

坛紫菜遗传连锁图谱的构建

徐燕^{1,2}, 谢潮添², 陈昌生², 纪德华², 高亚辉^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;

2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以野生型坛紫菜纯系(♀)和红色型坛紫菜纯系(♂)作为杂交亲本, 结合四分子分析法及单个体细胞克隆的丝状体途径, 创建了由157个株系组成的坛紫菜DH作图群体, 并用经过筛选的24对SRAP引物和16对SSR引物对父母本及作图群体各株系进行双标记分析, 获得了224个多态性标记, 其中157个标记符合孟德尔分离规律。根据标记间的连锁规律, 首次构建了坛紫菜的分子遗传连锁图谱, 所构建的遗传图谱由包含124个标记(含SRAP标记104个, SSR标记20个)的5个连锁群组成, 总长度为879.2 cM, 平均标记间隔为7.09 cM, 各个连锁群长度为134.2~213.6 cM, 包含标记18~31个。最后采用3种不同方法计算得到坛紫菜的估计基因组长度平均为955.3 cM, 由此得到坛紫菜遗传连锁图谱的基因组覆盖率为92.0%。

关键词: 坛紫菜; 遗传连锁图谱; 相关序列扩增多态性; 简单重复序列; DH作图群体

中图分类号: S 917

文献标识码: A

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国紫菜人工养殖的两个主要种类之一, 为我国特有的暖温带种类, 其产量约占全国紫菜总产量的75%左右, 是南方沿海传统大宗的养殖对象, 经济效益可观^[1]。但由于坛紫菜养殖业中品种的提纯、复壮、种质改良等研究工作相对滞后, 缺乏经过人工选育的具有优良性状的新品种, 生产多以野生体为亲本进行苗种繁殖, 无法保证苗种的质量, 且多年自养、自留、自用, 导致坛紫菜种质退化, 生产效益受到了极大影响, 严重影响沿海渔民的经济收入和坛紫菜养殖业的健康发展^[2]。因此, 对坛紫菜进行种质改良, 以培育优质、高产、抗逆的新品种, 来保证坛紫菜养殖业的健康持续发展势在必行。

植物基因组学的发展为植物育种提供了许多新的工具, 分子遗传连锁图谱就是其中最为重要的一个, 它是基因定位、基因克隆、比较基因组研究以及分子标记辅助育种的基础^[3]。自从1987年第一张RFLP分子遗传连锁图谱发表以来, 各种生物分子遗传图谱相继出现, 特别是在陆生

经济作物方面, 据不完全统计, 已有近30种农作物的分子遗传连锁图谱发表^[4]。而水生生物方面, 虽然起步较晚, 但是出于“蓝色农业”发展的需要, 目前也取得了很大进展。美国农业部在1997年就启动了为期5年, 以构建水产经济动物分子遗传连锁图为首要任务的基因组研究计划^[5]。随后, 挪威、法国、丹麦、英国和日本等也相继开展了类似的基因组计划, 并发表了多张水产养殖动物的分子遗传图谱^[6]。我国虽然至今没有设立国家级的水产养殖生物基因组研究计划, 但也相继开展了鱼、虾、贝等的遗传图谱构建工作, 并已取得很大进展^[6]。在大型经济海藻方面, 遗传连锁图谱的构建工作进行得很少, 目前只见Li等^[7]根据“双向拟侧交”策略, 利用AFLP标记构建了两种海带的中等密度遗传连锁图谱。紫菜一直被认为是大型藻类分子生物学的理想模式生物^[8], 但迄今为止未见遗传图谱构建的相关报道。

因此, 本研究以野生型坛紫菜纯系(♀)和经

收稿日期:2010-05-11 修回日期:2010-06-25

资助项目:国家自然科学基金项目(40806065);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A413);国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD07B03);公益性行业(农业)科研专项项目(200903030);福建省科技平台建设项目(2007N2011)

通讯作者:高亚辉, E-mail:ctxie@126.com

过人工诱变选育的红色型坛紫菜纯系(δ)作为杂交亲本,结合四分子分析法及单个体细胞克隆的丝状体途径创建坛紫菜的 DH 永久作图群体,并采用简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)和相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)双标记技术进行基因型分析,构建坛紫菜的永久高密度分子遗传连锁图谱,以为坛紫菜的分子标记辅助育种提供技术平台,加快坛紫菜的育种进程。

1 材料与与方法

1.1 坛紫菜 DH 作图群体的构建

采用集美大学坛紫菜种质改良与应用实验室保存的坛紫菜野生型纯系 YS III (η)和经过人工诱变选育的红色型坛紫菜纯系 RTPM (δ)作为杂交亲本构建了由 157 个株系组成的坛紫菜 DH 作图群体。亲本及作图群体各株系丝状体的培养条件为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度 $50 \sim 60 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期为 12L:12D。

DH 作图群体的构建过程如下:

(1) 2007 年 3 月分别促使两亲本纯系丝状体放散壳孢子,收集壳孢子于培养瓶中培养以获得亲本叶状体;

(2) 培养叶状体 2 个月后,选择健康的红色型坛紫菜雄性叶状体和野生型雌性叶状体作为亲本,进行杂交实验;

(3) 以 1:1 的比例进行雌雄叶状体的混合培养,2 周后去掉雄性叶状体,保留雌性叶状体进行单棵培养,直至果孢子放出为止;

(4) 将收集到的果孢子单个培养于试管中,使其萌发成杂合丝状体,当丝状体藻落生长到一定大小时,用粉碎机将其打碎,继续培养,培养方法及条件同其他丝状体的培养方法;

(5) 用充气加速水流刺激法促使成熟的杂合丝状体释放壳孢子,收集到的壳孢子经筛绢网(网孔 $50 \mu\text{m}$)过滤后,置于培养皿中培养,以获得 F_1 代叶状体;

(6) F_1 代叶状体培养 3 周后,挑出叶状体,于解剖镜下仔细观察,采用四分子分析法,用剪刀剪下各个色快进行体细胞酶解,然后通过单个体细胞克隆的丝状体途径^[9]促使直接发育形成二倍体的丝状体,即获得了杂交的双单倍体群体(DH 群体)。

1.2 基因组 DNA 的提取及检测

收集培养液中培养的 DH 群体各株系的自由丝状体用滤纸吸干后,取 0.5 g 置于微型匀浆机(Ultra-turrax T8, IKA)中进行高速匀浆,然后采用传统的 CTAB 法^[10]稍作改良后进行 DNA 的提取和纯化,在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳中检查所提取 DNA 的完整性,并在 Beckman DU-600 核酸蛋白紫外分析仪上测定 DNA 浓度。

1.3 SRAP 和 SSR 标记分析

SRAP 标记分析采用 Li^[11]设计的成套 SRAP 引物,分别选取正向和反向引物 10 条随机组合进行引物筛选,SSR 标记分析则采用 Xie 等^[12]和 Zuo 等^[13]设计的共 39 对坛紫菜 SSR 引物进行筛选,PCR 扩增的反应体系和程序以本实验室经正交实验优化过的反应体系和扩增程序进行^[12,14]。

1.4 数据统计

DH 作图群体的基因型均为纯和基因型 AA 或者 aa,在进行 SRAP 和 SSR 标记分析时,其表型分为片段的有(对应基因型 AA)和无(对应基因型 aa)两种,因此在记录标记分析结果时,找出只一个亲本中出现,而在后代中呈分离状态的清晰、稳定条带进行记录,每一标记位点中,与父本相同纯和带型记为“1”,与母本相同纯和带型记为“0”,缺失或模糊不清记为“—”。各遗传标记采用“引物代号—扩增片段分子量”的形式命名,如位点 E1M7-290 是指由 SRAP 引物 EM1 和 ME7 组合扩增出的分子量为 290 的扩增片段,位点 Phes 09—210 是指由 SSR 引物对 Phes 09 扩增出的分子量为 210 的扩增片段。最后应用卡方(χ^2)检验各分离的标记位点是否符合 1:1 的分离规律,找出符合孟德尔分离比的遗传标记($P \geq 0.05$)用于遗传连锁图谱的构建, $P < 0.05$ 的分离位点记为偏分离位点,不作为构图位点。

1.5 坛紫菜分子遗传连锁图谱的构建

将所有符合孟德尔分离比的 SSR 和 SRAP 标记位点用 MAPMAKER/EXP 3.0 软件进行连锁分析,首先按软件要求对原始的“1”“0”数据进行转换,位点连锁采用多点连锁分析,并采用“Group”(LOD ≥ 3.0 , 标记间最大图距为 50 cM)命令对所有分离位点进行分群,对少于 8 个标记的连锁群直接用“Compare”命令进行标记排序,对多于 8 个标记的连锁群采用“Three point”命令

将连锁群分为几个亚群,对每个亚群分别进行排序后,再确定亚群之间的顺序。当连锁群中的标记序列排好之后,用“Map”命令进行图距运算,标记间图距以实际图距(cM)记录。对于应用以上命令还未能定位的标记,采用“Try”命令进行定位,用“Ripple”命令来检验排序的可靠性。最后将连锁标记名称及对应标记间图距输入到Mapdraw软件^[15]中进行遗传连锁图谱绘制。

1.6 基因组预期长度及图谱覆盖率的计算

首先计算标记平均间隔(S),其值为图谱总长度除以间隔总数(标记总数减去连锁群数)。采用3种方法来计算基因组预期长度:(1) G_{e1} :参考文献^[16]的方法。每个连锁群的长度加上标记平均间隔的两倍,来补偿连锁群最末端的标记和端粒距离。(2) G_{e2} :参考文献^[17]的方法。每个连锁群的长度乘以系数 $(m+1)/(m-1)$, m 为每个连锁群所包含标记的数目。(3) G_{e3} :参考文献^[17-18]的方法。每个连锁群的长度乘以系数 $N(N-1)X/K$, N 为每个连锁群所包含标记的数目, X 为各个连锁群中的最大标记间隔, K 为

LOD ≥ 3.0 的连锁标记对数。将3种方法的平均值作为坛紫菜基因组预期长度 G_e 。

遗传图谱的实际长度分两个方面,一为框架图谱的长度 G_{of} ,二为所有连锁群的总长度,即包括三联体及连锁对在内的所有连锁群的总长度 G_{oa} ^[18]。相应的框架图覆盖率为 $C_{of} = G_{of}/G_e$,总的图谱覆盖率为 $C_{oa} = G_{oa}/G_e$ 。

2 结果与分析

2.1 SRAP 和 SSR 标记分析

用100对SRAP引物组合对亲本及5个子代株系进行了引物筛选,结果有24对引物组合扩增出了只有一个亲本中出现,且在子代中呈分离状态的清晰、稳定条带。将筛选出来的24对SRAP引物对DH作图群体中的157个株系进行了遗传分析,共扩增出872个位点,其中190个位点在亲本中表现为多态性,并在子代中产生了分离(表1),即平均每对引物组合扩增出了36.33个位点,其中有7.92个位点为多态性位点,多态位点百分率为21.8%。

表1 SRAP 和 SSR 标记分析结果

Tab. 1 Results of SRAP and SSR analyzed in *P. haitanensis* DH population

标记类型 marker type	引物组合 primer combination	总位点数 no. of total loci	多态位点数 no. of polymorphic loci	多态位点百分率(%) percentage of polymorphic loci
	ME1/EM5	34	8	23.5
	ME1/EM7	37	7	18.9
	ME1/EM9	29	9	31.0
	ME2/EM1	41	8	19.5
	ME2/EM5	37	10	27.0
	ME2/EM7	45	11	24.4
	ME2/EM9	30	9	30.0
	ME3/EM7	38	12	31.6
	ME3/EM9	42	7	16.7
	ME4/EM6	27	6	22.2
	ME5/EM4	33	7	21.2
	ME5/EM6	36	8	22.2
SRAP	ME5/EM7	40	9	22.5
	ME6/EM7	34	5	14.7
	ME6/EM9	32	7	21.9
	EM1/ME10	43	7	16.3
	EM3/ME10	36	7	19.4
	EM5/ME8	47	11	23.4
	EM2/ME3	24	1	4.2
	EM5/ME7	41	13	31.7
	EM3/ME6	37	7	18.9
	EM1/ME2	31	9	29.0
	EM5/ME10	38	5	13.2
	EM3/ME3	40	7	17.5
	合计 total	872	190	21.8

· 续表 1 ·

标记类型 marker type	引物组合 primer combination	总位点数 no. of total loci	多态位点数 no. of polymorphic loci	多态位点百分率(%) percentage of polymorphic loci
SSR	Phes02	5	1	20.0
	Phes03	4	1	25.0
	Phes06	11	4	36.4
	Phes07	5	2	40.0
	Phes09	9	3	33.3
	Phes11	8	3	37.5
	Phes12	9	2	22.2
	Phes14	7	1	14.3
	Phes15	13	3	23.1
	Phes17	8	1	12.5
	Phes20	9	2	22.2
	Phes24	10	3	30.0
	Phes28	7	2	28.6
	PH14	4	1	25.0
	PH47	8	3	37.5
	PH49	5	2	40.0
	合计 total	122	34	27.9

39 对 SSR 引物对亲本及 5 个子代株系进行了引物筛选,结果有 16 对引物扩增出了只有一个亲本中出现,且在子代中呈分离状态的清晰、稳定条带。将筛选出来的 16 对 SSR 引物对 DH 作图群体中的 157 个株系进行了遗传分析,共扩增出 122 个位点,其中 34 个位点在亲本中表现为多态性,并在子代中产生了分离(表 1),即平均每对引物组合扩增出了 7.63 个位点,其中有 2.13 个位点为多态性位点,多态位点百分率为 27.9%。

2.2 遗传连锁图谱构建

按“一个位点为一个标记”假设,224 个标记

(包括 SRAP 标记 190 个,SSR 标记 34 个)经过卡方检验,有 67 个标记(包括 SRAP 标记 58 个,SSR 标记 9 个)偏离孟德尔分离规律($P < 0.05$),偏分离比例为 29.9%,这些偏分离标记不作为遗传图谱构建的标记(表 2)。符合孟德尔分离规律的 132 个 SRAP 标记和 25 个 SSR 标记经 Mapmaker 3.0 的标记连锁分析,共有 104 个 SRAP 标记和 20 个 SSR 标记构成了 5 个连锁群,2 个 SRAP 标记和 1 个 SSR 标记构成了一个三联体,7 个 SRAP 标记和 1 个 SSR 标记构成了 4 个连锁对,剩下 19 个 SRAP 标记和 3 个 SSR 标记未连锁(表 2)。

表 2 分子标记连锁分析结果
Tab. 2 Results of markers linkage analyzed

分子标记类型 molecular marker type	多态性标记数 no. of polymorphic markers	偏分离标记数 no. of distorted markers	标记偏分离比 rate of distorted markers	形成连锁群(超过 3 个标记)标记数 no. of linked markers	三联体标记数 no. of unlinked markers in triplets	连锁对标记数 no. of unlinked markers in doublets	未连锁标记数 no. of unlinked singles
SRAP	190	58	30.5%	104	2	7	19
SSR	34	9	26.5%	20	1	1	3
合计 total	224	67	29.9%	124	3	8	22

由 104 个 SRAP 标记和 20 个 SSR 标记构成的 5 个连锁群总长度为 879.2 cM,各个连锁群长度为 134.2 ~ 213.6 cM,包含标记 18 ~ 31 个(表 3,图 1)。所获得的遗传连锁图谱平均标记间隔为 7.09 cM,最大标记间隔为 33.3 cM,最小标记间隔为 0.4 cM(表 3,图 1)。

2.3 基因组长度及图谱覆盖率

所构建的坛紫菜遗传连锁图谱观察基因组长度为 879.2 cM(表 4),如果加上三联体和连锁对的长度,则观察基因组长度为 947.5 cM,而采用 3 种不同方法计算得到的坛紫菜估计基因组长度平均为 955.3 cM,由此获得坛紫菜遗传

连锁图谱的基因组覆盖率为 92.0% (只计算 5 个连锁群及 4 个连锁对)。
个连锁群)或 99.2% (包括 5 个连锁群,1 个三

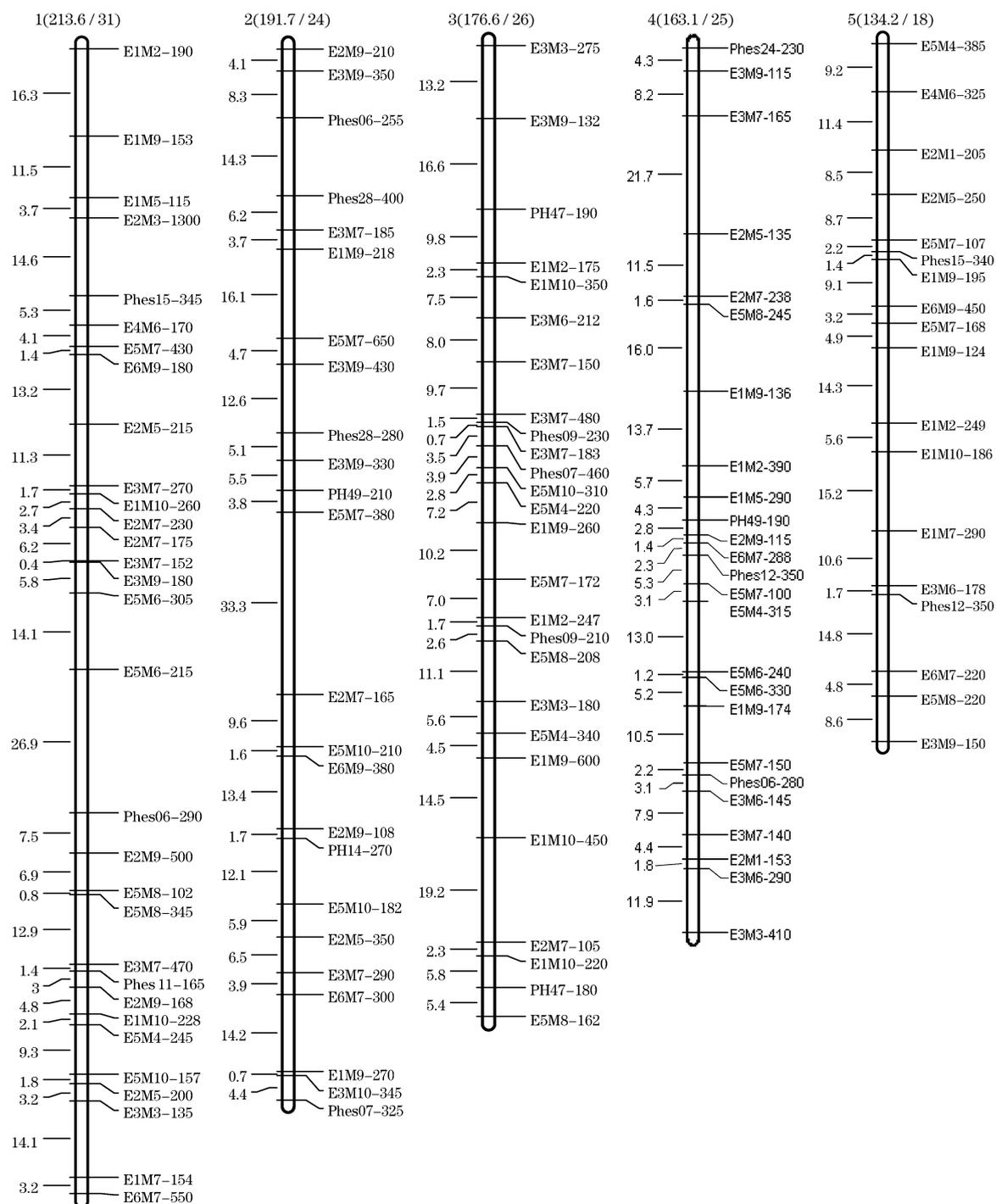


图 1 坛紫菜遗传连锁图谱

括号中斜线左侧为连锁群长度 (cM), 右侧为标记数目。连锁群左侧为相邻标记间遗传距离, 右侧为标记名称。

Fig. 1 Genetic linkage maps of *P. haitanensis*

Size of the linkage group (before slashes) and the marker number (after slashes) of each group are at the top, in parenthesis. Marker names are shown on the right of each group and the adjacent marker spacing is displayed on the left in cM Kosambi.

表 3 坛紫菜遗传连锁图谱各连锁群特征
Tab. 3 Summary of the genetic linkage map for *P. haitanensis*

连锁群 linkage group	长度(cM) length of group	标记数 no. of markers	平均标记间隔(cM) average marker spacing	最大标记间隔(cM) maximum marker spacing	最小标记间隔(cM) minimum marker spacing
1	213.6	31	6.89	26.9	0.4
2	191.7	24	7.99	33.3	0.7
3	176.6	26	6.79	19.2	0.7
4	163.1	25	6.52	21.7	1.2
5	134.2	18	7.46	15.2	1.4
合计 total	879.2	124	7.09	33.3	0.4

表 4 坛紫菜基因组长度及遗传图谱覆盖率
Tab. 4 Genome length and coverage of genetic linkage maps of *P. haitanensis*

	观察基因组长度(cM) observed genome length			估计基因组长度(cM) estimated genome length			基因组覆盖率(%) genome coverage	
	G_{oa}	G_{of}	G_{e1}	G_{e2}	G_{e3}	G_e	C_{of}	C_{oa}
数值 value	879.2	947.5	950.5	953.6	961.8	955.3	92.0%	99.2%

注: G_{of} 指遗传图谱实际长度; G_{oa} 指遗传图谱加上三联体及连锁对长度; G_e 指 G_{e1} , G_{e2} 和 G_{e3} 三种方法估计基因组长度的平均值; C_{of} 和 C_{oa} 分别指 G_{of} 和 G_{oa} 的基因组覆盖率。

Notes: G_{of} , observed total length of the framework map; G_{oa} , the map length based on framework map plus triples and doublets; G_e is the average of the estimated genome length G_{e1} , G_{e2} and G_{e3} (see ‘‘Materials and Methods’’); C_{of} and C_{oa} are the genome coverage of G_{of} and G_{oa} , respectively.

3 讨论

3.1 紫菜遗传连锁图谱的构建

细胞减数分裂过程发生的各种标记的重组交换是分子遗传图谱构建的基础。但由于紫菜的细胞小,细胞核的细微结构很难区分,染色体长度只有 $0.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$,在光学显微镜下很难观察到紫菜染色体的减数分裂过程,因此长期以来,紫菜减数分裂发生的时间与位置一直是藻类学家关注和争论的问题^[19-21],同时也成为紫菜遗传图谱构建的最大障碍。紫菜叶状体色素突变体的发现及用颜色作为遗传标记的研究为通过遗传分析推导紫菜减数分裂发生的确切位置提供了条件^[22], Ohme 等^[23]首先通过色素突变体与野生型进行杂交试验,阐明了条斑紫菜减数分裂的确切发生位置是在壳孢子萌发时第一和第二次细胞分裂时期,这一结论符合细胞学观察的实际^[24],也能解释紫菜配子体嵌合色素细胞变异的四分子遗传分析的结果^[25],因此得到了大多数藻类学家的认同,但由于条斑紫菜属于雌雄同体,很容易发生自交,且具无性生殖,难以确切追溯子代的来源,故至今未见其遗传图谱构建的相关报道。最近,严兴洪等^[26-27]通过坛紫菜的人工色素突变体与野生型进行的杂交实验推导及细胞学实验观察认为

坛紫菜的减数分裂发生的位置与条斑紫菜一致,也是在壳孢子萌发时第一和第二次细胞分裂时期,而且坛紫菜大部分为雌雄异体,很容易发生品系间杂交,不具无性生殖,在人工调控下,也能发育为雌雄同体进行自交而培育出纯系,这些特点为坛紫菜遗传连锁图谱的构建创造了条件。

紫菜遗传图谱构建时存在的另外一个困难就是杂交子代嵌合体的遗传分析问题,因为坛紫菜减数分裂发生在壳孢子萌发时的最初两次分裂,减数分裂完成后壳孢子产生的 4 个子细胞继续分裂,最终发育成为 2~4 块遗传组成不同的镶嵌叶状体,在缺乏明显标记的情况下,是无法区分同一叶状体上的各块嵌合体的,因此也就无法对其进行遗传分析。同样的,色素突变体的应用也就使得该问题迎刃而解^[22],可以采用不同的颜色特征作为遗传标记,来区分同一叶状体上的不同嵌合块,即可对各个嵌合块进行遗传分析。

因此本研究就采用坛紫菜红色型突变体同野生型杂交,并使杂交子代各嵌合块通过单个体细胞克隆的丝状体途径^[9]直接发育为二倍体的丝状体的方法构建了坛紫菜的 DH 作图群体,并通过 SRAP 和 SSR 双标记分析首次构建了包含 5 个连锁群的坛紫菜分子遗传连锁图谱。尽管 5 个连锁群与坛紫菜体细胞的 5 条染色体数目相同,但

由于缺少细胞学标记,这些连锁群是否与5条染色体一一对应以及如何对应,尚无法判断,还有待于进一步的研究。

3.2 遗传图谱构建中分子标记方法的选择

分子标记方法的选择是遗传连锁图谱构建的关键,尽管许多分子标记方法(如:RFLP, RAPD, AFLP, SSR, SRAP等)都已在各种动植物的遗传图谱构建中得到了广泛应用,但不同的标记方法在遗传图谱构建中仍然存在着各自的优缺点:RFLP标记具有重复性好、标记为共显性等优点,但操作复杂,需要大量高质量的DNA;RAPD标记操作简单,但重复性差;AFLP标记是遗传图谱构建中应用最为广泛的分子标记方法,但操作仍较为繁杂;SSR标记具有操作简单,多态信息丰富,标记为共显性等优点,但昂贵的引物开发费用及在基因组内分布的不均匀在很大程度上限制了其在遗传图谱构建中的应用;SRAP标记是一种兼有以上分子标记优点,同时克服了它们一些缺点的新型分子标记,其不足之处在于标记主要分布于编码区,对于基因分布相对较少的着丝粒及端粒附近区域检测到的机会较低,可能造成所构建的遗传图谱缩短或出现连锁群断开的现象^[11]。因此许多学者认为采用SRAP和SSR两种标记联合进行遗传连锁图谱构建是比较理想的方法,这样所构建的遗传连锁图谱可以覆盖基因组的大部分区域,且分布较为均匀^[28-30]。这一点也得到了本实验结果的证实,采用SRAP和SSR双标记构建的坛紫菜的遗传连锁图谱对基因组的覆盖率达到92%,且标记在遗传图谱上分布均匀,平均标记间隔为7.09 cM,没用出现明显的聚集和连锁群断开的现象。

3.3 作图群体及标记偏分离

作图群体的类型对于遗传图谱的构建具有重要的作用,目前用于构建遗传连锁图谱的分离群体主要有F₂代群体、回交一代群体(BC₁)、重组自交系群体(RIL)、加倍单倍体群体(DH)、单粒传系群体(SSD)和近等基因系群体等。由于RI群体和DH群体中每个株系都是纯合的,自交不分离,是一种永久性的分离群体,可以长期使用,便于不同实验室合作不断增加遗传连锁图的标记密度,而且特别适合于QTL位点的定位研究,目前已成为国际上遗传连锁图构建的主流。但由于RIL群体的构建需经过多轮自然选择和人工抽

样,作图群体的构建较为麻烦,因此本研究采用DH群体作为坛紫菜遗传连锁图谱构建的分离群体,其遗传结构直接反应了F₁配子中基因的分离和重组,作图效率高,而且作为永久群体,DH群体可以在不同的环境中生长,便于重复实验,既能提高QTL定位的准确性,也能揭示QTL与环境的相互作用^[31]。

标记偏分离现象在各种作图群体的遗传图谱构建中普遍存在,在远缘杂交组合的分离群体DH中尤为明显^[3]。导致偏分离现象的原因很多,主要有:(1)由配子体或孢子体不同发育阶段基因型的选择所造成;(2)由小孢子培养和植株再生过程的选择压造成;(3)由于遗传搭车效应,与影响偏分离的遗传因子紧密连锁的分子标记表现为严重的偏分离;(4)与F₂群体相比,DH群体中隐性有害基因的选择压增大,很可能导致偏分离的发生^[32]。此外,非生物因素如取样误差也会引起偏分离的发生。在本研究中,SRAP和SSR的标记偏分离比率分别为30.5%和26.5%,明显高于其它研究中的标记偏分离比例,首先这与坛紫菜DH作图群体本身有害基因纯和造成的选择压力增大有关。其次取样误差也是造成本研究偏分离比例明显偏高的一个重要原因,由于杂合丝状体放散的壳孢子发育而来的F₁代叶状体数量很多,在研究中不可能对所有的叶状体进行镜检,并对所有嵌合块进行酶解培养成双单倍体的丝状体,只能随机抽样。还有镜检嵌合体时,有可能相同颜色的嵌合块靠在一起,造成无法区分,这些过程都可能产生取样误差。第三,在对嵌合块进行酶解并培养为双单倍体的丝状体过程中,一部分酶解细胞无法完成整个发育过程,导致无法获得相应的丝状体,也是造成偏分离的一个原因。由于在遗传连锁图谱构建时,标记偏分离不但会影响相邻标记遗传距离的估计,甚至还会影响连锁群中标记的排列顺序^[32],在本研究中由于造成偏分离的原因很多,为避免偏分离标记对遗传图谱构建的影响,因此不把这些偏分离标记作为坛紫菜遗传图谱构建的标记。

参考文献:

- [1] 严兴洪. 坛紫菜的遗传与育种[M]// 王清印. 海水养殖生物的细胞工程育种. 北京:海洋出版社, 2007:314.
- [2] 陈昌生,徐燕,纪德华,等. 坛紫菜品系间杂交藻体

- 选育及经济性状的初步研究[J]. 水产学报,2007, 31(1):97-104.
- [3] 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,2000.
- [4] Rajapakse S. Progress in application of molecular markers to genetic improvement of horticultural crops [J]. Acta horticulturae,2003,625(2):29-36.
- [5] USDA(U. S. Department of agriculture). Five years of project of genetic maps of aquaculture species [M] // USDA regional project Number: NE-186, Duration: October1, 1997-September 30, 2002, USA,1997.
- [6] 岳志芹,孔杰,戴继勋. 水产动物遗传连锁图谱的研究现状及应用展望[J]. 遗传,2004,26(1): 97-102.
- [7] Li Y, Yang Y, Liu J, et al. Genetic mapping of *Laminaria japonica* and *L. longissima* using amplified fragment length polymorphism markers 400-in a "two-way pseudo-testcross" strategy[J]. J Integr Plant Biol,2007,49(3):392-400.
- [8] Sahoo D, Tang X R, Yarish C. *Porphyra*-the economic seaweed as a new experimental system [J]. Current Science,2002,83(11):1313-1316.
- [9] 曾庆国,刘必谦,杨锐,等. 坛紫菜单个体细胞克隆的丝状体途径[J]. 中国水产科学,2004,6(11): 549-553.
- [10] Joseph S, David W R. Molecular cloning: a laboratory manual-3rd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001.
- [11] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001,103(2):455-461.
- [12] Xie C T, Chen C S, Ji D H, et al. Characterization, Development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology,2009,21(2):367-374.
- [13] Zuo Z H, Wang C G, Cao X H, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Porphyra haitanensis* [J]. Molecular Ecology Notes,2006,7(3):522-524.
- [14] 谢潮添,陈昌生,纪德华,等. 坛紫菜 SRAP 分子标记体系的构建及种质材料的遗传分析[J]. 自然科学进展,2008,18(3):247-253.
- [15] 刘仁虎,孟金陵. MapDraw,在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传,2003,25(3):317-321.
- [16] Fishman L, Kelly A J, Morgan E, et al. A genetic map in the *Mimulus guttatus* species complex reveals transmission ratio distortion due to heterospecific interactions [J]. Genetics, 2001, 159 (4): 1701-1716.
- [17] Chakravarti A, Lasher L K, Reefer J E. A maximum-likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data [J]. Genetics, 1991, 128 (1): 175-182.
- [18] Cervera M T, Storme V, Ivens B, et al. Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers [J]. Genetics,2001,158(2):787-809.
- [19] 徐姗楠,马家海,何培民. 紫菜的减数分裂[J]. 海洋科学,2007,31(7):76-80.
- [20] 王娟,戴继勋,张义昕,等. 紫菜减数分裂的研究现状及展望[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006,36(3):377-380.
- [21] 王娟,戴继勋,张义昕,等. 紫菜的生殖与生活史研究进展 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (2): 322-327.
- [22] 张海波,候和胜. 紫菜色素突变体研究进展[J]. 生物技术通讯,2007,18(2):353-356.
- [23] Ohme M, Kunifujii Y, Miura A. Cross experiments of the color mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda [J]. Jap J Phycol,1986,34:101-106.
- [24] Akio S, Kagayaki M, Masahiro K, et al. Identification of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) meiosis by DNA quantification using confocal laser scanning microscopy [J]. J Appl Phycol, 2008, 20 (1):83-88.
- [25] Ohme M, Miura A. Tetrad analysis in conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta, Bangiales) [J]. Plant Sci,1988,57(2):135-140.
- [26] Yan X H, Li L, Agura Y. Genetic analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Appl Phycol, 2005,17(6):467-473.
- [27] 严兴洪,何亮华,有贺佑胜. 坛紫菜的细胞学观察 [J]. 水产学报,2008,32(1):131-137.
- [28] Ahmad R, Potter D, Southwick S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. J ASHS, 2004, 129: 204-210.
- [29] Lin Z, He D, Zhang X, et al. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD [J]. Plant

- Breeding, 2005, 124(2): 180–187.
- [30] Levi A, Thomas C E, Trebitsh T, *et al.* An extended linkage map for watermelon based on SRAP, AFLP, SSR, ISSR, and RAPD markers [J]. J ASHS, 2006, 131(3): 393–402.
- [31] Forster B P, Thomas W T B. Doubled haploids in genetics and plant breeding [J]. Plant Breed Rev, 2005, 25: 57–88.
- [32] Haitham S, Hamed K, Luke R, *et al.* Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR) markers [J]. Euphytica, 2002, 125(2): 265–272.

Construction of a genetic linkage map for *Porphyra haitanensis*

XU Yan^{1,2}, XIE Chao-tian², CHEN Chang-sheng², JI De-hua², GAO Ya-hui^{1*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Porphyra haitanensis* is an important economic marine crop in south China. The development of the *P. haitanensis* cultivation is highly desirable to select or breed new lines of *P. haitanensis* with strong economic traits and use them for cultivation. Molecular markers and molecular genetic maps are prerequisites for molecular breeding in any plant species. A comprehensive genetic linkage map for cultivated *P. haitanensis* has not yet been constructed. In this study, 157 double haploid (DH) lines [derived from a YS III (wild-type) × RTPM (red-type artificial pigmentation mutant) cross] were used as a mapping population in *P. haitanensis*. A total of 100 pairs of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) primers and 39 pairs of simple sequence repeat (SSR) primers were used to detect polymorphisms between the two parents and 5 DH lines. Twenty-four SRAP and 16 SSR polymorphic primer pairs were selected to analyze the DH population. A linkage genetic map comprising 104 SRAP markers and 20 SSR markers in five linkage groups, with a total length of 879.2 cM and an average of 7.09 cM between markers was constructed. The linkage groups comprised 18–31 markers ranging in length from 134.2 to 213.6 cM. The estimated genome length of *P. haitanensis* was 955.3 cM, with a coverage of 92.0% coverage. This is the first report of a comprehensive genetic map in *P. haitanensis*. The map presented here will provide a basis for the development of high-density genetic linkage maps, which will facilitate QTL mapping of desirable traits, and provide markers for MAS, map-based cloning of genes, and the introgression of beneficial genes from wild species into modern cultivars in *P. haitanensis*.

Key words: *Porphyra haitanensis*; genetic linkage map; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); simple sequence repeat (SSR); DH population

Corresponding author: GAO Ya-hui. E-mail: ctxie@126.com