

罗布麻种质的过氧化物酶及酯酶同工酶研究

任晓月¹, 陈彦云^{1,2}

(1. 宁夏大学 西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳技术, 对不同地区罗布麻过氧化物酶和酯酶同工酶谱进行分析。结果表明: 过氧化物酶具有 2~5 条不等的酶带, Rf 值在 0.547~0.882 之间; 酯酶具有 3~5 条不等的酶带, Rf 值范围在 0.1769~0.5918 之间; 过氧化物酶和酯酶的酶带数、酶带迁移率和酶活性可反映不同地区罗布麻种群间和种群内存在很大的遗传差异; DPS 聚类分析结果表明: 新疆红麻与内蒙红麻亲缘关系最近, 宁夏红麻与河北红麻亲缘关系较近, 青海白麻与内蒙古、新疆、宁夏和河北地区的亲缘关系最远。

关键词: 罗布麻; 过氧化物同工酶; 酯酶同工酶; 亲缘关系

中图分类号: S 563.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0134-04

罗布麻 (*Apocynum venetum* Linn.) 是夹竹桃科 (Apocynaceae) 罗布麻属 (*Apocynum* L.) 多年生宿根草本植物。其分布区由东到西, 大致在长江、淮河、秦岭和昆仑以北的广大区域, 在新疆及河西走廊西部分布的多为白麻, 在河西走廊东部及以东地区则以红麻为多^[1]。罗布麻叶片栅栏组织发达, 表皮含有一层角质层, 具有适应荒漠气候的形态结构; 具粗壮的深根系, 有利于穿过强盐化的表土重盐层; 茎基部木质化, 皮层厚, 能抵抗酷暑和严寒, 是一种耐旱、耐盐碱、耐严寒酷暑、抗风力强的野生优良水土保持植物^[2]。目前已有许多省已开始引种栽培罗布麻, 利用其耐盐碱、抗风沙的生物学特性改良盐碱地、防风固沙, 发挥其生态价值作用。但对

于引种栽培罗布麻对当地的生态适应性、亲缘关系远近、能否人工栽培还未见报道。

同工酶是基因表达的直接产物, 其活性的变化与植物的生长、发育和分化有关, 可作为探讨植物起源、演化、分类及亲缘关系的生理生化指标^[3]。过氧化物酶和酯酶是同工酶技术中研究最多的酶类, 普遍存在于各种植物组织中, 易于提取和分离, 并且具有较好的稳定性。因此, 该试验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对不同地区罗布麻的过氧化物酶和酯酶进行研究, 通过聚类分析, 探讨不同地区罗布麻亲缘关系远近, 为罗布麻种质资源保存、优良种的选育及引种栽培提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自宁夏贺兰县金山林场引种栽培的不同地区罗布麻植株, 分别为宁夏红麻、新疆红麻、内蒙红麻、河北红麻、青海白麻和美国罗布麻。

1.2 试验方法

1.2.1 酶液提取 称取新鲜叶片 2 g, 置于预冷的研钵中, 加入样品提取液 (0.1 M pH 7.3 Tris-HCl : 蔗糖 =

第一作者简介: 任晓月 (1986-), 女, 宁夏中卫人, 在读硕士, 研究方向为植物生态学。E-mail: rxy_2008@126.com。

通讯作者: 陈彦云 (1965-), 男, 宁夏平罗人, 本科, 研究员, 现从事植物资源教学及科研工作。E-mail: nxchenyy@163.com。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ0807)。

收稿日期: 2010-10-18

Abstract: Based on investigation on fixed plants and phases of seven evergreen species of Fagaceae, the phenophase and development periods were obtained to provide evidence for the extension of evergreen species of Fagaceae in Jiangsu areas. The results showed that six of the seven well-grown evergreen species of Fagaceae blossomed and bore fruit normally, and the fruit setting of *Lithocarpus harlandii* was not found. The phenophase of four genus in Fagaceae were different. Generally, the florescence of the genus *Cyclobalanopsis* and *Castanopsis* was 11.5 d and 15 d relatively, shorter than the other two genus. The fruit of *Lithocarpus* ripen next year, and the average florescence of *Lithocarpus glabra* and *Lithocarpus litseifolius* was 36 d, which was the longest of four genus. The florescence of *Quercus phillyraeoides* occurred early, from April, and lasted 18 d. In addition, there was significant difference among the different phenophase of three species belong to the genus *Lithocarpus*.

Key words: Fagaceae; evergreen species; *Cyclobalanopsis*; *Lithocarpus*; *Quercus*; *Castanopsis*; phenophase

1 : 1)4 mL, 加少量石英砂研磨成匀浆, 5 000 r/min 离心 15 min, 取其上清液, 贮于 0~4℃冰箱中备用。

1.2.2 电泳 采用双面垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 2 种同工酶分离胶浓度均为 7.0%, 浓缩胶浓度均为 5.0%。每个点样孔均加样 25 μL, 用 0.1%的溴酚蓝作为前沿指示剂, 用 pH 8.3 的 Tris-Gly 作为电极缓冲液。先在 20 mA, 100 V 的条件下电泳 1.5 h, 然后调至 30 mA, 150 V 电泳, 待指示剂距玻璃板末端 2 cm 处, 停止电泳。

1.2.3 染色 POD 同工酶采用抗坏血酸—联苯胺法^[4] (70.4 g 抗坏血酸+20 mL 联苯胺贮存液+20 mL 0.6% H₂O₂+60 mL H₂O)染色, 在常温下染色 5 min, 用水冲洗后照相, 最后用 3%的醋酸固定。EST 同工酶采用醋酸萘酯—坚牢蓝 RR 盐法^[4] (α-醋酸萘酯 200 mg, β-醋酸萘酯 200 mg, 坚牢蓝 RR 盐 100 mg+10 mL 丙酮+20 mL 0.1 M pH 7.5 的磷酸缓冲液)染色, 37℃下保温 30 min, 用水冲洗后照相, 最后用 7%的醋酸固定。

1.3 数据统计及聚类分析

根据 POD 和 EST 同工酶的酶带分布, 计算各酶带的相对迁移率 *Rf* 值和相似系数 *S*; 根据 POD 和 EST 同工酶酶带的 *Rf* 值绘制各自的酶带模式图; 然后用 DPS v7.05 统计软件进行聚类分析。酶带相对迁移率(*Rf*)=酶带迁移距离/溴酚兰迁移距离; 相似系数(*S*)=相同酶带数/(相同酶带数+不同酶带数)。

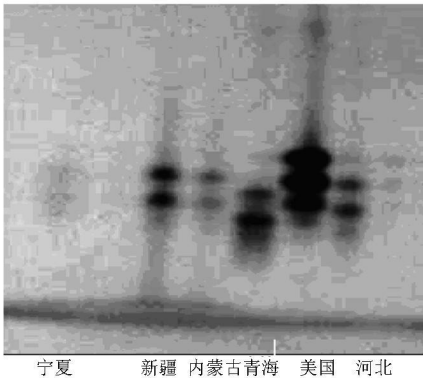


图 1 不同地区罗布麻过氧化物酶同工酶电泳图

表 1 不同地区罗布麻过氧化物酶同工酶酶带相对迁移率 (*Rf*)

酶带号	宁夏	新疆	内蒙	青海	美国	河北
1					0.547	
2					0.740	
3	0.779	0.774	0.774		0.780	0.779
4	0.801			0.801		
5		0.812	0.812	0.812	0.812	
6	0.820					0.820
7				0.842	0.842	
8						0.860
9				0.865		
10				0.882		

2 结果与分析

2.1 过氧化物同工酶酶谱分析

不同地区罗布麻过氧化物同工酶酶谱具有一定差异, 主要表现在酶带数、酶带迁移率和酶活性强弱上。由图 1、2 及表 1 可知, 6 个不同地区罗布麻过氧化物同工酶共显示 10 条酶带, 酶带数在 2~5 之间, 青海白麻和美国白麻各有 5 条酶带, 宁夏红麻和河北红麻各有 3 条酶带, 新疆红麻和内蒙红麻各有 2 条酶带。各地区的酶带迁移率具有一定的异同, 其变化范围在 0.547~0.882 之间; 新疆红麻和内蒙红麻具有相同的 2 条酶带数, 相对迁移率为 0.774 和 0.812, 但新疆红麻酶带颜色较内蒙红麻的深, 说明新疆红麻酶活性较内蒙红麻的高。青海白麻和美国白麻具有 2 条相同的酶带数, 相对迁移率为 0.812 和 0.842, *Rf* 值为 0.812 的美国白麻酶带颜色较青海白麻深, 说明美国白麻酶活性较青海白麻高, *Rf* 值为 0.740、0.780 的美国白麻酶活性均高于青海白麻。宁夏红麻和河北红麻具有 2 条相同酶带, 相对迁移率为 0.779 和 0.820, 河北红麻酶带颜色均深于宁夏红麻, 说明河北红麻酶活性高于宁夏红麻。

综上所述, 6 个不同地区罗布麻过氧化物同工酶酶带数在 2~5 之间, 酶带迁移率 *Rf* 值在 0.547~0.882 之间, 各地区酶活性的高低为: 美国白麻最高, 新疆红麻、青海白麻和河北红麻的酶活性较高, 内蒙红麻的酶活性较低, 宁夏红麻的最低。

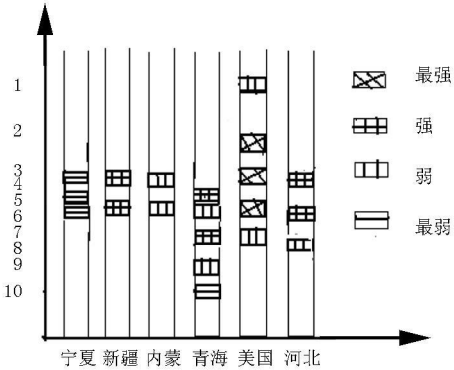


图 2 不同地区罗布麻过氧化物酶同工酶酶谱模式

2.2 酯酶同工酶酶谱分析

由图 3、4 及表 2 可知, 4 个不同地区罗布麻酯酶同工酶共显示 5 条酶带, 酶带数在 3~5 之间, 新疆红麻和河北红麻各有 5 条酶带, 宁夏红麻有 4 条酶带, 青海白麻有 3 条酶带。各地区酶带迁移率具有一定差异, 其变化范围在 0.1769~0.5918 之间; 新疆红麻和河北红麻有 5 条相同的酶带数, 但 *Rf* 值为 0.3061 和 0.3878 的新疆红麻酶带颜色较河北红麻的深, 说明新疆红麻酶活性较河北红麻的高; *Rf* 值为 0.3061 的青海白麻酶带颜色比宁夏红麻的深, 说明青海白麻酶活性高于宁夏红麻的。整

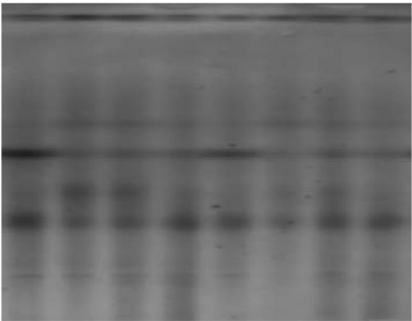
体来看, 新疆红麻、河北红麻和青海白麻的酶带颜色均较宁夏红麻的深, 说明宁夏红麻酯酶活性在 4 个地区是最低的。综上所述, 4 个不同地区罗布麻酯酶同工酶酶带数在 3~5 之间, 酶带迁移率 Rf 值在 0.1769~0.5918 之间, 各地区酯酶活性高低为: 新疆红麻最高, 河北红麻和青海白麻的酶活性较高, 宁夏红麻的最低。

表 2 不同地区罗布麻酯酶同工酶酶带相对迁移率(Rf)

酶带号	宁夏	新疆	河北	青海
1	0.1769	0.1769	0.1769	
2	0.3061	0.3061	0.3061	0.3061
3		0.3878	0.3878	
4	0.5	0.5	0.5	0.5
5	0.5918	0.5918	0.5918	0.5918

2.3 不同地区罗布麻聚类分析

由图 5 及表 3 可知, 不同地区罗布麻过氧化物酶聚



青海 河北 新疆 宁夏

图 3 不同地区罗布麻酯酶同工酶电泳

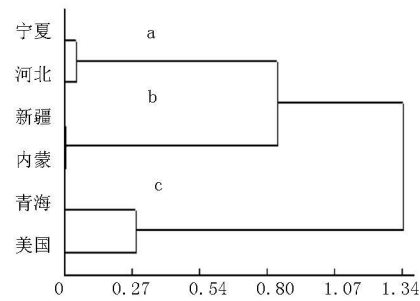


图 5 过氧化物同工酶聚类分析图谱

由图 6 及表 4 可知, 不同地区罗布麻酯酶在遗传距离为 0.56 时聚为 3 支: 新疆红麻、河北红麻聚为 1 支(c 支), 二者的相似度指数达到 1.000; 2 个居群间的地理位置较远, 但亲缘关系却很近, 也说明罗布麻各居群间的亲缘关系与居群间的地理位置分布不完全相关。作为罗布麻属的不同种青海白麻独自聚为 1 支(b 支), 说明种间存在遗传变异; 而宁夏红麻未与新疆红麻、河北红麻聚为 1 类, 单独构成 1 支(a 支), 说明居群间存在很大的遗传差异。原因可能为: 不同地区罗布麻居群受生殖隔离和山脉、沙漠等天然屏障隔离, 致使种群间很

为 3 支, 宁夏红麻、河北红麻聚为 1 支(a 支); 新疆红麻和内蒙红麻构成另 1 支(b 支), 2 个居群的相似度最高, 达到 1.000, 且 2 个居群间的地理位置较近, 说明罗布麻居群间的亲缘关系与居群间的地理分布具有一定的相关性; 青海白麻和美国白麻与其它 4 个居群相似系数最低而单独构成 1 支(c 支); 青海居群虽与新疆居群很近, 但并未和新疆居群、内蒙居群聚为 1 支, 而与地理位置很远的美国白麻聚为 1 支, 这说明罗布麻各居群间的亲缘关系与居群间的地理位置分布具有一定的相关性, 但并不完全相关。可能是因为罗布麻各居群间很少有基因交流, 且各居群间因自然地理环境的不同导致各居群在各自的自然环境下发生了非定向性变异, 最终导致一些地理距离相距较远的居群在聚类图上却相互靠近。

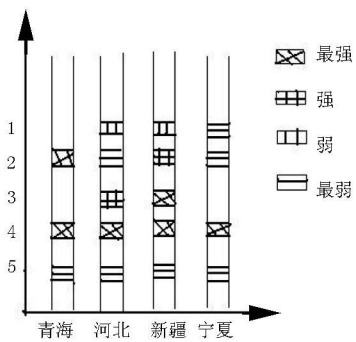


图 4 不同地区罗布麻酯酶同工酶谱模式

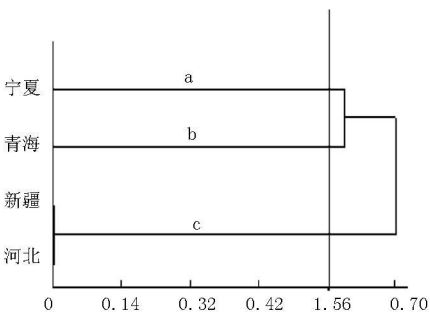


图 6 酯酶同工酶聚类分析

少有基因交流, 在长期的进化中形成了各自的生态适应型, 导致种群间形成了遗传分化。

表 3 6 个不同地区罗布麻过氧化物同工酶相似度指数

	宁夏	新疆	内蒙	青海	美国	河北
宁夏	1.000	0.250	0.250	0.143	0.143	0.500
新疆		1.000	1.000	0.167	0.400	0.250
内蒙			1.000	0.167	0.400	0.250
青海				1.000	0.250	0
美国					1.000	0.143
河北						1.000

表 4 4 个不同地区罗布麻酯酶同工酶相似度指数

	宁夏	新疆	河北	青海
宁夏	1.000	0.800	0.800	0.750
新疆		1.000	1.000	0.600
河北			1.000	0.600
青海				1.000

3 讨论与结论

同工酶分析技术是生物化学和分子生物学不断发展的产物, 现已应用到生物学的各个领域, 尤其在植物学中得到广泛发展, 同工酶分析是植物系统分类研究的重要工具, 在种内和种间亲缘关系研究中起着重要的作用^[5]。

该试验采用同工酶分析技术对罗布麻过氧化物酶和酯酶同工酶酶谱进行分析, 探讨了不同地区罗布麻的亲缘关系, 认为与罗布红麻同一属不同种的青海白麻与其它地区的罗布红麻亲缘关系很远, 地理位置较近的新疆红麻和内蒙红麻亲缘关系很近, 这与彭雪梅^[6]、陈彦云^[7]报道的结果一样, 说明罗布麻居群间的亲缘关系与居群间的地理分布具有一定的相关性; 从酯酶同工酶聚类分析图中得出宁夏红麻与新疆红麻、河北红麻亲缘关系较远, 说明罗布麻种群间存在很大的遗传差异, 这种遗传差异可能是长期自然选择的结果。因此, 在保护罗布麻野生资源时应尽可能多的保存各个地区罗布麻的种质资源, 这不仅维持了罗布麻种质资源遗传多样性,

而且为日后筛选具有优良经济性状、易于人工栽培的特优种质资源提供优良的基因资源。

该试验通过过氧化物酶和酯酶同工酶分析了不同地区罗布麻种群间和种群内的遗传差异, 探讨它们之间亲缘关系的远近, 在以后的研究中可将形态标记(株高、叶形、花序、花形、花色等)、同工酶分析技术和分子标记(RAPD、SSR 法)法结合在一起对罗布麻种群遗传多样性进行进一步研究, 为罗布麻种质资源鉴定、保存及引种栽培提供更为可靠的理论方法。

参考文献

[1] 张绍武, 胡瑞林, 钱学射. 中国罗布麻分布区的地理区划[J]. 西北植物学报, 2002, 22(7): 1-5.
[2] 任辉丽, 曹君迈, 陈彦云. 罗布麻的研究现状及其开发利用[J]. 北方园艺 2008(7): 87-90.
[3] 张桂兰, 苗以农, 李亚芹, 等. 大豆杂种后代过氧化物酶同工酶谱类型及其与亲本关系的分析[J]. 大豆科学, 1993, 12(3): 203-210.
[4] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1985: 45-47.
[5] 李国强, 王峥涛, 李晓波, 等. 松蓝属植物的同工酶分析及其系统学意义[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(4): 22-28.
[6] 彭雪梅, 张卫明, 王洋阳, 等. 基于 RAPD 标记的罗布麻野生居群遗传多样性分析[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2008, 31(4): 92-96.
[7] 陈彦云. 不同地区罗布红麻和罗布白麻的过氧化物同工酶分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6092-6094.

Research of Peroxidase Isozyme and Esterase Isozyme of Germplasms of *Apocynum venetum* Linn.

REN Xiao-yue¹, CHEN Yan-yun^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Restoration and Rehabilitation of Degraded Ecosystem in Northwest China (Ministry of Education), Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. School of Life Science Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The zymograms of peroxidase isozyme (POD) and esterase isozyme(EST) of *Apocynum venetum* Linn. from different areas were analyzed with polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that there were 2~5 different bands in the zymogram of peroxidase isozyme (POD), with *Rf* values between 0.547 and 0.882 and 3~5 different bands in the zymogram of esterase isozyme (EST) with *Rf* values between 0.1769 and 0.5918. The bands, *Rf* values and activities of POD and EST of *Apocynum venetum* Linn. from different areas illustrated that there were great inheritance differences between and in the populations. DPS cluster analysis indicated that the variety of *Apocynum venetum* L. from Xinjiang had closest genetic relationship with the variety from Inner Mongolia, and the variety from Ningxia had closer genetic relationships with the variety from Hebei. The variety of *Poacynum hendersonii* (Hook. f) Woodson from Qinghai had the farthest genetic relationship with the other 4 varieties of *Apocynum venetum* L. from Xinjiang, Inner Mongolia, Ningxia and Hebei.

Key words: *Apocynum venetum* Linn.; peroxidase isozyme; esterase isozyme; genetic relationship