

大豆重组自交系群体(ZKS-HX)遗传图谱的构建和形态标记的定位

吕祝章^{1,*}, 丁立孝¹, 田纪春², 常汝镇³, 邱丽娟³

¹日照职业技术学院, 山东日照 276826; ²山东农业大学农学院, 山东泰安 271018; ³中国农业科学院作物科学研究所, 国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程, 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081

摘要: 以大豆品种‘合丰25’为母本, 半野生大豆‘新民6号’为父本杂交得到的F_{2,9}代122个重组自交系为试验材料, 构建了含有124个SSR标记、1个EST标记、3个形态学标记的大豆遗传图谱。此图谱覆盖的基因组长度为2348.3 cM, 标记间平均距离为18.3 cM。每个连锁群长度范围为15.1~195.9 cM之间, 标记数范围2~10个。本文将控制茸毛色(*Pb*)基因定位于LG06-C2连锁群上, 与Sat_402的遗传距离为39.6 cM; 控制叶耳色(*Le*)、花色(*W*)基因定位于LG12-F连锁群上, 它们之间的遗传距离为9.9 cM, 与两边的Satt348、Sat_240标记遗传距离分别为13.3 cM和10.5 cM。

关键词: 大豆; 重组自交系; 遗传图谱; SSR; EST

A Genetic Map of Soybean Using a Recombinant Inbred Line Population (ZKS-HX) and Mapping of Morphological Markers

LÜ Zhu-Zhang^{1,*}, DING Li-Xiao¹, TIAN Ji-Chun², CHANG Ru-Zhen³, QIU Li-Juan³

¹Rizhao Polytechnic College, Rizhao, Shandong 276826, China; ²College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; ³Institute of Crop Sciences, National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology (MOA), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: A F_{2,9} RIL (recombinant inbred line) population with 122 lines was derived from a cross of ‘Hefeng 25’ as a female parent and ‘Xinmin 6’ as a male parent. A new soybean molecular genetic map was constructed by using Mapmaker. The new soybean genetic map covered 2348.3 cM, and the average distance among markers was 18.3 cM. The length of linkage group varied from 15.1 cM to 195.9 cM, and the markers on each linkage group varied from 2 to 10. 124 SSRs, 1 EST and 3 morphology markers were located in this map. A pubescence color (*Pb*) gene was located on LG06-C2 linkage group, 39.6 cM far from the marker of Sat_402. The auricle color gene (*Le*) and flower color gene (*W*) were located on LG12-F linkage group, the distance between *Le* and *W* was 9.9 cM, the distances between the two genes and the markers of Satt348 and Sat_240 were 13.3 cM and 10.5 cM, respectively.

Key words: soybean; RIL; genetic map; SSR; EST

遗传图谱是数量性状基因定位(QTL)、基因的图位克隆、比较基因组学研究以及分子标记辅助育种等的基础。大豆是严格的自花授粉作物, 由古四倍体演变而来的二倍体, 基因组较大(Arumuganathan和Earle 1991; Shoemaker等1996)、染色体又很小, 难以进行细胞遗传学研究, 因此, 构建分子遗传图谱就显得尤其重要。

Apuya等于1988年以2个栽培大豆品种‘Minsoy’和‘Noir1’杂交得到的60个F₂为作图群体, 首次利用11个RFLP (restriction fragment length polymorphism)标记构建了第1张含有4个连锁群的遗传图谱。随后各国学者先后用RFLP、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、SSR

(simple sequence repeats)、同工酶及形态学标记构建了多张大豆遗传图谱(Keim等1990; Lark 1993; Shoemaker和Olson 1993; Akkaya等1995; Shoemaker和Specht 1995; Lee等1996; Mansur等1996; Keim等1997; Apuya等1998; Cregan等1999; Song等2004)。Cregan等(1999)将3个不同群体的连锁图谱整合为含20个连锁群、1423个标记的大豆“公共图谱”。该图谱包括689个RFLP、606个SSR、79个RAPD、10个AFLP、10个同工酶标记和26个经典遗传学标记。Song等(2004)采用

收稿 2008-10-20 修定 2008-12-22

资助 国家自然科学基金(30490250)。

* E-mail: ytzhu Zhang@tom.com; Tel: 0633-8172898

5个群体对大豆整合遗传图谱进行加密, 补加了420个新的SSR, 使标记间的平均距离缩短为2.5 cM, 标记总数达1 849个。这是迄今为止标记数最多、密度最高的一张大豆“公共图谱”。

我国大豆遗传图谱研究工作始于1997年, 到目前为止, 共用‘长农4号’×‘新民6号’、‘科丰1号’×‘南农1138-2’、‘晋豆23’×‘灰布支黑豆’、‘科新3号’×‘中黄20’和美国大豆‘Charleton’×‘东农594’等5个不同群体构建了9张遗传图谱(张德水等1997; 刘峰等2000; 吴晓雷等2001; 王永军等2004; Zhang等2004; 杨喆等2004; 宛焯嵩等2005; 吕蓓等2005; 陈庆山等2005)。其中, 密度较为饱和的是吴晓雷等(2001)用栽培大豆‘科丰1号’×‘南农1138-2’的 $F_{7,9}$ 代群体构建的含24个连锁群, 总长度为2 320.7 cM的遗传图谱, 以及Zhang等(2004)用‘科丰1号’×‘南农1138-2’重组自交家系经符合性测验调整后的群体构建的含21个连锁群、总长度为3 595.9 cM的遗传图谱。与国外遗传图谱相比, 国内构建的大豆遗传图谱存在标记数偏少、部分区段标记间距离偏大等问题。

在大豆中, 虽然已鉴定出色素、同工酶、抗病基因及形态标记达250余个, 但仅有不到1/3的标记被定位到遗传图谱上, 这是由于用来构建遗传图谱所选用的亲本及其衍生群体的差异性有限。我国是大豆的发源地, 有占世界90%以上丰富的野生资源, 如何利用野生种与栽培种在表现型与基因型上的较大差异, 构建适宜作图的群体, 绘制更加精密的遗传图谱, 并利用遗传图谱发掘新的优异基因, 提高我国的大豆育种水平, 是亟待深入研究的课题。

本文用半野生大豆‘新民6号’与栽培大豆品种‘合丰25’的种间杂交群体 $F_{2,9}$ 中122个重组自交系RIL (recombinant inbred line)为材料, 构建了遗传图谱, 该重组自交系群体被命名为ZKS-HX (ZKS是指中国农科院作物所的缩写, HX是指父母本名称的缩写)。根据该图谱对形态性状进行了定位, 以供定位农艺性状基因和进一步开展分子标记辅助育种作参考。

材料与amp;方法

以栽培大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]品种‘合丰25’为母本与半野生大豆(*Glycine gracilis*

Skvortzow) ‘新民6号’为父本, 1998年在河北省承德市农科所试验地配制杂交组合。1999年种植 F_1 单株自交, F_2 代采用单粒传法(single seed descent, SSD)的方式繁殖, 在 F_3 ~ F_7 代采用株系内混合收获播种(multiple seed descent, MSD)的方式繁殖, 在 F_7 代于每个株系内随机选择1株收获, 然后种植得到 F_8 代。 F_4 和 F_6 代分别于2000~2001、2001~2002年度在海南省三亚市加代得到, 其余世代均在北京昌平试验农场种植。于2004年获得含122个株系的 $F_{2,9}$ 代RIL群体, 以后家系内混合留种。 F_8 ~ F_{10} 代, 重复3次, 随机区组排列, 2行区、行长5 m、行距1 m、株距55 cm。本文用于作图的共有122个株系。

对群体的花色、叶耳色(指叶柄基部的颜色)、茸毛色等农艺性状进行2年的田间鉴定。

大豆总DNA提取, 从田间取各株系嫩绿叶片, 按照SDS法提取基因组DNA(关荣霞等2003)。引物参照大豆“公共图谱”(Cregan等1999), 根据Soybase网站(<http://www.129.186.26.94>)提供的大豆SSR序列合成引物。EST-SSR标记是通过‘绥农14’的叶片构建的DNA文库得到Contig-139, 通过比对发现该标记是与核转运因子(信号蛋白分子的入核及出核转运)有关的功能基因。

PCR扩增反应体系为10 μ L, 含1.0 μ L 10 \times PCR缓冲液(含15 mmol \cdot L $^{-1}$ Mg $^{2+}$)、0.75 μ L dNTP (10 mmol \cdot L $^{-1}$)、0.2 μ L Tag酶(2.5 U \cdot μ L $^{-1}$)、0.75 μ L SSR引物、5.3 μ L 双蒸水、2 μ L 模板DNA (20 mg \cdot L $^{-1}$)。反应在(MJ Research) PCR扩增仪PTC-225上进行, PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 47 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 运行35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min后于4 $^{\circ}$ C保存。在扩增产物中加入4 μ L Loading缓冲液, 94 $^{\circ}$ C变性5 min, 取出后置于冰水混合物中迅速冷却。扩增产物用6%非变性聚丙烯酰胺胶进行分离, 银染检测。

数据统计和遗传作图时, 将来源于亲本‘合丰25’(母本)的带型记为A, 来源于‘新民6号’(父本)的带型记为B, 双亲杂合带型、缺失或模糊带型记为0。花色、叶耳色、泥膜有/无、茸毛色等形态性状分离数据也按同样的原则进行归类。利用MAPMAKER/EXP 3.0作图软件构建分子标记连锁图谱。应用Group命令(LOD值大于3.0, 重组率

小于50)进行连锁分析和分组,连锁标记少于8个的用 Compare 命令进行优化排序、多于8个的用 Ripple 命令进行排序,错误检测水平设为1%,利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距(cM)。根据已有 Cregan 等(1999)定位的 SSR 标记作为锚定标记以确定相应的连锁群。利用 WinQTLCart 2.5 版本绘制连锁图谱。

实验结果

1 亲本多态性引物筛选

对2个亲本共筛选了600对SSR引物,有192对引物在亲本间具有多态性,占检测总数的32%。

2 遗传图谱构建

用MAPMAKER/EXP 3.0软件对其中135个

SSR 标记进行连锁分析表明,124个SSR标记被整合到连锁群上,再加上3个形态学标记和1个EST标记,最终的连锁图谱(图1)含128个标记,分布于23个(其中E、F、G连锁群分别被分成两段)连锁群。该图谱覆盖基因组长度为2348.3cM,标记间平均遗传距离为18.3cM,每个连锁群长度的范围是15.1~195.9cM,标记数范围是2~10个。其中标记数最多的是LG23-O连锁群,含10个SSR标记;标记数最少的连锁群是LG16-H和LG18-I,各含2个SSR标记。比较该图谱和公共图谱(Cregan等1999)的结果表明,各个连锁群均能与之相对应,其中E(LG10-E和LG11-E)、F(LG12-F和LG13-F)、G(LG14-G和LG15-G)连锁群在该图谱中被分成两段,这是由于中间缺少标记所致。本文构建

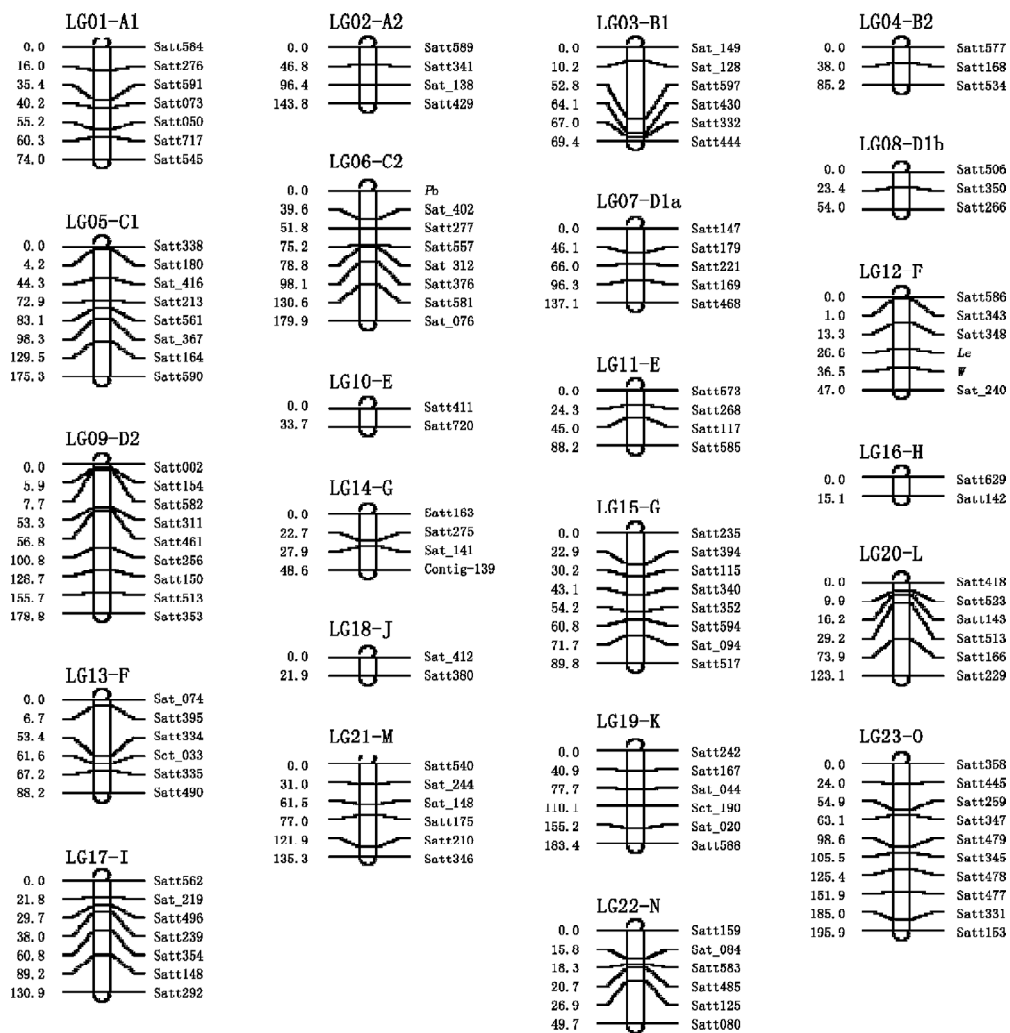


图1 ZKS-HX 大豆遗传图谱
Fig.1 Soybean genetic map of ZKS-HX RIL

的遗传图谱,与公共图谱吻合性很好的连锁群有 A1、A2、B2、E、G、I (Satt292 与 Satt148 位置颠倒)、K、L (Satt418 与 Satt523 位置颠倒)、M、N (Sat_084 与 Satt683 位置颠倒)和 O, 连锁群上的SSR标记排列顺序基本一致,相同标记间的图距表现相似。其他连锁群上的SSR标记与公共图谱排列顺序不尽相同,如LG03-B1连锁群上 Sat_149 与 Sat_128、Satt332 与 Satt444 标记和公共图谱比较排列位置发生颠倒,这可能是由于染色体发生易位或倒位的结果。需要指出的是,个别SSR标记的定位与公共图谱完全不同,位于公共图谱的 Satt213 (LGE)和 Satt561 (LGL),在本文图谱中被定位到LG05-C1连锁群,位于公共图谱Satt353 (LGH)、Satt513 (LGL)和 Satt150 (LGM)在本文中被定位在LG09-D2连锁群中。

3 偏分离分析

135个SSR标记在群体各株系中的分布分析表明,具有‘合丰25’基因型的平均频率为47.1%,具

有‘新民6号’基因型的平均频率为52.9%。2个亲本在群体中的分离比符合1:1的二项式分布。有42个SSR标记表现为偏分离(表1),但并没有明显偏向于某一亲本的趋势。

4 形态标记定位

定位了3个形态标记。控制茸毛色(*Pb*)的基因定位于LG06-C2连锁群上,与 Sat_402 的遗传距离为39.6 cM;控制叶耳色(*Le*)和花色(*W*)的基因定位于LG12-F连锁群上,它们之间的遗传距离为9.9 cM,与两边的 Satt348 和 Sat_240 标记遗传距离分别为13.3 cM和10.5 cM。

5 EST-SSR标记定位

将农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室以‘绥农14’叶片为材料构建的cDNA文库开发出的与控制核转运因子有关的EST-SSR标记 Contig-139 定位于LG14-G连锁群上,与标记 Sat_141 的遗传距离为20.7 cM。

表1 不同连锁群的组成及偏分离标记比例

Table 1 Composition of different linkage groups and segregation distortion percentage of markers

连锁群	长度/cM	标记数/个	平均距离/cM	偏分离标记	
				个数	比例/%
LG01-A1	74.0	7	10.57	2	28.6
LG02-A2	143.8	4	35.95	2	50.0
LG03-B1	69.4	6	11.56	1	16.7
LG04-B2	85.2	3	28.40	1	33.3
LG05-C1	173.5	8	21.68	6	75.0
LG06-C2	179.9	8	22.40	3	37.5
LG07-D1a	137.1	5	27.42	2	40.0
LG08-D1b	54.0	3	18.00	1	33.3
LG09-D2	178.8	9	19.70	0	0
LG10-E	33.7	2	16.85	1	50.0
LG11-E	88.2	4	22.05	1	25.0
LG12-F	47.0	6	7.83	1	16.7
LG13-F	88.2	6	14.70	3	50.0
LG14-G	48.6	4	12.15	4	100.0
LG15-G	89.8	8	11.22	3	37.5
LG16-H	15.1	2	7.55	1	50.0
LG17-I	130.9	7	18.70	2	28.5
LG18-J	21.9	2	10.95	1	50.0
LG19-K	183.4	6	30.56	0	0
LG20-L	123.1	6	20.51	1	16.7
LG21-M	135.3	6	22.55	0	0
LG22-N	49.7	6	8.28	1	16.7
LG23-O	195.9	10	19.59	5	50.0
总计	2348.3	128	18.30	42	32.8

讨 论

作图亲本的选择直接影响遗传图谱构建的难易程度及应用范围。在亲本的选择上要求亲本间有足够的DNA序列多态性, 如果缺少DNA多态性, 分离分析及连锁作图将受到限制。因此, 本文所用的母本‘合丰25’是全国种植时间最长(20多年)且累计种植面积最大(达1.8亿亩)的栽培大豆品种, 父本是高蛋白、结荚多的半野生大豆‘新民6号’, 它们之间在种子蛋白含量、脂肪含量、百粒重、生育期等许多重要农艺性状中都有显著差异, 我们也定位了这些性状的QTL。

大豆是严格的自花授粉作物, 杂种 F_1 单株经自交得到 F_2 后, 通过SSD或MSD继代自交5代便可得到家系内纯合稳定、家系间基因型各异的RIL群体(Keim 1994)。本文采用此法获得的半野生大豆与栽培大豆种间RIL群体。由于经过多代的自然和人工选择, 以致群体发生偏分离的可能性加大。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会表现出严重的偏分离(Xu等1997), 而且偏分离现象是普遍存在的(Konish等1990)。本文结果表明, 有32.8%的SSR位点呈现出偏分离(表1), 与张德水等(1997)的报道(25%)接近, 介于Keim等(1990)和陈庆山等(2005)报道的结果之间(13.3%~44.72%)。在所有23个连锁群中, 除了LG09-D2、LG19-K、LG21-M连锁群中未发现偏分离位点以外, 其余20个连锁群都存在偏分离标记, 以LG05-C1和LG14-G连锁群上分布较多。同时也发现大多数偏分离标记是集中成簇分布, 与吴晓雷等(2001)的研究结论相一致, 这可能是由于其附近有影响偏分离的遗传因子与分离标记紧密连锁造成的。在实验中还发现个别位点出现两个亲本的杂合带型, 推测这一位点可能还没有纯合。还发现个别位点出现了异于亲本的带型, 这可能是遗传漂变或基因突变造成的。

本文将控制叶耳色(*Le*)和花色(*W*)基因定位在LG-12F连锁群上的Satt348与Sat_240标记之间。叶耳色与花色基因之间的遗传距离为9.9 cM, 它们与两边的Satt348和Sat_240标记间遗传距离分别为13.3 cM和10.5 cM。本文的结果初步定位了控制叶耳颜色的基因。另外, 控制花色的基因也位于连锁群LG-12F上, 与标记Sat_240间的距离为10.5 cM(图1), 而刘峰等(2000)的结果表明控制花色的

基因距Sat_039标记11.0 cM。

控制叶耳颜色与花色基因的遗传距离较近, 这些定位的QTL在连锁群中聚集在一起。基因成簇分布的现象已有较多的报道, 例如大量抗病基因成簇分布于大豆F连锁群上的(刘峰等2000; Kanazin等1996; Yu 1996)。影响不同性状的基因的成簇存在的原因, 可能是“一因多效”(杨喆等2004), 也可能是控制这些性状的基因排列紧密, 导致了遗传加性效应增大(Mansur等1993)。

本文构建的图谱与其他遗传图谱的个别标记排序不尽一致或不在同一个连锁群上, 这可能是由于在不同的染色体区域存在大片段同源区域(刘峰等2000), 也可能是由于DNA重排或染色体间的易位或倒位(刘峰等2000)。

参考文献

- 陈庆山, 张忠臣, 刘春燕, 王伟权, 李文滨(2005). 应用Charleston × 东农594重组自交系群体构建SSR大豆遗传图谱. 中国农业科学, 38(7): 1312~1316
- 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟(2003). 用于SSR分析的大豆DNA的快速提取. 大豆科学, 21(1): 73~74
- 刘峰, 庄炳昌, 张劲松, 陈受宜(2000). 大豆遗传图谱的构建和分析. 遗传学报, 27(11): 1018~1026
- 吕蓓, 张丽霞, 宛焯嵩, 肖英华, 刘丕庆, 方宣钧(2005). 用AFLP标记饱和大豆SSR遗传连锁图. 分子植物育种, 3(2): 163~172
- 宛焯嵩, 王珍, 肖英华, 吕蓓, 方宣钧(2005). 一张含有227个SSR标记的大豆遗传连锁图. 分子植物育种, 3(1): 15~20
- 王永军, 吴晓雷, 喻德跃, 章元明, 陈受宜, 盖钧镒(2004). 重组自交系群体的检测调整方法及其在大豆NJRIKY群体的应用. 作物学报, 30(5): 413~418
- 吴晓雷, 贺超英, 王永军, 张志永, 东方阳, 张劲松, 陈受宜, 盖钧镒(2001). 大豆遗传图谱的构建和分析. 遗传学报, 28(11): 1051~1061
- 杨喆, 关荣霞, 王跃强, 刘章雄, 常汝镇, 王曙明, 邱丽娟(2004). 大豆遗传图谱的构建和若干农艺性状的QTL定位分析. 植物遗传资源学报, 5(4): 309~314
- 张德水, 董伟, 惠东威, 陈受宜, 庄炳昌(1997). 用栽培大豆与半野生大豆间的杂种 F_2 群体构建基因组分子标记连锁框架图. 科学通报, 42(12): 1326~1330
- Akkaya MS, Shoemaker RC, Specht JE, Bhagwat AA, Cregan PB (1995). Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. Crop Sci, 35: 1439~1445
- Apuya NR, Frazier BL, Keim P, Roth JE, Lark KG (1988). Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. Theor Appl Genet, 75: 889~901
- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep, 9: 208~218
- Cregan PB, Jarivk T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes DG, Chung J et al (1999). An integrated genetic linkage map of the soybean genome.

- Crop Sci, 39 (5): 1464~1490
- Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 11746~11750
- Keim P, Beavis WD, Schupp JM, Baltazar BM, Mansur BM, Freestone RE, Vahedian M, Webb DM (1994). RFLP analysis of soybean breeding populations: I. genetic structure differences due to inbreeding methods. Crop Sci, 34: 55~61
- Keim P, Diers BW, Olson TC, Shoemaker RC (1990). RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. Genetics, 126: 735~742
- Keim P, Schupp JM, Travis SE, Clayton K, Zhu T, Shi L, Ferreira A, Webb DM (1997). A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. Crop Sci, 37: 537~543
- Konishi T, Abe K, Matsuura S, Yano Y (1990). Drstorter segregation of the esterase isozyme genotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). Jpn J Genet, 65: 411~416
- Lark KG, Weisemann JM, Matthews BF, Palmer R, Chase K, Macalma T (1993). A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars: 'Minosy' and 'Noir 1'. Theor Appl Genet, 86: 901~906
- Lee SH, Bailey MA, Mian MA R, Carter TE, Ashley DA, Hussey RS, Parrott WA, Boerma HR (1996). Molecular markers associated with soybean plant height, lodging and maturity across locations. Crop Sci, 36: 728~735
- Mansur LM, Orf J, Lark KG (1993). Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP makers using extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* L. Merr.). Theor Appl Genet, 86: 914~918
- Mansur LM, Orf JH, Chase K, Jarvik T, Cregan PB, Lark KG (1996). Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. Crop Sci, 36: 1327~1336
- Shoemaker RC, Olson TC (1993). Molecular linkage map of soybean (*glycine max* L.Merr.). In: O'Brien SJ (ed). Genetic Maps Locus Maps of Complex Genomes. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6139~6148
- Shoemaker RC, Polzin K, Labate J, Specht J, Brummer EC, Olson T, Young N, Concibido V, Wilcox J, Tamulonis JP et al (1996). Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). Genetics, 144: 329~338
- Shoemaker RC, Specht JE (1995). Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. Crop Sci, 35: 436~446
- Song QJ, Marek LF, Shoemaker RC, Lark KG, Concibido VC, Delannay X, Specht JE, Cregan PB (2004). A new integrated genetic linkage map of the soybean. Theor Appl Genet, 109 (1): 122~128
- Xu SJ, Singh RJ, Hymowitz T (1997). Establishment of a cytogenetic map of soybean: progress and prospective. Soybean genetics newsletter, 24: 121~122
- Yu YG, Buss GR, Saghai Maroof MA (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 11751~11756
- Zhang WK, Wang YJ, Luo GZ, Zhang JS, He CY, Wu XL, Gai JY, Chen SY (2004). QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. Theor Appl Genet, 108: 1131~1139