

# 葛根资源遗传多样性和性状关联分析

袁 灿, 钟文娟, 龚一耘, 蒲德强, 戢沛城, 黄海燕, 杨泽湖, 张 超

(四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 成都 610300)

**摘要:** 通过研究葛根资源的遗传多样性和葛根表型性状与分子标记的关联分析, 为葛根分子育种和指纹图谱构建提供理论依据。鉴定分析了 127 份不同来源葛根资源的 10 个表型性状, 并用 ISSR 标记研究 127 份葛根资源的遗传多样性, 对 ISSR 标记与表型性状进行关联分析。表型性状鉴定结果显示葛根资源的 10 个性状变异大、多样性较好。利用 ISSR 标记获得多态性条带 109 条, 平均每个引物扩增 5.73 条、平均 Nei's 基因多样性 0.2085、平均 Shannon's 指数 0.3378, 最远遗传距离为 0.46。ISSR 分子标记聚类分析将 127 份资源聚为两大类, 群体结构分析和 PCoA 分析结果类似将 127 份资源分为 2 个亚群。GLM 分析发现 3 个与茸毛性状关联标记, MLM 分析未发现与表型性状关联的标记。本研究收集的资源遗传多样性较好, 葛根分子标记聚类结果与地域关系不大, 综合 GLM 和 MLM 关联分析结果, 本试验未发现与表型关联位点。

**关键词:** 葛根; ISSR 标记; 遗传多样性; 关联分析

## Genetic Diversity and Trait Association Analysis of *Pueraria lobata* Resources

YUAN Can, ZHONG Wen-juan, GONG Yi-yun, PU De-qiang, JI Pei-cheng,  
HUANG Hai-yan, YANG Ze-hu, ZHANG Chao

(Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300)

**Abstract:** Genetic diversity and association analysis of *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi resources are very useful to *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi molecular breeding and fingerprinting construction. In this study, we carried out the genetic diversity and association analysis of 127 resources by using ten botanical characteristics and ISSR markers. The phenotyping results showed that *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi had rich morphological diversity and all the ten botanical characteristics had great variances. 109 polymorphic bands were amplified by 19 ISSR primers with an average of 5.73 loci per primer, the mean of Nei's gene diversity was 0.2085, Shannon's information index was 0.3378, and the most distant GD was 0.46. The 127 resources were divided in two main groups by cluster analysis. PCoA and STRUCTURE analysis result corresponding to the analysis by NTSYS, also divided 127 resources into two subgroups, there were three association signals by GLM association analysis and no association signals by MLM association analysis. The high level of genetic diversity was found in our resources, clustering analysis showed that there was little correlation between ISSR marker and geographical distribution, by comparing GLM and MLM association analysis result there wasn't found any association signals.

**Key words:** *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi; ISSR makers; genetic diversity; trait association analysis

葛根 (*Pueraria lobata* (willd.) Ohwi) 为豆科葛属 (*Pueraria* DC.) 多年生植物, 以其干燥的根入药<sup>[1]</sup>。葛

根含有葛根素、葛根素木糖甙、黄酮、多糖等多种药用成分, 具有解肌、透疹、止泻、除烦、降脂、降糖、解酒、美

收稿日期: 2016-05-25 修回日期: 2016-06-27 网络出版日期: 2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1123.012.html>

基金项目: 四川省财政创新能力提升工程项目 (2013XXXX-004)

第一作者研究方向为药用植物育种栽培。E-mail: senkyjzsy@163.com; 钟文娟为共同第一作者

通信作者: 张超, 研究方向为药用植物育种栽培。E-mail: jychoazhang@163.com

容丰胸等功效<sup>[2-4]</sup>。我国在2000年前就将葛根入药治病和食疗保健<sup>[5-6]</sup>。此外葛根还具有生长迅速、生物产量高、适应性好、抗逆性强,可种植在贫瘠山坡上作为优质饲草<sup>[7-10]</sup>。因此葛根种植具有很好的市场前景。

我国是葛根的起源分布中心,但长期以来葛根主要靠采收野生资源供药用,品种选育没有得到足够重视,因过度的采挖,以及资源保护、品种提纯复壮和品种选育研究滞后,一些优良的葛根资源正在减少和消失<sup>[9]</sup>,因此对葛根资源进行收集、评价与利用,对推动葛根产业健康发展具有重要意义。近年来,葛根资源收集和遗传多样性研究逐渐得到重视,一些研究者利用表型性状和分子标记对葛根进行遗传多样性研究。郝建平等<sup>[11]</sup>利用表型特征对山西葛根种质资源进行了研究;景戌等<sup>[12]</sup>利用RAPD标记对12份重庆葛根进行了遗传多样性分析,周精华等<sup>[13]</sup>也利用RAPD标记对湖南的葛种质资源进行研究,郭艳艳等<sup>[14]</sup>利用ISSR标记对11份葛根资源多样性进行评价,陈大霞等<sup>[15]</sup>利用SRAP标记对21份葛根资源进行遗传多样性研究。但上

述研究样本较少,且只利用分子标记或者表型数据,未将分子标记和表型性状结合起来深入研究分析我国葛根资源的多样性。本研究于2012-2013年广泛收集了四川、江西、湖南、湖北、重庆、安徽、陕西等9省市的葛根资源127份,并通过表型性状鉴定和ISSR分子标记相结合的方法,研究了这些葛根资源遗传多样性和表型性状与分子标记的关联分析,以期为葛根资源遗传育种利用、品种指纹图谱的构建、葛根品种DUS(Distinctness, Uniformity, Stability)测定提供指导和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为课题组2012-2013年从江西、四川、湖北、安徽、浙江、山东、陕西、湖南、重庆等9省市收集的127份葛根资源(表1)。于2014年在四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所青白江基地统一育苗移栽,田间采用顺序排列,重复3次,每小区种植20株,田间管理按照葛根栽培常规管理。

表1 127份葛根资源材料来源及编号

Table 1 The detail information and code of 127 *Pueraria lobata*(willd.) Ohwi resources

编号 Number	来源 Origin	类型 Type	编号 Number	来源 Origin	类型 Type	编号 Number	来源 Origin	类型 Type	编号 Number	来源 Origin	类型 Type
G1	江西德兴	栽培葛根	G20	江西上饶	野生葛根	G39	江西横丰	野生葛根	G66	四川西昌	野生葛根
G2	江西德兴	栽培葛根	G21	江西上饶	野生葛根	G40	四川阆中	栽培葛根	G67	四川荣经	野生葛根
G3	江西德兴	栽培葛根	G22	江西上饶	野生葛根	G41	四川阆中	栽培葛根	G68	四川荣经	野生葛根
G4	江西德兴	栽培葛根	G23	江西上饶	野生葛根	G42	四川阆中	栽培葛根	G69	四川荣经	野生葛根
G5	江西德兴	栽培葛根	G24	江西上饶	野生葛根	G43	山东泰山	野生葛根	G70	四川荣经	野生葛根
G6	江西德兴	栽培葛根	G25	江西上饶	野生葛根	G44	四川巴中	栽培葛根	G71	四川荣经	野生葛根
G7	江西德兴	栽培葛根	G26	江西上饶	野生葛根	G45	四川巴中	栽培葛根	G72	四川荣经	野生葛根
G8	江西德兴	栽培葛根	G27	江西上饶	野生葛根	G46	四川巴中	栽培葛根	G73	四川荣经	野生葛根
G9	江西德兴	栽培葛根	G28	江西横丰	野生葛根	G47	四川巴中	栽培葛根	G74	四川荣经	野生葛根
G10	江西德兴	栽培葛根	G29	江西横丰	野生葛根	G48	四川西昌	野生葛根	G76	重庆万州	野生葛根
G11	江西上饶	栽培葛根	G30	江西横丰	野生葛根	G49	四川西昌	野生葛根	G77	重庆万州	野生葛根
G12	江西横丰	栽培葛根	G31	江西横丰	野生葛根	G50	四川西昌	野生葛根	G78	重庆万州	野生葛根
G13	江西横丰	栽培葛根	G32	江西横丰	野生葛根	G52	四川金堂	栽培葛根	G79	重庆万州	野生葛根
G14	江西横丰	栽培葛根	G33	江西横丰	野生葛根	G55	江西赣州	野生葛根	G80	重庆万州	野生葛根
G15	江西横丰	栽培葛根	G34	江西横丰	野生葛根	G56	江西赣州	野生葛根	G81	重庆万州	野生葛根
G16	江西横丰	栽培小叶葛	G35	江西横丰	野生葛根	G58	四川金堂	栽培葛根	G82	重庆万州	野生葛根
G17	江西横丰	栽培小叶葛	G36	江西横丰	野生葛根	G60	湖南岳阳	野生葛根	G83	重庆万州	野生葛根
G18	江西上饶	野生葛根	G37	江西横丰	野生葛根	G61	湖南岳阳	野生葛根	G84	重庆万州	野生葛根
G19	江西上饶	野生葛根	G38	江西横丰	野生葛根	G63	湖南岳阳	野生葛根	G85	重庆万州	野生葛根

表 1(续)

编号 Number	来源 Origin	类型 Type	编号 Number	来源 Origin	类型 Type	编号 Number	来源 Origin	类型 Type	编号 Number	来源 Origin	类型 Type
G88	四川雅安	野生葛根	G101	江西德兴	栽培葛根	G114	四川安县	野生葛根	G127	安徽宣城	野生葛根
G89	四川雅安	野生葛根	G102	江西德兴	野生葛根	G115	四川安县	野生葛根	G128	安徽宣城	野生葛根
G90	四川雅安	野生葛根	G103	江西德兴	野生葛根	G116	浙江临安	野生葛根	G129	陕西杨凌	栽培葛根
G91	四川平昌	栽培葛根	G104	江西德兴	栽培葛根	G117	陕西安康	野生葛根	G130	陕西杨凌	栽培葛根
G92	四川平昌	栽培葛根	G105	江西德兴	栽培葛根	G118	湖北兴山	野生葛根	G131	陕西杨凌	栽培葛根
G93	四川平昌	栽培葛根	G106	江西德兴	栽培葛根	G119	安徽宣城	野生葛根	G132	陕西杨凌	野生葛根
G94	四川平昌	栽培葛根	G107	江西德兴	栽培葛根	G120	安徽宣城	野生葛根	G133	陕西杨凌	野生葛根
G95	江西横丰	野生葛根	G108	江西德兴	栽培葛根	G121	安徽宣城	野生葛根	G134	陕西杨凌	野生葛根
G96	江西横丰	野生葛根	G109	江西德兴	栽培葛根	G122	安徽宣城	野生葛根	G135	陕西杨凌	野生葛根
G97	江西横丰	野生葛根	G110	四川安县	野生葛根	G123	安徽宣城	野生葛根	G136	四川梓潼	野生葛根
G98	江西横丰	野生葛根	G111	四川安县	野生葛根	G124	安徽宣城	野生葛根	G137	四川梓潼	野生葛根
G99	江西横丰	野生葛根	G112	四川安县	野生葛根	G125	安徽宣城	野生葛根	G138	四川梓潼	野生葛根
G100	江西横丰	栽培葛根	G113	四川安县	野生葛根	G126	安徽宣城	野生葛根			

G1:宋氏一代;G11:葛博士1号;G12:横葛1号;G13:横葛2号;G14:赣葛5号;G100:宋氏二代

G1:Songshiyidai, G11:Geboshi-1, G12:Hengge-1, G13:Hengge-2, G14:Gange-5, G100:Songshierdai

## 1.2 方法

**1.2.1 表型性状的鉴定** 对 127 份试验材料的 10 个表型性状进行鉴定,其中茎节间长度和叶柄长度两个性状采用定量测定,为减少取样误差,统一测定基部起第 8~10 节的 3 个节间长度和叶柄长度,每重复测量 10 株,取平均值。叶片颜色、叶片大小、茎秆茸毛、叶片茸毛、叶柄茸毛、叶片花纹、茎秆粗细、叶缺深浅等 8 个性状也统一鉴定第 8~10 节的茎和叶,采取赋值法(代码值)进行定性鉴定。

**1.2.2 ISSR 分子标记检测** 采用改良 CTAB 法提取 DNA,紫外分光光度计测定其浓度,将样品稀释至 50 mg/L。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L、*Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L、引物(10 mmol/L) 2  $\mu$ L、dNTP(2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L、10  $\times$  Buffer(25 mmol/L) 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 11.8  $\mu$ L。PCR 反应程序采用 ISSR-Touchdown<sup>[16]</sup>,具体为 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,10 个循环,每循环退火温度降低 0.5  $^{\circ}$ C;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,56  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物采用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳,电压稳定在 110~130 V 电泳 1~2 h,采用 Goldview 染色,用凝胶成像系统成像并保存记录。

**1.2.3 ISSR 扩增条带读数** ISSR 按有无读数,同一大小位置有条带赋值 1,无条带则赋值为 0。

**1.2.4 数据的分析与处理** 用软件 Popgene 进行遗传多样性分析,分别计算 Nei's 指数、Shannon's 指数、平均有效位点数;用软件 NTSYS 和 DPS 进行聚类分析,按非加权配对法(UPGMA)进行聚类分析,并计算 GS 值;采用软件 STRUCTURE 的 Bayesian Markov Chain Monte Carlo 模型(MCMC)计算群体结构,K 取值范围 1~20,8 次独立运算重复,根据 G. Evanno 等<sup>[17]</sup>的算法计算  $\Delta K$ ;PCoA 分析用软件 NTSYS;用 SPAGeDi 软件进行亲缘关系 kinship 分析;用 TASSEL<sup>[18]</sup> 软件一般线性模型(GLM, general linear model)和混合线性模型(MLM, mixed linear model)进行表型和标记的关联分析。

## 2 结果与分析

**2.1 表型性状鉴定结果** 试验鉴定了 127 份葛根资源的 10 个表型性状,其中叶色、叶花纹、叶片茸毛、茎秆茸毛、叶缺、叶柄茸毛、茎秆粗细、叶片大小 8 个生物学性状采用定性方法进行鉴定。叶色分为深、中、浅 3 个等级,分别占 15.7%、29.1%、55.1%。叶花纹分为大、中、小、无 4 个等级,分别占 49.6%、14.2%、16.5%、10.2%、9.4%。叶片茸毛分为无、稀少、少、中、多 5 个等级,分别占 55.1%、7.1%、24.4%、4.7%、8.7%。茎秆茸毛分为无、少、中偏少、中、较多、多 6 个等级,分别占 1.6%、23.6%、3.1%、

39.2%、7.1%、25.2%。叶缺分为无、浅、有、深4个等级,分别占63.8%、19.7%、14.2%、2.4%。叶柄茸毛分为无、少、中偏少、中、中偏多、多6个等级,分别占7.9%、3.2%、62.2%、7.1%、8.7%、3.1%。茎秆粗细分为细、中细、中、中粗、粗5个等级,分别占81.1%、4.7%、10.2%、2.4%、1.6%。叶片大小分为小、略小、中、中偏大、大5个等级,分别占73.2%、3.1%、

11.0%、2.4%、10.2%。127份葛根资源的茎节间长度、叶柄长度两个性状定量鉴定结果显示(表2),不同资源材料之间的叶柄长度和茎节间长度差异较大,其中叶柄长度变幅4.3~24.3 cm,变异系数为0.3,茎节间长度变幅3.2~28.7 cm,变异系数为0.4。表型性状鉴定结果表明不同葛根资源的这10个表型性状变异大,可作为葛根品种DUS测定的参考指标。

表2 叶柄长度和茎节长度统计分析结果

Table 2 Analysis results of length of stipe and internode

性状 Traits	极大值 Max.	极小值 Min.	极差 Range	平均数 Mean	变异系数 CV	标准差 SD
叶柄长度(cm) Stipe length	24.3	4.3	20.0	15.0	0.3	4.5
茎节间长度(cm) Internode length	28.7	3.2	25.5	13.8	0.4	5.4

**2.2 ISSR 标记检测和遗传多样性分析** 用100条ISSR引物在127份葛根资源中进行扩增,筛选到扩增谱带清晰的多态性引物19条(表3)。19条多态性引物共扩增得到多态性条带109条,平均每个引物扩增5.73条,19条引物中UBC889扩增条带最多(10个),UBC820扩增条带最少(1个)。利用

Popgene 软件计算各位点遗传多样性指数(表4),Nei's多样性指数在0.0079~0.5之间,平均Nei's指数0.2085,Shannon's指数在0.0258~0.6931之间,平均Shannon's指数0.3378,平均有效位点数1.3206,结果表明127份葛根资源具有较高的遗传多样性。

表3 多态性ISSR引物序列

Table 3 Sequence of polymorphism ISSR primers

引物 Primer	核苷酸序列 Sequence	备注 Note
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	
UBC816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	
UBC820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	
UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	Y = C/T
UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	R = A/G
UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	R = A/G
UBC850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	Y = C/T
UBC851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	Y = C/T
UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	Y = C/T
UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	Y = C/T
UBC860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	R = A/G
UBC866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	
UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	
UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA	
UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	D = A/G/T B = C/G/T
UBC890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	V = A/C/G H = A/C/T

表4 127份资源遗传多样性分析结果

Table 4 Genetic diversity analysis results of 127 resources

多样性指数 Diversity index	极大值 (位点) Max.	极小值 (位点) Min.	平均数 Mean	标准差 SD
有效位点数	2 (UBC856-3)	1.0079 (UBC880-5)	1.3206	0.2944
Nei's多样性 指数	0.5 (UBC856-3)	0.0079 (UBC880-1)	0.2085	0.1573
Shannon's 指数	0.6931 (UBC856-3)	0.0258 (UBC889-3)	0.3378	0.2118

**2.3 聚类分析、群体结构分析和PCoA分析** 利用DPS和NTSYS软件进行聚类分析,根据UPGMA法构建的遗传关系聚类图显示(图1),127份材料平均遗传相似系数为0.81,最大的为1(有两对材料不能区分),最小的为0.63,对应的最大遗传距离为0.46,最小的为0。聚类分析表明,当遗传相似系数为0.65时将127份材料划分为两个大类,第I类以农家栽培葛根为主,第II类以野生葛根为主,其中第I类、第II类又各自分为两小类(I-1、I-2、II-1、II-2),目前栽培较大面积的G1(宋氏一代)和G100(宋氏二代)分别被分在第I大类的两个亚类中。G35、G36和G47、G48两对材料不能通过这19条引物进行区分。聚类结果显示这19对ISSR引物能很好地鉴别区分其中的123份资源。

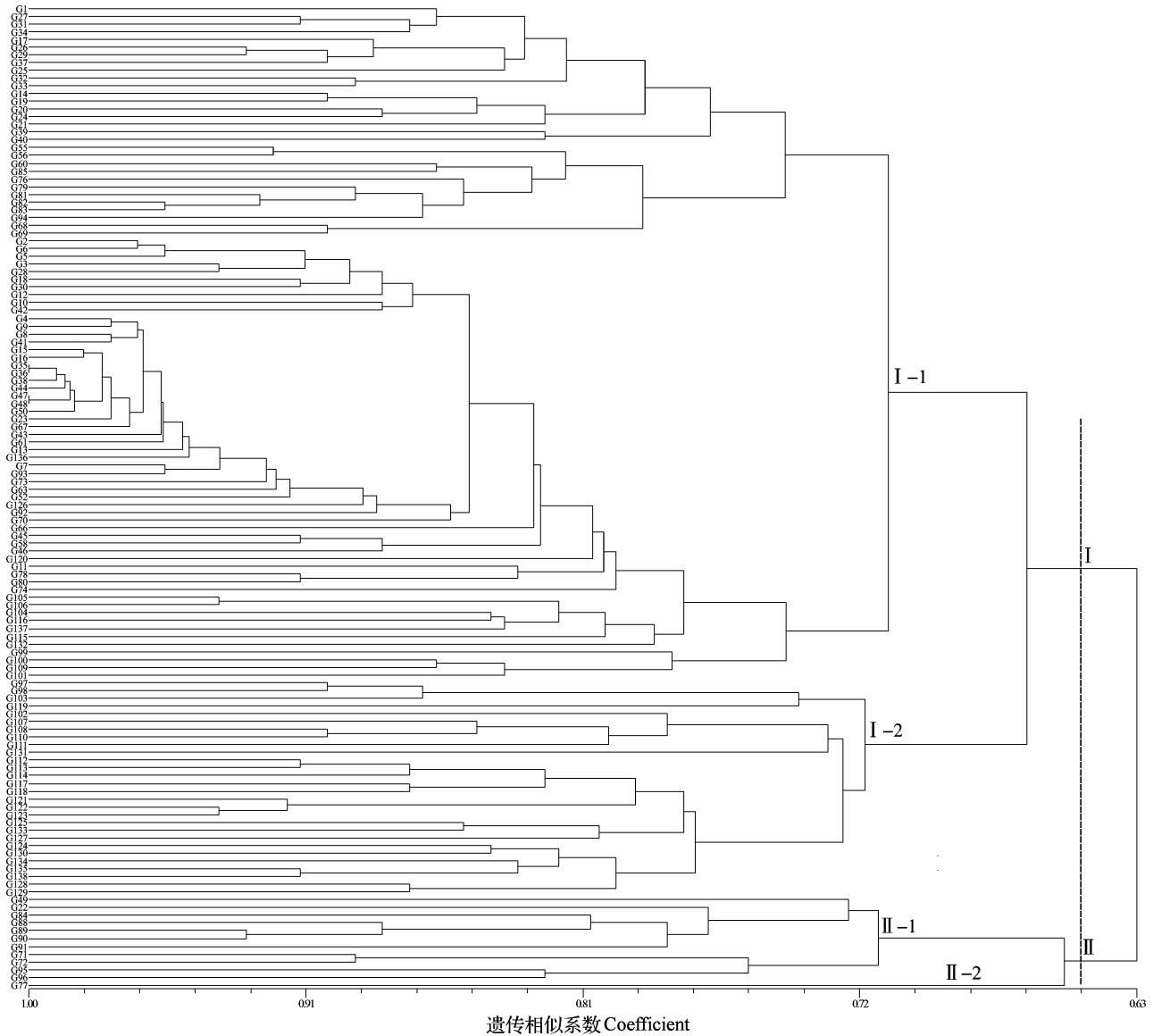


图 1 127 份葛根资源 ISSR 标记聚类图

Fig. 1 Dendrogram of 127 *Pueraria lobata*( willd. ) Ohwi resources by ISSR marker cluster analysis

江西上饶、德兴、横丰是我国葛根的主产地,在这 3 个地区收集的葛根资源 54 份,其中上饶 11 份、德兴 19 份、横丰 24 份,约占本试验资源的 1/2。为进一步分析主产区葛根资源的多样性,为生产提供参考,利用 NTSYS、Popgene 软件对江西 54 份葛根资源进行聚类 and 遗传多样性分析。在遗传相似系数为 0.65 时,54 份资源被聚为两大类,G1(宋氏一代)和 G100(宋氏二代)被聚到第 I 类,上饶资源全都被聚到第 I 类,横丰、德兴的材料两大类中都有(图 2)。根据 Popgene 分析结果来看,上饶葛根的遗传多样性较德兴和横丰更加丰富(表 5)。

利用 STRUCTURE Bayesian 模型计算群体结构,在 K = 1 时得到最小  $\ln P(K) = -12190.9$ ,在

K = 12 时得到最大  $\ln P(K) = -7635.3875$ 。用 G. Evanno 等<sup>[17]</sup>的算法寻找最优 K 值,在 K = 2 时得到  $\Delta K$  的最大值 300.2,随后  $\Delta K$  取值逐渐变小(图 3),根据分析结果在 K = 2 得到合理群体结构(图 4),将 127 份资源划分为两个亚群,第一亚群包括 55 份材料、第二亚群包括 72 份材料,宋氏一代和宋氏二代分属于不同亚群。通过 PCoA 分析(图 5)发现除了一份材料与 STRUCTURE 分析后的结果偏离,剩下的材料所在位置和 STRUCTURE 分析结果类似,主成分分析仍然将 127 份资源分为两个亚群。STRUCTURE 分析和 PCoA 分析结果一致性较高,与 NTSYS 分析结果类似,127 份葛根资源分为两个亚群。

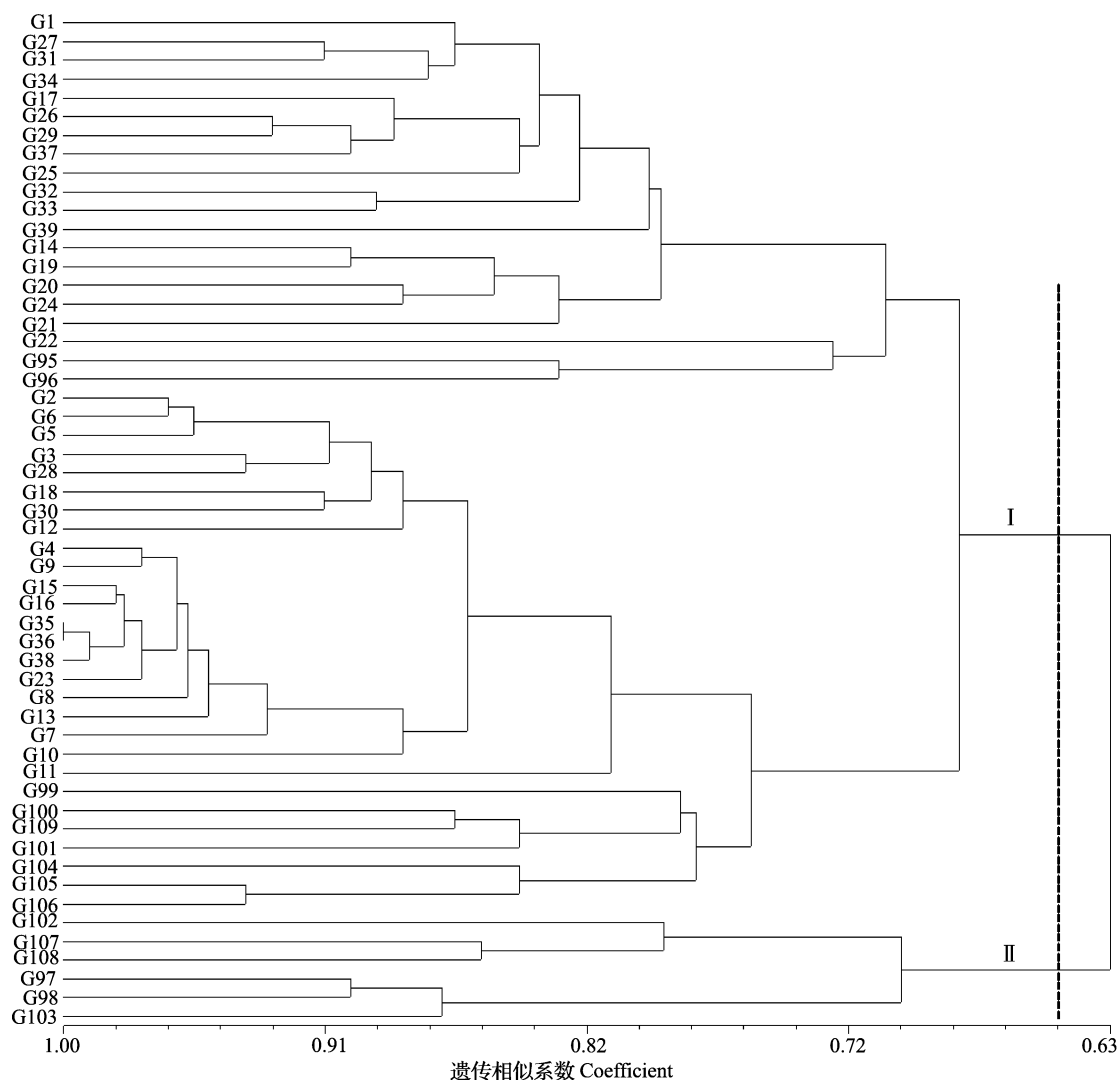


图2 54份葛根资源 ISSR 标记聚类图

Fig.2 Dendrogram of 54 *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi resources by ISSR marker cluster analysis

表5 江西葛根资源遗传多样性

Table 5 Genetic diversity of *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi resources from Jiangxi

材料来源(份数)	Nei's 指数	Shannon's 指数	PIC 值
Source of materials	Nei's genetic diversity	Shannon's information index	PIC value
江西(54)	0.2008	0.3232	0.2036
德兴(19)	0.1735	0.2821	0.1769
横丰(24)	0.1988	0.3155	0.2012
上饶(11)	0.2111	0.3187	0.2130

**2.4 ISSR 标记与生物学性状的关联分析** 利用 TASSEL 软件对 ISSR 条带与所调查性状采用回归分析方法进行关联分析,通过对标记条带进行过滤,将 109 个 ISSR 位点与 10 个表型性状通过 GLM 算法(以 Q 作为协变量)进行关联分析,结果当

$-\log_{10}(p) = 3$  时,得到条带 UBC889-5、UBC855-6、UBC817-3 与叶片茸毛性状关联,分别解释表型变异 10.2%、8.8%、9.8% (表 6)。但通过 MLM 算法(以 Q + K 作为协变量)作标记与性状的关联分析时,没有发现与表型性状显著关联(图 6)。

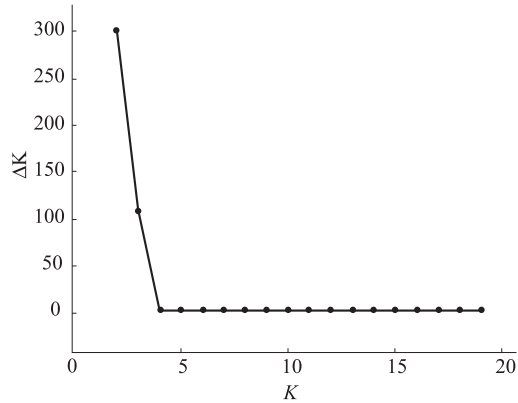
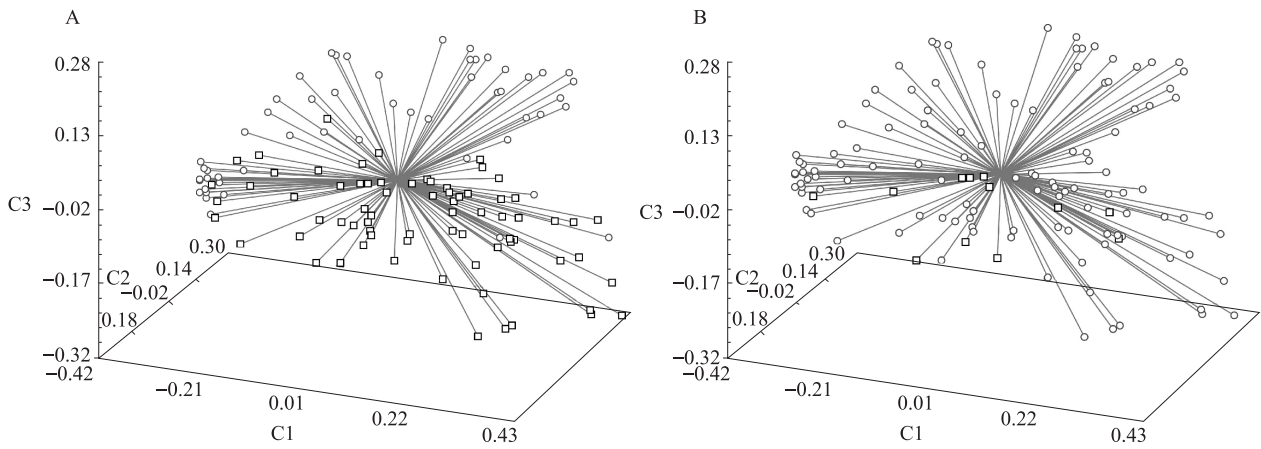


图3 STRUCTURE 分析  $\Delta K$  值  
Fig.3  $\Delta K$  values of STRUCTURE analysis



图4 127 份资源群体结构分析结果  
Fig.4 Population structure of 127 resources



A:圆圈表示 STRUCTURE 分析的第一亚群;B:圆圈表示 NTSYS 分析的第一类  
A: Circles indicate the first subgroup of STRUCTURE analysis, B: Circles indicate the first subgroup of NTSYS analysis

图5 PCoA 分析结果  
Fig.5 Results of PCoA analysis

表6 ISSR 标记与叶片茸毛关联分析结果

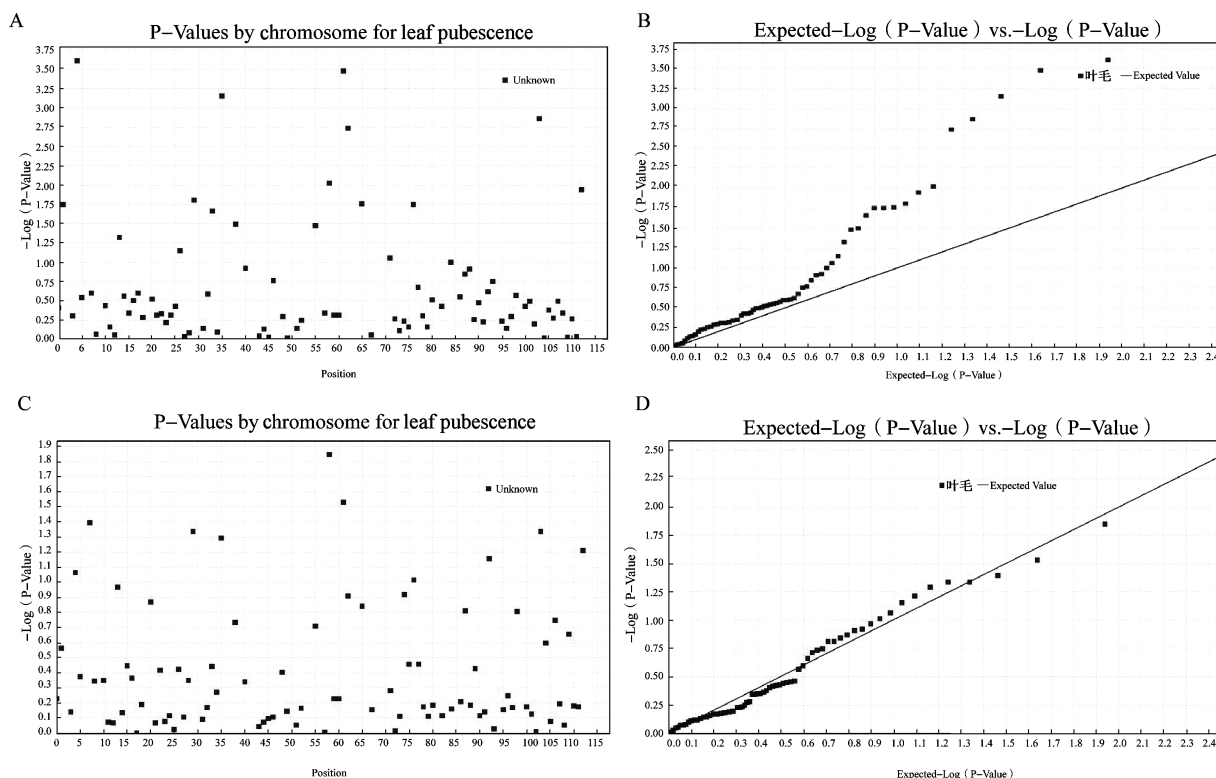
Table 6 Results of leaf pubescence association analysis by ISSR marker

性状 Traits	标记 Markers	df_marker	F_marker	p_marker	df_model	df_error	marker_r <sup>2</sup>
叶片茸毛	UBC889-5	1	14.260	2.45E-04	1	125	0.102
Leaf pubescences	UBC855-6	1	12.067	7.06E-04	1	125	0.088
	UBC817-3	1	13.620	3.33E-04	1	125	0.098

### 3 讨论

**3.1 表型性状遗传多样性分析** 国内目前报道的葛根遗传多样性分析文献多用分子标记进行遗传多样性评价,只有景戎等<sup>[12]</sup>对12份资源进行了葛根素含量的测试。本研究通过学习和改进 S. Bunmanopa 等<sup>[16]</sup>对泰国葛根遗传多样性研究方法,鉴定了葛根的10个植物学表型性状。通过分

析发现叶片颜色、叶片大小、茎秆茸毛、叶片茸毛、叶柄茸毛、叶片花纹、茎秆粗细、叶缺深浅等8个表型性状在资源中分布不均,变异范围较大。茎节间长度和叶柄长度2个定量鉴定性状的变异系数分别为0.3、0.4。本研究表型性状鉴定结果显示,不同来源葛根资源的10个表型性状变异较大,可作为葛根品种 DUS 测试的主要表型鉴定指标。



A: GLM 分析 Manhattan 图; B: GLM 分析 QQ 图; C: MLM 分析 Manhattan 图; D: MLM 分析 QQ 图

A: Manhattan result of GLM analysis, B: QQ result of GLM analysis, C: Manhattan result of MLM analysis, D: QQ result of MLM analysis

图 6 叶片茸毛的关联分析

Fig. 6 Association analysis of leaf pubescence

**3.2 ISSR 标记遗传多样性分析** 本试验用 19 条具有多态性的 ISSR 引物, 在 127 份资源中扩增得到 109 条清晰的多态性条带, 检测到的多态性较高, 与前人在其他作物上用 ISSR 进行遗传多样性研究结果类似<sup>[19-21]</sup>, 这 19 条 ISSR 引物也能有效地将其中 123 份资源区分开, 因此这 19 条 ISSR 引物可作为葛根资源和品种鉴定的核心引物。有两对材料不能进行有效地区分, 推测可能是这两对资源引种于相同地方其亲缘关系太近。分子标记和表型数据结果显示本研究收集的 127 份葛根资源表型差异大, 遗传多样性好, 该结果为后续这些材料进行杂交育种利用奠定了基础。

利用 NTSYS 进行聚类分析发现 127 份葛根可分为两大类, 其中宋氏一代 (G1) 和宋氏二代 (G100) 被聚到第 I 大类的两个亚类中, 这与两个品种的选育来源结果一致。聚类结果分析发现葛根分子标记聚类与地域关系不大, 这与郭艳艳等<sup>[14]</sup>、陈大霞等<sup>[15]</sup>的聚类结果一致, 可能是由于相互引种造成的。聚类图显示葛根栽培种与野生资源聚类相互交叉, 出现这种情况可能与现有葛根品种大都从野外收集的优良单株系谱选育而成有关, 也与葛根本身的选育驯化育种历史较短、栽培所用品种缺乏提

纯复壮有关。STRUCTURE 软件将 127 份资源分为两个亚群, PCoA 分析结果与 STRUCTURE 分析结果一致性极高, 两个类群差异不大, 群体间未出现明显分层现象。

**3.3 表型与分子标记的关联分析** 截至目前对葛根的表型和标记的关联分析尚未见报道, 本试验利用 tassel 软件对调查的表型性状和标记进行关联分析。利用 GLM 分析发现 3 个位点与叶片茸毛性状显著关联。前人研究发现有些茸毛能够通过分泌生物碱和萜类化合物来毒杀昆虫, 而且茸毛还能加强抵御极端气候。拟南芥<sup>[22]</sup>、水稻<sup>[23]</sup>、小麦<sup>[24]</sup>等作物中有许多控制茸毛生长的基因被定位和克隆, 在与葛根同科的大豆中邢光南等<sup>[25]</sup>研究发现叶片茸毛与抗虫性相关性极强。但本研究随后利用 MLM 分析没有发现与表型性状关联的分子标记。通过比对 MLM 和 GLM 分析的 QQ 图和 Manhattan 图, 认为本试验发现的与叶片茸毛关联标记, 可能是由于 GLM 算法出现的假阳性, 因此其准确性需进一步验证。

#### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技



- 出版社,2015:333
- [2] 李国辉,张庆文,王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3156-3160
- [3] 胥甜甜. 葛根素抗心肌细胞缺氧复氧损伤保护作用机制研究[D]. 南昌:南昌大学,2014:15
- [4] 黄志华,李良东,韩立民. 染料木素的脑保护作用及机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2015,29(1):141-146
- [5] 曾明,郑水庆,张汉明,等. 葛属药用植物的资源利用研究概况[J]. 药学实践杂志,2000,18(5):344-345
- [6] 陈文杰. 葛根研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育,2009,7(1):6-8
- [7] 刘云,张瑶,和润喜. 葛根及葛根食品的研究与开发现状[J]. 中国林副特产,2010,104(1):94-96
- [8] 朱校奇,周佳民,黄艳宁,等. 中国葛资源及其利用[J]. 亚热带农业研究,2011,7(4):231-234
- [9] 田启建. 湘西自治州葛根资源利用现状及产业发展策略[J]. 湖南农业科学,2010,236(5):111-114
- [10] 何建军,王少华,程薇,等. 湖北省葛根产业化现状分析与发展建议[J]. 湖北农业科学,2008,47(8):969-972
- [11] 郝建平,王峰,宋强,等. 山西省野葛种质资源分布与植物学性状研究[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(1):39-44
- [12] 景戌,徐莉,陈俊意,等. 重庆地区葛根遗传多样性分析和葛根素含量聚类分析[J]. 中国农学通报,2010,26(24):80-82
- [13] 周精华,揭雨成,杜晓华,等. 葛种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 作物研究,2013,27(4):347-350
- [14] 郭艳艳,成春燕,黄静丽,等. 不同来源葛根遗传多样性 ISSR 分析[J]. 大众科技,2013,15(164):134-136
- [15] 陈大霞,彭锐,李隆云,等. 部分粉葛品种遗传关系的 SRAP 研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(5):538-541
- [16] Bunmanopa S, Sakuanrungsirikulb S, Manakasema Y. White Kwao Krua variety classification by botanical characteristics and ISSR-Touchdown PCR technique[J]. Russ J Genet,2011,47(7):927-936
- [17] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. Mol Ecol,2005,14(8):2611-2620
- [18] Bradbury P J, Zhang Z W, Kroon D E. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples[J]. Bioinformatics,2007,23(19):2633-2635
- [19] 董红霞,柯卫东,黄新芳,等. 高效能源植物绿玉树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(2):286-291
- [20] 王惠梅,吴国林,江绍琳,等. 基于 SSR 和 ISSR 的鄱阳湖流域野生菘资源的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(1):133-141
- [21] 龚榜初,刘国彬. 锥栗自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(4):581-587
- [22] Gan Y, Kumimoto R, Liu C, et al. GLABROUS INFLORESCENCE STEMS modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell,2006,18(6):1383-1395
- [23] Wang D, Sun S X, Gao F Y, et al. Mapping a rice glabrous gene using simple sequence repeat markers [J]. Rice Sci, 2009, 16(2):93-98
- [24] Dobrovolskaya O, Pshenichnikova T A, Arbutova V S, et al. Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the Triticeae [J]. Euphytica,2007,155(3):285-293
- [25] 邢光南,谭连美,刘泽稀楠,等. 大豆地方品种叶片叶柄茸毛性状的形态变异及其与豆卷叶螟抗性的相关分析[J]. 大豆科学,2012,31(5):691-696