

桉树扦插生根和生长性状的 QTL 定位

于晓丽, 李发根, 翁启杰, 周长品, 甘四明*

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要:本研究以 1 个尾叶桉 × 细叶桉 F_1 谱系为材料, 在亲本遗传图谱上对扦插穗条的根数、最长根长、生根率和根干质量 4 个扦插生根性状及 13、18、46 个月生的树高和胸径 2 个生长性状的数量性状位点 (QTL) 进行了定位, 结果表明: 在母本尾叶桉和父本细叶桉上分别检测到 6 个和 7 个扦插生根相关的 QTL, 似然函数比值的对数值 (LOD) 2.0~3.9, 贡献率 15.2%~26.8%, 与最近标记的遗传距离为 0.0~15.0 cM; 尾叶桉上未检测到显著影响 13、18 个月生的树高和胸径的 QTL, 但检测到 2 个和 1 个 QTL 分别为与 46 月生树高和胸径显著相关; 细叶桉上检测到显著影响各林龄树高和胸径的 QTL, 包括 13 月生树高和胸径的 QTL 各 4 个、18 月生树高和胸径的 QTL 分别为 1 个和 2 个以及 46 月生树高和胸径的 QTL 各 2 个。没有检测到与扦插和生长均相关的 QTL, 表明两类性状可能受不同的基因位点控制。两类性状上均有部分 QTL 与相邻标记紧密连锁, 甚至直接定位到标记上, 这为相关性状的标记辅助选择提供了有潜力的候选标记。

关键词: 桉树; QTL; 扦插生根; 生长

中图分类号: S718.46 S792.39

文献标识码: A

Detection of Quantitative Trait Loci Related with Rooting Ability of Cuttings and Growth of *Eucalyptus*

YU Xiao-li, LI Fa-gen, WENG Qi-jie, ZHOU Chang-pin, GAN Si-ming

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: An F_1 pedigree of *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis* was used to detect quantitative trait loci (QTLs) controlling four cutting-related traits, i. e. number of roots per cutting, the maximum length of roots, percentage of rooted cuttings and root dry weight, as well as two growth traits, height (H) and breast-high diameter (DBH) of 13-, 18- and 46-month-old *Eucalyptus* trees. For cutting-related traits, six and seven QTLs were detected on genetic maps of maternal *Eucalyptus urophylla* and paternal *E. tereticornis*, respectively, with logarithm of odds (LOD) ranging from 2.0 to 3.9, variance explained from 15.2% to 26.8% and map distance with the closer flanking marker 0.0 to 15.0 cM. For growth traits, two and one QTLs were detected on the maternal map in 46-month-old H and DBH , respectively, though no QTL was found for 13- or 18-month-old growth, and a number of QTLs were located onto the paternal map for all the ages, including four, four, one, two, two and two QTLs for H_{13} , DBH_{13} , H_{18} , DBH_{18} , H_{46} and DBH_{46} , respectively. No QTL was found to affect significantly the rooting ability of cuttings and field growth simultaneously, implying probably the difference in genes responsible for the two types of traits. Several markers had zero cM of map distance to or linked very closely with QTL, which might act as sound candidate markers for future marker-assisted selection in related traits.

收稿日期: 2010-07-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2010AA1000687002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(RITFKYYW2008-4 和 2010-04)

作者简介: 于晓丽(1986—), 女, 山东烟台人, 在读硕士研究生, 从事分子生物学研究。

* 通讯作者: E-mail: Siming.Gan@ritf.ac.cn

Key words: *Eucalyptus*; quantitative trait locus (QTL); rooting ability of cuttings; growth

桃金娘科 (Myrtaceae) 桉树属 (*Eucalyptus* L' Hérit.) 树种在全球范围内广泛用于工业用材林营建^[1]。随着桉树扦插和组织培养等无性繁殖技术的发展,桉树营林的种植材料主要是无性系,尤其是杂种无性系,因此,生长以及无性繁殖相关的扦插生根能力是桉树无性系选育的重要性状^[2]。目前,已在桉树遗传图谱上定位了一批数量性状位点 (Quantitative trait locus, QTL),如生长^[3-7]、材性^[6-9]、耐寒性^[10]和桉叶油含量^[11-12]等性状相关的 QTL。无性繁殖性状上,Grattapaglia 等^[13]在尾叶桉 (*E. urophylla* S. T. Blake) 和巨桉 (*E. grandis* W. Hill ex Maid.) 上定位了组织培养的鲜根质量和萌条数以及扦插生根率的 QTL,Marques 等在细叶桉 (*E. tereticornis* Smith) 和蓝桉 (*E. globulus* Labill.) 上定位了扦插生根率的 QTL^[14-15];但是,尚未对生长和扦插生根能力同时进行 QTL 定位研究,并且对扦插生根相关的生根数量、根长和根干质量的 QTL 定位仍无报道。本研究以前期构建的尾叶桉和细叶桉遗传图谱^[16-17]为基础,对扦插相关的生根率、生根数量、最长根长和根干质量以及 13、18、46 个月生的树高和胸径进行了 QTL 定位研究,并估算了各 QTL 的贡献率,有助于理解扦插生根能力和生长性状的遗传基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料与 DNA 提取

植物材料为尾叶桉 (母本 P₁, UX-30) 和细叶桉 (父本 P₂, T4305) 及其杂交产生的 54 个 F₁ 子代^[17]。DNA 提取参考文献^[16]。

1.2 表型观测

该 F₁ 谱系为文献^[18]的杂种组合 1。扦插试验的各穗条根数 (*RN*)、各穗条最长根长 (*RL*, cm) 和小区生根率 (*RP*, %) 以及子代无性系 (扦插苗) 的大田生长试验 13、18、46 月生的树高 (*H*, m) 和胸径 (*DBH*, cm) 的观测具体参考文献^[18]。由于观测时穗条鲜根极易失水,影响根鲜质量的准确称量,故根鲜质量未做分析。各扦插穗条的根干质量 (*RW*, g) 采用烘干法测定,80 °C 烘 24 h 后称质量。

1.3 标记实验

随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记实验参考文献^[16],基于表达序列标签 (Expressed sequence tag, EST) 的切割扩增多态性序列 (Cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 标记实验参考文献^[17]。

1.4 数据分析

结合前期构建的尾叶桉和细叶桉遗传图谱^[16-17],利用软件 Mapmaker/QTL^[19]通过区间作图法进行 QTL 定位,采用回交模型。各子代无性系的性状平均值作为其表型值。首先,检验性状是否正态分布,对偏离正态分布的性状进行指数、对数或者反余弦转换。各连锁群是否存在 QTL 的最低似然函数比值的对数值 (Logarithm of odds, *LOD*) 为 2.0,利用“scan”命令检测各连锁群中可能存在的 QTL,利用“map”命令对可能的 QTL 进行最大 *LOD* 值的标记区间定位,即确定 QTL 所在的图谱位置,图距估算根据 Haldane 公式^[20],并计算 QTL 解释的方差分量 (贡献率)。

2 结果与分析

2.1 扦插性状的 QTL 定位

尾叶桉遗传图谱上共检测到显著影响扦插生根性状的 6 个 QTL,包括穗条根数 (*RN*)、最长根长 (*RL*)、生根率 (*RP*) 的 QTL 各 2、3、1 个,*LOD* 值 2.0 ~ 3.9,贡献率 15.2% ~ 26.8%,与最近标记的遗传距离 0.0 ~ 15.0 cM (表 1)。各 QTL 均分布于不同的标记区间,并且,除 *RL* 和 *RP* 的 1 个 QTL 同处连锁群 3 外,其余 QTL 均处于不同的连锁群。尾叶桉上未检测到显著影响扦插穗条根干质量 (*RW*) 的 QTL。

细叶桉遗传图谱上共检测到显著影响扦插生根性状的 7 个 QTL,包括 *RN*、*RL*、*RP* 和 *RW* 的 QTL 各 3、1、1、2 个,*LOD* 值 2.1 ~ 3.6,贡献率 15.9% ~ 25.6%,与最近标记的遗传距离 0.0 ~ 8.3 cM (表 1)。除 *RN*、*RL* 和 *RW* 的 1 个 QTL 同处连锁群 11 外,*RN* 和 *RL* 的 QTL 还同处相同标记区间 A106-520/2 ~ AH11-1150/1,其余 QTL 均处于不同的连锁群。

表1 尾叶桉和细叶桉遗传图谱上的 QTL 位置及其贡献率

树种	性状	连锁群	标记区间(图距/cM)	距左/右标记的图距/cM	LOD 值	贡献率/%
尾叶桉	RN	7	M18 - 450/2 ~ J11 - 690/3 (14.8)	0.0/14.8	2.1	15.8
		11	M18 - 920/1 ~ H17 - 1430/2 (15.8)	3.7/12.1	3.0	25.5
	RL	3	AW07 - 1400/1 ~ AZ11 - 1200/2 (15.8)	3.6/12.2	2.1	18.7
		6	AL06 - 770/2 ~ AZ07 - 1500/1 (3.1)	0.0/3.1	3.9	26.8
		18	AC19 - 790/3 ~ AP12 - 580/3 (22.2)	21.5/0.7	2.0	15.2
	RP	3	F09 - 450/3 ~ A11 - 880/1 (35.4)	20.4/15.0	2.0	23.8
	H ₄₆	15	AZ05 - 440/2 ~ EST - CD669233 (12.7)	6.3/6.4	2.7	21.3
		16	B19 - 1300/2 ~ AZ05 - 1400/2 (9.0)	9.0/0.0	2.0	14.9
	DBH ₄₆	15	AZ05 - 440/2 ~ EST - CD669233 (12.7)	6.3/6.4	2.1	16.7
	细叶桉	RN	6	R16 - 490/3 ~ R16 - 430/2 (6.4)	1.1/5.3	2.1
9			H14 - 550/3 ~ G13 - 1500/2 (17.0)	8.7/8.3	2.5	21.4
11			AL06 - 520/2 ~ AH11 - 1150/1 (16.9)	0.1/16.8	3.6	25.6
RL		11	AL06 - 520/2 ~ AH11 - 1150/1 (16.9)	13.8/3.1	2.4	20.2
RP		20	N12 - 1300/4 ~ W02 - 630/1 (4.2)	0.0/4.2	2.6	17.4
RW		1	K14 - 930/3 ~ V02 - 490/2 (0.8)	0.0/0.8	2.1	15.9
		11	E11 - 670/4 ~ AL06 - 520/2 (17.1)	13.3/3.8	2.6	21.0
H ₁₃		5	E01 - 900/1 ~ G10 - 270/1 (12.0)	11.9/0.1	2.6	18.5
		6	A04 - 550/1 ~ EST - CD668634 (11.8)	6.6/5.2	2.6	23.4
		8	W02 - 730/3 ~ A11 - 1350/2 (9.4)	5.3/4.1	2.5	18.3
		20	W02 - 630/1 ~ AC09 - 1350/1 (4.2)	3.0/1.2	2.8	19.9
DBH ₁₃		6	R16 - 430/2 ~ M18 - 1000/1 (24.5)	13.3/11.2	2.1	20.0
		8	W02 - 730/3 ~ A11 - 1350/2 (9.4)	0.1/9.3	3.3	22.5
		10	K03 - 330/2 ~ W03 - 530/3 (6.4)	1.8/4.6	2.2	16.6
		20	W02 - 630/1 ~ AC09 - 1350/1 (4.2)	4.2/0.0	3.1	21.7
H ₁₈		20	W02 - 630/1 ~ AC09 - 1350/1 (4.2)	2.7/1.5	2.2	16.9
DBH ₁₈		8	W02 - 730/3 ~ A11 - 1350/2 (9.4)	0.0/9.4	3.0	21.7
		20	W02 - 630/1 ~ AC09 - 1350/1 (4.2)	4.2/0.0	2.4	18.2
H ₄₆		5	G12 - 500/3 ~ A120 - 1000/2 (16.1)	0.3/15.8	2.0	14.8
		20	W02 - 630/1 ~ AC09 - 1350/1 (4.2)	0.0/4.2	2.9	21.0
DBH ₄₆		6	R16 - 430/2 ~ M18 - 1000/1 (24.5)	11.1/13.4	2.2	22.4
		20	W02 - 630/1 ~ AC09 - 1350/1 (4.2)	4.0/0.2	2.7	19.6

注:RN:穗条根数,RL:最长根长,RP:生根率,RW:根干质量,H₁₃:13月生树高,H₁₈:18月生树高,H₄₆:46月生树高,DBH₁₃:13月生胸径,DBH₁₈:18月生胸径,DBH₄₆:46月生胸径。

2.2 生长性状的 QTL 定位

尾叶桉遗传图谱上未检测到显著影响 13、18 月生树高和胸径的 QTL,但检测到 2 个和 1 个 QTL 分别与 46 月生树高(H₄₆)和胸径(DBH₄₆)显著相关,LOD 值 2.0 ~ 2.7,贡献率 14.9% ~ 21.3%,与最近标记的遗传距离 0.0 ~ 6.3 cM (表 1),其中,位于连锁群 15 上标记区间 AZ05-440/2 ~ EST-CD669233 的 1 个 QTL 与 H₄₆ 和 DBH₄₆ 均显著相关。

细叶桉遗传图谱上检测到显著影响不同林龄树高和胸径的 QTL,包括 13 月生树高(H₁₃)、胸径(DBH₁₃)的 QTL 各 4 个,18 月生树高(H₁₈)、胸径(DBH₁₈)的 QTL 分别为 1、2 个及 H₄₆ 和 DBH₄₆ 的 QTL 各 2 个;LOD 值 2.0 ~ 3.3,贡献率 14.8% ~

23.4%,与最近标记的遗传距离 0.0 ~ 11.2 cM (表 1)。相同林龄上均检测到相同的 QTL 显著影响树高和胸径,特别是连锁群 20 上的标记区间 W02-630/1 ~ AC09-1350/1 对各林龄的树高和胸径均有显著影响。

两亲本图谱上均检测到相同的 QTL 区域影响同一林龄或不同林龄的树高和胸径生长,表明同一基因位点可能控制不同的生长性状且在不同的生长时期均表达;但同一林龄下仍有不同的 QTL 显著影响树高和胸径,表明不同的生长性状可能还有特异基因控制,并且同一生长性状在不同林龄的 QTL 仍有不同,表明部分 QTL 位点可能只在一定的发育阶段表达。

2.3 扦插生根性状和生长性状的 QTL 比较

扦插生根性状和生长性状上,部分 QTL 与相邻标记的遗传距离很近,甚至直接定位到标记上(如尾叶桉图谱上与 RN 相关的 M18-450/2 和细叶桉图谱上与 H_{46} 相关的 W02-630/1),这可能有助于相关性状的标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)。另一方面,虽然各 QTL 的贡献率相对较小,但 LOD 值均在 2.0 以上,可以作为主效基因位点。

没有检测到同时影响扦插生根性状和生长性状的 QTL,表明两类性状可能受不同的基因位点控制。

3 结论与讨论

在扦插生根性状上,本研究首次对桉树生根数量、最长根长和根干质量进行了 QTL 定位,其中,在尾叶桉连锁群 7 和 6 上分别检测到与生根数量和最长根长 QTL 直接相关的标记 M18-450/2(0.0 cM) 和 AL06-770/2(0.0 cM);在细叶桉连锁群 1 和 11 上分别检测到与根干质量和最长根长 QTL 直接相关的标记 K14-930/3(0.0 cM) 和紧密连锁标记 AL06-520/2(0.1 cM)。这对三性状的 MAS 提供了有潜力的候选标记。同时,本研究在尾叶桉上定位了 1 个扦插生根率的 QTL,这与 Grattapaglia 等^[13]在尾叶桉上只检测到 1 个 LOD 大于 2.0 的该性状 QTL (另有 2 个的 LOD 为 1.9 和 1.7)的结果一致。另外,Marques 等^[15]利用不同的统计软件在细叶桉中检测到 3 个扦插生根率的 QTL,但贡献率最高只有 5.40%。因此,扦插生根率的主效基因可能很少,其更多地受微效多基因控制。

对于生长性状,尾叶桉遗传图谱上未检测到 13、18 月生的 QTL,这与 Verhaegen 等^[4]未在巨桉中检测到 18 月生的茎生长相关的 QTL 的结果一致。细叶桉图谱上检测到对各林龄的生长均有显著影响的 QTL,如连锁群 20 上标记区间 W02-630/1 ~ AC09-1350/1,但多数 QTL 只与 1 个或 2 个林龄的生长有关,这与 Verhaegen 等^[4]对巨桉和尾叶桉以及 Bundock 等^[5]对蓝桉生长性状 QTL 检测的结果类似,表明控制生长的 QTL 既可能与特定发育阶段相关,也可能在较长或者整个生长期表达。另一方面,影响同一林龄的树高与胸径的 QTL 既有相同的,也有不同的,表明不同生长性状可能还受特异基因控制。

部分性状在父母本的遗传图谱上均检测到 QTL,如 RN、RL、RP、 H_{46} 和 DBH_{46} ,表明父母本对有

关性状的遗传效应均较重要;但一些性状只在父本细叶桉的图谱上检测到 QTL,如 RW 及 13、18 月生树高和胸径,表明这些性状上父本细叶桉可能具有更大的遗传效应。

本研究也是首次对桉树同一谱系进行扦插生根性状和生长性状的 QTL 定位,没有发现同时影响两类性状的 QTL,这与两类性状相关性较低^[18]有关。Grattapaglia 等^[6,13]利用不同谱系分别进行胸径和扦插生根率的 QTL 定位,也未发现共同的 QTL。这也表明桉树基因组中可能缺乏同时控制这两类性状的“一因多效”基因。

当前,林木 QTL 定位研究仍存在一些问题,主要是群体较小和多用随机标记^[21]。类似地,桉树 QTL 定位也存在这些问题,如 Byrne 等^[3]进行亮果桉(*E. nitens* (Deane & Maiden) Maiden)苗期生长和叶面积 QTL 定位的一个家系仅 60 个子代,本研究的 QTL 定位群体大小与之相似,并且,本研究主要为 RAPD 随机标记,需要增加功能标记。另外,本研究的最大林龄为 46 个月,达半个轮伐期,虽在一定程度上可以较好地反映各子代无性系的生长水平,但仍需进一步对整个轮伐期的生长进行评价;大田生长试验只有一个试验点,不能评估 QTL 与环境的互作。因此,有关不足是进一步研究需要解决的问题。

参考文献:

- [1] 白嘉雨. 中国热带地区桉属树种的遗传改良回顾[M]//洪菊生,王豁然. 澳大利亚阔叶树研究. 北京:中国林业出版社,1993:33-48
- [2] Clarke C R E. Are *Eucalyptus* clones advantageous for the pulp mill? [J]. South African Forestry Journal, 2001, 190: 61-65
- [3] Byrne M, Murrell J C, Owen J V, et al. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94: 674-681
- [4] Verhaegen D, Plomion C, Gion J-M, et al. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 597-608
- [5] Bundock P C, Potts B M, Vaillancourt R E. Detection and stability of quantitative trait loci (QTL) in *Eucalyptus globulus* [J]. Tree Genetics and Genomes, 2008, 4: 85-95
- [6] Grattapaglia D, Bertolucci F L G, Penchel R, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers [J]. Genetics, 1996, 144: 1205-1214
- [7] Freeman J, Whittock S, Potts B, et al. QTL influencing growth and

- wood properties in *Eucalyptus globulus* [J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2009, 5: 713 – 722
- [8] Thamaris K, Groom K, Bradley A, *et al.* Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 856 – 864
- [9] Thumma B R, Southerton S G, Bell J C, *et al.* Quantitative trait locus (QTL) analysis of wood quality traits in *Eucalyptus nitens* [J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2010, 6: 305 – 317
- [10] Byrne M, Murrel J C, Owen J V, *et al.* Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 975 – 979
- [11] Henery M L, Moran G F, Wallis I R, *et al.* Identification of quantitative trait loci influencing foliar concentrations of terpenes and formylated phloroglucinol compounds in *Eucalyptus nitens* [J]. *New Phytologist*, 2007, 176: 82 – 95
- [12] Shepherd M, Chaparro J X, Teasdale R. Genetic mapping of monoterpene composition in an interspecific eucalypt hybrid [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99: 1207 – 1215
- [13] Grattapaglia D, Bertolucci F, Sederoff R. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-tester strategy and RAPD markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 937 – 947
- [14] Marques C M, Vasquez-Kool J, Carocha V J, *et al.* Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99: 936 – 946
- [15] Marques C M, Carocha V J, de sa Pereira A R, *et al.* Verification of QTL linked markers for propagation traits in *Eucalyptus* [J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2005, 1: 103 – 108
- [16] Gan S, Shi J, Li M, *et al.* Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers [J]. *Genetica*, 2003, 118: 59 – 67
- [17] 张照远, 甘四明, 李发根, 等. EST-CAPS 标记在尾叶桉和细叶桉遗传图谱构建中的应用 [J]. *林业科学研究*, 2007, 20(2): 230 – 234
- [18] 甘四明, 李梅, 吴坤明, 等. 尾叶桉(细叶桉杂种无性系扦插生根和生长性状的研究 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(2): 135 – 140
- [19] Lander E S, Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps [J]. *Genetics*, 1989, 121: 185 – 199
- [20] Haldane J B S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors [J]. *Journal of Genetics*, 1919, 8: 299 – 309
- [21] 宋婉, 陈晓阳, 续九如, 等. 林木遗传图谱构建研究进展与发展方向 [J]. *遗传*, 2003, 25(6): 749 – 756