

# 常见观赏竹类过氧化物酶同工酶及可溶性蛋白分析

孙 婴 宁, 王 维 禹, 方 姝

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘 要:**为了探讨常见观赏竹类的亲缘关系,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术分析了竹类植物过氧化物酶同工酶和可溶性蛋白。结果表明:供试材料的过氧化物酶同工酶和可溶性蛋白的位点和数目均存在差异。相似性系数在 0.400~0.762,同一种属的金边富贵竹与青叶富贵竹相似性系数最高(0.762)。聚类结果显示,6 个供试样品聚成二大类,与形态分类结果基本一致。试验结果可以初步作出常见观赏竹类品种间亲缘关系的判定。

**关键词:**观赏竹;同工酶;过氧化物酶(POD);可溶性蛋白

**中图分类号:**S 336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)21-0110-03

竹类植物是植物界中一个独特的类群,全世界共有木本竹类 70 余属,1 100 多种。在我国,具有较高观赏价值的竹种有 150 多种。观赏竹类植物色泽自然、竹香怡人,具有吸收紫外线的功能,能够净化空气,因此观赏价值很高。并且竹类植物比同面积的森林多放氧 35%,利用价值和生态价值极高,在室内绿化及园林景观建设中应用越来越广泛,能产生巨大的经济效益<sup>[1]</sup>。因此竹类植物研究愈来愈受到重视。

同工酶和可溶性蛋白都是基因表达的产物,对其谱带进行分析能够很好地判断基因的存在及其表达规律,能够从一定程度上揭示物种的遗传基础。同工酶

中以过氧化物酶(POD)同工酶研究最多。国内最早有关竹类植物同工酶的研究始于 1984 年,四川省林业科学研究所种质种源组研究提出竹叶的过氧化物酶同工酶分析可以用来鉴定和区分竹子的种类<sup>[2]</sup>,之后国内越来越多的同工酶研究用来分析竹类种间亲缘关系<sup>[3-6]</sup>,但这些研究大多集中在南天竹等一些南方的竹类植物上。该研究主要针对北方园艺市场中常见观赏竹类的过氧化物酶同工酶和可溶性蛋白进行分析,利用 5 个种属 6 个供试样品的可溶性蛋白和同工酶谱带差异对北方常见观赏竹类进行亲缘关系的鉴定,以期对北方园艺市场竹类植物的分类研究和品种选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

6 个供试样品的竹类植物全部购买自黑龙江省齐齐哈尔市龙沙区花鸟鱼市(表 1)。

**第一作者简介:**孙婴宁(1981-),女,辽宁抚顺人,硕士,讲师,现主要从事植物生理生态学研究。E-mail: progress123 @ 163.com。

**收稿日期:**2011-08-01

## Cloning and Sequencing of a Mitochondrial DNA Fragment Related to Cytoplasmic Male Sterile Line of Cabbage

XU Zhong-min, ZHANG En-hui, GONG Zhen-hui, CHENG Yong-an, MA Qing-shan

(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Taking ball leaves of cabbage in the period of ball as test materials, the special sequence related to CMS was amplified in the new cabbage CMS451 by PCR, and its homology was highly with Ogu-CMS published in NCBI. The results showed that CMS451 had the similar sterility with Ogu-CMS, but the gene related to CMS was relative conservative.

**Key words:** cabbage; CMS451; cytoplasmic male sterility(CMS); mitochondrial DNA(mtDNA)

表 1 供试材料

编号	品种名称	物种拉丁名
P <sub>1</sub>	刚竹	<i>Phyllostachys viridis</i>
P <sub>2</sub>	罗汉竹	<i>Phyllostachys aurea</i>
P <sub>3</sub>	凤尾竹	<i>Bambusa multiplex</i>
P <sub>4</sub>	金边富贵竹	<i>Dracaena sanderiana</i>
P <sub>5</sub>	青叶富贵竹	<i>Dracaena sanderiana</i>
P <sub>6</sub>	百合竹	<i>Dracaena reflexa</i>

1.2 试验方法

1.2.1 样品提取 称取各供试样品叶 0.5 g,放入研钵内,加 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)2 mL,冰浴下研磨成匀浆,8 000 r/min 离心 2 次,每次 10 min。上清液为可溶性蛋白和 POD 同工酶的粗提液。

1.2.2 电泳 采用不连续的聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离 POD 同工酶和可溶性蛋白。POD 同工酶分离胶和浓缩胶浓度分别为 7%和 2.5%;可溶性蛋白分离胶和浓缩胶浓度分别为 10%和 5%。上样量均为 30 μL。稳压电泳,浓缩胶 150 V,分离胶升至 300 V。待溴酚蓝指示剂下移至距胶底部 1 cm 时,停止电泳。POD 同工酶染色采用维生素 C-半量联苯胺法<sup>[7]</sup>,室温下染色 5~10 min,显出蓝色带为止,7%的乙酸脱色。可溶性蛋白用 0.1%考马斯亮蓝染色 0.5~1 h,常规脱色<sup>[8]</sup>。

1.2.3 数据统计 对竹子的过氧化物酶同工酶和可溶性蛋白电泳经过 3 次以上重复,在获得稳定图谱的基础上,应用 BandScan 软件进行电泳谱带检测,分别统计 POD 同工酶和可溶性蛋白的条带数和各条带的迁移率 Rf 值。同一 Rf 值位点,如出现酶带记为“1”;不出现酶带则记为“0”。然后用 Spss 17.0 采用类间平均链锁法获得相似性系数矩阵与聚类图。

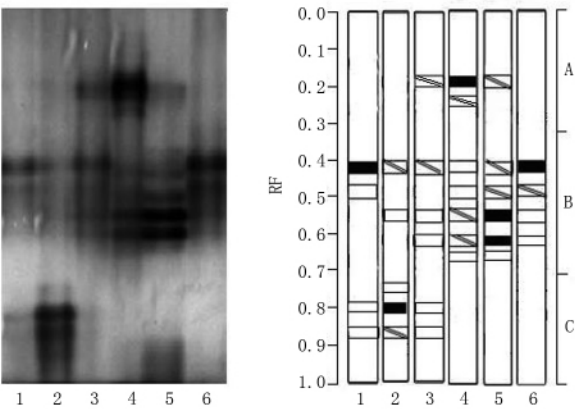


图 1 6 个供试样品的 POD 同工酶

注:■表示强带,□表示中带,□表示弱带;1. 刚竹;2. 罗汉竹;3. 凤尾竹;4. 金边富贵竹;5. 青叶富贵竹;6. 百合竹。下同。

2 结果与分析

2.1 竹子的 POD 同工酶分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳对 5 个种属的 6 个供试

样品进行分析,经比较可知,POD 同工酶酶谱以及它们的强弱都有所不同,共在 10 个位点产生酶带(图 1)。金边富贵竹酶带数目最多,为 7 条,刚竹和百合竹最少,为 4 条。酶带可分为 A、B、C 区,迁移率分别为 0.143~0.247、0.423~0.673、0.751~0.867。数量最多、活性最强、分布较为集中的是 B 区,其中 Rf=0.423 为 6 个供试样品所共有的固有酶。酶谱带数的不同、酶带强弱的差异说明了 6 个供试样品间的遗传差异。其中金边富贵竹与青叶富贵竹酶带数目分别为 7 条和 6 条,2 个品种共在 6 个位点产生相同的酶带,说明 2 个物种亲缘关系很近。

2.2 可溶性蛋白分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳对 6 个供试样品进行分析,经比较可知,可溶性蛋白条带以及它们的强弱都有所不同,图 2 则表明可溶性蛋白条带最多有 5 条,最少的为 3 条,其具体表现在迁移率、条带数目和条带强弱的显著不同。其中 Rf=0.268 为 6 个供试样品所共有的特征谱带,并且在台竹、罗汉竹、凤尾竹 3 个品种中着色较深。

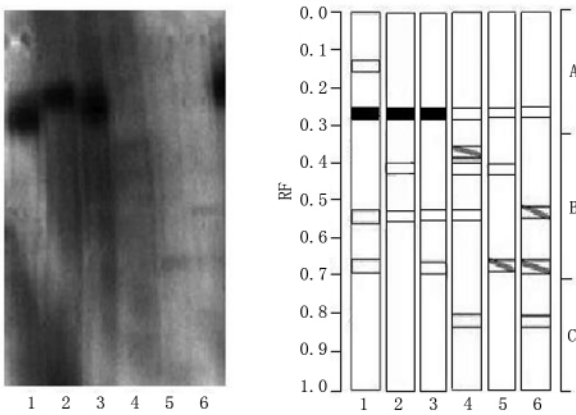


图 2 6 个供试样品的可溶性蛋白

2.3 相似性系数分析

由表 2 可知,6 个供试样品竹类的相似性系数在 0.400~0.762 之间,其中金边富贵竹与青叶富贵竹之间的相似性系数最高,为 0.762,说明二者之间的亲缘关系最近。金边富贵竹与青叶富贵竹同属于龙舌兰科龙血树属,为富贵竹的 2 种不同的品种。相似性系数结果表明,6 个供试样品的种内差异小于种间差异。

表 2 相似性系数分析

	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>
P <sub>1</sub>	1.000					
P <sub>2</sub>	0.625	1.000				
P <sub>3</sub>	0.706	0.706	1.000			
P <sub>4</sub>	0.400	0.500	0.571	1.000		
P <sub>5</sub>	0.471	0.471	0.667	0.762	1.000	
P <sub>6</sub>	0.625	0.500	0.706	0.700	0.706	1.000

## 2.4 聚类分析

由图3可知,6个供试样品被分成了2组,第1组中,罗汉竹与凤尾竹首先聚成一个类群,然后再与刚竹聚成一个类群。第2组中,金叶富贵竹与青叶富贵竹首先聚成一个类群,然后再与青叶百合竹聚成一个类群。聚类分析结果与形态分类结果基本一致。

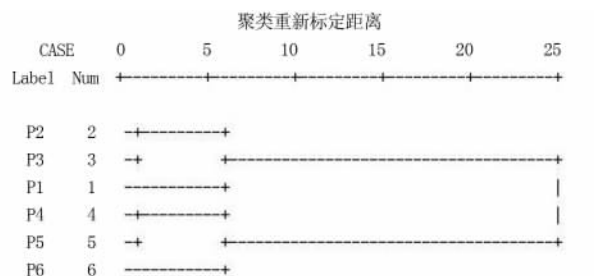


图3 6个供试样品的聚类分析

## 3 讨论

由于POD同工酶和可溶性蛋白在植物体内普遍存在,可以表现为基因的差异,也可能是相同基因的不同表达,可以采用同工酶和可溶性蛋白来鉴定物种的亲缘关系。Payne曾指出,同工酶电泳法是品种鉴定中最有效的<sup>[9]</sup>。利用POD同工酶进行植物间亲缘关系鉴定报道较多,由于酶谱比较稳定,因此被国内外很多研究者作为一种遗传特性分析的“生化指标”,进行栽培植物的起源、进化及其亲缘关系的探讨<sup>[10-13]</sup>。该试验结果同样也发现与POD同工酶相比,可溶性蛋白电泳结果虽重复多次试验,但条带数目始终较少,没有POD同工酶适宜用来进行观赏竹的亲缘关系分析。POD同工酶的电泳结果酶带丰富、清晰,更能反映出种间和种间的亲缘关系,更适宜用来鉴定观赏竹类植物亲缘关系。

聚类分析结果显示6个供试样品可以分成2组,其中罗汉竹、凤尾竹、刚竹聚成一个大类群,它们分属于禾本科不同属,亲缘关系较近。金边富贵竹、青叶富贵竹与百合竹聚成一类,同属于龙舌兰科龙血树属,亲缘关系较近。科属的种间的基因表达上存在很大差异,这不仅说明它们在种间相似程度上存在着明

显的差异,而且还表明5种科属竹子间存在着一种较为复杂的遗传关系。从POD酶带数量上看,金边富贵竹和青叶富贵竹相同带数最多。并且二者的相似性系数最高为0.762,由此可见种内的亲缘性很高。

该文采用计算相似性系数及聚类分析的方法,利用6种竹子的可溶性蛋白和同工酶出现的酶带条数和颜色深浅的变化来证明它们之间存在差异。尽管存在着酶谱差异,但在同一科属中均有相同的色带,说明它们有着共同的遗传基础。竹子的可溶性蛋白和同工酶相似性系数与它们属于同一科属的不同的植物相一致,说明同工酶和可溶性蛋白技术作为植物鉴定有较高可靠性。

## 参考文献

- [1] 四川省林业科学研究所种质种源组. 不同竹种同工酶差异性研究[J]. 四川林业科技, 1984(1): 2-4.
- [2] 李秋洁, 孙茂盛, 马国强. 观赏竹类在云南绿地景观中的应用[J]. 北方园艺, 2010(6): 130-133.
- [3] 黄承才, 汪奎宏. 竹亚科植物过氧化物酶和酯酶同工酶研究[J]. 绍兴师专学报(自然科学版), 1994(5): 14-15.
- [4] 唐丽, 刘友全, 钟秋平. 南天竹超氧化物歧化酶同工酶的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2008(3): 10-12.
- [5] 唐丽, 刘友全, 钟秋平. 湖南南天竹13个种质资源酯酶同工酶研究[J]. 江西农业大学学报, 2007(6): 26-28.
- [6] 唐丽, 刘友全, 钟秋平. 南天竹过氧化物酶同工酶的研究[J]. 福建林业科技, 2007, 4(4): 77-81.
- [7] 黄寿松, 翁坚. 几种植物中的过氧化物酶同工酶分析[J]. 遗传, 1980, 2(3): 710.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [9] Kath B N, Hove J B. Organellar and cytosolic localization of four phosphoribosyl diphosphate synthase isozymes in Spinach [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 497-505.
- [10] Amako K, Chen G X, Asade K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 497-504.
- [11] Kurt Y, Kaya N, Isk K. Isozyme variation in four natural populations of Cedrus libani A. Rich. in Turkey [J]. Turk J Agric fores, 2008, 32(2): 137-145.
- [12] 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.
- [13] 庞赫, 郭太君. 君子兰杂交后代过氧化物酶同工酶酶谱多样性分析[J]. 北方园艺, 2009(5): 38-41.

## Analysis Peroxidase Isozyme and Soluble Protein in Ornamental Bamboos

SUN Ying-ning, WANG Wei-yu, FANG Shu

(College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract:** In order to research the genetic differences of ornamental bamboos, the peroxidase isozyme of bamboo leaves were analyzed by plumb plate of polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that there were certain differences in the number and locus of the peroxidase isozyme and soluble protein bands among the accessions. The similarity coefficient was 0.400~0.762. The similarity coefficient between the two varieties of *Dracaena sanderiana* was the highest (0.762). The clustering analysis indicated that all samples were divided into 2 Groups, which was in accordance with the morphological taxonomy of bamboos. The study showed that ornamental bamboos could be distinguished by peroxidase isozyme and soluble protein analysis.

**Key words:** ornamental bamboo; isozyme; peroxidase; soluble protein