

文章编号: 1000-5692(2000)04-0350-05

杉木生长性状相关联遗传标记的检测

何祯祥¹, 施季森¹, 尹增芳¹, 陈孝丑², 余荣卓²

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 福建省林业厅 洋口国有林场, 福建 顺昌 353211)

摘要: 采用 ANOVA 方法对杉木 (*Cunninghamia lanceolata*) 树高、胸径和材积等生长性状相关联的 RAPD 分子标记进行了检测。单标记分析检测到与树高生长相关联的分子标记有 3 个, 胸径有 5 个, 材积有 2 个, 其累积贡献率分别为 15.8%, 24.36% 和 10.63%; 双标记分析共检测出 286 对标记组合 (其中树高有 96 对, 胸径有 94 对, 材积有 96 对), 与杉木生长性状紧密关联。与杉木生长性状相关的标记互作效应十分显著。表 4 参 7

关键词: 杉木; 生长性状; 遗传标记; 数量性状基因位点 (QTL); 方差分析

中图分类号: S722.3 **文献标识码:** A

林木上许多重要的经济性状如生长和材性等均表现为离散性分布, 经典数量遗传学家称之为数量性状, 且认为数量性状是受多个微效等基因控制, 常通过统计学的方法来研究这些数量性状的遗传变异规律。这样就控制数量性状的多个基因当作一个整体来考虑, 无法鉴别出单位个控制数量性状的基因及它们之间的关系, 更无法确定控制数量性状的基因在染色体上的位置。而林木遗传育种学家长期以来一直努力想解决控制数量性状的基因定位及其效应估计^[1]。在过去的几十年中, 人们也曾采用过形态标记、细胞学标记和同功酶学生化标记来试图对控制数量性状的基因进行检测, 但均因标记数量有限等原因, 使得这一研究领域进展极为缓慢。80 年代新型遗传标记——分子标记的出现, 极大地推动了对控制数量性状基因的研究。不少学者在发展数量性状基因定位理论的同时, 广泛应用到实践中去, 短短的几年内在杨树 (*Populus*)、桉树 (*Eucalyptus*) 和火炬松 (*Pinus taeda*) 等树种中, 均进行了重要经济性状的基因定位^[2~4]。本项研究利用杉木 (*Cunninghamia lanceolata*) J₀ 与 F₁₁ 2 个亲本杂交形成的 F₁ 群体, 采用 ANOVA 方法对生长性状 (树高、胸径和材积) 与 RAPD 分子标记进行相关联检测, 为进一步开展杉木的分子育种提供依据和参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1984 年我们选择了早期收集的杉木特殊类型遗传材料中 2 个 20 年生以上具有特殊性状表型的无性系 J₀ 和 F₁₁, 并以它们作为亲本杂交产生了大量的 F₁ 代。1985 年在福建省洋口林场育苗, 并于 1986 年春建立了测定林。

收稿日期: 2000-03-21; 修回日期: 2000-05-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3963230); “九五” 国家科技攻关项目 (95-011-03-17-03)

作者简介: 何祯祥 (1964—), 男, 安徽桐城人, 博士, 从事林木遗传、分子育种、计算机与网络应用研究。E-mail: zxhe 2000 @ yahoo. com

1.2 方法

1.2.1 生长性状观测 1998 年春我们对上述杂交组合的 F₁ 群体的生长性状 (树高和胸径) 进行了全面调查观测。

1.2.2 RAPD 分析和 RAPD 图谱的构建 从 F₁ 群体上随机抽取 78 个样本进行 RAPD 分析并构建 RAPD 遗传连锁图谱 (此部分内容已另文发表)。

1.2.3 与生长性状相关联 RAPD 标记检测^[5-7] A. 单因子 ANOVA 检测方法。单因子 ANOVA 检测法的统计模型为:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + e_{ij}$$

其中: Y_{ij} 为第 i 类标记类型第 j 个样本的性状值; μ 为群体性状均值; M_i 为第 i 类标记位点效应; e_{ij} 为随机误差。检测分析见表 1。

B. 双因子 ANOVA 检测方法。双因子 ANOVA 检测法的统计模型为:

$$Y_{ijk} = \mu + M_{Ai} + M_{Bj} + M_{Ai} \times M_{Bj} + e_{ijk}$$

其中: Y_{ijk} 为标记 A 第 i 类型标记 B 第 j 类型第 k 个样本性状值; μ 为群体性状均值; M_{Ai} 为标记 A 第 i 类型效应; M_{Bj} 为标记 B 第 j 类型效应; M_{Ai} × M_{Bj} 为标记 A 和标记 B 的交互效应; e_{ijk} 为随机误差。检测分析见表 2。

1.2.4 统计分析 单因子 ANOVA 分析和双因子 ANOVA 分析使用 SAS (6.12 版) 计算。

表 1 单因子 ANOVA 检测分析表

Table 1 The table of single factor ANOVA analysis

变异来源	df	SS	MS	EMS
标记类型间	1	SS _i	MS _i	σ _e ² + σ _i ²
误差	76	SS _e	MS _e	σ _e ²
总和	77	SS _T		

$$\text{贡献率}(P) = SS_i / SS_T \times 100\%$$

表 2 双因子 ANOVA 检测分析表

Table 2 The table of double factor ANOVA analysis

变异来源	df	SS	MS	EMS
M _A	1	SS _A	MS _A	σ _e ² + σ _{AB} ² + kb ² σ _A
M _B	1	SS _B	MS _B	σ _e ² + kσ _{AB} ² + ka ² σ _B
M _A × M _B	1	SS _{AB}	MS _{AB}	σ _e ² + kσ _{AB} ²
误差	74	SS _e	MS _e	σ _e ²
总和	77	SS _T		

$$\text{贡献率}(P) = SS_{AB} / SS_T \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 性状表型变异

参试 F₁ 群体的 78 个样本在生长性状上差异比较, 树高平均值为 7.81 m; 胸径平均值为 10.21 cm; 材积平均值为 41.63 dm³。树高、胸径和材积 3 个生长性状的变异系数分别为 18.8%, 25.7% 和 56.6%。

2.2 单因子 ANOVA 法检测生长性状相关联的 D

应用单因子 ANOVA 方法检测了 F₁ 群体中 78 个样本生长性状与 RAPD 分子标记的相关性, 结果列在表 3 中。从表 3 中不难看出, 与树高生长相关联的标记有 E11-1200, AM10-500 和 C13-2000, 累积贡献率达 15.8%; 与胸径生长相关联的标记有 5 个呈显著关联, 它们是 AZ03-400, E11-550,

表 3 单因子 ANOVA 检测 F₁ 群体与生长性状相关联的 RAPD 标记结果

Table 3 The result of RAPD markers which associated with growth traits using single factor ANOVA

性状	标记	SS _i	SS _T	F 值	贡献率 P / %
树高	E11-1200	9.90	157.36	4.70 *	6.29
	AM10-500	11.22	164.36	5.20 *	6.83
	C13-2000	0.88	151.41	4.30 *	5.87
胸径	AZ03-400	28.01	406.77	4.07 *	6.89
	E11-550	6.78	505.06	5.50 *	7.28
	007-650	26.75	479.93	3.90 *	5.57
	AK17-550	29.24	522.90	4.15 *	5.59
	C13-600	27.01	492.07	4.01 *	5.49
材积	E11-550	3 529.09	40 692.29	6.65 **	8.67
	S18-750	2 225.08	41 936.79	3.98 *	5.31

说明: * 为 0.05 水平显著; ** 为 0.01 水平显著

007-650, AK17-550 和 C13-600, 累积贡献率达 24.36%; 与材积生长呈显著关联的有 2 个, E11-550 和 S18-750, 累积贡献率为 10.63%。

值得注意的是 E11-550 标记既和胸径生长相关联, 又和材积生长相关联。

在这些与生长性状相关联的 RAPD 标记中, 只有 C13-2000 位于 P₁ 亲本连锁图中的第 6 连锁群上。

2.3 双因子 ANOVA 法检测生长性状相关联的 RAPD 标记

应用双因子 ANOVA 法对 129 个标记进行了任意 2 个标记与生长性状的相关联分析, 共检测出 286 对标记组合与生长性状紧密关联 (呈 0.01 水平显著)。其中树高有 96 对, 胸径 94 对, 材积 96 对 (限于篇幅, 仅列出贡献率超过 15% 的标记组合)。详见表 4。

表 4 双因子 ANOVA 法检测生长性状相关联的分子标记 (贡献率 > 15%)

Table 4 The result of RAPD markers which associated with growth traits using two factor ANOVA

性状	标记组合	SS _{AB}	SS _T	F 值	贡献率 P/%
树高	12×1120	23.97	157.05	11.83**	15.26
	112×144	23.84	143.09	11.80**	16.66
	116×149	23.47	120.28	12.02**	19.51
	118×133	23.65	127.09	10.94**	18.61
	118×182	14.88	89.57	8.13**	16.61
	141×149	22.70	139.15	7.26**	16.31
	153×190	27.19	143.15	13.92**	18.99
	153×190	27.19	143.15	13.92**	18.99
	154×1113	27.58	154.48	14.57**	17.85
	12×1120	84.10	500.99	13.39**	16.79
	114×129	56.81	355.79	9.42**	15.97
	114×184	69.45	311.07	12.97**	22.33
	115×132	77.68	362.52	11.75**	21.43
	115×151	64.42	380.93	10.18**	16.91
胸径	116×149	60.73	379.62	9.91**	16.00
	116×151	62.01	380.93	10.14**	16.28
	117×1111	63.53	371.50	9.52**	17.10
	118×133	62.92	375.60	9.52**	16.75
	118×182	56.03	245.14	11.83**	22.86
	118×184	48.26	279.01	8.87**	17.30
	118×185	48.26	279.01	8.87**	17.30
	122×184	53.57	351.90	9.15**	15.22
	126×1111	72.54	474.00	12.19**	15.30
	140×187	68.19	432.80	11.23**	15.76
	140×190	85.70	412.44	14.11**	20.78
	143×191	55.83	363.78	9.73**	15.35
	161×178	83.06	515.98	12.68**	16.10
	162×198	71.19	464.18	7.45**	15.34
材积	172×196	95.23	522.51	16.02**	18.23
	179×183	61.41	396.17	10.99**	15.50
	114×129	3867.55	24961.17	8.89**	15.49
	114×163	3495.50	25646.47	7.54**	13.63
	114×184	4218.89	21942.14	10.50**	19.23
	115×132	5745.72	26921.81	11.67**	21.34
	115×151	4628.15	29054.39	9.48**	15.93
	115×1123	3912.42	26057.11	8.04**	15.01
	116×149	4483.28	28725.81	9.38**	15.61
	116×151	4480.84	29045.39	9.50**	15.43
	117×1111	5401.95	28109.87	12.01**	19.22
	118×133	6285.38	30342.08	12.39**	20.72
	118×184	3521.02	18424.67	9.82**	19.11

续表 4

性 状	标记组合	SS_{AB}	SS_T	F 值	贡献率 $P/\%$
	118×185	3 521.02	18 424.67	9.42 **	19.11
	119×185	3 680.58	22 124.30	9.73 **	16.64
	140×190	6 152.03	33 428.04	12.12 **	18.40
	149×170	5 611.40	30 579.06	13.30 **	18.35
	154×1 113	6 151.27	38 291.98	12.93 **	16.06
	161×178	7 673.08	41 580.10	15.07 **	18.45
	162×198	6 622.76	39 518.57	13.76 **	16.86
	172×196	6 774.13	41 978.48	13.97 **	16.14

说明: ** 为 0.01 水平显著

我们还发现, 在单因子分析中单个标记显著, 但在双因子分析时却呈极显著现象: 树高有 L18, L65, L80, L98 和 L103; 胸径有 L48, L51, L68, L84, L111 和 L126; 材积有 L18, L48, L51, L103 和 L113。

3 讨论

在过去很长一段时间内, 人们无法对数量性状作出较为精确的遗传解释。分子标记的出现才使我们对控制植物数量性状有了进一步的认识。众多的有关林木数量性状的研究结果均表明数量性状并非像传统数量遗传学解释的那样有多个等效基因所控制。数量性状是由多个基因控制但不是等效的, 有的研究揭示了一些数量性状是由若干个寡基因控制。美国华盛顿大学的杨树研究小组检测出了 1~5 个 QTL 与树高、胸径、材积和插条生根特性相关。本项研究的结果也表明杉木的树高、胸径和材积等生长性状可能也是受多个基因控制, 但没有发现主效基因。这可能和作图双亲在树高、胸径和材积生长性状上差异不大, 在子代中没有发生主效基因的分离造成的。树高、胸径和材积相关的分子标记累积贡献率分别为 15.8%, 24.36% 和 10.36%。Grattapaglia 等在桉树中检测到 5 个与木材密度相关的 QTLs, 累积贡献率为 21%~25%, 4 个与树高相关的 QTLs, 累积贡献率为 14%^[3]; Grover 等在火炬松中检测到 5 个与木材体积质量相关的 QTLs, 累积贡献率为 23%^[4]。显然, 利用分子标记弄清控制数量性状的基因及其行为, 无疑对林木遗传改良不论在丰富遗传改良理论还是改良实践均具有重大指导意义。

Soller 等早在 1976 年就提出了将遗传标记与数量性状变异进行关联分析的方法, 即去检验特定标记不同标记类型个体间的性状差异显著性。从理论上讲, 检测标记与数量性状变异关联或连锁所采用的统计方法都涉及使用标记基因型均值。由于 QTL 数量通常较小, 且易受环境影响, 因此单个 QTL 效应往往较小, 不易完全从环境效应中分解出来。当对某一 QTL 效应进行分析时, 往往由于其他 QTL 的分离产生剩余遗传方差, 因此表型方差增大, 造成 QTL 检测的难度。因此许多学者在发展标记与关联 QTL 的检测方法。

目前 QTL 检测的常用方法有 ANOVA (方差分析法)、AM (区间作图法) 和 CIM (复合区间作图法)。本项研究采用以标记为基础, 用 ANOVA 法检测与杉木树高、胸径和材积等生长的相关联分子标记, 检测出多个相关 QTL, 尤其发现标记互作现象非常明显。这与大多数的类似研究结果均为一致^[2-6]。

本项研究仅对与杉木树高、胸径和材积等生长性状相关联的分子标记作初步探索, 进一步的 QTL 研究需加大以下 2 个方面的工作: ①利用多种标记构建出一张高密度遗传连锁图, 以利于 QTL 作图。②将 F_1 群体的个体进行无性繁殖, 并进行正规设计造林试验, 逐年调查主要数量性状的表型值, 以供 QTL 分析之用。

参考文献:

[1] 尹佟明, 黄敏仁. 林木遗传图谱构建和数量性状基因定位[J]. 世界林业研究, 1995, 12(3): 6-12.

- [2] Bradshaw HD Jr, Stettler R F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effect on growth, form and phenology traits in a forest tree [J]. *Genetics*, 1995, 139: 963—973.
- [3] Grattapaglia D, Bertolucci F L G, Sederoff R. Genetic mapping of quantitative loci controlling growth and wood quality trait in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 144: 1 205—1 214.
- [4] Grover A, Devey M, Fiddler T, et al. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbreed pedigree of loblolly pine [J]. *Genetics*, 1994, 138: 1 293—1 300.
- [5] 李金花, 苏晓华. 用 RAPD 标记检测与杨树生长和物候期有关的 QTLs [A]. 张绮纹. 杨树定向遗传改良及高新技术育种 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1999. 226—223.
- [6] 苏晓华, 张绮纹. 杨树叶片数量性状相关联标记及其图谱定位研究 [A]. 张绮纹. 杨树定向遗传改良及高新技术育种 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1999. 234—342.
- [7] 李维明. 检测作物数量性状基因与遗传标记连锁关系的方差分析法及其应用 [J]. 作物学报, 1993, 19(2): 97—120.

Detection of genetic markers associated with growth traits in Chinese fir

HE Zhen-xiang¹, SHI Ji-sen¹, YIN Zeng-fang¹, CHEN Xiao-chou², YU Rong-zhuo²

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;
2. Yangkou Forest Farm, Shunchang 353211, Fujian, China)

Abstract: The study of detection of the genetic markers (RAPDS) associated with the growth traits (height, diameter and volume) using ANOVA analysis for the first time. The results showed that 3, 5 and 2 RAPD markers associated with height, diameter and volume respectively by single-marker ANOVA analysis; and 286 pairs of markers were found to be associated with growth traits by two-marker ANOVA analysis and also showed interactions among them.

Key words: Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*); growth traits; genetic marker; QTL; ANOVA