

刘丹,刘志芳,周灿,等.湖北省不同地区茅苍术的遗传多态性分析[J].华中农业大学学报,2021,40(6):7-18.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.002

湖北省不同地区茅苍术的遗传多态性分析

刘丹¹,刘志芳¹,周灿¹,肖刚²,薛襟祺¹,王学奎¹

1.农业农村部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室/华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070;

2.湖北绿欣源农业开发有限公司,英山 438000

摘要 利用 83 对 SSR 分子标记,对 81 份茅苍术、5 份白术材料进行遗传多样性分析并构建 DNA 指纹图谱,考察 86 份材料的表型数据、药用品质、构建化学指纹图谱,探究不同材料在遗传结构上的差异,同时结合表型性状、药用品质与化学指纹图谱分析,为茅苍术的育种和应用研究提供理论依据。结果显示:83 对 SSR 引物共扩增出 420 个位点,多态性位点数占 97.14%;基于 SSR 分子标记的聚类分析遗传距离是 0.63(此时可将茅苍术与白术完全分开);对同居群材料进行群体结构遗传分析,发现遗传变异来源于群体内而不是群体间;供试材料的表型数据与药用品质数据相关性分析与聚类分析结果显示,倒 4 叶长与倒 4 叶宽、茎秆颜色、茎粗、株高之间、叶裂深度和上部分枝数之间、茎秆颜色和茎秆形状之间、茎粗和上部分枝数之间,都呈显著正相关($P < 0.05$);茎秆形状与下部分枝数之间呈显著负相关;Q 值与苍术素含量之间呈显著负相关; β -桉叶醇含量与醚浸出物含量之间呈极显著正相关;通过 HPLC 化学指纹图谱相似度比较以及共有峰峰面积量化后的聚类分析,供试材料指纹图谱相似度在 0.80~1.00,白术与茅苍术的相似度达到 0.89。结果表明:茅苍术与白术遗传背景差异较大,且茅苍术的遗传基础更加复杂,两者在活性成分间存在较大差异,但茅苍术材料间的差异相对较小;可从基因层面区分茅苍术和白术 2 个不同的品种,同时为筛选、鉴定高产、优质、抗病、高活性成分的茅苍术栽培种提供理论依据。

关键词 茅苍术; SSR 分子标记; 遗传多样性; HPLC 指纹图谱

中图分类号 S 567.21⁺1 : S 324 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0007-12

南苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 是菊科多年生草本植物,道地药材产区位于江苏茅山,也称茅苍术,现主要分布于湖北、江苏、河南等地^[1-2]。茅苍术作为我国传统大宗中药材,早在 2 000 多年前就已作为延缓衰老的药物被道家广泛使用。因其辛温、味苦,对于治疗呕恶泄泻、风湿外感、脚气、夜盲症、带下淋浊等有良好的疗效。野生茅苍术资源由于长期无序采挖已呈枯竭状态,人工栽培的茅苍术已成为苍术药材的主要来源。在茅苍术人工栽培中由于长期使用根状茎进行无性繁殖作为种源,导致茅苍术生长过程中种质退化严重,其药用部位的产量与品质出现不同程度的降低,且在遭遇高温多雨等极端天气时易发生大面积病害而成片死亡,因此,更新茅苍术的种质资源已成为茅苍术栽培中亟需解决的现实问题。良种的常规选育方式耗时长、易受外界环境影响,而利用 DNA 分子标记技术可

加快优良种质的选育进程。目前,茅苍术种质分子标记的应用研究中多采用 RAPD 标记技术,其次是 AFLP 和 ISSR 标记技术。如任冰如等^[3]、郭兰萍等^[4]、韦阳连等^[5]、李琳^[6] 和许梦云等^[7] 采用 RAPD、ISSR 或 AFLP 标记技术对茅苍术的遗传多态性及亲缘关系进行研究,为鉴别地道茅苍术提供了技术和理论支撑,但由于 AFLP 标记检测方法繁琐、费用昂贵,RAPD 标记实验的重复性差限制了其在种质资源筛选中的应用。SSR 分子标记在全基因组中分布广泛,其组成具有很高的多态性,使其成为鉴定遗传多态性、构建 DNA 指纹图谱以及鉴定品种纯度最理想的分子标记^[8],但在茅苍术上却缺乏相关研究。本研究利用多对 SSR 分子标记对来源于湖北省不同地区、不同叶型茅苍术进行多态性分析,通过群体结构分析阐明了不同地区茅苍术的遗传差异,并结合表型数据进行相关性分析,旨在为

收稿日期:2021-07-28

基金项目:国家科技部“中医药现代化研究”重点专项(2017YFC1701000;校企合作项目(0220160228)

刘丹,E-mail:930275950@qq.com

通信作者:王学奎,E-mail:wang-xuekui@mail.hzau.edu.cn

筛选高产、抗病、抗逆和活性组分含量高的茅苍术种质提供理论依据和应用参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在湖北省京山、保康和英山 3 个茅苍术规模产区收集供试材料(茅苍术、白术)的幼苗。京山和英

山的材料均为连续种植多年的栽培种,来自保康的材料有野生种和栽培种 2 类。将所有材料按地区和表观性状差异划分为 6 个群体:京山居群(京山材料)、保康 I 居群(多年栽培的野生种)、保康 II 居群(新采集的野生茅苍术幼苗)、保康 III 居群(栽培种)、英山居群(英山材料)和白术居群(白术材料)。各居群材料名称的简写如表 1 所示。

表 1 各居群中不同叶型材料

Table 1 Different leaf type materials in each population

居群来源 Population source	叶型特征代号 Code for leaf type characteristics							
京山 Jingshan	—	Jb	Jc	Jd	Je	Jf	Jg	—
保康 I Baokang I	By I a	By I b	By I c	By I d	By I e	By I f	—	—
保康 II Baokang II	—	By II b	By II c	—	By II e	—	—	—
保康 III Baokang III	Ba	Bb	Bc	—	Be	Bf	—	—
英山 Yingshan	Ya	Yb	Yc	Yd	Ye	Yf	Yg	—
白术 <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz.	—	—	—	Gd	—	—	—	BGh

注:京山、保康和英山分别用拼音首字母“J、B、Y”表示,“y I、y II”分别代表野生型 I、野生型 II,“G”代表白术,披针叶、披针裂叶、椭圆叶、椭圆裂叶、长椭圆叶、长椭圆裂叶、全裂叶、倒卵形裂叶分别用小写字母“a、b、c、d、e、f、g、h”表示。Note:Jingshan, Baokang and Yingshan represent J, B and Y using pinyin initials, Both y I and y II represent wildtype(yesheng I) and yesheng II respectively, G represent *Atractylodes macrocephala* Koidz, lanceolate leaf, lanceolate split leaf, oval leaf oval split leaf, long oval leaf, long oval split leaf, full-split leaf, obovate split leaf represent a, b, c, d, e, f, g, h respectively.

1.2 SSR 分子标记研究方法

供试材料根据其产地与叶型可归纳为 29 个群体材料,从每个群体材料中各选取 3 个单株(Gd 取 2 个单株)分别记为 1、2、3,采集 87 个单株的幼嫩叶片利用 CTAB 法^[9]提取 DNA。茅苍术叶片中含有丰富的多酚物质,为防止氧化,在提取 DNA 时利用除酚缓冲液和 β-巯基乙醇以除去叶片中酚类物质的干扰。引物来源于 Shakeel 等^[10]对茅苍术的转绿组测序数据。SSR 引物由 Primer 3.0 (V.2.3.6) 软件根据 Unigene 的碱基序列设计,引物的初步筛选使用 NCBI Primer-BLAST 5.0 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi? LINK_LOC=BlastHomeAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd)) 在线设计软件完成,筛选出符合要求的引物序列由武汉擎科生物技术有限公司合成。

引物的 PCR 扩增反应总体系为 20 μL, PCR 扩增程序为:94 °C, 5 min 预保温;94 °C, 35 s 变性;52~60 °C, 35 s 退火;72 °C, 35 s 延伸;35 个循环,最后延伸 10 min。进行 PCR 扩增时,若扩增产物条带不清晰、杂带多或不能扩增出目的片段,在原有退火温度(引物合成公司提供)上、下调整退火温度(±2 °C)重新扩增,然后选择适宜的退火温度(52~60 °C)用于实验。扩增后的 PCR 产物经聚丙烯酰

胺凝胶(PAGE)电泳检测,显色后拍照、记录带型。

1.3 表型数据及活性组分测定方法

在茅苍术的营养生长末期(7 月份)分别测定不同叶型茅苍术的倒 4 叶长、倒 4 叶宽、茎粗、株高、分枝数,调查不同叶型茅苍术茎秆形状、颜色,叶片开裂的程度。此外,使用体视显微镜观察并测定茅苍术的油室直径(μm)、油室密度(个/mm²)、油室面积与根茎面积的比(Q 值), $Q = \text{油室密度} \times \pi \times \{[\text{油室平均直径} \times 1000] / 2\}^2 \times 100\%$ 。

茅苍术中活性成分苍术素和 β-桉叶醇的制备参考《中国药典》(2015 版)的方法。苍术素(纯度 98.0%, BP0217)和 β-桉叶醇(纯度 98.0%, BP0263)对照品购自成都普瑞法科技开发有限公司。利用对照品制定的苍术素和 β-桉叶醇的标准曲线分别为: $Y = 29181x - 50.125$ ($R^2 = 0.9999$)、 $Y = 13561x - 2.8896$ ($R^2 = 0.9999$),其中 Y 为峰面积, mAU · s; x 为对照质量浓度, mg/mL, 用于后续相关活性组分的定量测定。苍术素和 β-桉叶醇分别进行精密度试验 (RSD = 0.15%/0.47%)、稳定性试验 (RSD = 0.62%/0.26%)、重复性试验 (RSD = 0.60%/0.63%) 和加样回收率试验 (RSD = 0.29%/0.88%), 说明分析方法和设备条件均满足实验要求。

精密称取供试样品干燥粉末 2.0 g, 用干燥至恒

质量的滤纸包好,置索氏提取器中,加入适量石油醚,加热回流6h,取出含供试样品的滤纸包。将滤纸包置于干燥至恒质量的蒸发皿中挥去石油醚,置于含P₂O₅的干燥器中干燥12h,再将其置于烘箱中缓慢加热至105℃并烘干至恒质量,其减少的质量为挥发性醚浸出物的质量。

1.4 化学指纹图谱的建立方法

建立化学指纹图谱时供试样品的制备与检测苍术素时供试样品的制备方法相同,采用HPLC法定性、定量分析茅苍术根茎中各活性成分的含量。分析仪器为Agilent 1260高效液相色谱仪;流动相为乙腈和水,采用梯度洗脱的方式进行洗脱。

1.5 数据的分析方法

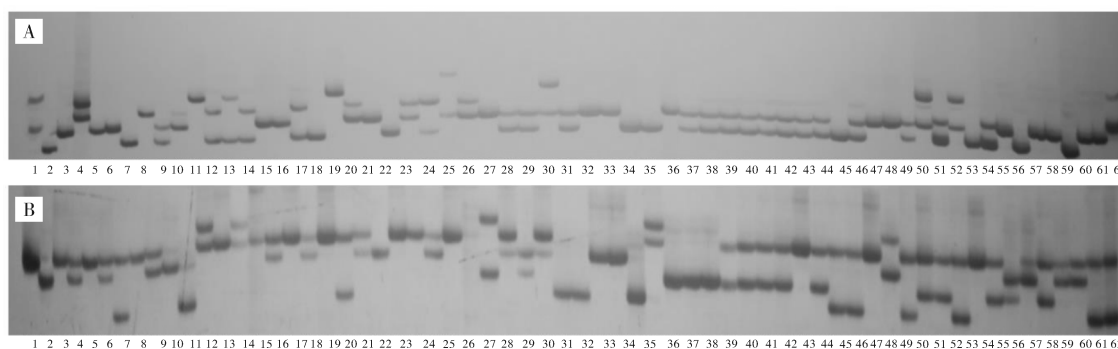
根据PCR扩增结果,每对SSR引物同一个位点上能检测到1~2个等位基因,将观测到的每个条带视为1个等位基因,显示扩增条带的赋值为“1”,无扩增条带的赋值为“0”,建立SSR分子标记的1/0矩阵,从而对86份供试材料进行分析。分子标记1/0矩阵数据采用NTsys 2.10e软件中的Similarity

程序计算遗传距离,以Clustering程序进行UPGMA遗传多样性分析和树状图聚类,用GenAIEx 6.502软件计算相关参数和主坐标分析,用POPGene 32.exe软件计算群体间的遗传距离和遗传一致度。表型数据与活性成分数据的分析采用Excel 2016和SPSS 17.0进行方差分析、相关性分析和聚类分析。化学指纹图谱分析采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(A版)进行评价,共有峰峰面积采用Excel 2016进行处理,应用SPSS 17.0软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR分子标记的多态性分析

239对SSR引物中共筛选到能扩增出条带的引物186对,其中扩增条带清晰并有多态性的引物有83对,共扩增出420个位点,多态性位点数占97.14%;说明供试材料具有较高的多态性,试验材料杂合度较高(部分供试材料SSR引物检测的多态性见图1,为部分引物的扩增结果)。



图中从左至右编号1~62分别对应材料的名称:Jb1、Jb2、Jb3、Jc1、Jc2、Jc3、Jd1、Jd2、Jd3、Je1、Je2、Je3、Jf1、Jf2、Jf3、Jg1、Jg2、Jg3、By I a1、By I a2、By I a3、By I b1、By I b2、By I b3、By I c1、By I c2、By I c3、By I d1、By I d2、By I d3、By I e1、By I e2、By I e3、By I f1、By I f2、By I f3、By II b1、By II b2、By II b3、By II c1、By II c2、By II c3、By II e1、By II e2、By II e3、Ba1、Ba2、Ba3、Bb1、Bb2、Bb3、Bc1、Bc2、Bc3、Be1、Be2、Be3、Bf1、Bf2、Bf3、BGh1、BGh2。The numbers 1-62 from left to right in the figure correspond to the material names respectively, Jb1, Jb2, Jb3, Jc1, Jc2, Jc3, Jd1, Jd2, Jd3, Je1, Je2, Je3, Jf1, Jf2, Jf3, Jg1, Jg2, Jg3, By I a1, By I a2, By I a3, By I b1, By I b2, By I b3, By I c1, By I c2, By I c3, By I d1, By I d2, By I d3, By I e1, By I e2, By I e3, By I f1, By I f2, By I f3, By II b1, By II b2, By II b3, By II c1, By II c2, By II c3, By II e1, By II e2, By II e3, Ba1, Ba2, Ba3, Bb1, Bb2, Bb3, Bc1, Bc2, Bc3, Be1, Be2, Be3, Bf1, Bf2, Bf3, BGh1, BGh2.

图1 部分供试材料SSR引物检测的多态性(A:标记PLD001; B:标记PLD194)

Fig.1 The detection of polymorphisms of partial test material SSR primers(A:Marker PLD001; B:Marker PLD194)

2.2 供试材料的聚类分析

由图2可知,供试86份材料的最大遗传距离是0.63,此时可以区分开茅苍术和白术2个不同的品种。在遗传距离0.59处,可将所有材料聚为3个大群,第I大群共71份材料,包含了京山(18份)、保康I(16份)、保康II(9份)、保康III(15份)和英山(13份)的材料;第II大群共10份材料,包含2份保

康I的材料和8份英山的材料;第III大群由5份白术材料组成。由聚类结果可知,茅苍术与白术间的遗传距离较大,亲缘关系较远,属于不同种植物;不同群体的茅苍术遗传距离相对较近,但个体间的遗传变异较大。此外,各居群中同一叶型的3个不同单株单独进行分子标记扫描,结果显示,同一地区相同叶型或不同地区相同叶型的材料并没有聚在一

起,反映出相同叶型材料间存在较大的遗传变异。

2.3 群体间的遗传多样性分析

1) 遗传距离和遗传一致度。由表 2 可知,居群间两两比较的 Nei's 遗传距离(GD)和遗传一致度(GI)的分别在 0.051 0~0.465 8、0.627 7~0.950 3。白术群体与茅苍术群体的 GD 显著大于茅苍术群体与茅苍术群体的 GD,GI 显著小于茅苍术群体,说明

白术与茅苍术的亲缘关系较远,变异来源于群体之间。茅苍术群体中,保康 I 和保康 III 的 GD 最小,GI 最大,说明保康 I 和保康 III 的亲缘关系最近,其次是保康 I 和京山之间,亲缘关系最远的是保康 II 和英山群体之间。整个茅苍术群体的 GD 小于 0.177 1, GI 均大于 0.837 7,说明茅苍术群体间的遗传距离近,变异来源于群体内。

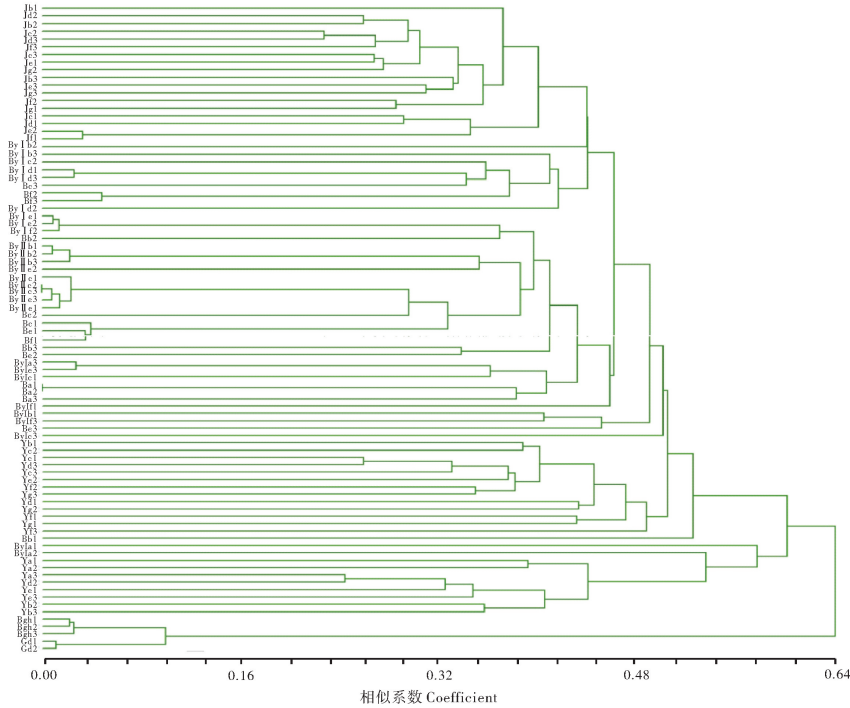


图 2 供试材料基于 SSR 标记的聚类分析

Fig.2 The clustering analysis of the selected material on SSR markers

表 2 居群间的 Nei's 遗传距离(GD)和遗传一致度(GI)

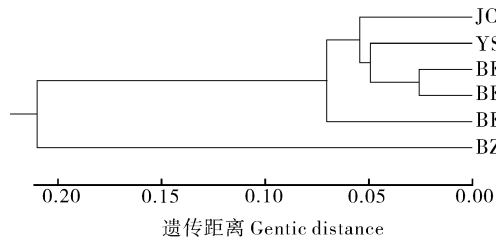
Table 2 Nei's genetic distance and genetic identity between population

群体来源 Population source	京山 Jingshan	保康 I Baokang I	保康 II Baokang II	保康 III Baokang III	英山 Yingshan	白术 <i>A. macrocephala</i>
京山 Jingshan		0.920 7	0.839 7	0.887 8	0.883 5	0.627 7
保康 I Baokang I	0.082 6		0.901 9	0.950 3	0.911 6	0.670 2
保康 II Baokang II	0.174 7	0.103 2		0.899 7	0.837 7	0.633 9
保康 III Baokang III	0.119 0	0.051 0	0.105 7		0.901 3	0.675 8
英山 Yingshan	0.123 8	0.092 5	0.177 1	0.103 9		0.681 2
白术 <i>A. macrocephala</i> Koidz	0.465 8	0.400 1	0.455 8	0.391 9	0.383 9	

注:下三角为 Nei's 遗传距离,上三角为遗传一致度。Note:Nei's genetic distance (the lower triangle) and genetic consistency (the upper triangle).

2) 居群间的聚类分析。利用居群间两两相对的遗传距离对不同居群进行聚类分析。由图 3 可知,当遗传距离等于 0.20 时,白术与茅苍术分别聚在两个群中,表明茅苍术与白术间亲缘关系较远,其中与白术居群亲缘关系最远的是保康 I 和保康 III 两个居群,最近的是保康 II 居群。茅苍术群体间的遗传距离小于 0.10,说明茅苍术居群间亲缘关系近,保康 I

居群与保康 III 居群的亲缘关系最近,其次是英山居群;保康 II 居群与京山居群亲缘关系最近,与保康 I 居群与保康 III 居群的亲缘关系最近。由此可知栽培种茅苍术之间的遗传信息差异较小,地理隔离并不存在阻碍基因交流的问题;同时栽培种与野生种茅苍术之间遗传信息没有明显差异,相对而言野生种茅苍术间的遗传信息差异较大。



JC:京山居群; BK1:保康 I 居群; BK2:保康 II 居群; BK3:保康 III 居群; YS 英山居群; BZ:白术居群。JC, BK1, BK2, BK3, YS, BZ represent the population source from Jingshan, Baokang I, Baokang II, Baokang III, Yingshan and *Atractylodes macrocephala* Koidz., respectively.

图 3 不同居群间的聚类分析

Fig.3 The cluster analysis of different populations

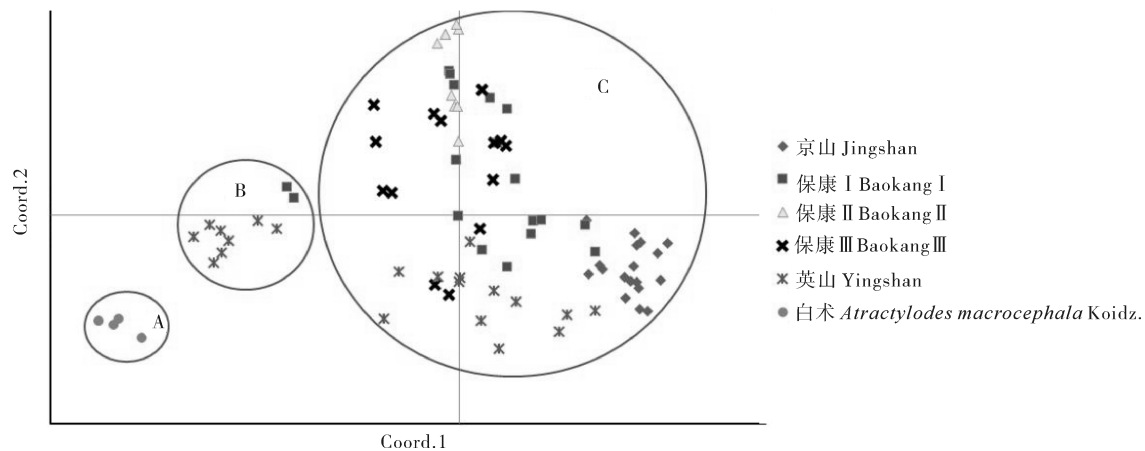


图 4 供试材料的主坐标分析

Fig.4 Principal coordinate analysis of test materials

4) 基于 SSR 分子标记的群体结构分析。利用 Structure 2.2 软件的混合模型和等位变异频率相关模型对来自于不同地区的 86 份种质资源进行群体结构分析(图 5), 共运行 190 次($K=2\sim 20$, 重复运行 10 次), 当 $K=4$ 时出现了明显拐点(图 5A), 并且此时似然值最大, 所以群体材料可以被划分为 4 个亚种群: S1、S2、S3、S4(图 5C)。其中 S1 亚群主要包括京山地区全部 18 份种质材料和保康地区及英山地区的部分种质材料; S2 亚群主要是保康地区的种质材料, 但是由于材料来源不同, 保康 I 的部分种质材料更偏向于 S1 亚群, 其遗传背景相对比较复杂, 与京山地区遗传背景相似度更高, 这也与在聚类分析时有 9 份保康 I 材料与京山地区的材料遗传相似度较高一致; S3 亚群大部分都是英山地区的材料, 由于地区间各种群存在基因交流比较频繁的现象,

3) 居群材料的主坐标分析。图 4 是利用 GenAIEx 6.502 软件对群体结构基于 SSR 分子标记的主坐标(PCoA)分析结果, 可以看出不同居群的材料可以聚为 A、B、C 三类, A 类由 5 份白术材料组成, 分布在第三象限; B 类由 8 份英山材料和 2 份保康 I 的材料 By I a1、By I a2 组成, 分布在二、三象限; C 类的材料最丰富, 但群体结构也最复杂, 它包含了 5 个居群的 71 份材料, 4 个象限中都有分布, 但在第一、第四象限较为集中。同时也可以看出, 茅苍术与白术的亲缘关系较远, 遗传差异较大。供试材料的 UPGMA 法聚类分析结果与主坐标分析结果基本一致。

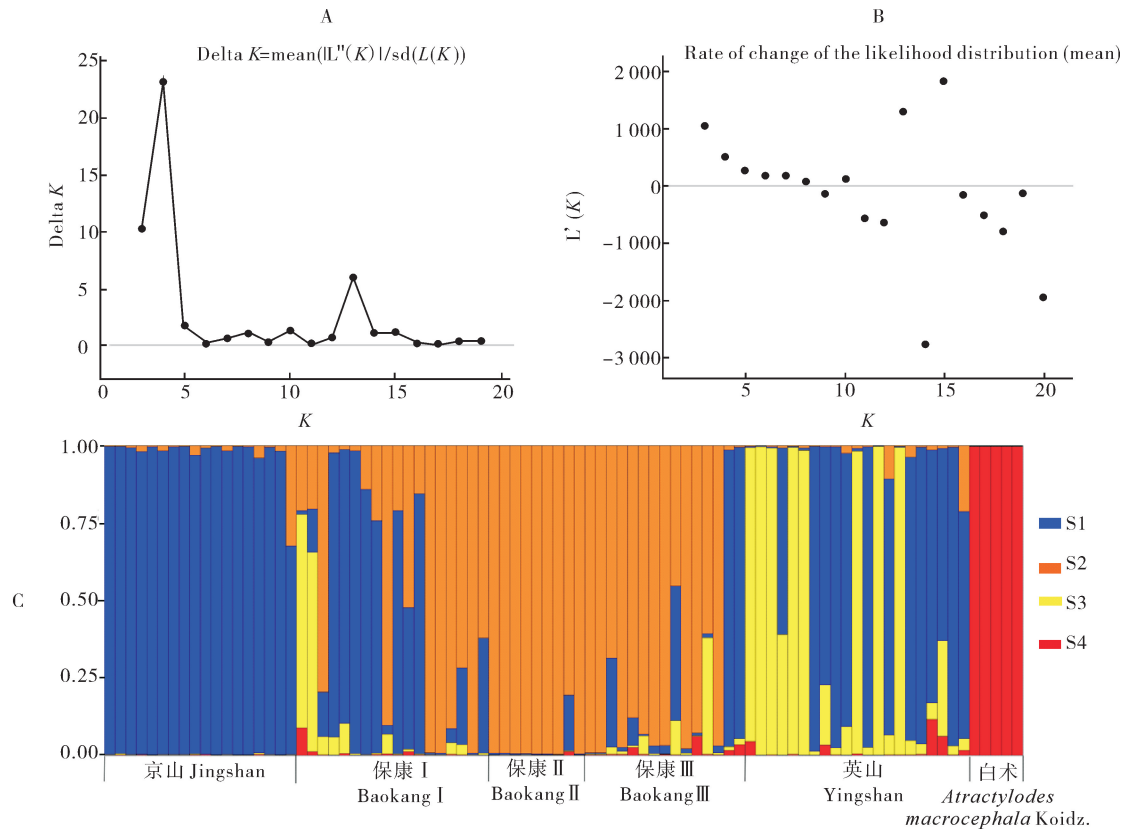
象, 英山地区的材料在 S1 亚群中也占据 50% 左右, 结构趋于多元化; S4 亚群间遗传结构比较单一, 均为白术, 这与聚类分析时的结果完全一致, 说明利用 UPGMA 方法进行聚类分析的结果与群体遗传结构分析结果可相互验证。综合上述结果可知, 湖北省茅苍术种质资源的亚群划分与其地理来源并没有必然联系, 群体间存在基因的相互交流, 导致群体结构趋于复杂、多元。

2.4 表型数据相关性分析

1) 农艺性状相关性分析。对农艺性状中的倒 4 叶长、倒 4 叶宽、倒 4 叶长宽比、叶裂深度、茎秆颜色、茎秆形状、茎粗、株高等进行相关性分析的结果见表 3, 可以看出茎粗与株高和折干率、株高与上部分枝数之间都表现出极显著正相关; 倒 4 叶宽与倒 4 叶长宽比之间呈现负极显著相关($P<0.01$)。倒

4 叶长与倒 4 叶宽、茎秆颜色、茎粗、株高之间、叶裂深度和上部分枝数之间、茎秆颜色和茎秆形状之间、茎粗和上部分枝数之间都呈显著正相关;茎秆形状与下部分枝数之间呈显著负相关($P < 0.05$)。综

所述,供试材料的茎秆越粗,株高越高,折干率越大,上部分枝数越多;倒 4 叶的长宽比随着倒 4 叶宽的增加而减小。茎粗对倒 4 叶长和上部分枝数都有影响,茎秆越粗,倒 4 叶越长,上部分枝数越多。



A 表示 K 值曲线;B 表示 $L'(K)$ 值;C 表示群体遗传结构(横坐标表示不同居群材料;纵坐标中“S1~S4”表示 4 个不同的亚种群,“0.00~1.00”表示对应亚群所占比例)。A represent K value curve; B represent $L'(K)$ value; C represent population genetic structure(The abscissa indicates materials in different populations. In the ordinate, “S1—S4” represents four different subpopulations, and “0.0—1.0” represents the relative proportion of corresponding subpopulations).

图 5 基于 SSR 标记的 K 值曲线及群体遗传结构图

Fig.5 Based on SSR marker the K -value curve and population genetic structure chart

2) 主要有效成分的相关性分析。对 Q 值、折干率、醚浸出物含量、苍术素含量和 β -桉叶醇含量进行相关性分析(表 4)。由表 4 可知, β -桉叶醇含量与折干率和醚浸出物含量间呈极显著相关($P < 0.01$),即折干率越大、醚浸出物含量越高, β -桉叶醇含量越高。苍术素含量与共同分析的指标间都呈负相关,且 Q 值与苍术素含量呈显著负相关($P < 0.05$),即 Q 值越大,苍术素含量越低。

2.5 化学指纹图谱的建立

1) 供试材料化学指纹图谱的建立。用于建立化学指纹图谱的供试材料共有 29 份,其中京山居群有 6 份、保康 I 居群有 6 份、保康 II 居群有 3 份、保康

III 居群有 5 份、英山居群有 7 份,材料 PD 是茅苍术的混合病株,材料 BGh 是白术。由图 6 可知,供试材料根茎指纹图谱的出峰时间在 45 min 内。29 份供试材料共标定出 6 个共有峰,用相同的 HPLC 法分析苍术素标准品并对标准品的化学指纹图谱,发现 6 号峰是苍术素峰。比较全部共有峰的峰面积,可知 6 号峰的峰面积最大,分离度最好,占总峰面积的 48.61%。以 6 号峰为参照峰,将保留时间和峰面积分别记为 1,分别计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。且 6 个共有峰的保留时间基本一致,但峰面积差异较大,说明不同材料相同活性成分的含量相差较大。

表 3 供试材料生理指标相关性分析

Table 3 The correlation analysis of physiological indexes of tested materials

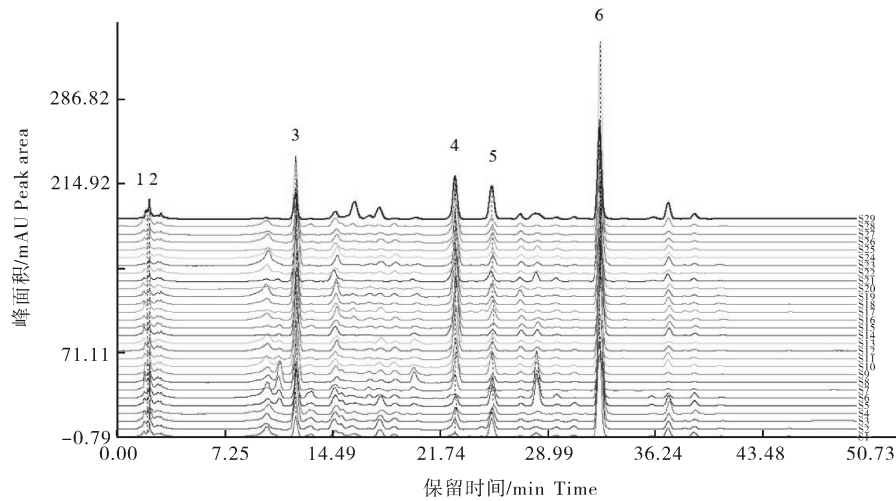
性状 Traits	倒 4 叶长 Length of inverted 4th leaf	倒 4 叶宽 Width of inverted 4th leaf	倒 4 叶长宽 比均值 Length- width ratio of inverted 4th leaf		叶裂深度 Leaf crack depth	茎秆 颜色 Stem color	茎秆 形状 Stem morphology	茎粗 Stem thickness	株高 Plant height	下部分 枝数 Lower branch number	上部分 枝数 Upper branch number	Q 值 Q value
倒 4 叶宽 Width of inverted 4th leaf	0.404 *											
倒 4 叶长宽比均值 Length-width ratio of Inverted 4th leaf	0.105	-0.814 **										
叶裂深度 Leaf crack depth	-0.074	-0.107	0.118									
茎秆颜色 Stem color	0.448 *	0.045	0.236	0.049								
茎秆形状 Stem morphology	0.287	-0.061	0.161	0.032	0.445 *							
茎粗 Stem thickness	0.385 *	-0.027	0.072	0.028	0.334	0.186						
株高 Plant height	0.474 *	0.117	0.008	0.115	0.245	0.178	0.780 **					
下部分枝数 Lower branch number	0.029	0.245	-0.188	0.332	-0.104	-0.387 *	0.064	0.067				
上部分枝数 Upper branch number	0.114	0.124	-0.193	0.424 *	-0.109	0.097	0.474 *	0.625 **	0.339			
Q 值 Q value	0.334	-0.016	0.202	0.227	0.304	-0.083	0.140	0.017	-0.102	-0.051		
折干率 Drying rate	0.140	-0.323	0.324	-0.287	0.158	0.119	0.493 **	0.255	-0.253	-0.276	0.055	

注: * 在置信度(双测)为 0.05 时,相关性是显著的; ** 在置信度(双测)为 0.01 时,相关性是显著的。Note: * represented the significant correlation at the confidence level (double test) of 0.05; ** represented the significant correlation at the confidence level (double test) of 0.01.

表 4 供试材料主要活性成分相关性分析

Table 4 The correlation analysis of main active components in tested materials

活性成分 Active components	Q 值 Q value	折干率 Drying rate	醚浸出物含量 Ether extract content	苍术素含量 Atractylodes content
Q 值 Q value				
折干率 Drying rate	0.055			
醚浸出物含量 Ether extract content	0.028	0.313		
苍术素含量 Atractylodes content	-0.427 *	-0.066	-0.050	
β -桉叶醇含量 β -Eucalyptol content	0.225	0.638 **	0.693 **	-0.258



S1~S29(自下而上)表示 29 种来自不同地区供试材料对应的 HPLC 指纹图谱,对应的实验材料编号分别是 S1-Jb、S2-Jc、S3-Jd、S4-Je、S5-Jf、S6-Jg、S7-By I a、S8-By I b、S9-By I c、S10-By I d、S11-By I e、S12-By I f、S13-By II b、S14-By II c、S15-By II e、S16-Ba、S17-Bb、S18-Bc、S19-Be、S20-Bf、S21-Ya、S22-Yb、S23-Yc、S24-Yd、S25-Ye、S25-Yg、S27-Yg、S28-PD、S29-BGh。S1-S29 (from bottom to top) represent the HPLC fingerprints of 29 tested materials from different regions, and the corresponding test material numbers are as follows: S1-Jb, S2-Jc, S3-Jd, S4-Je, S5-Jf, S6-Jg, S7-By I a, S8-By I b, S9-By I c, S10-By I d, S11-By I e, S12-By I f, S13-By II b, S14-By II c, S15-By II e, S16-Ba, S17-Bb, S18-Bc, S19-Be, S20-Bf, S21-Ya, S22-Yb, S23-Yc, S24-Yd, S25-Ye, S25-Yg, S27-Yg, S28-PD, S29-BGh.

图 6 供试材料根茎的 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig.6 HPLC fingerprint map of the rhizome of the tested material

比较供试材料化学指纹图谱相似度,由表 5 可知,供试材料与对照指纹图谱的相似度在 0.80~1.00,说明部分材料间活性成分的组成成分差异较大。混合病株 PD 与对照指纹图谱的相似度为 0.99,说明病害对茅苍术内活性成分的组成成分几乎没有影响;白术与对照指纹图谱的相似度是 0.89,说明白术与茅苍术在活性成分的组成上有差异,但

差异不大;茅苍术材料与对照指纹图谱的相似度在 0.80~1.00,说明茅苍术材料在活性成分组成上具有明显差异。比较不同居群茅苍术材料的平均指纹图谱相似度,发现各居群的指纹图谱相似度都大于 0.90,其中英山居群的相似度最大,平均值是 0.97;其次是保康 II 居群和保康 III 居群,平均值都是 0.94;平均指纹图谱相似度最小的是京山居群,是 0.90。

表 5 供试材料根茎指纹图谱相似度比较

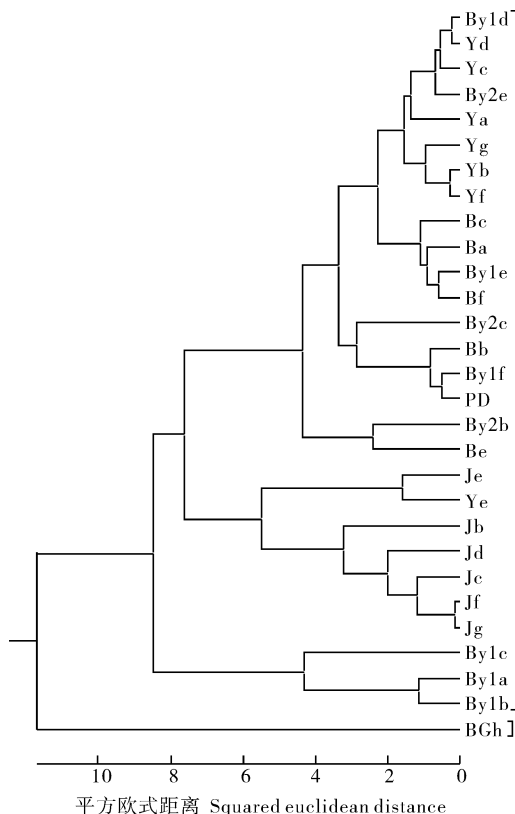
Table 5 The similarity comparison of HPLC fingerprint map of the rhizome of the tested material

图谱序号 Peak No.	材料编号 Material code	对照指纹图谱相似度 Similarity between the control HPLC fingerprint	图谱序号 Peak No.	材料编号 Material code	对照指纹图谱相似度 Similarity between the control HPLC fingerprint	图谱序号 Peak No.	材料编号 Material code	对照指纹图谱相似度 Similarity between the control HPLC fingerprint
S1	Jb	0.89	S11	By I e	0.97	S21	Ya	0.95
S2	Jc	0.90	S12	By I f	0.99	S22	Yb	0.99
S3	Jd	0.95	S13	By II b	0.86	S23	Yc	0.99
S4	Je	0.90	S14	By II c	0.97	S24	Yd	0.99
S5	Jf	0.90	S15	By II e	0.99	S25	Ye	0.90
S6	Jg	0.85	S16	Ba	0.93	S26	Yf	1.00
S7	By I a	0.88	S17	Bb	0.98	S27	Yg	0.97
S8	By I b	0.80	S18	Bc	0.97	S28	PD	0.99
S9	By I c	0.92	S19	Be	0.90	S29	BGh	0.89
S10	By I d	0.99	S20	Bf	0.92			

2) 化学指纹图谱共有峰聚类分析。29 份不同居群的茅苍术和白术共有 6 个共有峰,以对照指纹

图谱峰(6 号峰)为参照峰,将各峰的峰面积进行量化,得 29×6 的原始数据矩阵。用 SPSS 17.0 软件

对原始数据矩阵进行聚类分析,分析结果如图7所示,当平方欧式距离为10时,刚好可以将茅苍术与白术区分开,与SSR分子标记的聚类结果相似,说明相同化学成分在不同品种材料中含量差异大,茅苍术与白术的亲缘关系远。当平方欧式距离为8时,茅苍术材料可以聚为B1、B2两个大群,群B1包含5个居群的24份材料,此外混合病株(PD)也聚在了B1中;群B2只有安康I居群的3份材料。群B1包含材料种类复杂,又可分为b1、b2两个亚群,亚群b1包含了17份材料,安康I居群有3份、安康II居群有3份、安康III居群有5份、英山居群有6份;亚群b2包含了7份材料,其中6份来自于京山居群,Ye来自于英山居群。由分类结果可知,京山居群材料间的成份含量相差最小,安康I居群材料间相同活性成分含量差异最大。而不同叶型的材料依然没有聚集在一起,说明不同叶型材料中,相同活性成分的含量存在明显差异。



By1、By2 分别表示安康野生型 I (By I)、安康野生型 II (By II)。
By1、By2 represented the wild population I and II of *A. lancea* (Thunb.) DC. from Baokang, respectively.

图7 HPLC 指纹图谱共有峰聚类分析

Fig.7 The cluster analysis of HPLC fingerprinting common peak

3 讨论

SSR 分子标记技术早已广泛地运用在水稻、大麦等农作物中,为亲缘关系鉴定、分子标记辅助育种、构建遗传图谱、挖掘功能基因等提供了理论依据^[8]。本研究筛选出了 239 对符合要求的 SSR 引物,有 83 对(34.73%)引物在所有供试材料中都能扩增出清晰且易于区分的条带,这些引物是具有多态性的 SSR 标记。本研究中引物的利用率比红马蹄莲的引物利用率低,比栽培种柴胡的引物利用率高。Wei 等^[11]对红马蹄莲进行遗传多态性分析,发现有 58 对能扩增出清晰条带并有多态性的引物,占全部引物的 75.3%。利用 SSR 分子标记技术对柴胡栽培种质进行鉴别,发现扩增效果好且有较高的多态性的引物只占 18%^[12]。83 对引物共扩增出 420 个位点,含多态性的位点数 97.14%,比不同品种菊花的 98.90%^[13]、不同地区草豌豆的 97.40%^[14],比不同种质荔枝的 87.95%^[15]。

茅苍术居群间的遗传距离与居群的地理来源不相关。居群间的平均遗传分化系数(F_{st})为 0.198,说明居群间的遗传分化较大,地理位置与遗传分化系数的相关性不显著,表明不同居群的茅苍术群体间存在基因交流,居群间的 Nei's 遗传距离和遗传一致度分别在 0.051 0~0.465 8、0.627 7~0.950 3,但茅苍术居群间的遗传距离都小于 0.177 1,遗传一致度都大于 0.837 7,与白术居群间存在较大的差异,说明茅苍术与白术的遗传信息差异较大。茅苍术群体间的遗传距离与遗传一致度的研究结果与朱晓琴等^[16]的研究结果较为一致,他们利用 RAPD 分子标记技术分析得出茅苍术群体间的遗传距离是 0.11,遗传一致度是 0.9;但野生茅苍术和栽培茅苍术的分析结果与李琳等^[6]的研究结果不同,他们用 RAPD 分子标记技术分析比较野生和栽培茅苍术的遗传距离,发现野生茅苍术与栽培茅苍术的遗传距离较远,是 0.32,相比之下本研究中野生种与栽培种茅苍术的遗传距离更近,遗传一致度更高,这与栽培种均是通过“野生转家种”方式驯化而来的实际情况更为符合。

居群的聚类分析结果与供试材料的产地来源、叶型分类没有直接关系,但茅苍术与白术作为菊科的 2 种不同种植物在遗传结构上存在较大差异。UPMGA 的聚类分析和主坐标分析结果都显示茅

苍术与白术的遗传距离较远;而群体结构分析表明白术居群遗传背景单一,茅苍术居群间遗传结构复杂,说明了茅苍术与白术居群间基因交流不广泛,因此遗传基础差异较大。本研究中茅苍术材料分别采自京山、保康和英山,且保康材料既有野生种又有栽培种,聚类分析结果并没将各地区的材料分别聚在一起,也没有将野生种和栽培种的材料单独聚为两个群。在遗传距离为 0.59 时,京山(18 份)、保康 I(16 份)、保康 II(9 份)、保康 III(15 份)和英山(13 份)的材料 71 份材料聚为第 I 个群,英山的 8 份材料和保康 I 的 2 份材料聚为第 II 个群,聚类结果与前人的研究结果不同,郭建林等^[17]利用 RAPD 分子标记技术对不同地区 7 个居群的苍术进行遗传多样性分析,聚类结果保康居群单独聚在一起,英山居群与江苏小九华山等居群聚在一起。各居群材料的聚类结果没有明显差异可能与采样的地点相隔较近有关(京山: E 112°43′~113°29′, N 30°42′~31°27′;保康: E 110°45′~111°31′, N 31°21′~32°06′;英山: E 115°31′~116°04′, N 30°31′~31°09′),经纬度差异不大说明气候环境较为相似,地理距离较近且各地区间没有可以阻断环境交流的有利条件,致使茅苍术群体间的遗传变异相对较小。结合 HPLC 指纹图谱共有峰的聚类分析结果,当平方欧式距离为 10 时,茅苍术和白术材料就能明显区分,与上述 DNA 的 SSR 标记的聚类分析结果可以相互印证,两者的亲缘关系较远,且活性成分也存在较大差异。此外, HPLC 指纹图谱的聚类分析是基于 29 份不同居群不同叶型材料进行的,其亚群的分类存在差异,其中 By I a、By I b、By I c 聚类为 1 个亚群,而 SSR 标记的聚类结果显示三者的遗传差异较明显,说明同一地区的野生种活性成分差异较大,遗传基础也存在较大差异,且叶型不能作为准确区分不同地区居群材料活性成分差异的指标。进一步的亚群分析发现,各居群中不同叶型材料间活性成分差异显著,与 SSR 标记的聚类结果存在相似性,说明不同叶型材料间存在较大的遗传差异。与 SSR 标记聚类结果比较,2 种聚类结果均没有将不同地区茅苍术材料聚在一起,且野生种与栽培种也未单独聚类成群,居群间存在的差异不显著,两者的聚类结果存在共性。

对 Q 值与农艺性状、主要活性成分的相关性分析结果表明 Q 值与农艺性状间相关性不显著,但与苍术素含量间呈显著负相关,这一结果与已有研究

结果相似。胡双丰^[18]研究表明苍术中苍术素的含量与油室颜色、气味和纤维性等相关,色深且明显、香气浓、纤维性弱或无的苍术素含量高,反之含量低。俞忠明等^[19]研究表明,白术根茎中油室直径与油室密度不成正比,但油室面积比 Q 值与成分间有一定相关性,可用油室密度与 Q 值衡量白术药材的品质。此外,对茅苍术与白术共有峰峰面积进行量化,聚类结果显示白术单独居为一类,不同居群的茅苍术聚为一类,聚类结果与芮梦珏等^[20]的研究结果一致,即将 37 份苍术材料化学指纹图谱分析得到的共有峰峰面积进行量化并聚类,聚类结果显示茅苍术与罗田苍术聚为一类,关苍术与白术聚为一类,说明茅苍术与白术相同化学组分的含量差异较大。

本研究共选取了符合要求的 SSR 引物 239 对,其中 34.73% 的引物能扩增出清晰条带且有多态性,用这些引物对来自不同地区的 86 份茅苍术与白术种质资源进行遗传多态性鉴定,结果发现引物含有较高的多态性,供试材料的遗传变异与杂合度较高。聚类分析与群体结构分析结构表明,茅苍术与白术遗传距离较远,遗传背景差异较大,茅苍术的遗传背景更加复杂;栽培种与野生种茅苍术遗传距离较近,遗传一致度较高。基于 SSR 分子标记与 HPLC 化学指纹图谱共有峰的聚类分析结果表明,茅苍术与白术在遗传基础和活性成分含量间具有较大差异,但茅苍术材料间的差异相对较小;京山材料在 2 种聚类中都能聚在同一亚群中,而保康 I、保康 III 和英山的材料只有部分能聚在相同亚群,表明相比之下京山材料在遗传基础和活性成分含量间的差异更小。通过对供试材料的遗传多态性分析,可以从基因层面区分茅苍术和白术 2 个不同的品种,同时可为筛选鉴定高产、优质、抗病、高活性成份的茅苍术栽培种提供理论依据。

参考文献 References

- [1] 贺善安,贺慧生,吕晔,等.茅苍术资源的保护和利用[J].植物资源与环境,1993,2(1):1-6. HE S A HE H S, LÜ Y, et al. The conservation and utilization of *Atractylodes lancea* (Thumb.) DC[J]. Journal of plant resource and environment, 1993, 2(1): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [2] 徐友贵,田中联,王小明,等.茅苍术生物学特性研究初报[J].中国中药杂志,1992,17(1):18-20. XU Y G, TIAN Z L, WANG X M, et al. Preliminary report on the biological charac-

- teristics of *Atractylodes lancea* [J]. China journal of Chinese materia medica, 1992, 17(1): 18-20 (in Chinese).
- [3] 任冰如, 於虹, 贺善安. 苍术 DNA 分离及 RAPD 遗传多样性分析[J]. 植物资源与环境, 1997, 6(4): 1-6. REN B R, YU H, HE S A. Isolation of DNA from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. and genetic diversity analysis with RAPD[J]. Journal of plant resource and environment, 1997, 6(4): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [4] 郭兰萍, 黄璐琦, 蒋有绪, 等. 苍术遗传结构的 RAPD 分析[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(3): 178-181. GUO L P, HUANG L Q, JIANG Y X, et al. RAPD analysis on genetic structure of *Atractylodes lancea* [J]. Chinese pharmaceutical journal, 2006, 41(3): 178-181 (in Chinese with English abstract).
- [5] 韦阳连, 吴宝成, 周义锋. 茅山苍术与苍术素相关的 RAPD 标记研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10368-10370. WEI Y L, WU B C, ZHOU Y F. Study on *Atractylodes* and atracylodin-associated RAPD markers in Mt. Maoshan [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(24): 10368-10370 (in Chinese with English abstract).
- [6] 李琳, 谷巍, 申修源, 等. 野生和栽培茅苍术 RAPD 分析[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(5): 468-469. LI L, GU W, SHEN X Y, et al. RAPD analysis of wild and cultivated *Atractylodes lancea* [J]. Journal of Nanjing TCM University, 2011, 27(5): 468-469 (in Chinese with English abstract).
- [7] 许梦云, 吴沿友, 赵玉国, 等. 道地药材茅苍术的 ISSR 分析[J]. 河南农业科学, 2009(7): 90-93. XU M Y, WU Y Y, ZHAO Y G, et al. An ISSR analysis on famous region-drug *Atractylodes lancea* [J]. Journal of Henan agricultural sciences, 2009(7): 90-93 (in Chinese with English abstract).
- [8] 罗兵, 孙海燕, 徐港明, 等. SSR 分子标记研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(12): 5210-5212. LUO B, SUN H Y, XU G M, et al. Research progress of SSR molecular marker [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2013, 41(12): 5210-5212 (in Chinese with English abstract).
- [9] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic acids research, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [10] SHAKEEL A, ZHAN C S, YANG Y Y, et al. The transcript profile of a traditional Chinese medicine, *Atractylodes lancea*, revealing its sesquiterpenoid biosynthesis of the major active components [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151975 [2021-07-28]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151975>.
- [11] WEI Z, SUN Z, CUI B, et al. Transcriptome analysis of colored calla lily (*Zantedeschia rehmannii* Engl.) by illumina sequencing: de novo assembly, annotation and EST-SSR marker development [J/OL]. Peer J, 2016, 4: e2378 [2021-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27635342/>. doi: 10.7717/peerj.2378.
- [12] 吴素瑞, 高珂, 赵立子, 等. 利用 SSR 分子标记鉴别柴胡栽培种质的方法学研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(9): 1806-1812. WU S R, GAO E, ZHAO L Z, et al. Using SSR molecular markers to identify the cultivated germplasm of *Bupleurum* methodological research [J]. World science and technology/modernization of traditional chinese medicine and materia medica, 2015, 17(9): 1806-1812 (in Chinese).
- [13] FENG S G, HE R F, LU J J, et al. Development of SSR markers assessment of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* cultivars [J/OL]. Frontiers in genetics; 2016, 15(7): 113 [2021-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27379163/>. DOI: 10.3389/fgene.2016.00113.
- [14] SHIFERAW E, PE M E, PORCEDDU E, et al. Exploring the genetic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus* L.) using EST-SSR markers [J]. Molecular breeding; 2012, 30: 789-797.
- [15] 孙清明, 马文朝, 马帅鹏, 等. 荔枝 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(19): 4037-4049. SUN Q M, MA W Z, MA S P, et al. Characteristics of SSRs derived from ESTs and development of EST-SSR markers in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. Scientia agricultura sinica, 2011, 44(19): 4037-4049 (in Chinese with English abstract).
- [16] 朱晓琴, 贺善安. 苍术 (*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.) 种内遗传多样性分析 [J]. 植物资源与环境, 1995, 4(2): 1-6. ZHU X Q, HE S A. Genetic diversity in populations of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC [J]. Journal of plant resource and environment, 1995, 4(2): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [17] 郭建林, 葛燕芬, 孙小芹, 等. 基于 RAPD 标记的南苍术居群遗传多样性分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(4): 35-40. GUO J L, GE Y F, SUN X Q, et al. Analysis on genetic diversity of *Atractylodes lancea* populations based on RAPD marker [J]. Journal of plant resources and environment, 2012, 21(4): 35-40 (in Chinese with English abstract).
- [18] 胡双丰. 苍术与关苍术的鉴别 [J]. 中国药业, 2005, 14(1): 60-61. HU S F. Distinguishing Cangzhu and Guan Cangzhu [J]. China pharmaceuticals, 2005, 14(1): 60-61 (in Chinese).
- [19] 俞忠明, 杨明艳, 董宇, 等. 新鲜白术根茎显微结构与成分含量相关性研究 [J]. 医药导报, 2013, 32(5): 675-677. YU Z M, YANG M Y, DONG Y, et al. Study on the correlation between the microstructure of fresh *Atractylodes* rhizome and its ingredient content [J]. Herald of medicine, 2013, 32(5): 675-677 (in Chinese).
- [20] 芮梦珏, 欧阳臻, 彭华胜, 等. 基于苍术属植物水溶性成分 HPLC 指纹图谱的化学亲缘关系研究 [J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 1-6. RUI M J, OUYANG Z, PENG H S, et al. Analysis on chemical genetic relationship of *Atractylodes* based on HPLC fingerprint spectra of water-soluble components [J]. Chinese wild plant resources, 2015, 34(3): 1-6 (in Chinese with English abstract).

Genetic diversity of *Atractylodes lancea* in different regions of Hubei Province

LIU Dan¹, LIU Zhifang¹, ZHOU Can¹, XIAO Gang², XUE Jinqi¹, WANG Xuekui¹

1. Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River/College of Plant Science and Technology,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Lüxinyuan Agricultural Development Co., Ltd, Yingshan 438000, China

Abstract 83 pairs of SSR molecular markers were used to analyze the genetic diversity of 81 *A. lancea* materials and 5 *Atractylodes macrocephala* in different regions of Hubei Province and to construct DNA fingerprints. At the same time, the phenotypic data and medicinal quality of 86 materials were investigated, and chemical fingerprints were constructed. The results showed that a total of 420 loci were amplified by 83 pairs of SSR primers, and the number of polymorphic loci accounted for 97.14%. The genetic distance of cluster analysis based on SSR molecular markers was 0.63 (*A. lancea* and *A. macrocephala* can be completely separated). The genetic analysis of the population structure of different populations of materials revealed that the genetic variation originated from within the population, not between the populations. The correlation analysis and cluster analysis of the phenotypic data and the medicinal quality data of the materials tested found that there was a significant positive correlation ($P < 0.05$) between the length of the bottom 4 leaves and the width of the bottom 4 leaves, the culm color, the culm diameter, the plant height, between the depth of leaf cracks and the number of branches in the upper part, between the culm color and the culm shape, and between the culm diameter and the number of branches in the upper part. There was a significant negative correlation between the culm shape and the number of branches in the lower part. The Q value (ratio of oil area and total root area) was significantly negatively correlated with the content of atractylodine. The content of β -eucalyptus was significantly positively correlated with the content of ether extract. The similarity of fingerprints of the materials tested was 0.80-1.00, and the similarity of *Atractylodes macrocephala* and *Atractylodes macrocephala* reached 0.89 through comparing the similarity of HPLC chemical fingerprint and analyzing the cluster of shared peak areas after quantification. It is indicated that the genetic background of *A. lancea* and *A. macrocephala* are quite different, and the genetic basis of *A. lancea* is more complicated than that of *A. macrocephala*. There are big differences between the two active ingredients, but the difference between *A. macrocephala* materials is relatively small. Two different varieties of *A. lancea* and *A. macrocephala* can be distinguished from the genetic level. It will provide a theoretical basis for screening and identifying *A. lanceolata* cultivars with high yield, high quality, disease resistant and high active ingredients.

Keywords *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC; SSR; genetic diversity; HPLC chemical fingerprint

(责任编辑:张志钰)