

蒙古黄芪 2 种表型种子的酯酶同工酶差异性研究

谢小龙^{1,2}, 李 毅^{2*}

(1. 河南中医学院 药学院, 河南 郑州 450046; 2. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

摘要: 为探究蒙古黄芪 2 种表型种子在遗传上的分化情况, 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对蒙古黄芪有纹和无纹 2 种表型种子共 90 粒个体的酯酶同工酶进行了研究。结果表明: 电泳共产生的 27 条酯酶同工酶谱带中, 分别有 11.11%、29.63% 和 70.37% 的谱带在种子个体、母株个体及种子表型水平上是恒定的, 与其相应的其余谱带分别在上述 3 个水平上存在不同程度的差异。聚类分析将 90 粒供试种子划分为 2 个酶谱表征群和 6 个亚表征群, 其中 B 表征群均由有纹种子组成, A 表征群则由有纹和无纹 2 种表型种子组成; 除 c 亚表征群由 2 种表型种子组成外, 其余 5 个亚表征群均由同一表型的种子组成。蒙古黄芪 2 种表型种子在遗传上未明显分化, 表型和遗传上并不完全一致, 需进一步加强人工选择。

关键词: 蒙古黄芪; 种子; 表型; 酯酶同工酶; 遗传分化

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)06-0116-05

Studies on Esterase Isozymic Differences between Two Phenotypes of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* Seeds

XIE Xiao-long^{1,2}, LI Yi^{2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: Vertical polyacrylamide gel electrophoresis was used to study the esterase isozyme system in the 90 seed individuals to uncover the genetic relationship between two seed phenotypes of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, with one type possessing spots on the surface of seed coat but the other not. The results showed that a total of 27 esterase isozymic bands were generated, of which 11.11%, 29.63%, and 70.37% separately existed stably at seeds, mother plants, and seed phenotypes levels, while 88.89%, 70.37% and 29.63% were polymorphic among above-mentioned three levels, respectively. In the dendrogram, all the seeds tested were divided into two groups or six subgroups. Group B only included seeds with spots, while group A had two phenotypic seeds. Among the six subgroups, subgroup c possessed two phenotypic seeds and the others consisted of the same phenotypic seeds. In conclusion, there was no obvious genetic differentiation between the two seed phenotypes of *A. membranaceus* var. *mongholicus*, but further artificial selection could be helpful to accelerate genetic differentiation between them.

Key words: *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*; seed; phenotype; esterase isozyme; genetic differentiation

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

燥根为传统中药黄芪, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌等功效^[1]。由于长期过度采挖, 蒙古黄芪野生资源锐减,

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2011BAI06B02); 河南中医学院“博士科研基金”项目 (BSJJ2009-30)

作者简介: 谢小龙 (1976-), 男, 河南武陟人, 讲师, 博士, 主要从事药用植物资源相关研究。E-mail: xiaolongxie@126.com

* 通讯作者: 李 毅 (1965-), 男, 青海西宁人, 研究员, 主要从事生物技术相关研究。E-mail: liyi@nwipb.cas.cn

目前商品黄芪多为栽培品^[2]。

甘肃省陇西县是黄芪的道地产区,有“中国黄芪之乡”的美称。在长期栽培过程中,该地蒙古黄芪出现了丰富的变异,存在不同的形态类型,其中性状差异显著的有红色类型(R 型)和绿色类型(G 型)2 个自然类型;R 型植株茎蔓及果荚均或多或少具有红色斑纹,G 型植株茎蔓及果荚均为纯绿色,不具红色斑纹。调查也表明,2 种自然类型的成熟种子在表型上亦存在明显差异,R 型蒙古黄芪 95.36% 植株所产的种子表面均具斑纹,而所有 G 型植株的种子均无斑纹^[3-4]。丰富的遗传变异是植物选择育种的基础,然而有纹和无纹 2 种表型种子在遗传上是否固定下来尚未进行研究。

同工酶是基因表达的直接产物,可以反映基因型的微小差异,是探测种内遗传多样性和亲缘关系的常用遗传标记^[5-6]。对 2 种表型种子的酯酶同工酶进行研究,以探测二者在遗传上的关系及其与母株自然类型间的关系,从而为选择育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

从陇西蒙古黄芪栽培大田分别选取 5 个典型 R 型和 G 型植株,R 型植株所产种子均为有纹种子,G 型植株所产种子均为无纹种子。每个植株随机选取纯净种子(G1、G5 植株分别选取 10 粒和 8 粒种子,其余植株均选 9 粒种子)作为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 酯酶同工酶样品制备及电泳 按照谢小龙等^[7]的方法制备蒙古黄芪种子酯酶同工酶提取液并进行电泳。蒙古黄芪种子经 75% 的乙醇消毒后,加入 4 倍稀释的浓缩胶缓冲液作为酶提取液,冰浴研磨匀浆,4℃ 下浸提 10 h 后,取其 2 次离心上清液,

加入等体积样品缓冲液摇匀即为样品。采用不连续聚丙烯酰胺小型垂直板凝胶电泳,浓缩胶质量分数为 4%,分离胶质量分数为 10%;采用 α -醋酸萘酯、 β -醋酸萘酯、坚牢蓝 RR 染色。

1.2.2 统计分析 计算各酶谱带的相对迁移率(Rf),以 Rf 值依次确定各酶谱带名,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 90 粒种子的酯酶同工酶谱带的每条带赋值,制成 90×27(90 为种子样品数,27 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^[7]。

用 SPSS 11.0 统计软件计算两两样品之间的 Jaccard 系数(JAC),用组内连接法(Within-groups linkage)进行 Q 型聚类分析,得出树状图^[8]。

2 结果与分析

2.1 酯酶同工酶分布情况

90 粒蒙古黄芪种子电泳共产生 27 条酯酶同工酶谱带,根据各谱带在有纹和无纹 2 种表型种子中的分布情况,将其分为 A、B、C 3 种类型(表 1—2)。A 类型的 3 条谱带为所有供试种子的共有谱带;B 类型的 16 条谱带虽为 2 种表型种子所共有,但在种子个体间存在差异,部分种子中不存在该谱带;C 类型的 8 条谱带仅存在于其中一个表型的部分种子中,而另一个表型的种子中不存在,其中 Rf0.303、Rf0.392、Rf0.464、Rf0.673 等 4 条谱带仅存在于部分有纹表型种子中,而 Rf0.437、Rf0.457、Rf0.573、Rf0.585 等 4 条谱带仅存在于部分无纹表型种子中。由上可知,有 11.11% 的酯酶同工酶谱带(A 类型谱带)在种子个体水平上是恒定的;70.37%(A 类型+B 类型谱带)的同工酶谱带在种子表型水平上是恒定的;而其余 29.63% 的谱带(C 类型谱带)在种子表型间的分布则存在不同程度的差异。

表 1 蒙古黄芪种子酯酶谱带分类

| Rf 值 | 种子表型 | | 种子表型 谱带归类 | 植株个体 | | | | | | | | | | 植株个体 谱带归类 |
|-------|------|----|--------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------|
| | 无纹 | 有纹 | | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | |
| 0.017 | + | + | A | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | I |
| 0.029 | + | + | A | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | I |
| 0.283 | + | + | B | + | — | + | — | + | + | — | — | — | + | V |
| 0.303 | — | + | C | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | IX |
| 0.314 | + | + | B | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | II |
| 0.324 | + | + | B | + | — | + | + | + | + | + | — | + | + | IV |
| 0.339 | + | + | B | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | II |
| 0.350 | + | + | B | + | + | + | + | + | + | — | + | + | + | III |
| 0.362 | + | + | B | + | + | + | + | — | — | + | + | + | + | IV |

续表 1 蒙古黄芪种子酯酶谱带分类

| Rf 值 | 种子表型 | | 种子表型 谱带归类 | 植株个体 | | | | | | | | | | | 植株个体 谱带归类 |
|-------|------|----|--------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|--------------|
| | 无纹 | 有纹 | | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | | |
| 0.392 | — | +' | C | — | — | — | — | — | — | — | — | — | +' | IX | |
| 0.416 | +' | +' | B | +' | +' | — | + | +' | +' | +' | +' | +' | +' | III | |
| 0.437 | +' | — | C | — | — | +' | — | — | — | — | — | — | — | IX | |
| 0.445 | +' | + | B | + | + | +' | + | + | + | + | + | + | + | II | |
| 0.457 | +' | — | C | +' | — | — | — | — | — | — | — | — | — | IX | |
| 0.464 | — | +' | C | — | — | — | — | — | — | +' | — | — | — | IX | |
| 0.472 | +' | +' | B | +' | + | + | + | + | + | +' | + | + | + | II | |
| 0.484 | +' | +' | B | — | — | — | — | +' | — | +' | +' | — | — | VI | |
| 0.504 | +' | +' | B | +' | + | + | + | +' | +' | +' | +' | + | + | II | |
| 0.537 | + | + | A | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | I | |
| 0.564 | +' | +' | B | +' | — | +' | — | + | — | — | + | — | — | VI | |
| 0.573 | +' | — | C | +' | +' | — | — | — | — | — | — | — | — | VIII | |
| 0.585 | +' | — | C | — | +' | — | — | — | — | — | — | — | — | IX | |
| 0.593 | +' | +' | B | +' | +' | + | + | — | + | + | — | +' | +' | IV | |
| 0.619 | +' | +' | B | +' | +' | + | + | + | + | + | + | + | — | III | |
| 0.657 | +' | +' | B | + | + | + | + | + | + | + | — | — | + | IV | |
| 0.673 | — | +' | C | — | — | — | — | — | — | — | + | + | — | VIII | |
| 0.693 | + | +' | B | + | + | + | + | + | + | — | + | + | — | IV | |

注: +表示种子表型或植株个体内所有种子均具有该谱带; +'表示种子表型或植株个体内部分种子具有该谱带; —表示种子表型或植株个体内所有种子均不具有该谱带。

表 2 蒙古黄芪种子酯酶谱带类型比例

| 酶谱类型 | 植株类型 | | 酶谱带 | | | | | 占总谱带百分率/% |
|------|------|----|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | R | G | | | | | | |
| A | + | + | Rf0.017 | Rf0.029 | Rf0.537 | | | 11.11 |
| B | +' | +' | Rf0.283 | Rf0.314 | Rf0.324 | Rf0.339 | Rf0.350 | 59.26 |
| | | | Rf0.362 | Rf0.416 | Rf0.472 | Rf0.484 | Rf0.504 | |
| | | | Rf0.564 | Rf0.593 | Rf0.619 | Rf0.657 | | |
| | | | | | | | | |
| | + | +' | Rf0.445 | | | | | |
| | +' | + | Rf0.693 | | | | | |
| C | +' | — | Rf0.303 | Rf0.392 | Rf0.464 | Rf0.693 | | 29.63 |
| | — | +' | Rf0.437 | Rf0.457 | Rf0.573 | Rf0.585 | | |

| 植株个体酶谱类型 | | | 酶谱带 | | | | | 占总谱带百分率/% |
|----------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | | | | | | | | |
| I | | Rf0.017 | Rf0.029 | Rf0.537 | | | | 11.11 |
| II | | Rf0.314 | Rf0.339 | Rf0.445 | Rf0.472 | Rf0.504 | | 18.52 |
| III | | Rf0.350 | Rf0.416 | Rf0.619 | | | | 11.11 |
| IV | | Rf0.324 | Rf0.362 | Rf0.593 | Rf0.657 | Rf0.693 | | 18.52 |
| V | | Rf0.283 | | | | | | 3.70 |
| VI | | Rf0.564 | | | | | | 3.70 |
| VII | | Rf0.484 | | | | | | 3.70 |
| VIII | | Rf0.573 | Rf0.673 | | | | | 7.41 |
| IX | | Rf0.303 | Rf0.392 | Rf0.437 | Rf0.457 | Rf0.464 | Rf0.585 | 22.22 |

注: +表示植株类型内所有种子均具有该谱带; +'表示植株类型内部分种子具有该谱带; —表示植株类型内所有种子均不具该谱带。

根据酯酶同工酶谱带在不同植株种子中的分布情况,将上述 27 条酶谱带分为 9 种类型(I—IX)(表 1—2)。类型 I 共 3 条谱带,为所有供试种子共有;类型 II 的 5 条谱带为 10 个供试植株的共有带,但它们

在同一植株的种子个体之间存在一定差异;类型 III 的 3 条谱带仅在 1 个植株的种子中缺失,而在其他 9 个植株的全部或部分种子中存在;类型 IV 的 5 条谱带在 2 个植株中缺失,而在其余 8 个植株的全部或部分种

子中存在,缺失谱带的2个植株归属于同一或不同的自然类型;类型V仅有1条谱带,G2、G4、R2、R3及R4等5个植株的种子中未检测出该谱带,G3植株的全部种子具有该谱带,而其余4个植株中仅部分种子具有该谱带;类型VI的1条谱带在G5和R3植株的全部种子中存在,在G1和G3每个植株的部分种子中存在,而在其余植株的种子中则不存在;类型VII的1条谱带,仅在G5、R2及R3等3个植株的部分种子中检测到,而在其余植株的种子中未检测到;类型VIII包括2条谱带,仅在2个植株的全部或部分种子中具有,其余植株的种子中则不存在;类型IX的6条谱带为其中1个植株所特有,但仅出现在该植株的部分种子中。由上可知,11.11%(I类)的酯酶同工酶谱带在种子个体水平上是恒定的,29.63%(I—II类)的酶谱带在种子母株个体水平上是恒定的,其余70.37%(III—IX类)的谱带在母株个体水平上或多或少存在差异。

以上结果表明,酯酶同工酶谱带的分布在蒙古黄芪种子个体、种子母株及种子表型间存在不同程度的差异,但同时存在一定相似性,尤其是在2个不同的种子表型间,其共有的酯酶同工酶谱带高达70.37%。

2.2 聚类分析

由种子酯酶同工酶谱带聚类的树状图(图1)可知,在JAC0.63处将90粒供试蒙古黄芪种子划分为2个酶谱表征群(A、B),在JAC0.71处则将90粒种子进一步划分为6个亚表征群(a—f)。B表征群即亚表征群f,其组成为R型植株R3和R4的所有供试种子,即均由有纹种子组成。A表征群由R1、R2和R5等3个R型植株的全部种子及所有G型植株的种子组成,包括a—e 5个亚表征群。其中a亚表征群由除R5-01种子以外的所有R5植株的种子组成,均为有纹种子。b亚表征群由除R2-03种子以外的所有R2植株的种子组成,亦均为有纹种子。c亚表征群中既有有纹种子,又有无纹种子,包括了R2、R5、G1和G2各植株的部分种子及R1、G3和G4等植株的全部供试种子;该亚表征群中不同植株的种子出现混聚,甚至不同植株类型(即不同种子表型)的种子也混聚在一起。d和e 2个亚表征群均由无纹种子组成,d包括4粒G1种子和全部8粒G5种子,e包括4粒G1种子和6粒G2种子,这2个亚表征群同一植株内的种子也并未完全聚合到一起,不同植株间的部分种子反而具有更密切的关系。

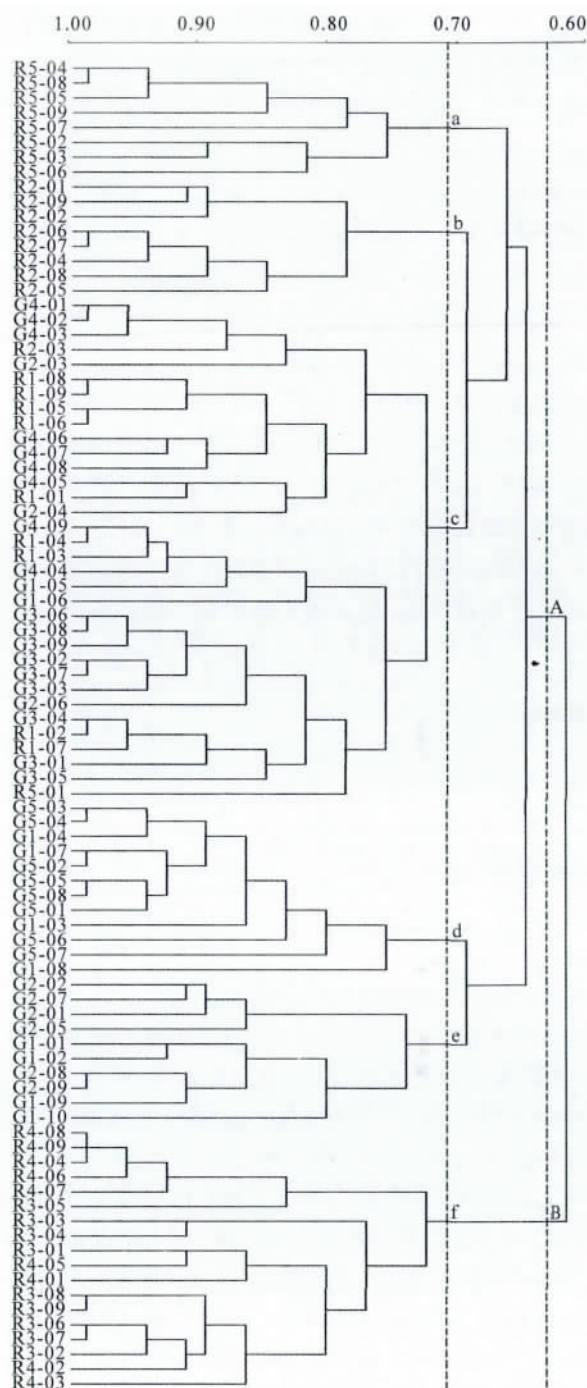


图1 蒙古黄芪2种表型种子酯酶同工酶聚类分析结果

聚类分析表明,供试蒙古黄芪种子在种子表型水平和植株个体水平上存在差异性,使得同一表征群或亚表征群由同一表型的种子或同一植株的种子组成;同时,供试种子在上述2个水平上亦存在相似性,使得不同表型的种子或不同植株的种子亦出现在同一表征群或亚表征群中。

3 讨论

对蒙古黄芪种子的酯酶同工酶研究表明,表型上一致的有纹或无纹蒙古黄芪种子,其遗传上并不完全

一致。这一方面与蒙古黄芪异花授粉的繁殖方式^[3]有关,即同一植株的种子,其母本相同而父本不同,从而造成子代个体间在遗传上的差异性;另一方面,R型和G型蒙古黄芪虽在形态上存在明显差异,但遗传上的分化不甚明显^[4],因而作为其子代的有纹和无纹种子在遗传上的分化亦不明显,一种表型种子的个体和另一表型种子具有更近的遗传关系。

研究结果同时表明,有纹和无纹2种表型种子在遗传上亦存在一定的分化,聚类图中表现为部分表征群或亚表征群的种子都由同一表型的种子构成。这与其2种表型种子的母本,即G型和R型植株在遗传上具有一定的分化有关^[4]。可见,2种表型种子与其母本之间仍具有一定的遗传一致性。

针对以上情况,农业生产实践中可以采取隔离和多代人工选择措施,使表型一致的蒙古黄芪在遗传上稳定下来,从而为优良品种培育提供更多的遗传素材。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版

(上接第 87 页)

3 结论与讨论

本研究从我国四川甘薯样品上克隆了 SPCSV WA 株系基因组 RNA2 3' 端 1.9 kb 大小的核苷酸序列,包括部分 *p60* 基因序列、完整的 *p8* 基因和 *CP* 基因(major CP)序列及部分 *mCP* 基因(minor CP)序列。该序列与已发表的 SPCSV WA 株系 Can181-9 分离物(GenBank 登录号为 FJ807785)相比,核苷酸序列一致性为 99.21%,其与已发表的 SPCSV EA 株系 m2-47 (GenBank 登录号为 HQ291260)和 Uganda 分离物(GenBank 登录号为 AJ428555)的核苷酸一致性分别为 67.07%和 67.43%。说明四川分离物属于 WA 株系,而且核苷酸序列高度保守,推测该病毒可能是由于种薯调运或引种传入我国,由于该病毒在我国发生时间较短,可能还未发生较大变异。甘薯是无性繁殖作物,病毒可通过种薯和种苗进行远距离传播,因此,建立高效、快速的血清学检测方法对病毒的预警和防控尤为重要。本研究首次在大肠杆菌中高效表达了 SPCSV 的外壳蛋白,为制备 SPCSV 特异性抗血清学、建立 SPCSV 准确、快速的检测技术奠定了良好基础。

参考文献:

[1] Martelli G P, Agranovsky A A, Bar-Joseph M, et al. The family Closteroviridae revised[J]. Archive of Virology,

(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283.

[2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:876.

[3] 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[J]. 安徽农业科学,2004,32(6):1203-1204.

[4] Xie X L, Hu Y P, Wang L, et al. Genetic diversity in three morphological types of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao as revealed by inter simple sequence repeat markers[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(18): 4490-4494.

[5] 李强栋,孟林,毛培春,等. 不同居群马蔺种质材料同工酶谱特征分析[J]. 草地学报,2012,20(1):116-124.

[6] 暴朝霞,黄宏文. 板栗主栽品种的遗传多样性及其亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2002,29(1):13-19.

[7] 谢小龙,胡延萍,赵旭东,等. 陇西栽培蒙古黄芪酯酶同工酶数量分析[J]. 中国科学院研究生院学报,2007,24(4):525-529.

[8] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析软件[M]. 2 版. 北京:电子工业出版社,2002:311.

2002,147:2039-2044.

[2] Untiveros M, Fuentes S, Kreuze J. Molecular variability of sweet potato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweet potato in Peru[J]. Archive of Virology, 2008,153:473-483.

[3] Gutiérrez D L, Fuentes S, Salazar L F. Sweet potato virus disease (SPVD): Distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru[J]. Plant Disease, 2003, 87: 297-302.

[4] Njeru R W, Mburu M W K, Cheramgoi E, et al. Studies on the physiological effects of viruses on sweet potato yield in Kenya[J]. Annals of Applied Biology, 2004, 145: 71-76.

[5] Gibson R W, Mpembe I, Alicai T, et al. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda[J]. Plant Pathology, 1998, 47: 95-102.

[6] Schaefer G A, Terry E R. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria[J]. Phytopathology, 1976, 66: 642-645.

[7] Clark C A, Davis J A, Abad J A, et al. Sweet potato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases[J]. Plant Disease, 2012, 96: 168-185.

[8] Qiao Q, Zhang Z C, Qin Y H, et al. First report of sweet potato chlorotic stunt virus infecting sweet potato in China[J]. Plant Disease, 2011, 95: 356.

[9] Qin Y H, Zhang Z C, Qiao Q, et al. Molecular variability of sweet potato chlorotic stunt viruses (SPCSV) and five potyviruses infecting sweet potato in China[J]. Archive of Virology, 2012, DOI 10. 1007/s00705-012-1503-8.

[10] 张振臣,乔奇,秦艳红,等. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病害[J]. 植物病理学报,2012,42(3):328-333.