

木麻黄青枯病抗性与EST-SSR标记的关联分析*

许秀玉^{1,2} 张 勇³ 甘先华¹ 张华新²
张应中¹ 王明怀¹ 毛亦杨⁴

(1 广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520; 2 中国林业科学研究院 国家林业局盐碱地研究中心, 北京 100091; 3 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520; 4 广东省森林资源保育中心, 广东 广州 510173)

摘要 为挖掘与木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 青枯病抗性 (bacterial wilt resistance, BWR) 相关的分子标记及其有效等位变异, 加速抗病品种的选育进程, 以 53 份木麻黄种质为自然群体材料, 利用 223 个木麻黄 EST-SSR 标记对抗、感池进行标记分型与筛选, 选择 Structure 2.3.4 软件进行群体结构分析, SPAGeDi1-5a 软件计算亲缘关系系数, TASSEL 软件的混合线性模型 (MLM) 进行标记与抗病性状的关联分析。利用抗、感基因池筛选出用于关联分析且不偏离哈-温平衡的标记 47 个; 群体结构分析将木麻黄种质分为 2 个组群; 关联分析发现 CAsESeSSR253、CAsESeSSR022、CAsESeSSR359、CAsESeSSR241、CAsESeSSR242、CAsESeSSR263、CAsESeSSR056、CAsESeSSR052、CAsESeSSR176、CAsESeSSR258 等 10 个 EST-SSR 标记位点与木麻黄青枯病抗性显著相关 ($P < 0.05$), 对青枯病抗性的解释率在 12.6%~60.1% 之间; CAsESeSSR359-386 bp、CAsESeSSR359-370 bp、CAsESeSSR052-237 bp 及 CAsESeSSR052-255 bp 等 4 个优异等位变异具有较高的增效表型效应 (> 20.0), CAsESeSSR253-202 bp、CAsESeSSR022-190 bp、CAsESeSSR022-196 bp 等位点具有较大的等位变异减效表型效应 (> 30.0)。

关键词 木麻黄; 青枯病; EST-SSR; 关联分析**中图分类号:** S722.3+6 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-2053 (2020) 03-0010-08Correlation Analysis of Bacterial Wilt Resistance and EST-SSR Markers in
*Casuarina*XU Xiuyu^{1,2} ZHANG Yong³ GANG Xianhua¹ ZHANG Huaxin²
ZHANG Yingzhong¹ WANG Minghuai¹ MAO Yiyang⁴

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. Research Centre on Saline and Alkali Lands of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 4. Forest Resources Conservation Center of Guang Dong Province, Guangzhou, Guangdong 510173, China)

Abstract In this study we aimed to screen the molecular markers and their effective alleles related to bacterial wilt resistance (BWR) in *Casuarina equisetifolia* and promote the breeding process of resistant cultivar. 53 *Casuarina* germplasms were used as natural population materials, and 223 *Casuarina* EST-SSR markers were typed and screened with the gene pools of resistance and susceptibility. Structure 2.3.4 was used to analyze the population structure, SPAGeDi1-5a was used to calculate the kinship coefficient, and TASSEL mixed linear

* 基金项目: 中央财政林业改革发展资金 ([2017] GDTK-06); 广东省林业科技创新项目 (2014KJCX017)

第一作者: 许秀玉 (1977—), 女, 教授级高级工程师, 主要从事林木遗传育种及森林生态修复研究, E-mail: 81250908@163.com。

通信作者: 毛亦杨 (1963—), 男, 工程师, 主要从事森林资源保护、监测等科研、管理工作, E-mail: 1206810891@qq.com。

model program was used to perform correlation analysis between *Casuarina* BWR and markers. 47 related markers were screened and they did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium. *Casuarina* germplasm was divided into two groups by population structure analysis. Correlation analysis results suggested that EST-SSR marker sites of CAsESeSSR253, CAsESeSSR022, CAsESeSSR359, CAsESeSSR241, CAsESeSSR242, CAsESeSSR263, CAsESeSSR056, CAsESeSSR052, CAsESeSSR176 and CAsESeSSR258 were significantly related to *Casuarina* BWR ($P < 0.05$), which explained 12.6% to 60.1% of *Casuarina* BWR. Alleles of CAsESeSSR359-386bp, CAsESeSSR359-370bp, CAsESeSSR052-237bp and CAsESeSSR052-255bp displayed relatively high plus effects on phenotypic effect (> 20.0), and alleles of CAsESeSSR253-202bp, CAsESeSSR022-190bp, CAsESeSSR022-196bp had high minus effects on phenotypic effect (> 30.0).

Key words *Casuarina*; bacterial wilt; EST-SSR; association analysis

植物青枯病 (*Ralstonia solanacearum*) 抗性性状受多基因控制, 属于数量性状, 采用常规育种方法选育抗病品系难度大, 进展慢^[1]。木麻黄科 (*Casuarinaceae*) 植物自然分布区广, 不同树种、种源及无性系间遗传变异非常丰富, 在青枯病抗性上也存在着极显著分化^[2]。近年来, 随着越来越多木本植物^[3-6]完成全基因组测序及大量分子标记的开发, 数量性状的研究, 特别是利用关联分析挖掘数量性状相关功能基因已经越来越成为国际植物基因组学研究的热点。林木繁衍以自然杂交为主, 群体遗传多样性水平高, 连锁不平衡水平低, 特别适用于关联分析^[7]。目前, 许多林木树种开展了数量性状与分子标记的关联分析, 但大多集中在生长性状与木材性状^[8], 利用关联分析挖掘林木抗病基因位点的研究极少见报道, 仅有火炬松 (*Pinus taeda*) - 抗镰刀球菌 (*Fusarium circinatum*)^[9]、抗脂溃疡病 (*Fusarium circinatum*)^[10]、石榴 (*Punica granatum*) - 抗白叶枯病 (*Xanthomonas axonopodis*)^[11]、巨尾桉 (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*) - 抗锈病 (*Puccinia psidii*)^[12]等少数几个树种病害关联分析。木麻黄不仅尚未开发足量的分子标记, 在分子辅助选育、遗传图谱构建、抗病基因定位等分子生物学领域的研究严重滞后, 木麻黄青枯病抗性相关分子标记研究国内外也极少见报道。本研究利用木麻黄 223 个 EST-SSR 标记, 对我国现有木麻黄种质资源青枯病抗性进行关联分析, 旨在挖掘与木麻黄青枯病抗性密切相关的标记位点或具有特定功能的基因位点, 为分子标记辅助育种提供有益参考, 加速抗病种质资源的选育进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 53 份木麻黄种质来源于广东、福建、海南, 是广东、福建、海南各省根据不同育种目的选育并保存下来的无性系, 由广东省林业科学研究院培育。

供试材料青枯病抗性鉴定方法、病情指数、抗性分级等数据来源于许秀玉等^[13]研究结果, 为了统计分析方便, 本文将病情指数换算成抗病指数, 抗病指数 = $100 - \text{病情指数}$ 。供试木麻黄种质材料信息见表 1。由表 1 可见, 供试材料抗病指数变异范围大, 介于 27.2~100.0 之间, 基本呈连续正态分布, 适合用于抗病关联分析。

1.2 DNA 提取与标记分型

采取木麻黄新鲜嫩枝, 采用改良的 CTAB 法^[14]提取基因组 DNA。检测浓度与纯度后稀释至 100 ng/ μL , 作为 PCR 扩增模板。

选取杂交、30、41、45、W6、G1、平 5 和 X1 等 8 个亲缘关系较远、抗病指数大于 95 的无性系构建抗病基因池; 选取 2、34、37、59、82、G88、K18 和 C7 等 8 个亲缘关系较远、抗病指数小于 50 的无性系构建感病基因池。利用 223 个木麻黄 EST-SSR 标记^[15]对抗、感池进行标记分型与筛选。初步筛选标记方法^[16]: 比较两个基因池的标记 - 等位基因频率, 相差 80% 以上的标记入选, 筛选出用于关联分析的标记。

反应体系、分型过程及参试 223 个标记具体信息参见 Xu 等^[15]研究结果。

1.3 数据分析

1.3.1 群体结构及关联分析 标记分型与筛选采

表 1 供试无性系及抗病指数
Tab.1 The clones and the disease index

编号 No.	无性系 Clone	来源 Origin	抗病指数 Disease index	编号 No.	无性系 Clone	来源 Origin	抗病指数 Disease index	编号 No.	无性系 Clone	来源 Origin	抗病指数 Disease index
01	1	福建	92.7	19	83	福建	52.9	37	何 2	福建	95.4
02	2	福建	48.8	20	G88	广东	43.8	38	何细	福建	64.0
03	12	福建	61.0	21	91	福建	50.4	39	G1	广东	100.0
04	13	福建	82.4	22	105	福建	64.0	40	X2	广东	72.0
05	16	海南	50.0	23	501	广东	100.0	41	K18	广东	27.2
06	20	海南	50.0	24	503	广东	100.0	42	K13	广东	92.9
07	21	海南	50.0	25	601	广东	82.8	43	抗风	福建	62.3
08	27	海南	50.0	26	701	广东	74.1	44	龙 4	福建	62.3
09	30	广东	100.0	27	701-3	广东	53.2	45	C7	广东	50.0
10	34	海南	50.0	28	A1	广东	100.0	46	平 2	福建	53.3
11	37	福建	40.7	29	A1-3	广东	78.0	47	平 5	福建	98.2
12	41	福建	96.1	30	A13	广东	47.2	48	莆 20	福建	76.1
13	45	福建	100.0	31	A8	广东	58.7	49	X1	广东	100.0
14	59	福建	42.3	32	A8-2	广东	89.2	50	杂交	福建	100.0
15	65	福建	42.1	33	宝 9	海南	47.3	51	湛江 1	广东	50.4
16	76	福建	76.1	34	W2	福建	76.7	52	湛江 3	广东	63.7
17	77	福建	82.1	35	W6	福建	97.4	54	A14	广东	51.7
18	82	福建	44.9	36	海口	海南	100.0				

用 GenAlEx 6.4.1 检测^[17]，筛选出在抗感基因池中能差异表达且不偏离哈 - 温平衡的标记用于关联分析。利用 Structure 2.3.4^[18] 软件分析木麻黄供试材料群体结构，设定亚群数（ K ）的取值范围 1~16，将 MCMC（Markov Chain Monte Carlo）的 Length of Burn-in Period（不作数迭代）设为 100 000 次，每个 K 值重复运行 10 次，其余参数采用默认设置。根据 $\ln P(D)$ 计算 ΔK ，以 ΔK 最大原则选取最适合的亚群数（ K ），并计算各参试材料的基因型属于第 K 亚群的概率（ Q 值）。利用 SPAGe-Di1-5a 软件^[19] 获取供试材料个体间亲缘关系系数 K 矩阵。基于 $Q+K$ 模型，选择 TASSEL 3.0 软件^[19] 的 MLM 模型，确定 $P<0.05$ 时的关联位点，计算标记对表型变异的解释率（ R^2 ）。

1.3.2 等位变异表型效应分析 采用无效等位基因（null allele）法^[20] 计算各增效 / 减效等位变异表型效应值（ A_i ），确定关联标记的增效 / 减效等位变异，将某一标记增效 / 减效等位变异的平均效应作为该标记的增效 / 减效应值（AAE），计算表型效应比（AN）。 $A_i = \sum x_{ij} / n_i - \sum N_k / n_k$ ；

$AAE = \sum a_c / n_c$ ； $AN = AAE / (\sum N_k / n_k) \times 100\%$ 。（ x_{ij} ：第 j 个具有 i 等位片段个体的表型值； n_i ：具有 i 等位片段的个体数； N_k ：第 k 个具有无效等位基因个体的表型值； n_k ：具有无效等位基因的个体数； a_c ：关联位点内第 c 个增效 / 减效等位变异表型效应值； n_c ：关联位点内增效 / 减效等位变异数。）

2 结果与分析

2.1 木麻黄 EST-SSR 标记分型与筛选

检测发现，223 个木麻黄 EST-SSR 标记中，共有 49 个标记在抗、感基因池中等位基因频率差异达 80% 以上，且 CAsSeSSR244 与 CAsSeSSR064 两个标记偏离哈 - 温平衡（表 2），因此选择其余 47 个标记作为关联分析标记，利用这 47 个标记对参试材料进行群体结构分析与亲缘关系系数计算。

2.2 群体结构分析

根据模型后验概率 $\ln P(D)$ 计算 ΔK ，通过 ΔK 来确定亚群数（ K ），以 ΔK 值最大时的 K 值即为最佳亚群数。由图 1A 可知，当 $K=2$ ， ΔK 值

表 2 49 个标记哈-温平衡卡方检验结果
Tab.2 Results of 49 EST-SSRs Chi-square tests for Hardy-Weinberg equilibrium

编号 No.	标记 Marker	自由度 DF	卡方 Chi-square	显著性 Significance	编号 No.	标记 Marker	自由度 DF	卡方 Chi-square	显著性 Significance
1	CASeSSR004	36	216.801	***	26	CASeSSR209	36	314.538	***
2	CASeSSR022	10	92.005	***	27	CASeSSR216	3	77.404	***
3	CASeSSR024	28	90.580	***	28	CASeSSR217	28	207.750	***
4	CASeSSR027	6	33.079	***	29	CASeSSR226	36	210.618	***
5	CASeSSR034	21	196.403	***	30	CASeSSR230	55	230.060	***
6	CASeSSR041	136	415.891	***	31	CASeSSR232	10	53.294	***
7	CASeSSR048	21	153.442	***	32	CASeSSR238	36	124.481	***
8	CASeSSR052	45	327.174	***	33	CASeSSR241	55	220.705	***
9	CASeSSR056	36	66.620	**	34	CASeSSR242	10	62.294	***
10	CASeSSR059	3	46.815	***	35	CASeSSR244	6	2.182	ns
11	CASeSSR064	45	67.375	*	36	CASeSSR252	55	162.977	***
12	CASeSSR066	3	71.086	***	37	CASeSSR253	91	240.846	***
13	CASeSSR069	78	267.345	***	38	CASeSSR257	6	53.755	***
14	CASeSSR076	28	146.670	***	39	CASeSSR258	3	19.566	***
15	CASeSSR100	66	142.854	***	40	CASeSSR259	15	137.901	***
16	CASeSSR108	55	150.108	***	41	CASeSSR263	66	108.962	***
17	CASeSSR112	91	373.336	***	42	CASeSSR264	36	90.240	***
18	CASeSSR125	28	221.103	***	43	CASeSSR293	15	48.336	***
19	CASeSSR134	21	147.959	***	44	CASeSSR304	15	184.583	***
20	CASeSSR140	15	96.864	***	45	CASeSSR307	3	36.522	***
21	CASeSSR141	3	37.861	***	46	CASeSSR359	21	67.807	***
22	CASeSSR156	28	90.326	***	47	CASeSSR372	45	112.927	***
23	CASeSSR165	105	409.328	***	48	CASeSSR387	15	224.824	***
24	CASeSSR176	6	53.000	***	49	CASeSSR400	21	126.252	***
25	CASeSSR185	45	220.195	***					***

注：*** 表示 $P < 0.001$ ；** 表示 $P < 0.01$ ；* 表示 $P < 0.05$ ；ns 表示差异不显著。
Note: *** indicate $P < 0.001$ ；** indicate $P < 0.01$ ；* indicate $P < 0.05$ ；ns indicate not significant.

最大，即参试群体明显存在 2 个亚群，表明将 53 份木麻黄种质资源分为 2 个组群时，具有最大的后验概率 $\ln P(D)$ ，组群间具有最大的遗传差异，组群内植株具有相对一致的遗传背景。 Q 值计算结果发现：所有参试材料在各自所属组群中的 Q 值全部大于 0.5，这表明所有参试材料都可归入 2 个组群中某一个，群体结构简单，遗传组分相对单一，有利于减少关联分析的假阳性，提高关联分析效果。

构建的群体结构图如图 1B，亚群 1 包含 34 个无性系，亚群 2 包含 19 个无性系，来源不同的参试材料在不同的亚群中均有分布，这表明亚群

的划分与地理来源之间没有必然联系，这与前期木麻黄种质资源亲缘关系分析结果相一致^[21]。

2.3 关联分析

由表 3 关联分析结果可见：有 10 个标记与青枯病抗性显著相关 ($P < 0.05$)，相关标记对表型变异的解释率较高，介于 12.6%~60.1% 之间。其中有 5 个标记具有增效效应，标记 CASeSSR359、CASeSSR052 与 CASeSSR056 增效效应值最大，分别为 19.1、18.1、11.7，其相对的表型变异解释率分别为 19.1%、18.1%、43.7%，推断这些标记与某个贡献率较大的抗病位点连锁的可能性较大，可利用这些标记对木麻黄种质资源的青枯病抗性

潜力做出评价。除了 CAsSeSSR359、CAsSeSSR052 标记外的其余 8 个标记均具有减效效应，CAsSeSSR022、CAsSeSSR242、CAsSeSSR176 减效效应值最大，分别为 32.2，22.0，21.4，相应的表型变异解释率分别为 35.9%，20.7%，12.6%，初步推断这些标记与感病位点连锁的可能性较大，可利用这些标记淘汰易感植物材料。

2.4 位点和等位片段的表型效应

由表 4 可见，具有增效表型效应等位变异的关联位点有 CAsSeSSR052、CAsSeSSR056、CAsSeSSR241、CAsSeSSR263 及 CAsSeSSR359，其表型效应范围分别为：2.9~37.1、6.1~17.3、2.0~5.3、2.1~13.8、11.5~27.3，其优异增效等位变异分别为：CA-

SeSSR052-255 bp (PE=37.1)、CAsSeSSR052-237 bp (PE=37.1)、CAsSeSSR359-370 bp (PE=24.0)、CAsSeSSR359-386bp (PE=27.3)。具有减效表型效应的关联位点有 CAsSeSSR022、CAsSeSSR056、CAsSeSSR176、CAsSeSSR241、CAsSeSSR242、CAsSeSSR253、CAsSeSSR258、CAsSeSSR263，其中 CAsSeSSR022-196 bp、CAsSeSSR022-190 bp、CAsSeSSR022-188 bp、CAsSeSSR253-202 bp、CAsSeSSR242-227 bp、CAsSeSSR253-186 bp、CAsSeSSR176-204 bp 的等位变异减效表型效应均高于 20.0。育种中，可优先利用表型效应值大的优异等位变异，利用优异增效等位变异进行优质亲本及抗病植物材料的筛选，为后续标记辅助育种及杂交育种提供有益参考。

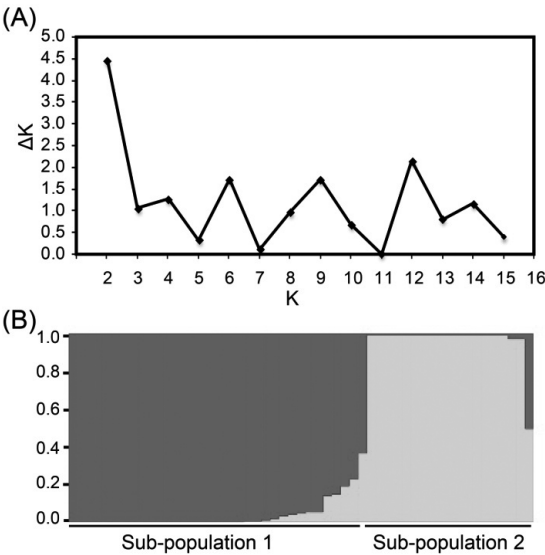


图 1 木麻黄 53 个无性系群体结构

Fig.1 Population structure of Casuarinaceae

表 3 关联标记的平均增效效应、减效效应

Tab.3 EST-SSR associated with *R. solanacearum* resistance could be detected with MLM model in Casuarinaceae and average positive (negative) allele effect

标记 Marker	P 值 P value	R ² /%	增效效应 Positive AAE	减效效应 Negative AAE
CAsSeSSR253	0.003	60.1	-	-14.0
CAsSeSSR022	0.009	35.9	-	-32.2
CAsSeSSR359	0.017	28.0	19.1	
CAsSeSSR241	0.018	47.3	3.6	-10.5
CAsSeSSR242	0.028	20.7	-	-22.0
CAsSeSSR056	0.029	43.7	11.7	-4.1
CAsSeSSR263	0.031	52.6	7.4	-0.81
CAsSeSSR052	0.031	29.9	18.1	-
CAsSeSSR176	0.034	12.6	-	-21.4
CAsSeSSR258	0.049	14.7	-	-5.3

表 4 木麻黄无性系青枯病抗病关联位点及其等位变异
Tab.4 Associated loci and phenotypic effect for *R. solanacearum* resistance

标记 Marker	等位增效 Allelic plus effect				等位减效 Allelic minus effect			
	等位片段 /bp Allele	表型 效应 PE	表型效应比 /% AN	携带等位 基因个体数 No. of carriers	等位片段 /bp Allele	表型 效应 PE	表型效应比 /% AN	携带等位 片段个体数 No. of carriers
CAsSeSSR253	-	-	-	-	186	24.1	29.3	24
	-	-	-	-	196	9.6	11.6	20
	-	-	-	-	202	33.9	41.2	9
	-	-	-	-	214	5.5	6.6	11
	-	-	-	-	222	0.6	0.7	8
	-	-	-	-	226	10.4	12.6	6
CAsSeSSR022	-	-	-	-	186	19.3	19.8	30
	-	-	-	-	188	24.3	25.0	13
	-	-	-	-	190	43.7	44.9	15
	-	-	-	-	196	41.4	42.5	17
CAsSeSSR242	-	-	-	-	223	16.5	18.7	50
	-	-	-	-	227	27.4	31.0	30
CAsSeSSR176	-	-	-	-	204	23.1	25.9	45
	-	-	-	-	219	19.6	22.0	53
CAsSeSSR258	-	-	-	-	201	9.3	12.6	39
	-	-	-	-	233	1.3	1.7	50
CAsSeSSR052	237	37.1	70.1	7	-	-	-	-
	239	12.9	24.5	19	-	-	-	-
	241	10.9	20.6	10	-	-	-	-
	243	2.9	5.4	11	-	-	-	-
	255	37.1	70.1	7	-	-	-	-
	257	16.3	30.8	29	-	-	-	-
	259	9.1	17.3	8	-	-	-	-
CAsSeSSR359	370	24.0	48.6	50	-	-	-	-
	380	13.5	27.4	23	-	-	-	-
	382	11.5	23.2	6	-	-	-	-
	386	27.3	55.4	6	-	-	-	-
CAsSeSSR241	265	2.0	2.6	9	247	6.0	7.9	44
	274	5.3	7.0	10	256	12.0	15.9	15
					280	13.4	17.7	22
CAsSeSSR056	220	6.1	9.1	36	228	5.6	8.3	10
	234	17.3	25.8	9	238	2.4	3.6	14
	-	-	-	-	240	4.2	6.3	16
CAsSeSSR263	176	2.6	3.8	19	164	0.9	1.3	13
	180	11.1	16.0	6	166	0.7	1.0	31
	186	13.8	19.9	6	-	-	-	-
	192	2.1	3.1	7	-	-	-	-

3 结论与讨论

木麻黄分子生物学研究基础薄弱,早期利用农杆菌开展了木麻黄基因工程研究^[22],利用 FIS-SR、ISSR、SSR、SCAR 等标记开展了木麻黄遗传多样性^[23]、群体结构^[23-24]、群体亲缘关系^[21]、木麻黄物种鉴定^[25]等少量分子育种研究,2018年开发了223个木麻黄 EST-SSR 标记^[15],2019年首次公布了短枝木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)的基因组数据^[3],本研究在此基础上首次开展了木麻黄青枯病抗病性状与分子标记的关联分析,共发掘出 CAsSeSSR241、CAsSeSSR263、CAsSeSSR056等10个与木麻黄青枯病抗病性状显著关联的 EST-SSR 位点及 CAsSeSSR052-255 bp、CAsSeSSR052-237 bp、CAsSeSSR359-370 bp、CAsSeSSR359-386 bp等优异增效等位变异,为今后预测控制性状的主效 QTL、新基因发掘、标记辅助育种、杂交育种等研究提供参考。其次, CAsSeSSR253-202 bp、CAsSeSSR022-190 bp、CAsSeSSR022-196 bp等多个等位片段对木麻黄青枯病抗性具有较高的减效效应,利用这些等位变异可以淘汰木麻黄感病材料。

本研究从223个木麻黄 EST-SSR 标记中筛选得到10个与青枯病抗性相关的标记,关联标记数量偏少,这可能由于与木麻黄青枯病抗性相关的基因原本就不多,也可能由于所用的 EST-SSR 标记数量不够多,今后可扩大标记数量与种类以获得更多的关联位点。本研究筛选出的10个关联标记表型变异解释率介于12.6%~60.1%,高于大多数植物抗病虫关联标记,如辣椒(*Capsicum annuum*)疫病(*Phytophthora capsici* Leonian)抗性关联分析中表型变异解释率2.98%~16.05%^[26],烟草(*Nicotiana tabacum*)青枯病抗性关联分析中表型变异解释率5%~14%^[19],陆地棉(*Gossypium hirsutum*)黄萎病(*Verticillium dahliae*)抗性关联分析表型变异解释率3%~13%^[27]等,这可能由于本次试验群体数量少造成的,也可能由于这些标记位于基因编码区或基因表达调控区,是青枯病抗性性状重要位点。

木麻黄为外来树种,本研究参试群体为我国海南、福建、广东各省根据抗风、速生、抗旱等不同育种目的选育出来的,为我国现存的木麻黄重要种质资源,因此群体数量少。利用这个群体

进行关联分析难免存在着 LD 偏差及表型取样误差^[26],为了提高关联分析的准确性,今后要进一步加强木麻黄育种群体的收集、积累、选育及杂交品系的创制,不断扩大用于木麻黄关联分析的群体数量,对获得的标记位点与优异等位变异进一步验证。其次,本研究中木麻黄青枯病抗性表型数据为室内接种试验所得,而林木对青枯病抗性的强弱除了受基因型影响外,还受自身生长势、侵染方式及环境条件等因素的影响,今后还应开展多地点田间试验,获得不同地点、不同生境条件下,不同木麻黄资源对青枯菌的抗病性能,研究环境与基因型的互作,以得到更多更准确的抗性相关位点与优异等位变异。

参考文献

- [1] QIAN Y, WANG X, WANG D, et al. The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco(*N. tabacum* L.) [J]. Euphytica, 2013, 192(2): 259-266.
- [2] 黄桂华, 仲崇禄, 张勇. 我国木麻黄科植物遗传改良研究进展[J]. 广东林业科技, 2005, 21(4): 65-69.
- [3] YE G F, ZHANG H X, CHEN B H. De novo genome assembly of the stress tolerant forest species *Casuarina equisetifolia* provides insight into secondary growth [J]. The Plant Journal, 2019, 97: 779-794.
- [4] LIANG Q, LI H Y, LI S K, et al. The genome assembly and annotation of yellowhorn (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) [J]. Giga Science, 2019, 8: 1-15.
- [5] ZHU Q G, XU Y, YANG Y, et al. The persimmon (*Diospyros oleifera* Cheng) genome provides new insights into the inheritance of astringency and ancestral evolution [J]. Horticulture Research, 2019, 6: 138.
- [6] 刘海琳, 尹俊明. 全基因组测序技术研究及其在木本植物中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(5): 172-178.
- [7] THUMMA B R, NOLAN M F, EVANS R, et al. Polymorphisms in cinnamoyl CoA reductase (CCR) are associated with variation in microfibril angle in *Eucalyptus* spp [J]. Genetics, 2005, 171(3): 1257-1265.
- [8] 阙青敏, 欧阳昆晞, 李培, 等. 全基因组关联分析(GWAS)在林木育种中的应用[J]. 植物生理学报, 2019, 55(11): 1555-1562.
- [9] TANIA Q, VIKNESWARAN G, W PATRICK C, et al. Association mapping of quantitative disease resistance in a natural population of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. Genetics, 2010, 186(2): 677-686.
- [10] DE LA TORRE A R, PUIU D, CREPEAU M W, et al.

- Genomic architecture of complex traits in loblolly pine [J]. *New Phytologist*, 2019, 221(4): 1789-1801.
- [11] SINGH V N, ABBURI V L, RAMAJAYAM D, et al. Genetic diversity and association mapping of bacterial blight and other horticulturally important traits with microsatellite markers in pomegranate from India [J]. *Molecular genetics and genomics: MGG*, 2015, 290(4): 1393-1402.
- [12] RESENDE R T, VILELA RESENDE M D, SILVA F F, et al. Regional heritability mapping and genome-wide association identify loci for complex growth, wood and disease resistance traits in *Eucalyptus* [J]. *New Phytologist*, 2017, 213(3): 1287-1300.
- [13] 许秀玉. 木麻黄青枯病的抗性鉴定及EST-SSR关联分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [14] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的CTAB提取植物DNA方法[J]. *实验室研究与探索*, 2009, 28(9): 14-16.
- [15] XU X Y, ZHOU C P, ZHANG Y, et al. A novel set of 223 EST-SSR markers in *Casuarina* L. ex Adans.: polymorphisms, cross-species transferability, and utility for commercial clone genotyping [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2018, March.
- [16] WANG M, SUKUMARAN S, BARKLEY N, et al. Population structure and marker-trait association analysis of the US peanut (*Arachis hypogaea* L.) mini-core collection [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123(8): 1307-1317.
- [17] PEAKALL R, SMOUSE P. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(1): 288-295.
- [18] 王海岗, 温琪汾, 穆志新, 等. 山西谷子核心资源群体结构及主要农艺性状关联分析[J]. *中国农业科学*, 2019, 52(22): 4088-4099.
- [19] 赖瑞强, 李荣华, 夏岩石, 等. 烟草种质的 SSR 标记遗传多样性及青枯病抗性的关联分析[J]. *中国烟草学报*, 2018, 24(6): 67-77.
- [20] BRESEGHELLO F, SORRELLS M E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars [J]. *Genetics*, 2006, 172(2): 1165-1177.
- [21] 许秀玉, 王明怀, 魏龙, 等. 51个木麻黄无性系遗传多样性的ISSR分析[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(6): 691-696.
- [22] 黄桂华, 仲崇禄, 苏晓华, 等. 分子生物技术在木麻黄科植物研究中的应用[J]. *广东林业科技*, 2006, 22(3): 75-80.
- [23] KULLAN A R K, KULKARNI A V, KUMAR R S, et al. Development of microsatellite markers and their use in genetic diversity and population structure analysis in *Casuarina* [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2016, 12(3): 1-12.
- [24] YASODHA R, KATHIRVEL M, SUMATHI R, et al. Genetic Analyses of *Casuarinas* Using ISSR and FISSR Markers [J]. *Genetica*, 2004, 122(2): 161-172.
- [25] GHOSH M, CHEZHIAN P, SUMATHI R, et al. Trees development of SCAR marker in *Casuarina equisetifolia* for species authentication [J]. *Trees*, 2011, 25(3): 465-472.
- [26] 袁欣捷, 方荣, 周坤华, 等. 辣椒疫病抗性关联分析及优异等位变异挖掘[J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(4): 1026-1040.
- [27] 张素君, 唐丽媛, 李兴河, 等. SSR标记与陆地棉田间黄萎病抗性的关联分析[J]. *华北农学报*, 2018, 33(6): 152-159.