

# 水稻孕穗期叶绿素含量的 QTL 定位

范淑秀,王嘉宇,毛 艇,徐正进

(沈阳农业大学 水稻研究所,辽宁省北方粳稻育种重点开放实验室,辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 利用由籼稻品种七山占与粳稻品种秋光杂交构建的一个包含 162 个株系( $F_{10}$ )的重组自交系群体,及其相应的包含 122 个 SSR 标记的遗传图谱,采用区间定位方法,对控制水稻孕穗期剑叶叶绿素含量的 QTL 进行定位分析。共检测到 22 个与孕穗期叶绿素含量有关的 QTL,分别位于第 3、7、10 和 12 染色体上,包括对 6 个叶绿素 a 含量 QTL、5 个叶绿素 b 含量 QTL、5 个类胡萝卜素含量 QTL 和 6 个总叶绿素含量 QTL,单个 QTL 对性状表型贡献率为 7.4% ~ 14.6%。

**关键词:** 水稻;重组自交系;剑叶;叶绿素含量

中图分类号: S511.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0069-04

## Identification of QTLs for Chlorophyll Content at Booting Stage in Rice

FAN Shu-xiu, WANG Jia-yu, MAO Ting, XU Zheng-jin

(Rice Institute of Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Northern Japonica Rice Breeding of Liaoning, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** The recombinant inbred line populations consisting of 162 lines derived from Qishanzhan (indica) / Akihikari (japonica) and its genetic linkage map were used to map the QTLs controlling the chlorophyll content of flag leaf. A total of 22 QTLs with main effects were detected on the chromosome of 3, 7, 10 and 12. Of them, six QTLs affected chlorophyll a content, five QTLs control chlorophyll b content, five QTLs and six QTLs control carotenoid content and total chlorophyll content respectively. Each QTL explained 7.4% - 14.6% phenotypic variations.

**Key words:** Rice; Recombinant inbred line; Flag; Chlorophyll content

叶绿素是植物吸收、传递、转换光能的主要色素,在一定的范围内,叶片的叶绿素含量与光合速率呈正相关关系<sup>[1-3]</sup>。高产品种叶片总叶绿素含量高,故其单位叶面积净光合速率大,生育后期表现较强的干物质积累优势<sup>[4]</sup>。不同品种叶绿素含量不同,一般粳稻品种的叶绿素含量高于籼稻品种<sup>[5]</sup>。近年来,随着株型育种理论的深入和完善,叶片叶绿素含量被作为高产品种选育的一项重要生理指标。叶绿素的遗传主要受核基因控制,属数量性状遗传,具有较高的遗传力,在一定程度上受显性基因的作用<sup>[6]</sup>,并且叶绿素的含量与栽培条件密切相关<sup>[7]</sup>。目前,以水稻叶绿素含量为性状及与叶绿素含量相关的基因定位已有一些研究报道<sup>[8-12]</sup>,但这些报道多数只涉及个别叶绿素相关性状,没有对各种叶绿素组分进行分析研究。

本研究利用籼稻品种七山占和粳稻品种秋光杂交产生的重组自交系群体,对水稻孕穗期叶片叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素以及类胡萝卜素含量分别进行了遗传分析和基因定位,为进一步探讨水稻叶片叶绿素含量的遗传规律以及水稻高光效育种提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

以典型的籼稻品种七山占与典型的粳稻品种秋光杂交衍生的重组自交系 (Recombinant Inbred Line, RIL $F_{10}$ , 共计 162 个株系) 群体及亲本为材料。

### 1.2 田间种植

田间试验在沈阳农业大学水稻研究所试验田进行,沙壤土,肥力中等,井水灌溉,采用开闭式塑料薄

收稿日期: 2010-07-12

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (20092103120012); 辽宁省博士科研启动基金资助项目 (20091070)

作者简介: 范淑秀 (1979-), 女, 山东济宁人, 博士后, 主要从事作物抗逆生理生化研究。

通讯作者: 王嘉宇 (1976-), 男, 辽宁法库人, 副研究员, 主要从事主要水稻生理生态与遗传育种研究。

膜保温旱育苗。每株系单本插成 3 行,每行 10 株,株行距为 30 cm × 13.3 cm,栽培管理同当地一般生产田。

### 1.3 叶绿素含量的测定

于孕穗期每份材料随机选取 3 片主茎剑叶,以叶片中部为测定部位,在去除叶片主叶脉后,将叶片剪成小碎片混合。用 10 mL 95% 乙醇避光浸泡 72 h,浸泡过程中每天混匀 2 次,提取叶绿素的叶片完全变白后进行比色,用紫外可见分光光度计 (Cary50,美国瓦里安公司生产) 在 665,649,470 nm 波长测量光密度值,以 95% 乙醇为空白对照。根据下列计算公式计算叶绿素 a ( $C_a$ )、叶绿素 b ( $C_b$ )、总叶绿素 ( $C_t$ ) 和类胡萝卜素 ( $C_{xc}$ ) 的浓度 (单位: mg/L)。

$$C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$$

$$C_t = C_a + C_b = 18.08A_{649} - 6.63A_{665}$$

$$C_{xc} = (1.000A_{470} - 2.05C_a - 14.8C_b) / 245$$

在计算叶绿素浓度之后,再按下面公式计算叶片的叶绿素含量 (mg/g):

$$\text{叶绿体色素的含量} = C_x V / 1.000W$$

式中  $C$  为叶绿素浓度 (mg/L);  $V$  为提取液总量 (mL);  $W$  为样品鲜质量 (g); 下标  $x$  表示具体测定的叶绿体色素。

### 1.4 分子遗传图谱的构建

DNA 提取采用 CTAB 法。选择覆盖整个基因

的 500 对 SSR 引物检测七山占和秋光之间的多态性,再用多态性有明显差异并且扩增条带较清晰的 122 对引物对群体进行 SSR 标记分析。PCR 采用 10  $\mu$ L 的反应体积,8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染法检测,采用 MAPMAKER/EXP 3.0b 构建遗传图谱,辅助 Map Chart 2.1 软件作图。

### 1.5 QTL 定位

QTL 分析采用 Mapmarker<sup>[13]</sup> 进行群体遗传图谱的绘制,采用 Qgene2.29<sup>[14]</sup> 软件进行叶绿素各性状的基因定位分析,利用区间作图法,采用 LOD 值 2.4 作为阈值来判断 QTL 的存在,若标记区间 LOD 值 > 2.4,则认为该区间 LOD 值最高处所对应的位点即为该性状的一个 QTL。同时计算每个 QTL 对各性状的贡献率,QTL 的命名采用 McCouch 等<sup>[15]</sup> 的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 剑叶叶绿素性状在亲本间和 RIL 群体中的表型分布

从表 1 可以看出,叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量在两亲本间性状差异不显著,但在七山占/秋光的重组自交系群体中各项指标变异幅度大,都呈现双向超亲分离,偏度和峰度分析表明,叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量皆表现为接近正态的连续分布,表现为数量遗传,可以进行 QTL 定位研究。

表 1 亲本和 RIL 群体的剑叶叶绿素含量

Tab. 1 Chlorophyll content of flag leaf in the parents and the RIL population

性状 Traits	秋光 Akihikari	七山占 Qishanzhan	RIL 群体			
			平均值 Mean	区间分布 Range	偏度 Skew	峰度 Kurt
叶绿素 a Chlorophyll a	2.463 8	2.706 2	2.342 8	1.363 1 ~ 3.224 6	-0.003 8	-0.063 5
叶绿素 b Chlorophyll b	0.666 1	0.803 6	0.692 4	0.415 6 ~ 0.979 0	0.199 2	-0.062 5
总叶绿素 Total chlorophyll	3.129 9	3.509 8	3.035 2	1.778 7 ~ 4.160 7	0.037 0	-0.078 3
类胡萝卜素 Carotenoid	0.540 3	0.589 2	0.511 4	0.286 8 ~ 0.715 1	0.019 3	0.414 2

### 2.2 剑叶叶绿素相关生理性状的 QTL 定位

用区间作图法对 RIL 群体剑叶的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量 4 个叶绿素生理性状分别进行 QTL 定位,共检测到 22 个 QTL (表 2,图 1),分别分布在第 3,7,10,12 染色体上。LOD 值 2.6 ~ 5.6,贡献率为 7.4% ~ 14.6%。

对叶绿素 a 含量检测到 6 个有关的 QTL,叶绿素 b 含量检测到 5 个有关的 QTL,其中第 3 染色体上的 2 个 QTL、第 10、12 染色体 QTL 的位置在两性状之间是相同的,即  $qChla-3a = qChlb-3a$ 、 $qChla-3b = qChlb-3b$ 、 $qChla-10a = qChlb-10$ 、 $qChla-12 = qChlb-12$ ; 在第七染色体的检测到控制叶绿素 a 含量和叶

绿素 b 含量的 QTL 各一个,  $qChla-7$  和  $qChlb-7$  都位于 SSR 标记 RM18 和 RM118 之间。

检测到控制含量的总叶绿素 QTL 6 个,控制总叶绿素含量的 QTL 与控制叶绿素 a 含量的 QTL 位于相同区间。在该群体中检测的控制类胡萝卜素含量的 QTL 5 个,分别位于第 3、7 和 10 染色体上,他们分别与各染色体上控制叶绿素 a、总叶绿素含量的 QTL 的区间相同,说明在该群体中,控制叶绿素生理性状的 QTL 存在 5 个基因簇,分别位于第 3 染色体的 RM251-RM232、RM231-RM22 之间,第 7 染色体的 RM18-RM118、第 10 染色体的 PSM166-RM269 和 RM258-RM216 之间。

表 2 剑叶叶绿素性状的 QTL 定位结果

Tab.2 QTL analysis for flag leaf chlorophyll contents

性状 Traits	QTL	染色体 Chromosome	标记区间 Flanking marker	LOD Value	贡献率 / % H <sup>2</sup>	加性效应 Additive
叶绿素 aChlorophyll a	qChla-3a	3	RM251-RM232	5.51	13.4	-0.150
	qChla-3b	3	RM231-RM22	5.57	14.6	-0.245
	qChla-7	7	RM18-RM118	3.26	8.8	0.131
	qChla-10a	10	PSM166-RM269	3.04	8.3	0.384
	qChla-10b	10	RM258-RM216	5.08	13.5	0.191
	qChla-12	12	RM235-RM19	2.71	7.4	-0.126
叶绿素 bChlorophyll b	qChlb-3a	3	RM251-RM232	5.24	13.8	-0.050
	qChlb-3b	3	RM231-RM22	4.07	10.9	-0.067
	qChlb-7	7	RM18-RM118	3.48	9.4	0.046
	qChlb-10	10	RM258-RM216	4.99	13.2	0.620
	qChlb-12	12	RM235-RM19	2.62	7.2	-0.056
总叶绿素 Total chlorophyll	qChlt-3a	3	RM251-RM232	5.21	13.8	-0.192
	qChlt-3b	3	RM231-RM22	5.28	13.9	-0.313
	qChlt-7	7	RM18-RM118	3.34	9.1	0.174
	qChlt-10a	10	PSM166-RM269	2.91	7.9	0.460
	qChlt-10b	10	RM258-RM216	5.17	13.7	0.253
	qChlt-12	12	RM235-RM19	2.75	7.5	-0.204
类胡萝卜素 Carotenoid	qChlxc-3a	3	RM251-RM232	3.88	10.5	-0.029
	qChlxc-3b	3	RM231-RM22	4.87	12.9	-0.047
	qChlxc-7	7	RM18-RM118	2.77	7.6	0.026
	qChlxc-10a	10	PSM166-RM269	3.01	8.2	0.089
	qChlxc-10b	10	RM258-RM216	4.76	12.6	0.040

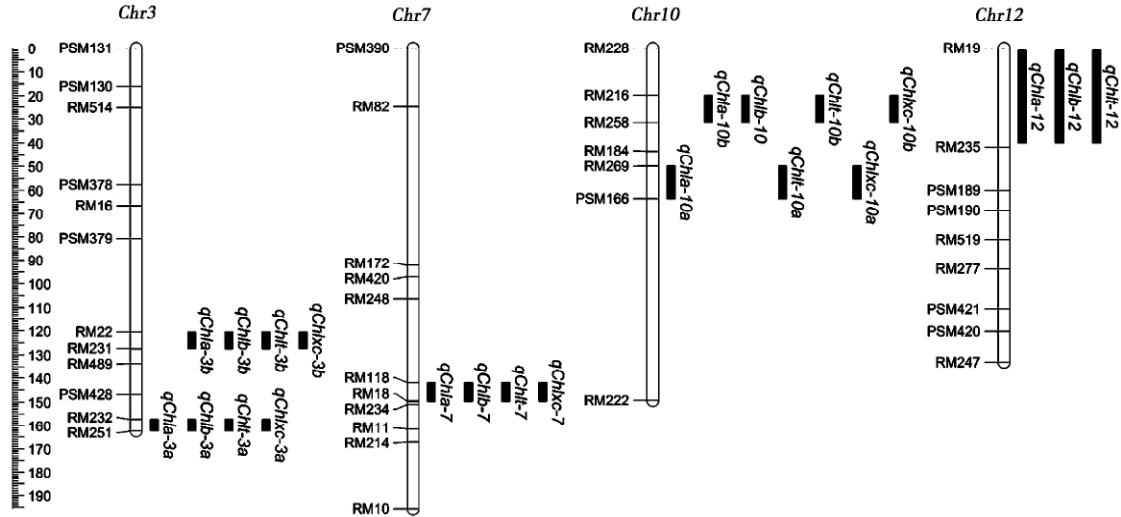


图 1 控制水稻剑叶叶片叶绿素含量的 QTL 在染色体上位置

Fig.1 Locations of QTLs for flag leaf chlorophyll content at the booting stage of rice

3 结论与讨论

崔克辉等<sup>[10]</sup>用珍汕 97A 和明恢 63 的重组自交系分析幼苗特性时,定位到 2 个控制剑叶叶绿素 a 含量的 QTL 和 1 个控制总叶绿素含量的 QTL,控制总叶绿素含量的 QTL 与控制叶绿素 a 含量的 1 个 QTL 位于同一区间;汪斌等<sup>[16]</sup>利用籼粳交重组自交系群体对控制水稻剑叶和倒二叶的叶绿素含量的 QTL 进行了定位分析,对叶绿素 a 和叶绿素 b 含量各检测到 6 个 QTL,分别位于第 1、4 和 11 染色体

上,其中 5 个 QTL 在两性状间是相同的。本研究对叶绿素 a 检测到 6 个 QTL,对叶绿素 b 含量检测 5 个 QTL,控制叶绿素 b 的 5 个 QTL 与控制叶绿素 a 中的 5 个位于相同区间。胡颂平等<sup>[17]</sup>利用籼粳交 RIL 群体对水稻倒二叶进行分析,在正常供水下检测到 7 个控制总叶绿素含量的 QTL,其中第 3 染色体上 RM231 ~ RM22 的 QTL 与本研究检测的一个 QTL 位于相同区间。在本研究中,控制叶绿素含量的 QTL 多以 QTL 簇的形式存在,说明紧密连锁或成簇分布可能是叶绿素的遗传基础之一。

本研究定位叶绿素含量相关性状 QTL 主要集中在第 3、7、10 和 12 号染色体上,与其他的 研究结果相比较,共同的 QTL 位点较少,多数 QTL 在不同群体中的重演性较差<sup>[18-21]</sup>。一方面可能是 因为不同的研究所用的材料不同,并且叶片叶绿素含 量是一个动态的变化过程,不同的研究侧重的生育 时期也不同,即使定位在同一染色体上,因所用的材 料和标记方法的不同,也难以确定是否是同一 QTL; 另一方面可能是因为叶片叶绿素含量受栽培措施等 影响较大。到目前为止,除第 11 染色体上没有发现 控制叶绿素含量的 QTL 外(<http://www.gramene.org/qtl/>)其他染色体都存在控制叶绿素含量的 QTL,说明叶绿素含量的分子遗传机制复杂。

#### 参考文献:

- [1] Mae T. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis and yield potential [J]. *Plant and Soil*, 1997, 196: 201 - 210.
- [2] 刘贞琦,刘振业,马达鹏,等. 水稻叶绿素含量及其与光合速率关系的研究 [J]. *作物学报*, 1984, 10(1): 57 - 62.
- [3] 大野义一. 籼稻光合效率的品种间差异和干物质生产 (屠曾平译) [M]. 北京: 农业出版社, 1976: 46 - 48.
- [4] 肖应辉,余铁桥,陈立云,等. 两系亚种间杂交稻干物质生产特性的研究 [J]. *湖南农业大学学报*, 1999, 25(6): 425 - 429.
- [5] 陈温福,徐正进,张龙步. 水稻超高产育种生理基础 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2003: 133 - 155.
- [6] 刘贞琦,刘振业,马达鹏,等. 水稻叶绿素含量的遗传研究 [J]. *贵州农学院学报*, 1983(2): 1 - 7.
- [7] 赵全志,陈静蕊,刘辉,等. 水稻氮素同化关键酶活性与叶色变化的关系 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(9): 2607 - 2616.
- [8] 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.
- [9] 吴平,罗安程. 应用分子标记研究氮素胁迫条件下水稻叶片叶绿素含量差异的遗传背景 [J]. *遗传学报*, 1996, 23(6): 431 - 438.
- [10] Cui K H, Peng S B, Xing Y Z, *et al.* Molecular dissection of relationship between seedling characteristics and seed size in rice [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(6): 702 - 707.
- [11] Cha K W, Koh H J, Lee Y J, *et al.* Isolation, characterization, and mapping of the stay-green mutant in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 526 - 532.
- [12] Yue B, Xue W Y, Luo L J, *et al.* QTL analysis for flag leaf characteristics and their relationships with yield and yield traits in rice [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 824 - 832.
- [13] Haldane J B S. The combination of linkage value and the calculation of distances between the loci of linked factors [J]. *J Genetics*, 1919, 8: 299 - 309.
- [14] Nelson J C. QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding [J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 239 - 245.
- [15] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, *et al.* Report on QTL nomenclature [J]. *Rice Genet Newslett*, 1997, 14: 11 - 13.
- [16] 汪斌,兰涛,吴为人,等. 水稻叶绿素含量的 QTL 定位 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(12): 1127 - 1132.
- [17] Hu S P, Yan Y M. Genetic analysis of chlorophyll content in rice by molecular markers [J]. *Agricultural Science and Technology*, 2004, 5(2): 8 - 11.
- [18] 胡颂平,梅捍卫,邹桂花,等. 正常与水分胁迫下水稻叶片叶绿素含量的 QTL 分析 [J]. *植物生态学报*, 2006, 30(3): 479 - 486.
- [19] 左海龙,肖珂,张永娟,等. 控制水稻叶片叶绿素含量及其离体叶片叶绿素降解速度相关的定位 [J]. *分子细胞生物学报*, 2007, 40(5): 346 - 350.
- [20] 杨国华,李绍清,冯玲玲,等. 水稻剑叶叶绿素含量相关性状的 QTL 分析 [J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2006, 52(6): 751 - 756.
- [21] Yang Q H, Lu W, Hu M L, *et al.* QTL and epistatic interaction underlying leaf chlorophyll and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content variation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(3): 245 - 250.