

利用同工酶鉴别山楂野生种 亲缘演化关系研究

张茂君

(吉林省农科院果树研究所·公主岭市)

摘要 用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对11个野生种山楂进行多种酶的分析测定。结果表明,用过氧化物酶和细胞色素氧化酶均能将供试的野生山楂鉴别开来。抗坏血酸氧化酶和超氧化物歧化酶不同,野生种山楂酶谱表现也不同。由同工酶资料计算所得的野生种间蛋白质相似系数也在一定程度上反映了野生种间的亲缘演化关系。

前 言

同工酶是基因表达的直接产物,基因水平上的差异,可由同工酶谱上的差异表现出来,所以同工酶被广泛用于生物间遗传变异和亲缘演化关系方面的研究。有关山楂起源和亲缘演化关系,人们已从细胞学等不同角度进行过分析。分子水平研究也有过报道。张育明等研究同工酶时指出,在合适时期利用过氧化物酶谱分析,对山楂进行遗传和分类方面的研究是有益的。但研究中所涉及到酶种类较少,难以准确说明分类和起源问题。本实验通过对收集到的11个野生种山楂进行多种同工酶分析,了解不同野生种的多种同工酶谱特征和探讨野生种山楂亲缘关系,为今后深入研究山楂品种起源和鉴定创造条件。

材料与方法

一、材料:于9月上旬取供试野生种山楂当年生枝条中部成熟叶子10片。

二、方法:①酶液提取:称取2克鲜叶,加Tris—柠檬酸(PH=7)和甘油3:1的混合液8ml,在冰浴中研磨,在0℃,8000r·pm下离心10分钟,上清液存于4℃下备用。②电泳:聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用Tris—HCl缓冲液系统。分离胶浓度7.5%,浓缩胶浓度10%,电泳时间9小时左右,电压5V/cm,进样量20μl。③染色:过氧化物酶采用醋酸联苯胺方法;细胞色素氧化酶、酯酶、酸性及碱性磷酸酯酶、苹果酸脱氢酶、过氧化氢酶、亮氨酸氨基肽酶的染色方法均采用胡能书、万国贤合编《同工酶技术及其应用》一书介绍的方法;多酚氧化

酶、磷酸化酶、淀粉酶、焦磷酸化酶染色方法均采用《ISOZYMES》一书中介绍的方法;抗坏血酸氧化酶采用张维强介绍的方法;超氧化物歧化酶采用《植物生理学通讯》中的一文介绍的方法。凝胶染色后水洗,记录照相。

结果与分析

一、山楂的几种同工酶比较 14种同工酶分析结果表明,不同类型的酶类电泳结果明显不同。具体可以分为三类:第一类没有表现活性,包括酯酶类和脱氧酶类,以及亮氨酸胺酶,磷酸化酶,焦磷酸化酶,淀粉酶,过氧化氢酶。第二类表现出活性,但酶带数很少,如多酚氧化酶和超氧化物歧化酶。这两种酶带数都少,酶谱表现却不相同。前者在试材中除甘肃山楂外,其余供试的野生种酶谱特征均相同,而后者可组成多种谱型,所以超氧化物歧化酶可以被利用。第三类表现出酶活性,带数较多。如氧化酶的过氧化物酶,细胞色素氧化酶和抗坏血酸氧化酶同工酶。这类酶中,酶带清晰,效果也很稳定,几次重复的结果均相同。以上结果说明,山楂属植物宜采用氧化酶类同工酶进行分析研究。

从这几种氧化酶类同工酶酶谱特征来看(见图1、图2、图3)均可分为慢(S)、中(I)、和快带(F)三区。S区酶带色较浅,但变化较复杂,可能是影响到种、品种分化和性状差异的因素。I区色深,除超氧化物歧化酶外,均有两条清晰稳定的酶带为研究试材共有。可能是山楂属基本遗传结构在这种酶类上的反映。

二、山楂属种间同工酶谱型比较 山楂属11个野生种四种同工酶结果(见图1~图4)。其中每个谱图左侧的酶谱是山楂属植物在该种酶上具有的酶带总数,本文称其为“基本图谱”。图谱从上至下表示酶带迁移率从

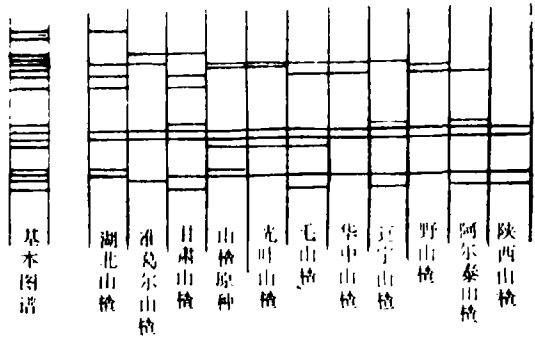


图1 山楂野生种叶片过氧化物同工酶谱

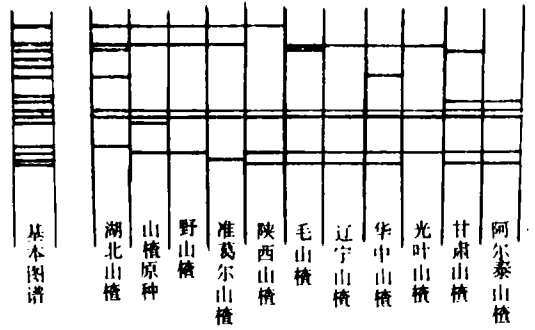


图2 山楂野生种叶片细胞色素氧化酶谱

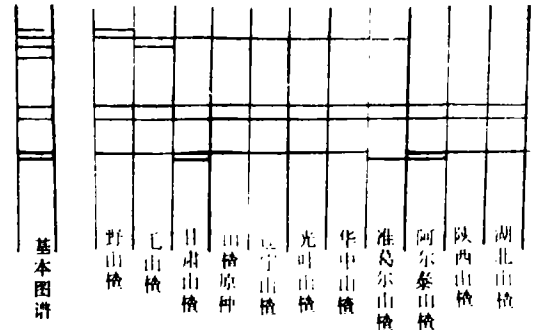


图3 山楂野生种叶片抗坏血酸氧化酶谱

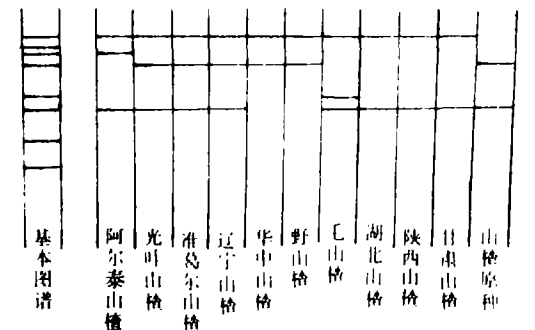


图4 山楂野生种叶片超氧化物歧化酶谱

注1 品种四种酶的同工酶谱未发表

慢到快。

从上述谱图中我们可以看出,基本图谱上有一些酶带野生种山楂都不含,即品种特有的酶带,如过氧化物酶的 S_2 和 S_4 酶带。细胞色素氧化酶的 S_4 、 S_5 、 S_7 酶带等。说明这些品种类型形成过程中在控制该种酶的基因位点发生了类似突变性质的变异。

收集到山楂属11个野生种间酶谱差异显著尤其是过氧化物酶和细胞色素氧化酶,各野生种谱型均不相同,说明这几种酶类都可作为研究野生种山楂分类、鉴别和亲缘演化关系的指标。

陕西山楂和湖北山楂,辽宁山楂和光叶山楂,它们的抗坏血酸氧化酶、超氧化物歧化酶从酶带数和酶带迁移率上都相同,进一步证实湖北山楂、陕西山楂、辽宁山楂和光叶山楂的亲缘关系较近,为近缘种。

前人曾将光叶山楂定为辽宁山楂的变种。后来 Keehae ex schneid (1906) 将光叶山楂定为独立种。本实验表明,两者的过氧化物酶差异显著。其差异不仅在S区,而且在I区和F区。但是,山楂品种间过氧化物酶差异主要在S区。辽宁山楂谱型为 S_5 、 I_9 、 I_{10} 、 F_{14} 、 F_{16} 。光叶山楂谱型为 S_5 、 S_6 、 I_{10} 、 I_{11} 、 I_{12} 、 F_{14} 。这就将为两者定成两个独立种又进一步提供证据。

以上分析,反过来也证明,亲缘关系较近的种同工酶谱特征也相近。

讨论和小结

由于同工酶是基因的直接产物,所以酶谱的近似程度能在一定程度上反映野生种间的亲缘关系。据此计算11个野生种间蛋白质相似系数。在此基础上利用“类平均法”进行了聚类分析,结果见图5。

从聚类图中可以看出,分类的结果基本上反映了野生种间的亲缘关系。在不同的蛋白质相似系数的水平下,可以将供试的野生

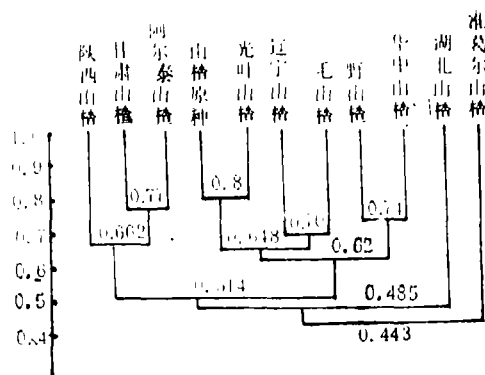


图5 山楂野生种间蛋白质相似系数类平均法分类图谱

种按亲缘关系划分成不同的类群。在蛋白质相似系数水平为0.7时,可分为7类。其中山楂原种和光叶山楂,辽宁山楂以及毛山楂,甘肃山楂和阿尔泰山楂,野山楂和华中山楂分别聚成几类。同类野生种间蛋白质相似系数很高,可能亲缘关系也较近。在0.63水平时,分为5类。其中辽宁山楂和毛山楂划到山楂原种类群中,陕西山楂划到甘肃山楂类群中。以上两个水平,湖北山楂和准葛尔山楂各自成为一类。说明这两个野生种与山楂原种亲缘关系较远。以上分类结果同野生种地理分布有关。地理分布相同,有交叉或相近的野生种被分到同一类群。

从同工酶进化理论看,随着生物进化,同工酶数也在增加,也就是说在种系发育过程中,总趋势是同工酶带数越多越进化。本实验中野生种山楂四种同工酶谱表明,原种山楂和辽宁山楂在过氧化物酶和细胞色素氧化酶的酶带都比光叶山楂酶带多,毛山楂的上述两种酶以及抗坏血酸氧化酶都比辽宁山楂多一条酶带,说明在这类群中光叶山楂可能是较原始类型,山楂原种和辽宁山楂次之,毛山楂是较进化的类型。同样甘肃山楂在过氧化物酶和细胞色素氧化酶带数也比阿尔泰山楂多,说明甘肃山楂较阿尔泰山楂进化。

以上关于山楂野生种亲缘演化关系论述,仅凭同工酶结果得出的,可供人们参考。(参考文献略收稿时间1990年8月29日)