

大豆四向重组自交系群体遗传图谱的构建

宁海龙,李琦,李文滨,薛红,李柏云,白雪莲,庄煦,李文霞

(东北农业大学 农学院/大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**以(垦丰14×垦丰15)×(黑农48×垦丰19)衍生的四向重组自交系群体的160个个体为试验材料,构建了一张含有154个SSR引物、包含20条连锁群的大豆遗传图谱,该图谱覆盖基因组长度为3 066.5 cM,标记间平均长度为16.31 cM。每个连锁群长度范围为32.0~335.6 cM,标记范围在4~15个,D2、L、D1b、C2、O连锁标记比较密集。

**关键词:**大豆;四向重组自交系;遗传图谱

**中图分类号:**      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0776

Construction of Linkage Map Based on a Four-way Recombinant Inbred Lines Population

NING Hai-long, LI Qi, LI Wen-bin, XUE Hong, LI Bai-yun, BAI Xue-lian, ZHUANG Xu, LI Wen-xia  
(Agronomy College of Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In this paper a F<sub>2:7</sub> of four-way recombinant inbred lines population with 160 individuals which come from the double cross (Kenfeng 14 × Kenfeng 15) × (Heinong 48 × Kenfeng 19) was used as experimental material to construct a linkage map. A new soybean linkage map was consistent of 154 SSR primers allocated in 20 linkage groups (LG). The linkage map covered 3 066.5 cM of the whole genome and the average distance among markers was 16.13 cM, and the length of LG varied from 32.0 to 335.6 cM. The number of markers in each LG ranged from 4 to 15 and high density of markers appeared on LG D2, L, D1b, C2 and O.

**Keywords:** Soybean; Four-way recombinant inbred lines; Linkage map

遗传连锁图谱是QTL定位、基因的图位克隆、比较基因组研究、分子设计育种等研究的基础。Apuya等<sup>[1]</sup>首次构建了RFLP标记的大豆遗传图谱,国内外学者构建了多张大豆遗传图谱。在早期用于遗传图谱构建的群体主要是F<sub>2</sub>群体,如Diers等利用*G. max* × *G. soja*种间杂交组合的F<sub>2</sub>群体<sup>[2]</sup>、Shoemaker等<sup>[3]</sup>用栽培大豆Clark × Harosoy杂交获得的近等基因系杂交的F<sub>2</sub>代群体、张德水等<sup>[4]</sup>以栽培品种长农4 × 半野生品种新民6的F<sub>2</sub>群体构建了遗传图谱。由于F<sub>2</sub>群体属于暂时群体,保存和应用比较困难,同时考虑大豆自花授粉的遗传特点,重组自交系群体(recombinant inbred lines,RIL)成为大豆图谱构建的主要遗传群体,如Keim等<sup>[5]</sup>利用BSR2101 × PI437.654的RIL群体、Orf等<sup>[6]</sup>利用Minsoy × Archer、Noir 1 × Archer和Minsoy × Noir 1等3个RIL群体,Stombaugh等<sup>[7]</sup>利用Minsoy × Archer的RIL群体,Hyten等<sup>[8]</sup>利用Essex × Williams的

RIL群体,Reinprecht等<sup>[9]</sup>利用RG10 × OX948的RIL群体,Pandurangan等<sup>[10]</sup>利用X3145-B-B-3-15 × AC Brant的RIL群体,Lu等<sup>[11]</sup>利用ZDD09454 × Yudou12的RIL群体,Eskandari等<sup>[12]</sup>利用OAC Wallace × OAC Glencoe的RIL群体,Rossi等<sup>[13]</sup>利用OAC Millenium × Heinong 38的RIL群体、吴晓雷等<sup>[14]</sup>利用科丰1号 × 南农1138-2的RIL群体、宛煜嵩等<sup>[15]</sup>利用晋豆23 × 灰布支的RIL群体构建了遗传图谱。在考虑增加遗传重组的机率提高遗传作图的精度和纯化定位群体遗传背景时,回交群体也逐渐用于遗传图谱的构建,如陈明阳等<sup>[16]</sup>利用中黄13(受体) × 东山69(供体)的BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>和BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>、曾庆力等<sup>[17]</sup>利用野生大豆ZYD00006(供体) × 绥农14(受体)的BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>群体构建了遗传图谱。以上用于遗传图谱构建研究的群体都是由2个亲本衍生的,连锁分析只涉及同一座位的两个等位基因。由于遗传背景的限制,单一群体的分子标记多态性较低,

收稿日期:2015-03-20  
基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究重点项目(12541x001);黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q12152);黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q09165)。  
第一作者简介:宁海龙(1975-),男,教授,博导,主要从事作物遗传育种与数量遗传研究。E-mail:ninghailongneau@126.com。  
通讯作者:李文霞(1974-),女,副教授,硕导,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:wxlee2006@aliyun.com。

导致遗传图谱整合的标记少、饱和度低等影响了实际利用的效果<sup>[18]</sup>。四向杂交设计是利用 4 个生物亲本通过双交衍生的遗传群体,四向杂交设计能够增加统计推断空间,一方面可以增加具有多态性的标记数量,增加遗传图谱的密度<sup>[19]</sup>。四向杂交设计群体连续自交形成的四向重组自交系群体。如同两个亲本构建的重组自交系群体一样,四向重组自交系群体更适合于自花授粉的作物,如大豆和常规水稻等,并且有益于研究发育性状、种子品质性状和抗性性状等,更是研究基因型 × 环境互作效应的理想材料。本研究应用前期研究中配制的四向重组自交系群体,通过 SSR 分子标记分析,构建大豆的遗传连锁图。

1 材料与方法

1.1 材料

在 2008 年,应用形态性状较大的 4 个大豆亲本配置 2 个杂交组合,垦丰 14 × 垦丰 15 和黑农 48 × 垦丰 19,将 2 个杂交组合的 F<sub>1</sub>代杂交形成四向杂交设计的 F<sub>1</sub>,在 F<sub>2</sub>经过 7 代自交,获得 160 个株系,各个基因型纯合,形成四向重组自交系(four-way recombinant inbred lines, FW-RIL)群体。在 F<sub>2</sub> ~ F<sub>6</sub>,采用单粒传法处理自交后代,在 F<sub>7</sub>种植成株行。F<sub>8</sub>于 2014 年在东北农业大学香坊农场试验地种植,每个株系各种植 1 行,小区行长 3 m,行距 65 cm,株距 6 cm。

1.2 SSR 标记分析

1.2.1 DNA 提取 采集各株系的嫩绿叶片,通过 CTAB 法提取 DNA<sup>[20]</sup>。

1.2.2 SSR 引物 根据 <http://www.soybase.org/> 网站提供的大豆 SSR 序列合成引物,参照 2003 年 Cregan 等<sup>[21]</sup> 和 Song 等<sup>[22]</sup> 发表的大豆公共图谱初步挑选了 560 对引物。

1.2.3 引物扩增 PCR 扩增应用 20 μL 反应体系为:即总 DNA 30 ng,引物(包括上游引物和下游引物)1.5 μmol · L<sup>-1</sup>,dNTP 2.5 μmol · L<sup>-1</sup>,10 × buffer 1.5 μL,Taq 酶 1 U,用超纯水补足 20 μL。

PCR 反应扩增条件为:94℃ 预变性 10 min,进入循环后,94℃ 变性 30 s;50℃ 复性 30 s;72℃ 延伸 30 s;循环 38 次后在 72℃ 延伸 5 min,置于 4℃ 下保存。

电泳方法为每个 PCR 反应体系加上 8 μL 甲酰胺双 Loading Buffer(在 PCR 板上),置 PCR 仪中变性 10 min,然后放入冰上冷却。PCR 产物在 6% 的聚丙烯酰胺标准测序胶上分离。

银染方法为:用 10% 酒精加 0.5% 乙酸固定凝胶 3 min,接着在 10% 酒精、0.5% 乙酸、0.2% Ag-NO<sub>3</sub> 的混合液中染色 10 min,清水漂 2 min 后在 3% NaOH、0.5% 甲醛混合液中显色 5 ~ 10 min。

1.2.4 数据记录 根据扩增的电泳结果,将与亲本垦丰 14 相同的带型记为 A,与亲本垦丰 15 相同的带型记为 B,与亲本垦丰 19 相同的带型记为 C,与亲本黑农 48 相同的带型记为 D,杂合的带型记 E,缺失和不清晰的带型记为 0。

1.3 遗传图谱的构建

大豆四向重组自交系群体遗传图谱构建过程包括如下主要步骤:(1)两点分析,在 FW-RIL 中,4 个亲本携带的可能等位基因型可能有 14 种,每两种类型的等位基因型的组合间的重组率可通过极大似然估计,具体通过 Newton 迭代法(Newton-Raphson 算法)实现;(2)连锁群划分,将估算的重组率作为标记间的遗传距离,构建距离矩阵,对标记进行遗传聚类,构建连锁群;(3)基因排序,采用分支跳跃法(Branch-Bound, Thompson, 1984)进行某一连锁群上标记的排序。具体算法应用 R 语言编写的函数实现。利用 MapChart 2.1 版本绘制连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 四向重组自交系群体 SSR 位点的多态性分析

选用 560 对引物在 4 个亲本之间进行多态性筛选,其中 188 对引物在 4 个亲本之间表现出良好的多态性,多态率达到 34%。其中等位基因型有 2 个的标记有 105 个,占 55.85%;等位基因型有 3 个的标记有 70 个,占 37.23%;等位基因型有 4 个的标记有 13 个,占 6.91%(见表 1)。

对 188 对 SSR 引物在群体的扩增结果进行  $\chi^2$  检测,其中 154 个(81.9%)SSR 位点在群体中符合分离比率,符合孟德尔遗传规律,有 34 个标记(18.1%)呈现偏分离。

2.2 遗传图谱的构建

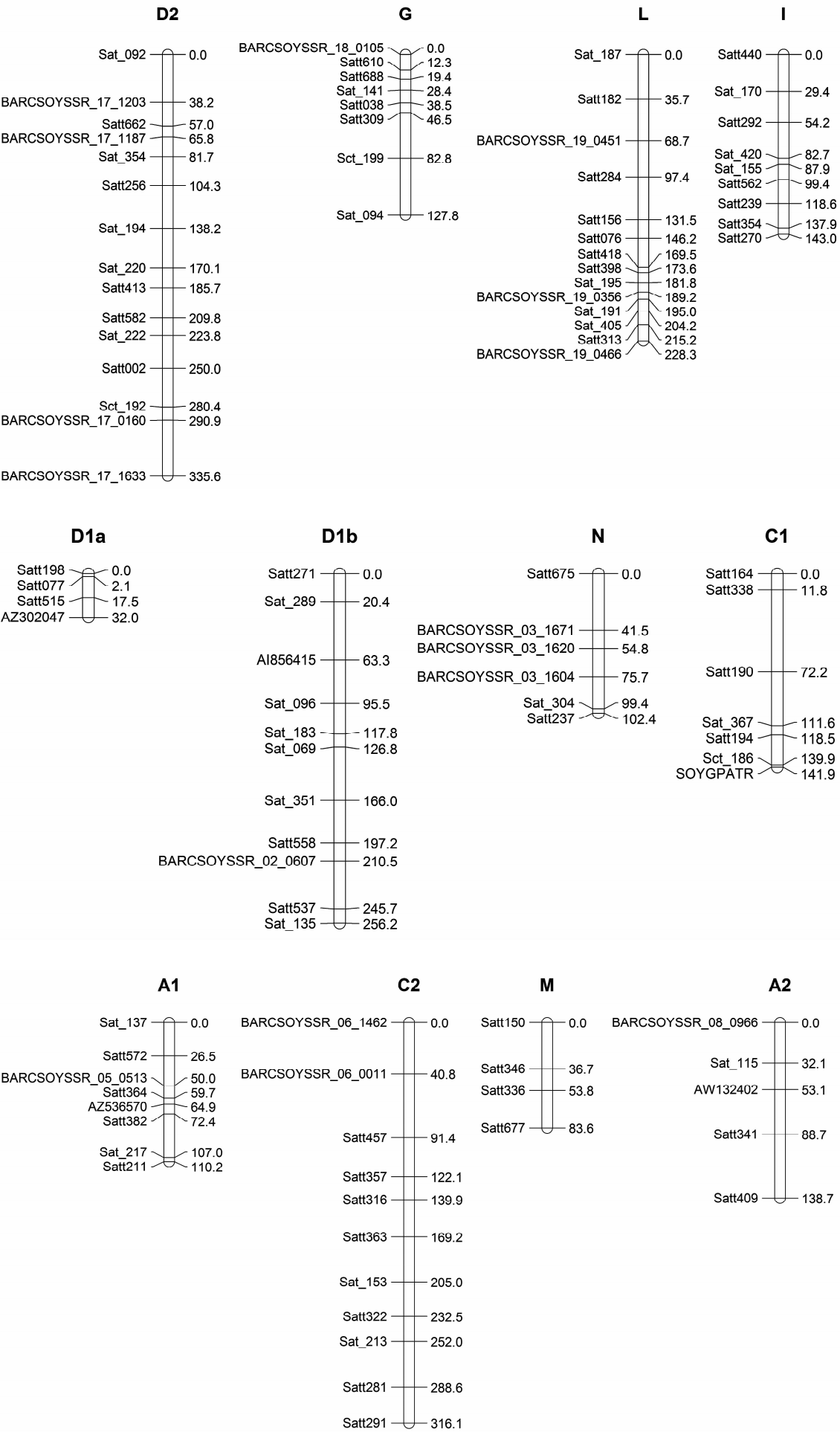
根据上述遗传图谱构建方法,该群体构建了一张含有 154 个 SSR 标记,分布于 20 个连锁群的大豆遗传图谱(图 1)。图谱覆盖基因组长度为 3 066.5 cM,标记间平均长度为 16.31 cM。每个连锁群长度范围为 32.0 ~ 335.6 cM,标记范围在 4 ~ 15 个(表 2)。其中 D2、L、D1b、C2、O 连锁标记比较密集,平均距离最大的连锁群为 J,为 29.08 cM,最小的连锁群为 D1a,为 8.00 cM,有 70 个间距大于 20 cM 的区间。

表 1 标记多态性统计  
Table 1 Statistica bout marker polymorphism

标记多态性 Marker polymorphism	等位基因型 Allelotype	标记数 Markers	标记多态性 Marker polymorphism	等位基因型 Allelotype	标记数 Markers
A = B = D	2	16	A = B	3	7
A = C = D	2	19	A = C	3	7
B = C = D	2	19	A = D	3	10
A = BC = D	2	17	B = C	3	9
A = CB = D	2	10	B = D	3	18
A = DB = C	2	11	C = D	3	19
A = B = C	2	13	ABCD	4	13

表 2 SSR 标记在遗传图谱上的分布  
Table 2 Distribution of SSR markers on the map

连锁群 Linkage group	长度 Length/cM	标记数 Number of markers	平均距离 Average distance/cM	>20 cM 区间数 Numbers of inters( >20 cM)
D2	335.6	15	22.37	7
G	127.8	8	15.98	2
L	228.3	14	16.31	4
I	143.0	9	15.89	3
D1a	32.0	4	8.00	0
D1b	256.2	11	23.29	3
N	102.4	6	17.07	3
C1	141.9	7	20.27	3
A1	110.2	8	13.78	3
C2	316.1	11	28.74	8
M	83.6	4	20.90	2
A2	138.7	5	27.74	4
K	121.7	6	20.28	3
O	190.2	10	19.02	4
B1	120.8	6	20.13	4
H	78.1	5	15.62	2
F	134.0	7	19.14	3
B2	123.4	7	17.63	4
E	137.1	6	22.85	4
J	145.4	5	29.08	4



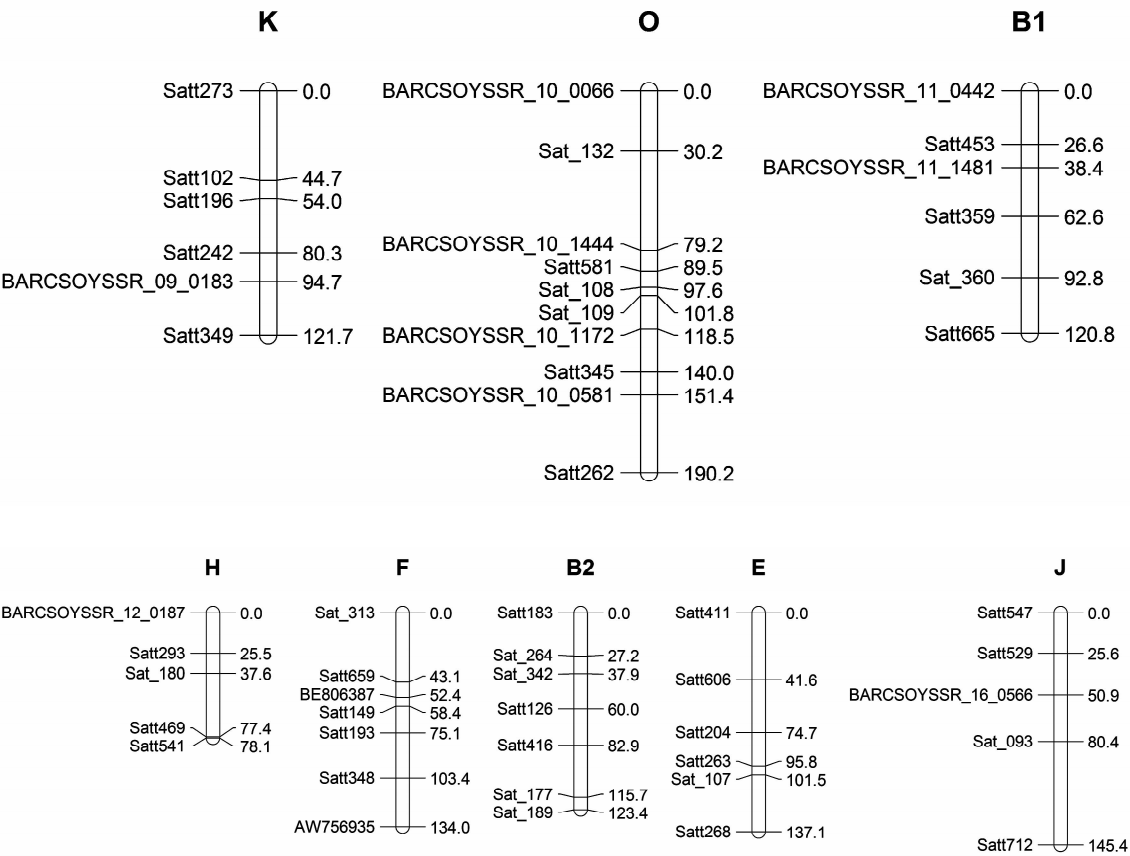


图 1 大豆遗传连锁图谱  
Fig. 1 Soybean genetic linkage map

3 讨论

在大豆育种实践中,为了克服遗传基础狭窄的不足,育种者利用 4 个亲本进行杂交,对优良性状进行聚合。但是对于四亲本交配衍生的重组自交系群体的遗传机制和标记间的连锁研究还未见报道。本研究建立四向重组自交系群体不同等位基因型位点间的连锁关系模型,建立了遗传图谱构建方法,为应用四向重组自交系群体进行 QTL 定位、图位克隆、分子设计育种奠定了方法基础。这对于大豆重要育种性状的 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。

应用构建的作图方法分析了大豆四向重组自交系群体的 SSR 标记基因型数据,构建了一张含有 154 个 SSR 引物、包含 20 条连锁群的大豆遗传图谱,该图谱覆盖基因组长度为 3 066.5 cM,标记间平均长度为 16.31 cM。相对于已经构建的连锁图谱<sup>[3,14-15]</sup>,本图谱含有的标记数目还较少。有待于进一步加密。

与单交群体不同,四向重组自交系群体利用了 4 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。对于像大豆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,将会有多个标记不能产生多态,如果只用前两个亲本配置的遗传群体,在 188 个标记中,将有 50 个标记不能产生多态性,即 A = B。

参考文献

[1] Apuya N R, Keim P, Roth E J. Restriction fragment length polymorphism as genetic markers in soybean *Glycine max* (L.) Merrill [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 75: 889-901.

[2] Diers B W, Keim P, Fehr W R, et al. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83(5): 608-612.

[3] Shoemaker R C, Specht J E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups [J]. Crop Science, 1995, 35: 436-446.

[4] 张德水,董伟,惠东威.用栽培大豆与半野生大豆间的杂种 F<sub>2</sub> 群体构建基因组分子标记连锁框架图 [J]. 科学通报, 1997, 42 (12): 1326-1330. (Zhang D S, Dong W, Hui D W. Construction of molecular marker linkage map based on a F<sub>2</sub> population from cross *Glycine* × *Soja*. [J]. Chinese Science Bulletin, 1997, 42 (12): 1326-1330. )

[5] Keim P,Schupp J M, Travis S E,et al. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers[J]. Crop Science,1997,37(2):537-543.

[6] Orf J H, Chase K, Jarvik T, et al. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations[J]. Crop Science, 1999, 39(6):1642-1651.

[7] Stombaugh S K, Orf J H, Jung H G, et al. Quantitative trait loci associated with cell wall polysaccharides in soybean seed[J]. Crop Science, 2004, 44:2101-2106.

[8] Hyten D L, Pantalone V R, Sams C E,et al. Seed quality QTL in a prominent soybean population[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(3):552-561.

[9] Reinprecht Y, Poysa V, Yu K, et al. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm[J]. Genome, 2006, 49(12):1510-1527.

[10] Pandurangan S, Pajak A, Molnar S, et al. Relationship between asparagine metabolism and protein concentration in soybean seed[J]. Journal of Experimental Botany, 2012,63(8):3173-3184.

[11] Lu W G, Wen Z X, Li H C, et al. Identification of the quantitative trait loci (QTL) underlying water soluble protein content in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126:425-433.

[12] Eskandari M, Cober E, Rajcan I. Genetic control of soybean seed oil: I. QTL and genes associated with seed oil concentration in RIL populations derived from crossing moderately high-oil parents[J]. Theoretic and Applied Genetics, 2013, 126(2):403-495.

[13] Rossi M, Orf J, Liu L, et al. Genetic basis of soybean adaptation to North American *vs.* Asian mega-environments in two independent populations from Canadian  $\times$  Chinese crosses[J]. Theoretics and Applied Genetics, 2013, 126(7):1809-1823.

[14] 吴晓雷,贺超英,王永军,等. 大豆遗传图谱的构建和分析[J]. 遗传学报,2001,28:1051-1061. (Wu X L, He C Y, Wang Y J, et al. Construction and analysis of a genetic linkage map of soybean[J]. Acta Genetica Sinica, 2001,28:1051-1061.)

[15] 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. (Wan Y S, Wang Z, Xiao Y H, et al. A soybean genetic linkage map comprising of 227 SSR loci in a soybean RIL population[J]. Molecular Plant Breeding, 2005,3(1):15-20.)

[16] 陈明阳,张金巍,韩粉霞,等. 利用 BC<sub>2</sub> 群体定位大豆蛋白质含量 QTL[J]. 中国油料作物学报, 2013,35(6):617-623. (Chen M Y,Zhang J W,Han F X,et al. Detection of soybean protein content QTL with BC<sub>2</sub> backcross population [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013,35(6):617-623.)

[17] 曾庆力,蒋洪蔚,刘春燕,等. 利用高世代回交群体对大豆小粒性状的基因型分析及 QTL 定位[J]. 中国油料作物学报, 2012,34(5):473-477. (Zeng Q L,Jiang H W,Liu C Y,et al. Genotype analysis and QTL mapping small seed size soybean with advanced backcross population[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012,34(5):473-477.)

[18] 周斌,邢邯,陈受宜,等. 大豆分子标记遗传图谱的整合及其应用[J]. 大豆科学, 2009, 28(4):557-565,573. (Zhou B, Xing H, Chen S Y, et al. An integrated genetic linkage map of soybean and its application[J]. Soybean Science, 2009, 28(4):557-565,573.)

[19] Xu S. Mapping quantitative trait loci using four-way crosses[J]. Genetic Research, 1996, 68:175-181.

[20] 王珍,方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2):281-288. (Wang Z, Fang X J. Separation of DNA in plant [J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(2):281-288.)

[21] Cregan P B,Jarvik T,Bush A L,et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Science, 1999, 39(5):1464-1490.

[22] Song Q J,Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(1):122-128.

种业学术的交流园地

种业企业的展现舞台

种业产业的信息媒介

种业文化的靓丽风景

《种业导刊》

《种业导刊》创刊于1981年,由河南省农业科学院主管,河南省农业科学院农业经济与信息研究所主办。连续出版物号:ISSN 1003-4749,CN 41-1392/S。

《种业导刊》立足于宣传农业、宣传种业、宣传企业、宣传品种,竭诚为广大种业界同仁提供最佳、最前瞻的服务和宣传。《种业导刊》集知识性、权威性、前瞻性、实用性于一体,突出市场经济和信息时代的特点,是各级农业行政领导、农业科研与推广人员、农业院校师生、种业经营者和农业生产资料经营者的良师益友。

《种业导刊》主要栏目有政策法规、专家论坛、市场预测、特别关注、种业管理、名企专访、栽培技术、繁育制种与引种、蔬菜园艺、植物保护、问题与探讨、国外农业、工作研究、品种审定等。

《种业导刊》全年12期,每月10日出版。国内邮发代号:36-119,每期定价8.00元,全年96.00元,全国各地邮局均可订阅。

敬请赐稿! 欢迎订阅!

联系方式:

地址:郑州市花园路116号

河南省农业科学院《种业导刊》编辑部

邮编:450002

电话:0371-87000220 65727121

QQ 在线:1661317955

邮箱:zydaokan@126.com

网址:种业在线(www.seedsee.com)