

李淑娟, 李长慧, 张 英, 等. 青海鹅观草属 10 个野生种质资源酯酶同工酶分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 24–27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.006

青海鹅观草属 10 个野生种质资源酯酶同工酶分析

李淑娟, 李长慧, 张 英, 刘艳霞

(青海大学农牧学院, 青海西宁 810016)

摘要:采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳(PAGE)技术对青海鹅观草属 10 个野生种质资源进行酯酶同工酶(EST)检测和分析。结果表明, 鹅观草属 10 个种质的酯酶同工酶谱带共有 9 条, 形成 4 个区域(A、B、C、D), 其中 R_f 值为 0.198、0.469、0.630 的这 3 条酶带为共有带, 其余则为各份材料的特征带; 各种质材料间的酯酶同工酶表现出较丰富的多态性, 说明鹅观草属 10 个种质不同种及部分种的不同居群在遗传本质上是有所区别的。聚类分析表明, 鹅观草属 10 个野生种质资源可聚为 3 个类群。

关键词: 鹅观草属; 种质资源; 酯酶同工酶; 聚类分析

中图分类号: S543⁺.202 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0024-03

鹅观草属(*Roegneria* C. Koch)为小麦族(Trit-iceae Dumortier)近缘属中植物种类最多的多年生大属, 现有 120 多种, 我国有 70 多种^[1]。该属许多物种是草原或草甸的组成成分, 而且许多种类可作为优良牧草加以利用, 也有部分种类含抗逆基因, 可作为麦类作物培育新品种的宝贵资源。目前仅青海省鹅观草属植物就有 23 种、3 个变种, 广泛分布于三江源、祁连山地的大部分地区。其中的多数种具有抗寒、耐旱、耐盐碱、耐贫瘠等优良特性, 是高寒地区天然草场的重要组成部分和优良的牧草, 也是高海拔地区人工草地建设、草地改良、水土保持以及生态环境建设的首选草种。然而, 鹅观草属植物种间由于形态特征较为相似, 可作为分类依据的器官结构较为细微, 其分类在禾本科中一直属于难度较大的属。

同工酶是一种特异蛋白质, 是基因的直接产物, 同工酶的差异反映基因的表达差异^[2]。同工酶作为一种便捷的分子标记, 广泛应用于生物学研究的各个领域, 如探讨物种的起源进化、了解植物居群的遗传结构、研究种内遗传多样性等, 在植物的种群、发育及遗传研究中, 尤其对其种间分类及亲缘关系的研究有重要意义^[3-9]。采用同工酶分析技术对种间、品种间的分类研究已比较广泛, 其方法、技术较为成熟。从目前的研究来看, 尚未有学者对于分布在青海地区的鹅观草属植物从生化水平上进行研究。本研究采用酯酶同工酶技术对分布于青海三江源区的鹅观草属 10 个野生种质资源 6 种[玉树鹅观草(*Roegneria yushuensis*)、毛穗鹅观草(*Roegneria trichospicula*)、短柄鹅观草(*Roegneria brevipes* Keng)、曲芒异芒草(*Roegneria abolinii* var. *divaricans* Nevski)、紫穗鹅观草(*Roegneria purpurascens* Keng)、肃草(*Roegneria stricta* Keng)]及部分种的 4 个居群进行酯酶同工酶谱带特征分析, 从生化水平探讨不同材料间的遗传差异, 为该属材料的选择利用及

亲缘关系判定提供科学依据, 这也是对该生态草种进行深入研究及合理开发利用的基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验所采用的鹅观草属 10 份野生种质材料种子均采自青海三江源地区, 于 2015 年 5 月种植于青海大学农牧学院草业科学系牧草试验田, 待供试材料生长至幼苗期采集幼叶作为试验材料。其编号、物种名称及采集地等信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 酶提取液制备 分别称取 10 个试验材料的叶片(幼叶)各 1 g, 洗净后用滤纸吸干水分, 剪碎后置于预冷的小研钵中, 加入少量提样缓冲液, 在冰浴中研磨匀浆, 移入离心管中, 10 000 r/min、4 ℃, 离心 15 min, 取 0.5 mL 上清液, 加入等量的样品处理液, 于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳(PAGE) 电泳采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳技术^[10], 分离胶浓度为 7.5%, 缓冲液 pH 值为 8.8, 浓缩胶浓度为 3%, 缓冲液 pH 值为 6.8, 凝胶厚度为 1.5 mm。电极缓冲液为 Tris-Gly 缓冲液(pH 值 8.3), 上样量每槽为 20 μL。电泳时, 电流 20 mA, 浓缩胶电压为 200 V, 分离胶电压为 220 V, 温度 4 ℃ 左右, 恒压电泳至溴酚蓝迁移到距凝胶末端 1.0 cm 处为止。

1.2.3 染色、固定及照相 电泳结束后, 采用醋酸萘酯-固兰 RR 盐染色法染色^[11], 室温下染色至酶带清晰为止, 用水漂洗终止染色, 用 7% 冰乙酸固定 5 min, 清水漂洗后观察结果并拍照记录。

1.2.4 酶带分析及数据处理 根据相对迁移率 R_f 绘制模式图并标定酶带位置^[12]:

R_f = 酶带的迁移距离/前沿指示剂(溴酚蓝)的迁移距离。

根据同工酶胶板上的谱带分布确定带的有无, 并转化成二项数据, 在同一 R_f 值处, 有谱带的记为 1, 无谱带的记为 0。把同工酶谱信息处理为 0、1 数据后, 采用 NTSYSpc-2.10s 统计软件用非加权组平均法(UPGMA)^[13] 分析 10 份材料的

收稿日期: 2016-12-24

基金项目: 青海省科学技术应用基础研究计划(编号: 2014-ZJ-712)。

作者简介: 李淑娟(1967—), 女, 青海贵德人, 硕士, 教授, 主要从事牧草种质资源与遗传育种研究。E-mail: lsqjhu@163.com。

表 1 供试材料编号与采集地等信息

居群编号	种质名称	拉丁名	采集地点	海拔(m)	生境
R ₁	玉树鹅观草	<i>Roegneria yushuensis</i>	曲麻莱东风乡	4 278	阳坡
R ₂	玉树鹅观草	<i>Roegneria yushuensis</i>	铁卜加草原站	3 228	平滩
R ₃	曲芒异芒草	<i>Roegneria abolinii</i> var. <i>divaricans</i>	湟源下脖项	2 513	山坡
R ₄	毛穗鹅观草	<i>Roegneria trichospicula</i>	泽库和日乡	3 506	阳坡
R ₅	玉树鹅观草	<i>Roegneria yushuensis</i>	兴海县	3 522	平滩
R ₆	短柄鹅观草	<i>Roegneria brevipes</i>	曲麻莱东风乡	4 086	路边坡地
R ₇	曲芒异芒草	<i>Roegneria abolinii</i> var. <i>divaricans</i>	泽库和日乡	3 286	平滩
R ₈	肃草	<i>Roegneria stricta</i>	泽库西铺沙	2 726	草原山坡
R ₉	短柄鹅观草	<i>Roegneria brevipes</i>	泽库和日乡	3 500	路边坡地
R ₁₀	紫穗鹅观草	<i>Roegneria purpurascens</i>	麦秀林场	2 997	山坡

酯酶同工酶连锁类群,构建酶谱聚类树状图,进行聚类分析。

2 结果与分析

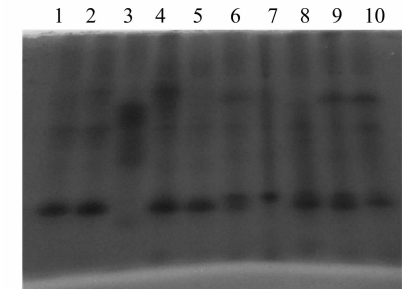
2.1 酶带及酶谱分布特征

谱带的数量、出现位点是判断区分不同种和品种的直观依据。由图 1、表 2 可知,供试的 10 个种质材料的酯酶同工酶酶谱共 55 条酶带,鹅观草属 10 个种质的酯酶同工酶谱带共有 9 条,形成 4 个区域(A、B、C、D),每份材料显示的酶谱带 5~6 条不等。把它们分成 A、B、C、D 4 个区,其中 A 区为慢速迁移区,有 1 条酶带, R_f 值为 0.198;B 区为中速迁移区,酶带数 2~3 条不等, R_f 值在 0.259~0.469 之间;C 区为较快速迁移区, R_f 值为 0.630,也仅有 1 条酶带;D 区为快速迁移区,酶带数 1~2 条不等, R_f 值在 0.765~0.889 之间。

由图 2 可以看出,10 个种质材料中中间酯酶同工酶酶谱具有一定的差异,主要表现在酶带数、酶带迁移率、酶带的活性强度上。A、B、C 区内都有各自的公共带,其中 A₁、B₄、C₁ 是 10 个种质材料的共有带,酶带相对稳定,酶活性较强,其余酶带则为各份材料的特征带,说明酯酶同工酶谱带表现出较强的多态性。A 区的公共带 $R_f = 0.198$,B 区的公共带 $R_f = 0.469$,C 区的公共带 $R_f = 0.630$ 。从总体趋势看出,D 区酶的活性最强,其次是 B 区,C 区的活性最弱。

从同种的不同居群间酶谱来看,同为玉树鹅观草的 R₁、R₅ 2 个居群各自的酶带数、酶带迁移率及酶带的活性均大致相同,R₂ 在 B₁ 位点表现有特征带,与 R₁、R₅ 的酶谱有差异,表明在遗传上存在分化;同为短柄鹅观草的 R₆、R₉ 2 个居群的酶带数相同,但酶带的活性不同,R₆ 仅 D₂ 1 条强带,R₉ 有 2 条强带,其酶活性及含量均强于 R₆;曲芒异芒草 R₃、R₇ 2 个居群酶带数相同,R₃ 有 2 条强带,在 D₃ 位点有特征带,R₇ 只

有 1 条强带,R₃、R₇ 的酶谱有明显差异。可以看出,各种间不仅酶带总数不同,而且在各个区域分布的位点、带级也明显不同,而同一物种的不同居群间酶谱既具有较稳定的相似性,又具有细微差异。



1~10 对应表 1 中的 R₁~R₁₀。图 2 同
图1 鹅观草属 10 个种质材料酯酶同工酶酶谱

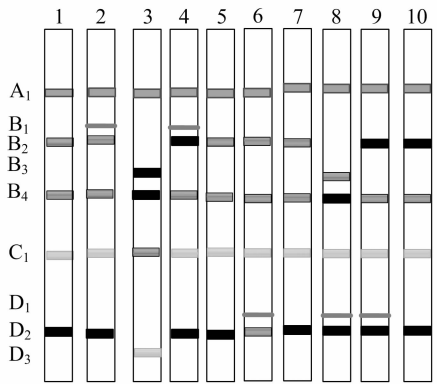


图2 鹅观草属 10 个种质材料酯酶同工酶模式

表 2 鹅观草属 10 个种质酯酶同工酶的迁移率

区带	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
A ₁	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198
B ₁	—	0.259	—	0.259	—	—	—	—	—	—
B ₂	0.309	0.309	0.309	0.309	0.309	0.309	0.309	0.309	—	—
B ₃	—	—	0.395	—	—	—	—	0.395	—	—
B ₄	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469
C ₁	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630
D ₁	—	—	—	—	—	0.765	0.778	0.765	0.765	—
D ₂	0.827	0.827	—	0.827	0.827	0.827	—	0.827	0.827	0.827
D ₃	—	—	0.889	—	—	—	—	—	—	—

注:“—”表示无此带。

2.2 酯酶同工酶谱相似系数聚类

从表 3 可以看出,鹅观草属 10 个种质资源的遗传相似系数在 0.167~1.000,其中 R₁ 与 R₅ 的相似系数最高,说明它们的相似性最高,基本没有遗传分化;而 R₃ 与 R₉ 的相似系数最低,仅为 0.167,说明它们的相似性最低,二者的亲缘关

系很远。所有样品在聚类距离约 0.65 处可分支为 3 个类群,分别记为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类;在第Ⅰ类群中,R₁、R₂、R₄、R₅、R₁₀ 亲缘关系一致;在第Ⅱ类群中,R₆、R₇、R₉ 亲缘关系较近;在第Ⅲ类群中,R₃、R₈ 亲缘关系较近(图 3)。

表 3 鹅观草属 10 个种质酯酶同工酶谱相似系数

材料	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
R ₁	1.000									
R ₂	0.833	1.000								
R ₃	0.333	0.167	1.000							
R ₄	0.833	1.000	0.167	1.000						
R ₅	1.000	0.833	0.333	0.833	1.000					
R ₆	0.833	0.667	0.167	0.667	0.833	1.000				
R ₇	0.667	0.500	0.333	0.500	0.667	0.833	1.000			
R ₈	0.500	0.333	0.500	0.333	0.500	0.667	0.500	1.000		
R ₉	0.833	0.667	0.167	0.667	0.833	1.000	0.833	0.667	1.000	
R ₁₀	0.833	0.667	0.333	0.667	0.833	0.667	0.500	0.333	0.667	1.000

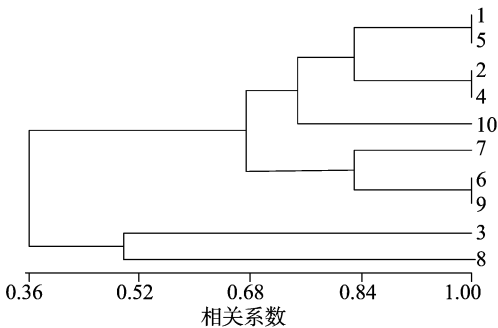


图3 鹅观草属 10 个种质材料酯酶同工酶聚类分析结果

3 讨论与结论

魏秀华等利用同工酶技术研究鹅观草属的 3 个物种的生物系统关系,解决了这 3 个物种的划分问题^[14]。本研究中鹅观草属的曲芒异芒草(R₃)与玉树鹅观草(R₂)、毛穗鹅观草(R₄)、短柄鹅观草(R₆)及紫穗鹅观草(R₁₀)在酯酶同工酶谱带上存在不同程度的差异,各种间不仅酶带总数不同,而且在各个区域分布的位点及带级也明显不同,其遗传一致度较低(0.167~0.333)。玉树鹅观草的 2 个居群(R₁、R₅)及短柄鹅观草的 2 个居群(R₆、R₉)的遗传一致度很高(1.000),但酶带的活性具有一定的差异性。同为玉树鹅观草的 R₂ 居群则与其他 2 个居群(R₁、R₅) 在谱带分布上也有所不同,遗传相似度为 0.833。居群之间具有相同或不同的酶带数,或者迁移率之间差异很小,可以认为它们既有共同的遗传基础,而且随着时空的变化又有变异的表现。这与前人的相关研究结果相似,即种子植物属内种间的遗传一致度约为 0.67,种内居群间的遗传一致度约为 0.90^[15]。

基于遗传相似系数的酶谱树状聚类结果显示,种源相同、地理位置分布较近、海拔近似的鹅观草属植物如 R₁、R₂、R₄、R₅、R₁₀ 聚为一类;曲芒异芒草的 2 个居群 R₃、R₇ 并未聚在一起,而是海拔较高的 R₇ (3 200 m) 与 R₆、R₉ 聚为一类,海拔较低的 R₃ (2 500 m)、R₈ (2 700 m) 2 个居群聚为一类。说明鹅观草属植物的聚类与种源地、海拔、生境有一定关系,海拔差

异小的居群遗传距离也较小。

鹅观草属 10 个种质资源的酯酶同工酶谱类型丰富,酶带数量、带级、位点及活性强度等表现出一定差异,各自具有特征谱带,且所具有的共有带的带级、酶含量、活性强度也不尽相同,说明利用这些酶谱特征找出供试材料间的细微差异是可行的,由此表明,供试材料具有独立的遗传关系,之间有一定的遗传分化,是进行生化水平鉴定的有利指标。酶谱分析作为揭示物种遗传背景的方法,还受生理、发育状态及人为等因素的干扰,所以应该将其与其他方法包括形态学、细胞学等方法结合起来才能得出更加准确可靠的结果^[16]。对该属植物采用其他种类酶[如过氧化物酶(POD)同工酶、细胞色素氧化酶]分析,尚待进一步研究。

参考文献:

[1] 卢宝荣,颜 济,杨俊良. 鹅观草属三个种的染色体组分析与同工酶分析[J]. 云南植物研究,1998,10(3):261-270.
[2] 段会军,褚素敏,张采英,等. 河北省不同生态区大豆品种的过氧化物同工酶分析[J]. 河北农业大学学报,2003,26(4):42-46.
[3] 邹春静,盛晓峰,韩文卿,等. 同工酶分析技术及其在植物研究中的应用[J]. 生态学杂志,2003,22(6):63-69.
[4] 丁 毅,宋远淳. 大麦酯酶同工酶谱的聚类分析与遗传研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1995,41(6):729-734.
[5] 张维强. 同工酶与植物遗传育种[M]. 北京:北京农业大学出版社,1993:52-55.
[6] 王述民,谭富娟,胡家蓬. 小豆种质资源同工酶遗传多样性分析与评价[J]. 中国农业科学,2002,35(11):1311-1318.
[7] 赵坚义,Beckerh C. 同工酶分子标志研究中国和欧洲栽培油菜的遗传差异[J]. 作物学报,1998,24(2):213-220.
[8] 张宗文. 红花品种资源的同工酶遗传多样性及分类研究[J]. 植物遗传资源科学,2000,1(4):6-13.
[9] 张丽敏,徐秀芳,戚晓利,等. 两个不同子房类型糜子酯酶同工酶的研究[J]. 生物学杂志,2005,22(3):28-29.
[10] 孙 群. 植物同工酶和可溶性蛋白质的凝胶电泳[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
[11] 邹 琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,

席秀利, 黄海波, 楼步青, 等. 广陈皮 DNA 提取优化及茶枝柑的 ISSR 分子鉴别[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 27–31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.007

广陈皮 DNA 提取优化及茶枝柑的 ISSR 分子鉴别

席秀利, 黄海波, 楼步青, 詹若挺, 王浩涵

(广州中医药大学, 广东广州 510006)

摘要:为提取优化广陈皮基因组 DNA, 同时利用简单重复序列间扩增 (ISSR) 分子鉴定技术快速、准确地鉴别茶枝柑及其近缘种。对比 4 种提取方法后择优提取广陈皮 DNA; 采用正交优化茶枝柑 ISSR-PCR 反应体系, 筛选 100 条 ISSR 通用引物及其退火温度, 从而对茶枝柑及近缘种进行遗传多态性分析。结果发现, 通过对比 cCTAB 法提取陈皮基因组 DNA 产率较试剂盒法提高了 10 倍, 且电泳检测条带清晰明亮, 可为后续分子研究提供基础; 通过筛选 100 条 ISSR 通用引物, 最终筛选出 10 条适合茶枝柑及近缘种的引物, 对其进行多态性分析并获得 13 种植物聚类分析图。因此可知, cCTAB 法适合陈皮基因组 DNA 的提取, 并可为其他果皮类植物基因组 DNA 提取提供参考; ISSR 适合茶枝柑及近缘种的遗传多态性分析, 可作为其有效分子鉴别手段。

关键词: DNA 提取; ISSR; 茶枝柑; 近缘种; 遗传多态性

中图分类号: S666.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0027-05

芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 (*Citrus*) 植物茶枝柑 (*Citrus reticulata* cv. *chachiensis*) 的成熟果皮可入药。茶枝柑的果皮晒干即为中药陈皮, 陈皮具有理气健脾、燥湿化痰之功效, 用于胸脘胀满、食少吐泻、咳嗽痰多等疾病^[1]。商业上用于制作中成药、中药饮片、陈皮茶、饮料、添加剂和香料等, 具有很高的食用兼药用价值^[2]。因其需求量巨大, 同时由于环境、地域的差异, 陈皮药材来源混杂、混伪品较多, 造成了药材质量不稳定, 难以保证临床用药的安全和有效, 因此建立科学的鉴定方法是保证陈皮质量亟需解决的问题。

1994 年, 加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等提出分子标记采用简单重复序列间扩增 (inter simple sequence repeat, 简称 ISSR)^[3]。ISSR 技术简易、快捷, 引物设计无须预知基因组序列, 只要是目标区域的长度在可扩增范围内, 就能扩增出微卫星重复序列间的 DNA 片段^[4]。ISSR 综合了其他分子标记高多态性、可重复性、低成本易操作以及无须知道基因组序列的优点, 已被广泛应用于种质收集、品种鉴定、遗传多样性以及 SSR 引物开发等研究^[5]。

本研究通过经典十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[6]、

mCTAB 法^[7]以及 2 种植物基因组提取试剂盒法对广陈皮药材基因组 DNA 提取进行探究, 优化适合广陈皮 DNA 的提取方法, 以期今后广陈皮的分子研究提供保障。同时, 利用 ISSR 标记对茶枝柑及近缘种进行遗传多态性分析, 得到相关物种的 ISSR 聚类分析图, 从而为茶枝柑及其近缘种植物鉴别提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料的收集包括广陈皮 (*Citrus aurantium* L.) 以及茶枝柑同属近缘 13 种, 其中茶枝柑、福橘 (*Citrus reticulata* Blanco cv. *Tangerina*) 采自广东省、福建省等地, 由广州中医药大学黄海波副教授鉴定, 凭证标本保存于广州中医药大学。采集植物新鲜幼嫩叶片, 用 75% 乙醇水溶液清洁叶表面后迅速置于硅胶密封袋中, 快速干燥后保存于 -20 °C 冰箱备用, 试验材料详细信息见表 1。

1.2 仪器和试剂

OSE-Y20 电动研磨仪 [天根生化科技 (北京) 有限公司], Arktik PCR 仪 (Thermo), T960 PCR 仪 (杭州晶格科学仪器有限公司), Power Pac Basic 电泳仪 (Bio-Rad), 离心机 (Eppendorf), Nano Drop 2000 超微量紫外分光光度计 (Thermo), Tanon-2500 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

dNTPs, ExTaqDNA 聚合酶、Mg²⁺、10 × ExTaq Buffer、DL5000Maker、琼脂糖 (TaKaRa); 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、CTAB、β-巯基乙醇 (Sigma 公司); 植物基因组提取试剂盒、

1995.

[12] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 102–110.

[13] 裴鑫得. 多元统计分析及其应用 [M]. 北京: 农业出版社, 1991: 89–188.

[14] 魏秀华, 周永红, 杨瑞武, 等. 鹅观草属三个物种及其居群间的

酯酶同工酶分析 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(2): 117–120, 195.

[15] 王中仁. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 95–118.

[16] 葛 颂. 酶电泳资料和系统与进化植物学研究综述 [J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(1): 71–84.