水菜二种同工酶指纹图谱及分类研究

任吉君,周 荣,王 艳,何丽烂,李芳艳

(广东佛山科学技术学院园艺系,528231)

摘要:同工酶酶谱分析和聚类分析表明,水菜属于芸薹种,可将水菜作为亚种,京水菜和壬生菜作为水菜亚种下的变种处理。PPO 同工酶用于芸薹属种间的分类鉴定优于 POD 同工酶。叶 PPO 同工酶 E'4 为水菜的特异酶带。

关键词:水菜;同工酶;指纹图谱;聚类分析

中图分类号:S645 文献标识码:B 文章编号:1001-0009(2006)04-0027-03

水菜类中的千筋京水菜、丸叶壬生菜是近些年从日本新引进的特菜。由于各地对京水菜、壬生菜的称呼都有所不同,给生产和学术交流带来极大的不便;同时,学术界对水菜的分类也存有争议[1,2,3],为此,作者采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法,利用这二种特菜及其近缘种的幼根和幼叶对过氧化物酶(POD)同工酶、多酚氧化酶(PPO)同工酶进行了分离,拟通过酶谱分析和聚类分析,以确定京水菜、壬生菜在芸薹属栽培种中的分类地位。

同工酶作为"生化指纹"已广泛应用于蔬菜分类等领域的研究[4]。但已往芸薹属种间亲缘关系的鉴定所使用的同工酶多为酶谱较复杂的 POD 同工酶[5],在国内尚未见到对 PPO 同工酶的研究报道,现试图借助二种同工酶的比较,进而找出利于芸薹属蔬菜分类的同工酶。

1 材料与方法

1.1 试验材料

A 丰抗 60 大白菜;B 矮脚黑叶白菜;C 矮脚大头清江白菜;D 南丰 45 天油青菜心;E 东莞白沙 80 天油青菜心;F 白茎千筋京水菜;G 日本丸叶壬生菜;H 雪里蕻;I 大坪埔大肉包心芥菜;J 千宝菜;K 早红紫甘蓝;L 紫花菜;M 天津绿苤蓝。材料由本校和北京特菜中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 育苗 将正常的种子播于盛有约 6cm 珍珠岩的育苗盘中。出苗后浇 0.5 倍的日本园试配方营养液[1]。至 2 叶 1 心时,取洗净的嫩根、幼叶,用于酶液提取。

1.2.2 酶液制备 称取 0.5g 根或叶置于预冷的研钵(4℃)中,加入少量预冷(4℃)0.05mol/L,pH8 的磷酸缓冲液(Tris-HCl),研磨,匀浆并定容至 6ml,于 13 000r/min 下离心 10min,吸取上清液,加入 1/4 体积的 20%甘油,摇匀作酶液,于-20℃冰箱保存备用。

1.2.3 电泳及染色 酶液量根 20μl,叶 40μl。POD、PPO 同工酶分离参照胡能书等人的方法[6],染色参照薛俊杰等人的方法[7]。计算 Rf 值,即蛋白质带的迁移距离与溴酚兰迁移距离之比。

1.3 统计分析

利用 DPS5.0 统计软件计算欧氏遗传距离,采用类平均法(UPGMA)构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 不同品种 POD 酶谱特征

2.1.1 根 POD 同工酶谱 13 个品种的根共分离出 10 条 POD 酶带,见图 1 和表 1。酶带依次命名为 e1~e10,则 e2 为各品种根共有的特征酶带。e2、e5、e6、e8 分离清晰,活性高。从根 POD 酶带分布看,京水菜 F 和壬生菜 G 共有酶带为 e1、e2、e3、e9 共 4 条酶带,大白菜 A、小白菜 B 和 C、菜心 D 和 E 的共有酶带是 e2、e3、e9,可见京水菜 F、壬生菜 G 与大白菜、小白菜、菜心亲缘关系接近;而千宝菜 J 的酶带为 e1、e2、e3、e8,紫甘蓝 K、紫花菜 L 和绿苤蓝 M 的共有酶带是 e1、e2、e8,可见千宝菜 J 与甘蓝的亲缘关系更为接近。利用根 POD 聚类结果见图 3,取欧氏距离 d=1.64,可将供试品种分成 3 大类。第 1 类:在 d=1.28 水平上品种 A、B、C、D、E、F、G 聚为一类,含大白菜、小白菜、菜心、京水菜、壬生菜,其中京水菜 F、壬生菜 G 与菜心 D、E 亲缘关系最近,d=0;大白菜 A 与小白菜 B 亲缘关系最近,d=0。第 2 类:在 d=1.41 水平上 H、I 聚为一类,含包心芥和分蘖芥。第 3 类:在 d=1.63 水平上 J、K、L、M 聚为一类,含千宝菜、紫甘蓝、紫花菜、绿苤蓝,其中紫花菜 L 与绿苤蓝 M 亲缘关系较近,d=1。从图 3 还可以看出,三类蔬菜中第 1 类与第 2 类亲缘关系较近,二者与第 3 类蔬菜亲缘关系较远。

表 1 不同品种根 POD 同工酶带

酶带	Rf	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
e1	0.139	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e2	0.190	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e3	0.241	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
e4	0.253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
e5	0.304	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
e6	0.342	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
e7	0.424	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
e8	0.430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
e9	0.450	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
e10	0.470	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

注:"+"表示酶带出现,"-"表示酶带不出现。

*基金项目:广东省农业重大攻关项目(2003B21210),佛山市科技发展专项基金(04020011)

收稿日期:2006-02-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

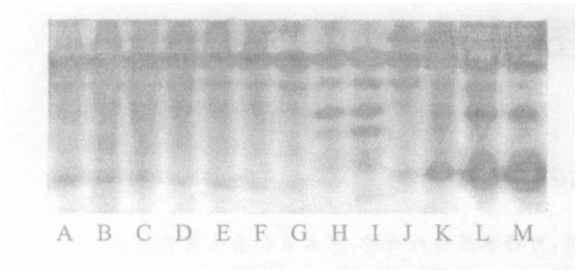

图 1　根 POD 同工酶电泳图

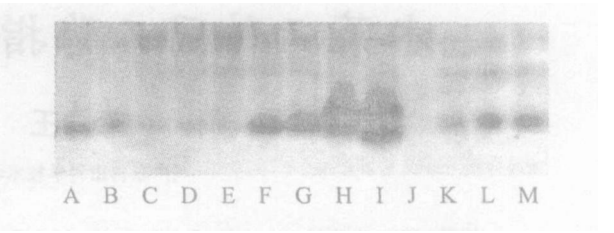

图 2　叶 POD 同工酶电泳图

2.1.2　叶 POD 同工酶谱　13 个品种叶片共分离出 7 条酶带，酶带依次命名为 e' 1~e' 7，其中 e' 5、e' 6、e' 7 分离清晰，活性高，见图 2 表 2。其中京水菜、壬生菜与芥菜类、甘蓝类的 e' 6 酶活性高，而千宝菜 J 的同工酶活性低。叶 POD 同工酶聚类结果指出，京水菜、壬生菜、大白菜、小白菜、菜心与甘蓝类的紫花菜、绿苤蓝在 d= 1 水平上聚为一类，见图 4。特别是小白菜 C、京水菜 F、壬生菜 G 与紫花菜 L、绿苤蓝 M 在 d= 0 水平上聚为一类，显然，不同种类蔬菜之间聚类产生了交叉，由此可见，利用叶 POD 同工酶进行聚类分析是难以得到正确结论的。

表 2　不同品种根 POD 同工酶带

酶带	Rf	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
e'1	0.100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e'2	0.114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
e'3	0.169	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
e'4	0.190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
e'5	0.238	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
e'6	0.263	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
e'7	0.278	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

注：同表 1。

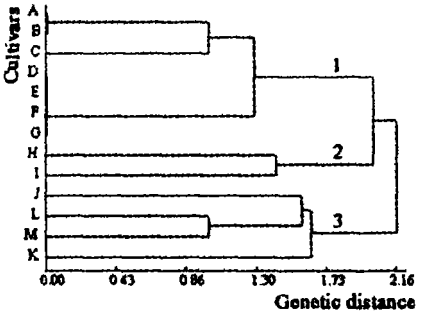

图 3　根 POD 同工酶聚类图

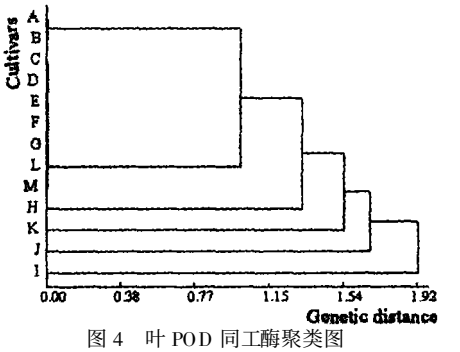

图 4　叶 POD 同工酶聚类图

2.2　不同品种 PPO 酶谱特征

2.2.1　根 PPO 同工酶电泳图谱　供试材料的根共分离出 6 条 PPO 同工酶带，见图 5 表 3。酶带依次命名为 E1~E6，则活性较强的 E2 为各个品种所共有。从酶带分布上看，京水菜 F、壬生菜 G、千宝菜 J 与白菜类的 A、B、C、D、E 更为相似，共有酶带为 E2、E3；京水菜、壬生菜不具有 E4、E5、E6 同工酶带，因此，与甘蓝类的 K、L、M 和芥菜类的 H、I 有着显著的差异。根 PPO 聚类结果如图 7 所示。取 d= 1.02，可将供试品种分成 3 类。第 1 类含京水菜 F、壬生菜 G、千宝菜 J 和白菜类的 A、B、C、D、E，它们在 d= 1.0 水平上聚为一类，其中菜心 E、壬生菜 G、千宝菜 J 亲缘关系最近 d= 0。第 2 类为芥菜类的 H、I，二者遗传距离 d= 0；第 3 类为甘蓝类的 K、L、M，这 3 个品种的遗传距离 d= 0。

表 3　不同品种根 PPO 同工酶带

酶带	Rf	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
E1	0.133	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
E2	0.196	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E3	0.248	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E4	0.320	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
E5	0.360	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
E6	0.451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

注：同表 1。

2.2.2　叶 PPO 同工酶电泳图谱　13 个品种的叶共分离出 5 条 PPO 同工酶带，见图 6 和表 4。酶带依次命名为 E' 1~E' 5，则 E' 2 为各品种所共有。

京水菜 F、壬生菜 G 与白菜类的 B、C、D、E 一样，具有拖尾的 E' 2，与白菜类 B、C、D、E 不同的是京水菜、壬生菜还具有活性稍弱的 E' 4，此点则又与芥菜类的 H 相似。千宝菜 J 与甘蓝类 K、L、M 一样，共有活性较强的 E' 1、E' 2。叶 PPO 聚类结果如图 8。水菜类的京水菜 F 与壬生菜 G 的亲缘关系最近(d= 0)，白菜类的 A、B、C、D、E 亲缘关系最近(d= 0)。在 d= 1.00 水平上京水菜、壬生菜、大白菜、小白菜、菜心聚为一类，此类蔬菜在 d= 1.12 水平上同甘蓝类的 K、L、M 和千宝菜 J 聚为一类。在 d= 1.52 水平上再与芥菜类 H、I 聚为一类。至此可以发现千宝菜 J 的酶谱表现具有双重性，这是因为千宝菜是甘蓝与小白菜的杂交种。可见对于远缘杂交种而言利用同工酶进行聚类分析尚需进一步探讨。

表 4　不同品种根 PPO 同工酶带

酶带	Rf	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
E' 1	0.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E' 2	0.212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E' 3	0.494	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
E' 4	0.537	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
E' 5	0.562	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

注：同表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

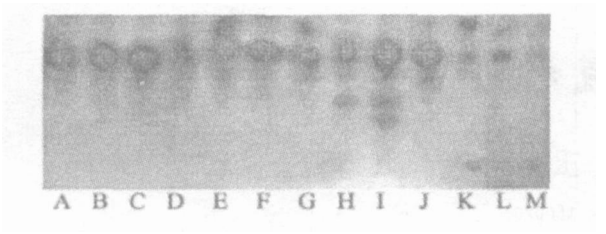

图 5 根 PPO 同工酶电泳图

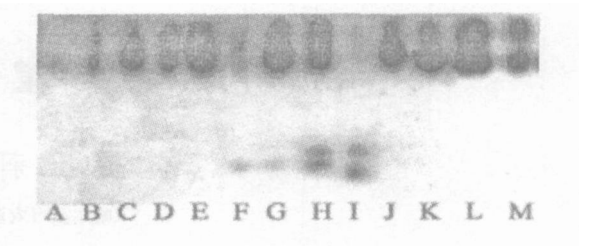

图 6 叶 PPO 同工酶电泳图

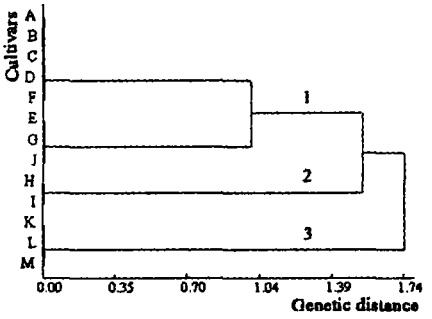

图 7 根 PPO 同工酶聚类图

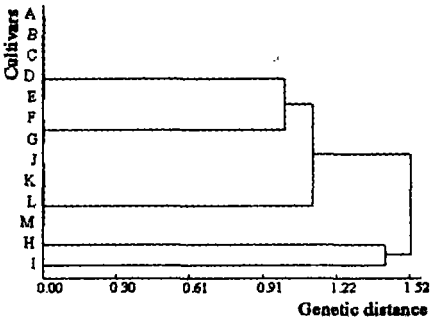

图 8 叶 PPO 同工酶聚类图

3 讨论

根 POD、PPO 同工酶和叶 PPO 同工酶指纹图谱及聚类分析表明:水菜中京水菜(2n=2x=20)、壬生菜(2n=2x=20)[1]的 POD、PPO 同工酶与芸薹(Brassica campestris L., 2n=2x=20, AA)种下的大白菜、小白菜、菜心的 POD、PPO 同工酶极为相近,遗传距离近,相似度高,而与甘蓝(B. oleraceaL., 2n=2x=18, CC)类、芥菜(B. junceaCoss., 2n=4x=36, AABB)类的 POD、PPO 同工酶谱相去较远,遗传距离远,相似度低,因此,宜将京水菜、壬生菜归为芸薹种。然而,京水菜和壬生菜叶 PPO 同工酶与大白菜、小白菜、菜心叶 PPO 同工酶谱又存有一定的差异,因此,建议将水菜列为芸薹种水菜亚种(B. campestrisssp. japonica (Bailey) Hort.)。本试验结果支持曹家树等(1994)提出的将日本水菜作为芸薹种下亚种[2]的这个处理建议。不宜将京水菜、壬生菜称为银丝芥、金丝芥,否则容易引起误解,更不能将京水菜学名误写为B. juncea var. multisecta(叶用芥菜)[8]。由于水菜类中的京水菜和壬生菜在形态上和生化指标上有一定的差异,因此,建议将京水菜和壬生菜分别作为水菜亚种不同变种处理。

叶 POD 同工酶聚类分析将已知的白菜类、甘蓝类和芥菜类蔬菜交叉聚类到一起,显然,结果是错误的,因此,不能利用叶 POD 同工酶对芸薹属进行正确分类。

与 POD 同工酶相比,根和叶 PPO 同工酶具有酶谱简单、清晰、特异性强、容易辨析等优势,更适合进行芸薹属种间的分类研究。对于水菜而言,可利用水菜叶中 PPO 同工酶专一的 E'4 进行鉴定。

参考文献:

[1] 野菜園芸大事典编辑委员会. 野菜園芸大事典[M]. 东京:養賢堂株式会社. 1977:1229-1232.

[2] Mas Yamaguchi. World Vegetables[M]. Connecticut: AVI Publishing Company. 1983:218-219.

[3] 曹家树,曹寿椿. 中国白菜与同属其它类群种皮形态的比较和分类[J]. 浙江农业大学学报, 1994, 20(4):393-399.

[4] 刘华,贾继增. 指纹图谱在作物品种鉴定中的应用[J]. 作物品种资源, 1997,(2):45-48.

[5] 张彦萍,刘海河,马德伟. 蔬菜同工酶研究现状及存在问题[J]. 中国蔬菜, 1997,(3):46-50.

[6] 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, 1985:171-180.

[7] 薛俊杰,张震云,弓春瑞,等. 几种木本豆科植物过氧化物酶和多酚氧化酶同工酶研究[J]. 山西农业大学学报, 2000, 20(1):55-58.

[8] 周伟华,黄邦海,吴云鹞,等. 6 个珍稀蔬菜品种介绍[J]. 广东农业科学, 2003,(4):53-55

Study on Fingerprint of Two Isozymes in Water Cabbage and Classification

REN Ji-jun, ZHOU Rong, WANG Yan, HE Li-lan, LI Fang-yan
(Department of Horticulture, Feshan University, Foshan 528231, China)

Abstract: Peroxidase (POD) isozyme and polyphenol oxidase (PPO) isozyme of water cabbage were studied and cluster analysis was made by UPGMA. The results showed that water cabbage were Brassica campestrisL. subspecies, Jingshuicai and Renshengcai were variety ofB. campestrisL. ssp. japonica. PPO isozyme fingerprint on identifying species of Brassica was better than POD isozyme fingerprint. E'4 of the PPO isozyme in leaf was diagnostic fingerprint of water cabbage.

Key words: Water cabbage; Isozyme; Fingerprint; Cluster analysis

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net