

乌头自然群体株系的第一、二子根质量标记-性状关联分析

余 马, 侯大斌*, 舒晓燕, 黄 晶, 刘 霞, 刘 丹

西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010

摘 要: 目的 发掘乌头子根质量相关分子标记, 为乌头新品种选育提供技术支撑。方法 研究利用 280 个 AFLP 分子标记位点对 126 份乌头的自然群体进行了第一、二子根质量的分子标记-性状关联分析。结果 STRUCTURE 软件基于 k 值变化推导出供试自然群体的最佳亚群数为 2, 关联分析识别到 19 个目标性状关联位点, 分别解释了 0.87%~6.69% 的表型变异。其中 P1M1-27、P3M3-30 及 P1M1-20 在 GLM 模式、MLM 模式、GLM+K 模式及 GLM+Q 模式中均被识别到。结论 研究发掘到的目标性状关联位点对乌头分子标记辅助育种具有重要意义。

关键词: 乌头; AFLP; 子根质量; 关联分析; 分子标记

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2950-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.024

Marker-trait association analysis for weight of first and second fleshy root in 126 diverse lines of *Aconitum carmichaelii*

YU Ma, HOU Da-bin, SHU Xiao-yan, HUANG Jing, LIU Xia, LIU Dan

School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

Abstract: Objective To identify molecular markers associated with weight of fleshy root of *Aconitum carmichaelii*, and provide technologic basis to *A. carmichaelii* breeding. **Methods** The marker-trait association (MTA) analysis for the weight of first and second fleshy root was conducted in association mapping panel comprised 126 diverse lines based on 280 AFLP loci. **Results** The population structure analysis of all lines conducted using STRUCTURE indicated that the likely number of subgroups was 2 based on the change in k . A total of 19 loci were identified to associate with 0.87%—6.69% of phenotypic variance for objective trait. The loci of P1M1-27, P3M3-30, and P1M1-20 were identified under all analysis modes of GLM, MLM, GLM + K, and GLM + Q. **Conclusion** These loci should be compatible to marker assistance selection during *A. carmichaelii* breeding.

Key words: *Aconitum carmichaelii* Debx.; AFLP; weight of fleshy root; MTA analysis; molecular marker

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根, 其主要成分乌头碱 (aconitine)、次乌头碱 (hypoaconitine) 和中乌头碱 (mesaconitine) 等具有抗炎、镇痛、强心、抗心律失常、降血糖及抗癌等药理作用, 是一种重要的商品药材^[1-2]。乌头栽培历史悠久, 其最佳道地产区四川江油已栽培乌头 1 300 多年^[3]。乌头子根在栽培条件下可达 4~15 个, 为保证子根的商品性, 乌头栽培需要在其生长期进行 2 次以上的修根, 以摘除第一子根和第二子根以外的多余子根, 该栽培模式耗时费力, 且用工成本较高。因此选育子根数少且大的附子品种以减

少或省略掉修根成本对附子规模化栽培意义重大。

乌头为异花授粉植物, 其生产上多用于子根保种繁殖, 这使其栽培群体杂合性较高。且乌头从种子萌发到开花结实需要 2~3 年时间, 因此创制纯系材料及分离群体等传统育种及遗传研究所需的必须材料进展缓慢。关联作图 (association mapping) 可以同时利用大量遗传资源构建的自然群体以发掘目标性状关联遗传位点。该方法克服了传统双亲本分离群体模式的数量位点作图 (QTL mapping), 还能发掘到双亲本群体中不能发掘的遗传位点^[4-5]。因此该方法已广泛应用于小麦、玉米和水稻的抗性、产量

收稿日期: 2016-11-30

基金项目: 西南科技大学博士基金项目 (14zx7110); 国家工业与信息化部 2012 年度扶持中药材生产建设项目 (川附子栽培与炮制规范及创新生产技术产业化基地建设)

作者简介: 余 马 (1986—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物育种。Tel: 15196278464 E-mail: yuwen0073@126.com

*通信作者 侯大斌, 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物。Tel: (0816)6089523 E-mail: dbhou@126.com

及质量相关遗传位点发掘^[6-8]。本研究利用 AFLP 标记技术对包含 126 份乌头的自然群体进行标记-性状关联分析,以发掘影响附子第一、二子根质量的遗传位点。

1 材料与方法

1.1 材料

供试自然群体共包含 126 份性状各异株系,该群体为本课题组作种质资源保存用(表 1)。所有材料由西南科技大学生命科学与工程学院侯大斌教授鉴定为毛茛科乌头属乌头 *Aconitum carmichaelii* Debeaux。各株系分别从江油、安县、北川、布拖、汉中及勉县药农处搜集。所有株系均以子根营养繁殖。

表 1 供试乌头群体

Table 1 Investigated population of *A. carmichaelii*

群体	株系编号	来源
P-1	H1~H53	江油
P-2	H54~H61	布拖
P-3	H62~H97	安县
P-4	H98~H107	汉中
P-5	H108~H116	勉县
P-6	H117~H126	北川

1.2 田间设计及表型考查

126 份自然群体材料于 2013~2014 年种植于江油药王谷,每个株系种植行长 1.5 m,单株间距 0.1 m,行间距 0.3 m,每株系种植 5 行,常规肥水管理及病虫害防治。表型数据收集时,每个株系选取 10 株代表性植株,每株取最大的 2 个子根称定质量。

1.3 AFLP 分析

模板 DNA 的制备为每 250 ng 基因组 DNA 加 5 U *MseI* 及 10 U *EcoRI* 限制性内切酶消化。其后,在被消化 DNA 片段上连接 5 pmol *EcoRI* 接头和 50 pmol *MseI* 接头。取 2 μL 的酶切-连接产物作为模板 DNA 进行预扩增。预扩增在 20 mL 的反应体系中进行。预扩增体系除 DNA 模板外,还包括 0.8 μL *EcoRI*-A 引物,0.8 μL *MseI*+C 引物,0.4 μL dNTPs (10 pmol/L),0.4 U Taq DNA 聚合酶,及 2 μL 10×PCR (+Mg²⁺) 缓冲液。预扩增 PCR 热循环条件为 95 °C 变性 30 s,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,25 个循环。将预扩增产物用 TE 稀释 50 倍后作为 AFLP 模板 DNA 进行选择扩增。选择性扩增体系包括 2 μL 模板 DNA,30 ng 选择性前、后

扩增引物 0.4 μL dNTPs (10 pmol/L),0.4 U Taq DNA 聚合酶,0.4 U Taq DNA 聚合酶,及 2 μL 10×PCR (+Mg²⁺) 缓冲液。选择性扩增 PCR 条件为 94 °C、5 min;94 °C、30 s,65 °C、30 s (每个循环温度降低 0.7 °C),72 °C、1 min,12 个循环;94 °C、30 s,56 °C、30 s,72 °C、1 min,24 个循环;72 °C、6 min;4 °C 保温。扩增产物通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测差异性。各株系间 DNA 条带差异采用“0”“1”标记,其中“0”为条带缺失,“1”为条带存在。本研究共采用 10 对选择性引物,引物序列见表 2,引物对分别为 P1M1、P2M1、P2M2、P3M3、P4M3、P4M4、P4M5、P4M6、P5M5 及 P6M6。

表 2 AFLP 引物及序列

Table 2 Oligonucleotide sequences used in AFLP analysis

引物	代码	序列 (5'→3')
<i>EcoRAAC</i>	P1	GACTGCGTACCAATTCAAC
<i>EcoRACA</i>	P2	GACTGCGTACCAATTCACA
<i>EcoRACT</i>	P3	GACTGCGTACCAATTCACCT
<i>EcoRACC</i>	P4	GACTGCGTACCAATTCACC
<i>EcoRAGC</i>	P5	GACTGCGTACCAATTCAGC
<i>EcoRAGG</i>	P6	GACTGCGTACCAATTCAGG
<i>MseCAA</i>	M1	GATGAGTCCTGAGTAACAA
<i>MseCAG</i>	M2	GATGAGTCCTGAGTAACAG
<i>MseCAT</i>	M3	GATGAGTCCTGAGTAACAT
<i>MseCTC</i>	M4	GATGAGTCCTGAGTAACCT
<i>MseCTG</i>	M5	GATGAGTCCTGAGTAACGT
<i>MseCTT</i>	M6	GATGAGTCCTGAGTAACCT

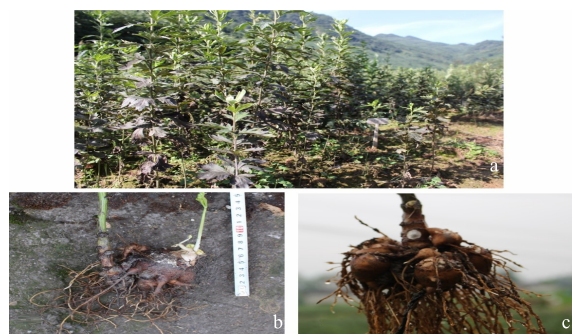
1.4 标记-性状关联分析

群体结构使用 STRUCTURE 软件混合模式分析^[9]。100 000 次重复后继续 150 000 万次 MCMC 重复以在 1~15 内推导出正确的 *k* 值。关联分析采用 TASSEL V2.1 分析软件^[10-11],分析共采用 4 种模式:(1)不考虑群体结构及亲缘关系的普通线性模型 (GLM) 模式;(2)控制亲缘关系的 GLM+K 模式;(3)控制群体关系的 GLM+Q 模式;(4)混合线性模型 (MLM) 模式。

2 结果与分析

2.1 群体表型

供试自然群体中,各株系子根数 1~13 个不等(图 1),其中第一、二子根平均质量 15.0~60.2 g,方差分析表明各株系间第一、二子根平均质量差异显著,基因型对目标性状差异构成显著影响 ($P<0.05$)。



a-126 份乌头群体资源圃 b-单子根株系 c-多子根株系
a-126 diverse genotypes in genetic resources nursery of *Aconitum carmichaelii* b-single fleshy root line c-multiple fleshy roots line

图 1 乌头群体及子根

Fig. 1 Investigated population and fleshy root of *A. carmichaelii*

2.2 基因型测定及群体结构

10 对选择性 AFLP 引物共扩增出 327 个 AFLP 条带, 其中 280 个条带在 126 份株系材料中表型出特异性多态性, 占有位点的 85.6%, 单个引物对扩增出的特异性条带数为 12~45 (图 2)。

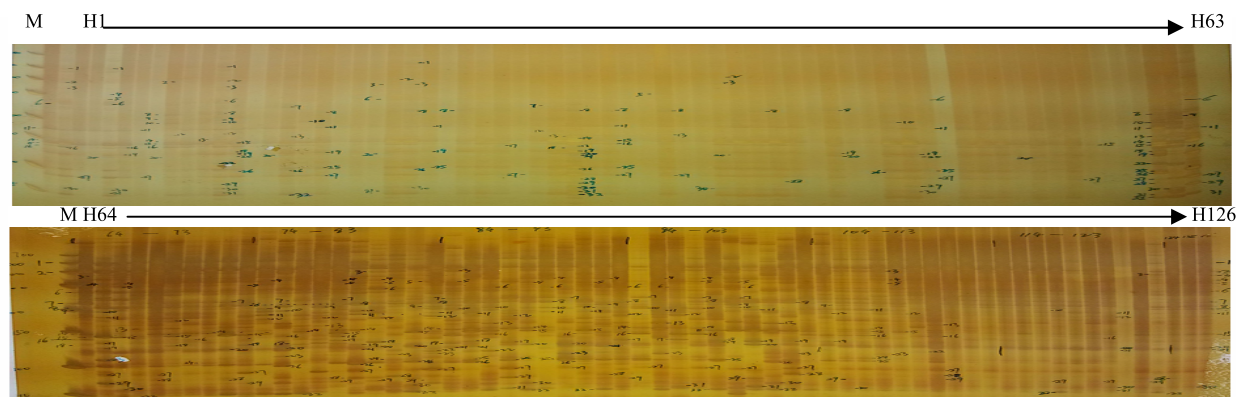


图 2 P2M2 引物对的群体 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplifications of P2M2 in *A. carmichaelii* population

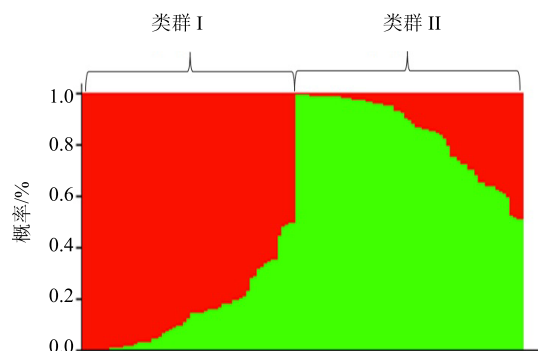


图 3 126 份乌头自然群体的群体结构

Fig. 3 Population structure for 126 lines of *A. carmichaelii*

群体结构分析中, STRUCTURE 基于 k 值变化推导出最佳亚群数为 2。其中 49 份江油产地附子 (H1~H12、H14~H22、H24~H31、H33~H45、H47~H53)、7 份布拖产地附子 (H54、H55、H57~H61)、4 份安县产地附子 (H62、H63、H66、H82)、及 1 份汉中产地附子 (H100) 被聚类为一个亚群。其余 4 份江油产地附子 (H13、H23、H32、H46)、1 份布拖产地附子 (H56)、32 份安县产地附子 (H64、H65、H67~H81、H83~H97)、9 份汉中产地附子 (H98、H99、H101~107)、9 份勉县产地附子 (H108~H116) 及 10 份北川产地附子 (H117~126) 被聚类为 2 个亚群 (图 3)。

2.3 标记-性状关联分析

关联分析中共识别到 19 个目标性状关联位点。其中 GLM 识别到 13 个目标性状关联位点, 这些位点分别解释了 1.54%~6.69% 的表型变异率 ($P<0.05$, 表 3)。MLM 模式识别到 12 个目标性状关联位点, 分别解释了 0.87%~4.24% 的表

型变异率 ($P<0.05$)。GLM+Q 模式识别到 4 个目标性状关联位点, 分别解释了 2.90%~6.33% 的表型变异率 ($P<0.05$)。GLM+K 模式识别到 5 个目标性状关联位点, 分别解释了 2.91%~6.69% 的表型变异率 ($P<0.05$)。4 种模式共识别到 3 个共同位点, 分别为 P1M1-27、P3M3-30 及 P1M1-20。此外, GLM 模式、GLM+K 模式及 GLM+Q 模式下都识别到 P5M5-7 与目标性状显著相关; P6M6-16 在 GLM 模式及 MLM 模式被识别到与目标性状显著相关; P5M5-16 在 GLM 模式、MLM 模式及 GLM+K 模式与目标性状显著相关。

表 3 标记-性状关联分析结果

Table 3 Result of MTA

关联位点	GLM		MLM		GLM+K		GLM+Q	
	<i>P</i>	<i>R</i> ² /%	<i>P</i>	<i>R</i> ² /%	<i>P</i>	<i>R</i> ² /%	<i>P</i>	<i>R</i> ² /%
P1M1-15	0.029 6	1.82						
P1M1-20	0.000 0	6.69	0.010 3	3.22	0.000 0	6.69	0.000 0	6.33
P1M1-27	0.000 0	6.69	0.010 3	3.22	0.000 0	6.69	0.000 0	6.33
P1M1-36	0.006 7	2.68						
P1M1-40			0.025 3	2.37				
P2M2-16	0.038 5	1.67	0.028 4	2.26				
P3M3-1	0.038 2	1.67						
P3M3-3			0.001 3	0.87				
P3M3-9	0.014 2	2.26						
P3M3-30	0.000 0	6.69	0.010 3	3.22	0.000 0	6.69	0.000 0	6.33
P4M3-3			0.047 8	1.81				
P4M3-21	0.047 3	1.54						
P4M4-12			0.027 1	2.30				
P5M5-7	0.002 4	1.99			0.002 4	3.25	0.004 5	2.90
P5M5-12			0.017 0	2.74				
P5M5-16	0.004 5	2.91	0.004 0	4.24	0.004 5	2.91		
P6M6-9	0.028 3	1.85						
P6M6-12			0.041 9	1.92				
P6M6-16	0.020 3	2.05	0.015 2	2.84				

P 为显著性值, *R*² 为位点表型变异解释率

P significance probability; *R*² phenotypic variation explained by markers

3 讨论

3.1 群体表型

药材道地性与药用植物生长环境、种质资源、栽培方式、收获时间及炮制加工方式显著相关。本研究中所有供试群体株系皆来自于药农们生产用或种用材料,各株系均处于同一环境条件下,但各株系第一、二子根平均质量差异显著,这表明了乌头块根大小的遗传差异性。这些株系在田间生产上收获后均能达到炮制所需的块根大小要求,这也说明了乌头等中药材产量的环境和栽培方式依赖性^[12]。

3.2 群体结构

群体结构分析中,同一产地内株系多数被划分到同一亚群,但也有部分材料被划分到另一亚群。这可能是大多数药农的乌头皆是自己留种为主,同时就近做种源交流,使得多数产地内的株系亲缘关系较近^[3]。此外,因目前交通日趋便利,各产地间串种现象也逐年增加,因此同一产地少数株系被聚类到其他亚群。频繁的串种会导致乌头栽培种源混乱,这将最终影响用药安全及药材市场稳定性。因此发掘种源特异性指纹图谱对乌头质量控制及评价非常重要。

3.3 标记-性状关联分析

目前自然群体的标记-性状关联分析中,共有 6 种模式评价群体结构及亲缘关系对表型性状的影响研究^[10-11]。本研究使用了其中 4 种模式对乌头自然群体株系的进行分析,各种模式下识别到的目标性状相关位点数差异显著,这和其他农作物的研究结果相一致。共 5 个位点在至少 3 种模式下都被识别到与目标性状相关联,这些位点与目标性状的关联性较其他位点更具真实性。但为了确认这些位点的关联真实性及环境独立性,各位点在多个环境下的表达验证非常必要。为获得更适合炮制加工需求的块茎,乌头选育过程中应注意大块茎与少块茎数目相结合,此外矮化基因的利用也非常重要。目前针对供试群体的子根数、株高、地上器官等性状环境考查及其关联分析正在进行中。本研究识别到的目标性状关联位点对乌头分子标记辅助育种具有重要意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈荣昌,孙桂波,张强,等. 附子及其复方中药的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 883-888.

- [3] 侯大斌. 附子资源与遗传多样性研究 [M]. 成都: 四川大学出版社, 2008.
- [4] Sorrells M, Yu J. Linkage disequilibrium and association mapping in the Triticeae [J]. *Gene Geno Triti*, 2009(7): 655-683.
- [5] Brachi B, Faure N, Horton M, *et al.* Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(5): e1000940.
- [6] Yu LX, Lorenz A, Rutkoski J, *et al.* Association mapping and gene-gene interaction for stem rust resistance in CIMMYT spring wheat germplasm [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, doi: 101007/s00122-011-1664-y.
- [7] Yu L X, Liu S X, Anderson J A, *et al.* Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines [J]. *Mol Breed*, 2012, 30(1): 613-614.
- [8] Kollers S, Rodemann B, Ling J, *et al.* Whole genome association mapping of Fusarium head blight resistance in european winter wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57500.
- [9] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155(16): 945-959.
- [10] Yu J M, Pressoir G, Briggs W H, *et al.* A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(28): 203-208.
- [11] Zhang Z W, Buckler E D, Casstevens T M, *et al.* Software engineering the mixed model for genome-wide association studies on large samples [J]. *Brief Bioinform*, 2009, 10(29): 664-675.
- [12] Szakiel A, Paczkowski C, Henry M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10(19): 471-491.