

巴西橡胶树 SSR 遗传图谱的构建

冯素萍^{1,3}, 李维国², 于飞^{1,4}, 王静毅^{1,4}, 武耀廷³

1 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所, 海口 571101;

2 中国热带农业科学院橡胶研究所, 儋州 571737;

3 琼州学院, 五指山 572200;

4 海南大学农学院, 海口 570228

摘要: 以热研 88-13×IAN873 的 94 个 F₁ 群体为试材, 利用简单序列重复 (Simple sequence repeat, SSR) 标记, 采用 FsLinkageMAP 1.0 软件, 构建了巴西橡胶树热研 88-13×IAN873 的遗传连锁图谱。从 441 对 SSR 引物中筛选出 160 对具有多态信息的引物, 在分离群体中共检测到 206 个多态性位点, 176 个位点用于遗传图谱的构建; χ^2 检验结果显示, 有 147 个位点符合 1:1 分离比例, 有 12 个符合 1:2:1 分离比例, 有 17 个符合 1:1:1:1 的分离比例, 共有 13 个偏分离位点, 偏分离率低 (7.38%); 91 个 SSR 位点被分为 18 个连锁群, 覆盖橡胶树基因组 1 937.06 cM, 每个连锁群包含 2~16 个位点, 标记间的平均距离为 21.29 cM。

关键词: 巴西橡胶树; SSR 标记; 遗传图谱

Construction of genetic linkage map for rubber tree (*Hevea brasiliensis*) based on SSR markers

FENG Su-Ping^{1,3}, LI Wei-Guo², YU Fei^{1,4}, WANG Jing-Yi¹, WU Yao-Ting³

1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China;

2. Rubber Cultivation Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Danzhou 571737, China;

3. Qiongzhou University, Wuzhishan 572200, China;

4. Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: Out of 260 polymorphic loci screened from a total of 441 pairs of EST-SSR and genomic-SSR primers, 176 were used for constructing the genetic map of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) by an F₁ segregating population including 94 progenies from the cross Reyan 88-13×IAN873. Chi-square test carried out on the polymorphic loci used in constructing the map showed that 147 loci followed a segregation ratio of 1:1 and 12 loci followed a ratio of 1:2:1 and 17 loci followed a ratio of 1:1:1:1. Only 13 (7.38%) loci were distorted from the Mendelian ratio. The genetic linkage map consisted of 91 marker loci in 18 linkage groups and covered 1937.06 cM with an average genetic distance of 21.29 cM between adjacent markers. The largest linkage group consisted of 16 marker loci, while the smallest one contained only 2 marker loci.

Keywords: rubber tree (*Hevea brasiliensis*); SSR markers; genetic linkage map

SSR 标记以其共显性遗传, 在群体中常存在大量复等位性, 以及引物在种内或种间的保守性, 重复性高, 而成为构建遗传图谱、基因定位等的理想工具^[1]。特别是从 EST 中开发的 SSR 标记^[10,30], 直接来自于基因表达序列, 可直接将与目标性状基因相关的 EST 标记构建到遗传图谱, 获得在物种水平上具有普遍意义的信息; 而用直系来源的 SSR 标记或 EST 标记构建同属近缘树种的一致性图谱 (Consensus map), 对不同树种的比较基因组研究^[2]有着非常重要的意义。

巴西橡胶树的第一张分子标记遗传图谱是 Lespinasse 等^[3]运用拟测交法, 利用 F₁ 代的 106 个个体构建而成, 该图谱由 18 个连锁群组成, 包含 301 个 RFLP 标记、388 个 AFLP 标记、18 个微卫星标记和 10 个同工酶标记, 覆盖基因组的总图距为 2 144 cM, 标记间的平均距离为 3 cM。Lespinasse

收稿日期: 2009-10-16; 修回日期: 2010-01-05

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (编号: ITBBZD0715) 资助

作者简介: 冯素萍 (1972—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 植物分子遗传。E-mail: sophie_565@163.com
通讯作者: 武耀廷 (1962—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 植物分子遗传。E-mail: wuyaoting@tsinghua.org.cn
等^[3]还利用这张图谱进行了巴西橡胶树南美叶疫病的 QTL 定位, 此后许多橡胶树研究人员利用这张图谱开展了一系列的研究工作^[4-6]。和丽岗^[7]利用 261 个 AFLP 标记构建了橡胶树 GT1×IAN873 的遗传图谱, 该图谱的总图距为 1 455.57 cM, 各标记间平均图距为 5.58 cM。王惠君^[8]用 113 个 SRAP 标记和 35 个 SSR 标记构建了一张包括 18 个连锁群, 定位 61 个 SRAP 标记、7 个 SSR 标记的分子连锁图谱, 该图谱覆盖橡胶树基因组长度 774 cM, 平均标记间距为 11.38 cM。本研究利用 SSR 标记构建橡胶树热研 88-13×IAN873 的遗传图谱, 为下一步进行橡胶树重要性状的 QTL 定位、图位克隆及分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以橡胶树热研 88-13 作母本, IAN873 为父本在中国热带农业科学院橡胶研究所(儋州)橡胶林基地进行人工授粉, 得到 94 个 F₁ 作图群体单株。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

取橡胶树古铜期叶片, 用改良的 CTAB 法^[9]提取叶片基因组 DNA。

1.2.2 标记选择

本研究使用的 SSR 引物分别来自于: ①Feng 等^[10]开发的 184 对 EST-SSR 引物; ②通过 <http://tropgenedb.cirad.fr/en/rubbertree.html> 搜索得到的 23 对基因组 SSR 引物; ③本实验室利用 SAM 法开发得到的 126 对基因组 SSR 引物(未发表); ④对橡胶树 EST 数据库二次开发后得到的 108 对 EST-SSR 引物(未发表), 共 441 对引物。任选两个样品初筛后, 用两个亲本和 6 个 F₁ 代无性系进行复筛。

用温度梯度法确定不同引物的合适复性温度。在 Whatman Biometra T1 Thermocycler 上进行 PCR 扩增, 20 μL PCR 扩增体系包括: 2 μL 的 10×buffer, 0.25 μL 的 10 mol/L dNTP, 正向和反向引物各 1 μL (20 μmol), 2 μL 的叶片基因组 DNA (20 ng/μL), 0.15 μL 的 Taq 聚合酶 (5 U/μL) (试剂由上海生工生物技术公司提供), 加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min, 30 个循环中 94℃ 变性 30 s, 复性(视不同引物复性温度而定)45 s, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 延伸 5 min 结束反应。采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 银染参照张军等^[11]的方法。

1.2.3 图谱构建

采用全同胞遗传连锁图谱构建软件 FsLinkageMAP 1.0^[12] (<http://fgbio.njfu.edu.cn/tong/fslinkagemap/fslinkagemap.htm>) 进行图谱构建。

2 结果与分析

2.1 标记分析

441 对不同来源的 SSR 引物经过初筛和复筛后, 得到 160 对引物共扩增出 206 个分离位点, 平均每对引物 1.29 个。检测到的 20 种分离类型可转化为 7 种用于连锁分析的分离类型(表 1)。

表 1 SSR 标记位点分离类型及分布

分离类型	转换类型	子代原基因型 对应转换类型	期望 分离比	个数	分离类型	转换类型	子代原基因型 对应转换类型	期望 分离比	个数
aa×ab				18	a0×ab				4
00×a0	aa×ab	a-, 00 → ab, aa	1:1	31	b0×ab	a0×ab	b-, ab, a0 → a-, ab, a0	1:2:1	4
bb×ac		ab, bc → aa, ab		1	合计				8
bb×ab		ab, bb → ab, aa		35	ab×ab	ab×ab		1:2:1	12
合计				85	合计				12
ab×aa	ab×aa		1:1	22	ab×ac	ab×cd	aa, ac, ab, bc → ac, ad, bc, bd	1:1:1:1	2

ab×bb		ab, bb → ab, aa		23	ac×bc	ab, ac, bc, cc → ac, ad, bc, bd	3
a0×00		a0, 00 → ab, aa		17	ab×bc	ab, ac, bb, bc → ac, ad, bc, bd	3
合计				62	a0×b0	ab, a0, b0, 00 → ac, ad, bc, bd	2
ab×a0	ab×a0	b-, ab, a0 → a-, ab, b0	1:2:1	3	ac×ab	aa, ab, ac, bc → ac, ad, bc, bd	2
ab×b0				4	bc×ac	ab, bc, ac, cc → ac, ad, bc, bd	3
合计				7	bc×ab	ab, bb, ac, bc → ac, ad, bc, bd	2
a0×ab				4	合计		17
b0×ab	a0×ab	b-, ab, a0 → a-, ab, a0	1:2:1	4	a0×a0	a0×a0	3:1 15
合计				8	合计		15
总计							206

2.2 SSR 标记在 F₁ 代群体中的分离情况

由于 ab×a0、a0×ab 和 a0×a0 分离的复杂性，因此从构建图谱的标记中剔除，其余 4 种分离类型（部分分离类型如图 1：A, B, C 所示）共得到 176 个分离位点（表 1）。

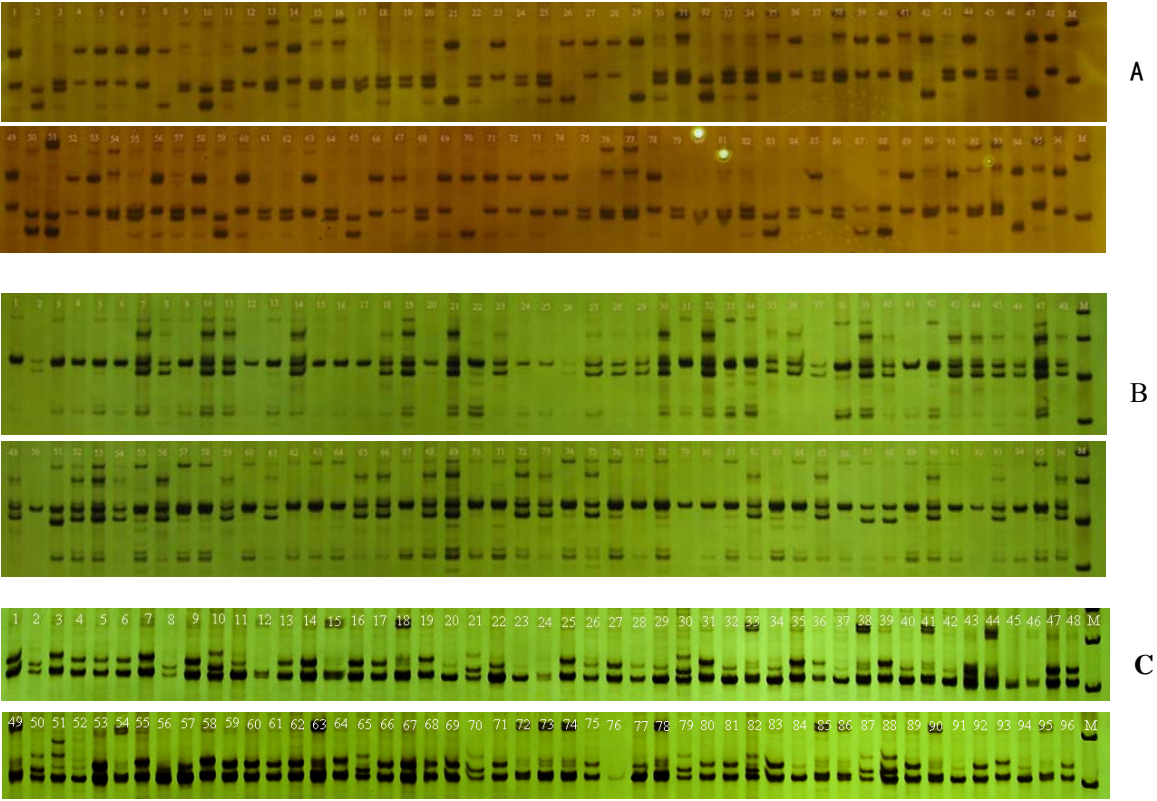


图 1 部分标记对 F₁ 群体的扩增图谱
A: 标记 HBE192 的扩增图谱；B: 标记 HBE316 的扩增图谱；C: 标记 mHbCIR425 的扩增图谱。图中 1~94 号为 F₁ 代单株，95、96 号分别为亲本热研 88-13 和 IAN873，M 为 Marker。

分别对这 4 类数据进行 χ^2 检验，在 5% 的显著水平下共计 13 个标记偏离孟德尔分离比率（表 2），占总分离位点的 7.38%。

表 2 不同分离类型 F ₁ 代的偏分离情况			
分离类型	位点数	偏分离数	偏分离率(%)
1:1	147	10	6.80
1:2:1	12	1	8.33

1:1:1:1	17	2	11.76
合计	176	13	7.38

2.3 连锁图谱的构建

本实验得到的橡胶树 SSR 标记遗传图谱包括 18 个连锁群 (表 3, 图 2), 由 91 个 SSR 标记组成, 该图谱覆盖橡胶树基因组 1 937.06 cM, 连锁群的平均长度为 107.61 cM, 每个连锁群包含 2~16 个标记, 标记间的平均距离为 21.29 cM; 各连锁群的长度在 9.33~550.83 cM, 第 1 连锁群的图距最长, 含有 16 个标记; 第 17 连锁群的图距最短, 含有 2 个标记; 最大的间隔距离位于第 1 连锁群上, 图距为 68.3 cM, 最小的间隔距离位于第 1 和第 7 连锁群上, 图距为 1.1 cM。

表 3 SSR 标记在图谱上的分布

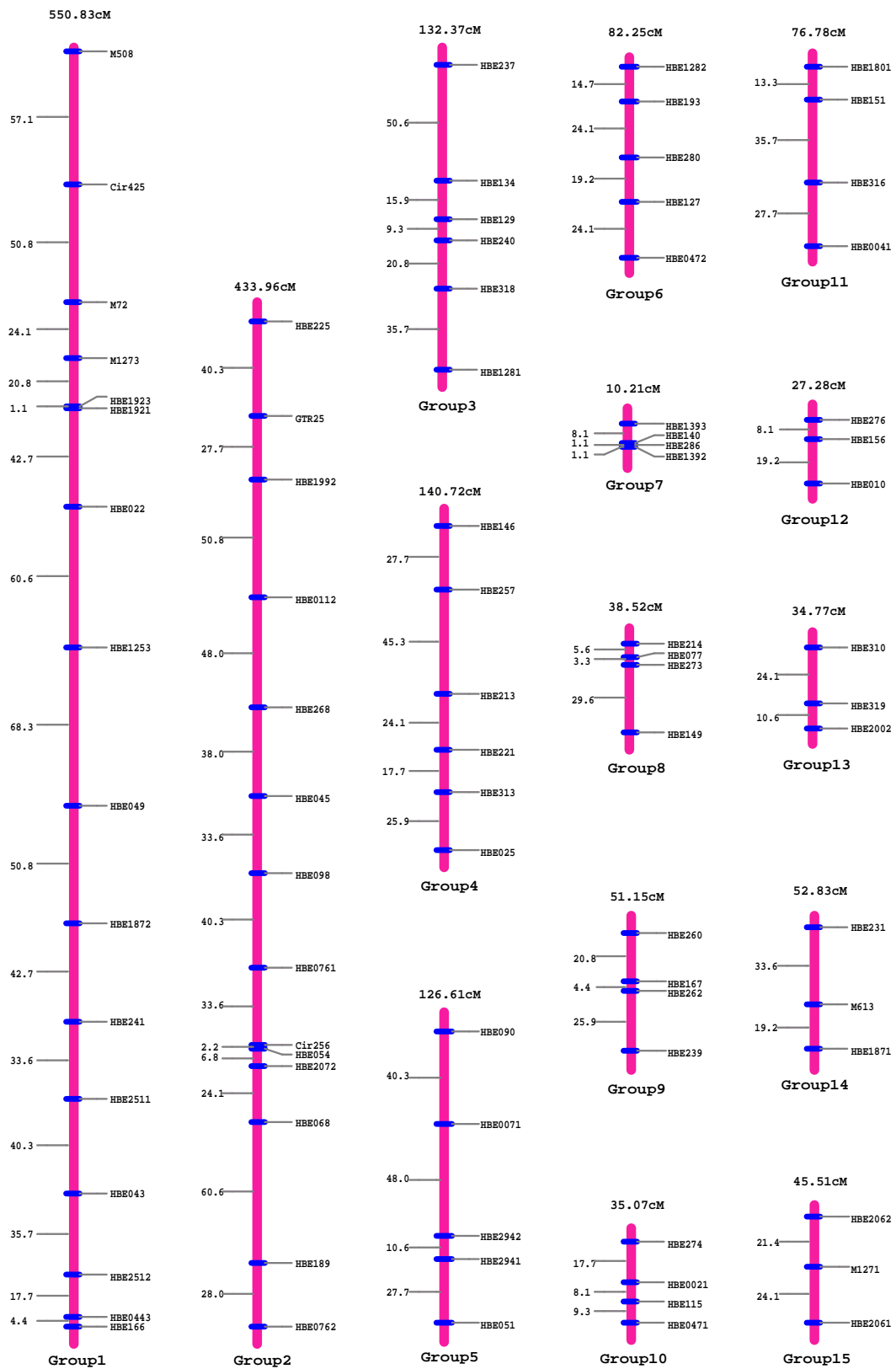
连锁群	长度(cM)	标记数目	平均距离(cM)	连锁群	长度(cM)	标记数目	平均距离(cM)
1	550.83	16	34.42	11	76.78	4	19.18
2	433.96	14	31.00	12	27.28	3	9.10
3	132.37	6	22.05	13	34.77	3	11.57
4	140.72	6	23.45	14	52.83	3	17.60
5	126.61	5	25.32	15	45.51	3	15.17
6	82.25	5	16.42	16	78.24	3	26.10
7	10.21	4	2.58	17	9.33	2	4.65
8	38.52	4	9.63	18	10.63	2	5.30
9	51.15	4	12.78				
10	35.07	4	8.78	Total	1937.06	91	21.29

3 讨论

3.1 作图群体亲本的选择

橡胶树为高度杂合的物种, 根据“双假测交理论”^[13~15], 当一个亲本的许多杂合位点在另一亲本呈纯隐性或亦为杂合位点, 这些位点在 F_1 代群体中发生分离。当双亲中一方杂合而另一方呈纯隐性时, 表现为 1:1 分离, 类似于回交一代 (BC) 群体的分离情况; 当双亲均为杂合时表现为 1:2:1 或 3:1 和 1:1:1:1 分离, 前者类似于“ F_1 ”自交, 产生“ F_2 ”代群体的分离情况, 后者则类似于两对基因的测交产生分离的情形。

理论上亲缘关系远且多态性高的种或品种是建立分离群体的理想亲本^[16], 木本植物由于起源复杂、分布广泛、遗传变异丰富及高度杂合等特性, 亲本的选择直接影响到构建连锁图谱的难易及所建图谱的适用范围。橡胶树的世代周期长, 因而很难得到像农作物那样的重组近交系用于遗传作图。然而, 通常种间或种内杂交所产生的 F_1 代群体就会有高频率的分离位点, “拟测交”作图策略的成功使林木遗传研究者有了很好的理论依据。本研究选用的材料热研 88-13×IAN873 杂交组合中, 母本热研 88-13 的亲本为 PB86×FA1717, 由巴西北方农业研究所育成, 具有抗平流低温, 生长量和产量显著比 GT1 高等特点^[17], 是目前马来西亚培育的胶木兼优新品种的重要亲本, 也是我国中规模推广级品种。IAN873 的亲本是 RRIM600×PiIB84, 是中国热带农业科学院橡胶研究所选育的一个中规模推广级品种, 具有高产、抗风的特性, 是橡胶树主要优良品种, 是早熟高产品种热研 8-79 的母本^[18]。本研究以橡胶树热研 88-13×IAN873 的 F_1 代群体为材料, 可用于构建橡胶树遗传图谱材料。



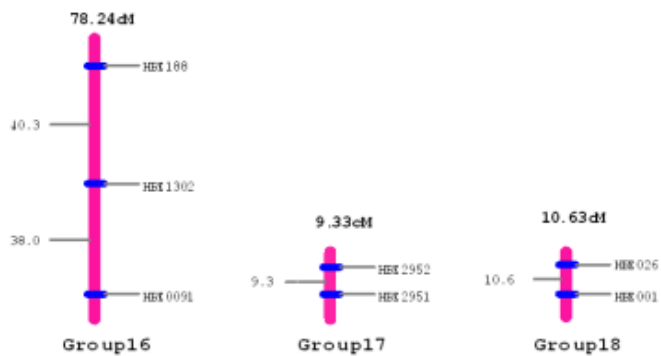


图 2 巴西橡胶树热研 88-13×IAN873 的遗传连锁图

3.2 SSR 标记的偏分离现象

偏分离会使连锁的检验受到影响，一些本来不存在连锁的标记由于各自的偏分离，可能误导出连锁的结果，而另一些本来连锁的标记也有可能由于偏分离而无法检测到连锁。发生严重偏分离的标记一般不能应用于连锁作图。

本研究中分离位点偏离孟德尔分离比例，偏分离率为 7.38%，低于已有报道^[19-21]。关于造成偏分离的原因，目前主要存在遗传搭车效应^[22,23]、基因组中偏离因子或连锁的致死基因的表达^[24]、花粉选择^[25]、染色体丢失^[26]、与抑制连锁基因表达的上位效应、构建群体的两个亲本的遗传背景有关^[27]以及实验技术方面的原因等^[28]，而数据统计时因各种实验原因造成的不同个体间标记清晰度的差异、带型缺失或模糊不清的数据等引起的误差也可导致偏分离。

3.3 连锁群与染色体的对应关系

连锁群是植物染色体在分子水平上的反映，分子连锁群的数目应该同相应物种染色体的数目一致。但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的交换值存在异质性等原因，使连锁群上常常会产生较大的空隙，严重的则出现小片段的连锁群^[29]。标记数目少时，则可能出现连锁群比染色体数目多的现象；随着标记数目增多，这些标记会与其他群上的标记连锁而把它们合成一群。标记越多，标记连锁群的数目与染色体的数目越接近，直到相等。橡胶树染色体数目为 $n=18$ ，而本研究中构建了具有 18 个连锁群的连锁图谱，但由于 SSR 标记数目偏少，连锁群与染色体并非一一对应的关系。与 Lespinasse 等^[3]构建的遗传图谱比较发现，本实验构建的 group1、group14 和 group15 分别对应于 Lespinasse 等^[3]构建遗传图谱的 g1、g11 和 g7。进一步的研究中，可采用其他的标记类型进行加密标记，在加密该遗传图谱的基础上，确定出与橡胶树 18 条染色体有对应关系的主连锁群。

参考文献（References）：

- [1] Paglia GP, Olivieri AM, Morgante M. Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Mol Gen Genet*, 1998, 258(5): 466–478.
- [2] Brown GR, Kadel III EE, Bassoni DL, Kiehne KL, Temesgen B, van Buijtenen JP, Swell MM, Marshall KA, Neal DB. Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics. *Genetics*, 2001, 159(2): 799–809.
- [3] Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 127–138.
- [4] Venkatachalam P, Priya P, Amma CK, Thulaseedharan A. Identification, cloning and sequencing analysis of a dwarf genomic-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23(5): 327–332.
- [5] 陈守才, 邵寒霜, 胡东琼. 用 RAPD 技术鉴定橡胶树抗白粉病基因连锁标记. *热带作物学报*, 1994, 15(2): 21–26.
- [6] Le Guen V, Lespinasse D, Oliver G, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M. Molecular mapping of genes conferring field

- resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theor Appl Genet*, 2003, 108(1): 160–167.
- [7] 和丽岗. 橡胶树分子遗传图谱的构建及相关性状的 QTL 初步定位[学位论文]. 华南热带农业大学, 2007.
- [8] 王惠君. 橡胶树初级分子遗传图谱的构建[学位论文]. 华南热带农业大学, 2007.
- [9] Venkatachalam P, Thomas S, Priya P, Thanseem I, Gireesh T, Saraswathyamma CK, Thulaseedharan A. Identification of DNA polymorphism within the clones of *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg. using RAPD analysis. *Indian J Nat Rubb Res*, 2002, 15(3): 172–181.
- [10] Feng SP, Li WG, Huang HS, Wang JY, Wu YT. Development, application and cross-species/genera transferability of EST-SSR makers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol Breed*, 2009, 23: 85–97.
- [11] 张军, 张天真. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测. 棉花学报, 2000, 12(5): 267–269.
- [12] 施季森, 童春发. 树木遗传图谱构建和 QTL 定位统计分析. 北京: 科学出版社 2006, 82–86.
- [13] Hemma TM, Weedon NF, Manganaris, AG, Lawson DM. Molecular marker linkage map for apple. *J Hered*, 1994, 85(1): 4–11.
- [14] Testolin R, Huang WG, Lain O, Messina R, Vecchione A, Cipriani G. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 30–36.
- [15] Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, Falistocco E, Falcinelli M. Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two-way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(2-3): 273–280.
- [16] 张德强, 张志毅, 宋婉等. 毛白杨遗传作图最适分离群体的选择. 北京林业大学学报, 2003, 25(4): 21–25.
- [17] 窦美安, 郭森元, 叶应福. 中规模推广级橡胶抗寒高产品种 IAN873 的引种利用研究. 热带作物学报, 2002, 23(3): 21–26.
- [18] 黄华孙. 中国橡胶树育种五十年. 北京: 中国农业出版社, 2005, 170–190.
- [19] 高妍, 韩明玉, 赵彩平, 宋健. 桃分子连锁图谱的构建. 果树学报, 2008, 25(4): 478–484.
- [20] Temesgen B, Brown GR, Harry DE, Kinlaw CS, Sewell MM, Neale DB. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor Appl Genet*, 2001, 102(5): 664–675.
- [21] Nikaido AM, Ujino T, Iwata H, Yoshimura K, Yoshimura H, Suyama Y, Murai M, Nagasaka K, Tsumura Y. AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica*. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(6): 825–831.
- [22] Xu SJ, Singh RJ, Hymowitz T. Establishment of a cytogenetic map soybean: progress and prospective. *Soybean Genet Newslett*, 1997, 24: 121–122.
- [23] Kinishita T. Report of the committee on gene mobilization, nomenclature and linkage group. *Rice Genet Newslett*, 1991, 8: 2–37.
- [24] Tzeng TH, Lyngholm LK, Ford CF, Bronson CR. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Genetics*, 1992, 130(1): 81–96.
- [25] Zhao B, Deng QM, Zhang QJ, Li JQ, Ye SP, Liang YS, Peng Y, Li P. Analysis of segregation distortion of molecular markers in F₂ population of rice. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(5): 449–457.
- [26] Lagercrantz U, Lydiate DJ. RFLP mapping in *Brassica nigra* indicates differing recombination rates in male and female meioses. *Genome*, 1995, 38 (2) : 225–264.
- [27] 尚伟, 周元昌. 利用水稻 ILP 标记构建水稻连锁图谱. 三明农业科技, 2007, (3) : 11–16.
- [28] Robert EM, Hunag JC, Fung E, Nielsen K, Heimtna J, Vligalys R, Mithcell TG. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety neoformans serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics*, 2004, 167(5): 619–631.
- [29] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 1994, 137(4): 1121–1137.
- [30] 安泽伟, 赵彦宏, 程汉, 李维国, 黄华孙. 橡胶树 EST—SSR 标记的开发和应用. 遗传, 2009, 31(3): 311 – 319.