

文章编号:1002-1175(2007)04-0525-05

简报

陇西栽培蒙古黄芪酯酶同工酶数量分析^{*}

谢小龙^{1,2} 胡延萍^{1,2} 赵旭东^{1,2} 王莉^{1,2} 李毅^{1†}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(2006 年 11 月 13 日收稿; 2007 年 1 月 15 日收修改稿)

Xie XL, Hu YP, Zhao XD, et al. Numerical analysis of esterase isozymes in seeds of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao cultivated in Longxi county. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2007, 24(4): 525 ~ 529

摘要 为了对陇西栽培蒙古黄芪的优质高产和良种选育提供一定依据,采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对该地区栽培蒙古黄芪种子酯酶同工酶进行了研究.结果表明:该地栽培蒙古黄芪是一个复杂的异质群体;种子酯酶同工酶电泳技术是检验蒙古黄芪种内变异的一种有效手段.

关键词 蒙古黄芪,酯酶同工酶,聚类分析

中图分类号 R284.1

1 引言

蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao) 为豆科 (Leguminosae) 黄芪属 (*Astragalus*) 多年生草本植物. 其干燥根为正品黄芪之一,具有补气固表、利尿托毒、排浓、敛疮生肌之功效,在临床上广泛应用^[1]. 由于长期过度采挖,蒙古黄芪野生资源锐减,目前其商品来源主要为栽培品^[2]. 甘肃省陇西县于 20 世纪 80 年代中期开始大规模引种栽培蒙古黄芪. 据当地药农反映,引种栽培初期蒙古黄芪生长好、产量高,但近些年其病虫害和减产情况严重. 为探究其原因并为选育黄芪良种提供一定依据,作者对陇西栽培蒙古黄芪的形态多样性进行了调查^[3],本文利用酯酶同工酶电泳技术以进一步研究其在遗传上的分化.

2 材料和方法

2.1 实验材料

2003 年于甘肃省陇西县首阳镇下河社蒙古黄芪栽培大田中,随机采 100 个植株的果荚,分单株净种,装入纸袋自然风干后,每单株随机选 1 粒纯净种子供试验用.

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

75%乙醇将供试种子消毒 10min 后,蒸馏水反复冲洗 3 次,用滤纸将水吸干,称取单粒种子重量,压

^{*}2001 年中科院中组部“西部之光”人才培养计划项目和 2003 年国家科学技术部农业科技成果转化资金项目 (03EFN216300247) 资助
[†]通讯联系人, E-mail: Li Yi @nwipb. ac. cn

碎并加入 30 倍 (v/m) 稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液 (0.494 mol/L pH6.8 Tris-HCl 溶液)^[4], 冰浴研磨成匀浆, 置于 0~4 °C 冰箱中浸提 10h 后, 在 Sigma 2k15 型冷冻离心机中于 4 °C 以 13201g 离心 15min, 吸取上清液在上述条件下再次离心, 取第 2 次离心的上清液, 并加入等体积样品缓冲液 ($V_{\text{浓缩胶缓冲液}} : V_{\text{甘油}} : V_{1\% \text{溴酚蓝}} : V_{\text{蒸馏水}} = 3:1:5:5:14$) 即为样品。

2.2.2 酯酶同工酶电泳

采用不连续聚丙烯酰胺小型垂直板凝胶电泳. 电泳仪和电泳槽分别为北京六一厂 DYY-III2B 型和 DYY-III28A 型. 浓缩胶丙烯酰胺质量浓度 40g/L (化学聚合), 分离胶丙烯酰胺质量浓度 100g/L, 电极缓冲液储液为 pH8.3 Tris-Gly 缓冲液 (使用时稀释 10 倍)^[4]. 每槽进样 60 μ L, 4 °C 冰箱中稳流电泳, 初始电流强度为 20mA, 样品进入分离胶后, 电流增至 30mA, 当溴酚蓝指示剂到达分离胶底部约 1cm 处时停止电泳. 取出胶板, 用 - 醋酸萘酯, - 醋酸萘酯, 坚牢蓝 RR 染色^[5], 染色完毕后所显示谱带即为酯酶同工酶酶谱^[4,6-8]. 拍照并精确测量酶谱和溴酚蓝的迁移距离. 每一样品重复电泳 2 次, 为使不同胶板上的酶谱带在相对位置上更具可比性, 前一板中后一半种子重复电泳时与其后顺序排列的种子在下一板中同时电泳, 依次进行, 直至全部样品电泳完毕. 以第一块胶板上酶谱的 R_f 值为标准, 其他各板以主要谱带为基础, 通过比较计算确认各酶谱的 R_f 值. $R_f = \text{酶谱迁移距离} / \text{指示剂迁移距离}$.

2.2.3 资料分析

以酶谱带的 R_f 值依次确定各谱带名, 并依据 0/1 二态编码原则 (即有谱带的用 1 表示, 无谱带的用 0 表示) 给 100 粒种子的酯酶同工酶谱带的每条带赋值, 制成 100 \times 34 (100 为种子样品数, 34 为所有样品的酯酶同工酶谱带种类数) 原始二态数据矩阵表.

SPSS11.0 统计软件计算两两样品之间的 Jaccard 系数, 采用组内连接法 (Within-groups linkage) 进行 Q 型聚类分析^[9].

3 结果与分析

表 1 结果显示, 蒙古黄芪种子酯酶同工酶图谱中 (图 1), 100 粒供试种子的共有谱带 2 条, 分别为 R_f 0.017 和 R_f 0.029, 占总酶谱带 (34 条) 的 5.88%; 酶谱带 R_f 0.445, R_f 0.472, R_f 0.504 以及 R_f 0.537 在样品中出现频率也较高, 分别为 94%, 95%, 95% 和 96%, 占总酶谱带的 11.76%.

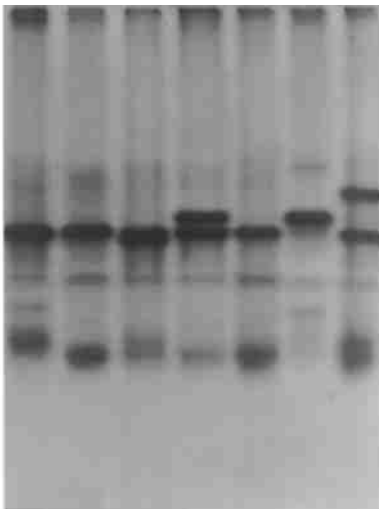


图 1 9~15 号种子酯酶同工酶图谱

这些酶谱带是蒙古黄芪种子的特征谱带, 表示供试种子个体间的相似性和亲缘关系. 但其余 82.36% 的酶谱带更多地表示种子个体之间的异质性. 其中 R_f 0.046, R_f 0.166, R_f 0.258, R_f 0.380 和 R_f 0.497 分别为个别单粒种子的特异特征带; R_f 0.270, R_f 0.437, R_f 0.457, R_f 0.464, R_f 0.484, R_f 0.634 和 R_f 0.643 等谱带也分别仅在极少数种子的酶谱中出现 (出现频率 5%); R_f 0.283, R_f 0.303, R_f 0.324, R_f 0.350, R_f 0.362, R_f 0.564, R_f 0.575, R_f 0.585 和 R_f 0.593 等谱带的出现频率也均低于 40%. 可见, 酯酶同工酶在蒙古黄芪种子个体间表现出很大的变异性.

聚类图 (图 2) 中, 在结合线 L_1 处可将 100 粒蒙古黄芪种子划分为 3 个酶谱表征群 (A~C): A 表征群包含 27 个种子个体, 占供试种子总数的 27%; B 表征群种子个体数占总数的 33%; C 表征群种子个体数占总数的 40%. 在 L_2 处可将 100 粒种子进一步划分为 7 个亚表征群 (a~g), 其中 a, c, d, f, g 5 个亚表征群包含种子个体数较多, 分别占种子总数的 22%, 13%, 20%, 19%, 17%; 而 b, e 2 个亚表征群包含种子个体数则较少, 分别仅占总数的 5% 和 4%. 聚类结果表明, 陇西栽培蒙古黄芪在遗传上已向不同方向分化. 同时从整个聚类图可以看出, 不同种子个体之间在酶谱上都存在一定差异.

表 1 各酯酶酶谱在样品中所出现频率

酶谱带(Rf)	0.017	0.029	0.046	0.166	0.258	0.270	0.283	0.303	0.314	0.324	0.339	
谱带出现次数	100	100	1	1	1	3	38	14	61	25	63	
谱带出现频率/(%)	100	100	1	1	1	3	38	14	61	25	63	
酶谱带(Rf)	0.350	0.362	0.380	0.416	0.437	0.445	0.457	0.464	0.472	0.484	0.497	
谱带出现次数	30	30	1	63	4	94	2	3	95	4	1	
谱带出现频率/(%)	30	30	1	63	4	94	2	3	95	4	1	
酶谱带(Rf)	0.504	0.537	0.564	0.575	0.585	0.593	0.619	0.634	0.643	0.657	0.673	0.693
谱带出现次数	95	96	26	12	12	31	77	4	5	68	62	55
谱带出现频率/(%)	95	96	26	12	12	31	77	4	5	68	62	55

可见,陇西栽培蒙古黄芪是一个具有不同类型的、严重混杂的异质群体。

4 讨论

4.1 有作者分别用叶片、幼根皮部^[10]及种子幼芽^[11]制样,达到了对蒙古黄芪种内变异类型进行酯酶同工酶差异比较的目的。本实验采用风干种子制样,亦获得了清晰、丰富的酯酶同工酶谱带。同时该法还省去了种子发芽等繁琐过程,从而克服了由于取样部位和发芽期差异而造成的不同组织器官特异性和器官发育阶段性的差异,具有方便、准确及可比性强的特点。

4.2 酯酶同工酶电泳数据分析表明,陇西栽培蒙古黄芪是一个严重混杂的群体。这与其形态上具有丰富多样性是一致的^[3]。形成这种混杂的可能原因有:(1)引种栽培初期,由于种源不足,当地药农从不同产地引进蒙古黄芪种子混合使用(访问调查资料),由于不同地理种源的蒙古黄芪在遗传上可能存在差异^[12~14],混合使用后造成了机械混杂;(2)同一种源的蒙古黄芪本身就存在不同变异类型^[10,11],异地环境加剧了不同类型间差异的表达;(3)异花授粉的蒙古黄芪^[3],由于自然异交而引起基因重组,导致出现性状的变异;(4)引种黄芪在新的自然条件和栽培条件下,可能发生基因突变,使栽培群体内出现新的类型;(5)栽培技术不良^[15]使群体中优良个体不能充分繁殖,而一些适应低产水平的个体比例逐年上升,从而改变栽培群体的遗传组成;(6)陇西栽培蒙古黄芪生产上用种为药农自留自用或在本地域内交换使用,未对种子进行提纯复壮,缺乏系统的良种选育工作。

混杂的群体势必导致其种性的退化,这是造成陇西栽培蒙古黄芪近年来产量下降的重要原因。对此,应按照规范化生产操作规程 SOP 生产黄芪种子,加强该地蒙古黄芪的提纯复壮和良种选育工作,为生产提供良种^[16];同时,为获得优质高产黄芪,在当地还应按照蒙古黄芪规范化种植技术规程^[15]生产黄芪。

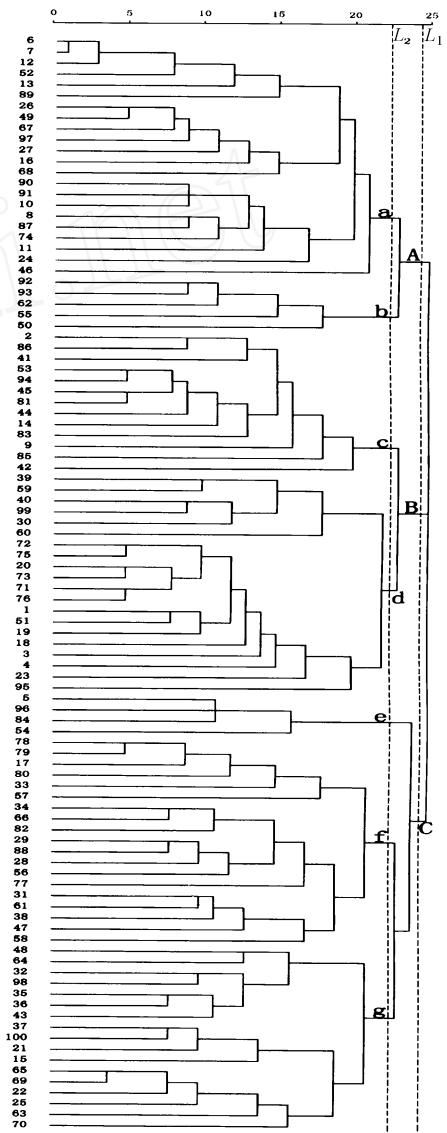


图 2 蒙古黄芪种子酯酶同工酶聚类树状图

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2005 年版(一部). 北京: 化学工业出版社, 2005. 212 ~ 213
- [2] 肖培根. 新编中药志(第一卷). 北京: 化学工业出版社, 2002. 876 ~ 893
- [3] Xie XL, Wang XS, Zhao L, et al. Morphotype diversity of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2004, 32(6): 1203 ~ 1204 (in Chinese)
谢小龙, 王溪森, 赵利, 等. 陇西栽培蒙古黄芪原植物形态多样性研究. *安徽农业科学*, 2004, 32(6): 1203 ~ 1204
- [4] 何忠效, 张树政. 电泳(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1999
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 266
- [6] 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996. 4 ~ 9
- [7] Hu HL, Dang RY, Wang J. EST-PAGE technology and identification of sunflower hybrids and inbreds. *Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition)*, 2003, 31(3): 65 ~ 68 (in Chinese)
胡辉林, 党润盈, 王军. EST-PAGE 法对向日葵杂交种及自交系品种纯度的鉴定. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2003, 31(3): 65 ~ 68
- [8] Shi SX, Zhang ZE, Xiao JP, et al. Studies on the seed storage behaviour of *Panax quinquefolius*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31(10): 776 ~ 778 (in Chinese)
石思信, 张志娥, 肖建平, 等. 西洋参种子贮存习性的研究. *中草药*, 2000, 31(10): 776 ~ 778
- [9] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析(第 2 版). 北京: 电子工业出版社, 2002. 347 ~ 365
- [10] Bai XL, Wang X, Zhang L, et al. On the ultrastructure of Mongolian Milkvetch (*Astragalus mongholicus*) and a comparison of their isozymes and lipase. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1994, 25(9): 479 ~ 481 (in Chinese)
白效令, 王湘, 张莉, 等. 黄芪超微结构观察及其脂酶同工酶比较. *中草药*, 1994, 25(9): 479 ~ 481
- [11] Bai XL, Ni N, Qu J, et al. Study on the difference between *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* seeds. In: Botany Society of Shanxi Province, Botany Society of Shandong Province, Botany Society of Hebei Province, et al. *North China Bulletin of Botanical Research* (vol.). Tianjin: Nankai University Press, 1993. 40 ~ 45 (in Chinese)
白效令, 倪娜, 屈静, 等. 蒙古黄芪种子间差异的研究. 见: 山西省植物学会, 山东省植物学会, 河北省植物学会, 等编. *北方植物学研究(第一集)*. 天津: 南开大学出版社, 1993. 40 ~ 45
- [12] Liu YH. Karyotype analysis of 5 species of genus *Astragalus*. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1984, 22(2): 125 ~ 127 (in Chinese)
刘玉红. 五种黄芪属植物的核型分析. *植物分类学报*, 1984, 22(2): 125 ~ 127
- [13] Ma XH, Qin RL, Xing WB. Chromosome observations of some medical plants in Xinjiang. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1984, 22(3): 243 ~ 249 (in Chinese)
马兴华, 覃若林, 邢文斌. 新疆某些药用植物的染色体观察. *植物分类学报*, 1984, 22(3): 243 ~ 249
- [14] Yan L, Wan T, Zhang Z, et al. Analysis on botanical characters of *Astragalus membranaceus* Bunge. and *A. membranaceus* var. *mongholicus* (Bunge.) Hsiao. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2001, 22(4): 71 ~ 77 (in Chinese)
燕玲, 宛涛, 张众, 等. 膜荚黄芪与蒙古黄芪植物学特征分析. *内蒙古农业大学学报*, 2001, 22(4): 71 ~ 77
- [15] Chen ZG, Ma SZ, Chen CC, et al. Standard operating procedure for *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* of domestic medicinal materials in Longxi, Gansu Province. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2004, 35(11): 1289 ~ 1293 (in Chinese)
陈志国, 马世震, 陈桂琛, 等. 甘肃陇西道地药材蒙古黄芪规范化栽培技术规程初步研究. *中草药*, 2004, 35(11): 1289 ~ 1293
- [16] Zhang LP, Shi J, Yang CQ, et al. Study on formulation of normalized operational regulations for production of seeds of *Astragalus mongholicus*. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2005, 7(6): 72 ~ 78, 66 (in Chinese)
张丽萍, 史静, 杨春清, 等. 黄芪种子规范化生产操作规程 SOP 的制定. *世界科学技术——中医药现代化*, 2005, 7(6): 72 ~ 78, 66

Numerical analysis of esterase isozymes in seeds of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao cultivated in Longxi county

XIE Xiao-Long^{1,2} HU Yan-Ping^{1,2} ZHAO Xu-Dong^{1,2} WANG Li^{1,2} LI Yi¹

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2 Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The esterase isozyme system in the seeds of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao cultivated in Longxi county was studied by means of vertical polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the individuals of *A. membranaceus* var. *mongholicus* were heterogenous and the cultivated population was seriously mixed. The esterase isozyme electrophoresis used in this paper was an effective method for detecting intraspecific variation of *A. membranaceus* var. *mongholicus*.

Key words *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, esterase isozyme, cluster analysis

www.cnki.net