

# 青海东南部地区不同居群山丹百合 POD 同工酶分析

莫 帼 超<sup>1,2</sup>, 谢 国 斌<sup>2</sup>, 陈 奇<sup>2</sup>, 唐 道 城<sup>1</sup>

(1. 青海大学 高原花卉中心, 青海 西宁 810016; 2. 南充市园林管理处科研中心, 四川 南充 637000)

**摘 要:**以青海东南部地区 12 个不同居群山丹百合为试材, 采用垂直板凝胶电泳技术, 进行了过氧化物酶(POD)同工酶分析研究, 并对各居群间亲缘关系进行了探讨。结果表明:青海东南部地区 12 个居群山丹百合居群间的遗传相似度为 0.333~1.000, 平均遗传相似度为 0.6615, 居群间具有丰富的遗传多样性。互助县扎龙口乡居群的遗传变异最大, 乐都县引胜乡居群的遗传变异最小。同工酶标记聚类分析将山丹百合聚为三大类和 1 个独立类群。

**关键词:**青海东南部; 山丹百合; 过氧化物酶; 遗传关系

**中图分类号:**Q 813 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0108-03

同工酶是基因表达比较稳定的功能蛋白, 因此同工酶结构在一定程度上反映了基因的结构, 通过同工酶的多样性研究遗传多样性的本质是由生化表现型研究基因型的过程。Arzate<sup>[1]</sup>、Jeong 等<sup>[2]</sup>从鳞片贮藏蛋白和同工酶方面讨论了百合的多样性, 发现百合在蛋白质组分等方面存在丰富的遗传多样性。在国内, 周厚高等<sup>[3-4]</sup>、李雪等<sup>[5]</sup>、贾月慧等<sup>[6]</sup>、姚青菊等<sup>[7]</sup>、孙晓泽等<sup>[8]</sup>从生化的角度探讨了种群间、型间的遗传多样性, 发现不同种百合及同种不同群体百合间都存在丰富的遗传多样性。其中主要涉及的生化标记有等位酶分析, 蛋白质图谱分析以及同工酶分析。主要采用过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)、超氧化歧化酶(SOD)和多酚氧化酶(PPO)等同工酶进行了研究。山丹百合(*Lilium pumilum* DC.)即细叶百合, 属百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)卷瓣组多年生球根植物, 具有较高的食用、药用和观赏等经济价值。青藏高原气候独特, 是我国细叶百合的分布区之一, 青海省位于青藏高原的东南部, 具有丰富的山丹百合资源。但是随着近几年环境污染和人为破坏, 青海省山丹百合野生资源已遭到一定程度的破坏, 因此有必要开展相关方面的研究来有效指导山丹百合野生资源的保护和利用。该试验旨在了解青藏高原青海省东南部地区不同居群山丹百合的亲缘关系, 以期对资源保护和人工

开发应用山丹百合提供一定的理论依据和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

于 2009 年 7 月从青海省东部农业区及黄南藏族自治州等地收集引种 12 个居群的山丹百合(采集地及代号见图 1 注), 各居群间隔距离在 1 km 以上、相对隔离。居群内各单株间的水平距离在 20 m 以上, 海拔高度相差 5 m, 以尽可能避免收集样本间的亲缘关系。采样居群中心位置采用 GPS 全球卫星定位系统定位。采用离体培养技术保存该 12 个居群山丹百合进行 POD 同工酶分析。采用相同培养基配方(MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L)进行鳞片离体培养, 然后将诱导芽分别接入芽分化培养基(MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L)和生根培养基(1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L), 10 d 后, 当丛生芽上叶片展开并生长至 2~4 cm, 根生长至 2~4 cm 时, 取其叶片和根作为材料进行 POD 同工酶的分析。

### 1.2 试验方法

1.2.1 酶液的制备 称取各种源试管苗根端 1~3 cm 或新鲜叶片 0.3 g 左右, 分别置于预冷的研钵中, 加入样品提取液(Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0) 10 mL, 研成匀浆, 倒入 20 mL 离心管中, 于冰箱中 0~4℃浸提 30 min 后, 12 000 r/min 低温离心 15 min, 取其上清液, 加入 0.5% 溴酚兰溶液 3 滴和等体积的 40% 蔗糖溶液, 混匀, 贮于冰箱中 0~4℃备用。

1.2.2 POD 同工酶电泳及染色 参照胡能书等<sup>[9]</sup>、薛俊杰等<sup>[10]</sup>的方法, 采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术, 分离胶浓度为 7.5%(pH 8.9), 过硫酸胺化学聚合; 浓缩胶浓度为 3%(pH 6.7), 核黄素光聚合; 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统(pH 8.3), 采用 DYY 型稳压稳流电

**第一作者简介:**莫帼超(1987-), 女, 硕士研究生, 现主要从事园林规划及植物遗传多样性等研究工作。E-mail: mgc-chao@163.com.

**责任作者:**唐道城(1954-), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 现主要从事园林植物培育及遗传学等研究工作。E-mail: tangdaocheng6333@163.com.

**基金项目:**青海省科技厅资助项目(2011-GH-584)。

**收稿日期:**2013-04-18

泳仪在 4℃ 冰箱中,稳压 200 V 电泳 4 h 左右。待指示剂移至电泳槽底部时,停止电泳,将电泳完毕的凝胶放入染色液中染色约 30 min 左右,直至酶带清晰可见,用水冲洗数次。

### 1.3 数据分析

将图谱中出现酶带的记为 1,未出现酶带的记为 0。将 12 个野生百合的酶带记录数据录入 SPSS 11.0。采用 Dice 系数法对 12 个分类群(OUT)的过氧化酶带进行计算,得到 Dice 相似系数表。应用类间平均链锁法

(Between-groups linkage)进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 根和叶过氧化物同工酶的比较

从图 1 可以看出,组培苗叶的 POD 活性比根强,酶带数比根多,叶中的酶带数有 12 条,而根中的酶带数仅有 4 条,且酶带不易分辨。因此山丹百合组培苗 POD 分析的合适部位应为叶片。

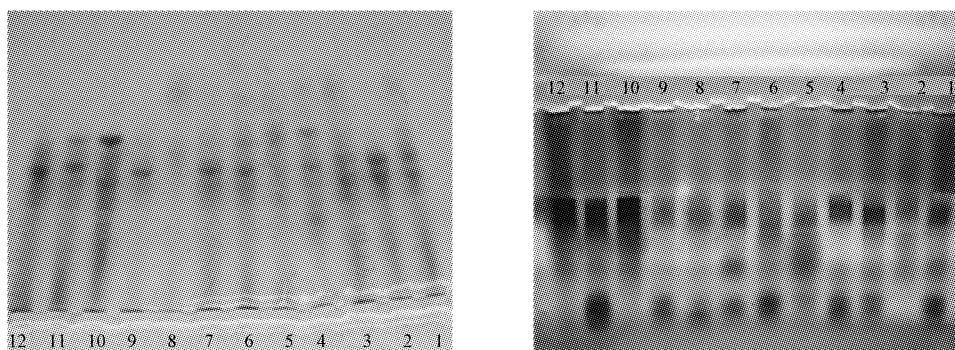


图 1 山丹百合组培苗根和叶 POD 酶谱比较(左图为根尖,右图为叶片)

注:数字 1~12 分别代表:兴海县大河坝乡(DH)、大通县宝库乡(BK)、化隆县沙加乡(SJ)、乐都县藏家峡乡(CJ)、互助县扎龙口村(ZL)、湟源县东峡乡(DX)、乐都县引胜乡(YS)、尖扎县要其乡(YQ)、门源县仙米乡(XM)、循化县文都乡(WD)、同仁县多哇乡(DW)、民和县西沟乡(XG)。

Fig. 1 POD bands in the roots and leafs in *L. pumilum*(left:roots;right:leafs)

Note: The number 1~12 stand for: Daheba township Xinghai county, Baoku township Datong county, Shajia township Hualong county, Zangji Xia township Ledu county, Zhalongkou township Huzhu county, Dongxia township Huangyuan county, Yinsheng township Ledu county, Yaoqi township Jianzha county, Xianmi township Menyuan county, Wendu township Xunhua county, Duowa township Tongren county, Xigou township Minhe county, respectively.

### 2.2 山丹百合的同工酶谱特征

12 个居群山丹百合组培苗叶片的 POD 酶共有 12 条迁移率不同的酶带(图 1 右)。不同居群山丹百合酶带数量、酶活性和迁移率  $Rf$  均有较大差异。其中循化县文都乡和民和县西沟乡居群的酶带数量最多,有 10 条谱带,其次为同仁县多哇乡居群;乐都县藏家峡乡居群的酶带数量最少,仅 3 条酶带。大多数居群的酶带数为 5~6 条。其中  $Rf1$ 、 $Rf2$ 、 $Rf7$  和  $Rf9$  酶带活性较强,为多数居群所共有,是 12 个居群山丹百合的基本酶带。其它 8 条酶带活性相对较弱,为一种或少数几种百合所特有,体现了各居群山丹百合之间的遗传差异。

12 条酶带中除  $Rf1$  和  $Rf7$  为 12 个居群的山丹百合所共有之外,其它 10 条酶带均为多态性酶带,各居群之间表现出明显差异。说明山丹百合各居群之间的遗传多样性极为丰富;POD 作为遗传标记,能较好的反应山丹百合居群间的差异。

### 2.3 同工酶图谱记录数据聚类分析

从表 1 和图 2 可以看出,在阈值 10 处,12 个居群被明显的聚为三大类和 1 个独立类群;第 1 类包括大通县宝库乡、门源县仙米乡、互助县扎龙口乡、湟源县东峡乡、乐都县引胜乡和乐都县藏家峡乡;第 2 类包括化隆

县沙加乡和尖扎县要其乡 2 个居群;第 3 类包括循化县文都乡、同仁县多哇乡和民和县西沟乡 3 个居群;第 4 类包括兴海县大河坝乡 1 个独立居群。

表 1 山丹百合 12 个居群 POD 标记 Dice 相似系数矩阵

Table 1 Matris of Dice similarity between populations of *Liliums* based on POD marker

居群	居群											
	DH	BK	SJ	CJ	ZL	DX	YS	YQ	XM	WD	DW	XG
DH	1.000											
BK	0.667	1.000										
SJ	0.400	0.727	1.000									
CJ	0.571	0.750	0.667	1.000								
ZL	0.667	0.400	0.364	0.500	1.000							
DX	0.667	0.800	0.727	0.750	0.400	1.000						
YS	0.600	0.727	0.667	0.667	0.545	0.909	1.000					
YQ	0.667	0.800	0.727	0.750	0.400	0.800	0.727	1.000				
XM	0.400	0.545	0.500	0.667	0.727	0.545	0.667	0.545	1.000			
WD	0.571	0.533	0.625	0.462	0.667	0.667	0.750	0.667	0.625	1.000		
DW	0.615	0.429	0.533	0.333	0.714	0.571	0.667	0.571	0.533	0.947	1.000	
XG	0.571	0.533	0.625	0.462	0.667	0.667	0.750	0.667	0.625	1.000	0.947	1.000

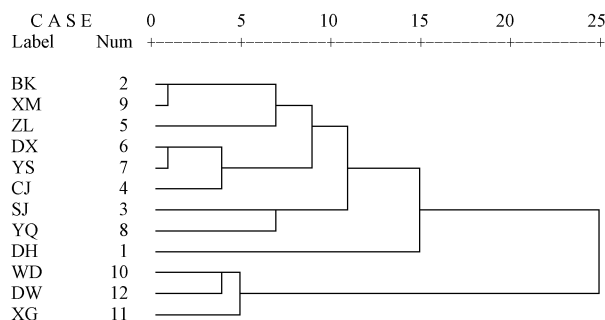


图2 山丹百合 12 个居群 POD 电泳图谱

Fig. 2 Electrophorogram of POD from the 12 *Liliums* populations

### 3 讨论

青海东南部地区 12 个居群山丹百合居群间的遗传相似度为 0.333~1.000, 平均遗传相似度为 0.6615, 居群间具有丰富的遗传多样性。采用 UPGMA 法, 将山丹百合的 12 个居群聚为 4 类(L=10)。从参试的 12 个居群山丹百合的平均遗传相似度可以看出, 互助县扎龙口乡居群和其余 11 个居群间的遗传变异最大, 遗传多样性水平最高, 亲缘关系最远, 平均遗传相似度为 0.5875; 其次是兴海县大河坝乡, 平均遗传相似度为 0.6163。与各居群遗传变异最小的是乐都县引胜乡, 平均遗传相似度为 0.7230, 说明乐都县引胜乡居群与各居群间的遗传

多样性水平最低, 亲缘关系最近。通过试验发现对于山丹百合组培苗而言, 叶片 POD 活性高于根系 POD 活性, 此结论与贾月慧等<sup>[6]</sup>的结论相反, 有待进一步证实。

### 参考文献

- [1] Arzate-Fernandez A M, Nakazaki T, Tanisaka T. Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium coneolor* and *L. longflorum* by *in vitro* ovary slice culture[J]. Plant Breeding, 1998, 117(5): 479-484.
- [2] Jeong J H, Kwon S T. Variations of morphological characteristics of *lilium hansonii* related with protein and isozyme bands[J]. Acta Hort, 1996, 414: 145-150.
- [3] 周厚高, 张西丽, 王中仁, 等. 几个百合品种遗传亲缘关系的等位酶分析[J]. 西南农业学报, 1999, 12(4): 92-95.
- [4] 周厚高, 周焱, 宁云芬, 等. 新铁炮百合自交初代遗传分化的等位酶分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(1): 72-78.
- [5] 李雪, 文婕英, 曾小英, 等. 百合属几种植物亲缘关系的可溶性蛋白质和过氧化物酶分析[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2005, 41(6): 58-60.
- [6] 贾月慧, 张克中, 王藏蕤, 等. 几种中国野生百合的过氧化物酶同工酶[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(2): 16-17.
- [7] 姚青菊, 夏冰, 彭峰, 等. 岷江流域王百合和通江百合多酚氧化酶同工酶的研究[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 92-96.
- [8] 孙晓泽. 沈阳地区 11 个东方百合品种几种同工酶的研究[J]. 科技情报开发与经济, 2007, 17(13): 203.
- [9] 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.
- [10] 薛俊杰, 张震云, 弓春瑞, 等. 几种木本豆科植物的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.

## Isozymes of Peroxidase Analysis Between Populations of *Lilium pumilum* DC. in Southeast Qinghai

MO Guo-chao<sup>1,2</sup>, XIE Guo-bin<sup>2</sup>, CHEN Qi<sup>2</sup>, TANG Dao-cheng<sup>1</sup>

(1. Plateau Flower Research Center of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. Landscape Management Service Research Center of Nanchong, Nanchong, Sichuan 637000)

**Abstract:** Taking 12 different populations of *L. pumilum* DC. collected from southeast Qinghai as materials, peroxidase (POD) in the leaves were studied by means of polyacrylamide gel slab electrophoresis. The genetic relationships were compared by clustering. The results showed that dice similarity between populations of *L. pumilum* based on POD marker were 0.333 to 1.000, average was 0.6615. Great diversities were showed between populations of *L. lilium*. in Zalong village Huzhu county had a highest variance, while in Yinsheng village Ledu county was the lowest. 12 populations were divided into 3 big groups and a respective population.

**Key words:** Southeast Qinghai; *Lilium pumilum* DC.; Peroxidase; genetic relationships