

大盘山自然保护区白术种质资源遗传特征研究

郑建树¹, 陈斌龙², 陈莉¹, 郭卫东¹, 陈秉初^{1*}

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

2. 磐安县农业局中药材研究所, 浙江 磐安 322304

摘要: **目的** 研究大盘山自然保护区内不同品系白术之间的形态学特征、遗传多样性基础, 为保护和选育优质种质资源奠定基础。**方法** 对 11 个品系的白术样品进行了形态学、生理学比较分析, 并利用 ISSR 分子标记技术分析其遗传多样性, 通过 UPCMA 法进行聚类分析。**结果** 11 份白术样品在叶片形状、叶色、根茎形态、产量、抗病性方面存在很大的差异, 且这些差异并没有一定的相关性; 各品系白术的光合速率也存在显著的差异, 且产量和光合速率间高度相关。筛选出的 15 条 ISSR 引物共检测得到 129 个位点, 其中 107 个为多态性位点, 占 82.95%, 聚类分析表明白术各品系之间都发生了一定程度的分化现象, 个别品系之间遗传分化现象严重。**结论** 大盘山白术资源丰富, 各品系间具有一定遗传差异基础, 为选育优质白术资源提供基础。

关键词: 白术; 大盘山; 形态学特征; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2011)11 - 2300 - 05

Inheritance characteristics of germplasm resources of *Atractylodes macrocephala* in Dapan Mountain national natural reserve

ZHENG Jian-shu¹, CHEN Bin-long², CHEN Li¹, GUO Wei-dong¹, CHEN Bing-chu¹

1. College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicinal Materials, Agricultural Bureau in Pan'an County, Pan'an 322304, China

Abstract: Objective To study the morphological characteristics and genetic diversity of *Atractylodes macrocephala* from different varieties, in order to protect and select the germplasm resources and optimize the cultivated technology. **Methods** The inter-simple sequence repeat (ISSR), morphological characteristics, and physiology were used to analyze the genetic diversity among 11 varieties of *A. macrocephala* in Dapan mountain, a national natural reserve in Zhejiang Province and the cluster analysis was performed by UPCMA method. **Results** The varieties differed greatly in leaf-shape and leaf-color, stem and rhizomatous configuration, production and disease resistance, and no correlation was observed in these differences. However, in all samples, the photosynthesis rate was closely correlated to the biomass production, despite the great differences existing among different varieties. Simultaneously, fifteen screened ISSR primers were served as ISSR-PCR markers, and 129 sites were amplified, which included 107 polymorphic sites (82.95% of the total bands). At molecular level, the genetic differentiations occurred among 11 varieties, some differentiations were quite distinctive according to cluster analysis. **Conclusion** The germplasm resources of *A. macrocephala* are abundant and the genetic diversity basis exists in all kinds of *A. macrocephala* in Dapan mountain.

Key words: *Atractylodes macrocephala* Koidz.; Dapan mountain; morphological characteristics; ISSR markers; genetic diversity

白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 原名“术”, 菊科多年生草本, 主产于浙江、湖南、江西等地, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎等功效, 是我国高配方频度的大宗常用中药材之一^[1-4]。

浙江磐安是中国药材之乡, 其产白术被列为珍品, 素有“北参南术”之誉, 为浙江“八味”之一。白术历来种植材料混杂、谱系不清, 尚无固定品种, 以致其根茎药性规格质量参差不齐, 影响中药疗效、

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 浙江省科技厅项目 (2008c23069)

作者简介: 郑建树 (1983—), 男, 浙江温州人, 浙江师范大学化学与生命科学学院植物生物技术方向研究生。E-mail: zhengjs009@yahoo.cn

*通讯作者 陈秉初 E-mail: sky23@zjnu.cn

经济效益和国际竞争力。为选育优良白术品种，有效地保护种质资源，非常有必要开展种质资源遗传和分化特征研究。

本研究采用 ISSR 标记技术^[5-12]从遗传背景出发，结合白术生物学特征及光合生理特征，了解不同品系白术的遗传多样性，评价种质材料之间的差异，为选育优质白术品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

样品取自浙江省磐安县大盘山中药材种植基地，11个具有表观特征差异的白术品系经过多年观察筛选获得。

LI-6400XT 光合仪，Eppendorf Centrifuge 5417R 离心机，BIO-RAD S10000 Thermal Cycler PCR 仪，Bio-Rad Universal Hold I 凝胶成像分析仪。

1.2 方法

1.2.1 生物学特征和光合生理指标的测定 观察并描述各品系叶片的形状、叶色、以及茎和块根的形态，每样品选取 50 株测定单个块茎的平均质量(产量)，并用叶片病斑的多少来表示各品系抗病性大小。同时，以当年生春梢顶第 2 片完全展开叶为测定叶，测定光合速率，每个样品 15 个重复。数据用 SPSS15.0 分析软件进行多重比较方差分析，并根据 Duncan's 和 One way ANOVA 法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)

1.2.2 DNA 的提取 基因组 DNA 采用改良的 CTAB 法进行提取。取 0.5 g 叶片，加入液氮研磨后移入 10 mL 离心管中。加入 3.5 mL CTAB 抽提液 (2% CTAB, 0.1 mol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, pH 8.0)，和 70 μ L β -巯基乙醇混匀，65 $^{\circ}$ C 保温 40 min，每隔 10 min 混匀 1 次；加入等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 溶液，颠倒混匀，15 $^{\circ}$ C，11 000 r/min，5 min；移出上层水相，加入 1/10 体积 CTAB-NaCl 溶液 (10% CTAB, 0.7 mol/L NaCl)，用等体积氯仿-异戊醇溶液抽提，11 000 r/min 离心 5 min；移出上层水相，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置 10 min，11 000 r/min 离心 5 min 收集沉淀；用 500 μ L TE 缓冲液溶解沉淀，将溶液移至 1.5 mL 离心管中，加等体积氯仿-异戊醇溶液，11 000 r/min 离心 5 min，取上清。加入 1/10 体积 NaAc 及等体积异丙醇，混匀，11 000 r/min 离心 5 min 收集沉淀，沉淀在 70%乙醇中漂洗，晾干，溶于 TE，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 ISSR 引物合成 根据 British Columbia 大学 (加拿大) 公布的 ISSR 引物序列设计^[13]，由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 PCR 扩增条件及程序 根据磐安白术、实验试剂、器材等自身特点，参考马辉等^[14]PCR 体系，在单因素设计的基础上，均匀设计，最后确定各成分的最佳浓度：在 25 μ L 反应体系中，含 5.0 ng/ μ L 模板 DNA、0.4 mol/L 随机引物、2.5 μ L 10 \times 缓冲液 (含 Mg^{2+})、0.2 mmol/L dNTPs、0.3 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)，加无菌超纯水使总体积达到 25 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，然后进行 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、不同退火温度 (视 ISSR 引物退火温度而定) 下退火 120 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s 的循环反应，共 35 个循环，最后于 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min，4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应在梯度 PCR 仪上进行，试剂均购自宝生物工程技术有限公司。

1.2.5 PCR 产物的电泳检测 扩增产物采用 2%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，电泳缓冲液为 1 \times TAE，采用凝胶成像分析仪进行图像处理。

1.2.6 数据分析 根据 ISSR 扩增谱带在相同电泳迁移率 (相同相对分子质量片段) 的有无统计得到所有位点的二元数据，有 DNA 扩增带记为“1”，无带记为“0”。利用 SPSS 15.0 软件计算不同样品间的多态性位点数，并按 UPGMA 法 (非加权配对算术平均法) 对所有样品进行聚类分析，构建亲缘关系图。

2 结果与分析

2.1 白术资源品系形态学特征

对 11 个白术品系的基本形态学如：叶片的形状、叶色、以及根茎形态等进行观察，测定各自的产量及抗病性 (表 1)。结果表明，各品系在形态学上表现出很大的差异性。叶片形状上存在叶缘细裂、中裂、深裂 3 种叶形；茎的形态上具有单、双、多秆之分；存在 3 种形态的块根，分别为蛙状、狗头状和武状；而叶色也有深、浅之分，并且在基本形态学上并没有一定的相关性，在产量跟抗病性上也存在很大的差异，并且白术各品系的基本形态学跟产量、抗病性大小之间也没有显示一致的相关性，因此，不能从单一的形态学上来判断各种白术品质的好坏。

2.2 白术品系光合速率

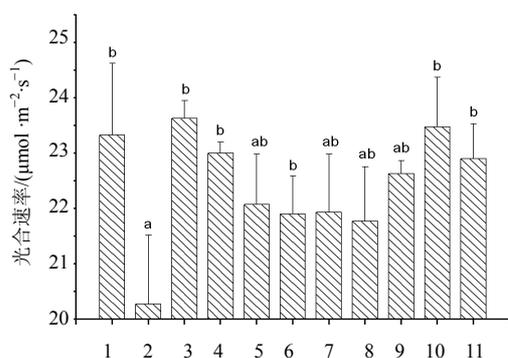
从图 1 中可知，不同白术品系在光合速率上存在显著性差异，同时，利用 SPSS 15.0 分析软件分析白

表 1 大盘山白术资源品系形态学特征

Table 1 Morphological characteristics of *A. macrocephala* in Dapan mountain

编号	叶片形状	叶色	茎形态	块根	产量/g	抗病性
1	细裂	浅绿	多杆	武状	440.00±11.51	++
2	细裂	浅绿	二杆	狗头状	175.00±13.22	++
3	中裂	浅绿	多杆	蛙状	525.00±16.48	+++
4	中裂	深绿	多杆	武状	415.00±12.16	++
5	中裂	深绿	多杆	武状	375.00±14.67	++
6	细裂	深绿	多杆	狗头状	216.00±12.80	++
7	深裂	深绿	单杆	蛙状	147.00±15.34	+++
8	细裂	深绿	多杆	蛙状	216.00±11.94	++
9	中裂	浅绿	多杆	蛙状	335.00±14.37	+++
10	细裂	浅绿	多杆	武状	385.00±15.66	+++
11	中裂	浅绿	多杆	武状	420.00±14.29	+++

“+++”-叶片的病斑数 0~5 “++”-叶片的病斑数 6~10
 “+++”-lesion spots of blade 0—5 “++”- lesion spots of blade 6—10



不同的小写字母表示不同品系之间差异显著 ($P < 0.05$)
 Different lowercase letters indicate significant difference among different varieties of *A. macrocephala* ($P < 0.05$)

图 1 白术 11 种品系的光合速率

Fig. 1 Photosynthesis rate of 11 varieties of *A. macrocephala*

术各样品产量跟光合速率之间的相关性, 结果表明它们之间存在高度相关, 相关系数为 0.842, $P < 0.01$ 。

2.3 白术 ISSR 扩增产物多态性分析

采用 ISSR 分子标记技术对白术 11 份植物材料的亲缘关系进行分析, 从 100 条引物中选取扩增条带清晰、重复性好、可获得 4 个以上扩增片段的引物作为候选引物 (UBC808、UBC815、UBC817、UBC818、UBC826、UBC30、UBC34、UBC835、UBC836、UBC841、UBC855、UBC856、UBC858、UBC866、UBC873) 共 15 条用于白术 ISSR 分析。对 11 个白术品系进行 ISSR 扩增, 获得清晰的扩增条带, 而且多态性丰富 (图 2)。15 条引物共检测得到 129 个位点, 其中具有 107 个多态性位点, 约

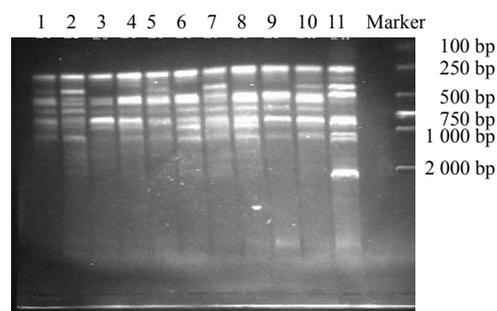


图 2 ISSR 引物 UBC817 对白术 11 个品系的扩增结果

Fig. 2 PCR results of 11 varieties of *A. macrocephala* by using ISSR primer UBC817

占 82.95%。扩增产物条带大小主要集中在 200~2 000 bp。其中, 以引物 UBC836 扩增出条带最多, 共检测到 12 个位点, 多态性比率 91.67%, 另外 UBC834、UBC841、UBC855、UBC866 多态性比率均高达 100% (表 2)。从表 3 可知, 两个样品间的多态性位点数在 24~62, 其中, 2 号样品跟 6 号样品之间的多态性位点数为 24 个, 遗传相似性最近, 而 11 号样品与 3 号和 9 号的多态性位点同为 62 个, 说明他们之间的遗传分化程度最大。

2.4 白术 ISSR 聚类分析

运用 SPSS 15.0 分析软件按照 Pearson correlation's interval measure 和 Between-groups linkage's method 的步骤^[15], 构建白术 11 个品系的聚类分析图 (图 3)。从 11 个品系的树状聚类图可以看出, 当遗传距离为 25 时, 11 份白术样品可明显分为 2 个大类群, 其中第 11 份材料跟其他品系间具有明

表 2 15 条不同的 ISSR 引物及扩增结果

Table 2 Amplification of 15 ISSR primers on *A. macrocephala*

引物	引物序列 (5'-3')	退火温度/°C	扩增总带数	多态性带数	多态性位点率/%
UBC808	(AG) 8T	51.0	6	5	83.33
UBC815	(CT) 8A	45.7	10	9	90.00
UBC817	(CA) 8T	52.9	11	7	63.64
UBC818	(CA) 8G	50.7	9	7	77.78
UBC826	(TG) 8A	46.9	8	5	62.50
UBC830	(AG) 8YA	48.0	9	7	77.78
UBC834	(GA) 8YT	51.7	7	7	100.00
UBC835	(CT) 8RA	48.7	10	7	70.00
UBC836	(CT) 8RG	50.0	12	11	91.67
UBC841	(CA) 8RT	48.0	8	8	100.00
UBC855	(AC) 8YT	56.0	7	7	100.00
UBC856	(AC) 8YA	48.0	6	5	83.33
UBC858	(TG) 8RT	54.1	7	5	71.43
UBC866	(CTC) 6	58.7	11	11	100.00
UBC873	(GGAT) 4	55.0	8	6	75.00

表 3 白术不同品系间的多态性位点数

Table 3 Amount of polymorphic sites in 11 varieties of *A. macrocephala*

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	26	39	40	34	36	40	41	51	37	51
2		-	35	40	34	24	34	37	51	41	43
3			-	39	47	29	43	30	52	52	62
4				-	44	36	52	41	49	53	53
5					-	40	38	41	47	25	49
6						-	38	29	49	43	47
7							-	37	45	31	43
8								-	46	42	50
9									-	44	62
10										-	48
11											-

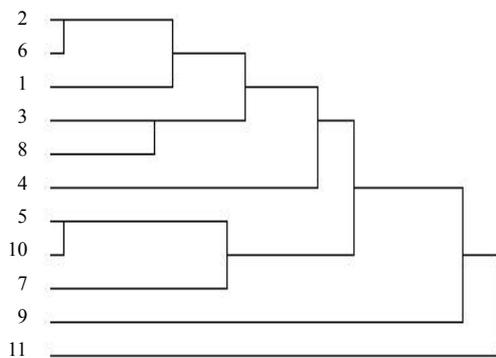


图 3 白术 11 品系水平聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram in 11 varieties of *A. macrocephala*

显的差别；当遗传距离为 20 时，11 个样品可聚为 3 类，可将第 9 号样品单独归为一类。尽管各样品都是采集于同一地区，但在分子水平上都发生了一定程度的分化，个别样品之间遗传分化现象严重。

3 讨论

白术是多年生常异花授粉植物，是“浙八味”之一，是常用的大宗药材之一^[16]。但由于白术种植混杂，品系不清，难以保证要用质量。因此，必须抓紧选育优良品种，尽快实现种植材料良种化。

磐安地区白术资源十分丰富，但不同品系之间在基础形态学、根茎质量、抗病性以及光合生理上存在广泛的差异，且各性状间又无显著相关。同时，

各白术品系在分子水平上都发生了一定程度的遗传分化现象,个别样品之间分化现象严重,多态性位点达到了 82.95%,表明白术各品系间具有一定的遗传差异基础。究其原因,可能是由于白术自然野生资源繁多,各种白术在磐安地区集中种植,田间人工驯化过程中交叉授粉,加剧了基因在不同品种间的流动,造成了磐安地区白术资源丰富的变异,更加剧了各品种间的差异及谱系混乱,甚至导致原本优良性状的严重退化。因此,不能以单一的表现性状来判断白术品质的优劣,传统以蛙形和鸡腿形为一等品,狗头状、武字、二叉等形状最差的标准^[17],已经不适合用于白术品质的判定。白术种质资源的选育应该以白术的有效成分的量如白术内酯为主要指标,在保证药用价值的前提下,结合栽培学上的抗病性和光合作用特性,进行综合分析。因此,上述白术品系的有效药用成分比较将成为下一步研究工作的重点。

为了合理开发和利用磐安地区丰富的白术资源,在保护种质资源的同时,提高栽培品种的质量,形成规范化的栽培方式,防止品种之间继续分化。开展优株选择,选育含有效成分高、且产量高,耐病等优良品种进行合理的栽培,并保存优良品种,实现白术种质资源的优良化很有必要。当地政府和药农应该加强管理,对不同品系的白术进行隔离种植,保证品种的遗传稳定性。同时,利用白术之间可以如此频繁地进行遗传分化的特征,通过遗传育种技术,获取较好的遗传改良效果^[18]。只有解决了药农的栽培品种和技术的问题,帮助他们实现可观的经济效益,才能最有效和可持续地保护大磐山自然保护区的白术种质资源。

参考文献

- [1] 龙全江,徐雪琴,胡 昀. 白术的化学、药理与炮制研究进展 [J]. 中国医药信息杂志, 2004, 11(11): 1033-1034.
- [2] 段 启,许冬谨,刘传祥,等. 白术的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 附 4-附 6.
- [3] 白 岩,陈 磊,王晓妮,等. 白术不同采收期内酯 I、II 和 III 量的动态变化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 129-131.
- [4] 付顺华,陈斌龙,何福基,等. 白术植株性状的相关性研究 [J]. 中药材, 2003, 26(10): 695-697.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [6] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. ISSR amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780-792.
- [7] Kojima T, Nagaoka T, Noda K, *et al.* Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 37-45.
- [8] Ratnaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, *et al.* Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 348-353.
- [9] 张福生,郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [10] 许永华,张爱华,金 慧,等. 人参种源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1164-1167.
- [11] 欧立军,颜 旺,廖亚西,等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 353-357.
- [12] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1311-1320.
- [13] 徐 莉,赵桂仿. 微卫星 DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 714-722.
- [14] 马 辉,张智俊,罗淑萍,等. 药用植物白术 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究 [J]. 新疆农业科学, 2009, 46(1): 40-45.
- [15] 张 力. SPSS 13.0 在生物统计中的应用 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2006.
- [16] 庄文庆. 药用植物育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1993.
- [17] 何福基,陈斌龙,何浩亮,等. 白术主要性状遗传分析与优良产地和优株选择 [J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(5): 524-529.
- [18] 斯金平,童再康. 厚朴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.