

## 苍术属植物的遗传关系研究

邹小兴<sup>1,2</sup>, 黄璐琦<sup>3</sup>, 崔光红<sup>3</sup>, 袁庆军<sup>3</sup>, 彭勇<sup>4</sup>, 刘勇<sup>1</sup>, 肖培根<sup>4\*</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002;  
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100094)

**摘要:** 运用对 PCR 产物直接测序的方法测定了苍术属 8 种植物的 ITS 序列和叶绿体 atpB-rbcL、psbB-psbF 和 trnL-trnF 基因间隔区序列。计算了不同种间 ITS 序列、atpB-rbcL+psbB-psbF+trnL-trnF 序列的碱基差别 (转换值/颠换值) 和 Kimura 遗传距离。序列数据经排列后进行 UPGMA 法分析, 结果显示: ① 罗田苍术-苍术和辽东苍术-朝鲜苍术各自构成一个分支, 再参照分支内各植物之间的遗传距离值, 认为将罗田苍术作为苍术变种不适宜; ② 鄂西苍术与属内其余植物亲缘关系都较远, 在属内处于原始地位; ③ 支持将辽东苍术归入朝鲜苍术, 将北苍术作为苍术的一个变种处理。

**关键词:** 苍术属; ITS 序列; atpB-rbcL; psbB-psbF; trnL-trnF; 遗传关系

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0680-07

## Genetic relationships of *Atractylodes* plants

ZOU Xiao-xing<sup>1,2</sup>, HUANG Lu-qi<sup>3</sup>, CUI Guang-hong<sup>3</sup>, YUAN Qing-jun<sup>3</sup>, PENG Yong<sup>4</sup>,  
LIU Yong<sup>1</sup>, XIAO Pei-gen<sup>4\*</sup>

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
2. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The phylogenetic relationships of the genus *Atractylodes* DC. was analyzed using the nuclear ribosomal ITS and three chloroplast fragments, including atpB-rbcL, psbB-psbF and trnL-trnF intergenic spacer (IGS) sequences. Phylogenetic analyses revealed that *A. lancea* subsp. *Iuotianensis* and *A. lancea*, *A. chinensis* var. *liaotungensis* and *A. coreana* form monophyletic terminal clade, separately. The trees, within each the pairwise genetic distances, did not support Hu's classification. Authors suggested that *A. lancea* Subsp. *Iuotianensis* should be included in *A. lancea* rather than be treated as a separate subspecies. *A. carlinoides* was placed in the basal position of *Atractylodes*, which had a distant relationship with the others of the genus. The results lead us to suggest that *A. chinensis* var. *liaotungensis* be put into *A. coreana*, *A. chinensis* as a subspecies of *A. lancea*.

**Key words:** *Atractylodes* DC.; ITS sequence; atpB-rbcL; psbB-psbF; trnL-trnF; genetic relationship

菊科苍术属 (*Atractylodes* DC.) 是一个分布于东亚地区的属, 除鄂西苍术 *Atractylodes carlinoides* (Hand.-Mazz.) Kitam. 因其根茎不发达而不作药用外,

其余均以根茎作药材使用<sup>[1]</sup>。长期以来, 对于苍术属植物种及种下等级的划分一直存在着争议<sup>[1-7]</sup>。刘慎谔<sup>[2]</sup>将北苍术定为种, 并在其下划分出全叶苍术 *A. chinensis* var. *simplicifolia*、辽东苍术 *A. chinensis* var. *liaotungensis* Kitag. 和赤峰苍术 *A. chinensis* var. *quinqueloba* 等几个变种。傅舜谔等<sup>[4]</sup>主张将北苍术作为苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC. 的变种 *A. lancea* (Thunb.) DC.

收稿日期: 2008-12-12.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2006CB504700).

\*通讯作者 Tel: 86-10-62894462, E-mail: xiaogp@public.bta.net.cn

var. *chinensis* (Bunge) Kitam. 更合适。郭允珍等<sup>[1]</sup>同意将北苍术作为苍术的变种, 同时将全叶苍术、赤峰苍术和辽东苍术作为北苍术的变型处理。林谔和石铸<sup>[5]</sup>将茅苍术和北苍术合并为苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC.。胡世林等<sup>[8, 9]</sup>认为分布于大别山区罗田县、金寨县等地的苍术是一个新的地理亚种, 命名为罗田苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC. subsp. *luotianensis* Hu et Feng。

分子生药学是生药学与分子生物学相互融合而形成的一门新兴交叉学科, 它在药用植物的亲缘鉴定、系统发育等方面的研究日益显现出旺盛的生命力<sup>[10]</sup>。目前, 已有不少学者开展了苍术类药材分子生药学研究。如 Mizukami 等<sup>[11-13]</sup>开展了苍术属植物 rDNA RFLP 分析和叶绿体 *trnK* 基因系统发育研究, Kohjyouma 等<sup>[14]</sup>、任冰如等<sup>[15, 16]</sup>和郭兰萍等<sup>[17]</sup>开展了苍术 RAPD 分析, Shiba 等<sup>[18]</sup>对苍术、北苍术、朝鲜苍术、关苍术和白术 5 种苍术属植物的 252 个样品进行了核基因组 ITS 区序列分析, 葛燕芬等<sup>[19]</sup>对上述 5 种苍术属植物叶绿体 *trnL-trnF* 序列进行了测定和比较分析。以上研究表明, 分子生药学研究可以为苍术属植物的遗传进化和亲缘关系研究提供较好的证据。同时, 由于不同分子标记在不同类群中的分辨率有所不同, 上述研究仍未能很好地解决苍术属植物分类上存在的问题。

ITS 序列存在于高度重复的核糖体 DNA 中, 是高度重复的串联序列单位, 具位点内或位点间的协同进化。被子植物 ITS 区长度较稳定, 总长度为 600~700 bp, 能提供较丰富的信息位点, PCR 扩增及测序简单易行。因此, ITS 序列已成为在序列水平上探讨科内属间及属下种间关系十分有效的手段<sup>[20, 21]</sup>。叶绿体 DNA (cpDNA) 具有分子质量小、结构简单和有独立的进化路线等优点<sup>[10]</sup>。而在特定的 cpDNA 非编码区存在相对较高的核苷酸置换率<sup>[22]</sup>, 从而使之在种间和种内都拥有较高的遗传变异<sup>[23]</sup>, 这对于较近分类群的研究有重要价值。为此, 本文尝试采用 ITS 序列分析以及叶绿体 *atpB-rbcL*、*psbB-psbF* 和 *trnL-trnF* 序列分析, 为苍术属植物相关种的界定、亲缘关系和系统发育等进行分子生药学方面的研究。

## 材料与方法

**材料** 供试材料见表 1。野外采集供试材料新鲜叶片, 迅速在硅胶中干燥保存。原植物标本经中国医学科学院药用植物研究所肖培根院士鉴定后, 存放于

中国医学科学院药用植物研究所标本馆。外类群 *Atractylis cancellata* 和 *Atractylis carduus* 的 ITS 序列取自 GenBank, 其登录号分别为 AY826231 和 AY826232。

**试剂和仪器** EX Taq DNA 聚合酶、dNTP、Buffer 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 反应在 TC-512 仪上进行。

**总 DNA 提取** 总 DNA 的提取采用从北京三博远志生物技术有限公司购买的植物 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 进行提取。取适量叶片, 去叶脉, 加液氮研磨至粉末状, 加入 400  $\mu\text{L}$  缓冲液 SP1, 4  $\mu\text{L}$  RNaseA, 迅速振荡混匀, 室温放置 10 min; 加入 130  $\mu\text{L}$  缓冲液 SP2, 充分混匀, 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min; 取上清液 (约 400  $\mu\text{L}$ ) 加入到另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积缓冲液 SP3, 加入 200  $\mu\text{L}$  乙醇, 充分混匀, 取 600  $\mu\text{L}$  上述溶液加入到吸附柱中, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将剩余溶液加入同一吸附柱中, 再次离心 1 min, 弃去收集管中的废液; 向吸附柱中加入 700  $\mu\text{L}$  漂洗液 PW, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s, 倒掉废液; 向吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液 PW, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s, 倒掉废液; 将吸附柱放回收集管中, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 取出吸附柱室温放置几分钟, 使吸附柱中硅胶膜彻底干燥; 将吸附柱转入一干净的离心管中, 向硅胶膜中间部位加入 60  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液 EB, 65  $^{\circ}\text{C}$  放置 2 min, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min, 将提取的 DNA 溶液置  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

**引物设计** 考虑到在进行系统进化研究时, 单个基因序列所能提供的信息往往有限, 因此同时考虑了叶绿体的 4 段 DNA 序列: *atpB-rbcL* 区、*psbB-psbF* 区、*trnL-trnF* 区和 *del2U-del2L* 区。其中, *del2U-del2L* 基因间隔区 PCR 效果不理想, 故不采用。引物采用 Taberlet 等的设计。具体序列分别为: *atpB*: 5'-ACATCKARTACKGGACCAATAA-3', *rbcL*: 5'-AACACCA GCTTTTRAATCCAA-3'; *psbB*: 5'-GTTTACTTTTGGG CATGCTTCG-3', *psbF*: 5'-CGCAGTTCGTCTTGAC CAG-3'; *trnL*: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3', *trnF*: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'。ITS 区引物为 ITS1: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA GG-3' 和 ITS2: 5'-TCCTCCTCTTATTGATATGC-3'。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

**PCR 扩增** 每 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体积中包括: 10 $\times$  Taq Buffer (含  $\text{MgCl}_2$ ) 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , 引物 (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 1.25  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 (80~

**Table 1** The origins of materials and sequence accession numbers

No.	Species	Origin	Voucher No.	GenBank accession number			
				ITS	atpB-rbcL	psbB-psbF	trnL-trnF
1	<i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. subsp. <i>luotianensis</i> Hu et Feng	Luotian, Hubei	Z0706026	FJ872828	EU931324	EU931332	EU931340
2	<i>A. macrocephala</i> Koidz.	Qimen, Anhui	Z0707029	–	EU931325	EU931333	–
3	<i>A. lancea</i> (Thunb.) DC.	Nanjing, Jiangsu	Z0707032	–	EU931326	EU931334	–
4	<i>A. chinensis</i> (DC.) Koidz.	Chaoyang, Liaoning	Z0707037	–	EU931327	EU931335	–
5	<i>A. coreana</i> (Nakai) Kitam.	Anshan, Liaoning	Z0708039	–	EU931328	EU931336	–
6	<i>A. japonica</i> Koidz. Ex Kitam.	Fengcheng, Liaoning	Z0708045	–	EU931329	EU931337	–
7	<i>A. chinensis</i> DC. var. <i>liaotungensis</i> Kitag.	Dalian, Liaoning	Z0708048	FJ872829	EU931330	EU931338	EU931341
8	<i>A. carlinooides</i> (Hand.-Mazz.) Kitam.	Shennongjia, Hubei	Z0711049	FJ872830	EU931331	EU931339	EU931342

100 ng) 1.25  $\mu$ L, EX Taq DNA 聚合酶 (5 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积。

ITS 区反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 38 个循环。最后 72 °C 延伸 10 min。

atpB-rbcL 基因间隔区 PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环。最后 72 °C 延伸 7 min。

psbB-psbF 基因间隔区 PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环。最后 72 °C 延伸 7 min。

trnL-trnF 基因间隔区 PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环。最后 72 °C 延伸 7 min。

PCR 产物以 2 000 bp DNA ladder 作为分子质量标记, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶(含 EB)在 1×TAE 缓冲液中电泳, SYNGENE 型凝胶成像系统下观察、拍照。

**序列测定** PCR 产物的纯化和序列测定均由北京三博远志生物技术有限公司完成。PCR 产物直接双向测序, 测序引物与 PCR 反应引物相同。新测序列报送 GenBank, 登录号见表 1。

**数据处理** 经双向测定的序列用 Staden package 软件按照正链的方向拼接成完整的序列。用 CLUSTAL X 软件进行对位排列, 然后手工适当调整, 将变化很大、干扰分析的区段删除。对位排列后的序列用 MEGA 3.1 软件进行序列间的差异分析, 并用 UPGMA 法构建分子系统树, 利用 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的置信度, 空缺 (gap) 始终作缺失 (missing) 处理。

## 结果

### 1 序列结果

**1.1 ITS 序列长度及变异** 8 种苍术属植物的 ITS 序列长度变异范围为 706~720 bp, 排序后两端切平,

其序列长为 643 bp。根据已报道的关苍术序列资料 (GenBank 登录号, AY826233 和 AF319053) 确定了 ITS1 区、ITS2 区和 5.8S 区的界限, 其长度分别为 257、164 和 222 bp。5.8S 区序列相当保守, 48 个变异位点均位于 ITS1 区和 ITS2 区 (表 2)。将白术、苍术、北苍术、朝鲜苍术和关苍术的测序结果与 GenBank 上登录的 ITS 序列 (GenBank 登录号分别为 AB219406、AB219407、AB219408、AB219409 和 AB219405) 进行对位排列, 未见差异。

**1.2 叶绿体序列** 8 种苍术属植物的叶绿体 DNA 的 atpB-rbcL 序列长 782~876 bp, 排序后两端切平, 其序列长为 777 bp。共有 10 个变异位点, 其中在 289–304、367、580–585、605–610 和 748–755 位点发生插入/缺失, 白术在 329 位点存在 1 个特异性碱基 C, 北苍术在 657 位点存在 1 个特异性碱基 T, 关苍术在 677 位点存在 1 个特异性碱基 T, 罗田苍术在 706 位点存在 1 个特异性碱基 T (表 3)。

叶绿体 DNA 的 psbB-psbF 序列长 794~828 bp, 排序后两端切平, 其序列长为 742 bp。共有 4 个变异位点, 其中关苍术在 323 位点有 1 个碱基 T 的插入, 除鄂西苍术外的 7 种苍术属植物在 498 位点有 1 个碱基 G 缺失, 鄂西苍术在 558 位点存在特异性碱基 A (表 3)。

叶绿体 DNA 的 trnL-trnF 序列长 881~903 bp, 排序后两端切平, 其序列长为 810 bp。共有 7 个变异位点, 其中在 28、215–216 和 312 位点发生插入/缺失, 鄂西苍术在 567、673 和 721 位点均存在特异性碱基 T (表 3)。将白术、苍术、北苍术、朝鲜苍术和关苍术的测序结果与 GenBank 上登录的 trnL-trnF 序列 (GenBank 登录号分别为 EF028334、EF028337、EF028335、EF028336 和 AY772277) 进行对位排列, 未见差异。

### 2 遗传距离的计算和系统发育分析

将每一种植物的 atpB-rbcL、psbB-psbF 和 trnL-

**Table 2** Variable sites with ITS region sequences of eight medicinal species in *Atractylodes*

No.	ITS1 nucleotide position																												
	19	27	38	40	43-44	50	54	60	73	76	84-85	86	89	99	104	111-112	114	118	124-127	130	146-147	191	195	197-198	208	215	228-229	232	248
1*	A	C	T	G	AC	A	G	A	C	G	GC	G	C	G	C	TC	C	C	CTTG	G	AT	A	A	GC	G	C	GG	T	T
2	-	C	C	A	TT	G	G	A	C	G	GC	G	T	G	C	CA	C	C	CTCG	G	AT	A	G	GC	G	C	CG	T	T
3	A	C	T	G	AC	G	G	A	C	G	GC	G	C	G	C	TC	T	C	CTTG	G	AT	A	A	GC	A	C	GG	T	T
4	A	C	T	A	AC	G	G	A	T	G	GC	A	C	G	C	TC	C	T	CTTG	G	GT	C	A	GC	G	C	CG	T	C
5	A	C	T	A	AC	G	G	A	T	G	GC	A	C	G	C	TC	C	T	CTTG	G	GT	C	A	GC	G	C	CG	T	C
6	A	C	T	A	AC	G	G	A	C	G	GC	G	C	G	T	TC	C	T	CTTG	G	GT	A	A	TC	G	C	CG	T	T
7	A	C	T	A	AC	G	G	A	T	G	GC	A	C	G	C	TC	C	T	CTTG	G	GT	C	A	GC	G	C	CG	T	C
8	A	T	C	A	AC	G	A	G	T	T	AT	G	C	T	T	TC	T	C	TCCA	T	AC	A	G	GT	G	-	CA	C	T

No.	ITS2 nucleotide position																		
	434	444	456	459	467	495	498	503	513-514	530	533	539	541	568	581-582	586	605	619	627-628
1*	A	C	C	G	G	C	T	C	AG	G	C	G	A	C	GC	C	C	C	CG
2	G	C	C	G	G	C	C	C	CG	G	C	G	T	T	GC	C	C	C	CG
3	A	C	C	G	G	C	T	C	AG	G	C	G	A	C	GC	C	C	C	CG
4	T	C	C	G	G	C	C	C	AG	G	C	G	T	C	GC	C	C	C	CG
5	T	C	C	G	G	C	C	C	AG	G	C	G	T	C	GC	C	C	C	CA
6	T	C	C	G	G	C	T	C	AG	G	C	G	T	C	GC	C	C	T	CG
7	T	C	C	G	G	C	C	C	AG	G	C	G	T	C	GC	C	C	C	CA
8	G	T	T	A	A	T	C	T	AA	T	T	A	T	C	AT	T	T	C	TT

\*1: *A. lancea* subsp. *Iuotianensis*; 2: *A. macrocephala*; 3: *A. lancea*; 4: *A. chinensis*; 5: *A. coreana*; 6: *A. japonica*; 7: *A. chinensis* var. *liaotungensis*; 8: *A. carlinoides*

**Table 3** Variable sites of the aligned sequences of three chloroplast DNA fragments of eight medicinal species in *Atractylodes*

Nucleotide position	atpB-rbcL							psbB-psbF				trnL-trnF									
	289-302	303-304	329	367	580-585	605-610	657	677	706	748-755	323	489	558	583	28	215-216	312	332	567	673	721
1*	-	-	A	-	ATTGAA	-	C	A	T	ATATTATT	-	-	G	C	T	-	A	G	C	C	G
2	AGTGATATATGTTG	TA	C	-	ATTGAA	-	C	A	G	ATATTATT	-	-	G	A	T	-	A	G	C	C	G
3	-	-	A	-	ATTGAA	-	C	A	G	ATATTATT	-	-	G	C	-	-	A	G	C	C	G
4	-	-	A	-	ATTGAA	AAATTG	T	A	G	ATATTATT	-	-	G	C	T	-	A	G	C	C	G
5	-	-	A	-	ATTGAA	-	C	A	G	-	-	-	G	C	T	-	A	T	C	C	G
6	AGTGATATATGTTG	AA	A	-	ATTGAA	-	C	T	G	-	T	-	G	C	T	-	A	G	C	C	G
7	-	-	A	-	ATTGAA	-	C	A	G	ATATTATT	-	-	G	C	T	-	-	T	C	C	G
8	AGTGATATATGTTG	TA	A	A	-	-	C	A	G	-	-	G	A	A	T	AT	A	G	T	T	T

\*1: *A. lancea* subsp. *Iuotianensis*; 2: *A. macrocephala*; 3: *A. lancea*; 4: *A. chinensis*; 5: *A. coreana*; 6: *A. japonica*; 7: *A. chinensis* var. *liaotungensis*; 8: *A. carlinoides*

trnF 序列连接起来, 8 种苍术属植物 atpB-rbcL + psbB-psbF + trnL-trnF 序列经对位排列后的序列长度为 2 331 bp。

不同植物序列间的碱基差别 (转换值/颠换值) 和根据 Kimura 的核苷酸替换模型计算出的植物间的遗传距离见表 4。从表 4 中可以看出, 根据 ITS 区序列计算的遗传距离介于 0~0.071 3, 平均值为 0.030 6; atpB-rbcL + psbB-psbF + trnL-trnF 序列计算的遗传距离较小, 介于 0~0.002 6, 平均值为 0.001 2。其中, 白术与其他 7 种植物的遗传距离较大, 平均值为 0.033 1 (ITS) 和 0.001 4 (cpDNA sequence); 鄂西苍术与其他

7 种植物的遗传距离最大, 平均值为 0.069 5 (ITS) 和 0.002 5 (cpDNA sequence); 朝鲜苍术与辽东苍术之间的遗传距离最小, 为 0。

采用 UPGMA 法, 经 1 000 次重复抽样计算, 获得 8 种苍术属植物的分子系统树。比较 ITS 区序列和 atpB-rbcL + psbB-psbF + trnL-trnF 序列给出的结果发现, 两者构建的系统发育树极为相似, 8 种苍术属植物聚成 3 个独立的分支: ① 鄂西苍术和白术各构成一分支; ② 属内其余植物组成一分支 (图 1、图 2)。UPGMA 法无法分辨亲缘关系密切的罗田苍术和苍术以及朝鲜苍术和辽东苍术之间的关系。

讨论

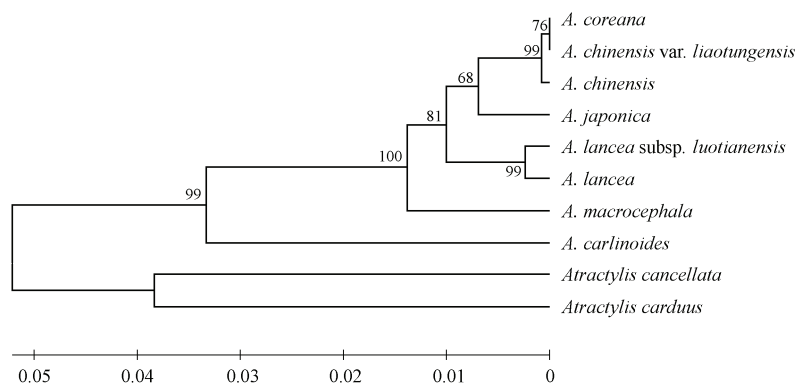
苍术与北苍术、罗田苍术的遗传关系 刘慎谔<sup>[2]</sup>、东北药用植物志<sup>[3]</sup>等将北苍术定为种。石铸等<sup>[5, 6]</sup>通过对中国科学院植物所标本馆苍术属植物标本系统整理后, 主张将茅苍术和北苍术合并为苍术 *A. lancea*。本文通过 *atpB-rbcL*、*psbB-psbF* 和 *trnL-trnF* 间隔区的序列分析, 以及将三套数据拼接后序列重建的系统树 (图 2) 分析, 表明苍术和北苍术遗传关系紧密, 但存在 3 个稳定的变异位点。而通过 ITS 区序

列构建的系统树 (图 1) 表明苍术和北苍术遗传关系较远, 两者的遗传距离达 0.020 6 (表 4)。任冰如等<sup>[16]</sup> RAPD 分析表明南、北苍术间的遗传距离相对较近。基于 RFLP<sup>[11]</sup>分析和 *trnK*<sup>[12]</sup>、ITS<sup>[18]</sup>、*trnL-trnF*<sup>[19]</sup>序列分析, 表明两者存在一定的遗传差异。郭兰萍等<sup>[17]</sup>认为苍术的化学成分、遗传分化和地理分布有一定的相关性, 以地域为界划分南北苍术有一定道理。因此, 通过形态特征、化学成分等<sup>[1, 4, 7, 14, 24]</sup>比较分析, 认为将北苍术作为苍术变种 *A. lancea* var. *chinensis*

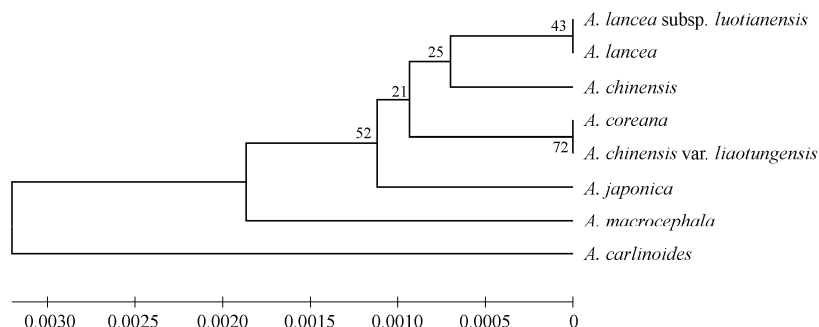
**Table 4** Base differences and genetic distances of ITS region sequences and the combined sequences of three chloroplast DNA fragments of eight medicinal species in *Atractylodes*

No.	ITS								atpB-rbcL+psbB-psbF+trnL-trnF							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
1*		0.025 5	0.004 7	0.019 0	0.020 6	0.015 8	0.020 6	0.071 3	0.001 3	0.000 4	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.002 6
2	11/5		0.027 1	0.027 1	0.028 7	0.027 1	0.028 7	0.067 7	0/3	0.000 9	0.001 3	0.001 3	0.001 3	0.001 3	0.001 3	0.002 2
3	3/0	12/5		0.020 6	0.022 2	0.017 4	0.022 2	0.069 5	0/1	0/2		0.000 4	0.000 4	0.000 4	0.000 4	0.002 2
4	8/4	12/5	9/4		0.001 6	0.012 6	0.001 6	0.069 5	1/1	1/2	1/0		0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.002 6
5	9/4	13/5	10/4	1/0		0.014 2	0	0.069 5	0/2	0/3	0/1	1/1		0.000 9	0	0.002 6
6	6/4	12/5	7/4	6/2	7/2		0.014 2	0.069 5	0/2	0/4	0/1	1/1	0/2		0.000 9	0.002 6
7	9/4	13/5	10/4	1/0	0/0	7/2		0.069 5	0/2	0/3	0/1	1/1	0/0	0/2		0.002 6
8	36/7	33/8	35/7	35/7	35/7	35/7	35/7		3/3	3/2	3/2	4/2	3/3	3/4	3/3	

\*1: *A. lancea* subsp. *luotianensis*; 2: *A. macrocephala*; 3: *A. lancea*; 4: *A. chinensis*; 5: *A. coreana*; 6: *A. japonica*; 7: *A. chinensis* var. *liaotungensis*; 8: *A. carlinoides*



**Figure 1** The UPGMA dendrogram of eight medicinal species in *Atractylodes* based on ITS sequences. *Atractylis cancellata* and *Atractylis carduus* were used as outgroup.



**Figure 2** The UPGMA dendrogram of eight medicinal species in *Atractylodes* based on cpDNA *atpB-rbcL* + *psbB-psbF* + *trnL-trnF* sequences

的分类处理是合适的。

胡世林等<sup>[8, 9]</sup>将分布于大别山区海拔 600 m 以上的苍术定名为一新的地理亚种—罗田苍术 *A. lancea* subsp. *luotianensis*。本文通过 ITS 序列分析和 *atpB-rbcL*、*psbB-psbF* 和 *trnL-trnF* 间隔区的序列分析, 以及参见图 1 和图 2 系统树, 表明罗田苍术-苍术构成一分支, 而且两者之间的遗传距离值非常小 (表 4), 亲缘关系密切。作者通过野外调查, 查阅中国科学院植物所和中国医学科学院药用植物研究标本馆标本, 同时查阅文献<sup>[1, 5, 6, 17, 25, 26]</sup>, 表明苍术是一个多型性种, 存在一系列过渡类型。因此, 仅靠少数形态特征的差异就将罗田苍术作为变种从苍术中划分出来, 是否合理仍需进一步研究。

**辽东苍术和朝鲜苍术的遗传关系** 刘慎谔<sup>[2]</sup>、东北药用植物志<sup>[3]</sup>和郭允珍等<sup>[1]</sup>根据叶较小、先端尖、茎上部叶多数、密生、不超出头状花序和头状花序下的叶状苞多数等形态特征, 将辽东苍术作为北苍术的变种处理。作者通过查阅文献、核对标本、野外采集等, 发现其叶部形态特征为: 叶椭圆形或长椭圆形、披针形或卵状披针形, 最宽处在叶片中部或中部以下, 基部圆形, 大部分茎叶无柄, 半抱茎或贴茎。以上形态特征与朝鲜苍术区别于其他各种苍术属植物的叶部特征基本一致<sup>[5]</sup>。UPGMA 系统树 (图 1 和图 2) 表明辽东苍术-朝鲜苍术构成一分支, 两者遗传距离值为 0 (表 4), 分子数据也支持将辽东苍术与朝鲜苍术归并。

**鄂西苍术与苍术属其他植物的亲缘关系** 本文研究表明, 鄂西苍术与其他 7 种植物的遗传距离较大, 位于 UPGMA 系统树的基部位置, 显示出与其余植物比较远的亲缘关系。

马起凤等<sup>[7]</sup>根据鄂西苍术仅分布于湖北省秭归县五指山一带, 贮藏量极少, 分布局限, 具有基生叶, 地上茎无分枝, 地下茎不发达, 并且含有大量的该属特征性成分苍术酮, 认为鄂西苍术是苍术属内比较原始的种, 其他各种苍术由其分化而来; 在湖北西部变异为无叶柄的苍术类 (包括茅苍术、朝鲜苍术及北苍术等) 和有叶柄的白术类 (包括白术和关苍术)。本文结果支持鄂西苍术是较原始的种的观点。但关于有叶柄的白术类 (包括白术和关苍术) 比无叶柄的苍术类 (包括茅苍术、朝鲜苍术及北苍术等) 更进化的观点, 与本文的研究存在一定差异。由于所选择的代表植物非常有限, 要给出较为肯定的结论尚需进一步研究。

由于 8 种苍术属植物的叶绿体 *atpB-rbcL*、*psbB-psbF* 和 *trnL-trnF* 间隔区高度保守, 遗传变异率极低, 有系统学分析意义的信息位点缺乏, 利用其序列探讨属内种间关系时, 普遍存在内部分支分辨率和支持率较低的状况。

目前, 有关苍术属植物相互间的系统关系、属内各植物间的分类学处理均存在争议。现阶段, 要想更好地挖掘苍术属植物的药用资源和药用价值, 必须采集更多地区的样品, 并结合形态学、解剖学、细胞学、植物化学以及分子生药学等方法, 对该属植物的亲缘关系和系统分类作进一步的探讨。

**致谢:** 安徽中医学院药学院王德群教授、彭华胜老师协助采样, 湖北省农业科学院中药材研究所由金文主任采集鄂西苍术样品。

## References

- [1] Lou ZC, Qin B. Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs: North-China Edition, Vol 3 (常用中药材品种整理和质量研究: 北方编第 3 册) [M]. Beijing: Beijing Medical University Press, 1996: 743-807.
- [2] Liu SE. Claves Plantarum Chinae Boreali-orientalis (东北植物检索表) [M]. Beijing: Science Press, 1959: 410.
- [3] Institute of Forestry and Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Medicinal Flora of Northeast China (东北药用植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1959: 192-196.
- [4] Fu SM, Fang HJ, Liu GS, et al. A study on the medicinal plants of the genus *Atractylodes* [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 1981, 19: 195-202.
- [5] Lin R, Shi Z. Flora of China, Vol 78 (中国植物志: 第 78 册) [M]. Beijing: Science Press, 1987: 23-29.
- [6] Shi Z. On the nomenclature of Chinese drug "CANGZHU" [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 1981, 19: 318-322.
- [7] Ma QF, Meng XS, Zhou HR. Studies on the chemical constituents and taxonomy of genus *Atractylodes* native of China [J]. J Shenyang Coll Pharm (沈阳药学院学报), 1982, 3: 54-61.
- [8] Hu SL, Feng XF, Wang J, et al. A new subspecies of *Atractylodes* from China [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 2001, 39: 84-86.
- [9] Hu SL. Textual research for Chinese materia medica of *Rhizoma Atractylodis* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中国医药学报), 2001, 16: 11-13.
- [10] Huang LQ. Molecular Pharmacognosy (分子生药学) [M]. 2nd ed. Beijing: Peking University Medical Press, 2006.

- [11] Mizukami H, Shimizu R, Kohda H, et al. Restriction fragment length polymorphisms of rDNA and variation of essential oil composition in *Atractylodes* plants [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19: 577–580.
- [12] Mizukami H, Shimizu R, Kohjyouma M, et al. Phylogenetic analysis of *Atractylodes* plants based on chloroplast trnK sequence [J]. Biol Pharm Bull, 1998, 19: 474–478.
- [13] Mizukami H, Okabe Y, Kohda H, et al. Identification of the crude drug *Atractylodes* Rhizome (Byaku-jutsu) and *Atractylodes lancea* Rhizome (So-jutsu) using chloroplast trnK sequence as a molecular marker [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23: 589–594.
- [14] Kohjyouma M, Nakajima S, Namera A, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis and variation of essential oil components of *Atractylodes* plants [J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20: 502–506.
- [15] Ren BR, Yu H, He SA. Isolation of DNA from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. and genetic diversity analysis with RAPD [J]. J Plant Res Environ (植物资源与环境学报), 1997, 6: 1–6.
- [16] Ren BR, He SA, Yu H, et al. Evaluating the relationships between populations of swordlike *Atractylodes* (*Atractylodes lancea*) by random amplified polymorphic DNA technology [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31: 458–461.
- [17] Guo LP, Huang HQ, Wang M, et al. A preliminary study on relationship between *Atractylodes lancea* and *A. chinensis* as analyzed by RAPD [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2001, 26: 156–158.
- [18] Shiba M, Kondo K, Miki E, et al. Identification of medicinal *Atractylodes* based on ITS sequences of nrDNA [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29: 315–320.
- [19] Ge YF, Hang YY, Xia B, et al. Sequencing of trnL-F and analysis of interspecific genetic relationship of five medicinal species in *Atractylodes* DC. [J]. J Plant Res Environ (植物资源与环境学报), 2007, 16: 12–16.
- [20] Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Ann Mo Bot Gard, 1995, 82: 247–277.
- [21] Wang JB, Zhang WJ, Chen JK. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 1999, 37: 407–416.
- [22] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Mol Biol, 1991, 17: 1105–1109.
- [23] Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and conservation of tree species [J]. Trends Ecol Evol, 1999, 14: 140–145.
- [24] Hu SL, Feng XF, Ji L, et al. *Atractylodes lancea* and its geo-varieties [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31: 781–784.
- [25] Peng HS, Wang DQ. Studies on population biology of transitional types of genus *Atractylodes* in Anhui province [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 793–797.
- [26] He SA, He HS, Lu Y, et al. The conservation and utilization of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC [J]. J Plant Res Environ (植物资源与环境学报), 1993, 2: 1–6.