

## 小麦 RILs 群体叶绿素含量和千粒重相关分析及 QTL 定位

刘胜男, 甘剑锋, 张海萍, 常成\*, 卢杰, 司红起, 马传喜

(农业部黄淮南部小麦生物学与遗传育种区域重点实验室, 安徽省作物生物学重点实验室, 安徽农业大学农学院, 合肥 230036)

**摘要:** 以京 411/红芒春 21 构建的重组自交系群体 (RILs) 为实验材料 (包括 177 个家系), 研究花后旗叶叶绿素含量及其与粒重的关系, 并进行 QTL 定位。结果表明, 2011 和 2012 年, 花后 7 d (I 期)、14 d (II 期)、19 d (III 期) 旗叶叶绿素含量及总叶绿素含量与千粒重呈显著或极显著正相关。连锁分析及 QTL 定位结果表明, 2AS2 存在一新的 QTL 位点 (Barc5~Gwm448), 控制 I 期和 II 期的旗叶叶绿素含量, 于 2011 年和 2012 年均被检测到, 可分别解释 I、II 时期叶绿素含量表型变异的 16.38%~20.12% 和 17.27%~19.35%。而另一位点 2AS1 (Barc1138~Barc212) 只在 2011 年检测到, 可分别解释 I、II 期叶绿素含量变异的 11.43% 和 9.67%。同时, 该新位点 (Barc5~Gwm448) 也与千粒重变异有关, 可分别解释其表型变异的 13.35% (2011 年) 和 10.14% (2012 年)。未检测到花后其他时期旗叶叶绿素含量的基因位点。

**关键词:** 小麦; 旗叶叶绿素含量; 千粒重; 相关性; QTL 分析

中图分类号: S512.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0570-05

### QTL mapping and analysis of correlation between chlorophyll content and 1000-kernal weight in RILs population of wheat

LIU Sheng-nan, GAN Jian-feng, ZHANG Hai-ping, CHANG Cheng, LU Jie, SI Hong-qi, MA Chuan-xi

(Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement on South Yellow & Huai River Valley, Ministry of Agriculture P.R. China; Key Laboratory of Crop and Biology of Anhui Province; School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The correlation between chlorophyll content of flag leaf after anthesis from 7 days to 24 days and 1000-kernal weight (TKW) was analysed using a RILs population from the cross between Jing411 and Hong-mangchun21. In addition, the QTLs controlling these traits were also located according to the data of 2011 and 2012 crop seasons. The results indicated that the chlorophyll contents of flag leaf of 7 days (I), 14 days (II), 19 days (III) after anthesis and the total contents were positively related with TKW at the levels of 0.05 and 0.01 respectively in the two crop season. And the analysis of molecular markers linkage indicated a new QTL was found on the 2AS linked to the markers of Barc5 and Gwm448, which could explain 16.38%-20.12% (I) and 17.27%-19.35% (II) phenotype variations of chlorophyll content of flag leaf at 2011 and 2012 crop seasons respectively. Another QTL located between Barc1138 and Barc212 was only detected at 2011 crop season, which could explain 11.43% (I) and 9.67% (II) phenotype variations of chlorophyll content of flag leaf respectively. Simultaneously, the new QTL between Barc5 and Gwm448 was also confirmed to correlate with TKW and explained the variations of 13.35% (2011) and 10.14% (2012) respectively. No loci were found for the chlorophyll content of the flag leaf at other stags after anthesis.

**Key words:** common wheat (*Triticum aestivum* L); chlorophyll content of flag leaf; 1000-kernal weight; correlation; QTL analysis

小麦是世界上种植最广泛的的粮食作物, 其产量的提高是现代小麦育种家共同追求的育种目标之一, 而粒重是构成小麦产量的三因素之一, 受灌浆充实度和籽粒大小共同决定<sup>[1]</sup>。研究表明, 光合作

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31000705), 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CRS-03) 和安徽省小麦产业技术体系共同资助。

作者简介: 刘胜男, 女, 硕士研究生。E-mail: 757589657@qq.com

\* 通信作者: 常成, 男, 副教授。E-mail: changtgw@126.com

用是决定小麦产量潜力的一个重要因素, 主要影响籽粒灌浆及粒重的形成。小麦叶片是主要的光合作用器官, 影响着籽粒的重量和饱满度, 据统计, 小麦生长后期功能叶所产生的光合作用产物对小麦产量形成的贡献可以达到 80% 左右, 尤其是旗叶, 在开花期以后旗叶进行光合作用产生的产物能够达到小麦产量的 30%<sup>[2]</sup>。植物叶片的叶绿素含量是一个与光合作用有关的重要性状, 小麦的不同生育时期其叶片的叶绿素含量也呈现动态变化。

前人研究已证明, 小麦产量相关性状多为数量性状, 由多基因控制, 易受环境条件影响<sup>[3]</sup>, 为产量性状的遗传改良带来一定的难度。近年来, SSR 等分子标记的开发应用, 为小麦数量性状的基因定位, 特别是产量相关性状的定位提供了有利的研究工具<sup>[4]</sup>。目前, 关于对农作物发育动态的 QTL 定位的分析已有很多研究, 如大豆<sup>[5]</sup>, 水稻<sup>[6-9]</sup>, 玉米<sup>[10]</sup>等。研究表明, 许多性状的 QTL 在不同时期有不同的表达, 在对数量性状进行分子标记辅助选择时, 应根据不同发育时期的 QTL 进行选择才能达到理想效果<sup>[11]</sup>。本实验室前期研究也表明, 从小麦盛花期至灌浆中前期, 旗叶叶绿素含量与粒重关系较为紧密, 并证实一些基因 (如 *Tackox4*) 和 QTL 位点 (如位于 2AS 的 Barc212~Gwm614 位点) 与叶绿素含量相关。但不同发育时期, 叶绿素水平的调控机制也可能不同, 从而参与该性状的调控基因较为复杂。因此, 本实验以前期研究为基础, 利用不同的 RILs 群体材料对 2AS 重新检测, 以期验证或挖掘新的 QTL 位点, 开发新的分子标记用于小麦辅助育种, 以提高选择效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以京 411 和红芒春 21 杂交产生的重组自交系群体 (RILs) 为供试材料, 该群体包含 177 个家系, 已培育至第 8 代, 各家系基本稳定, 适合本研究的要求。

### 1.2 田间种植

实验材料分别于 2011 和 2012 年种植于安徽农业大学大杨店试验田。每个家系种植 2 行, 行长 1.5 m, 行距 20 cm, 每行播 50 粒。田间管理同大田生产, 逐株编号挂牌。

### 1.3 田间叶绿素含量的测量

标记各家系抽穗期和开花期, 并分别在花后 7 d (7 days after anthesis, 7 DAA)、14 d (14 DAA)、19 d (19 DAA)、24 d (24 DAA) 和 30 d (30 DAA) 测定旗

叶叶绿素含量。每个家系选取开花时期较为一致的 5 片主茎旗叶, 每个旗叶均匀选取上中下 3 个位点, 用 SPAD-502 叶绿素仪测定叶绿素含量, 取平均值作为衡量各家系旗叶的叶绿素水平。该 5 个时期依次记为 I、II、III、IV、V, 分别在 2011 年和 2012 年各测定 1 次。

### 1.4 千粒重的测定

两个亲本及 RIL 家系分别随机取 1 000 粒种子称重, 3 个重复, 取均值; 分别于 2011 年、2012 年各测定 1 次。

### 1.5 PCR 扩增及检测

**1.5.1 引物合成** 根据前人构建的小麦 2A 染色体的遗传连锁图谱, 合成 SSR 引物 (主要类型为 BARC、GWM、CFA 和 CFD 等), 由上海生工生物技术公司进行合成。

**1.5.2 DNA 的提取** 小麦基因组 DNA 的提取采用 SDS-Tris 饱和酚法<sup>[12]</sup>。用 1.0% 的琼脂糖进行琼脂糖凝胶电泳, 检测提取 DNA 的质量。

**1.5.3 PCR 扩增及产物检测** 扩增体系: 10  $\mu$ L 包括 ddH<sub>2</sub>O 3.86  $\mu$ L、10 $\times$ buffer 1  $\mu$ L (含 2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>)、dNTP (2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L; 上、下游引物各 1  $\mu$ L、*Taq* 酶 (5 U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.14  $\mu$ L 及 DNA 模版 60 ng。

扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55~60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 补充延伸 6 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应于 BIO-RAD My Cycler 1.0 上进行。

PCR 完成后, 加入变性指示剂 (DNA loading buffer) 在 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 然后立即置于冰水混合物上, 待 PCR 板冷却后, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 以备点样电泳。

**1.5.4 产物电泳检测** 电泳采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 法, 用 6% 变性 PAGE 胶进行凝胶电泳, 电泳结果拍照保存。家系中与京 411 相同的带型记为 “A”, 与红芒春 21 相同的带型记为 “B”, 杂合带型记为 “H”, 缺失和其它带型记为 “-”。

### 1.6 数据的统计分析及 QTL 定位

田间数据和实验室数据记录完成后, 用 SPASS17.0 软件进行统计分析。利用 Mapmanager QTX (V1.0) 软件进行分子标记连锁分析, 然后利用 Windows QTL Cartographer (V2.5) 进行 QTL 定位, 采用复合区间作图 (CIM) 法, 以  $LOD > 3.0$  为阈值来判断 QTL 的存在。

## 2 结果与分析

### 2.1 RILs 群体旗叶叶绿素含量与粒重相关性分析

分别研究了 2011、2012 年 RIL 群体各家系旗叶叶绿素含量与千粒重的相关性, 结果表明, 2011 和 2012 年千粒重与花后 7 d (I 期)、14 d (II 期)、19 d (III 期) 叶绿素含量以及叶绿素总含量呈极显著或显著正相关, 如表 1 所示。其中 2011 年各相关

系数分别为 0.512\*\*、0.499\*\*、0.318\*\*和 0.196\*；2012 年各相关系数分别为 0.354\*\*、0.315\*\*、0.180\* 和 0.177\*。而 IV 和 V 期叶绿素含量与千粒重显著不显著。上述结果说明, 灌浆中前期 (I、II、III 期) 旗叶叶绿素含量与千粒重关系密切, 总叶绿素含量也影响粒重。而灌浆中后期 (IV 和 V 期), 旗叶叶绿素含量不利于提高小麦粒重。

表 1 RIL 家系叶绿素含量与千粒重的相关性分析

Table 1 Analysis of correlation between chlorophyll content of flag leaf and 1000-kernal weight

年份 Year	性状 Trait	I	II	III	IV	V	总含量 Total content
2011	千粒重 TKW	0.512**	0.499**	0.318**	-0.006	-0.072	0.196*
2012	千粒重 TKW	0.354**	0.315**	0.180*	-0.101	-0.091	0.177*

注: \* 和\*\*分别表示在 0.05、0.01 和水平上的相关显著性检测。

Note: \* and \*\* indicated the significant correlation at the levels of 0.05 and 0.01, respectively.

表 2 2011 年测定的双亲及 RIL 家系的 I、II、III 期叶绿素含量和千粒重分析

Table 2 Analysis of chlorophyll content of flag leaf at the stages of I, II and III of RILs and 1000-kernal weight

性状 Trait	亲本 Parents		RILs 群体 RILs population				
	京 411 Jing411	红芒春 21 Hongmangchun21	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
2011-I	50.66	36.41	37.71	59.14	48.98	4.48	20.05
2011-II	52.45	32.33	33.94	60.73	48.66	4.73	22.37
2011-III	52.48	31.01	10.57	59.52	45.17	7.91	62.56
2011-TKW	44.88	21.02	10.90	55.55	34.66	8.36	69.85

注: 2011-I, II, III, TKW 分别表示 2011 年花后 7 d、14 d、19 d 叶绿素含量及千粒重。下同。

Note: 2011-I, II, III and TKW mean the chlorophyll contents of flag leaf at 7, 14 and 19 days after anthesis and 1000-kernal weight. The same below.

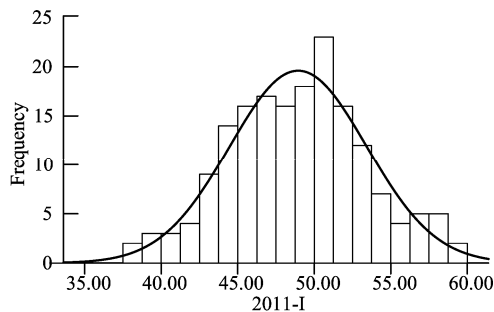


图 1 2011 年 RIL 家系花后 7 d (I) 旗叶叶绿素含量频率分布  
Figure 1 The distribution frequency of chlorophyll content of flag leaf at 7 DAA of RIL

### 2.2 RILs 群体叶绿素含量和千粒重频率分布

相关分析已表明, 京 411 和红芒春 21 构建的 RILs 群体第 I、II、III 叶绿素含量与千粒重有着密切关系, 因此本文对 2011 年该时期叶绿素含量、千粒重进行频率分布分析, 结果如图 1、图 2、图 3 和图 4 所示。在 RILs 群体中, I、II、III 时期叶绿素含量大致呈正态分布, 说明该阶段小麦旗叶叶绿素含量为多基因控制的数量性状。而千粒重一般呈

偏态分布, 说明可能存在控制该性状的主效基因, 这与潘艳秋等结果相似<sup>[13]</sup>。由表 2 可看出, 京 411 和红芒春 21 的 I、II、III 期叶绿素含量及千粒重差异较大, 该 RILs 群体性状分布范围和变异也较大, 较适合进行 QTL 定位分析。其中 2012 年数据和 2011 年类似 (未列出)。

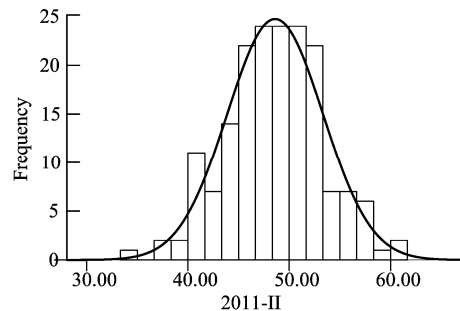


图 2 2011 年 RIL 家系花后 14 d (II) 旗叶叶绿素含量频率分布  
Figure 2 The distribution frequency of chlorophyll content of flag leaf at 14 DAA of RIL

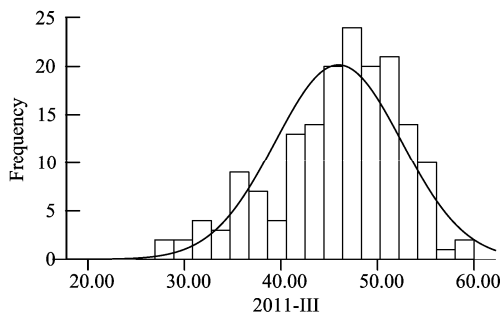


图 3 2011 年 RIL 家系花后 19 d (III) 旗叶叶绿素含量频率分布

Figure 3 The distribution frequency of chlorophyll content of flag leaf at 19 DAA of RIL

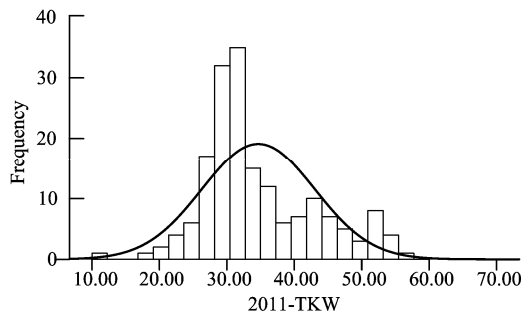


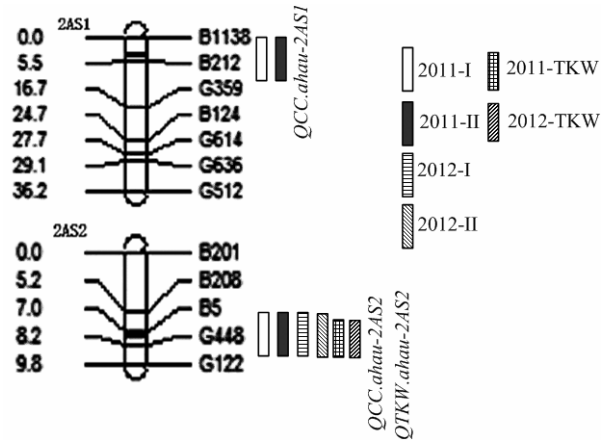
图 4 2011 年 RIL 家系千粒重频率分布

Figure 4 The distribution of TKW of RIL in 2011

### 2.3 叶绿素动态的 QTL 定位

前期研究证实, 2AS 上存在一控制小麦旗叶叶绿素含量的主效 QTL<sup>[14]</sup>, 因此本实验利用 2A 染色体的 SSR 标记对京 411 和红芒春 21 构建的 RILs 群体进行分子标记连锁分析, 并根据 2011、2012 年 2 年的田间测定结果进行旗叶叶绿素含量的 QTL 定位。结果表明, 通过连锁分析, 共获得总长为 46 cM 的 2 个连锁群, 位于 2AS 上, 分别记为 2AS1 和 2AS2。根据 2011 年数据, 检测到 2 个控制花后 7d (I 期)、14d (II 期) 旗叶叶绿素含量的 QTL 位点, 分别位于 Barc1138~Barc212 (与董连生研究结果较

为类似<sup>[14]</sup>) 和 Barc5~Gwm448 标记区间, 可分别解释叶绿素含量表型变异的 11.43%、9.67%和 16.38%、19.35%。同时, 后者还可解释 13.35%的千粒重变异, 如表 3 所示。但对于 2012 年数据来说, 只检测到 1 个 QTL 位点, 即 Barc5~Gwm448, 可分别解释 I 期、II 期叶绿素含量及千粒重表型变异的 20.12%、17.27%和 10.14%, 相应的 QTL 位点被标记于连锁图中 (图 5)。



图中 B 和 G 分别表示 Barc 和 Gwm SSR 引物。黑色片段表示 QTL 位点。

B and G mean the Barc and Gwm type marker. The black strip means the location of QTL

图 5 叶绿素含量及千粒重 QTL 定位连锁分析

Figure 5 The analysis of QTL for chlorophyll content and TKW

根据前人的连锁分析结果, 本实验获得的 2 个连锁群 (2AS1 和 2AS2) 同时位于 2A 染色体的短臂上, 但分布于不同区域, 其中后者更靠近着丝粒。本实验检测的 QTL 位点 (Barc5~Gwm448) 与董连生 (2012) 结果不同, 同时 2AS1 上的 QTL 标记区间 (Barc1138~Barc212) 连锁比董连生研究结果<sup>[14]</sup> 更为紧密, 后者的遗传距离为 16.2 cM。对于花后 19 d、24 d、30 d 的叶绿素含量等性状, 本实验未检测到相应的 QTL 位点。

表 3 京 411/红芒春 21 RIL 群体叶绿素含量及千粒重 QTL 定位分析

Table 3 The analysis of QTL for chlorophyll content of flag leaf and TKW in Jing411/Hongmangchun RIL population

年份-性状 Year-Trait	亲本 Parents			染色体 Chr.	标记区间 Marker interval	位置/cM Location	LOD 值 LOD value	贡献率 R <sup>2</sup> Contribution rate R <sup>2</sup>
	京 411 Jing411	红芒春 21 Hongmangchun21	差值 Difference					
2011-I	50.66	36.41	14.24	2AS1	Barc1138~Barc212	4.5	6.20	11.43
				2AS2	Barc5~Gwm448	7.4	7.87	16.38
2011-II	52.45	32.33	20.12	2AS1	Barc1138~Barc212	4.5	13.20	9.67
				2AS2	Barc5~Gwm448	7.4	24.22	19.35
2011-TKW	44.88	21.02	23.86	2AS2	Barc5~Gwm448	7.4	5.79	13.35
2012-I	44.02	34.11	9.91	2AS2	Barc5~Gwm448	7.4	9.70	20.12
2012-II	43.36	32.3	11.06	2AS2	Barc5~Gwm448	7.4	20.80	17.27
2012-TKW	37.02	19.14	17.88	2AS2	Barc5~Gwm448	7.4	4.33	10.14

### 3 讨论

小麦灌浆期叶片光合作用对粒重的形成关系重大,而该时期叶绿素含量起着重要作用。本研究证实花后 7~19 d 旗叶叶绿素含量与千粒重呈显著或极显著正相关,说明该时期较高的叶绿素含量有利于粒重的提高,与前期研究结果相似<sup>[13-14]</sup>。潘艳秋研究表明,小麦 *Tackox4* 基因等位变异与京 411/红芒春 21 构建的 RILs 群体旗叶叶绿素含量密切相关,该基因位于 3A 上,与本研究不同<sup>[13]</sup>。董连生利用和尚麦/豫麦 8679 构建的 RILs 群体分别在 2AS (Gwm614~Barc212) 和 5AL (Barc141~Barc165) 上定位 2 个 QTL,分别控制盛花期和灌浆前期的旗叶叶绿素含量,与本研究结果部分类似<sup>[14]</sup>。这些结果表明,花后旗叶叶绿素含量应属于多基因控制的数量性状,其受到叶绿素合成、分解及叶绿素稳定等机制的影响,较为复杂。本研究在 2AS 不同连锁区域检测到 2 个 QTL 位点,该结果说明,2AS 上可能同时存在 2 个控制叶绿素含量的基因,值得进一步研究。

本研究利用 2011 和 2012 年田间数据,均检测到控制 I 期、II 期旗叶叶绿素含量及千粒重的 QTL 位点 (Barc5~Gwm448),说明该位点在不同年份间较为稳定。同时也说明,该位点可能通过影响叶绿素含量而与粒重相关。而且,定位的 QTL 位点和董连生研究结果相比连锁更为紧密,有利于在育种中应用<sup>[14]</sup>,但未检测到花后 19 d、24 d 及 30 d 叶绿素含量的基因位点,说明在灌浆中后期,旗叶叶绿素水平的调控机制异于前期。因此,通过 QTL 定位及开发稳定的分子标记,有利于提高小麦育种效率。

### 参考文献:

- [1] 吴金城,鲁海泉,吴显汀. 小麦产量构成因素[J]. 河南科技, 1990(4): 24.
- [2] 郑丕尧. 作物生理学导论[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1992: 121-127.
- [3] 田再民,张立平,孙庆林,等. 小麦重要农艺性状 QTL 研究方法及其研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报, 2007, 28(4): 243-247.
- [4] Huang X Q, Coster H, Ganai M W, et al. Advanced back-cross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1379-1389.
- [5] 崔世友,喻德跃. 大豆不同生育时期叶绿素含量 QTL 的定位及其与产量的关联分析[J]. 作物学报, 2007, 33(5): 744-750.
- [6] 沈波,庄杰云,张克勤,等. 水稻叶绿素含量的 QTL 及其与环境互作分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 1937-1943.
- [7] 何慈信,朱军,严菊强,等. 水稻叶挺长发育动态的 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2000, 14(4): 193-198.
- [8] 何慈信,朱军,严菊强,等. 水稻穗干物质重发育动态的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2000, 33(1): 24-32.
- [9] Wang B, Lan T, Wu W R, et al. Mapping of QTLs controlling chlorophyll content in rice[J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30 (12): 1127-1132.
- [10] 王爱玉,张春庆. 玉米叶绿素含量的 QTL 定位[J]. 遗传, 2008, 30(8): 1083-1091.
- [11] 刘宾,赵亮,张坤普,等. 小麦株高发育动态 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4562-4570.
- [12] Gale K R, Ma W, Zhang W, et al. Simple high-throughput DNA markers for genotyping in wheat[C]//Eastwood R, Hollamby G, Rathjen T and Gororo N. 10th Australian wheat breeding assembly. Wheat Breeding Society of Australia, Adelaide, South Australia. 2001: 26-31.
- [13] 潘艳秋. 小麦 CKOX 基因变异与旗叶叶绿素含量以及产量性状的关系[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [14] 董连生. 小麦耐光氧化性状与粒重的关系研究及相关分子标记作图[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.