

苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.) 种内遗传多样性分析*

朱晓琴 贺善安

(江苏省植物研究所江苏省植物迁地保护重点实验室, 南京 210014)
中国科学院

摘要 分析了苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.) 5种等位酶(MDH, GDH, PPO, SOD, PER) 12个位点上25个等位基因的分化特征。结果表明: 群体内多态位点比例平均为0.61, 每个位点的平均杂合率为0.26, 每个位点发现的平均等位基因数为1.78。苍术种内基因多样性的86%产生在群体内, 群体间分化的明显效果为14%。所有配对组合, 群体间的平均遗传距离是0.11, 遗传同一性是0.90。说明苍术种内变异很大。同时探讨茅苍术的分类位置, 认为茅苍术不是苍术和白术的杂交种。

关键词 苍术; 等位酶; 遗传多样性

Genetic diversity in populations of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. Zhu Xiao-Qin and He Shan-An (The Provincial Key Laboratory for Plant Ex Situ Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and Academia Sinica, Nanjing 210014), *J. Plant Resour. & Environ.* 1995, 4(2): 1~6

Populations of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. from different provenances were determined for the genetic variations of 25 alleles at 12 loci coding for five allozymes (MDH, GDH, PPO, SOD, PER). The average percentage of polymorphic loci within populations was 0.61, whereas the number of alleles per locus averaged 1.78. The mean value of the average expected heterozygosity for all samples were 0.26. Based on the values obtained by Nei's genetic diversity index, the G_{st} was 14%. It indicated that the majority of genetic variations was distributed within populations. The mean value of Nei's genetic identity for pairwise comparisons of populations was 0.90, while the mean genetic distance was 0.11. In addition, based on the result of allozyme study of this paper, it seemed that the population of Maocangzhu in Jiangsu Province belongs to *A. lancea*.

Key words *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; allozyme; genetic diversity

苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)是菊科苍术属植物, 多年生草本。其干燥根茎为常用中药, 有多种药效^[2]。苍术在中国的分布范围很广, 是变异很大的多型性种^[3]。近年的研究表明, 苍术种内各种源间的形态、解剖结构以及根茎挥发油化学成分等方面具有明显差异。

中药材的种内变异, 主要是同种药材不同群体间的差异, 是影响中药材品质和质量标准化的根本原因。本研究的目的在于: 运用等位酶方法, 分析苍术种内遗传多样性, 明确各种源(群体)间和个体间的变异性质和变异幅度, 为制定药材质量标准, 科学地进行栽培开发, 以

及实行有效的资源保护提供理论依据。

1. 材料与方 法

1.1 实验材料

4个种源的苍术植株采自江苏省金坛县薛埠(以 Xu 表示)、安徽省太平县游山(Hu)、湖北省随州市草店乡(Ca)和湖北省罗店(Lu)。栽培白术(*A. macrocephala* Koidz.)产于浙江省临安县於潜(Li)。另外还对以江苏金坛薛埠苍术为母本,上述白术为父本所得的杂种 F₁代植株(Hy)进行了分析。

1.2 方 法

共分析了5种酶系统,分别是:苹果酸脱氢酶同工酶(MDH)、谷氨酸脱氢酶同工酶(GDH)、多酚氧化酶同工酶(PPO)、超氧化物歧化酶同工酶(SOD)和过氧化物酶同工酶(PER)。MDH, GDH, PPO 分析个体数(株)分别为: Xu 19, Hu 12, Lu 13, 白术4, 苍术与白术的杂种 F₁ 4; SOD 分析个体数(株): Xu 9, Hu 9, Lu 7, 白术4, F₁ 4; PER 分析个体数(株): Xu 25, Hu 12, Lu 15, Ca 17, 白术10, F₁ 6。PER 的分析,于7~8月孕蕾期采集样品,其余4种酶的样品于5月营养生长期采集,均取主茎中部全展叶。酶提取方法基本参照 Wendel and Parks^[13]。聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳参考 He^[10]的方法。染色方法参照 He^[10]和王敦元^[4]的方法。

2. 结果与分 析

2.1 苍术群体内的遗传变异

2.1.1 3个苍术群体(Xu, Lu, Hu)等位酶基因位点频率 对苍术3个群体5种等位酶的12个位点上的25个等位基因进行分析,得出各等位基因在不同群体中的频率分布(表1),表现差异最大的在于 PER 的位点。

2.1.2 群体内遗传变异分析 采用4个常用的遗传变异量^[7,9]:每个基因位点期望的杂合性(h);所有基因位点总的平均杂合性(H);群体多态基因位点比例(P);每个基因位点被发现的等位基因数(A/L)。分析结果见表2。可以看出,苍术群体内变异性大,杂合性水平高,所测试的5种酶系统都是有变异的酶种。各群体间的杂合性程度很相似。所有位点全部样品期望杂合性(H)的变化范围平均为0.26,每个位点被发现的等位基因数(A/L)平均为1.78,多态位点比例(P)的平均值是0.61。

2.2 苍术群体间的遗传分化

2.2.1 多基因位点的平均分化程度 根据 Nei(1973)^[11]把总的基因多样性(Ht)划分为它的组成部分,即群体内基因多样性和群体间基因多样性(Dst),而群体间遗传分化的相对量(Gst)用公式 $Gst = Dst/Ht = (Ht - Hs)/Ht$ 计算,得出苍术总的基因多样性为0.41。群体内基因多样性为0.34,比之群体间平均基因多样性(Hs)的0.07要大得多(见表3)。因此,群体间的基因分化指数为0.14。也就是说,总基因多样性的14%来源于群体间基因差异,86%属于群体内的遗传分化。

表1 苍术各群体不同基因位点上等位基因频率
Tab 1 Allelic frequencies of the three *A. lancea* populations

位点 Locus	等位基因 Allele	群体 Population*			位点 Locus	等位基因 Allele	群体 Population*		
		Xu	Hu	Lu			Xu	Hu	Lu
MDH-1	a	1.00	1.00	1.00	PER-1	a	0	0	0
MDH-2	a	0.47	0.32	0.24	PER-1	b	0.03	1.00	0.13
	b	0	0.26	0.15		c	0.97	0	0.87
	c	0.53	0.42	0.46		PER-2	a	0.88	0.50
	d	0	0	0.15	PER-2	b	0.12	0.50	0.67
GDH-1	a	0.22	0.33	0.36	PER-3	a	0.38	0.30	0.46
	b	0.78	0.67	0.64	PER-3	b	0.48	0.60	0.25
PPO-1	a	0.50	0.63	0.82	PER-3	c	0.14	0.10	0.29
	b	0.50	0.37	0.18	PER-5	a	0.50	0.50	0.57
PPO-2	a	1.00	1.00	1.00	PER-5	b	0.50	0.50	0.43
PPO-3	a	1.00	1.00	1.00	PER-6	a	1.00	1.00	0.90
SOD-1	a	1.00	0.96	1.00	PER-6	b	0	0	0.10
	b	0	0.04	0					

*Xu—江苏金坛县薛埠 Xuebu, Jiangsu; Hu—安徽太平游山 Taiping, Anhui; Lu—湖北罗店 Luodian, Hubei

表2 苍术各群体等位酶位点的遗传变异
Tab 2 Genetic variability at 12 loci for 3 populations of *A. lancea*

	群体 Population*			平均数 \bar{x}	标准误 δ
	Xu	Hu	Lu		
期望杂合性(h) Expected heterozygosity (h)					
MDH-1	0	0	0	0	—
MDH-2	0.50	0.65	0.69	0.61	0.100
GDH-1	0.34	0.44	0.46	0.41	0.064
PPO-1	0.50	0.47	0.30	0.42	0.108
PPO-2	0	0	0	0	—
PPO-3	0	0	0	0	—
SOD-1	0	0.08	0	0.03	0.046
PER-1	0.04	0	0.22	0.09	0.114
PER-2	0.32	0.50	0.44	0.38	0.158
PER-3	0.58	0.54	0.64	0.59	0.050
PER-5	0.50	0.50	0.49	0.50	0.006
PER-6	0	0	0.18	0.06	0.104
平均杂合性(H) Mean heterozygosity	0.23±0.245	0.27±0.268	0.29±0.257	0.26	0.031
多态位点比例(P) Percentage of polymorphic loci**	0.58	0.58	0.67	0.61	0.052
各位点发现等位基因数 Mean number of alleles/locus(A/L)	1.67	1.75	1.92	1.78	0.128

*Xu—江苏金坛县薛埠 Xuebu, Jiangsu; Hu—安徽太平游山 Taiping, Anhui; Lu—湖北罗店 Luodian, Hubei

**出现2个以上等位基因的位点被看作为多态位点。 A locus is considered polymorphic if more than one allele were detected.

表3 苍术群体间的遗传多样性与分化

Tab 3 Genetic diversity and differentiation among populations of *A. lancea*

位点 Locus	总的基因多样性 Ht	群体内基因多样性 Hs	群体间基因多样性 Dst	群体间基因分化指数 Gst
MDH-2	0.64	0.61	0.03	0.05
GDH-1	0.42	0.41	0.01	0.02
PPO-1	0.46	0.42	0.04	0.09
SOD-1	0.03	0.03	0	0
PER-1	0.47	0.09	0.38	0.81
PER-2	0.49	0.38	0.11	0.22
PER-3	0.63	0.59	0.04	0.06
PER-5	0.50	0.50	0	0
PER-6	0.06	0.06	0	0
平均数 \bar{x}	0.41	0.34	0.07	0.14
标准误 s	0.220	0.227	0.122	0.261

2.2.2 苍术不同群体间的遗传距离(D)和遗传同一性(I)

运用 Nei(1973)^[12]的方法计算遗传距离这一重要的群体分化程度指标,结果见表4。

3个苍术群体两两之间的遗传同一性的平均值为0.90,遗传距离平均为0.11。

2.2.3 过氧化物酶同工酶酶谱的二维排序

苍术、白术以及苍术与白术的杂种 F_1 的 MDH、GDH、PPO、SOD 酶都没有差异,但部分白术以及苍术与白术的杂种 F_1 个体的 PER 酶谱中出现一条苍术所没有的酶带。PER 各条酶带在不同群体中的出现频率见表5。从表3也可看出,绝大多数位点都表现出群体内多样性 H_s 远大于群体间多样性 D_{st} 的趋势,只有 PER-1 位点例外。PER-1 位点正是苍术与白术两个种在已分析酶种中唯一表现出酶带差异的位点。而且苍术群体间表现差异最大的酶种就是 PER。因此有必要对 PER 同工酶在不同群体中的表现进行更细致的分析。参考 Gu Yin *et al.*^[8]的方法,计算江苏金坛苍术群体(Xu),湖北苍术群体(Lu, Ca),安徽太平苍术群体(Hu)以及白术(Li)之间的距离系数,并在此基础上进行二维排序。排序结果见图1。

通过计算,排序间距与距离系数之间的相关系数为0.79,达到极显著水平,说明排序结

表4 苍术群体间的遗传距离(D)和遗传同一性(I)

Tab 4 Nei's measure of genetic distance (D) and identity (I) between three populations of *A. lancea*

遗传同一性 Identity (I)	遗传距离 Distance (D)		
	Xu	Hu	Lu
Xu	—	0.14	0.06
Hu	0.87	—	0.12
Lu	0.94	0.89	—

Xu—江苏金坛县薛埠 Xuebu, Jiangsu; Hu—安徽太平游山 Taiping, Anhui; Lu—湖北罗店 Luodian, Hubei

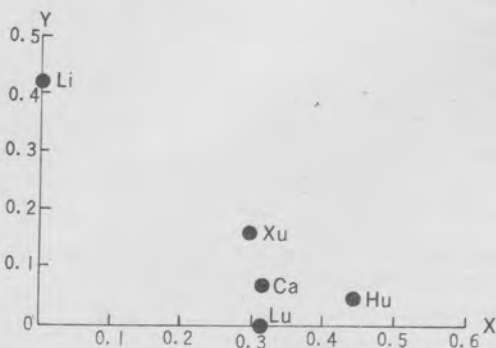


图1 苍术 PER 酶谱的二维排序

Fig 1 Two-dimensional gradient analysis of PER in *A. lancea*

Xu—江苏薛埠 Xuebu, Jiangsu; Hu—安徽太平 Taiping, Anhui; Lu—湖北罗店 Luodian, Hubei; Ca—湖北草店 Caodian, Hubei

果没有失真。结果表明, 湖北两个苍术群体之间的酶谱距离最小; 4个苍术群体中, 江苏金坛茅苍术与其他3个苍术群体关系紧密, 它与白术的亲缘关系比其他苍术群体更近, 而且, 这一排序结果与遗传距离一致。

表5 苍术各群体中 PER 酶带的出现频率

Tab 5 Frequencies of PER bands in different population of *A. lancea*

酶带编号 Band No.	迁移率 Rf	频率 Frequency*					
		Xu	Hu	Lu	Ca	Li	Hy
1	0.62	0	0	0	0	0.50	0.33
2	0.60	0.04	0	0.07	0	0.80	0.50
3	0.57	0.72	0.42	0.27	0	0.80	1.00
4	0.53	0.64	0.58	0.13	0.29	0.40	0.50
5	0.51	0.12	0.58	0.07	0.35	0	0.50
6	0.48	0.56	0.25	0.53	0.71	0.40	0.67
7	0.45	0.56	0.58	0.27	0.29	0.20	0
8	0.44	0.20	0.17	0.33	0	0	0
9	0.31	0.16	0.08	0.33	0	0	0
10	0.25	0.56	0.83	0.87	0	0	0
11	0.23	0.28	0	0	0	0	0
12	0.21	1.00	0.58	0.40	0.24	1.00	0.83
13	0.16	1.00	0.75	1.00	0.71	0.40	0.50
14	0.15	1.00	0.75	0.87	0.94	0.90	1.00
15	0.13	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
16	0.12	0	0	0.27	0	0.30	0
17	0.11	0.48	0.67	0.54	0.53	0.40	0
18	0.06	0.28	0.17	0.07	0.71	0.40	1.00
19	0.04	0.52	0.67	0.54	0.76	0.50	0.50
20	0.02	0.56	1.00	0.80	0.88	0	0

* Xu——江苏金坛县薛埠 Xuebu, Jiangsu; Hu——安徽太平游山 Taiping, Anhui; Lu——湖北罗店 Luodian, Hubei; Ca——湖北随州草店 Caodian, Suizhou, Hubei; Li——白术产浙江临安於潜 *A. macrocephala* of Linan, Zhejiang; Hy——栽培苍术与白术杂交种 Hybrids between *A. lancea* and *A. macrocephala*。

3. 讨 论

3.1 苍术的种内变异

根据对3个苍术群体5个酶系统中12个位点的25个等位基因的资料分析结果, 认为苍术是多态性物种。从遗传多样性参数来看, 苍术各群体内的基因丰富程度和遗传变异水平都较高。种内遗传变异中, 群体内杂合性为0.34, 占总变异的86%, 群体间杂合性为0.07, 占14%。说明群体内基因多样性比群体间基因多样性大, 同时后者的变异水平对于苍术种内群体来说也达到相当高的程度。Haufler⁽⁹⁾认为, 种内个体可行杂交的种, 其独立的群体包含大部分的种内变异; 自交种则在群体间存在广泛的变异。苍术的这种现象正是其自身繁育特性的反映。群体内个体变异与群体水平上的繁育系统密切相关, 繁育系统会调节基因重组程度, 遗传重组程度又与群体内个体变异程度直接相关联。苍术的交配系统是常异花授粉性, 以及其连续分布的特点, 使基因较易流动, 从而形成了群体内遗传变异大于群体间的现象。

但同时也应注意到, 苍术的自然分布区很广。当环境条件在较大的空间有所不同时, 群

体间变异应是一个有效的适应对策。由于分布环境的异质性,地方群体要经受当地环境条件的选择压力,因此形成了种内群体间一定的分化。本研究对于遗传同一性的分析揭示了苍术不同群体间较高的相似性(平均为0.90),3个苍术群体间的平均遗传距离值(D)为0.11。大羽滋^[1]指出:“从全体平均来看,D值在地方小种间大体上是0.01,亚种间是0.1,种间是1,可以明显地看到与分类单位平行增大的现象。”对照而言,苍术群体间的差异性也是较高的。

种内变异是影响苍术药材品质的根本原因,对苍术种内遗传多样性的分析将有助于了解其群体遗传结构以及基因在群体间和群体内的分布信息。这些资料对苍术资源保护策略的制定,比如基因资源的监测、保护规模和布局以及选种育种方法和步骤等问题,提供重要理论依据,并有助于正确把握药材的品质。

3.2 茅苍术的分类位置

一般认为,苍术素(atractylodin)是苍术根茎挥发油的主要成分,苍术酮(atractylon)是白术的特征成分。因为这两个种很容易进行种间杂交,一些研究者对它们的杂交后代的判断标准就是这些成分有无^[6]。而茅苍术既含有苍术素又含有苍术酮,因此有研究者怀疑,茅苍术是苍术与白术的种间杂种^[6]。本研究表明,在蛋白质水平上,茅苍术与其他种源的苍术非常相似,而与白术差异很大。5种已分析的酶种中,苍术、白术以及苍术与白术的杂交后代仅在过氧化物酶同工酶酶谱中出现差异。通过对过氧化物酶同工酶酶谱进行二维排序,结果表明,茅苍术仍属于苍术(*A. lancea*)种。但它的系统位置可能较其他苍术种源更接近白术。由于茅苍术与白术之间的这些异同性,有必要对它们的系统关系进行更深入的研究。

传统经验认为,出产于江苏茅山地区的茅苍术质量最优,但近几十年来,由于多种人为及自然因素的影响,茅苍术资源正面临枯竭的危险。因此,对于这一珍贵的药材资源,应从理论和实践两方面同时深入研究,探求保护和发展良策。

参 考 文 献

- 1 大羽滋(赵敏等译),1983:群体遗传,科学出版社,北京.
- 2 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 1990:中华人民共和国药典一部(一九九〇年版).人民卫生出版社,化学工业出版社.
- 3 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1987:中国植物志,第七十八卷第一分册,科学出版社,北京.
- 4 王敦元,叶银芳,肖伟祥. 1983:安徽农学院学报(1):17~23.
- 5 贺善安,贺慧生,吕 晔等. 1993:植物资源与环境 2(1):1~6.
- 6 后藤胜实,泉 宏昌,布万里子等. 1988:生药学杂志 42(1):51~57.
- 7 Bruederle L P, D E Fairbrothers. 1986: *Systematic Botany* 11(4): 583~594.
- 8 Gu Y, Z D Hu, J Y Wu et al. 1991: *Cathaya* 3: 29~36.
- 9 Hauffer C H. 1985: *Systematic Botany* 10(1): 92~104.
- 10 He S A, J Y Wu, Y Gu. 1990: *Cathaya* 2: 21~28.
- 11 Nei M. 1973: *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 70: 3321~3323.
- 12 Nei M. 1973: *Amer. Natur.*, 106: 283~292.
- 13 Wendel J F, C R Parks. 1982: *Journal of Heredity* 73: 197~204.

(责任编辑:许定发)