

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2019.01.028

饲用型小黑麦遗传图谱构建及草产量相关性状 QTLs 初步定位

刘晶, 赵方媛, 李冬梅, 李雪, 田新会, 杜文华*

(甘肃农业大学草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:本研究以饲用型小黑麦杂交 F_2 代为作图群体, 利用 ISSR 分子标记构建了遗传连锁图谱, 并对小黑麦草产量相关性状(株高, 分蘖数, 单株生物量)进行了 QTLs 定位, 可为小黑麦草产量相关主效 QTL 挖掘、功能基因定位以及分子标记辅助育种奠定基础。结果表明:521 个 F_2 代单株草产量相关性状的田间表型数据呈连续变异, 分布频率大致接近正态分布, 可用于 QTLs 定位。该遗传图谱包含 7 个连锁群, 图谱总长度为 542.9 cM, 标记间平均距离为 5.90 cM, 共有 92 个位点。对草产量相关性状基因进行 QTL 定位分析, 共检测到 17 个 QTLs, 分布在 6 个连锁群上, 控制株高的 QTLs 有 5 个, 贡献率为 6.7%~13.2%; 控制分蘖数的 QTLs 有 7 个, 贡献率为 5.4%~15.4%; 控制单株生物量的 QTLs 有 5 个, 贡献率为 7.4%~12.4%。其中 QPH7-2, QNT2-2 和 QBS2 分别对小黑麦株高、分蘖数和单株生物量的贡献率最大, 为主效 QTLs, 可对其进行进一步克隆、转化及利用。

关键词:小黑麦; ISSR 标记; 遗传图谱; 草产量相关性状; QTLs 定位

中图分类号:S512.4

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2019)01-0219-08

Constructions on the Linkage Genetic Map and Initial Locations on QTLs Related to the Hay Yield of Forage Triticale

LIU Jing, ZHAO Fang-yuan, LI Dong-mei, LI Xue, TIAN Xin-hui, DU Wen-hua*

(College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory of Grassland Ecosystem, (Gansu Agricultural University), Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou, Gansu Province 730070, China)

Abstract: In this study, F_2 generation derived from forage triticale hybrids were used as the mapping population. The genetic linkage map was constructed by using ISSR molecular marker and QTLs were mapped to yield-related traits (plant height, number of tillers, above ground biomass of single plant) of triticale. It could lay a foundation for main QTL mining, functional gene mapping and molecular marker-assisted breeding of triticale. The results showed that the field phenotypic data of 521 F_2 generation grass yield-related traits showed continuous variation, and the distribution frequency was close to normal distribution, which could be used for QTLs localization. The linkage map included 7 linkage groups, the total length of map was 542.9 cM, the averaged distance among markers was 5.90 cM, and there were 92 loci. QTL results showed that there were 17 QTLs related to the hay yield in triticale. These QTLs distributed on 6 linkage groups. There were 5 QTLs controlling the plant height, which contribution rate varied from 6.7% to 13.2%. There were 7 QTLs controlling the number of tillers, which contribution rate changed from 5.4% to 15.4%. There were 5 QTLs controlling the aboveground biomass of the single plant, which contribution rate varied from 7.4% to 12.4%. Among them, QPH7-2, QNT2-2 and QBS2 have the highest contribution rate to plant height, number of tillers and aboveground biomass of single plant, respectively, so they were the main QTLs, which could be further cloned, transformed and utilized.

收稿日期:2018-10-09;修回日期:2019-01-26

基金项目:国家自然科学基金项目(31760702, 31360577); 甘肃省草地畜牧业可持续发展创新团队项目(2017C-11); 国家重点研发计划(2018YFD0502402-3); 西藏饲草产业专项(XZ201801NA02)资助

作者简介:刘晶(1983-), 女, 山西平陆人, 博士研究生, 主要从事草种质资源及育种栽培研究, E-mail:654138133@qq.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail:duwh@gau.edu.cn

Key words: Triticale; ISSR marker; Genetic map; Characters related to the hay yield; QTLs localization

小黑麦(\times *Triticosecale* Wittmack)是由小麦属(*Triticum*)和黑麦属(*Secale*)经属间有性杂交和染色体数加倍培育而成的一种新异源多倍体物种^[1]。其不但结合了小麦高产优质和黑麦抗病、抗寒、抗旱和适应性强的优点,而且还具有杂种优势强和营养品质好等特点^[1]。饲用型小黑麦单株生物量高,饲草的粗蛋白含量高,植株鲜嫩多汁、消化率高、适口性好,为家畜所喜食^[2]。由于其抗寒性强,在青藏高原高寒牧区具有一定应用前景^[3]。

饲用型小黑麦的草产量与株高、单株分蘖数以及单株生物量密切相关。通过聚合上述优异性状,就可以培育高产小黑麦新品种(系)。目前我国饲用型小黑麦新品种的培育大多采用常规育种技术,传统育种周期长,自然突变率低,有益突变少,不利于大规模和多方向育种^[4],同时也不能满足畜牧业快速发展对优良草品种的需求。如果在常规育种基础上,引进和运用现代育种技术,就可以使品种选育向快速、高效、定向的方向发展^[5-6]。

借助 DNA 分子标记技术构建小黑麦遗传连锁图谱,并对控制草产量相关数量性状(Quantitative Trait Locus, QTLs)的基因进行跟踪和克隆,充分利用,就能提高育种效率和准确性。目前,研究者已将 ISSR 分子标记(Inter-simple sequence repeat)运用到多个植物的遗传图谱构建中。潘玉玲^[7]利用利用 3 种分子标记技术(SSR、SRAP 和 ISSR)对丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)F₁ 代单株标记进行了遗传连锁分析,并构建了一张遗传连锁图谱。汪斌等^[8]利用筛选出的 20 条 ISSR 多态性引物对 84 份国内外红麻(*Hibiscus cannabinus*)种质资源进行 PCR 扩增,选择 5 条扩增结果较好的引物构建了国内外红麻种质资源的 ISSR 指纹图谱构建。殷丽琴等^[9]利用 ISSR 分子标记技术绘制了 10 份彩色马铃薯(*Solanum tuberosum*L.)品种的指纹图谱。赵雅姣等^[10]筛选出 12 条 ISSR 多态性引物对 30 份饲草型小黑麦种质进行了遗传多样性分析,以了解不同种质间的遗传差异。赵方媛等^[11]利用 ISSR 分子标记构建了 1 张小黑麦遗传连锁图谱,并对抗条锈 QTL 进行了初步定位分析。

国内外对牧草相关性状 QTL 的定位研究主要集中在黑麦草属(*Lolium*)^[12]、赖草属(*Leymus*)^[13]、苜蓿属(*Medicago*)^[14]、三叶草属(*Trifolium*)^[15]、鸭茅(*Dactylis*)^[16]、高丹草(*Hupozhongzi*)^[17]、结缕草(*Zoysia*)^[18]和二倍体冰草(*Agropyron*)^[19]等

牧草上。Studer 等^[20]以 306 个多花黑麦草(*Lolium multiflorum* Lam.) F₁ 代单株为作图群体,利用 AFLP 和 SSR 分子标记构建了多花黑麦草分子遗传连锁图谱,在第 1、2 连锁群上发现了控制冠锈病相关的 QTLs,其遗传贡献率高达 56%。Barrett 等^[21]利用 2 个高度杂合的白三叶(*Trifolium repens* L.)种质杂交得到的 182 个 F₁ 代为作图群体,构建了白三叶遗传连锁图谱,并对种子产量、花序密度、千粒重和花序收益率进行了定位研究,得到 23 个与种子产量相关的 QTLs,为提高白三叶种子产量和分子标记辅助选择育种奠定了基础。Espinoza 和 Julier^[22]利用蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的作图群体检测了与牧草品质(粗蛋白、消化率、茎叶比等)相关的 QTL 定位。李小雷等^[23]构建了二倍体冰草的分子遗传连锁图谱,并对冰草 10 个重要农艺性状进行检测,在 6 个连锁群上共检测到 13 个与农艺性状相关的 QTLs。国内外小黑麦 QTL 定位方面的研究较少,主要集中在八倍体粮用型小黑麦上。Niedziela 等^[24]对粮用型小黑麦耐土壤铝离子的相关基因进行了定位,Würschum 等^[25]以 4 个双单倍体群体为作图群体,通过研究粮用型小黑麦穗期、盛花期和乳熟期控制株高 QTL 和抗倒伏基因的关系,旨在降低小黑麦株高,提高种子产量。Alheit 等^[26]利用多系杂交的 4 个双单倍体群体对控制饲用型小黑麦乳熟期生物量和株高的 QTL 进行了定位。截至目前,国内外对六倍体饲用型小黑麦遗传图谱构建研究较少^[11],并且尚未有饲用型小黑麦草产量相关性状 QTL 定位方面的研究报道。为此,本研究拟利用饲用型小黑麦 F₂ 代群体构建遗传连锁图谱,并结合田间表型数据,对饲用型小黑麦草产量相关性状(株高,分蘖数,单株生物量)进行 QTL 定位分析,获取与之紧密连锁的分子标记,为利用分子标记辅助育种培育饲用型小黑麦新品种,以及农艺性状的遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于甘肃省临洮县农校农场,位于甘肃省中部,定西市西部($103^{\circ}87' E, 35^{\circ}37' N$)。海拔 1 892 m,属温带大陆性气候,多年气象数据资料显示,临洮县年降水量 562 mm,无霜期 153 d,年平均

气温 7.0℃。有灌溉条件,土壤为黑麻土。

1.2 试验材料

参试材料为甘农 2 号小黑麦(父本)和甘农 1 号小黑麦(母本)杂交形成的 521 个 F_2 代单株及亲本材料。父本和母本均是甘肃农业大学选育而形成的基因纯合、性状稳定性的六倍体饲用型小黑麦品种,两个亲本生态类型差异较大:母本株高较低,分蘖数较多,单株生物量较高;父本株高较高,分蘖数低,单株生物量低。

1.3 遗传作图群体构建

将收获的 F_1 代单株的主穗种子按编号顺序种植于试验地,并种植父母本材料各 1 行。点播,行长 1 m,株距 0.1 m,行距 0.2 m,试验期间按照常规田间管理技术进行管理。出苗后 20 d 给形成的 521 个单株做好标记,分别采集每个单株的幼嫩叶片,用锡箔纸包装后置于液氮中速冻,储存于-80℃,用于遗传图谱构建。开花期田间测定每个单株的株高,成熟期按单株连根拔出,田间晾干后带回室内测定每个单株的分蘖数(包括有效分蘖数和无效分蘖数),之后剪掉根系,测定单株生物量。参照文献^[25-26]的方法,根据 521 个单株的株高、分蘖数和单株生物量数据,每个指标中分别选取较大值和较小值单株各 30 株用于草产量相关性状 QTLs 定位。

1.4 遗传作图群体基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增

用改进的 CTAB 法^[27]提取 521 个单株的全基因组 DNA,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,合格的样品于-20℃冰箱保存备用。饲用型小黑麦最优(20 μl) ISSR-PCR 反应体系采用项目组前期研究结果^[28]。所用 ISSR 引物为项目组前期从适于禾本科植物 ISSR-PCR 反应体系的 64 条引物中筛选出的、适宜于小黑麦多样性分析的谱带清晰稳定、重复性好、多态性高的 14 条引物^[28],一共扩增出清晰可辨的条带共 110 条,其中多态性条带 68 条。

1.5 基因型数据统计方法

将 ISSR 标记所获得的作图群体的多态性条带进行统计。条带统计方法:各个单株如果在该位点的带型与母本相同记为“A”,与父本相同记为“B”,

同时具有父母本双亲带型的记为“H”,缺失的带型记为“-”。

1.6 遗传连锁图谱构建和 QTL 定位分析

本研究采用 JoinMap3.0 软件^[29]绘制完成饲用型小黑麦遗传连锁图谱。参考文献^[26],设置 LOD≥2,步长为 1.0,在 2.0~10.0 的 LOD 值范围内对标记进行分组,其余参数值为软件默认参数。利用区间作图法(interval mapping,IM)^[30]进行 QTL 定位分析。

QTL 的命名规则方法为“Q+X+定位连锁群及个数”,其中“Q”为 QTL 的英文缩写,“X”为性状名称的英文缩写(如:株高,plant height,PH),定位连锁群用数字表示,若同一个性状在同一连锁群中检测到多个位点,则在该连锁群后面依次标 1、2、3 等,QTL 的名称一般用斜体^[30]。

1.7 田间表型数据分析

使用 Microsoft Excel 2007 软件对 F_2 代群体的株高、分蘖数和单株生物量的田间表型数据进行统计分析,绘制频率分布柱形图,并对亲本的测定数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

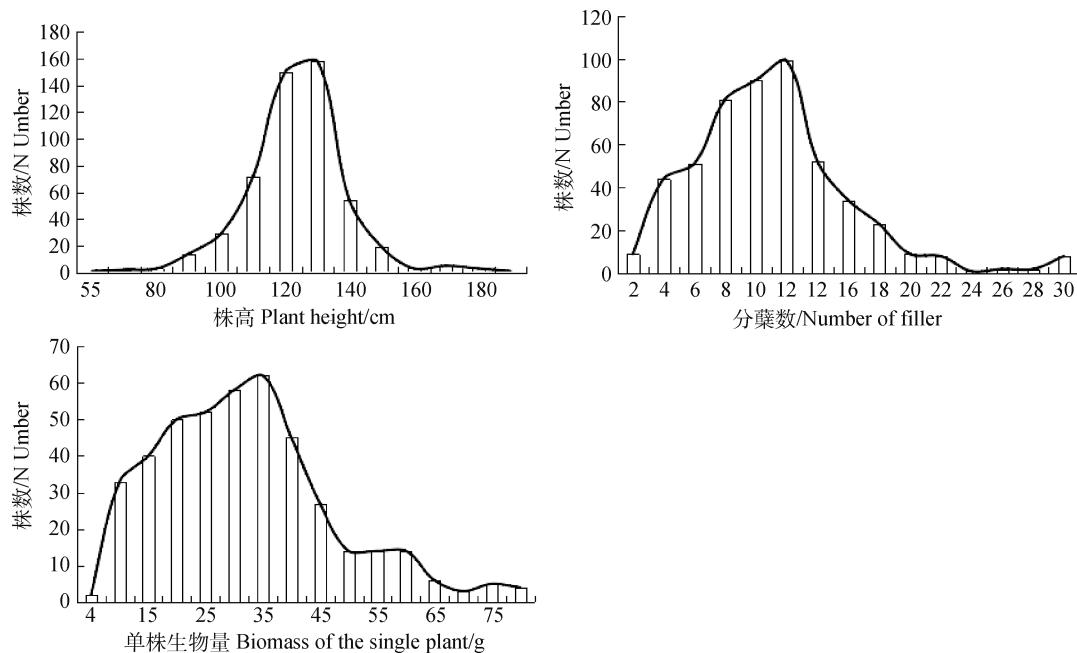
2.1 饲用型小黑麦杂交 F_2 代群体的田间表型鉴定

2.1.1 饲用型小黑麦 F_2 代群体草产量相关性状分析 饲用型小黑麦 F_2 代 521 个单株株高、分蘖数和单株生物量的田间表型结果(表 1,图 1)表明, F_2 代群体具有超亲现象且呈现出数量性状的遗传特点。就 F_2 群体各性状的平均值而言,株高、分蘖数和单株生物量均高于中亲值,体现出超亲优势,即后代趋向于分蘖数增多,单株生物量增加。3 个性状在 F_2 代中均表现出广泛变异,其中分蘖数和单株生物量的变异系数和变异幅度较大,株高的变异系数和变异幅度较小。变异的连续性是各性状的共同特征,在该群体中株高呈正态分布(峰度=3,偏度<1),分蘖数和单株生物量呈正偏态分布(峰度>3,偏度>1)。说明与草产量相关的 3 个重要表型性状基本上呈连续正态分布,能够作为遗传图谱作图群体^[26]。

2.1.2 饲用型小黑麦 F_2 代群体草产量相关性状的相关性分析 饲用型小黑麦 F_2 代群体草产量相关性状的相关性分析(表 2)表明,株高和分蘖数、单株生物量极显著正相关,分蘖数和单株生物量极显著正相关($P<0.01$)。

表 1 饲用型小黑麦杂交 F₂ 群体和父母本草产量相关性状的比较Table 1 Comparison of the forage yield related traits between the F₂ population and their parents in triticale

草产量相关性状 Forage yield related traits	亲本 Parents		中亲值 Mid-parent value	F ₂ 群体 F ₂ population				
	父本 Male parent	母本 Female parent		平均值 Mean	变异系数 CV/%	变异幅度 Range	峰度 Kurtosis	
							偏度 Skewness	
株高/cm Plant height	122.30	113.99	118.15	135.75	10.89	80~120	3.01	0.23
分蘖数/个 The number of tillers	4.69	5.43	5.06	10.33	48.69	1~42	9.07	2.05
单株生物量/g Biomass of the single plant	13.32	15.42	14.37	29.33	56.29	3.01~134.81	4.76	1.46

图 1 小黑麦杂交 F₂ 群体株高、分蘖数和单株生物量的次数分布Fig. 1 Distribution frequency of plant height, the number of tillers and biomass of the single plant in the F₂ populations of triticale表 2 饲用型小黑麦 F₂ 代群体草产量性相关性状的相关系数Table 2 Correlation coefficients among forage yield related traits in F₂ populations of triticale

性状 Trait	株高 Plant height	分蘖数 The number of tillers	单株生物量 Biomass of the single plant
株高 Plant height	1.000	0.354 **	0.545 **
分蘖数 The number of tillers	1.000	0.772 **	
单株生物量 Biomass of the single plant	1.000		

注: ** 表示极显著相关($P<0.01$)

Note: ** indicate significant correlated at the 0.01 level

2.2 饲用型小黑麦 F₂ 群体遗传连锁图谱构建与分析

以 F₂ 群体 521 个单株的田间表型数据为基础, 利用 Joinmap 3.0 作图软件, 进行遗传连锁分析作图, 构建了 1 张遗传连锁图谱^[11](图 2)。本连锁图谱包含 7 个连锁群(分别命名为 LG1~LG7), ISSR 分子标记共 92 个, 标记间平均距离为 5.90 cM, 图

谱总长度为 542.9 cM。各连锁群上的分子标记数存在差异, 变化范围为 9~18 个; 各连锁群对应的空隙数目也各不相同, 变化范围为 8~17 个; 各连锁群上标记间隔在 9.6~15.0 cM 之间; 连锁群上标记间平均距离变异范围在 4.93~7.80 cM 之间; 各连锁群的长度在 54.7~124.8 cM 之间(表 3)。

表 3 饲用型小黑麦 7 个连锁群的特性

Table 3 Characters of 7 linkage groups for forage triticale

连锁群 Linkage group	标记数 No. of markers	平均标记密度 marker/cm ³	空隙数 No. of intervals	标记间距 Marker Intervals /cM	平均距离 Average Interval /cM	长度 Length/cM
LG1	12	0.16	11	11.6	6.21	74.5
LG2	15	0.19	14	15.0	5.31	79.6
LG3	18	0.19	17	10.4	5.17	93.1
LG4	16	0.13	15	11.9	7.80	124.8
LG5	12	0.20	11	9.6	4.93	59.2
LG6	10	0.18	9	10.2	5.70	57.0
LG7	9	0.16	8	10.9	6.08	54.7
总计 Total	92	0.17	85	—	5.90	542.9

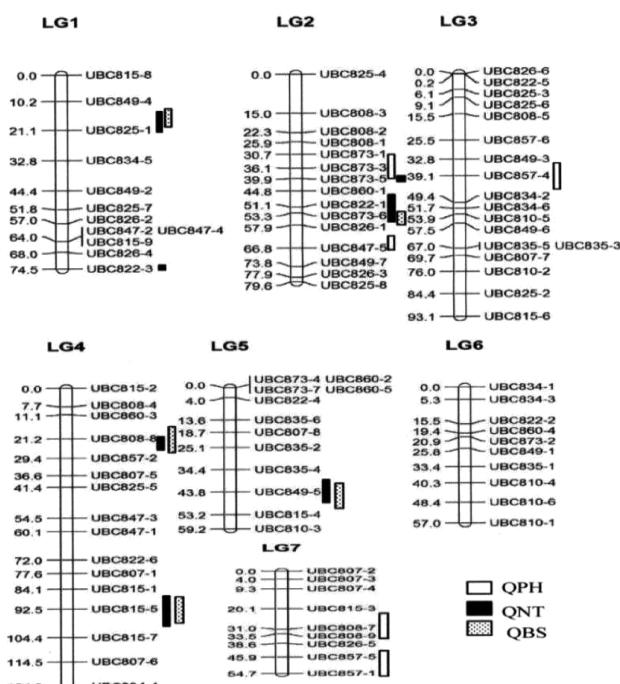
图 2 小黑麦 F₂ 群体 ISSR 遗传连锁图谱构建及草产量相关性状 QTL 定位

Fig. 2 Genetic linkage map and QTL for forage yield related traits in F₂ population of triticale based on ISSR marker注:QPH 表示控制株高的 QTLs;QNT 表示控制分蘖数的 QTLs;QBS 表示控单株生物量的 QTLs

Note: QPH means QTLs controlling the plant height, QNT means QTLs controlling the number of tillers, and QBS means QTLs to controlling the biomass of single plant

2.3 饲用型小黑麦杂交 F₂ 代群体草产量相关性状的 QTL 定位

运用 MapQTL6.0 软件,以 LOD≥2.0 为阈值,对饲用型小黑麦 F₂ 群体草产量相关性状(株高,分蘖数,单株生物量)进行 QTL 定位分析。共检测到 17 个相关 QTLs,分布在 6 个连锁群(LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6)上,平均每个连锁群 2.8 个,QTLs 在 6 个连锁群上分布不均匀,LG2 上分布最多,有 5 个 QTLs;连锁群 LG3 上分布最少,只有 1 个 QTL(图 2)。

控制株高的 5 个 QTLs 分布在 LG2、LG3 和 LG7 连锁群上,分别为 QPH2-1、QPH2-2、QPH3、QPH7-1 和 QPH7-2,所在区间分别为 UBC873-1~UBC873-5、UBC826-1~UBC847-5、UBC849-3~UBC834-2、UBC815-3~UBC826-5 和 UBC826-5~UBC857-1,临近标记分别为 UBC873-3、UBC847-5、UBC857-4、UBC808-9 和 UBC857-5。

7 个控制分蘖数的 QTLs 分布在 LG1、LG2、LG4 和 LG5 连锁群上,分别为 QNT1-1、QNT1-2、QNT2-1、QNT2-2、QNT4-1、QNT4-2 和 QNT5,所在区间分别为 UBC849-4~UBC834-5、UBC826-4~UBC822-3、UBC873-3~UBC860-1、UBC860-1~UBC826-1、UBC860-3~UBC857-2、UBC815-1~UBC815-7 和 UBC835-4~UBC815-4,临近标记分别为 UBC825-1、UBC822-3、UBC873-5、UBC873-6、UBC808-8、UBC815-5 和 UBC849-5,对应的遗传距离(cM)分别为 21.13, 74.5, 39.90, 53.33, 21.24, 92.50 和 43.76。

5 个控制单株生物量的 QTLs 分布在 LG1、LG2、LG4 和 LG5 连锁群上,分别为 QBS1、QBS2、QBS4-1、QBS4-2 和 QBS5,所在区间分别为 UBC849-4~UBC825-1、UBC822-1~UBC826-1、UBC860-3~UBC857-2、UBC815-1~UBC815-7 和 UBC835-4~UBC815-4,临近标记分别为 UBC825-1、UBC822-3、UBC873-5、UBC873-6、UBC808-8、UBC815-5 和 UBC849-5,对应的遗传距离分别为 16.23, 53.34, 21.24, 92.50 和 43.76。

2.3.1 控制株高 QTL 分析 5 个控制株高的 QTLs(QPH2-1, QPH2-2, QPH3, QPH7-1, QPH7-2),对应的 LOD 值分别为 4.37, 2.78, 4.82, 4.52 和 5.65, 单个 QTL 的贡献率分别为 10.4%, 6.7%, 11.4%, 10.7% 和 13.2% (表 4), 其中贡献率为 13.2% 的 QPH7-2 为有效 QTL, 加性效应的变化范围为 -23.22~17.91。

表 4 饲用型小黑麦 F₂ 代群体株高、分蘖数和单株生物量的 QTLs 定位结果Table 4 QTLs mapping on plant height, the number of tillers and biomass of the single plant in F₂ population of triticale

性状 Trait	位点 QTL	连锁群 Linkage group	区间 Interval	位置 Position/cM	LOD	贡献率 Expl/%	加性效应 Additive
株高 (Plant height)	QPH2-1	LG2	UBC873-1~UBC873-5	36.06	4.37	10.4	-16.23
	QPH2-2	LG2	UBC826-1~UBC847-5	66.79	2.78	6.7	-8.44
	QPH3	LG3	UBC849-3~UBC834-2	39.07	4.82	11.4	-16.08
	QPH7-1	LG7	UBC815-3~UBC826-5	33.55	4.52	10.7	-23.22
	QPH7-2	LG7	UBC826-5~UBC857-1	45.88	5.65	13.2	17.91
分蘖数 (The number of tillers)	QNT1-1	LG1	UBC849-4~UBC834-5	21.13	2.35	5.7	4.20
	QNT1-2	LG1	UBC826-4~UBC822-3	74.45	2.21	5.4	2.31
	QNT2-1	LG2	UBC873-3~UBC860-1	39.90	3.10	7.5	4.11
	QNT2-2	LG2	UBC860-1~UBC826-1	53.33	6.67	15.4	8.91
	QNT4-1	LG4	UBC860-3~UBC857-2	21.24	2.37	5.8	4.59
	QNT4-2	LG4	UBC815-1~UBC815-7	92.50	5.04	11.8	-4.88
	QNT5	LG5	UBC835-4~UBC815-4	43.76	4.59	10.9	-3.82
单株生物量 (Aboveground biomass of single plant)	QBS1	LG1	UBC849-4~UBC825-1	16.23	2.89	7.1	19.74
	QBS2	LG2	UBC822-1~UBC826-1	53.34	4.41	10.4	23.60
	QBS4-1	LG4	UBC860-3~UBC857-2	21.24	5.30	12.4	21.66
	QBS4-2	LG4	UBC815-1~UBC815-7	92.50	3.34	8.0	-12.88
	QBS5	LG5	UBC835-4~UBC815-4	43.76	4.89	11.5	-12.63

2.3.2 控制分蘖数 QTLs 分析控制饲用型小黑麦分蘖数的 7 个 QTLs 标记 QNT1-1, QNT1-2, QNT2-1, QNT2-2, QNT4-1, QNT4-2 和 QNT5, 对应的 LOD 值分别为 2.35, 2.21, 3.10, 6.67, 2.37, 5.04 和 4.59, 单个 QTL 的贡献率分别为 5.7%, 5.4%, 7.5%, 15.4%, 5.8%, 11.8% 和 10.9% (表 4), 其中贡献率为 15.4% 的 QNT2-2 为主效 QTL, 加性效应的变化范围在 -4.88~8.91 之间。

2.3.3 控制单株生物量 QTLs 分析以 LOD ≥ 2.0 为阈值, 5 个控制单株生物量的 QTLs (QBS1, QBS2, QBS4-1, QBS4-2, QBS5) 对应的 LOD 值分别为 2.89, 4.41, 5.30, 3.34 和 4.89, 单个 QTL 的贡献率为 7.1%, 10.4%, 12.4%, 8.0% 和 11.5% (表 4), 其中贡献率为 12.4% 的 QBS2 为主效 QTL, 加性效应的变化范围在 -12.88~23.60 之间。

3 讨论

小黑麦作为新型饲料作物, 其抗寒性强、草产量和粗蛋白含量高, 在青藏高原高寒牧区和华北、西北、西南地区具有极其广阔的应用前景。要进一步提高其草产量, 培育高产品种是关键。利用 QTL 技术可以将草产量相关性状进行定位, 可为饲用型小黑麦草产量相关主效 QTL 的挖掘、功能基因定位以及分子标记辅助育种奠定基础, 有利于提高育种效率, 培育高产饲用型小黑麦品种。但目前国外

QTL 研究主要集中在粮用型小黑麦^[24-25]方面, 饲用型小黑麦 QTL 研究较少^[26]。郭建文等^[31]研究表明, 饲用型小黑麦杂交 F₁ 代具有丰富的遗传变异, 46 个真杂种单株的株高、分蘖数和单株生物量等表现出明显的杂种优势。本研究以饲用型小黑麦 F₂ 代为试验材料, 研究发现株高、分蘖数和单株生物量均具有超亲现象, 有利于选育高产饲用型小黑麦品种(系)。饲用型小黑麦分蘖数和单株生物量测定应在开花期进行^[3], 本研究考虑到育种需要, 要收获种子, 所以推迟到完熟期进行。测定分蘖数时也测定了无效分蘖, 虽然该指标对种子产量无贡献, 但其对饲用型小黑麦草产量却具有重要贡献^[3]。QTL 定位时, 构建作图群体所需株系一般为 100~400 个^[32-33]。本研究 F₂ 代 521 个单株的株高、分蘖数和单株生物量呈连续变异, 分布频率大致接近正态分布, 体现出数量基因控制分离群体的特点^[34]。从而说明可用于 QTL 定位。

理想的遗传连锁图谱一般含有较多分子标记, 并且标记分布均匀、距离较近, 连锁群的数目和染色体数目一致等^[26]。Würschum 等^[25]认为, 构建一个基本的连锁图谱框架需要分子标记间的平均距离为 10~20 cM, 用于 QTL 定位的遗传连锁图谱则要求平均间隔小于 10 cM。本研究利用前期研究^[28]筛选出的 14 对 ISSR 多态性引物对小黑麦 F₂ 代群体进行遗传连锁分析, 初步构建了 1 张连锁图, 标记间平均距离为 5.90 cM, 说明该遗传连锁图谱适合于进行 QTL 定位。但该图谱只包含 92 个 ISSR 标

记,标记位点较少,有待于利用 AFLP、SSR、SNP 等其他分子标记,以挖掘更多标记,来增加遗传图谱密度。本研究采用 F_2 代群体并非最理想群体,因此还需在此基础上,进一步采用单粒传法获得高代稳定系(RIL 群体),然后通过测定草产量相关性状,以提高 QTL 结果定位的准确性。

株高、分蘖数和单株生物量是决定饲用型小黑麦草产量高低的重要因素^[2]。Würschum 等^[25]利用 DArT 标记在粮用小黑麦孕穗期、盛花期和乳熟期分别检测到 15、18 和 8 个控制株高的 QTLs。本研究利用 ISSR 标记构建饲用型小黑麦遗传图谱,并对开花期饲用型小黑麦株高、成熟期分蘖数和单株生物量进行 QTL 定位,共检测到 17 个 QTLs,其中控制株高的 QTLs 有 5 个,控制分蘖数的 QTLs 有 7 个,控制单株生物量的 QTLs 有 5 个。虽然本研究检测到控制开花期株高的 QTLs 数量较少,且只有 1 个(QPH7-1)和 Würschum 等^[25]检测到的乳熟期 QTL 相同,但本研究检测到的、控制饲用型小黑麦开花期株高的 QTLs 可为前述研究^[25]的补充。本研究表明,控制饲用型小黑麦株高、分蘖数和单株生物量的 QTLs 在连锁群上分布不均匀。这主要是因为控制不同性状的 QTLs 所处位置不同^[26],也与本研究涉及的数量性状较少有关^[35-36]。

本研究发现,饲用型小黑麦 QTL 分布有聚集趋势,表现出一因多效现象,遗传图谱中 LG1 连锁群上 21.23 cM 处的标记同时影响分蘖数和单株生物量;LG2 连锁群上 39.90 cM 处的标记同时影响株高和分蘖数,53.34 cM 处的标记同时影响分蘖数和单株生物量;LG4 连锁群上 21.24 cM 和 92.50 cM 处的标记同时影响分蘖数和单株生物量;LG5 连锁群上 43.76 cM 处的标记同时影响分蘖数和单株生物量。这一现象表明遗传连锁图谱上同一个位点的 QTL 可同时影响株高、分蘖数和单株生物量等不同性状,而且这些性状的相关性较高。这种现象也出现在黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.)^[37]、小麦^[38]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[39] 和玉米 (*Zea mays*)^[33] 等作物中。经典数量遗传学认为,基因的多效性或者连锁性是 2 个性状具有相关性的主要原因^[37]。许多 QTL 研究^[40-42]也试图从分子水平上证明这个问题。因此,需要通过增加标记数量来提高饲用型小黑麦图谱密度以及饱和度,为进一步挖掘主效基因,研究多因一效和一因多效的遗传机制,以及精细定位优良基因奠定基础。

QTL 容易受遗传背景和环境条件影响。这可

能与数量性状间基因与基因的互作和改变有关,这种现象称为上位性^[20],基因与环境的互作效应对 QTL 也有一定影响。在数量性状遗传中上位效应的作用不可忽视^[43-44]。要确保 QTL 的正确性和真实性,必须严格控制环境对植物的影响^[45]。本研究是在一个试验地环境下开展的研究,缺少不同试验地环境因素影响,因此,要构建饲用型小黑麦遗传图谱并进行 QTL 精细定位,就需要在不同环境条件下对多个基因型的 QTL 进行分析,以获得更加准确的 QTL 位点。

4 结论

饲用型小黑麦 F_2 代的 521 个单株的株高、分蘖数和单株生物量呈连续变异,分布频率大致接近正态分布,可用于 QTL 定位。饲用型小黑麦遗传图谱包含 7 个连锁群(LG1~LG7),图谱总长度为 542.9 cM,标记间平均距离为 5.90 cM,总共有 92 个位点。LOD ≥ 2.0 时,共检测到 17 个草产量相关 QTLs,其中控制株高 QTLs 5 个,分蘖数 QTLs 7 个,单株生物量 QTL 是 5 个,这些 QTLs 分布在 6 个连锁群上,平均每个连锁群 2.8 个;QTLs 在 6 个连锁群上的分布不均匀,LG2 上分布最多(5 个),LG3 上分布最少(1 个)。本研究通过对与饲用型小黑麦草产量紧密相关的农艺性状(株高、分蘖数、单株生物量)进行 QTLs 定位分析,可为相关主效基因的克隆、转化、利用以及农艺性状的遗传改良提供理论依据。

参考文献

- [1] 李冬梅,田新会,杜文华. 5 个小黑麦新品系的种子产量及产量构成因素分析[J]. 草地学报,2016,24(1):241-244
- [2] 赵雅姣,田新会,杜文华. 饲草型小黑麦在定西地区的最佳刈割期[J]. 草业科学,2015,32(7):1143-1149
- [3] 宋谦,田新会,杜文华. 甘肃省高寒牧区小黑麦新品系的生产性能[J]. 草业科学,2016,33(7):1367-1374
- [4] 任志强,杨慧珍,卜华虎,等. 诱变在作物遗传育种中的应用进展[J]. 中国农学通报,2016,32(33):125-129
- [5] 梁翰文,吕慧颖,葛毅强,等. 作物育种关键技术发展态势[J]. 植物遗传资源学报,2018,19(03):390-398
- [6] 王忠华,朱东亮,俞超. 现代育种技术在药用植物品种改良中的应用[J]. 科技通报,2010,26(01):88-92+119
- [7] 潘玉玲. 基于 SSR、SRAP 和 ISSR 丹参遗传连锁图谱构建及其农艺性状的 QTL 定位[D]. 泰安:山东农业大学,2016:27-39
- [8] 汪斌,祁伟,兰涛,等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻质种资源 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报,2011,37(6):1116-1123

- [9] 殷丽琴,彭云强,付绍红,等. 基于 ISSR 标记的彩色马铃薯遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 西南农业学报,2016,29(01):20-25
- [10] 赵雅姣,田新会,杜文华. 饲草型小黑麦遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 草地学报,2017,25(03):574-581
- [11] 赵方媛,李冬梅,田新会,等. 饲草型小黑麦遗传图谱的构建及抗条锈 QTL 定位[J]. 农业生物技术学报,2018,26(04):576-584
- [12] Brown R N, Barker R E, Wamke S E, et al. Identification of quantitative trait loci for seed traits and floral morphology in a field-grown Lolium perenne \times Lolium multiflorum mapping population[J]. Plant Breeding, 2010, 129(1): 29-34
- [13] Larson S R, Mayland H F. Comparative mapping of fiber, protein, and mineral content QTLs in two interspecific Leymus wildrye full-sib families[J]. Molecular Breeding, 2007, 20(4): 331-347
- [14] Robins J G, Luth D, Campbell T A, et al. Genetic mapping of biomass production in tetraploid alfalfa [J]. Crop Science, 2007, 47(1): 1-10
- [15] Herrmann D, Boiler B, Studer B, et al. QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 536-545
- [16] 谢文刚. 鸭茅分子遗传连锁图谱构建及开花基因定位[D]. 成都: 四川农业大学, 2013: 48-71
- [17] 房永雨,于肖夏,于卓,等. 高丹草 10 个重要性状的 QTL 定位分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(4): 26-34+43
- [18] 郭海林,丁万文,陈静波,等. 结缕草耐盐分离群体的构建[J]. 草地学报, 2012, 20(4): 724-728+734
- [19] 段清清. 冰草遗传连锁图谱构建及主要农艺性状的 QTL 定位[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2016: 57-81
- [20] Studer B, Boiler B, Bauer E, et al. Consistent detection of QTLs for crown rust resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) across environments and phenotyping methods[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(1): 9-17
- [21] Barrett B A, Baird I J, Woodfield D R. A QTL analysis of white clover seed production[J]. Crop Science, 2005, 45: 1844-1850
- [22] Espinoza L C L, Julier B. QTL detection for forage quality and stem histology in four connected mapping population of the legume *medicago truncatula* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(2): 497-509
- [23] 李小雷. 几种披碱草种间杂种 F1 遗传特性及冰草分子图谱构建研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008: 47-68
- [24] Niedziela A, Bednarek P T, Labudda M, et al. Genetic mapping of a 7R Al tolerance QTL in triticale ((*Triticosecale Wittmack*) [J]. Journal of Applied Genetics, 2014, 55(1): 1
- [25] Würschum T, Liu W, Busemeyer L, et al. Mapping dynamic QTL for plant height in triticale [J]. BMC Genetics, 2014, 15(1): 59
- [26] Alheit K V, Busemeyer L, Liu W, et al. Multiple-line cross QTL mapping for biomass yield and plant height in triticale (\times *Triticosecale Wittmack*) [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2014, 127(1): 251-60
- [27] 丁芳兵,刘连芬,汤庚国,等. 从苹果属腊叶标本中提取 DNA 的改良 CTAB 法研究[J]. 中国农学通报, 2012, (16): 176-179
- [28] 赵雅姣. 基于 ISSR 标记的小黑麦遗传多样性分析及在甘肃省临洮地区的生产性能研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015: 13-29
- [29] Van Ooijen J, Voorrips R. JoinMap3. 0 Software for Calculation of Genetic Linkage Maps [J]. Wageningen: Plant Research International, 2001
- [30] Van Ooijen J W. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84: 803-811
- [31] 郭建文,李冬梅,田新会,等. 小黑麦杂交 F1 代真假杂种的 ISSR 标记鉴定及遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报, 2017, 37(08): 1031-1037
- [32] 何小红,徐辰武,蒯建敏,等. 数量性状基因作图精度的主要影响因子[J]. 作物学报, 2001, 27(4): 469-475
- [33] 李永祥,王阳,石云素,等. 玉米籽粒构型与产量性状的关系及 QTL 作图[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 408-418
- [34] 龚文兵,肖扬,周雁,等. 香菇产量相关性状的 QTL 定位[C]// 中国菌物学会会员代表大会, 2014: 110
- [35] Alheit K V, Busemeyer L, Liu W, et al. Multiple-line cross QTL mapping for biomass yield and plant height in triticale (\times *Triticosecale Wittmack*) [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2014, 127(1): 251-60
- [36] 姜志艳. 四倍体杂交冰草高密度分子巧传图谱构建及重要农艺性状 QTL 定位[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015: 4-14
- [37] 苗晗,顾兴芳,张圣平,等. 黄瓜果实相关性状 QTL 定位分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(24): 5031-5040
- [38] 张坤普,徐宪斌,田纪春. 小麦籽粒产量及穗部相关性状的 QTL 定位[J]. 作物学报, 2009, 35(2): 270-278
- [39] 杨梯丰,张少红,赵均良,等. 水稻耐冷 QTL 定位的比较分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(1): 1-15
- [40] 刘传奇,高鹏,栾非时. 西瓜遗传图谱构建及果实相关性状 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(14): 2814-2829
- [41] 吴春红,梁雪,李斯深,等. 小麦苗期钾、钠吸收相关性状及其 QTL 分析[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(5): 1025-1036
- [42] 杨钊钊,李永祥,刘成,等. 基于多个相关群体的玉米雄穗相关性状 QTL 分析[J]. 作物学报, 2012, 38(8): 1435-1442
- [43] 王培,李晓林,杨林,等. 小麦单株穗数的遗传分析及基于 QTL 定位的最优基因型预测[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(5): 820-827
- [44] 侯萌,齐照明,韩雪,等. 大豆蛋白质和油分含量 QTL 定位及互作分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(13): 2680-2689
- [45] 王伟,叶志云,郑景生,等. 稻米粒形的 QTL 定位及上位性和 QE 互作分析(英文)[J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1344-1350