

选育甘草乌新 号的生理特性和基因多态性研究

严 硕¹, 高文远^{1,2*}, 路福平², 黄 滔¹

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 天津科技大学

中药生物工程研究所, 天津 300193)

摘要:目的 对从野生甘草中选育出的新品种甘草(乌新 号)进行种质评价。方法 观察了其发芽率、可溶性蛋白量和过氧化物酶活性,并与对照组进行了基因组多态性比较。结果 乌新 号可溶性蛋白量产生了变化,过氧化物酶活性显示乌新 号具有较高活性。通过分子标记简单序列重复技术(ISSR)进行多态性分析,在所使用的22条随机引物中,6条随机引物产生了不同DNA条带,表明乌新 号甘草与对照组相比产生了基因多态性变化。结论 这些变化表明乌新 号是一个具有前景的品种并且能在将来广泛应用。

关键词:甘草;乌新 号;育种;ISSR

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0126-04

Physiological features and genetic polymorphism of a new breed licorice Wuxin No. 1

YAN Shuo¹, GAO Wen-yuan^{1,2}, LU Fu-ping², HUANG Tao¹

(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. College of

Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300074, China)

Abstract: **Objective** A new breed of licorice seeds (Wuxin No. 1) was selected from wild licorice, *Glycyrrhiza uralensis*. **Methods** Its germination rate, content of soluble protein, and peroxidase (POD) activities were investigated and compared with the wild licorice seeds (control group). The leaves of Wuxin No. 1 were collected and its genetic polymorphism was analyzed by inter-simple sequence repeat technique (ISSR). **Results** The results suggested that the seed vitality in Wuxin No. 1 was higher than that in the control group. The change of soluble protein and POD activity also demonstrated that the seeds in Wuxin No. 1 have the higher vigor. ISSR Analysis showed that among 22 random primers used in this experiment, six primers generated different DNA band types, which meant that there was genetic polymorphism in Wuxin No. 1. **Conclusion** All these changes indicate that Wuxin No. 1 is a prospective domestication species of licorice and may be cultivated widely in the future.

Key words: licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.); Wuxin No. 1; breeding; inter-simple sequence repeat (ISSR)

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 是豆科多年生草本植物,其根茎具有补脾益气、止咳祛痰、清热解毒、调和诸药等功效,是最常用的中药之一,具有“十方九草”之说。从有历史记载以来,它已经被东西方国家用于治疗疾病。甘草是我国用量最大的药材之一,其资源和栽培问题一直未能解决,主要原因在于缺乏优良的甘草种质资源。人工种植甘草的萌发率低以及有效成分量低,尚不能完全代替野生甘草,选育优良品种是甘草栽培的重要任务^[1]。通过常规育种从野生资源中选育了一种新品种乌新

号,前期对乌新 号甘草主要生物活性成分量分析,结果表明乌新 号甘草一年生根中甘草酸、甘草苷和甘草多糖的量分别是同期野生的2.44、1.25、1.26倍,而且在乌新 号中检出了甘草次酸,而在野生的一年生甘草中未检到甘草次酸^[2]。本实验在前期考察了其有效成分量的基础上,通过考察乌新号的生理活性和基因多态性来综合评价乌新号的物种质量,选育优良甘草种质资源。

1 材料

1.1 植物材料:乌新 号和对照组野生甘草均由北

收稿日期:2009-04-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472148,30772732)

*通讯作者 高文远 Tel:(022)87401895 Fax:(022)87401895 E-mail:pharmgao@tju.edu.cn

京大兴时珍国药研究所提供,并经高文远教授鉴定。

1.2 化学药品:引物从上海生工生物工程技术有限公司(上海,中国)购得,用于分析的 *Taq* 酶, 10 ×PCR 缓冲液, dNTP 均购于宝生物工程(大连)有限公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 发芽率和胚根长度的比较:试验是参照《中华人民共和国农作物种子检验规程》(GB/T 3543.2, GB/T 3543.3)。将 60 粒乌新号甘草种子放置在培养皿中,加入 50 mL 水,培养温度 25℃, 7 d 内记录萌发数和胚根长度。发芽势 (GI) = $\sum(Gt/Dt)$ (Gt:发芽种子数量;Dt:发芽种子天数);发芽指数 (VI) = $S \times GI$ (S 为幼苗平均长度)。在最低显著性差异 (LSD) 5 % 的可能性水平上进行方法学比较。

2.2 可溶性蛋白的量:将乌新号种子和野生甘草种子温水浸泡 30 ~ 48 h,以软化种皮,使种子达到充分吸胀状态。用 70 % 酒精消毒 30 s 后再用蒸馏水冲洗种子数遍,1 % 次氯酸钠消毒 15 min,蒸馏水冲洗干净,均匀摆入内覆有两层无菌滤纸的培养皿中,每个培养皿 25 粒,分别加入适量蒸馏水和 PEG 6000 溶液(体积分数为 20 %)置于 25℃ 生化培养箱中光照培养 7 d,从萌发起,每隔 24 h 取已萌动发芽的甘草种子,去种皮,称取约 100 mg 至研钵中,加入 2 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 研磨至匀浆,将此匀浆倒入 5 mL 离心管,置于离心机中离心 10 min (转速 1×10^4 r/min)。取上清液 1 mL 至刻度试管中,再加入 20 mL 磷酸缓冲液,进行稀释。采用紫外分光光度法在 280、260 nm 波长下测定吸光度值,以磷酸缓冲液为空白调零。按下述公式计算可溶性蛋白的量。

$$\text{蛋白质质量浓度}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

2.3 过氧化物酶活性:将乌新号和野生甘草种子温水浸泡 30 ~ 48 h,以软化种皮,使种子达到充分吸胀状态。用 70 % 酒精消毒 30 s 后再用蒸馏水冲洗种子数遍,1 % 次氯酸钠消毒 15 min,蒸馏水冲洗干净,均匀摆入内覆有两层无菌滤纸的培养皿中,每个培养皿 25 粒,分别加入适量蒸馏水和 PEG 6000 溶液(体积分数为 20 %)置于 25℃ 生化培养箱中光照培养 7 d。每隔 24 h 取种子去种皮,称取约 100 mg 至研钵中,加适量磷酸缓冲液 (pH 7.8) 研磨至匀浆,取 0.1 mL 酶液,分别加入 2.9 mL 磷酸缓冲液, 1.0 mL 2 % 的 H_2O_2 , 0.05 mL 的愈创木酚溶液,在 37℃ 水浴中保温 15 min 后,迅速加入 2.0 mL 三氯乙酸终止反应,以加热煮沸 5 min 的酶液为对照,测

定其在 470 nm 处的吸光度 (A), POD 活力以每分钟内 A_{470} 变化 0.01 为 1 个活力单位 (U) 表示。

$$\text{过氧化物酶活性} = \frac{\Delta A_{470} \times V_T}{W \times V_S \times 0.01 \times t}$$

式中 ΔA_{470} 为反应时间内吸光度的变化值, W 为样品的质量 (g), t 为反应时间 (min), V_T 为提取酶液的总体积 (mL), V_S 为测定时所取的酶液的体积

2.4 基因多态性分析

2.4.1 DNA 基因组提取:提取新鲜甘草叶片基因 DNA,提取方法参照 Paterson 法^[2]。

2.4.2 ISSR 基因多态性:PCR 反应:25 μL 反应体系,体系中含有 10 μL 模板 DNA (10.5 ng), 2.5 μL 10 ×PCR 缓冲液 (包含 Mg^{2+}), 2 μL dNTPs (10 mmol/L), 1 μL 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.25 μL *Taq* DNA 酶 (5 U/ μL), 9.25 μL ddH₂O。

扩增程序:94℃ 预变性 5 min 然后进入下列循环:94℃ 变性 45 s, 53℃ 退火 60 s, 72℃ 下延伸 90 s, 共计 40 个循环,循环结束后在 72℃ 延伸 7 min。

取扩增产物 5 μL 点样于 1 % 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后在凝胶成像系统上观察并保存结果。

3 结果

3.1 乌新号和对照组的种子发芽率、发芽势和活力指数:研究乌新号的发芽过程并与对照组对比。方差分析 (ANOVA) 表明乌新号和对照组具有显著性差异 ($P < 0.05$), 经过 7 d 的培养发芽率已经达到 97.45 %, 是对照组的 1.23 倍, 乌新号的发芽势各自在培养第 2 天达到最高。结果见表 1。

表 1 乌新号和对照组的萌发率、萌发潜力和种子活力指标 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Germination rate, germination potential, and vigor index of seeds in Wuxin No. 1 and control group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

物种	时间/d	发芽率/%	发芽势	活力指数
乌新号	1	30.00 $\pm$ 3.71	18.00 $\pm$ 1.15	44.66 $\pm$ 0.71
	2	71.67 $\pm$ 1.81	21.80 $\pm$ 1.07 *	126.48 $\pm$ 1.25
	3	81.78 $\pm$ 1.24	16.36 $\pm$ 1.42	179.63 $\pm$ 0.91
	4	84.26 $\pm$ 1.52	12.64 $\pm$ 0.93	163.06 $\pm$ 0.45
	5	89.56 $\pm$ 2.46	10.75 $\pm$ 1.16	205.11 $\pm$ 0.81
	6	97.41 $\pm$ 2.13	9.42 $\pm$ 1.62	229.11 $\pm$ 0.72
	7	97.45 $\pm$ 1.15 *	9.45 $\pm$ 0.81	229.16 $\pm$ 0.64 *
野生甘草	1	20.00 $\pm$ 1.46	12.00 $\pm$ 0.95	29.88 $\pm$ 0.76
	2	53.30 $\pm$ 1.82	15.99 $\pm$ 1.53	101.70 $\pm$ 0.25
	3	67.08 $\pm$ 1.17	13.42 $\pm$ 1.28	123.73 $\pm$ 0.43
	4	68.00 $\pm$ 1.31	10.20 $\pm$ 0.96	148.51 $\pm$ 0.31
	5	75.41 $\pm$ 2.00	9.05 $\pm$ 1.72	147.06 $\pm$ 0.52
	6	78.21 $\pm$ 3.15	7.82 $\pm$ 1.30	145.61 $\pm$ 0.67
	7	79.43 $\pm$ 2.56	7.94 $\pm$ 1.02	145.46 $\pm$ 0.88

* 显著水平可能性选在 0.05, $P < 0.05$

* Significance at 0.05 probability level, $P < 0.05$

3.2 萌发期间可溶性蛋白的变化:萌发期间的可溶性蛋白的变化结果见图 1。可溶性蛋白波动如“V”字形,在第 2 天开始减少,在第 4 天增加,经过最初 2 d 的萌发期,乌新 1 号种子可溶性蛋白比对照组急剧减少,发芽势达到最高,见表 11;经过 2 d 萌发,乌新 1 号中可溶性蛋白的量比对照组高,这种结果表明,可溶性蛋白的变化反映了萌发期间的种子活力的变化。

3.3 萌发 7 d 过氧化物酶活性变化:本实验研究发现乌新 1 号和对组在过氧化物酶的活力上有显著的区别(图 2),但是,在 7 d 萌发期间乌新 1 号的过氧化物酶的活性比对照组种子高。

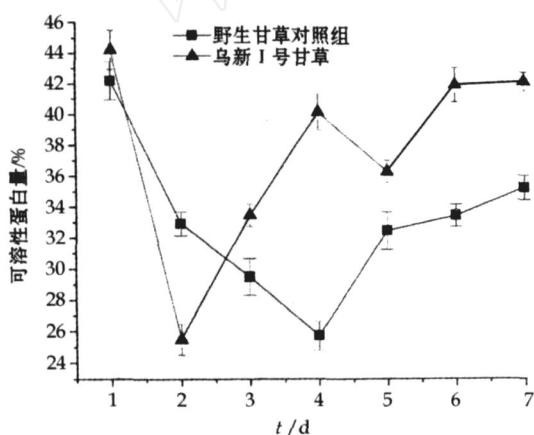


图 1 萌发 7 d 过程中可溶性蛋白的变化

Fig. 1 Change of soluble protein during 7 d germination

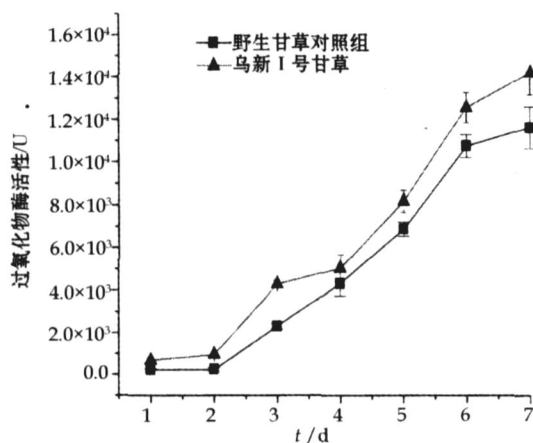


图 2 萌发 7 d 过程中过氧化物酶的变化

Fig. 2 Change of POD activity during 7 d germination

3.4 ISSR 基因多态性分析:本实验选用了 22 条引物,引物合成参照文献方法^[3],在乌新 1 号和对组比较中,16 条产生了相同的 DNA 条带,6 条产生了不同的 DNA 条带。表 2 显示了 ISSR 引物序列,22 条 ISSR 引物在 300 ~ 1 000 bp 共有 124 条带,每条引物扩增出 5 ~ 11 条带。21 条带产生了多态性占

多样性的 16.9%,无论哪种情况,多态性是由于扩增条带的丢失和增加引起的。引物 T13765 扩增出 7 个条带,其中两条产生了多态性;相对于对照组,乌新 1 号在 350 bp 产生了一个额外的条带并且在 50 bp 条带缺失了一条带(图 3)。

表 2 6 种多态性 ISSR 引物和序列

Table 2 Six polymorphic ISSR primers and their sequence

序列号	序列顺序(5'→3')
T13761	CACACACACACACAG
T13762	GTGTGTGTGTGTGTC
T13763	A GA GA GA GA GA GA GC
T13764	GA GA GA GA GA GA GAA
T13765	ATGA TGA TGA TGC
T13766	CCCTCCCTCCCTCCCT

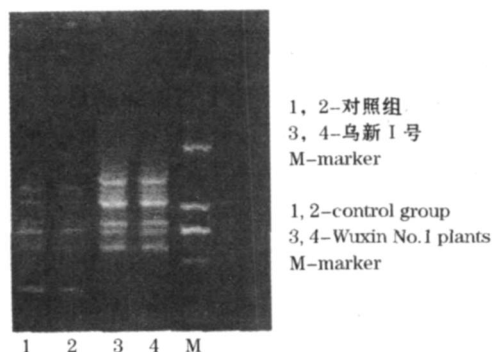


图 3 引物 T13765 产生的 ISSR 图

Fig. 3 ISSR Patterns generated by primer T13765

4 讨论

命名为乌新 1 号甘草新物种是直接从野生甘草中常规选育出来的优良品种,本实验研究了其生理特性和基因稳定性。种子萌发是植物生长周期的开始阶段,发芽率和活力指数是评价种子质量的重要指标。研究乌新 1 号的发芽过程并与对照组相比,表明乌新 1 号可溶性蛋白量产生了变化。作为种子成分的主要部分,可溶性蛋白在种子萌发期间由于代谢活力的增加可能经历相当大的变化^[4],萌发期间的可溶性蛋白的变化结果表明,可溶性蛋白波动如“V”字形。胞内或者胞外的过氧化物酶在植物细胞抗氧化反应和植物呼吸作用、光合作用中具有重要作用^[5,6]。据报道植物种子的生存能力和过氧化物酶有密切联系^[7]。高文远等^[8]报道了在种子萌发期间甘草的过氧化物酶活性随着时间增加,本实验过氧化物酶活性显示乌新 1 号具有较高活性。通过分子标记简单序列重复技术(ISSR)进行多态性分析,在所使用的 22 条随机引物中,6 条随机引物产生了不同 DNA 条带,表 2 显示了 ISSR 引物序列,22 条 ISSR 引物在 300 ~ 1 000 bp 有 124 条带,每条引物扩增出 5 到 11 条带。21 条带产生了多态性占

多样性的 16.9%,多态性是由于扩增条带的丢失和增加引起的。引物 T13765 扩增出 7 个条带,其中两条产生了多态性。相对于对照组,乌新号在 350 bp 产生了一个额外的条带并且在 50 bp 缺失了一条带。表明乌新号甘草与对照组相比产生了基因多态性变化,乌新号和对照组在基因数量、大小,以及 DNA 扩增片段密度上有本质的区别。生理特性分析结合 ISSR 分析表明乌新号和野生物种是不同基因类型,这些变化表明乌新号是一个具有前景的品种,并且能在将来广泛应用。

前期对乌新号甘草主要生物活性成分的量进行分析,结果表明乌新号甘草一年生根中甘草酸、甘草苷和甘草多糖的量分别是同期野生的 2.44、1.25、1.26 倍,而且在乌新号中检出了甘草次酸,而在野生的一年生甘草中未检出甘草次酸^[2]。李慧超等^[9]测定了内蒙古扎鲁特地区栽培的甘草一年生根中甘草酸的质量分数为 3.93 mg/g,要低于乌新号的 4.45 mg/g,乌新号中甘草苷的量和内蒙古赤峰 3 年生甘草中甘草苷的质量分数相当,这些说明所选育的乌新号其主要生物活性成分积累速度较快。

本实验研究乌新号种子的发芽率和活力实验表明,其种子的发芽率、活力和萌发中的过氧化物酶

的活性要明显高于野生的对照组,前期研究表明乌新号甘草根中的主要生物活性成分的量也高于野生甘草,这克服了一些甘草种植栽培中的关键问题,预示着乌新号具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99: 317-324.
- [2] 李克峰,高文远,陈海霞. 选育甘草乌新号主要生物活性成分的含量分析 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32 (5): 447-448.
- [3] Paterson A, Brubaker C, Wendel J. A rapid method for extraction of (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11 (2): 122-127.
- [4] Vardhini V B, Rao R. S. S. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum [J]. *Plant Growth Regulat*, 2003, 41: 25-31.
- [5] Sharma P, Dubey R. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. *Plant Growth Regulat*, 2005, 46: 209-221.
- [6] Radotic K, Ducic T, Mutavdzic D. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium [J]. *Environ Exper Bot*, 2000, 44: 105-113.
- [7] 汤菊香,李广领,彩改玲,等. 花生种子活力与生理生化性态关系的研究 [J]. *河南农业大学学报*, 2005, 39 (3): 300-303.
- [8] 高文远,李志亮,尚培根. 甘草种子萌发初期过氧化酶的研究 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23: 212-219.
- [9] 李慧超,于淑华,闫凤杰,等. 高效液相色谱法测定野生甘草及栽培甘草中甘草酸的含量 [J]. *中国药事*, 2002, 16 (5): 304.

白术不同采收期内酯、和量的动态变化研究

白岩^{1,2},陈磊¹,王晓妮¹,杨潮锋¹,何福基¹,田薇¹

(1. 浙江林学院林业与生物技术学院,浙江 临安 311300; 2. 河北农业大学农学院,河北 保定 071001)

摘要:目的 以白术内酯、和量的量作为指标,考察不同采收期白术内酯量的动态变化,为其标准化栽培及采收加工技术提供科学依据。方法 采用 HPLC 法测定白术中的 3 种内酯成分。白术内酯和色谱柱: xBridge-C₁₈ 柱;流动相:甲醇-水(65:35);检测波长:220 nm;体积流量:1.0 mL/min;白术内酯色谱柱: Kromasil-C₁₈ 柱;流动相:甲醇-水(80:20);检测波长:276 nm;体积流量 0.6 mL/min。结果 白术内酯、和平均回收率分别为 103.52%、88.16%和 99.61%;RSD 分别为 0.37%、1.8%和 0.16%。不同采收期白术内酯、和量的变化与采样时期具有相关性。结论 白术中白术内酯量最高的时期在 5 月下旬至 6 月上旬摘蕾前。

关键词:白术内酯;白术内酯;白术内酯;高效液相色谱法;采收期

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)01-0129-03

白术始载于《神农本草经》,被列为上品,以菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz 的二年生干燥根茎入药^[1],为“浙八味”之一。白术具有燥湿利水、和胃安胎的功效,其内酯类

成分具有较强的增强唾液淀粉酶活性的作用^[2],可调节胃肠道功能以及促进营养物质的吸收^[3],为白术的主要活性成分。本研究利用 HPLC 法对不同采收时期白术根茎中内酯类成分进行测定,明确白

收稿日期:2009-03-10

基金项目:白术良种选育中其药效成分的定量控制(20070947)

作者简介:白岩(1977-),女,吉林长春人,浙江林学院林业与生物技术学院讲师,博士,主要从事中药资源开发与利用、药用植物栽培与药用植物生理的研究和教学工作。Tel:(0571)63741273 Fax:(0571)63741273 E-mail: baiyan814@yahoo.com.cn