

福白菊与八种药用菊花 POD 同工酶比较分析

程 华^{1,2}, 李琳玲^{1,2}, 袁红慧^{1,2}, 张心玲³, 郑永生³, 程水源^{1,2}

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 化学与生命科学学院, 湖北 黄冈 438000; 3. 湖北省福白菊产业协会, 湖北 麻城 438331)

摘 要:为了初步了解“福白菊”与其它杭系菊花栽培品种亲缘关系,以不同产地药用菊花的叶片做 POD 同工酶分析,并运用相似系数法进行亲缘关系的聚类分析,从谱带分布和酶谱距离判定不同种间 POD 同工酶谱间的差异。结果表明:营养生长期,叶比茎的 POD 酶带更清晰,更整齐,分离更好,营养生长阶段的叶最适合用于菊花 POD 同工酶分析;“杭黄菊”、“金菊 2 号”、“金菊 1 号”、“杭小洋菊”4 个品种间亲缘关系极近。“杭白菊”和“射阳大白菊”相似系数为 0.89,可归为 1 类。“福白菊”、“黄山贡菊黄花”、“杭迷你小酒菊”亲缘关系较远的都可各自归为一类,尤其是“杭迷你小酒菊”与其它 8 个菊花品种的亲缘关系较远。该研究可为药用菊花栽培品种的亲缘关系鉴别提供参考,并为药用菊花的分类、遗传育种、资源综合利用提供理论依据。

关键词:“福白菊”;药用菊花;POD 同工酶;遗传多样性

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)22-0099-05

菊花(*Dendranthema × gradi folium* (Ramat) Kitam.)为菊科菊属植物,是经长期人工选择培育出的名贵观赏花卉。品种极为丰富,是种子植物最大科,总数 25 000~30 000 种^[1-3]。菊花是中国的传统名花,观赏价值较高,同时又是我国传统中药材和保健茶饮原料,有疏风清热、平肝明目、解毒之功效。临床上用于治疗头痛、眩晕、目赤、心胸烦热、疔疮、肿毒等症^[2,4]。现代药理研究表明,菊花具有治疗冠心病、降低血压、预防高血脂、抗菌、抗病毒、抗炎、抗衰老等多种药理活性^[5]。

生物的遗传变异是生物群体内多态等位基因存在的反映,是生物进化的先决条件,也是同工酶技术在研究生物分类及系统进化中得以应用的理论基础^[6]。同工酶电泳技术能分辨出同工酶和等位基因酶,根据酶带的变化推断出基因位点和等位基因的不同,计算出基因频率、多态位点的百分数以及平均每个位点的等位基因数、有效数、杂合度等指标,进而了解每个种分布区范围内各群体的遗传变化和遗传结构,并且通过同工酶变异大小的比较可以推断种群演化历史及迁徙方向^[7-8]。

第一作者简介:程华(1980-),男,在读博士,讲师,研究方向为经济林木种质资源评价与利用。E-mail:chenghua1437@126.com.

责任作者:程水源(1965-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事经济林木种质资源评价与利用研究工作。E-mail:s_y_cheng@sina.com.

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2010CDZ026);湖北省教育厅高校青年教师深入企业行动计划资助项目(XD2010398)。

收稿日期:2012-07-20

POD 作为植物细胞内重要的组成成分,具有许多非常重要的生理功能。一方面与植物正常的形态发生和形态建成有关,在植物的生长、发育过程中起作用^[9-12];另一方面与植物的抗逆性有关,包括抗旱、抗寒、抗盐、抗病等,是植物保护酶系的重要保护酶之一^[13-14]。

目前,有关“福白菊”和“杭白菊”遗传亲缘关系的系统性研究较少,因此,造成“福白菊”与杭系菊花认知混乱的局面,不仅不利于“福白菊”优势资源的充分利用,而且亦不利于“福白菊”品牌建设和“福白菊”产业的持续性发展。该试验通过比较不同时期不同组织的 POD 同工酶的条带探讨 POD 同工酶在“福白菊”中的阶段特异性和组织特异性,为同工酶研究时的取材提供理论依据,找出合适的取样时期和部位。通过探讨菊科植物不同种菊花 POD 同工酶谱,以期对药用菊花的分类、遗传育种、资源综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 2010 年 7 月 20 日、8 月 4 日、8 月 19 日、9 月 3 日分 4 次在黄冈师范学院校园内采集“福白菊”的叶和茎。每次采回后放入-80℃的冰箱保存。另于 7 月 25 日在野外采集湖北麻城“福白菊”、“杭白菊”、“杭黄菊”、“杭迷你小酒菊”、“射阳大白菊”、“杭小洋菊”、“金菊 1 号”、“金菊 2 号”、“黄山贡菊黄花”9 种菊科植物的叶片(表 1),同样置于-80℃冰箱保存。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质提取 把新鲜原料抹净,用吸水纸尽可能

擦干水,用天平各称取 1 g,叶片按 1:3(g:v)加入磷酸缓冲液,茎按 1:2(g:v)加入磷酸缓冲液,在冰浴环境中用研钵研碎。分装入 5 mL 离心管,贴上编号标记。把装有样品的离心管分别放入天平平衡,并对称装入高速冷冻离心机(使用 5 mL 离心管对应的转子),设置条件为 4℃,6 000 r/min 离心 20 min(正交实验得出此时效果最好)。完成离心后取上清液。

表 1 供试菊花材料

Table 1 Chrysanthemum varieties

编号 No.	类型 Type	品种 Cultivar	产地 Location
A	杭菊	“杭黄菊”	江苏射阳
B	白菊	“福白菊”	湖北麻城
C	杭菊	“杭迷你小酒菊”	浙江桐乡
D	贡菊	“黄山贡菊黄花”	安徽歙县
E	杭菊	“杭白菊”	江苏射阳
F	杭菊	“金菊 2 号”	浙江桐乡
G	杭菊	“金菊 1 号”	浙江桐乡
H	杭菊	“杭小洋菊”	浙江桐乡
I	杭菊	“射阳大白菊”	江苏射阳

1.2.2 蛋白质电泳 用聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳,参考胡能书等^[15]方法略作改进,分离胶浓度为 9%,浓缩胶浓度为 3%,电极缓冲液 pH 8.3。采用稳压电泳,初始电流每槽为 1 mA,待指示剂在胶面上连成一蓝线时将电流调至每槽为 3 mA,电泳 0.5~1 h,至前缘离凝胶底部 1 cm 左右停止。

1.2.3 染色 POD 同工酶染色法:联苯胺-醋酸-过氧化氢染色法。用配置好的染液进行染色,胶在室温上先呈现深蓝色谱带,随着时间延长,过氧化物谱变成红褐色,然后用水冲洗清洁。

1.3 数据分析

使用数码相机对电泳结果进行拍照,利用计算机简便、快捷和准确地记录酶谱条带。经过反复摸索,采用数字化和图形化结合记录同工酶电泳酶谱的方法较为可行。首先使用数码照片保存电泳结果,用 Photoshop 测量和计算样品的 R_f 值: R_f =酶带的迁移距离/溴酚蓝的迁移距离。依据 POD 同工酶带的迁移距离、迁移率、酶带的条数和强度,进行比较分析。根据植物 POD 同工酶酶带 R_f 值的相似程度来确定对比种的相似程度。用 NTsys 2.10 统计分析软件计算酶谱相似系数,并建立聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 “福白菊”不同时期、不同器官的 POD 同工酶酶谱分析

“福白菊”营养生长时期到生殖生长时期的过渡时期分别为早期、中期、中后期和后期 4 个时期,分别以 1、2、3、4 表示。电泳结果和分析见图 1~4。

2.1.1 “福白菊”不同时期叶的 POD 同工酶酶谱分析

“福白菊”不同时期叶的 POD 同工酶酶谱图见图 1,模式

图见图 2。从电泳图谱可见,A 带在营养期的 4 个时期均表达,且活性较强;B 带在 4 个时期均表达,在早期和后期活性较强,在中期和中后期活性较弱;C 带在 4 个时期均表达,但活性较弱,在中后期活性最弱;D 带在 4 个时期均表达,在早期、中后期、后期活性较强,中期活性较弱;E 带在早期、中后期和后期表达,在中期不表达,其中中后期活性较弱,早期和后期活性最弱。在早期、中后期与后期,A、B、C、D、E 5 条带均表达,在中期,只有 4 条带表达,E 带不表达。但是 4 个时期的同工酶酶带表达量有差异,表达活性不同,随着营养期的延长,叶 POD 活性先降低后升高。A、B、C、D 4 条带在叶的营养生长期始终显现,可能是这几种酶在维持“福白菊”正常生长发育过程中起着重要的作用。

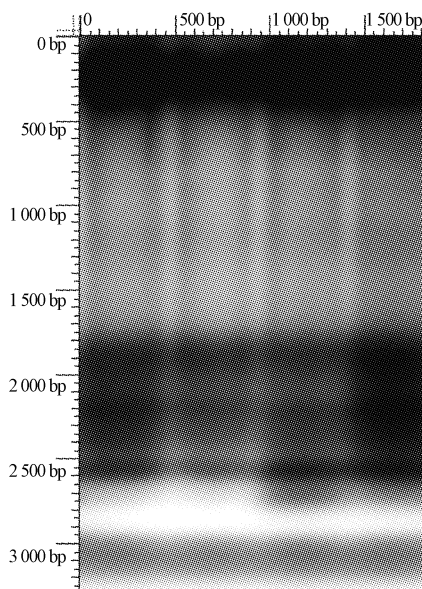


图 1 “福白菊”不同时期叶的 POD 同工酶酶谱

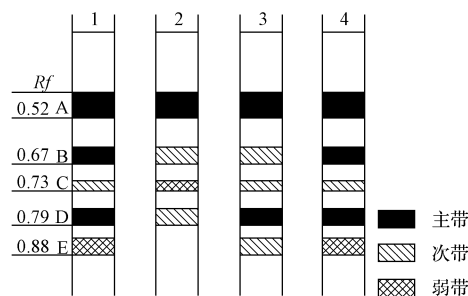
Fig. 1 The POD isozyme among the different growth stages of leaves of *Chrysanthemum* ‘Fubaiju’

图 2 “福白菊”不同时期叶的 POD 同工酶酶谱模式

Fig. 2 The POD isozyme patterns among the different growth stages of leaves of *Chrysanthemum* ‘Fubaiju’

2.1.2 “福白菊”不同时期茎的 POD 同工酶酶谱分析

“福白菊”不同时期茎的 POD 同工酶酶谱图见图 3,模式图见图 4。从电泳图谱中可见,A 带在营养期的 4 个时期均表达,其中在早期、中期和后期活性较弱,在中后期

活性最弱;B带在4个时期均表达,在早期和后期活性较强,在中期活性较弱,中后期活性最弱;C带在4个时期均表达,早期和后期活性较强,在中期和中后期活性最弱;D带在4个时期均表达,在早期和后期活性较强,在中期和中后期其最弱;E带在早期和后期表达,在中期和中后期不表达,其中早期和后期活性较弱。在早期与后期,A、B、C、D、E 5条带均表达,在中期和中后期,只有4条带表达,E带不表达。随着营养期的延长,茎 POD 活性先降低后升高,且中期和中后期酶带的表达量都较少,活性较弱,尤其在中后期,4条带的表达都很少,活性最弱,可见,在营养生长向生殖生长的转变期过程中,茎的同工酶也随之发生了相应的变化。

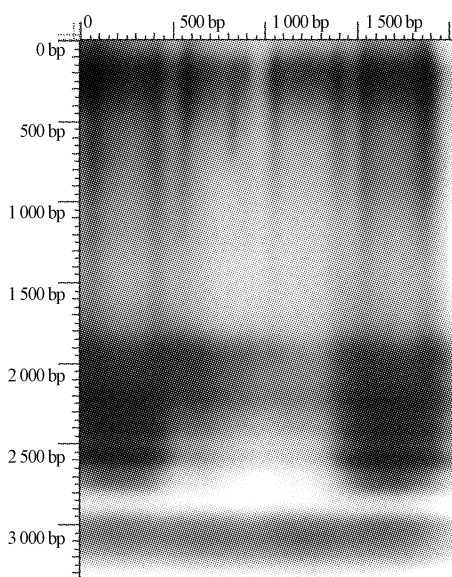


图3 “福白菊”不同时期茎的 POD 同工酶酶谱

Fig. 3 The POD isozyme among the different growth stages of stems of *Chrysanthemum* 'Fubaiju'

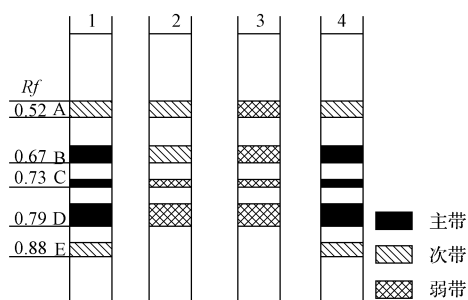


图4 “福白菊”不同时期茎的 POD 同工酶酶谱模式

Fig. 4 The POD isozyme patterns among the different growth stages of stems of *Chrysanthemum* 'Fubaiju'

2.1.3 “福白菊”茎与叶的 POD 同工酶酶谱分析 由以上分析可知,在营养生长阶段的4个时期,叶与茎相比均出现过 A、B、C、D、E 5条带,但是在表达量上存在差异,如 A 带在叶中的活性强于茎,C 带在茎中的活性强于叶。并且,在同一时期,茎与叶的 POD 同工酶的表达

与活性也存在差异。从总体来看,在营养生长阶段,叶比茎的 POD 同工酶谱带要清晰,说明不同器官 POD 同工酶在不同生长阶段的变化有其共性也有各自的特性。

2.2 不同菊花的 POD 同工酶酶谱分析

2.2.1 过氧化物同工酶酶谱分析 9种不同的菊科植物电泳结果见图5,模式图见图6。由图6可知,菊科9种植物酶谱的酶带数目、宽度、活性强弱及酶带迁移率 R_f 值有明显的不同。杭黄菊、“金菊2号”、“金菊1号”、“杭小洋菊”都有相同的6条酶谱带,只是在表达量上存在着差异,说明这4个品种间亲缘关系很近。“福白菊”、“杭迷你小酒菊”、“黄山贡菊黄花”、“杭白菊”、“射阳大白菊”的酶谱带分别是7、3、5、5、6条谱带。5种植物种间有 R_f 值相同的酶带,如野外“福白菊”与“射阳大白菊”有6条 R_f 值相同的酶带,“杭迷你小酒菊”与“黄山贡菊黄花”有2条 R_f 值相同的酶带,“黄山贡菊黄花”与“射阳菊花”有3条 R_f 值相同的酶带,体现其具有属的共性;这5种植物同工酶酶带数目、 R_f 值及酶活性差异较大,都有各自的特征性谱带,说明其种间差异性较大,亲缘关系较远。所有的9种植物中,都出现了G带,这可能是菊科植物的特征性谱带。

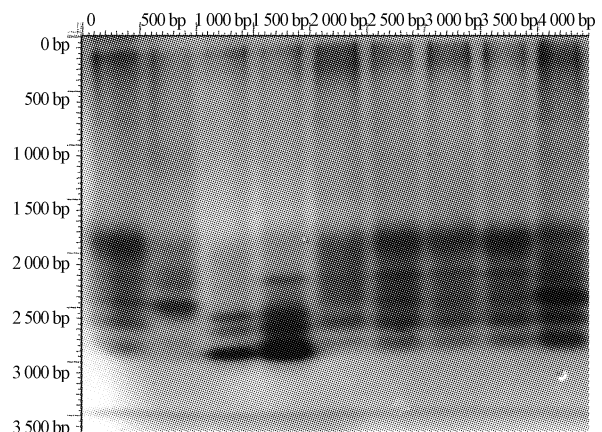


图5 9种不同菊科植物的 POD 同工酶酶谱

Fig. 5 The POD isozyme bands of leaves in nine cultivars of *Chrysanthemum*

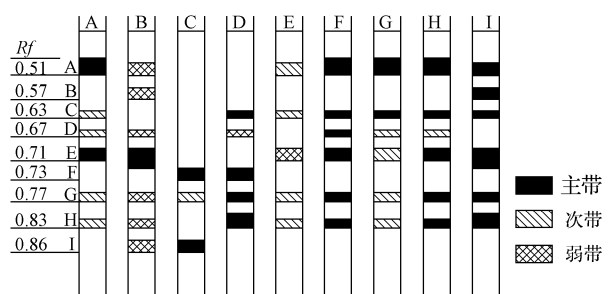


图6 9种不同菊科植物的 POD 同工酶酶谱模式

Fig. 6 The POD isozyme patterns bands of leaves in nine cultivars of *Chrysanthemum*

2.2.2 聚类分析 用“1”和“0”记录条带的有无,“1”表示该条带表达,“0”表示该条带不表达,形成 1/0 矩阵,利用 NTsys 2.10 统计分析软件的 SIMQUAL 法计算材料间遗传相似系数及相似系数矩阵(表 2)。用 SAHN 功能按照 UPGMA 法进行聚类分析,再用 Tree Plot 功能绘出聚类分析树状图(图 7)。由表 2 可知,9 种菊科植物之间得相似系数的差异较大,从 0.22 到 1.0。根据聚类分析,亲缘关系越近的种类,相似系数越接近于 1,亲缘关系越远的种类,相似系数越接近于 0。由图 7 可知,菊科 12 个品种的遗传相似距离在 0.22~1.00 之间。聚类分析表明,供试材料在 0.22 相似系数处被分为 2 组,其中“杭迷你小酒菊”分为 1 组,其它 8 种分为另 1 组,说明“杭迷你小酒菊”与其它 8 种植物的亲缘关系很远。在 0.56 相似系数处,8 种植物又被分为 2 组,其中“黄山贡菊黄花”分为 1 组,其余 7 种植物分为另 1 组,说明“黄山贡菊黄花”与其余 7 种植物的亲缘关系较远。在 0.67 相似系数处,野外“福白菊”被分出来另为 1 组,其余 6 种植

物被分为 1 组。在 0.78 相似系数,可将剩余的 6 种植物分为 2 类,1 类为“杭黄菊”、“金菊 2 号”、“金菊 1 号”、“杭小洋菊”,另 1 类为“杭白菊”和“射阳大白菊”。其中“杭黄菊”、“金菊 2 号”、“金菊 1 号”、“杭小洋菊”亲缘关系极为相近,“杭白菊”和“射阳大白菊”相似系数为 0.89,亲缘关系近,可归在 1 类中。

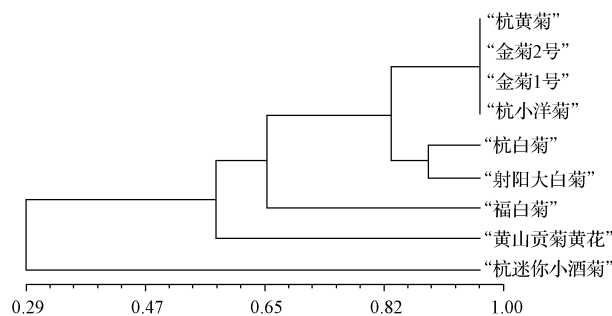


图 7 9 种菊科植物的聚类分析树状图

Fig. 7 Relationship and cluster in nine cultivars of Chrysanthemum

表 2

9 种菊科植物的相似系数矩阵

Table 2

Similarity coefficient in nine cultivars of Chrysanthemum

品种	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A	1.0000000								
B	0.6666667	1.0000000							
C	0.2222222	0.3333333	1.0000000						
D	0.6666667	0.3333333	0.5555556	1.0000000					
E	0.8888889	0.5555556	0.3333333	0.5555556	1.0000000				
F	1.0000000	0.6666667	0.2222222	0.6666667	0.8888889	1.0000000			
G	1.0000000	0.6666667	0.2222222	0.6666667	0.8888889	1.0000000	1.0000000		
H	1.0000000	0.6666667	0.2222222	0.6666667	0.8888889	1.0000000	1.0000000	1.0000000	
I	0.7777778	0.6666667	0.2222222	0.4444444	0.8888889	0.7777778	0.7777778	0.7777778	1.0000000

3 讨论

同工酶分析操作简单,费用低廉,分析直观,目前已成为探讨植物遗传多样性、亲缘与演化关系的重要手段^[16]。目前同工酶技术已被广泛应用于植物的系统、生理、病理、遗传分析、基因标记、个体发育、杂种优势以及鉴定远缘杂种真实性等方面^[6-7,9-11,14]。

3.1 “福白菊”不同时期不同器官的 POD 同工酶谱

POD 广泛存在于高等植物的组织中,参与各种生理活动,具有多种分子形式的阶段特异性和组织特异性,在植物不同生长发育时期其同工酶谱构成及酶活性均存在差异,表现为多型现象。其变化与植物组织器官的分化、形成和生理状态等密切相关,且酶谱变化先于形态分化。随着植物的生长发育,器官或组织的生理特性和一系列代谢过程将发生深刻变化,同工酶也随之变化^[9]。该研究首先通过对“福白菊”营养生长期 4 个阶段茎和叶的 POD 酶谱迁移距离、迁移率、酶带的条数和强度的变化比较,发现叶片与茎的 POD 同工酶变化在 4 个阶段有规律性(活性先降低后升高),且叶与茎的同工酶表达量存在差异,可能是“福白菊”为适应温度条件而

诱导体内过氧化物酶系统代谢改组的结果,也可能是营养生长期向生殖生长期过渡阶段,由于器官分化前代谢旺盛而产生的过氧化物类型多,需要不同的 POD 同工酶参与清除过氧化物的危害,从而保持植物体细胞内环境的相对稳定。表明植物的不同器官不同时期担负着不同的生理功能,具有不同的代谢途径,要求不同的酶类表达。因此,产生同工酶分布的器官特异性和阶段特异性;同时可以看出营养生长阶段的叶片的 POD 同工酶带比茎的酶带更清晰,叶片更适合用于“福白菊”POD 同工酶分析。以上这些都说明,同工酶的表达在不同发育阶段不同器官存在一定差异,同工酶用于“福白菊”研究时应对取样阶段和器官进行比较。

3.2 菊花的 POD 同工酶分析

不同用途菊花在形态特征、内在品质上均存在较大差异。药用菊花彼此间的遗传背景、亲缘关系与演化复杂,演化关系等尚存争议^[17]。POD 同工酶分析可以从分子水平鉴定很多外部形态上难以鉴别的遗传性变异,从而广泛应用于植物种质资源和亲缘关系的鉴定^[18]。9 种菊花栽培品种间的 POD 带谱差异较大,特别是“杭迷

你小酒菊”,“黄山贡菊黄花”与其它 7 种植物亲缘关系较远;“杭黄菊”、“金菊 2 号”、“金菊 1 号”、“杭小洋菊”有高度的相似性。而“杭白菊”与“射阳大白菊”间亲缘关系密切,野生“福白菊”与杭系菊花栽培品系有一定亲缘关系,但又有显著差异。该研究的 POD 同工酶分析结果与邵清松等^[19]在药用菊花的 ISSR 分析结论上较为一致。综上所述,植物的同工酶表现,有着组织器官的特异性及发育阶段的特异性,这对利用同工酶进行品种鉴定和分类是一个不利因素,但它也存在着相对的稳定时期和适宜的采样部位,这使得其应用具备了可行性、科学性。该试验通过对“福白菊”的叶与茎在营养生长期的不同时期 POD 酶谱分析,发现“福白菊”的叶中 POD 同工酶酶型丰富且相对稳定,“福白菊”与另外 8 种菊花栽培品种存在一定亲缘关系,但有差异。研究结果为初步阐明“福白菊”和杭菊品系可能存在的遗传进化关系,为探究二者的起源问题奠定了一定基础,亦为“福白菊”品牌建设和产业的可持续发展提供理论支持。

参考文献

- [1] 陈俊愉. 观赏植物(多样性)[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [2] 陈发棣,陈佩度. 几种中国野生菊的染色体组分析及亲缘关系初步研究[J]. 园艺学报,1996,23(1):67-72.
- [3] 戴思兰. 中国栽培菊花起源的综合研究[D]. 北京:北京林业大学,1994.
- [4] 中华人民共和国药典编写委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [5] 徐文斌,郭巧生,王长林. 药用菊花遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志,2006,31(1):18-21.
- [6] 熊全沫. 同工酶电泳数据的分析及其在种群遗传上的应用[J]. 遗传,1986,8(1):1-5.
- [7] 李军,陶芸,郑师章,等. 同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究[J]. 植物学报,1995,37(9):669-676.
- [8] 赵小兰,姚崇怀,王彩云. 桂花品种的同工酶研究[J]. 华中农业大学学报,2000,19(6):595-599.
- [9] 丁玲,陈发棣,滕年军,等. 菊花不同生长阶段不同器官 POD 和 EST 同工酶比较[J]. 西北植物学报,2007,27(10):2029-2034.
- [10] 梁顺祥,郭洋楠,唐道城,等. 孔雀草 POD 同工酶及主要观赏性状研究[J]. 北方园艺,2009(9):65-67.
- [11] 李阳春,王玲英. 早熟禾属不同种及生态型 POD 同工酶分析[J]. 草业科学,1996,13(5):4-8.
- [12] 周怀军,张晓曼,赵玉辉,等. 不同砧木大石早生李 POD 与树体生长势的关系[J]. 西北林学院学报,2003,18(2):6-8.
- [13] 陈永军,王泽杰,谢崇华,等. 水稻苗期不同水分胁迫下抗氧化指标的变化[J]. 西南农业学报,2009,22(2):286-289.
- [14] 孟学平,杨恒山. 盐胁迫对冬小麦叶过氧化物酶同工酶的影响[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(1):25-27.
- [15] 胡能书,万贤国. 同工酶技术与应用[M]. 长沙:湖南科技出版社,1985:54-57.
- [16] Ding L, Chen F, Fang W. Genetic diversity among 27 materials in 8 species of dendranthema by isozyme analysis[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2007,27(2):249-256.
- [17] 丁玲,陈发棣,滕年军,等. 野生及不同用途菊花的同工酶分析[J]. 南京农业大学学报,2008,31(3):37-42.
- [18] 李宁,陈年来,陈宗礼. 陕西延川 22 个枣树品种 POD 同工酶研究[J]. 延安大学学报(自然科学版),2008(2):62-66.
- [19] 邵清松,郭巧生,张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药,2009,40(12):1971-1975.

(该文作者还有姜德志,单位同第一作者。)

Analysis and Comparison of POD Isozyme for *Chrysanthemum* ‘Fubaiju’ and Eight Cultivars of *Chrysanthemum*

CHENG Hua^{1,2}, LI Lin-ling^{1,2}, YUAN Hong-hui^{1,2}, ZHANG Xin-ling³,
ZHENG Yong-sheng³, CHENG Shui-yuan^{1,2}, JIANG De-zhi^{1,2}

(1. Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratories, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Chemistry and Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 3. The Chrysanthemum Industry Association of Hubei, Macheng, Hubei 438331)

Abstract: In order to find out the genetic diversity of *Chrysanthemum* ‘Fubaiju’ and provide evidence for evaluation and exploitation of *Chrysanthemum* germplasm, peroxidase isozyme analysis of 9 germplasm from different habitats were analyzed by using polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE). POD isozyme patterns varied greatly among the species and varieties that studied by anglicizing their band distribute and zymogram distance. The results showed that there were more clear POD isozyme bands in leaf than stem. The leaf during vegetative growth stage was the best for POD research; the consanguinity of *Chrysanthemum* ‘Hanghuangju’, ‘Jinju(number 1)’, ‘Jinju(number 2)’ and ‘Hangxiaoyangju’ were very close, ‘Sheyangdabaiju’ and ‘Hangbaiju’ could return to a species. The consanguinity of *Chrysanthemum* ‘Fubaiju’, ‘Huangshangongjuhuanghua’ and ‘Hangminixiaojiuju’ were far to others, especially ‘Hangminixiaojiuju’ was very far to others. These study could be used as cultivar identification and protection on biochemical levels.

Key words: *Chrysanthemum* ‘Fubaiju’; medicinal *Chrysanthemum*; POD isozyme; genetic diversity