

4 种芦蒿的鉴定·分类与评价

王开冻 (江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400)

摘要 [目的] 为研究芦蒿的种质资源和遗传机制奠定基础 [方法] 以在南京地区栽培的 4 个芦蒿品种 (红芦蒿、伏秋青芦蒿、冬春青芦蒿和白芦蒿) 为材料, 利用形态学观察和同工酶技术对 4 个芦蒿品种进行鉴定与分类, 并对其农艺性状进行综合评价 [结果] 通过形态学观察, 可初步确定 4 份材料为芦蒿, 且存在明显的形态差异。4 个芦蒿品种有 12 条过氧化物酶共同谱带和 6 条酯酶共同谱带, 分别占总位点数的 92.3% 和 50.0%, 从酶蛋白水平上进一步证实 4 份材料均属芦蒿种。4 份材料间同工酶谱带也有显著差异, 与表型差异相一致。田间调查表明, 在相同生长环境中伏秋青芦蒿和冬春青芦蒿的生长势较好、产量较高, 这与同工酶分析结果相一致 [结论] 伏秋青芦蒿和冬春青芦蒿在芦蒿育种中具有较高的利用价值。

关键词 芦蒿; 形态学观察; 同工酶; 农艺性状

中图分类号 S649 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)02-00501-02

Identification, Classification and Evaluation of 4 Varieties of *Artemisia selengensis*

WANG Kai-dong (Jiangsu Vocational Technical College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangsu 212400)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for studying the germplasm resource and the genetic mechanism of *Artemisia selengensis*. [Method] With 4 varieties of *A. selengensis* (Red *A. selengensis*, Green *A. selengensis* in summer and autumn, Green *A. selengensis* in winter and spring, White *A. selengensis*) cultivated in Nanjing area as tested materials, 4 varieties of *A. selengensis* were identified and classified by morphological observation and isozyme technology. And their agronomic traits were comprehensively evaluated. [Result] Through morphological observation, 4 materials were preliminarily confirmed as *A. selengensis* and they had obvious morphological differences. There were 12 common peroxidase bands and 6 common esterase bands among 4 varieties of *A. selengensis*, being 92.3% and 50.0% of total site number respectively, which further proved that 4 materials belonged to *A. selengensis* at the zymoprotein level. The isozyme bands also had significant differences among 4 materials, which were in accordance with the phenotypic differences. The field investigation showed that Green *A. selengensis* in summer and autumn, Green *A. selengensis* in winter and spring had better growth vigor and higher yield in the same growth environment, which was in accordance with the results of isozyme analysis. [Conclusion] Green *A. selengensis* in summer and autumn, Green *A. selengensis* in winter and spring had higher utilization values in the breeding of *A. selengensis*.

Key words *Artemisia selengensis*; Morphological observation; Isozyme; Agronomic traits

随着人们对芦蒿 (*Artemisia selengensis* Turca.) 消费量的不断增加, 单纯的采摘野生资源已经不能满足人们的消费需求, 人工规模化栽培芦蒿成为目前市场上的主要来源。但是随着芦蒿不断被人工驯化栽培, 生产上陆续出现了一些如生长势衰退、营养成分含量降低、易受病虫害危害、品质劣变等^[1]新的问题。解决上述问题需要从芦蒿的种质资源和遗传机制上加以研究, 但是由于芦蒿栽培历史短, 目前国内外对其遗传基础各个方面的研究都极其缺乏^[2-3]。芦蒿由野生状态到人工栽培历史不长, 尚无科学的划分, 当前生产上也尚未进行严格的品种选择, 通常在同一田间出现集团状多种分化类型。因此, 笔者以同工酶分析法作为研究技术手段收集不同表型的芦蒿, 进行不同材料的鉴定、分类, 旨在为今后的芦蒿品种改良、培育抗病虫害品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料为红芦蒿、伏秋青芦蒿、冬春青芦蒿和白芦蒿, 均为南京市八卦洲乡栽培较普遍的 4 个农家品种, 在研究中依次编号为 1、2、3、4, 生产上主要通过扦插繁殖, 长期的无性繁殖加上其自花授粉特性, 使其群体表现稳定。

1.2 方法^[4]

1.2.1 样品制备。 分别取芦蒿地上茎和叶片用作酶粗提液的制备。提取液为 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 6.8), 内含 0.1% β -巯基乙醇和 15% 蔗糖。样品质量与提取液体积比为 1:3 (mg/ μ l), 冰浴研磨成匀浆后, 在 10 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液保存于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.2 电泳及染色。 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶法进行

电泳。浓缩胶质量浓度为 3% (pH 值为 6.7), 过氧化物酶同工酶的分离胶质量浓度为 8% (pH 值为 8.9), 酯酶同工酶的分离胶质量浓度为 9% (pH 值为 8.9), 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH 值为 8.3)。点样量为 20 μ l, 点样后在电极缓冲液中加入 3~4 滴浓度 1% 的溴酚蓝作为前沿指示剂, 在 4 °C 恒温下电泳, 初始电压 100 V, 0.5 h 后加至 200 V, 稳压直至指示剂离底部 0.5~1.0 cm 结束电泳, 前后约 3~4 h。过氧化物酶采用改良的醋酸联苯胺法染色, 酯酶采用醋酸- α -萘酯为底物, 坚牢蓝为染料, 37 °C 恒温下染色。待显出清晰酶带后, 用蒸馏水漂洗数次, 照相并绘制模式图。

1.2.3 数据分析。 同工酶酶带的相对迁移率 (Rf) 计算参照何忠效等^[4]介绍的方法进行, $Rf = \text{酶带迁移距离} / \text{溴酚蓝迁移距离}$ 。

2 结果与分析

2.1 芦蒿形态特征鉴定分类 《植物志》记载芦蒿为多年生直立草本, 有地下茎。茎高 80~140 cm, 中部无毛。叶表面无毛, 背面有白色黏毛, 下部叶在花期枯萎; 中部叶密集, 羽状深裂, 侧裂片 1~2 对, 线状披针形或线形, 边缘有疏尖齿, 顶端渐尖, 基部渐窄成楔形短柄, 无假托叶; 上部叶 3 裂或不裂或线形而全缘。头状花序钟形, 长 3.0~4.0 mm, 宽 2.5~3.0 mm; 总苞叶约 4 层, 外层卵形, 黄褐色, 有短绒毛, 中层广卵形, 内层椭圆形, 有宽膜质边缘; 花黄色, 外层雌性, 内层两性, 均结实; 瘦果微小, 无毛; 花果期 9~11 月。对照《植物志》记载, 确定 4 份材料为芦蒿, 除了上述共同特征以外, 它们还存在明显的形态差异, 主要表现在叶片形状和茎秆颜色上 (表 1、图 1)。

2.2 同工酶分析结果

2.2.1 过氧化物酶同工酶分析结果。 以地上茎中的酶谱为

作者简介 王开冻 (1973-), 男, 山东巨野人, 硕士, 讲师, 从事园艺蔬菜作物研究。

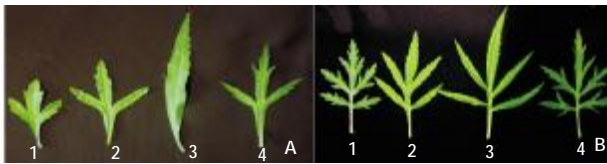
收稿日期 2007-09-11

表 1 4 种芦蒿的主要形态差异
Table 1 Main configuration differences of four kinds of Artemisia selengensis

编号 No.	形态特征 Morphological Characteristics
1	叶片深绿色, 多为羽状, 3-5 裂, 枫叶状, 较肥厚; 茎暗红色, 有白色短绒毛 Dark green leaves of most plume shape with 3-5 splits, maple lobation, thick leaf, dark red stem and white short down
2	叶片黄绿色, 多为羽状, 3-5 裂, 鸡爪状, 较肥厚; 茎深绿色, 有白色短绒毛 Yellow-green and hypertrophic leaves of most plume shape with 3-5 splits, dark green stem and white short down
3	叶片绿色, 多狭细, 柳叶状; 顶端尖茎绿色, 光滑 Green and narrow leaves of willow lobation with green and smooth stem tip
4	叶片绿色, 多 5-7 裂, 枫叶状, 狭细; 顶端尖茎淡绿色, 光滑 Green and narrow leaves of most 5-7 splits with maple lobation, light green and smooth stem tip

注: 1 为红芦蒿; 2 为伏秋青芦蒿; 3 为冬春青芦蒿; 4 为白芦蒿。下同。

Note: 1: Red Artemisia selengensis 2: Autumn green Artemisia selengensis 3: Winter and spring green Artemisia selengensis; 4: White Artemisia selengensis. The same as follows.



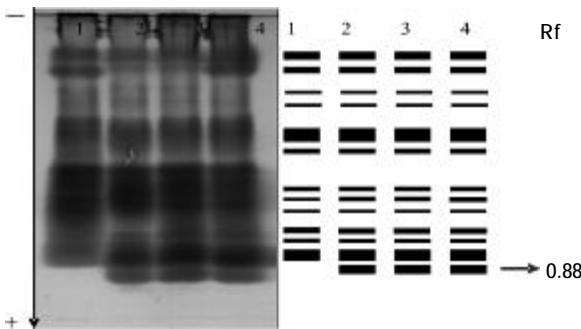
注: A 为幼嫩植株叶片形状; B 为成熟植株叶片形状。

Note: A: Leaf morphology of the young plant; B: Leaf morphology of the mature plant.

图 1 4 种芦蒿的叶片形态

Fig. 1 Leaf morphology of four kinds of Artemisia selengensis

例比较 4 份芦蒿材料的谱带差异 (图 2)。结果表明, 伏秋青芦蒿、冬春青芦蒿和白芦蒿 3 种类型的过氧化物酶同工酶谱带型相同, 与这 3 种类型芦蒿相比, 红芦蒿在 Rf=0.88



注: →表示缺失条带。下图同。

Note: →stands for lack of band. The same as follows.

图 2 4 种芦蒿的过氧化物酶谱及模式

Fig. 2 Peroxidase enzyme spectrum and mode of the four kinds of Artemisia selengensis

的位置缺失了一条谱带, 说明 4 个材料的过氧化物酶同工酶谱差异不显著, 单独利用过氧化物酶同工酶不能将不同类型

表 2 芦蒿的部分重要田间性状评价

Table 2 Evaluation of some important field properties of Artemisia selengensis

编号 Serial number	综合生长势 Comprehensive growth potential	抗旱能力 Drought resistance	抗病能力 Disease resistance	抗虫能力 Insect-resistant capacity	产量 Yield
1	中 Medium	强 Strong	抗性强 Strong resistance	强 Strong	低 Low
2	强, 茎较粗 Strong, relative wide stem	强 Strong	易感白粉病 Susceptible to powdery mildew	强 Strong	较高 Relative high
3	强, 茎较粗 Strong, relative wide stem	强 Strong	易感白粉病 Susceptible to powdery mildew	强 Strong	较高 Relative high
4	弱, 茎较细 Weak, relative small stem	强 Strong	易感白粉病 Susceptible to powdery mildew	强 Strong	低 Low

注: 同时扦插, 冬春青芦蒿最早发芽、展叶。

Note: Cutting at the same time, winter and spring green buds of Artemisia selengensis show the earliest germination.

3 结论与讨论

(1) 植物学形态标记分类法在对植物种、属及以上的分类中发挥了很重要的作用^[9], 但易受到植物个体发育、环境条件、栽培措施等的影响, 对于种以下的细微差异则具有很大的不可靠性。在自然界中存在很多的同物异形与同名异物以及同名异物与同物异名等现象, 有时仅凭形态特征很难区分。利用形态特征进行初步鉴定, 确认收集到的材料符

的芦蒿区分开。

2.2.2 酯酶同工酶分析结果。以叶片中的酶谱为例比较 4 份芦蒿材料的谱带差异 (图 3)。结果表明, 冬春青芦蒿的谱带最丰富, 与其相比, 红芦蒿少了 Rf=0.48, 0.61, 0.77, 0.83 共 4 条带, 伏秋青芦蒿少了 Rf=0.77 一条带, 白芦蒿少了 Rf=0.53, 0.70 两条带。4 份材料的酯酶同工酶谱差异显著, 利用酯酶同工酶可以将芦蒿的不同材料完全区分开, 也进一步说明 4 份材料存在遗传基础上的差异。

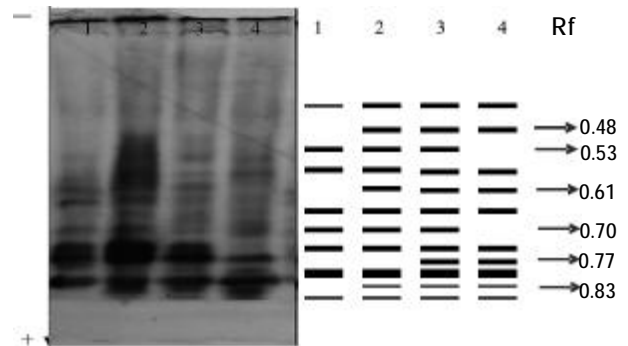


图 3 4 种芦蒿的酯酶谱及模式

Fig. 3 Esterase enzyme spectrum and mode of the four kinds of Artemisia selengensis

2.3 农艺性状评价

2.3.1 田间生长状况评价。田间观察发现 (表 2), 芦蒿的抗旱能力和抗虫能力很强, 伏秋青芦蒿和冬春青芦蒿的生长势旺盛, 产量较高。红芦蒿的抗病能力强, 其他 3 种材料易感白粉病, 但病害对产量影响不明显。4 种材料中, 冬春青芦蒿的生长速度最快, 其次依次为伏秋青芦蒿、白芦蒿、红芦蒿。

《植物志》上关于蒿属芦蒿种的描述记载, 但 4 份芦蒿材料之间又存在形态上的差异, 需要进一步通过生化标记进行鉴定。

(2) 试验结果表明, 4 份芦蒿材料的同工酶谱差异显著, 过氧化物酶同工酶存在 12 条共同谱带, 酯酶同工酶谱存在 6 条共同谱带, 分别占总位点数的 92.3% 和 50.0%,

(下转第 570 页)

抗原结合,形成抗原抗体复合物,在磁力的作用下,使特异性抗原与其他物质分离,克服了放免和酶联免疫测定方法的缺点。**Mahbubam^[13]**采用免疫磁珠技术先从污水中分离贾第鞭毛虫包裹 DNA,再释放 DNA,然后用 PCR 扩增技术检测,结果灵敏度为 3 或 30 包裹/ml,而直接从污水中提取贾第鞭毛虫进行 PCR 扩增检测失败。

2.4 免疫荧光标记 免疫荧光标记即用荧光素标记已知抗原(或抗体),与特异抗体(或抗原)结合后产生荧光。**孙洋^[14]**等人利用吖啶橙标记免疫血清,用吖啶橙免疫荧光菌团培养法检测沙门氏菌,结果表明,该检测方法对于 34 个菌/ml 的沙门氏菌均可检出,与枯草杆菌、大肠埃希氏杆菌等 8 种杂菌均不形成菌团交叉,与杂菌的浓度比在 1:640 之内均不受干扰,在 30 h 内即可获得结果,而且具有敏感性高、特异性强、简便快速等优点^[14]。

3 细胞和分子生物学技术

3.1 噬菌体裂解试验 噬菌体对细菌有特殊的裂解作用。**张碧波**等人在应用噬菌体快速检测沙门氏菌时,对 100 个肠杆菌菌株进行噬菌体裂解试验,结果表明,30 株沙门氏菌全部为阳性,而其余非沙门氏菌全部为阴性,与前人的研究结果一致。

3.2 核酸探针 目前,检测沙门氏菌的探针属特异性沙门氏菌,已从鼠伤寒沙门氏菌 E23566 菌株染色体 DNA 克隆成功,并用于检测食品中沙门氏菌的存在。20 世纪 80 年代中期发展起来的以放射性同位素标记的核糖体核糖核酸(rRNA)探针,用 rRNA 为靶序列来探测特异性微生物的存在,为细菌的分类提供了一种全新的方法^[14]。

4 结语

近年来,人们一直致力于研究沙门氏菌的检测方法,但传统的检测方法,既消耗人力物力,又浪费时间,食品在上市前是否受到沙门氏菌的污染不能得到很好的检测。因此,近年来,科研工作者们一直在探索沙门氏菌的快速检测方

法,加快食品上市前的检测速度。随着分子生物学技术和免疫学技术的迅速发展,涌现出许多快速检测方法,其缩短了检测时间,提高了对致病菌的检测效率,也明显提高了检测方法的特异性和灵敏度。有关部门和食品企业应在此基础上对沙门氏菌的检测技术进行更深入的研究,研制出更快、更有效的检测方法,以保证食品的安全性和消费者的身体健康^[6]。

参考文献

- [1] 彭丽萍,陈博文.食品沙门氏菌检测方法进展[J].中国人兽共患病杂志,1999,15(5):89-91.
- [2] 顾援农,王伟浩.PCR 技术的新进展[J].卫生职业教育,2003,21(11):122-125.
- [3] 欧阳松应,杨冬.实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J].生命的化学,2004,24(1):74-76.
- [4] HEID C A,STEVENS J,LIVAK J K,et al.Real time quantitative PCR[J].Genome Res,1996,6:986-994.
- [5] 王宁.定量 PCR 技术研究进展[J].国外医学-临床生物化学与检验学分册,2000,21(6):314-316.
- [6] 闫冰,李一松.食品中单核细胞增多李斯特菌的快速检测[J].食品工业科技,2006(10):202-205.
- [7] 殷月兰.单抗竞争 ELISA 检测猪沙门氏菌感染方法的建立与应用[J].中国预防兽医学报,2003,25(1):68-71,79.
- [8] 陈沁,李健.进口动物性饲料中沙门氏菌的分离鉴定[J].中国动物检疫,2002,19(1):24-25.
- [9] 刘永德,汪毅.兔出血症三种快速诊断法比较研究[J].畜牧兽医学报,1992,23(4):361-365.
- [10] 雷风,韩志辉.应用斑点酶联免疫吸附试验快速检测饲料中的沙门氏菌[J].中国奶牛,2005(5):9-11.
- [11] 王中民,李君文.胶体金免疫层析法快速检测沙门氏菌[J].微生物学免疫学进展,2004,32(4):36-38.
- [12] 陆东东.免疫磁珠技术的应用研究[J].陕西医学检验,1999,14(2):59-60.
- [13] 张宏伟,郑玉梅.免疫磁珠性质及其应用[J].国外医学免疫学分册,2000,23(1):5-8.
- [14] 孙洋,王云翔,柳增善.吖啶橙免疫荧光菌团培养法对沙门氏菌的快速检测[J].吉林畜牧兽医,1994(6):14-16.
- [15] 张艳红,吴延功.沙门氏菌快速检测方法研究进展[J].动物医学进展,2001,22(2):39-41,48.
- [16] 张华.动物性产品中沙门氏菌的危害及控制措施[J].中国动物保健,2004(6):8-10.

(上接第 502 页)

从酶蛋白水平上证实了材料间的同种相似性,4 份材料都属于芦蒿种;同时 4 份材料的两种酶谱又都存在显著差异,过氧化物酶同工酶存在两种带型,酯酶同工酶酶谱存在 4 种带型,说明它们存在遗传基础上的差异,结合两种酶可以将芦蒿 4 份种质区分开。

(3) 同工酶分析结果显示,4 份材料存在遗传上的差异,与形态上的表型差异一致,结合 3 种研究方法将 4 份材料划分为 4 个不同的类型。从 4 种类型芦蒿的形态特征上来看,红芦蒿与伏秋青芦蒿叶型较为接近,叶片多为羽状 5 裂,较肥厚。而白芦蒿和冬春青芦蒿的叶型和地上茎秆颜色都很相似,叶片多狭细,顶端尖,地上茎均为深绿色;伏秋青芦蒿、冬春青芦蒿和白芦蒿的地上茎都为绿色,只是绿色的深浅程度有差别,而红芦蒿的地上茎为紫红色。这从外部形态上进一步证明了它们的亲缘关系。

(4) 综合两种同工酶酶谱,比较 4 种类型酶带数目,推

测出冬春青芦蒿的适应能力最强,其次为伏秋青芦蒿。田间调查发现,在相同生长环境中伏秋青芦蒿和冬春青芦蒿的生长势较红芦蒿和白芦蒿旺盛,与推论一致。综合酶谱信息、田间调查资料,笔者认为在芦蒿育种中伏秋青芦蒿和冬春青芦蒿是具有较高潜在利用价值的种质资源,可以通过进一步深入研究,解决生产上存在的问题。

参考文献

- [1] 管建国,宋佩扬.菱蒿的生物学特性及栽培中的几个问题[J].南京农专学报,1996(3):27-30.
- [2] 石丽敏,陈劲枫.南京八大野菜[J].中国蔬菜,2006(5):35-39
- [3] 李双梅,郭宏波,黄新芳,等.菱蒿 DNA 提取、RAPD 优化及引物筛选初报[J].中国农学通报,2006,22(4):78-80.
- [4] 何忠效,张树政.电泳[M].北京:科学出版社,1999:284-298.
- [5] WEN C S,HSIAO J Y.Genetic differentiation of Liliun longiflorum Yhnb.var.scabrum Masam.(Liliaceae) in Taiwan using random amplified polymorphic DNA and morphological characters [J]. Bot Bull Acad Sin,1999,40:65-71.