

秦岭坡旱地不同桔梗栽培品种亲缘关系鉴别

王新军¹, 谢 静², 吴 珍¹, 邓寒霜¹

(1. 商洛学院生物医药工程系, 陕西 商州 726000; 2. 陕西师范大学生命科学院, 陕西 西安 710062)

摘 要: 为对秦岭坡旱地中药材桔梗品种选育及种质资源鉴定提供依据, 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术研究了不同产地三年生桔梗不同叶位酯酶同工酶 (EST) 的表达差异, 并通过 EST - PAGE 图谱迁移率 (*R_f*)、联合系数 (*S*)、酶谱相似度 (*T*) 综合分析方法, 初步评价了目前在商洛坡旱地栽培的不同产地桔梗品种的亲缘关系。结果表明: 6 种不同产地桔梗间的亲缘关系大小顺序为: 甘肃平凉 > 山东淄博 > 四川广元 > 西安蓝田 > 内蒙赤峰 ≈ 陕西商洛, 内蒙赤峰与陕西商洛桔梗疑为同一品种。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 酯酶同工酶; 迁移率; 联合系数; 酶谱相似度

中图分类号: Q948.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7601(2014)02-0151-06

Identification of the genetic relationship between different cultivated varieties in Qinling Slope dryland

WANG Xin-jun¹, XIE Jing², WU Zhen¹, DENG Han-shuang¹

(1. Department of Biological Medicine Engineering, Shangluo University, Shangzhou, Shaanxi 726000, China;

2. The College of Life Sciences of Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: In order to provide the basis for variety breeding and germplasm identification of Chinese traditional medicine *Platycodon grandiflorum* in Qinling slope dryland, platycodon esterase isozymes (EST) expression difference of different leaf position in three different regions is studied by application of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique, and through the EST - PAGE map mobility (*R_f*), joint coefficient (*S*) (*T*), enzyme spectrum similarity comprehensive analysis method, Put forward the preliminary kinship evaluation of shangluo *Platycodon grandiflorum* cultivation varieties in the different regions of slope dryland. The results showed that the genetic relationship between different regions size order: Pingliang - Gansu > Zibo - Shandong > Guangyuan - Sichuan > Lantian - Xian > Chifeng - Neimenggou ≈ Shangluo - Shaanxi, there are no difference between Chifeng - Neimenggou and Shangluo - Shaanxi in species of the platycodonis.

Keywords: polyacrylamide gelelectrop horesis; esterase; transfer rate; joint coefficient; enzyme similarity

桔梗为桔梗科植物桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 的干燥根^[1], 临床上用于治疗咳嗽痰多、胸闷不畅、咽痛、肺痈吐脓等症状, 是重要的药食两用中药材。桔梗为耐干旱的植物, 主要生长在秦岭的坡塬、丘陵、中高山易旱地区。作为“五大商药”的桔梗药材, 在秦岭东部的商洛山区已有一千四百多年的种植历史。由于长期不重视桔梗品种选育, 导致境内桔梗种植出现种源不清, 品种混乱现象严重, 已成为桔梗产业发展的制约因素^[2]。蛋白质电泳技术作为植物品种鉴定的方法得到国际认可, EST - PAGE 技术被大量应用于作物品种鉴定研究

中。国内学者石俊英等^[3]曾用 PAGE 技术进行不同产地桔梗的指纹图谱研究。李喜凤^[4]等应用 PAGE 技术分析了河南不同产地与年限桔梗的 EST 同工酶变化。运用 EST - PAGE 技术, 结合酶带迁移率 (*f*)、联合系数 (*S*)、酶谱相似度 (*T*) 综合分析评价不同产地桔梗品种亲缘关系的研究未见报道, 本研究通过对秦岭破旱地不同桔梗栽培品种进行蛋白质电泳和相关指标综合分析其亲缘关系, 旨在为秦岭坡旱地中药材桔梗品种选育及种质资源鉴定提供依据。

收稿日期: 2013-07-05
基金项目: 陕西省科技厅重点实验室专项项目 (008ZY001); 商洛市中药现代化专项基金资助项目 (08SKJ001)
作者简介: 王新军 (1968—), 男, 陕西洛南人, 副教授, 主要从事植物资源开发及营养生化研究。E-mail: wangxinjun1988@sohu.com。

1 材料、仪器及试剂

1.1 材料

供试材料采自陕西商洛香菊制药集团药源基地桔梗种质资源圃,该种质资源圃由生物医药工程系王新军课题组于 2008 年分别从山东省淄博市、四川省广元市、内蒙古赤峰市、甘肃省平凉市、西安市蓝田县、陕西省商洛市引种种植建立(桔梗种子由陕西道地中药材种植有限公司黄杰提供),于 2011 年 6 月 14 日采集六个产地三年生桔梗不同叶位叶片(茎尖部叶片、功能部叶片、茎基部叶片)共 18 份用于实验研究:其中茎尖部叶片(6 份)、功能部叶片(6 份)和茎基部叶片(6 份)。

1.2 仪器

DYY—Ⅲ 28 型电泳仪槽(北京六一仪器厂);垂直板电泳槽、DYY—10C 型电泳仪、WD—9406 型胶片观察灯等。

1.3 试剂

丙烯酰胺(Acr)、亚甲基双丙烯酰胺(Bis)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(Ap)等,所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备

取新鲜的绿色叶片(共 18 个供试样),清洗干净自然晾干,各取 5 g 放入预冷过的研钵中,加入 2 倍体积的电极缓冲液(Tris—甘氨酸,PH8.3)及适量石英砂,冰浴研磨成匀浆,在 3000r/min 离心 20min,分别标上标签装入试剂瓶贮于 4℃冰箱中备用。分离胶、浓缩胶组成及配比见表 1 和表 2。

表 1 分离胶组成

Table 1 The collocation of concentrated gel	
试剂名称 The reagent name	凝胶浓度 The gel concentration
30% Acr—Bis 溶液/mL	5.3
Tris—HCL pH8.9 缓冲液/mL	4.0
双蒸水 Double steaming water/mL	6.7
10% Ap/mL	0.3
TEMED/mL	0.008

2.2 上样与电泳

采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法,制备浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 10%。电极缓冲液为 Tris—Gly, pH = 8.3。用 1.5% 琼脂封口,点样孔为 12 泳道,每样品按 50 μL 的点样量按从左到右的

顺序依次点样,电泳操作在 4℃冰箱中进行^[4]。

表 2 浓缩胶组成

Table 2 Samples of <i>Platycodon grandiflorum</i>	
试剂名称 The reagent name	凝胶浓度 The gel concentration
30% Acr—Bis 溶液/mL	0.75
Tris—HCL pH8.9 缓冲液/mL	1.25
双蒸水 Double steaming water/mL	3.0
10% Ap/mL	0.15
TEMED/mL	0.008

2.3 染色与脱色

电泳结束后,打开电泳槽,取出胶板,切去浓缩胶,保留分离胶并标记溴酚蓝前沿,凝胶常温下进行酯酶同工酶染色:取 100 mg 坚牢蓝 RR 盐、50 mg a—醋酸萘酯和 50 mg b—醋酸萘酯用 10 mL 丙酮溶解,再加入 90 mL 的 0.1 mol/L pH 6.5 磷酸缓冲液摇匀,待溶液为砖色便可以使用,现配现用,待出现清晰酶带时即可停止染色,用胶片观察灯对酶谱进行观察、比较和记录,然后照相,保存在 7%的醋酸溶液里。绘酶谱图并计算相对迁移率(R_f)值(R_f = 酶带迁移距离/溴酚蓝迁移距离)。

3 结果与分析

3.1 6 种不同产地桔梗茎尖部位叶片和功能部位叶片酯酶同工酶酶谱分析

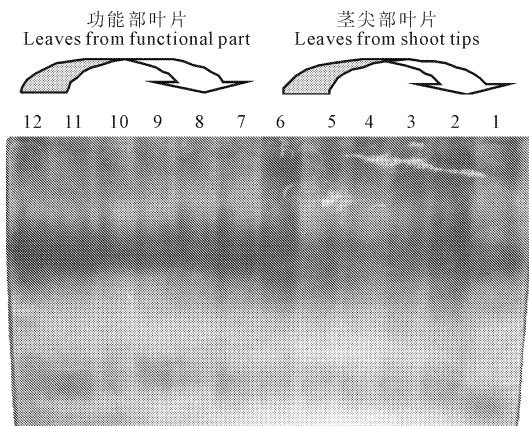


图 1 6 种产地桔梗茎尖部叶片和功能部叶片酯酶同工酶凝胶电泳图谱

Fig.1 Esterase isoenzyme electrophoresis pattern of *Platycodon grandiflorum* leaves collected from shoot tips and functional part among 6 locations
(从 1 到 6 分别为:1 山东淄博、2 四川广元、3 内蒙赤峰、4 陕西商洛、5 西安蓝田、6 甘肃平凉桔梗茎尖部位叶片;7 到 12 分别为对应产地桔梗功能部位叶片)
(from 1 to 6 respectively: *Platycodon grandiflorum* leaves collected from shoot tips part among 1 Zibo—Shandong, 2 Guangyuan—Sichuan, 3 Chifeng

- Neimenggou, 4 Shangluo - Shaanxi, 5 Lantian - Xian, 6 Pingliang - Gan-su; 7 to 12, respectively *Platycodon grandiflorum* leaves collected from functional part among corresponding to the distribution)

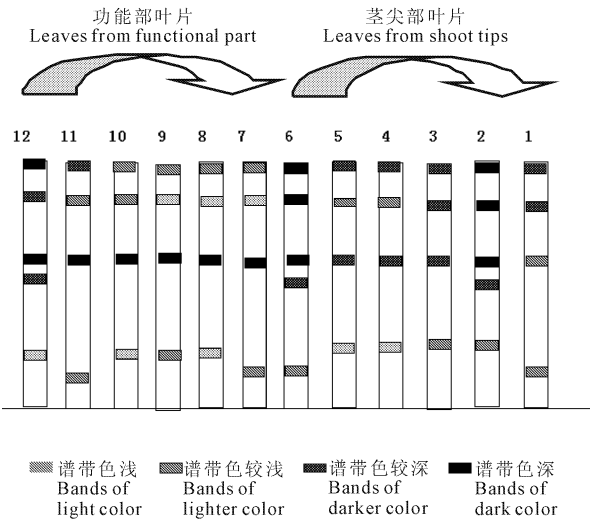


图 2 6 种产地桔梗茎尖部叶片和功能部叶片酯酶同工酶谱图

Fig.2 Esterase iaozyme zymogram of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from shoot tips and functional part among 6 locations

(从 1 到 6 分别为: 1 山东淄博、2 四川广元、3 内蒙赤峰、4 陕西商洛、5 西安蓝田、6 甘肃平凉桔梗茎尖部位叶片; 7 到 12 分别为相对产地桔梗功能部位叶片)

(from 1 to 6 respectively: *Platycodon grandiflorum* leaves collected from shoot tips part among 1 Zibo - Shandong, 2 Guangyuan - Sichuan, 3 Chifeng - Neimenggou, 4 Shangluo - shanxi, 5 Lantian - Xian, 6 Pingliang - Gansu; 7 to 12, respectively *Platycodon grandiflorum* leaves collected from functional part among corresponding to the distribution)

注: 联合系数(S)的计算方法为: $S = \text{两个桔梗之间共同具有的酶带数} / \text{两个桔梗所具有的酶带数之和} - \text{减去共同具有的酶带数}$ 。下同。

Note: the calculation method of joint coefficient (S) : $S = \text{enzyme band number Shared between the two characteristics} / \text{the sum of enzyme band of two characteristics} - \text{the number of enzymes with together}$. The same below.

为了研究方便,按酯酶同工酶酶带迁移率的大小和染色的深浅不同将酶谱分为 3 个区: I 区,染色最浅,迁移率最大的区域,酶带较少,只有极弱带; II 区,染色较深,迁移率较大的区域,酶带较多,此区是显示各材料特征酶带的主要带区; III 区,染色较深,迁移率最小的区域,酶带较多。

由茎尖部位叶片和功能部位叶片的酯酶同工酶电泳结果(图 1、2)可知内蒙赤峰和陕西商洛、西安蓝田的茎尖部叶片带型无明显差异,四川广元、内蒙赤峰和陕西商洛的功能部叶片的带型无明显差异。

表 3 6 种产地桔梗茎尖部叶片和功能部叶片酯酶同工酶酶带的强度及相对迁移率

Table 3 The bands grade and the relative Rf of esterase isozyme of <i>Platycodon grandiflorum</i> leaves collected from shoot tips and functional part among 6 locations						
样品序号 The sample number	酶带序号 The bands number					
	1	2	3	4	5	6
1	+	+	+	-	-	+
2	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	-	+	-
4	+	+	+	-	+	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	-	+
7	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	-	+	-
9	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	-	+	-
11	+	+	+	-	-	+
12	+	+	+	+	+	-
迁移率 Mobility	0.03	0.15	0.30	0.40	0.60	0.70

3.2 6 种产地桔梗茎尖部位叶片和功能部位叶片联合系数和酶谱相似度分析

由于酯酶同工酶系基因表达的产物,遗传上具有一定的保守性,因此,桔梗酯酶同工酶的表现型差异反映了基因型的差异,基因型差异显示出种间亲缘关系的远近^[5-6]。Vaughan 等^[7]提出酶谱相似度预测种间亲缘关系的方法被广泛应用,酶谱相似度指数越高,反映亲缘关系越近。联合系数越大,说明酶谱差异越小亲缘关系密切,反之则差异越大,亲缘关系越远。 $T(\text{或 } S) = 1$ 时,说明酶带数相同且全部为共有酶带, $T(\text{或 } S) = 0$ 时,说明没有一条共有酶。6 种不同产地桔梗茎尖部位叶片、功能部位叶片间的酶谱相似度(T)及联合系数(S)计算结果见表 4、5、6、7。

表 4 6 种产地桔梗茎尖部叶片间酶谱的联合系数(S)

Table 4 Zymogram joint coefficient of 6 <i>Platycodon grandiflorum</i> leaves collected from shoot tips					
样品序号 The sample number	2	3	4	5	6
1	0.50	0.60	0.60	0.60	0.80
2		0.80	0.80	0.80	0.67
3			1	1	0.50
4				1	0.50
5					0.50

表 5 6 种产地桔梗功能部位叶片间的联合系数 (S)

Table 5 Joint coefficient of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from functional part

样品序号 The sample number	8	9	10	11	12
7	0.60	0.60	0.60	1	0.50
8		1	1	0.60	0.80
9			1	0.60	0.80
10				0.60	0.80
11					0.50

表 6 6 种产地桔梗茎尖部位叶片间的酶谱相似度 (T)

Table 6 Enzyme similarity of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from shoot tips

样品序号 The sample number	2	3	4	5	6
1	0.67	0.75	0.75	0.75	0.89
2		0.89	0.89	0.89	0.80
3			1	1	0.67
4				1	0.67
5					0.67

注:酶谱相似度 $T = Nx / (X_1 + X_2 + \cdots + X_n)$, 其中 N 为所研究的桔梗品种数目, x 为 n 个桔梗之间所共有的酶带数, n 为第 n 个桔梗的酶带数。下同。

Note: Enzyme spectrum similarity $T = Nx / (X_1 + X_2 + \cdots + X_n)$, where N is the species number of *Platycodon grandiflorum* characteristics, x is enzyme band number Shared between n *Platycodon grandiflorum*, n is the enzyme band number of N TH *Platycodon grandiflorum*. The same below.

表 7 6 种产地桔梗功能部位叶片间的酶谱相似度 (T)

Table 7 Enzyme similarity of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from functional part

样品序号 The sample number	8	9	10	11	12
7	0.75	0.75	0.75	1	0.67
8		1	1	0.75	0.89
9			1	0.75	0.89
10				0.75	0.67
11					0.67

3.2.1 6 种产地桔梗茎尖部位叶片联合系数和酶谱相似度分析 从表 4、6 可知:同一品种间,茎尖部位叶片酶谱相似度的值总大于联合系数值。把所有两桔梗间的 S, T 值进行排序,结果是一致的;亲缘关系最远的是山东淄博和四川广元、内蒙赤峰和甘肃平凉、陕西商洛和甘肃平凉、西安蓝田和甘肃平凉 (S, T 值最小, $S = 0.5000, T = 0.6667$, 只有 3 条相同的酶带),由此可见,甘肃平凉桔梗与其余各桔梗间的差异最为明显。其次是内蒙赤峰和陕西商洛、内蒙赤峰和西安蓝田、陕西商洛和西安蓝田 (S, T 值最大, $S = 1, T = 1$, 内蒙赤峰、陕西商洛和西安蓝

田桔梗酶带数量和位置相同,但酶活性略有区别)。
3.2.2 6 种产地桔梗功能部位叶片联合系数和酶谱相似度评价桔梗间的亲缘关系 同上,从表 5、7 可知:同一品种间,功能部位叶片酶谱相似度的值总大于联合系数值。把所有两桔梗间的 S, T 值进行排序,结果是一致的;亲缘关系最远的是山东淄博和甘肃平凉、西安蓝田和甘肃平凉 (S, T 值最小, $S = 0.5000, T = 0.6667$, 只有 3 条相同的酶带),由此可见,甘肃平凉与其余各桔梗间的差异最为明显。其次是山东淄博和西安蓝田、四川广元 and 内蒙赤峰、四川广元和陕西商洛、内蒙赤峰和陕西商洛 (S, T 值最大, $S = 1, T = 1$, 内蒙赤峰和陕西商洛桔梗酶带数量和位置相同,但酶活性略有区别)。

3.3 6 种产地桔梗茎基部叶片酯酶同工酶酶谱分析

由图 3、4 和表 8 可知,茎基部叶片酶带在数量和分布上比茎尖部叶片和功能部叶片少。为了研究方便,按酯酶同工酶酶带迁移率的大小和染色的深浅不同将酶谱分为 3 个区:Ⅰ,染色最浅,迁移率最大的区域,酶带较少,只有极弱带;Ⅱ,染色较深,迁移率较大的区域,酶带较多,此区是显示各材料特征酶带的主要带区;Ⅲ,染色较深,迁移率最小的区域,酶带较多。

由茎基部叶片酯酶同工酶电泳结果(图 3、4)可知不同产地桔梗:山东淄博和四川广元桔梗的茎基部叶片带型无明显差异,西安蓝田和甘肃平凉的茎基部叶片带型无明显差异。

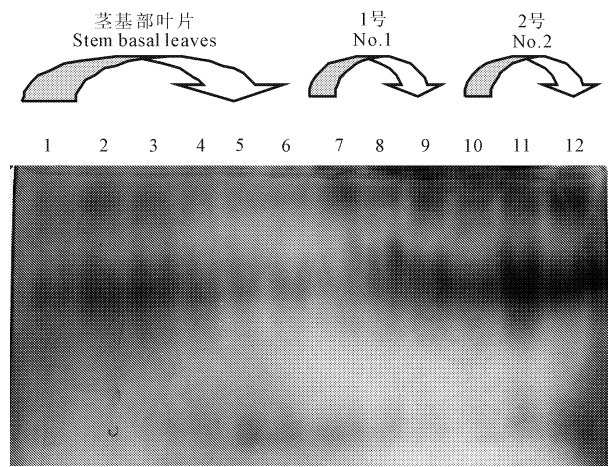


图 3 6 种产地桔梗茎基部叶片和 1 号 2 号酯酶同工酶凝胶电泳图谱
Fig.3 Esterase isoenzyme electrophoresis pattern of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from stem base and No.1, No.2
(从 1 到 6 分别为:1 山东淄博、2 四川广元、3 内蒙赤峰、4 陕西商洛、5 西安蓝田、6 甘肃平凉桔梗茎基部叶片;7、8、9 分别为山东淄博的茎尖部叶片、功能部叶片、茎基部叶片;10、11、12 分别为四川广元的茎尖部叶片、功能部叶片、茎基部叶片)

(from 1 to 6 respectively: *Platycodon grandiflorum* leaves collected from stem basal part among 1 Zibo – Shandong, 2 Guangyuan – Sichuan, 3 Chifeng – Neimenggou, 4 Shangluo – shanxi, 5 Lantian – Xian, 6 Pingliang – Gansu; 7, 8, 9, respectively stem tip of a leaf, the functional part of leaf, stem basal leaves in Zibo – Shandong; 10, 11, 12, respectively the stem tip of a leaf, functional part of leaf, stem basal leaves in Guangyuan – Sichuan.)

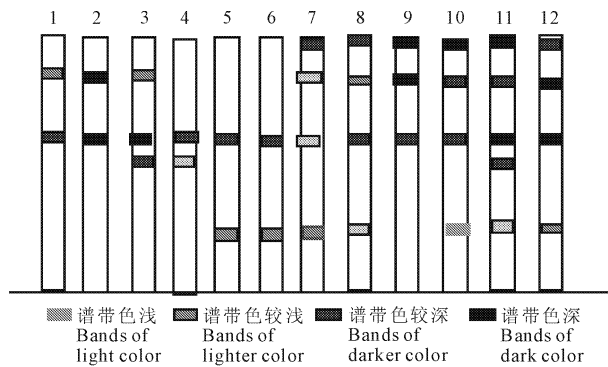


图 4 6 种产地桔梗茎基部叶片和 1 号 2 号酯酶同工酶电泳谱
Fig.4 Esterase iaozyme zymogram of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from shoot tips and No.1, No.2

(从 1 到 6 分别为:1 山东淄博、2 四川广元、3 内蒙赤峰、4 陕西商洛、5 西安蓝田、6 甘肃平凉桔梗茎基部叶片;7、8、9 分别为山东淄博的茎尖部叶片、功能部叶片、茎基部叶片;10、11、12 分别为四川广元桔梗的茎尖部叶片、功能部叶片、茎基部叶片)

(from 1 to 6 respectively: *Platycodon grandiflorum* leaves collected from stem basal part among 1 Zibo – Shandong, 2 Guangyuan – Sichuan, 3 Chifeng – Neimenggou, 4 Shangluo – Shaanxi, 5 Lantian – Xian, 6 Pingliang – Gansu; 7, 8, 9, respectively stem tip of a leaf, the functional part of leaf, stem basal leaves in Zibo – Shandong; 10, 11, 12, respectively the stem tip of a leaf, functional part of leaf, stem basal leaves in Guangyuan – Sichuan)

表 8 6 种产地桔梗茎基部叶片和山东淄博、四川广元桔梗酯酶同工酶酶带的强度及相对迁移率
Table 8 The bands grade and the relative *Rf* of esterase isozyme of *Platycodon grandiflorum* among 6 samples from stem base

样品序号 The sample number	酶带序号 The bands number				
	1	2	3	4	5
1	-	+	+	-	-
2	-	+	+	-	+
3	-	+	+	+	-
4	-	-	+	+	-
5	-	-	+	-	+
6	-	-	+	-	+
7	+	+	+	-	+
8	+	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-
10	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	-	+
迁移率 Mobility	0.03	0.11	0.24	0.04	0.50

表 9 6 种产地桔梗茎基部叶片间的酶谱联合系数 (*S*)
Table 9 Zymogram joint coefficient of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from stem base

样品序号 The sample number	2	3	4	5	6
1	1	0.67	0.33	0.33	0.33
2		0.67	0.33	0.33	0.33
3			0.67	0.25	0.25
4				0.33	0.33
5					1

表 10 6 种产地桔梗茎基部叶片间的酶谱相似度 (*T*)
Table 10 Enzyme similarity of 6 *Platycodon grandiflorum* leaves collected from stem base

样品序号 The sample number	2	3	4	5	6
1	1	0.80	0.50	0.50	0.50
2		0.80	0.50	0.50	0.50
3			0.80	0.40	0.40
4				0.50	0.50
5					1

3.4 6 种产地桔梗茎基部叶片联合系数和酶谱相似度分析

从表 9、10 可知:相同的两桔梗间,酶谱相似度的值总大于联合系数值。把所有两桔梗间的 *S*、*T* 值进行排序,亲缘关系最远的是内蒙赤峰和西安蓝田、内蒙赤峰和甘肃平凉(*S*、*T* 值最小, *S* = 0.2500, *T* = 0.4000, 只有 2 条相同的酶带),亲缘关系最近的是山东淄博和四川广元、西安蓝田和甘肃平凉(*S*、*T* 值最大, *S* = 1, *T* = 1, 1 号和 2 号桔梗的酶带数量和位置分别相同,但酶活性略有区别)。

3.5 同一产地桔梗不同叶位叶片间酯酶同工酶的分析

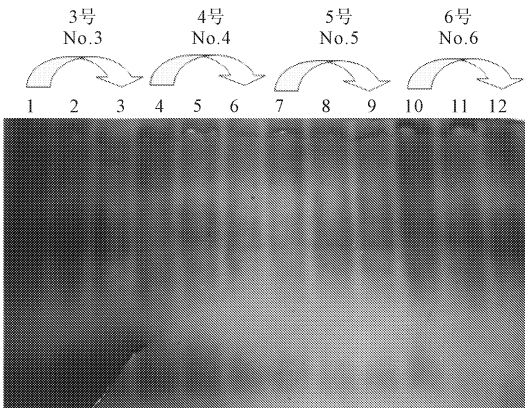


图 5 3、4、5、6 号桔梗不同部位酯酶同工酶凝胶电泳图谱
Fig.5 Esterase iaozyme electrophoresis pattern in 3, 4, 5, 6 samples using different part of the plant

(1,2,3 分别为:内蒙赤峰桔梗的茎尖部叶片、功能部叶片和茎基部叶片;4,5,6 分别为陕西商洛桔梗的茎尖部叶片、功能部叶片和茎基部叶片;7,8,9 分别为西安蓝田桔梗的茎尖部叶片、功能部叶片和茎基部叶片;10,11,12 分别为甘肃平凉桔梗的茎尖部叶片、功能部叶片和茎基部叶片)

(1, 2, 3 are: *Platycodon grandiflorum* stem tip of a leaf, functional part of leaf and stem base of blade in Chifeng – Neimenggou; 4, 5, and 6 respectively for Shangluo – Shaanxi; 7, 8, 9, respectively for Lantian – Xian; 10, 11, 12, respectively for Pingliang – Gansu)

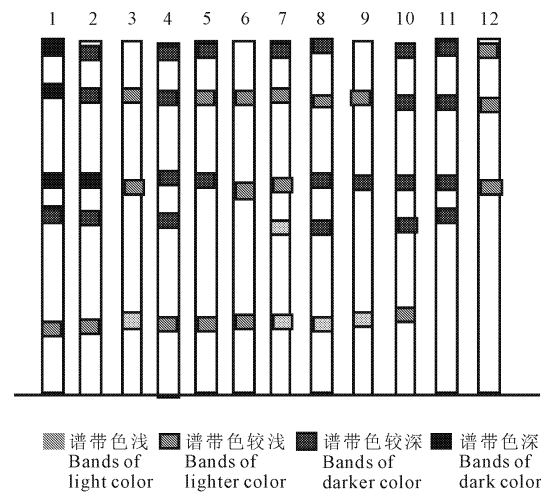


图 6 第 3,4,5,6 号桔梗不同部位酯酶同工酶酶谱
Fig.6 Esterase isozyme zymogram in 3,4,5,6 samples using different part of the plant

(1,2,3 分别为内蒙赤峰桔梗的茎尖部位叶片、功能部位叶片和茎基部叶片;4,5,6 分别为陕西商洛桔梗的茎尖部位叶片、功能部位叶片和茎基部叶片;7,8,9 分别为西安蓝田桔梗的茎尖部位叶片、功能部位叶片和茎基部叶片;10,11,12 分别为甘肃平凉桔梗的茎尖部位叶片、功能部位叶片和茎基部叶片)

(1, 2, 3 are: *Platycodon grandiflorum* stem tip of a leaf, functional part of leaf and stem base of blade in Chifeng – Neimenggou; 4, 5, and 6 respectively for Shangluo – shanxi; 7, 8, 9, respectively for Lantian – Xian; 10, 11, 12, respectively for Pingliang – Gansu)

由图 5、6 可知,同一品种桔梗不同部位(茎尖部位、功能部位和茎基部位)叶片酯酶同工酶谱也呈现一定规律性,茎尖部位叶片的酶带数最多,共有 28 条酯酶同工酶带,占总酶条带数的 37.83%;其次为功能部叶片共 27 条酯酶酶带,占总酶条带数的 36.48%;而茎基部叶片有 19 条酯酶酶带,占总酶条带数 25.67%,茎尖和功能叶酶条带数占总酶条带数的 74.31%,茎尖部和功能叶片酶带数酯酶同工酶表达量最大,且条带最清晰。可能与茎尖细胞分裂旺盛,基因表达活跃,而功能叶主要进行光合产物合成,代谢产物丰富,通过本研究,表明桔梗品种不同部位叶片内酯酶同工酶的时空变化规律,随着叶片的叶龄增大,酯酶同工酶表达量减弱。根据不同部位酯酶同工酶含量和活性变化情况,为桔梗

酯酶同工酶研究时的取材提供理论依据。

3.6 6 种产地桔梗间的亲缘关系

根据 6 种产地桔梗不同部位叶片酯酶同工酶酶带的强度及相对迁移率、联合系数和酶谱相似度可以评价桔梗间的亲缘关系。运用联合系数(S)和酶谱相似度(T)综合分析见表 11。

表 11 2 对亲缘关系最远的桔梗间的 S 和 T 值

Table 11 S and T of 4 samples that have the maximal phylogenetic relationship with each other

桔梗 <i>Platycodon grandiflorum</i>	内蒙赤峰和甘肃平凉 Chifeng – Neimenggou and Pingliang – Gansu	西安蓝田和甘肃平凉 Lantian – Xian and Pingliang – Gansu
联合系数 S	0.25	0.50
酶谱相似度 T	0.40	0.67

表 12 1 对亲缘关系最近的桔梗间的 S 和 T 值

Table 12 S and T of 2 samples that have the minimum phylogenetic relationship with each other

桔梗 <i>Platycodon grandiflorum</i>	内蒙赤峰和陕西商洛 Chifeng – Neimenggou and Shangluo – Shaanxi
联合系数 S	0.25
酶谱相似度 T	0.40

根据实验研究,可评价出 6 个产地桔梗间的亲缘关系最远的桔梗有 2 对:内蒙赤峰和甘肃平凉、西安蓝田和甘肃平凉。亲缘关系最近的桔梗有 1 对:内蒙赤峰和商洛碾子凹。亲缘关系由远及近依次为:甘肃平凉 > 山东淄博 > 四川广元 > 西安蓝田 > 内蒙赤峰 ≈ 陕西商洛。

4 结论与讨论

1) 运用(EST – PAGE)技术,结合联合系数(S)、酶谱相似度(T),综合分析与评价不同产地桔梗间的亲缘关系为:甘肃平凉 > 山东淄博 > 四川广元 > 西安蓝田,内蒙赤峰 ≈ 陕西商洛。此方法可以作为桔梗药材品种选育、种内变异类型筛选、桔梗种质资源收集评价的有效方法之一。

2) 酯酶同工酶可作为桔梗分类及品种鉴定的有效生化标记,采样部位以茎尖部位和中部功能叶片为主。

酯酶是催化酯类化合物水解的酶系,它催化羧酸酯类的酯键的水解或合成,在植物不同的生长发育时期表现出阶段的特异性^[8]。酯酶同工酶在植物上表现出阶段特异性,同工酶的阶段特异性可以反映植物生长发育过程的基因表达的特异性。

[4] 湛润生,岳新丽,韩志平,等.晋北地区不同种植年限设施土壤养分含量的变化[J].干旱地区农业研究,2012,(5):133-137.

[5] 张维理,武淑霞,冀宏杰,等.中国农业面源污染形势估计及控制对策 I.21 世纪初期中国农业面源污染的形势估计[J].中国农业科学,2004,(7):1008-1017.

[6] 刘宏斌,李志宏,张云贵,等.北京平原农区地下水硝态氮污染状况及其影响因素研究[J].土壤学报,2006,(3):405-413.

[7] Tang X, Ma Y B, Hao X Y, et al. Determining critical values of soil Olsen-P for maize and winter wheat from long-term experiments in China[J]. Plant and Soil, 2009,323(1-2):143-151.

[8] Maguire R O, Sims J T. Measuring agronomic and environmental soil phosphorus saturation and predicting phosphorus leaching with Mehlich 3[J]. Soil Science Society of America Journal, 2002,66(6):2033-2039.

[9] Hesketh N, Brookes P C. Development of an indicator for risk of phosphorus leaching[J]. Journal of Environmental Quality, 2000,29(1):105-110.

[10] Maguire R O, Sims J T. Soil testing to predict phosphorus leaching [J]. J Environ Qual, 2002,31(5):1601-1609.

[11] 吕家珑, FortuneS, BrookesPC. 土壤磷淋溶状况及其 Olsen 磷“突变点”研究[J].农业环境科学学报,2003,(2):142-146.

[12] 钟晓英,赵小蓉,鲍华军,等.我国 23 个土壤磷素淋失风险评估 I.淋失临界值[J].生态学报,2004,(10):2275-2280.

[13] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,2000:180-182.

[14] 高惠璇.SAS 系统 SAS _ STAT 软件使用手册[M].中国统计出版社,1997:202-204.

[15] Colomb B, Debaeke P, Jouany C, et al. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern france[J]. European Journal of Agronomy, 2007,26(2):154-165.

[16] Aulakh M S, Garg A K, Kabba B S. Phosphorus accumulation, leaching and residual effects on crop yields from long-term applications in the subtropics[J]. Soil Use and Management, 2007,23(4):417-427.

[17] Mallarino A P, Atia A M. Correlation of a resin membrane soil phosphorus test with corn yield and routine soil tests[J]. Soil Science Society of America Journal, 2005,69(1):266-272.

[18] 周全来,赵牧秋,鲁彩艳,等.P 肥施入土壤后的变化进程及对 P 淋失的影响[J].生态与农村环境学报,2006,(3):80-83.

[19] 刘畅,张玉龙,孙伟.灌溉方式对保护地土壤磷素淋失风险的影响[J].土壤通报,2012,(4):923-928.

[20] Maguire R O, Sims J T. Soil testing to predict phosphorus leaching [J]. Journal of Environmental Quality, 2002,31(5):1601-1609.

[21] Kohler A, Abbaspour K C, Fritsch M, et al. Using simple bucket models to analyze solute export to subsurface drains by preferential flow[J]. Vadose Zone Journal, 2003,2(1):68-75.

[22] 蒋小金,王恩姮,陈祥伟,等.典型黑土耕地土壤优先流环绕特征[J].应用生态学报,2010,(12):3127-3132.

[23] Djodjic F, Borling K, Bergstrom L. Phosphorus leaching in relation to soil type and soil phosphorus content[J]. Journal of Environmental Quality, 2004,33(2):678-684.

[24] Heathwaite A L, Dils R M. Characterising phosphorus loss in surface and subsurface hydrological pathways[J]. Science of the Total Environment, 2000,251:523-538.

[25] Simard R R, Beauchemin S, Haygarth P M. Potential for preferential pathways of phosphorus transport[J]. Journal of Environmental Quality, 2000,29(1):97-105.

(上接第 156 页)

酯酶同工酶是基因表达的直接产物,在不同产地桔梗及不同部位表现出不同的多态性特征,不同产地桔梗引种到同一环境后经过三年生长,其酯酶同工酶的酶谱仍然存在差异,说明酯酶同工酶技术可以鉴别不同产地桔梗之间遗传差异性。也可以作为桔梗科植物亲缘关系鉴定和发育阶段研究的手段。

3) 在本研究中,引自内蒙赤峰与陕西商洛的桔梗品种显示有非常近的亲缘关系,疑为同一品种,经调查曾有药商早年将内蒙赤峰桔梗引种到商洛商州区种植。可能与药源基地引种有关系。

参 考 文 献:

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005 版)[S].北京:中国医药科技出版社,2005:19.

[2] 刘自刚,张雁,王新军,等.桔梗育种研究进展[J].中草药,2006,37(6):962-964.

[3] 石俊英,巩雨丽,张会敏.不同产地桔梗的聚丙烯酰胺凝胶电泳指纹图谱鉴别研究[J].中国药理学杂志,2007,(19):1462-1464.

[4] 李喜凤,薛秋萍,董诚明,等.河南不同产地与年限桔梗的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析[J].时珍国医国药,2007,18(1):35-36.

[5] 林兴生,李开本,陈体强,等.11 个灵芝菌株的栽培性状和酯酶同工酶研究[J].江西农业大学学报,2001,23(1):80-83.

[6] Tao Lin, Ren Jun. Study on relationship and cluster of calligonum by isozyme electrophoresis analysis[J]. Acta Botanica Boreali - Occidentalia Sinica,2004,24(9):1708-1713.

[7] Vaughan J G, Denford K E. An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of Brassica, Sinapsis species with special reference to their taxonomic value[J]. J Exp Bxp Bot, 1968,19:724-732.

[8] 林亨芳,王金英,江川.水稻不同部位酯酶同工酶酶带和酶谱分析[J].福建农林大学学报(自然科学版),1994,23(3):262-265.