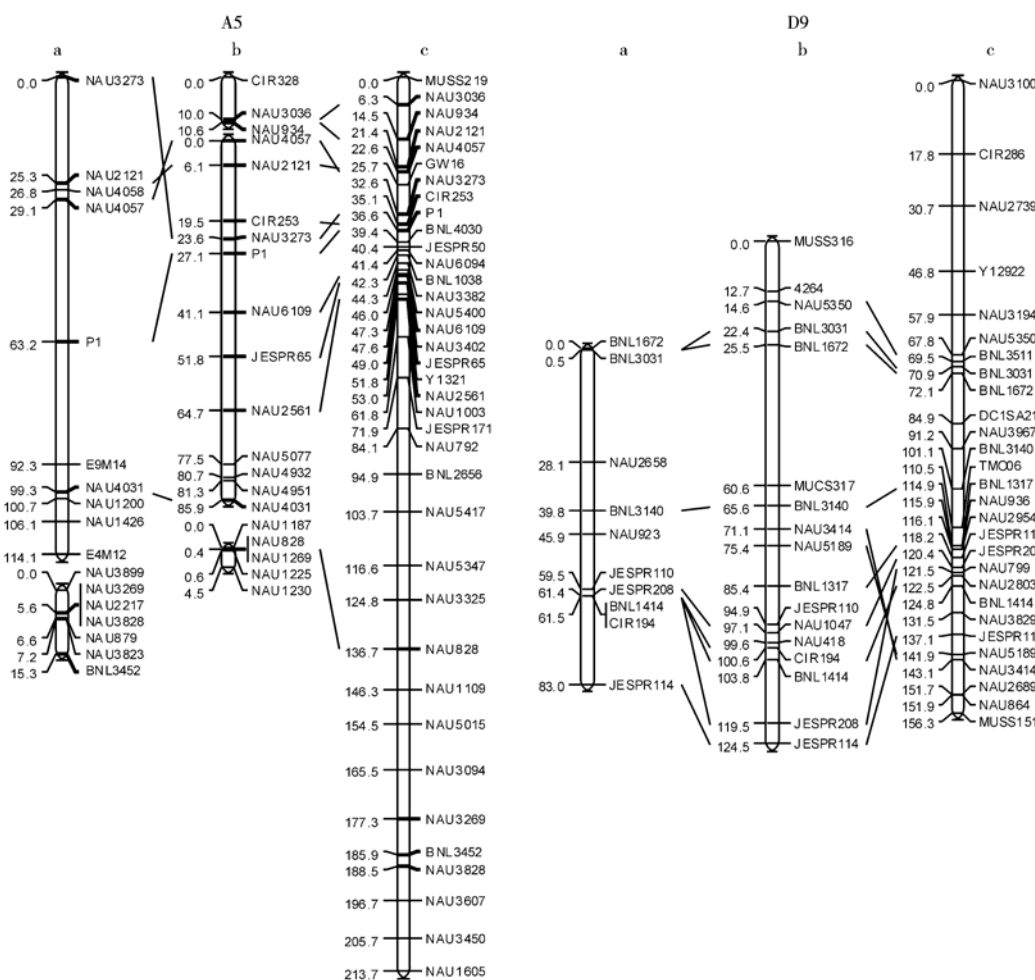


图 3 不同作图群体遗传连锁图谱的比较

Fig. 3 Order and position of markers on A5 and D9 in linkage maps derived from three different populations

a: 由中 12 × 8891 组合 F₂ 的重组自交系构建^[17] From RIL derived from F₂ of Zhong 12 × 8891; b: 由泗棉 3 号/苏棉 12//中 4133/8891 四交群体构建 From four-way cross population, Simian 3/Sumian 12//Zhong 4133/8891; c: 由 TM-1//TM-1/海 7124 构建^[13] From BC population of TM-1//TM-1/Hai7124

作图群体的类型进行了扩展, 使作物四交育种实践中的遗传图谱构建与 QTL 定位、标记辅助选择统一起来。这对于棉花重要育种性状的 QTL 定位以及在多个亲本复合杂交形成的育种群体中进行分子标记辅助选择具有重要的指导意义。

与单交群体不同, 四交群体利用了多个亲本之间的遗传差异, 构建的分子标记遗传图谱具有更多遗传差异信息, 从而提高图谱覆盖率。对于像陆地棉这样遗传多样性较低的物种, 用四交群体进行遗传作图, 优势更加明显。从表 1 中可以看出, 如果作图群体只用到 2 个亲本, 那么在本研究中, 对于 343 个多态位点, 将有近 35% 的标记 (aa × ab 型标记的一半) 不能产生多态。与最近本实验室 Wang 等^[17] 报道的陆地棉品种间的遗传图谱 (作图群体为单交组合的重组自交系) 相比, 本图谱所含标记数目和图谱覆盖率都增加近 1 倍左右。

用四交群体定位 QTL 时, 由于 2 个 F₁ 亲本中的每个位点的连锁相是已知的, 四交群体可以方便地用于 QTL 检测和效应分析。用四交群体检测 QTL, 不仅效率要明显高于单交群体, 而且还可以降低统计上 II 类错误发生的概率^[32]。由于四交群体在 QTL 分析和育种实践中的特殊作用, 我们已构建了这一四交 F₁ 分离群体单株的后代家系, 以用于性状调查和 QTL 分析。这一图谱将在后续的 QTL 分析、分子标记辅助选择上发挥作用。

参考文献:

[1] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 57-79
 [2] Guo W Z, Zhang T Z, Zhu X F, et al. Modified backcross pyramiding breeding with molecular marker-assisted selection and its applications

- in cotton [J]. *Acta Agron Sini*, 2005, 31(8): 963-970
- [3] 何祯祥, 施季森, 王明麻, 等. 杉木杂种群体分子框架遗传连锁图初报 [J]. *南京林业大学学报*, 2000, 24(6): 22-26
- [4] Hanley S, Barker H A J, van Ooijen J W, et al. A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 1087-1096
- [5] Wang C M, Zhu Z Y, Lo L C, et al. A microsatellite linkage map of barramundi, *Lates calcarifer* [J]. *Genetics*, 2007, 175: 907-915
- [6] Fryxell P A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae) [J]. *Rheede*, 1992, 2: 108-165
- [7] Wendel J F, Brubaker C L, Percial E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton [J]. *Am J Bot*, 1992, 79: 1291-1310
- [8] Reinisch A J, Dong J M, Brubaker C L, et al. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome [J]. *Genetics*, 1994, 138: 829-847
- [9] Rong J K, Abbey C, Bowers J E, et al. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*) [J]. *Genetics*, 2004, 166: 389-417
- [10] Lacape J M, Nguyen T B, Thibivilliers S, et al. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense* backcross population [J]. *Genome*, 2003, 46: 612-626
- [11] Zhang J, Guo W Z, Zhang T Z. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. × *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 1166-1174
- [12] Lin Z X, He D H, Zhang X L, et al. Linkage map construction and mapping QTLs for cotton fiber quality using SRAP, SSR and RAPD [J]. *Plant Breed*, 2005, 124: 180-187
- [13] Guo W Z, Cai C P, Wang C B, et al. A microsatellite-based, gene-rich linkage map reveals genome structure, function, and evolution in *Gossypium* [J]. *Genetics*, 2007, 176: 527-541
- [14] Shappley Z W, Jenkins J N, Watson C E Jr, et al. Establishment of molecular markers and linkage groups in two F₂ populations of upland cotton [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 915-919
- [15] Ulloa M, Meredith W R. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an intraspecific population [J]. *J Cotton Sci*, 2000, 4: 161-170
- [16] Ulloa M, Meredith W R, Shappley Z W, et al. RFLP genetic linkage maps from four F_{2;3} populations and a joinmap of *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 200-208
- [17] Wang B H, Guo W Z, Zhu X F, et al. QTL mapping of fiber quality in an elite hybrid derived-RIL population of upland cotton [J]. *Euphytica*, 2006, 152: 367-378
- [18] Zhang Z S, Xiao Y H, Luo M, et al. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of fiber-related traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Euphytica*, 2005, 144: 91-99
- [19] Maliepaard C, Jansen J, van Ooijen J W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications [J]. *Genet Res*, 1997, 70: 237-250
- [20] Arús P, Olarte C, Romero M, et al. Linkage analysis of ten isozyme genes in F₂ segregating almond progenies [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1994, 119: 339-344
- [21] Ritter E, Gebhardt C, Salamini F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents [J]. *Genetics*, 1990, 125: 645-654
- [22] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plan Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122-127
- [23] Reddy O U K, Pepper A E, Saha S, et al. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research [J]. *J Cotton Sci*, 2001, 5: 103-113
- [24] Nguyen T B, Giband M, Brotier P, et al. Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 167-175
- [25] Qureshi S N, Saha S, Kantety R V, et al. EST-SSR: a new class of genetic markers in cotton [J]. *J Cotton Sci*, 2004, 8: 112-123
- [26] Wang C B, Guo W Z, Cai C P, et al. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Gossypium raimondii* Ulbrich [J]. *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 557-561
- [27] Han Z G, Wang C B, Song X L, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* L. derived EST-SSRs in allotetraploid cotton [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 430-439
- [28] 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测 [J]. *棉花学报*, 2000, 12(5): 267-269
- [29] van Ooijen J W, Voorrips R E. JoinMapR Version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps [M]. Wageningen: The Netherlands Plant Research International, 2001: 1-46
- [30] Kosambi D D. The estimation of map distance from recombination values [J]. *Ann Eugen*, 1944, 12: 172-175
- [31] Wang K, Song X L, Han Z G, et al. Complete assignment of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by translocation and fluorescence in situ hybridization mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 73-80
- [32] Xu S. Mapping quantitative trait loci using four-way crosses [J]. *Genet Res*, 1996, 68: 175-181