

# 花生吸水膨胀期耐低温性状 QTL 定位

刘海龙<sup>1,2</sup>, 白冬梅<sup>3</sup>, 宁 洽<sup>2</sup>, 郭建斌<sup>1</sup>, 徐志军<sup>1</sup>, 陈小姝<sup>2</sup>, 孙晓苹<sup>2</sup>, 姜慧芳<sup>1\*</sup>, 高华援<sup>2\*</sup>

(1. 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430062; 2. 吉林省农业科学院花生研究所, 吉林 公主岭 136100; 3. 山西省农业科学院经济作物研究所, 山西 汾阳 032200)

**摘要:** 本文目的是为我国花生耐低温育种中优良亲本的选择和分子标记辅助育种提供基本信息和材料基础。以徐花 13 中间型大粒花生为母本, 中花 6 号珍珠豆型中粒花生为父本, 衍生的 187 个家系的 RIL 群体通过 SSR 技术检测 RIL 群体多样性, 构建了一张含 325 个标记的连锁图, 总长度 1 493.79 cM, 标记间平均距离为 4.60 cM, 为遗传连锁图谱进一步饱和奠定基础。进行 RIL 群体耐低温表型鉴定, 采用 QTL IciMapping3.0 软件完备区间作图法进行 QTLs 定位和效应估计, 共检测出 10 个与耐低温相关的 QTL, 其中主效 QTL 可以为耐低温标记辅助育种。鉴定出的耐低温家系可以为耐低温育种提供材料基础。

**关键词:** 花生; 遗传图谱; 耐低温; QTL

中图分类号: S565.2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)05-0005-07

## Mapping of QTL for Low Temperature Tolerance Trait during Peanut Seed Imbibition

LIU Hailong<sup>1,2</sup>, BAI Dongmei<sup>3</sup>, NING Qia<sup>2</sup>, GUO Jianbing<sup>1</sup>, XU Zhijun<sup>1</sup>, CHEN Xiaoshu<sup>2</sup>, SUN Xiaoping<sup>2</sup>, JIANG Huifang<sup>1\*</sup>, GAO Huayuan<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062; 2. Peanut Research Institute of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 3. Economic Plant Research Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang 032200, China)

**Abstract:** This paper provided basic for low temperature resistant breeding and molecular marker assisted breeding. 187 recombinant inbred lines (RIL), derived from a cross between two peanut cultivars (Xuhua 13 × Zhonghua 6), were used as mapping population. Finally, a genetic linkage map consisting of 325 SSR loci in 20 linkage groups and covering 1 493.79 cM with an average distance of 4.60 cM was constructed, which laid a good foundation for molecular genetic map construction. QTL mapping of the traits related to pod was conducted by QTL IciMapping3.0. A total of 10 QTL were detected in the two environments, which laid a good foundation for molecular genetic map construction and the molecular markers linked closely to the major QTL could be used in MAS breeding of peanut with low temperature resistance. Low temperature resistant parentage may be basic germplasm resources in low temperature resistance peanut breeding.

**Key words:** Peanut; Genetic linkage map; Low temperature tolerance; QTL

低温是北方花生产区主要的非生物胁迫之

收稿日期: 2018-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(31871662); 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室开放课题基金(2014001); 吉林省农业科学院创新工程(CXGC2018ZY001)

作者简介: 刘海龙(1976-), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向: 花生遗传育种。

通讯作者: 姜慧芳, 女, 博士, 研究员, E-mail: penut@oil.crope.com  
高华援, 男, 硕士, 研究员, E-mail: ghy64143@163.com

一。花生在吸水膨胀期、花期及生长发育后期都可能遭受低温冷害<sup>[1-3]</sup>。花生在吸水膨胀期遭遇低温冷害发生大面积烂种, 造成大面积减产或绝收, 因此在花生育种中有必要创制一批耐低温花生种质或品种, 同时分子标记辅助选择可以加快花生耐低温种质创制或品种培育的进程。

近年来花生遗传图谱与 QTL 定位发展较快, 主要对花生产量相关性状、农艺性状及抗病性进行 QTL 定位, 如李振动等<sup>[4]</sup>利用花生栽培种 RIL 群

体构建了包含 365 个标记的栽培种花生遗传图谱,使用 2 年荚果表型数据,利用 WinQTLcart 2.5 软件的复合区间作图法,找到了与荚果长、宽、厚和百果重相关的 QTL,表型变异解释率为 3.14% ~ 18.27%。成良强等<sup>[5]</sup>利用栽培种 F2 作图群体,构建了一张含有 234 个 SSR 标记花生遗传图谱,长度为 1 683.43 cM,使用 1 年主茎高和总分枝数鉴定结果,应用 WinQTLCart 2.5 软件采用复合区间作图法进行了 QTL 定位和遗传效应分析。共检测到 17 个与主茎高和总分枝数相关的 QTL 位点,贡献率在 0.10% ~ 10.22% 之间。张新友<sup>[6]</sup>使用 winQTLcart2.5 和 QTLNetwork2.0 两种分析软件进行 QTL 的检测,获得 62 个与形态、产量、品质、网斑病抗性相关的加性 QTL 位点。未见到有关花生吸水膨胀期耐低温 QTL 定位报道。本研究通过对花生 RIL 群体种子吸水膨胀期耐低温性鉴定,发掘耐低温的材料,同时,通过 SSR 技术检测 RIL 群体多样性,应用相关软件进行 QTL 定位。研究结果将为我国花生耐低温育种中优良亲本的选择和分子标记辅助育种提供基本信息和材料基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

根据徐花 13、中花 6 号两个品种在亲本筛选中相对发芽率为 75.1%、32.4%,耐低温性状上差异较大。以徐花 13 为母本,中花 6 号为父本杂交,构建重组自交系群体(RIL)共 187 个家系。

### 1.2 表型数据测定方法

2014、2015 连续两年间对 RIL 群体的 F<sub>5</sub>、F<sub>5.6</sub> 代种子在室内进行耐低温试验。

#### 1.2.1 种子准备

将种子用酒精消毒后放置在小烧杯中,再用蒸馏水多次冲洗,将洗净的种子放置于预冷 2℃ 的灭菌蒸馏水中浸泡 48 h,待低温试验使用。

#### 1.2.2 低温发芽试验

将待用的种子在无菌台中转移至直径为 9 cm 的底部放有滤纸的灭菌培养皿中,加 2℃ 的灭菌蒸馏水,放置在 25℃ 恒温层析柜中发芽。

#### 1.2.3 低温发芽设计

冷浸温度为 2℃,每份(30 粒)种子做 3 次重复,按上述方法操作。同时正常发芽每份(30 粒)种子做 3 次重复,作为矫正参数。按如下公式计算相对发芽率:

相对发芽率(RGR)=(2℃发芽率/25℃发芽率)×100%<sup>[5]</sup>

### 1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

选取亲本和 RIL 群体的幼叶,采用改良 CTAB 法提取叶片基因组总 DNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度与纯度。

采用国内外文献已发表的和农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室开发的基因组 SSR 引物(2 340 对以及 SSR 引物的种类,EST-SSR800 对)进行扩增。

本实验对 DNA 提取采用改良的 CTAB 法。详细操作为:

①将 CTAB 抽提缓冲液放置在 65℃ 水浴锅中进行预热,使其温度达到 65℃ 左右;②取 0.3 g 新鲜叶片置于 1.5 mL 的离心管中,将离心管进行编号后直接投入到装有液氮的液氮缸内;③用镊子从液氮缸中取出 1.5 mL 离心管,用小玻璃棒快速研磨至粉末状,使研磨的粉末变成灰白色(速度要快,以防降解);④加入预热的 CTAB 抽提缓冲液 600 μL 缓冲提取液,加入 10 μL R Nase A,充分震荡混匀;⑤置于 65℃ 水浴锅中保温 1.5 h(每 15 min 震荡一次);⑥从水浴锅里取出离心管,按顺序置于离心管架上,待冷却至室温后加入 600 μL 氯仿:异戊醇(24:1),放在摇床上轻摇 15 min;⑦取同等数量新的 1.5 mL 的离心管进行编号;⑧12 000 r/min,离心 8 min,取上清液,转移至已编号的离心管中;⑨加 600 μL 氯仿:异戊醇(24:1),放在摇床上轻摇 15 min;⑩12 000 r/min,离心 8 min,取上清液,转移至已编号的离心管中;⑪加入等体积的冰冻乙醇,轻轻震动沉淀 DNA,然后置于-20℃ 的冰箱中静止 20 min;⑫在 10 000 r/min 下,离心 10 min,弃上清;⑬加入 1 mL 的 70% 乙醇,洗涤 2 次;⑭真空抽干;⑮加入 100 μL 的 ddH<sub>2</sub>O,溶解 DNA。

PCR 体系采用 10 μL,含 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50 mmol/L KCl、300 ~ 400 μmol/L dNTPs、10 ~ 40 pmol/L 引物对、10 ~ 20 ng 模板 DNA。PCR 程序为 Touchdown,扩增条件为 94℃ 预变性 3 min;93℃ 变性 30 s,65℃ 退火 30 s(每个循环降低 1℃),72℃ 延伸 1 min,共 10 个循环;93℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 20 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,硝酸银染色,显影,扫描保存。

### 1.4 分子标记数据统计

统计每份材料扩增的条带,与母本相同的带型记为“2”,与父本相同的带型记为“0”,同时具有两个亲本带型的记为“1”,缺失或者不清的带型记为“-1”。

## 1.5 数据分析与QTL检测

应用Joinmap 3.0软件构建遗传图谱设置 $LOD \geq 3$ ,步长为0.5,在2.0~20.0的LOD值范围内将所有标记分组,并利用Kosambi函数将重组率转换为图谱距离(cM);采用QTL的命名以q加英文名称首字母加所在连锁群命名,若同一连锁群上出现2个或以上QTL时,则QTL后面加“-”和数字区分。如下位于第1连锁群上的第一个控制耐低温性状的表示为QTL<sub>qLTTLG1-1</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 RIL群体吸水膨胀期耐低温性的变异

从表1可知,亲本和RIL家系的变幅和变异系数较大;从偏度和峰值看,绝对值均在0.5附近,表现出正态分布;在2个环境中最大值都超过了高值亲本,最小值低于低值亲本,表明这性状同时具有正向和负向超亲优势,适合进行QTL的定位分析。

表1 亲本以及后代群体性状变异

年份	亲本		变异幅度	平均值±标准差	RIL群体		
	P <sub>1</sub> 徐花13(%)	P <sub>2</sub> 中花6(%)			变异系数	峰度	偏度
2014	37.50	76.30	0~100	35.2±25.3	71.90	-0.30	0.54
2015	35.00	79.25	0~100	34.6±25.2	72.80	-0.17	0.61

从图1可以看到,2个环境相对发芽率频次曲线呈连续分布,基本符合正态分布,表明花生耐

低温性状为多基因控制的数量性状,适合进行QTL的定位分析。

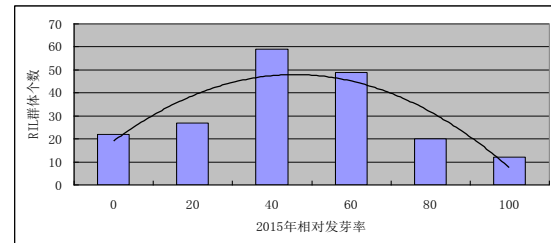
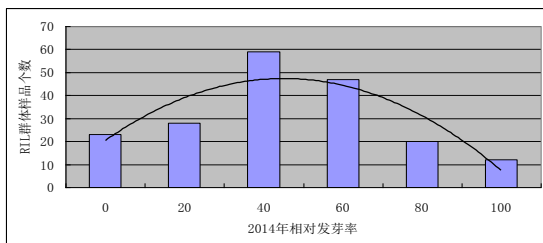


图1 2014(F<sub>5</sub>)和2015(F<sub>5:6</sub>) RIL群体相对发芽率频次分布图

### 2.2 构建遗传连锁图谱

利用3120对SSR引物(其中1650对引物为本实验室自主开发)对亲本徐花13和中花6号进行多态性筛选,获得365对多态性较好、条带清晰的SSR引物,并对RIL群体基因型鉴定。在RIL群体中能重复检测到清晰条带的引物323对(204对本实验室自主开发的),其中321对引物检测到1个位点,2对引物检测到2个位点,323对引物共产生325个位点,均为共显性标记。经卡平方( $\chi^2$ )测验( $P < 0.05$ ),在325个标记中,偏离孟德尔分离规律的标记有142个,占43.7%。这142个偏离标记中有72个偏向母本徐花13的基因型,70个偏向父本中花6号的基因型。

利用JoinMap3.0软件对上述多态性分子标记进行遗传连锁分析,在2.0~20.0的LOD值范围内构建遗传图谱,得到包含20个连锁群、325个标记

位点的遗传图谱(图2)。连锁群总长度1493.79 cM,标记间平均距离4.60 cM,连锁群长度范围11.57~208.19 cM,标记个数介于6~40之间。最长连锁群是LG3(208.19 cM),同时也是标记最多的连锁群,标记个数为40个,连锁群长度最小的是LG20,标记个数为6个,标记间平均距离1.93 cM。标记个数最少的连锁群是LG8连锁群,标记个数为5个,标记间平均距离为2.92 cM。将本连锁图与Shirasawa<sup>[21]</sup>整合图谱比较,发现两个连锁图具有较好的一致性。本连锁图中构建的20个连锁群有17个连锁群与Shirasawa整合图谱的16个连锁群对应,其中存在2个连锁群对应Shirasawa某一连锁群,有三个连锁群没有锚标记LG5、LG19、LG20,未整合到Shirasawa的图谱上(见表2)。

表2 标记在连锁群上的分布

连锁群	长度(cM)	平均(cM)	标记数	对应整合图谱连锁群	锚标记数	新增标记
LG1	104.83	3.49	30	B10	8	22
LG2	148.92	5.52	27	B05	11	16
LG3	208.19	5.20	40	A07	14	26
LG4	81.39	6.26	13	B01	5	8
LG5	43.67	6.24	7			
LG6	116.89	5.08	23	B03	6	17
LG7	92.62	3.86	24	A10	5	19
LG8	14.6	2.92	5	B07	3	2
LG9	86.4	3.60	24	A04	8	16
LG10	44.24	6.32	7	A03	2	5
LG11	109.76	4.77	23	B02	13	10
LG12	49.27	2.59	19	A01	10	9
LG13	71.12	4.18	17	A02	5	12
LG14	58.71	7.34	8	A08	2	6
LG15	52.12	4.01	13	A09	4	9
LG16	34.37	4.91	7	A08	2	5
LG17	43.94	4.88	9	B08	2	7
LG18	82.95	5.18	16	A05	6	10
LG19	38.23	5.46	7			
LG20	11.57	1.93	6			

### 2.3 花生吸水膨胀期耐低温性状QTL定位

结合 RIL 群体  $F_5$ 、 $F_{5,6}$  代的表型数据,利用 QTL IciMapping 软件采用完备区间作图法,共检测出 10 个 QTL,其中在 2014 年环境中检测到 9 个 QTL,分别定位在 6 条连锁群上,其连锁群分别为 A1、A3、A4、A6、A7、A11;贡献率 5.41% ~ 38.83%, LOD 值 3.18 ~ 19.38,其中 5 个 QTL 的加性效应值为负值,来自于母本徐花 13;4 个 QTL 的加性效应值为正值,来自于父本中花 6,其中贡献率大于 10% 的 QTL 有 5 个,为 qLTTLG1-1、qLTTLG1-2、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1、qLTTLG7-2,贡献率分别为 13.96%、19.33%、38.83%、10.86%、11.56%, LOD 值分别为 7.46、9.32、19.38、5.96、5.25,加性效应值为负值的是 qLTTLG1-1、qLTTLG7-2,加性效应值为正值的是 qLTTLG1-2、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1。qLTTLG1-1 在引物 AHGS1564 与 AHGS1596 之间,两个引物间的距离为 1.17 cM,标记的位置为 42.00, qLTTLG6-1 的 LOD 值达到 19.38,贡献率为 38.83%,加性效应值为 15.75,定位在 2C11 和 AGGS1038 之间,位置 17.00 cM,更加靠近标记 2C11。

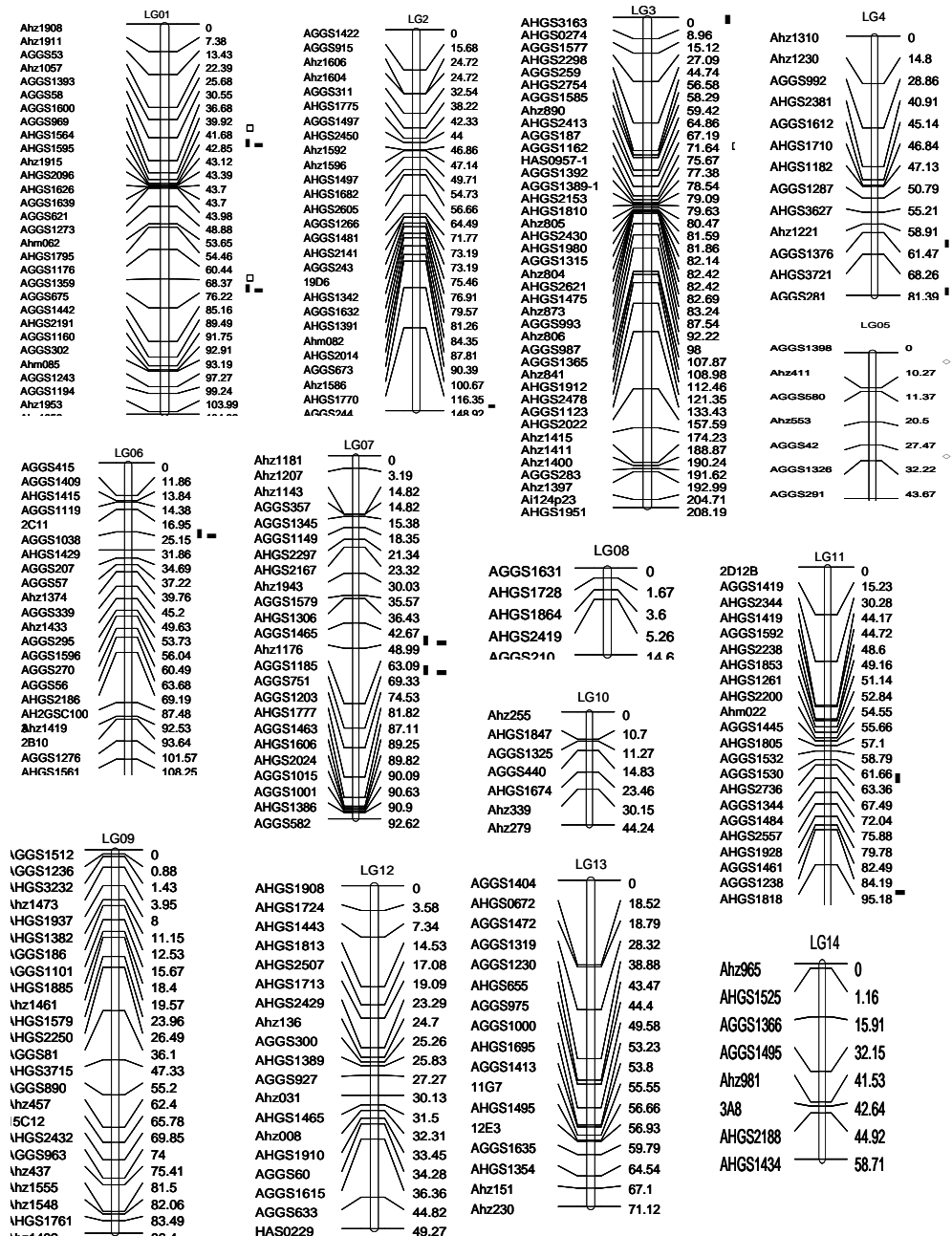
在 RIL 群体 2015 年环境中检测到 8 个 QTL,贡献率 6.33% ~ 45.85%, LOD 值 3.41 ~ 20.11 之间,

分别定位在 6 条连锁群上,其连锁群分别为 A1、A2、A3、A6、A7、A11,其中第 A1、A7 连锁群上有两个 QTL,分别为 qLTTLG1-1、qLTTLG1-2、qLTTLG7-1、qLTTLG7-2;贡献率 6.33% ~ 45.85%, LOD 值 3.41 ~ 20.11,其中 4 个 QTL 的加性效应值为负值,4 个 QTL 的加性效应值为正值;贡献率大于 10% 的 QTL 有 qLTTLG1-1、qLTTLG1-2、qLTTLG2-1、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1, LOD 值分别为 7.96、8.76、3.5、20.11、5.98,其中主效 QTL 中加性效应值为负值的是 qLTTLG1-1、qLTTLG2-1,加性效应值为正值的是 qLTTLG2-1、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1, qLTTLG6-1 的 LOD 值达到 20.11,贡献率为 45.85%,加性效应值为 17.09,仍定位在 2C11 和 AGGS1038 之间。

利用 QTL IciMapping3.0 对花生耐低温性状进行 QTL 检测, qLTTLG1-1、qLTTLG6-1、qLTTLG3-1、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1、qLTTLG7-2、qLTTLG11-1 在两年同时被检测到,贡献率大于 10% 的 QTL 被两年同时检测到地有 qLTTLG1-1、qLTTLG1-2、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1,其中 qLTTLG6-1 在两个环境的检测中贡献率最大,分别为 38.83%、45.85%(见表 3)。

表3 QTL 分析结果

QTL	连锁群	2014年(F <sub>5</sub> )						2015年(F <sub>5,6</sub> )					
		位置	左标记	右标记	LOD	贡献率 R <sup>2</sup> (%)	加性效应	位置	左标记	右标记	LOD	贡献率 R <sup>2</sup> (%)	加性效应
qLTTLG1-1	1	42	AHGS1564	AHGS1595	7.46	13.96	-9.43	42	AHGS1564	AHGS1595	7.96	16.26	-10.16
qLTTLG1-2	1	70	AGGS1359	AGGS675	9.32	19.33	11.18	70	AGGS1359	AGGS675	8.76	19.37	11.19
qLTTLG2-1	2							126	AHGS1770	AGGS244	3.5	13.71	-9.31
qLTTLG3-1	3	3	AHGS3163	AHGS0274	3.7	7.11	-6.74	1	AHGS3163	AHGS0274	3.41	6.33	-6.35
qLTTLG4-1	4	59	Ahz1221	AGGS1376	3.5	5.69	6.01						
qLTTLG4-2	4	69	AHGS3721	AGGS281	3.48	6.11	-6.23						
qLTTLG6-1	6	17	2C11	AGGS1038	19.38	38.83	15.75	18	2C11	AGGS1038	20.11	45.85	17.09
qLTTLG7-1	7	42	AHGS1306	AGGS1465	5.96	10.86	8.3	42	AHGS1306	AGGS1465	5.98	11.59	8.57
qLTTLG7-2	7	55	Ahz1176	AGGS1185	5.25	11.56	-8.56	56	Ahz1176	AGGS1185	3.65	8.81	-7.47
qLTTLG11-1	11	62	AGGS1530	AHGS2736	3.18	5.41	5.86	89	AGGS1238	AHGS1818	3.6	9.3	7.67



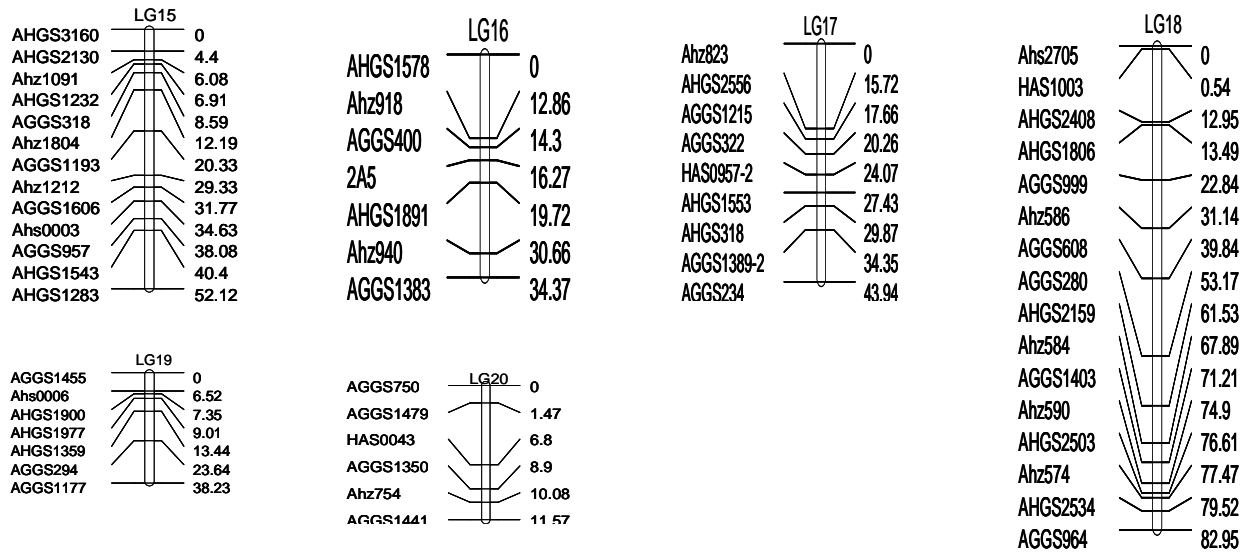


图2 花生遗传连锁图谱

利用F<sub>5</sub>数据使用 QTL Ici Mapping 3.0 检测到的 QTL; F<sub>6</sub>年利用 QTL Ici Mapping 3.0 检测到的 QTL

### 3 讨论

耐低温表型鉴定是 QTL 鉴定的重要数据, 决定 QTL 定位准确程度。现有的鉴定方法有王晶珊<sup>[7]</sup>的鉴定播种到出苗的积温在花生吸水膨胀期的表型; 封海胜<sup>[8]</sup>的鉴定通过低温浸种后的胚芽长度; 在随后的花生耐低温抗性机制研究中王

秀贞等<sup>[3]</sup>、唐月异<sup>[9-10]</sup>也采用利用了封海胜法。但以上两种方法在 RIL 群体表型鉴定中使用并不便。因此借鉴大豆<sup>[11-13]</sup>、水稻<sup>[14-17]</sup>相关耐低温试验中耐低温表型鉴定方法, 和刘海龙等<sup>[18]</sup>花生吸水膨胀期耐低温表型鉴定方法, 用相对发芽率指标作为花生吸水膨胀耐低温性指标。

用此方法鉴定 187 个 RIL 家系, 在 2014 年环

表4 2014年(F<sub>5</sub>)代 RIL 群体表型鉴定结果

代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR	代号	RGR
QT1729	10.00	QT1749	0.00	QT1769	56.25	QT1789	33.33	QT1809	12.50	QT1829	20.00	QT1849	55.00	QT1869	55.00	QT1889	11.11	QT1909	0.00
QT1730	30.00	QT1750	60.00	QT1770	90.00	QT1790	0.00	QT1810	70.00	QT1830	55.00	QT1850	55.00	QT1870	33.75	QT1890	30.00	QT1910	20.00
QT1731	11.11	QT1751	64.29	QT1771	18.18	QT1791	20.00	QT1811	34.29	QT1831	60.00	QT1851	100.00	QT1871	20.00	QT1891	0.00	QT1911	0.00
QT1732	51.43	QT1752	40.00	QT1772	40.00	QT1792	33.33	QT1812	0.00	QT1832	40.00	QT1852	51.43	QT1872	33.75	QT1892	50.00	QT1912	10.00
QT1733	50.00	QT1753	62.50	QT1773	55.00	QT1793	28.13	QT1813	10.00	QT1833	30.00	QT1853	77.78	QT1873	50.00	QT1893	40.00	QT1913	0.00
QT1734	42.19	QT1754	0.00	QT1774	60.00	QT1794	30.00	QT1814	22.22	QT1834	87.50	QT1854	55.00	QT1874	60.00	QT1894	30.00	QT1914	25.00
QT1735	20.00	QT1755	11.11	QT1775	22.50	QT1795	37.50	QT1815	0.00	QT1835	11.11	QT1855	22.22	QT1875	34.29	QT1895	12.50	QT1915	60.00
QT1736	14.29	QT1756	10.00	QT1776	60.00	QT1796	0.00	QT1816	10.00	QT1836	90.00	QT1856	90.00	QT1876	20.00	QT1896	55.00	徐花 13	37.50
QT1737	100.00	QT1757	66.67	QT1777	20.00	QT1797	55.00	QT1817	0.00	QT1837	40.00	QT1857	88.89	QT1877	0.00	QT1897	0.00	中花 6	76.30
QT1738	70.00	QT1758	56.25	QT1778	20.00	QT1798	42.86	QT1818	0.00	QT1838	100.00	QT1858	64.29	QT1878	55.00	QT1898	22.22		
QT1739	30.00	QT1759	28.13	QT1779	20.00	QT1799	30.00	QT1819	55.00	QT1839	20.00	QT1859	90.00	QT1879	20.00	QT1899	0.00		
QT1740	60.00	QT1760	33.75	QT1780	33.33	QT1800	40.00	QT1820	0.00	QT1840	75.00	QT1860	40.00	QT1880	11.11	QT1900	0.00		
QT1741	68.57	QT1761	12.50	QT1781	50.00	QT1801	33.33	QT1821	55.00	QT1841	20.00	QT1861	56.25	QT1881	20.00	QT1901	11.11		
QT1742	10.00	QT1762	30.00	QT1782	70.00	QT1802	0.00	QT1822	55.00	QT1842	40.00	QT1862	100.00	QT1882	0.00	QT1902	0.00		
QT1743	0.00	QT1763	30.00	QT1783	22.50	QT1803	20.00	QT1823	22.22	QT1843	40.00	QT1863	10.00	QT1883	50.79	QT1903	0.00		
QT1744	30.00	QT1764	22.22	QT1784	30.00	QT1804	22.22	QT1824	22.22	QT1844	48.21	QT1864	55.00	QT1884	11.25	QT1904	20.00		
QT1745	60.00	QT1765	30.00	QT1785	20.00	QT1805	25.00	QT1825	55.00	QT1845	55.00	QT1865	60.00	QT1885	0.00	QT1905	62.50		
QT1746	11.11	QT1766	55.00	QT1786	55.00	QT1806	33.33	QT1826	55.00	QT1846	20.00	QT1866	10.00	QT1886	12.50	QT1906	14.06		
QT1747	15.00	QT1767	40.00	QT1787	37.50	QT1807	20.00	QT1827	0.00	QT1847	80.00	QT1867	50.00	QT1887	55.00	QT1907	18.75		
QT1748	50.00	QT1768	11.11	QT1788	44.44	QT1808	25.71	QT1828	55.00	QT1848	88.89	QT1868	55.00	QT1888	33.33	QT1908	22.22		

境中,鉴定结果中 QT1737、QT1838、QT1851、QT1862 4 个家系相对发芽率为 100%;QT1770、QT1836、QT1848、QT1856、QT1857、QT1859 6 个家系相对发芽率大于 85%;这 10 个家系可以作为花生吸水膨胀期耐低温资源,为花生耐低温新品种培育创制基础。本研究利用花生吸水膨胀期耐低温性是多基因控制的数量性状,通过 2 个品种间的杂交,通过 RIL 群体的构建,获得了耐低温性高于高值亲本的材料(见表 4)。

本研究选用的 2 个亲本材料均是育种中的优良品种,在群体构建过程中,每一个 F<sub>2</sub> 发育来的家系都完整保留,没有丢失。该群体的双亲在耐低温性状方面的差异显著,徐花 3 号的耐低温性状的表型值大于中花 6 号,通过表型性状的统计分析,本研究所用的 RIL 群体在耐低温性状方面的变异符合正态分布(图 1),最大值和最小值均超过了双亲间的差异,为遗传图谱构建奠定了基础。花生遗传图谱的构建取得了很大的进展,郭建斌<sup>[19]</sup>在关于花生含油量和脂肪酸组成 QTL 研究中构建了 20 个连锁群 807 个 SSR 标记位点的遗传连锁图,长度为 1 639.78 cM,标记间平均距离变异范围为 0.79 cM ~ 4.90 cM,进一步完善了高油酸育种的理论基础,为分子检测提供了依据;Qin 等<sup>[20]</sup>构建了一张包含 324 个 SSR 标记、总长度 1 352.1 cM 的栽培种花生遗传图谱,为花生全基因组测序组装的可靠参考图。本研究构建了一张包含 325 个标记,20 个连锁群,总长度 1 493.79 cM,标记间平均距离 4.60 cM 的栽培种花生遗传图谱,与 Shirasawa 等<sup>[21]</sup>整合的遗传连锁图比较,发现本研究构建的 20 个连锁群中的 17 个连锁群与 Shirasawa 整合图谱的 16 个连锁群对应(表 2),其中存在 2 个连锁群对应一个 Shirasawa 整合图谱的某一个连锁群的现象。暂时无法与 Shirasawa 整合的连锁图进行匹配的标记有待进一步验证。

由于花生耐低温性状的复杂性,不能够在早代进行选择,也是传统育种选择效率较低的原因之一。随着分子标记技术和生物信息学的发展,通过定位相关性状的 QTL 为提高花生耐低温性状的改良提供了技术支撑,将有利于在花生耐低温育种中取得较大突破。本研究在两个环境中,共同被检测到的贡献率大于 10% 的主效 QTL 有 4 个,分别为 qLTTLG1-1、qLTTLG1-2、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1;其中 qLTTLG1-1 F<sub>5</sub> 代贡献率为 13.96%,加性效应值 -9.43, F<sub>5.6</sub> 代贡献率为 16.26%,加性效应值 -10.16, qLTTLG1-2 F<sub>5</sub> 代贡献

率为 19.33%,加性效应值 11.18, F<sub>5.6</sub> 代贡献率为 19.37%,加性效应值 11.19, qLTTLG6-1 F<sub>5</sub> 代贡献率为 38.83%,加性效应值 15.75, F<sub>5.6</sub> 代贡献率为 45.85%,加性效应值 17.09, qLTTLG7-1 F<sub>5</sub> 代贡献率为 10.86%,加性效应值 8.3, F<sub>5.6</sub> 代贡献率为 11.59%,加性效应值 8.57,这 4 个 QTL 可以在花生吸水膨胀期耐低温分子标记辅助选择中应用。从而完善了有关花生吸水膨胀期耐低温 QTL 鉴定方面的研究空白。

## 4 结 论

本研究构建了一张含 325 个标记的连锁图,连锁图长总长度 1 493.79 cM,标记间平均距离为 4.60 cM;采用 QTL IciMapping3.0 软件完备区间作图法进行 QTL 定位和效应估计,共检测出 10 个与耐低温相关的 QTL;两个环境共同检测到 4 个主效 QTL: qLTTLG1-1、qLTTLG1-2、qLTTLG6-1、qLTTLG7-1,可以用于耐低温标记辅助育种。鉴定出的 10 个耐低温家系可以为耐低温育种提供材料基础。

### 参考文献:

- [1] 凤 桐,高华援,赵叶明,等.吉林省花生生产现状与发展优势[J].吉林农业科学,2010,35(1):23-25,27.
- [2] 孙晓苹,陈小姝,吕永超,等.吉林省花生系谱分析[J].东北农业科学,2017,42(6):23-27.
- [3] 王秀贞,唐月昇,吴 琪,等.花生种子芽期耐低温相关基因克隆[J].核农学报,2013,27(2):152-157.
- [4] 李振动,李新平,黄 莉,等.栽培种花生荚果大小相关性状 QTL 定位[J].作物学报,2015,41(9):1313-1323.
- [5] 成良强,唐 梅,任小平,等.栽培种花生遗传图谱的构建及主茎高和总分枝数 QTL 分析[J].作物学报,2015,41(6):979-987.
- [6] 张新友.栽培花生产量品质和抗病性的遗传分析与 QTL 定位研究[D].杭州:浙江大学,2010.
- [7] 王晶珊,封海胜,案文玻.低温对花生出苗的影响及耐低温种质的筛选[J].中国油料,1985(3):27-32.
- [8] 封海胜.花生种子吸胀期间耐低温性鉴定[J].中国油料,1991(1):67-70.
- [9] 唐月昇.花生耐低温种质筛选及相关差异表达基因鉴定[D].青岛:中国海洋大学,2011.
- [10] 唐月昇,王传堂,高华援,等.花生种子吸胀期间耐低温性及其与品质性状的相关研究[J].核农学报,2011,25(3):436-442.
- [11] 蒋洪蔚,李灿东,刘春燕,等.大豆导入系群体芽期耐低温位点的基因型分析及 QTL 定位[J].作物学报,2009,35(7):1268-1273.
- [12] 胡国玉,赵晋铭,周 斌,等.大豆耐低温出苗的遗传分析与分子标记[J].大豆科学,2008,27(6):905-910.

(下转第 47 页)

12.87%。

自交系 I18 与处理 1、处理 2、处理 3 共检测到 1 401 个共表达基因,上调基因 926 个,下调基因 429 个。从韦恩图可以看出,玉米接种大斑病后的基因共表达以上调为主,呈现被诱导激活的趋势,小部分基因表达受到抑制。随着大斑病侵染时间的增加,差异表达基因数目增多。上调的基因数目呈现先增加后降低的趋势,可能是由于接种时间较长,部分基因呈现被抑制的状态。下调的基因数目呈现升高的趋势,可能是基因被抑制的数目逐渐增多的原因。

通过使用 BLAST 软件,对 8 大数据库进行序列比对,对共表达基因进行注释,共筛选出 6 个基因 ID,发掘 1 个下调的新基因,5 个上调基因。可以看出,大斑病菌侵染玉米,植物基因表达以上调为主,可见人工接种大斑病菌后基因表达呈现被诱导激活的趋势。

大斑病菌侵染后,自交系 I18 生物体发生复杂的生物学、细胞组分、分子功能等过程。对大斑病接种差异表达基因进行功能注释,本试验检索检测到 33 370 个基因,经 GO 基因库分类得到 32 048 个注释基因,注释率达到 96%。不同基因参与不同生物学过程,本研究初步探讨了大斑病侵染转录组机理。但未进行 RNA 差异表达量分析验证,后续试验将继续开展。大斑病的研究多是以产量为核心,结合分子标记展开,SNP 分子标记广泛应用到大斑病基因挖掘及检测中<sup>[11-12]</sup>。但玉米大斑病基因遗传转化方面报导较少<sup>[13-14]</sup>,因此,玉米抗大斑病基因表达验证和遗传转化方面研究有待进一步开展。

## 参考文献:

- [ 1 ] 王慧慧,张文忠,芦 明,等.玉米大斑病的研究进展[J].天津农业科学,2016,22(12):133-136.
- [ 2 ] 肖明纲,宋风景,孙 兵,等.玉米大斑病广谱抗性外引自交系的发掘与抗病基因初步鉴定[J].作物学报,2018,44(4):614-619.
- [ 3 ] 马 骏,刘欣芳,齐 欣,等.基于 SALF-seq 的玉米抗大斑病基因 QTL 分析[J].辽宁农业科学,2018(2):8-13.
- [ 4 ] 马 骏,朱迎春,王延波,等.玉米大斑病抗性基因研究进展[J].辽宁农业科学,2014(3):66-69.
- [ 5 ] 郑 飞,崔亚坤,王 森,等.玉米大斑病抗性育种研究进展与展望[J].安徽农业科学,2018,46(4):15-18.
- [ 6 ] 鄂 洋,林 凤.分子标记技术在玉米大斑病抗性基因研究中的应用[J].玉米科学,2009,17(3):64-67.
- [ 7 ] Florea L, Song L, Salzberg S L. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues[J]. F1000 Research, 2013, 2:188.
- [ 8 ] Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. Bioinformatics, 2010, 26: 136-138.
- [ 9 ] Altschul S F, Madden T L, Zhang J, et al. Gapped BLAST and PSI BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [ 10 ] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [ 11 ] 孙丽萍,张思奇,赵同雪,等.2016 年黑龙江省玉米大斑病调查与分析[J].东北农业科学,2017,42(4):36-38.
- [ 12 ] 李 红,晋齐鸣,孟灵敏,等.东北春玉米区主推玉米品种抗玉米叶斑病鉴定与评价[J].吉林农业科学,2012,37(6):39-41.
- [ 13 ] 田秀艳,陈 鑫,王振东.分子标记技术在玉米大斑病抗性基因研究中的应用[J].现代农业科学,2008(11):18-20.
- [ 14 ] 王庆华,杨继良,尹小燕,等.玉米大斑病抗性基因的 DNA 分子标记研究进展[J].玉米科学,2002(2):93-96.
- [ 15 ] 邱鹏程,张闻博,蒋洪蔚,等.大豆芽期耐盐和耐低温位点的遗传重叠[J].中国农业科学,2011,44(10):1980-1988.
- [ 16 ] 曾乃燕,何军贤,赵 文,等.低温胁迫期间水稻光合膜色素与蛋白水平的变化[J].西北植物学报,2000,20(1):8-14.
- [ 17 ] 赵明辉,张文忠,马殿荣,等.水稻耐冷基因研究进展[J].沈阳农业大学学报,2012-12,43(6):711-718.
- [ 18 ] 纪素兰,江 玲,王益华,等.利用回交重组自交群体检测水稻耐低温发芽数量性状基因座[J].南京农业大学学报,2007,30(1):1-6.
- [ 19 ] 刘海龙,陈小妹,杨富军,等.花生种质资源耐低温表型鉴定研究[J].花生学报,2017(3):20-25.
- [ 17 ] 赵秀琴,张 婷,王文生,等.水稻低温胁迫不同时间的代谢物谱图分析[J].作物学报,2013,39(4):720-726.
- [ 19 ] 郭彦斌.花生含油量及脂肪酸组成的 QTL 分析[D].武汉:华中农业大学,2016.
- [ 20 ] Qin H D, Feng S P, Chen C, et al. An integrated genetic linkage map of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) constructed from two RIL populations[J]. Theor Appl Genet, 2012, 124: 653-664.
- [ 21 ] Shirasawa K, Bertoli D J, Varshney R K, et al. Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes[J]. DNA Res, 2013, 20: 173-184.

(上接第 11 页)