

菘蓝属植物的同工酶分析及其系统学意义

李国强, 王峥涛, 李晓波, 徐国钧

(中国药科大学生药学研究室, 江苏 南京 210038)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 比较了菘蓝属 (*Isatis* L.) 5 种 2 变种 1 多倍体品种及 1 外类群种共计 20 个样本的酯酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶的酶谱差异, 并运用数量分类学的原理和方法对酶谱数据进行了聚类分析。20 个样本的酯酶同工酶酶谱共有 18 条酶带, 可分为慢带区 (A 区)、中带区 (B 区) 和快带区 (C 区) 3 个区, 其中 A 区的 R_f 0.09 酶带为所有样本共有, 而 B 区和 C 区不仅酶带数多, 而且活性较强, 并表现出很大差异。20 个样本的超氧化物歧化酶同工酶酶谱有 8 条酶带, 略有差异。聚类分析结果表明, 20 个样本被明显分成 10 组, 与形态性状分类结果基本一致。利用酶带的有无、酶带的活性差异以及聚类分析结果, 可以初步作出菘蓝属类群间亲缘关系的判定。

关键词: 酯酶同工酶; 超氧化物歧化酶同工酶; 聚类分析; 菘蓝属

中图分类号: Q946.5; Q949.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)04-0022-07

The isoenzyme analysis of *Isatis* L. species and its systematic signification LI Guo-qiang, WANG Zheng-tao, LI Xiao-bo, XU Guo-jun (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China) *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(4): 22-28

Abstract: The zymogramatic variations of esterase isoenzyme (EST) and superoxide dismutase isoenzyme (SOD) of 20 sample materials including 5 species, 2 varieties, 1 multiploid in *Isatis* L. and 1 outgroup species (*Coronopus didymus* J. E. Smith) were analyzed with the polyacrylamide gel electrophoresis. The zymogramatic data indicated that 18 belts of EST isoenzyme can be divided into 3 zones. All the species showed the enzyme belt at R_f 0.09 in zone A of EST. While zone B and zone C of EST displayed many more enzyme belts of difference from each other with stronger enzyme activity. For SOD, 8 enzyme belts were found but with little difference in zymogram. The clustering analysis indicated that all samples were divided into 10 groups, which is in accordance with the morphological taxonomy of *Isatis*. As a result, the relationship and classification of these samples can be determined preliminarily by the number and the activity of enzyme belts of EST and SOD.

Key words: esterase isoenzyme (EST); superoxide dismutase isoenzyme (SOD); clustering analysis; *Isatis* L.

菘蓝属 (*Isatis* L.) 隶属于十字花科 (Cruciferae), 全世界约 30 余种 (有些分类学家认为有 50 余种)。主要分布于地中海以东的中亚地区, 伊朗-吐兰地区为其分布中心, 向东可达库页岛和日本, 往北可及中欧和北美。我国产 6 种 3 变种。菘蓝属在我国主要分布于新疆、内蒙古和东北三省, 其中特产我国的栽培种菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 则几乎遍及全国^[1]。该属是一个有着重要药用等经济价值的类群, 其中菘蓝是中药板蓝根、大青叶的基源植物和制备青黛的主要植物来源^[2,3]; 另外, 我国特有变种新疆菘蓝 (乌斯玛 *Isatis indigotica* Fort. var. *osma*) 在民间还用于制备化妆品^[4,5]。

由于该属植物的营养器官和繁殖器官形态结构在种间乃至种内居群间变异幅度大, 种下无明显的

间断性状可依, 致使其在经典分类上一直被认为是十字花科较困难的属之一, 属内种类组成复杂, 不少种类的种间关系不清, 如菘蓝和欧洲菘蓝 (*I. tinctoria* L.)、菘蓝和长圆果菘蓝 (*I. oblongata* DC.)、欧洲菘蓝和三肋菘蓝 (*I. costata* C. A. Mey.) 等, 甚至沙漠菘蓝组、宽翅菘蓝组和菘蓝组之间界限也很难划清。这一现象也制约了其系统分类研究和遗传多样性探讨。

迄今为止, 对菘蓝属的研究多见于形态分类研究、地理分布描述、比较解剖学、细胞分类学研究及

收稿日期: 2000-09-29

基金项目: 国家经贸委专项科研基金资助项目

作者简介: 李国强 (1962-), 男, 江苏高淳人, 博士, 主要从事生药学、药用植物学、中药资源学和分子生物学研究。

植物化学研究,而涉及同工酶等分子系统学研究报道很少并且仅限于少数种类^[6-8]。植物同工酶分析已广泛应用于植物系统演化研究,对类群间亲缘关系的探讨具有一定的意义^[9-16]。为进一步搞清菘蓝属植物的系统演化,探讨类群间的分类学问题,同时为更好地利用该属的药用植物资源提供理论依据,本文对国产菘蓝属植物进行了酯酶及超氧化物歧化酶同工酶分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料(表1)的果实采自不同产地,分别于2000年2月3日和2000年3月5日播种于中国药科大学药用植物园。

供试材料分属2属6种2变种1多倍体品种共计20个样本(表1),所有供试材料均经作者进行种类鉴定,凭证标本及样品均收藏于中国药科大学药用植物标本馆(CPU)。

为了得到一个较理想的有根的系统树,本文选择了臭芥(*Coronopus didymus* J. E. Smith)作为外类群。主要基于该种类与菘蓝属皆于十字花科独行菜

族,亲缘关系较近,但与内类群作参照时分辨率又不至于过高,并且是近世界广布种等考虑。

1.2 方 法^[17]

1.2.1 酶液提取 取幼苗的新鲜叶片,分别用自来水及蒸馏水冲洗,吸干表面水分备用。酯酶同工酶(EST)用0.1 mol/L pH 6.8 磷酸钠缓冲液提取,超氧化物歧化酶同工酶(SOD)用0.05 mol/L pH 7.8 磷酸钠缓冲液提取,上述提取液均含0.5 mol/L蔗糖,0.006 mol/L 抗坏血酸,0.006 mol/L β -巯基乙醇。称取叶片200 mg,加入600 μ L 提取液及少许石英砂,在冰浴中研磨成匀浆,充分摇匀后于4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心20 min。取上清液供试,重复2~3次。剩余上清液于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.2 电泳 采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度7.5%~10%(pH 8.9),浓缩胶浓度2.5%~3.75%(pH 6.7),电极缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3)。每孔点样量为50 μ L,加入几滴溴酚兰指示电泳前沿。于4 $^{\circ}$ C 冰箱内稳流电泳4~5 h;电流为浓缩胶10~15 mA,分离胶为20~30 mA。

表1 菘蓝属试验材料

Table 1 The sampling materials of *Isatis* L.

原植物 Taxon	来源 Source	采集日期 Collecting date
1. 欧洲菘蓝 <i>Isatis tinctoria</i> L.	北京 Beijing	1999-10-11
2. 菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort.	北京 Beijing	1999-10-15
3. 新疆菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort. var. <i>osma</i>	新疆塔城 Tacheng, Xinjiang	1999-08-11
4. 新疆菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort. var. <i>osma</i>	新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang	1998-08-02
5. 菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort.	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	1998-07-01
6. 新疆菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort. var. <i>osma</i>	新疆和田 Hotan, Xinjiang	1999-11-01
7. 新疆菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort. var. <i>osma</i>	新疆喀什 Kashi, Xinjiang	1999-11-16
8. 菘蓝多倍体 <i>I. indigotica</i> Fort. (4X)	上海 Shanghai	1999-04-20
9. 菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort.	河北安国 Anguo, Hebei	1998-07-21
10. 菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort.	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu	1999-09-01
11. 宽翅菘蓝 <i>I. violascens</i> Bunge	新疆阜康 Fukang, Xinjiang	1998-08-03
12. 毛三肋菘蓝 <i>I. costata</i> C. A. Mey. var. <i>lasiocarpa</i> N. Busch	新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang	1999-08-18
13. 长圆果菘蓝 <i>I. oblongata</i> DC.	新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang	1999-08-03
14. 三肋菘蓝 <i>I. costata</i> C. A. Mey.	新疆塔城 Tacheng, Xinjiang	1999-08-11
15. 三肋菘蓝 <i>I. costata</i> C. A. Mey.	新疆托里 Toli, Xinjiang	1999-08-13
16. 菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort.	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol	1997-07-20
17. 新疆菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort. var. <i>osma</i>	新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang	1999-09-16
18. 新疆菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort. var. <i>osma</i>	新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang	1999-09-16
19. 菘蓝 <i>I. indigotica</i> Fort.	安徽合肥 Hefei, Anhui	1998-09-14
20. 臭芥 <i>Coronopus didymus</i> J. E. Smith	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	1999-06-05

1.2.3 显色 酯酶(EST):将醋酸- α -萘酯、醋酸- β -萘酯各 30 mg 用丙酮 1.5 mL 溶解,取坚牢蓝 RR 100 mg 用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 10 mL 溶解,最后加蒸馏水至 100 mL。将上述溶液混匀,把凝胶片浸入染色液中,于 37℃ 保温 50 min。用蒸馏水漂洗后,拍照,绘图。

超氧化物歧化酶(SOD):按罗广华、王爱国方法操作^[18],略加改进。将电泳后的凝胶片按次序浸入如下溶液中:1) 2.45×10^{-3} mol/L 氮蓝四唑(NBT)溶液 100 mL,在黑暗下浸泡 20 min;2) 2.8×10^{-2} mol/L 四甲基乙二胺、 2.8×10^{-5} mol/L 核黄素、 3.6×10^{-2} mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.8)混合溶液 100 mL,在黑暗下浸泡 15 min;3) 1×10^{-4} mol/L EDTA、 5×10^{-2} mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.8)混合溶液 100 mL,在 4×8 W 日光灯下照光 30 min。经染色和照光后,凝胶上出现蓝色背景下透明的谱带(负带),经蒸馏水漂洗后,用 95% 酒精略浸泡数分钟,照相,绘图。

1.2.4 数据整理及聚类分析 测量各酶带的迁移距离,按酶种分别计算 R_f 值,并对测定结果分别或综合进行聚类分析。同一 R_f 值位点,如出现酶带记为“1”;不出现酶带则记为“0”。然后按 SPSS 的类间平均链锁法进行聚类分析,绘制出各类群的聚类图。

2 结果与分析

2.1 酶系统的选择

为了比较酯酶和超氧化物歧化酶的可行性,在实验中同时分析了酯酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、细胞色素氧化酶和 α -淀粉酶。结果显示,前两者具有较好酶谱差异,其余酶系统差异不明显。因此,酯酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶在菘蓝属系统研究中是两种适用的酶系统,作为同工酶的分子系统学证据,能为该属的系统分类提供有力的佐证。

2.2 酯酶同工酶酶谱比较分析

20 个样本的酯酶同工酶酶谱(图 1, 图 2)共有 8 个基因位点(E1~E8)18 条酶带。酶带的 R_f 值由小到大依次为 0.09、0.11、0.14、0.16、0.19、0.21、0.23、0.28、0.31、0.34、0.38、0.40、0.45、0.48、0.50、0.51、0.54 和 0.57。图 2 酶谱显示:全部酶带可以划分为慢带区(A 区)、中带区(B 区)和快带区(C 区),其中慢带区有 7 条酶带(R_f 0.09~0.23)3 个位点(E1、E2 和 E3);中带区有 5 条酶带(R_f 0.24~0.40)2 个位点(E4 和 E5);快带区有 6 条酶带(R_f 0.41~0.57)3 个

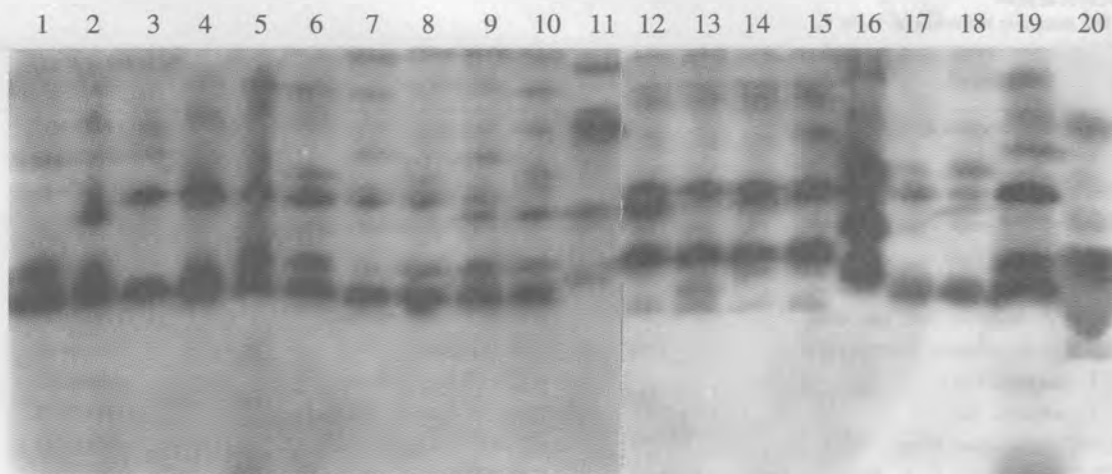


图 1 菘蓝属植物及其外类群酯酶同工酶酶谱
Fig. 1 Esterase isoenzyme belts in the leaf of *Isatis* species and outgroup

1: 欧洲菘蓝 *I. tinctoria* (北京 Beijing); 2: 菘蓝 *I. indigotica* (北京 Beijing); 3: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 4: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang); 5: 菘蓝 *I. indigotica* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu); 6: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆和田 Hotan, Xinjiang); 7: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆喀什 Kashi, Xinjiang); 8: 菘蓝多倍体 *I. indigotica* (4X) (上海 Shanghai); 9: 菘蓝 *I. indigotica* (河北安国 Anguo, Hebei); 10: 菘蓝 *I. indigotica* (甘肃兰州 Lanzhou, Gansu); 11: 宽翅菘蓝 *I. violascens* (新疆阜康 Fukang, Xinjiang); 12: 毛三肋菘蓝 *I. costata* var. *lasiocarpa* (新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang); 13: 长圆果菘蓝 *I. oblongata* (新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang); 14: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 15: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆托里 Toli, Xinjiang); 16: 菘蓝 *I. indigotica* (内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol); 17: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang); 18: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang); 19: 菘蓝 *I. indigotica* (安徽合肥 Hefei, Anhui); 20: 臭芥 *Coronopus didymus* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu)

位点(E6、E7和E8)。慢带区的活性较弱,但各样本均有 R_f 0.09的主酶带;中带区和快带区的活性较强,酶带较复杂,往往提示种间乃至种内类群上的特征差异。E3和E4为二聚体酶,其余均为单态酶。

分析结果表明,菘蓝、新疆菘蓝、欧洲菘蓝、宽翅菘蓝(*I. violascens* Bunge)、三肋菘蓝、毛三肋菘蓝(*I. costata* C. A. Mey. var. *lasiocarpa* N. Busch)、长圆果菘蓝的酯酶同工酶酶谱均有差异。其中,欧洲菘蓝表达的酶带数为7条,有E1、E3、E4、E6和E7共5个基因位点,E2和E5两个基因位点的缺失使之与其他类群相区别;菘蓝不同栽培居群有酶带10~11条,有E1、E2、E3、E4、E5、E6和E7共计7个基因位点;新疆菘蓝不同栽培居群有酶带7~10条,也有E1、E2、E3、E4、E5、E6和E7 7个基因位点,但E6基因位点仅和田、喀什居群拥有;三肋菘蓝两个居群均有10条酶带,在8个基因位点上均有表达;毛三肋菘蓝有9条酶带,有E1、E2、E3、E4、E5、E6和E8共7个基因位点,缺少E7基因位点;长圆果菘蓝有9条酶带、8个基因位点;宽翅菘蓝有10条酶带,有E1、E2、E3、E5和E6共5个基因位点,缺少E4、E7和E8基因位点,在E1位点上有2条酶带表达,在E3位点有3条酶带表达;外类群臭芥有7条酶带,有E1、E3、E6、E7和E8共计5个基因位点。菘蓝属7个分类群19个供试样本中,种间、种内甚至居群间在酶谱上仍然具有一定的差异。总之,通过酶谱上酶带的有无以及酶带活性的强弱,可以对菘蓝属不同种及同种不同产地的居群加以区分,而且可以为进一步探讨菘蓝属植物的亲缘关系提供有力的证据。

2.3 超氧化物歧化酶同工酶酶谱比较分析

菘蓝属20个样本的超氧化物歧化酶同工酶酶谱(图3,图4)共有3个基因位点(S1、S2和S3),并在8个位置上出现酶带。酶带的 R_f 值由小到大依次为0.08、0.23、0.28、0.36、0.38、0.43、0.45和0.48。图4酶谱显示:全部酶带可以分为慢带区、中带区和快带区3个区,其中慢带区有S1位点2条酶带(R_f 0.08~0.23);中带区有S2位点3条酶带(R_f 0.24~0.38);快带区有S3位点4条酶带(R_f 0.39~0.48)。慢带区的活性较弱,中带区、快带区的活性较强;慢带区仅宽翅菘蓝和三肋菘蓝有特征性谱带,其 R_f 值分别为0.08和0.23,其余种类皆无;大部分种类在中带区则共有 R_f 0.28和 R_f 0.36的特征性谱带;快

带区除欧洲菘蓝和宽翅菘蓝有3条谱带外,其余大部分种类拥有 R_f 值为0.43和0.45两条酶带,而臭芥则表达出 R_f 为0.45和0.48的两条酶带,新疆菘蓝的阿克苏居群及吐鲁番居群仅表现出1条酶带(R_f 0.43)。

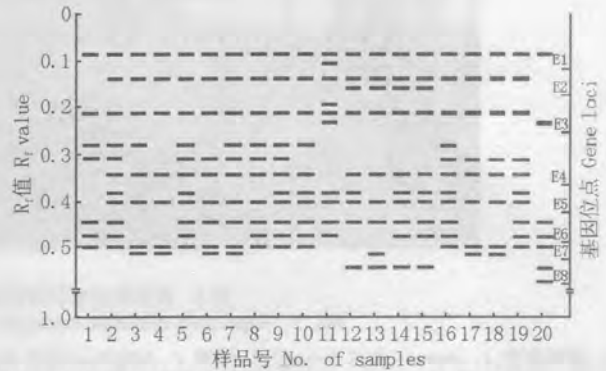


图2 菘蓝属植物及其外类群的酯酶同工酶酶谱的示意图
Fig. 2 Illustration of esterase isoenzyme belts in the leaf of *Isatis* species and outgroup

1: 欧洲菘蓝 *I. tinctoria* (北京 Beijing); 2: 菘蓝 *I. indigotica* (北京 Beijing); 3: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 4: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang); 5: 菘蓝 *I. indigotica* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu); 6: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆和田 Hotan, Xinjiang); 7: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆喀什 Kashi, Xinjiang); 8: 菘蓝多倍体 *I. indigotica* (4X) (上海 Shanghai); 9: 菘蓝 *I. indigotica* (河北安国 Anguo, Hebei); 10: 菘蓝 *I. indigotica* (甘肃兰州 Lanzhou, Gansu); 11: 宽翅菘蓝 *I. violascens* (新疆阜康 Fukang, Xinjiang); 12: 毛三肋菘蓝 *I. costata* var. *lasiocarpa* (新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang); 13: 长圆果菘蓝 *I. oblongata* (新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang); 14: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 15: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆托里 Toli, Xinjiang); 16: 菘蓝 *I. indigotica* (内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol); 17: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang); 18: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang); 19: 菘蓝 *I. indigotica* (安徽合肥 Hefei, Anhui); 20: 臭芥 *Coronopus didymus* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu)

通过分析可以看出,不同种类菘蓝(含外类群)的超氧化物歧化酶酶带略有差异,种间差异较种内居群间差异要显著的多,鉴于各种类酶带活性上的差异,尚值得对各居群作进一步的研究。

2.4 两种酶谱带结果综合聚类分析

如上所述,20个样本(含外类群)的超氧化物歧化酶同工酶酶谱酶带稍有差异,而酯酶同工酶酶谱酶带差异明显,把两者结合起来进行聚类分析无疑会更稳定可靠,根据酶谱带的有无计算的相似矩阵见表2。

图5显示了20个样本(含外类群)在不同聚类水平上相互结合情况。从聚类树形图上可以看出:当T值大于24时,外类群和内类群各自聚为一支,



图 3 菘蓝属植物及其外类群超氧化物歧化酶同工酶酶谱
 Fig. 3 Superoxide dismutase isoenzyme belts in the leaf of *Isatis* species and outgroup

1: 欧洲菘蓝 *I. tinctoria* (北京 Beijing); 2: 菘蓝 *I. indigotica* (北京 Beijing); 3: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 4: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang); 5: 菘蓝 *I. indigotica* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu); 6: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆和田 Hotan, Xinjiang); 7: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆喀什 Kashi, Xinjiang); 8: 菘蓝多倍体 *I. indigotica* (4X) (上海 Shanghai); 9: 菘蓝 *I. indigotica* (河北安国 Anguo, Hebei); 10: 菘蓝 *I. indigotica* (甘肃兰州 Lanzhou, Gansu); 11: 宽翅菘蓝 *I. violascens* (新疆阜康 Fukang, Xinjiang); 12: 毛三肋菘蓝 *I. costata* var. *lasiocarpa* (新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang); 13: 长圆果菘蓝 *I. oblongata* (新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang); 14: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 15: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆托里 Toli, Xinjiang); 16: 菘蓝 *I. indigotica* (内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol); 17: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang); 18: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang); 19: 菘蓝 *I. indigotica* (安徽合肥 Hefei, Anhui); 20: 臭芥 *Coronopus didymus* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu)

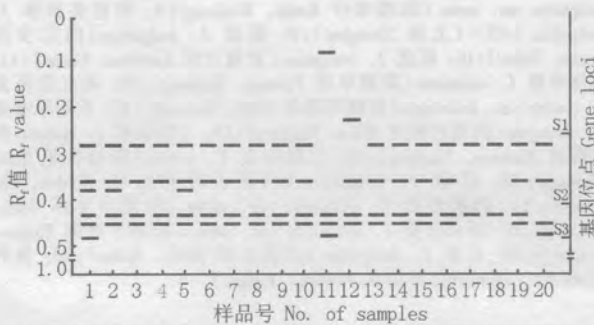


图 4 菘蓝属植物及其外类群的超氧化物歧化酶同工酶酶谱示意图
 Fig. 4 Illustration of superoxide dismutase isoenzyme belts in the leaf of *Isatis* species and outgroup

1: 欧洲菘蓝 *I. tinctoria* (北京 Beijing); 2: 菘蓝 *I. indigotica* (北京 Beijing); 3: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 4: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang); 5: 菘蓝 *I. indigotica* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu); 6: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆和田 Hotan, Xinjiang); 7: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆喀什 Kashi, Xinjiang); 8: 菘蓝多倍体 *I. indigotica* (4X) (上海 Shanghai); 9: 菘蓝 *I. indigotica* (河北安国 Anguo, Hebei); 10: 菘蓝 *I. indigotica* (甘肃兰州 Lanzhou, Gansu); 11: 宽翅菘蓝 *I. violascens* (新疆阜康 Fukang, Xinjiang); 12: 毛三肋菘蓝 *I. costata* var. *lasiocarpa* (新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang); 13: 长圆果菘蓝 *I. oblongata* (新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang); 14: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 15: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆托里 Toli, Xinjiang); 16: 菘蓝 *I. indigotica* (内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol); 17: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang); 18: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang); 19: 菘蓝 *I. indigotica* (安徽合肥 Hefei, Anhui); 20: 臭芥 *Coronopus didymus* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu)

说明所选外类群对内类群具有良好的分辨力,同时提示内类群可能为一单系群;当 T 值大于 17 时,内类群分出一支,为宽翅菘蓝;当 T 值大于 15 时,内类群分出欧洲菘蓝这一支;当 T 值大于 12 时,余下类群又分为两大支,一支为菘蓝和新疆菘蓝(菘蓝变种),另一支为长圆果菘蓝、三肋菘蓝和毛三肋菘蓝;当 T 大于 8 时,前一支中菘蓝(包括菘蓝多倍体)和新疆菘蓝(菘蓝变种)不同居群被分为两类;当 T 大于 7 时,后一支中长圆果菘蓝被分出。当取 $6 < T < 7$ 时,20 个材料被聚为 10 类(见图 5),其中 7 个不同产地的菘蓝居群被分为第 I 类;新疆菘蓝的阿克苏和吐鲁番居群被分为第 II 类;新疆菘蓝的和田和喀什居群被分为第 III 类,新疆菘蓝的塔城和乌鲁木齐居群被分为第 IV 类;三肋菘蓝的 2 个居群被分为第 V 类;而毛三肋菘蓝、长圆果菘蓝、欧洲菘蓝、宽翅菘蓝、臭芥分别对应于 VI、VII、VIII、IX 和 X 类。

3 结论与讨论

1) 菘蓝不同种类的酶谱表达存在种间乃至种内居群水平上的特异性。其中酯酶同工酶酶谱差异显著,而超氧化物歧化酶同工酶酶谱差异不十分显著。

表2 菘蓝属植物及其外类群的酯酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶谱相似矩阵¹⁾
Table 2 Proximity matrix of EST and SOD isoenzyme in the leaf of *Isatis* species and outgroup¹⁾

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0																			
2	5	0																		
3	9	6	0																	
4	10	7	1	0																
5	5	0	6	7	0															
6	8	5	3	2	5	0														
7	7	4	2	3	4	1	0													
8	5	2	4	5	2	3	2	0												
9	6	1	5	6	1	4	3	1	0											
10	6	1	5	6	1	4	3	1	0	0										
11	14	11	13	12	11	12	13	11	10	10	0									
12	14	9	0	8	9	8	9	9	8	8	10	0								
13	9	8	6	5	8	5	6	6	7	7	13	5	0							
14	11	6	8	7	6	7	8	6	5	5	9	3	4	0						
15	11	6	8	7	6	7	8	6	5	5	9	3	4	0	0					
16	6	1	5	6	1	4	3	1	0	0	10	8	7	5	5	0				
17	11	8	4	3	8	3	4	6	7	7	13	11	8	10	10	7	0			
18	11	8	4	3	8	3	4	6	7	7	13	11	8	10	10	7	0	0		
19	6	1	5	6	1	4	3	1	0	0	10	8	7	5	5	0	7	7	0	
20	10	13	13	12	13	12	13	11	12	12	12	12	11	11	11	12	15	15	12	0

¹⁾ 1: 欧洲菘蓝 *I. tinctoria* (北京 Beijing); 2: 菘蓝 *I. indigotica* (北京 Beijing); 3: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 4: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang); 5: 菘蓝 *I. indigotica* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu); 6: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆和田 Hotan, Xinjiang); 7: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆喀什 Kashi, Xinjiang); 8: 菘蓝多倍体 *I. indigotica* (4X) (上海 Shanghai); 9: 菘蓝 *I. indigotica* (河北安国 Anguo, Hebei); 10: 菘蓝 *I. indigotica* (甘肃兰州 Lanzhou, Gansu); 11: 宽翅菘蓝 *I. violascens* (新疆阜康 Fukang, Xinjiang); 12: 毛三肋菘蓝 *I. costata* var. *lasiocarpa* (新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang); 13: 长圆果菘蓝 *I. oblongata* (新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang); 14: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 15: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆托里 Toli, Xinjiang); 16: 菘蓝 *I. indigotica* (内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol); 17: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang); 18: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang); 19: 菘蓝 *I. indigotica* (安徽合肥 Hefei, Anhui); 20: 臭芥 *Coronopus didymus* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu)

推测可能与前者的基因位点多(为8个),后者的基因位点少(仅为3个)有关。

2) 菘蓝属分类单位变异幅度较大,尤其是种下无明显的间断性状可依,直接制约了其系统分类研究和遗传多样性探讨。本试验首次通过同工酶性状结合数量分类方法对其属下亲缘关系作了初步探讨。酯酶、超氧化物歧化酶同工酶两者结合分析的树系图显示出良好的聚类分析结果,在结合水平很高情况下宽翅菘蓝始终单独一支,这一结果和 De Candolle(1823)的分类系统(Sect. *Glastum* DC.)、Davis(1965)的分类系统相一致^[6-8]。

3) Debeaux^[19](1875)指出菘蓝和长圆果菘蓝近缘。王希平等^[11](1983)从菘蓝染色体数目、野生种

地理分布等推论菘蓝是一较原始类群,而长圆果菘蓝与之大不相同。长圆果菘蓝与三肋菘蓝形态特征及地理分布相似,是三肋菘蓝的一特化类群。从上述聚类分析也得出了完全相同的结论。另外,对菘蓝和欧洲菘蓝的聚类分析结果也完全支持乔传卓等^[10]以形态为主要依据对两者所作出的鉴别。

4) 我国新疆民间栽培的乌斯玛曾被关克俭、马毓泉鉴定为欧洲菘蓝(*Isatis tinctoria* L.),王希平、周太炎等则鉴定为菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.),作者研究认为应该在菘蓝种下建立种下变种等级更为客观,而且欧洲菘蓝明显区别于原产我国的菘蓝和变种乌斯玛。这两个结论同时得到了DNA分子证据,以及形态和化学成分证据的支持^[5,20]。

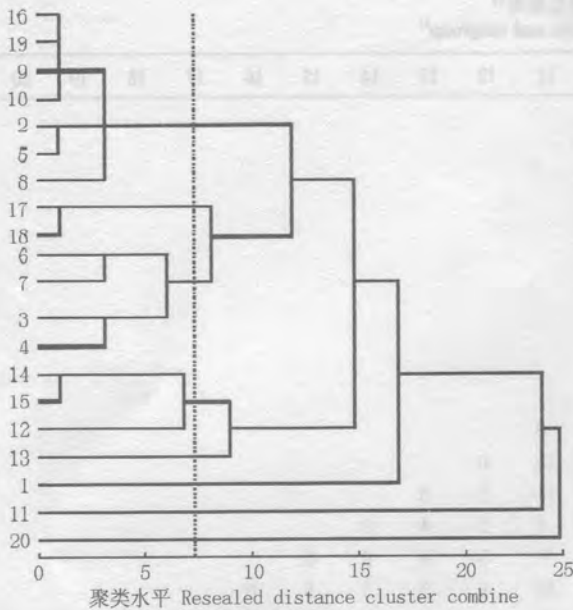


图5 类间平均连锁法聚类分析树图

Fig. 5 Dendrogram using average linkage between groups

1: 欧洲菘蓝 *I. tinctoria* (北京 Beijing); 2: 菘蓝 *I. indigotica* (北京 Beijing); 3: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 4: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang); 5: 菘蓝 *I. indigotica* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu); 6: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆和田 Hotan, Xinjiang); 7: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆喀什 Kashi, Xinjiang); 8: 菘蓝多倍体 *I. indigotica* (4X) (上海 Shanghai); 9: 菘蓝 *I. indigotica* (河北安国 Anguo, Hebei); 10: 菘蓝 *I. indigotica* (甘肃兰州 Lanzhou, Gansu); 11: 宽翅菘蓝 *I. violascens* (新疆阜康 Fukang, Xinjiang); 12: 毛三肋菘蓝 *I. costata* var. *lasiocarpa* (新疆阿勒泰 Altay, Xinjiang); 13: 长圆果菘蓝 *I. oblongata* (新疆尼勒克 Nilka, Xinjiang); 14: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆塔城 Tacheng, Xinjiang); 15: 三肋菘蓝 *I. costata* (新疆托里 Toli, Xinjiang); 16: 菘蓝 *I. indigotica* (内蒙古呼和浩特 Hohhot, Nei Mongol); 17: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆阿克苏 Aksu, Xinjiang); 18: 新疆菘蓝 *I. indigotica* var. *osma* (新疆吐鲁番 Turpan, Xinjiang); 19: 菘蓝 *I. indigotica* (安徽合肥 Hefei, Anhui); 20: 臭芥 *Coronopus didymus* (江苏南京 Nanjing, Jiangsu)

致谢: 本研究始终得到了李式军教授的关心和柳李旺、姜平、李寿田、朴崇兴、庄飞云博士等的帮助, 在此表示衷心感谢。

参考文献:

[1] 周太炎. 中国植物志 第三十三卷[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 61-66.
 [2] 夏光成, 王士贤, 王强, 等. 板蓝根类的研究[A]. 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究(北方篇)第1册[M]. 北

京: 北京医科大学-中国协和医科大学联合出版社, 1995. 303-342.
 [3] 夏光成, 王士贤, 吴寿金, 等. 大青叶类的研究[A]. 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究(北方篇)第1册[M]. 北京: 北京医科大学-中国协和医科大学联合出版社, 1995. 253-301.
 [4] 李国强, 庄重, 刘庆华, 等. 资源植物菘蓝属引种栽培及利用的现状与前景[J]. 植物学通报, 1996, 13(3): 37-39.
 [5] 李国强, 胡军, 朱燕, 等. 菘蓝属种质资源优化初步研究[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(5): 21-23.
 [6] 王寅, 乔传卓, 王中仁, 等. 菘蓝不同栽培居群的等位酶分析[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 209-212.
 [7] 乔传卓, 崔熙. 菘蓝和欧洲菘蓝的鉴别研究[J]. 植物学报, 1984, 22(3): 237-242.
 [8] 王希平, 周太炎, 袁昌齐, 等. 中国菘蓝属 (*Isatis* L.) 植物研究[A]. 南京中山植物园研究论文集编辑组. 南京中山植物园研究论文集 1982[C]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1983. 23-31.
 [9] 成锁占, 杨文衡. 根据同工酶谱对核桃属十个种分类学的研究[J]. 园艺学报, 1987, 14(2): 89-96.
 [10] 方德秋, 章文才, 肖顺元. 应用同工酶进行柑桔分类和进化研究[J]. 植物分类学报, 1993, 31(4): 329-352.
 [11] 胡志昂. 杨属植物的同工酶过氧化物酶[J]. 植物分类学报, 1981, 19(3): 291-297.
 [12] 刘启新, 惠红. 中国前胡属酯酶同工酶与种类演化和地理分布格局[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(4): 17-24.
 [13] 童南奎, 陈世儒. 芥菜及其原始亲本的酸性磷酸酶同工酶分析[J]. 植物分类学报, 1990, 17(4): 293-298.
 [14] 汪祖华, 陆振翔, 郭洪. 李、杏、梅亲缘关系及分类地位的同工酶研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 97-102.
 [15] 杨自湘, 奚声珂. 胡桃属十种植物的过氧化物酶分析[J]. 植物分类学报, 1989, 27(10): 53-57.
 [16] 郑晓鹰, 李丽, 李秀清. 大白菜品种同工酶及水溶蛋白的遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 244-248.
 [17] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
 [18] 罗广华, 王爱国. 植物的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯, 1983, (6): 44-45.
 [19] Debeaux M O. Florule De Shang Hai (Pro. Kiangsu) [J]. Actes Linnean Society Bord. 1875, XXX: 71.
 [20] 李国强. 中国产菘蓝植物资源研究[D]. 南京: 中国药科大学, 2001. 91-95.

(责任编辑: 惠红)