

## 岷江流域王百合和通江百合多酚 氧化酶同功酶的研究

姚青菊, 夏冰, 彭峰, 何树兰, 周康

(江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 应用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳技术, 对岷江流域王百合 3 个采样点的 14 个样品和通江百合 4 个采样点的 4 个样品的多酚氧化酶(PPO)同功酶进行了研究。结果表明, 两种百合的多酚氧化酶在种间和种内均有一定差异。酶谱的聚类分析在遗传相似系数约 0.5 处, 将两种百合 18 个样品分成 5 个类群, 其中王百合的 13 个样品聚成了 4 类, 样品 12 则与通江百合的 4 个样品聚成了 1 类; 5 个类群在外部形态上也呈现出相似性。

**关键词:** 王百合; 通江百合; 多酚氧化酶; 同功酶

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0092-05

## Study on polyphenol oxidase isozyme of *Lilium regale* and *Lilium sargentiae* in Minjiang River Valley

YAO Qing-ju, XIA Bing, PENG Feng,  
HE Shu-lan, ZHOU Kang

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Polyphenol oxidase(PPO)isozyme in 14 samples from 3 populations of *Lilium regale* and 4 samples from 4 populations of *L. sargentiae* in the Minjiang River Valley was tested by polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE). The results are stated as follows: There are some variations between inter and intraspecies of the two lilies; At the genetic similarity coefficient of 0.5, the 18 samples can be divided into 5 groups, 13 samples of *L. regale* belong to 4 groups, while a sample of *L. regale* and 4 samples of *L. sargentiae* belong to the fifth group. The morphological character also shows some resemblance to isozyme of PPO.

**Key words:** *Lilium regale*; *L. sargentiae*; polyphenol oxidase(PPO); isozyme

王百合(*Lilium regale*, 又名岷江百合)和通江百合(*L. sargentiae*)是百合属百合组的两个种, 仅产于我国四川省。王百合由英国著名植物学家 Wilson E. H. 在 1903 年发现于四川岷江地区, 并于 1905 年将其引种至英国和美国, 随即发展成为最流行的园艺栽培品种(McRae, 1998)。王百合植株高 80~120 cm, 强健耐寒, 花喇叭状, 芳香, 是重要的育种材料。作为父本, 王百合先后与通江百合 *L. sar-*

*gentiae*(*L. × imperiale* Wilson)、淡黄花百合 *L. sulphureum*(*L. × sulphureum*)、紫脊百合 *L. leucanthum* var. *centifolium*(*L. × centigale*)、卷丹 *L. lancifolium*(*L. × lancifolium* 'Pink Star') 等杂交产生了许多优良杂种, 美国还育成了金黄色的王百合品种 Royal Gold(龙雅宜等, 1998; Zhao 等, 1996)。通江百合也是 Wilson E. H. 在 1903 年发现于泸定通江河谷(McRae, 1998), 因容易使人误解为

收稿日期: 2004-09-12 修回日期: 2005-07-24

基金项目: 江苏省自然科学基金资助(BK2001152)[Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(BK2001152)].

作者简介: 姚青菊(1971-), 女, 陕西渭南人, 硕士, 工程师, 从事植物遗传多样性与物种保护研究, E-mail: <qingyujiao@21cn.com>.

本种产于四川通江地区,故《四川植物志》定名为“泸定百合”。本种植株高大,茎秆粗壮,株高达 120~150cm,花喇叭状,大而芳香。本种与王百合、湖北百合 *L. henryi*(*L. × aurelianense*)等所得的杂种在开花期、花色以及花形上都有很大的变异(龙雅宜等,1998;Zhao 等,1996)。在岷江流域野生百合资源的调查中,发现王百合和通江百合在当地分布范围较广,资源蕴藏量很大,并且随着其生境的不同在形态上有很大的变异,表现出典型的生态型差异;作为喇叭状大花类型的代表,在百合新品种选育上有很重要的价值。本文在野外资源调查、采集的基础上,对这两种百合的多酚氧化酶同功酶进行了分析,为保护和利用该两种百合资源提供了科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

两个百合种的 7 个不同居群,于 2001 年 7 月采自四川岷江流域的 7 个采样点。王百合以汶川为起点,沿岷江河谷向下游方向每 20 km 左右作为一个

取样点,随机采挖 20 个种球(间距 20 m 以上),共 3 个采样点(Sites R1,R2,R3);通江百合采样地点分别为岷江河谷(2 个取样点,Sites S1,S2)、大渡河(泸定县,1 个取样点,Sites S3)、青衣江(天全县,1 个取样点,Sites S4),采样方法同王百合。采集点气候、土壤等生态条件差异很大(表 1),据调查,汶川至都江堰仅相距 89 km,年降水量却从 600 mm 骤升至 1 200 mm 以上,王百合三个取样点之间的降水量差异在 100~200 mm 之间。通江百合取样地中,泸定降水量为 800 mm,天全 1 400 mm,都江堰 1 200 mm(四川省测绘局,1981);而各样点的土壤条件差异也明显,汶川县样点的土壤极为干燥,有呈莲座状生长的兰科植物分布。在降水量较高的地区,土壤的排水和透气性都比较好。

全部样品采回南京后,种球冷藏,至 9 月下旬种植于本所资源材料圃中,同时进行 PPO 同功酶分析,样品 1~5 取自王百合 Site R1;样品 6~10 取自王百合 Site R2;样品 11~14 取自王百合 Site R3;样品 15 取自通江百合 Site S1;样品 16 取自通江百合 Site S2;样品 17 取自通江百合 Site S3;样品 18

表 1 岷江流域王百合和通江百合采样地点与生境

Table 1 Sampling sites and habitat of *L. regale* and *L. sargentiae* in the MRDA

种 Species	采样点 Sampling sites	生境 Habitat
王百合 <i>L. regale</i>	汶川县城外山坡 Sites R1	坡度>60°;旱生草灌丛,伴生植物有羊蹄甲( <i>Baobinia kerrii</i> )、蒿属( <i>Artemisia</i> )植物以及一些耐旱性豆科植物,土壤为粉沙质壤土。
	汶川至都江堰 10 km 处 Sites R2	向阳山坡,坡度 30°~40°;灌木丛,伴生植物有黄护( <i>Cotinus coggygris</i> )、柃子( <i>Cotoneaster</i> )、羊蹄甲、铁线莲( <i>Clematis florida</i> )、花椒( <i>Zanthoxylum bungeanum</i> )、蒿属植物、禾草;土质疏松,石砾多,土壤为粗砂质土。
	汶川至都江堰 30 km 处 Sites R3	路旁山坡,30°~40°;灌木丛,伴生植物有羊蹄甲、柃子、锦鸡儿( <i>Caragana sinica</i> )、野蔷薇( <i>Rosa multiflora</i> )、荨麻( <i>Urtica thunbergiana</i> );土壤为粗砂质土。
通江百合 <i>L. sargentiae</i>	汶川至都江堰 45 km 处 Sites S1	生水沟边石缝中,伴生植物为荨麻科;土壤为岩石缝隙积聚的风化砂土。
	都江堰映秀镇 Sites S2	路边岩石上;伴生植物有铁线莲、木通( <i>Akebia quinata</i> )、蒿属;土壤为腐殖土。
	泸定沙湾大渡河边 Sites S3	山坡上,坡度约 50°;灌木丛,伴生植物有六月雪( <i>Serissa serissoides</i> )、合欢( <i>Albizia julibrissin</i> )、羊蹄甲、柃子、茅草;土壤为粉质砂质土,碎石多。
	天全紫石乡高家庄 Sites S4	山坡废耕地,坡度约 40°;伴生植物有醉鱼草( <i>Buddleja lindleyana</i> )、八角枫( <i>Alangium chinense</i> )、大青( <i>Clerodendrum cyrtophyllum</i> )、野牡丹( <i>Melastoma cadidum</i> )、魔芋( <i>Amorphophallus rivieri</i> )、柃子、悬钩子( <i>Rubus plamatus</i> )、盐肤木( <i>Rhus chinensis</i> )、拉拉藤( <i>Humulus scandens</i> )、绣球( <i>Hydrangea macrophylla</i> )、蕨类植物;土壤为砂质红壤。

取自通江百合 Site S4。

### 1.2 叶片 PPO 同功酶测定与分析

1.2.1 测定方法 参照何忠效等(1999)的方法。酶液制备:剪取各样品生长旺盛的全展功能叶片,各样品称取 0.5 g,分别剪碎后放入研钵中,加入 5 mL 的 Tris-Gly (pH8.3) 缓冲液,冰浴研磨成匀浆后,10 000 r/min、4 °C 冰冻离心 20 min,上清液即为酶

浸提液。制板:采用不连续聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳,其中分离胶浓度 7.5%,浓缩胶浓度 3%。加样:用微量加样器吸取 30 μL 酶浸提液,潜水加样。电泳:电极缓冲液为 Tris-Gly(pH8.3),在 4 °C 冰箱内进行电泳,起始电压为 90 V,待胶板上出现溴酚蓝色带后,将电压增至 140 V,直到溴酚蓝迁移到距胶板下端 1 cm 时,停止电泳。染色:凝胶放入染液中,来

回振荡 5~10 min, 酶带显出后记录酶谱并拍照。

1.2.2 数量分析方法 参照何平等(1996)同功酶数量分类方法, 根据酶谱带图, 以 Rf 值依次确定谱带名。按照各谱带的活性强弱, 分别给各谱带赋值, 方法如下: 谱带不出现, 赋值为 0; 谱带表现活性较弱, 赋值为 1; 谱带活性较强, 赋值为 2; 谱带活性强, 赋值为 3。应用 Jaccard 公式( $C_1 = a/(a+b)$ ),  $a$  为 2 个样品间共同拥有的带数,  $b$  为仅在一个样品中出现的带数总和), 计算样品间相似系数(遗传距离为  $D$

$= 1 - C_1$ ), 使用 UPGMA 法, 在 STATISTICA 软件中, 进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶片 PPO 同功酶酶谱特征

王百合与通江百合不同采集点 18 个样品功能叶片的 PPO 同功酶电泳图谱见图 1 和表 2。

由图 1 可见, 两个百合种的功能叶片中共出现

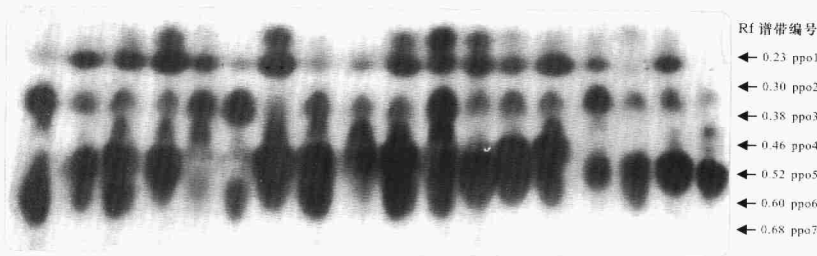


图 1 王百合与通江百合 18 个样品叶片 PPO 同功酶酶谱

Fig. 1 PPO isozyme bands in the lamina of 18 samples in *L. regale* and *L. sargentiae*

表 2 王百合与通江百合 18 个样品叶片 PPO 同功酶酶带模式图\*

Table 2 Sketch of PPO isozyme bands in the lamina of 18 samples in *L. regale* and *L. sargentiae*

谱带 Bands	Rf	样品 Sample																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ppo1	0.23																		
Ppo2	0.30																		
Ppo3	0.38																		
Ppo4	0.46																		
Ppo5	0.52																		
Ppo6	0.60																		
Ppo7	0.68																		

注: 表格中空白及符号“—”, “-”, “-”, “-”分别表示该谱带在该样品中未出现、活性较弱、活性较强、活性强。

Note: the symbols “—”, “-”, “-”, “-” indicate the band appeared in this sample thinly, mediocrly or heavily, and the blank didn't.

7 条 PPO 同功酶酶带, 其 Rf 值分别为 0.23、0.30、0.38、0.46、0.52、0.60、0.68 (分别记为谱带 ppo1、ppo2、ppo3、ppo4、ppo5、ppo6 和 ppo7)。可将其分为: 酶区 I (ppo1 和 ppo2)、酶区 II (ppo3 和 ppo4)、酶区 III (ppo5、ppo6 和 ppo7), 形成 3 个活性区域, 样品间活性差异很大。其中, ppo2、ppo3 和 ppo5 三条谱带为所有样品均出现, 但各样品间活性差异也很明显, 尤其是 ppo3, 表现为在样品 1、6、8、9 和 16、18 中活性均很小, 在样品 4、7、10、11、12、17 中活性均很大; ppo4 带, 以样品 1、5、6、11、14 为活性较大, 其他样品活性较小, 以样品 18 为最小; 而 ppo6 带在

大多数样品中均表现为活性很高, 只在样品 5、6 和 9 中活性表现较低。从两个百合种间比较来看, 通江百合 4 个样品功能叶片的 PPO 同功酶谱表现一定的特征性: ppo1、ppo4、ppo5 和 ppo7 活性很低或没有; 而王百合 14 个样品间变化很大。

### 2.2 样品的遗传分类及其亲缘关系

根据 PPO 同功酶酶谱中各谱带的出现几率和活性强弱表现, 绘制 18 个样品的 PPO 同功酶谱带模式图, 见表 2。为进一步分析两个百合资源 18 个样品间的亲缘关系, 按照数据赋值方法, 采用相似系数聚类分析法, 对王百合和通江百合 18 个样品进行

分类,得到结果如图 2。

从聚类图上看,在遗传相似系数 0.5 处,可将王百合和通江百合 18 个样品分为 5 类群,对各类群的形态特征进行比较,可以发现(表 3):通江百合 4 个采集地的样品全部集中于第三类群中,而且形态特征差异不大,说明该种的遗传较稳定,尽管分布较广,但生态型分化较少;而王百合的 3 个采集地的 14 个样品,分布在 5 个类群别中,但形态特征仍然以采样点(居群)间差异为显著,同一采样点的样品间差异较小。说明该种的遗传变异较大,生态类型丰富。其中比较特殊的是第二类群的样品 2 和第四类群的样品 9,样品 2 表现为在 18 个样品中无论鳞茎宽度、地上茎高和粗壮程度、花径等均为最大,而样品 9 在 14 个王百合样品中表现为最小值;第五类群样品 3、4、7、8、10、11、14 和第一类群样品 1、5、6 形态表现基本相同,反映出 3 个采样点(居群)的代表性特征,即第一采样点的样品形态指标值均显著大于(或区别于)第二和第三采样点的样品,后两个

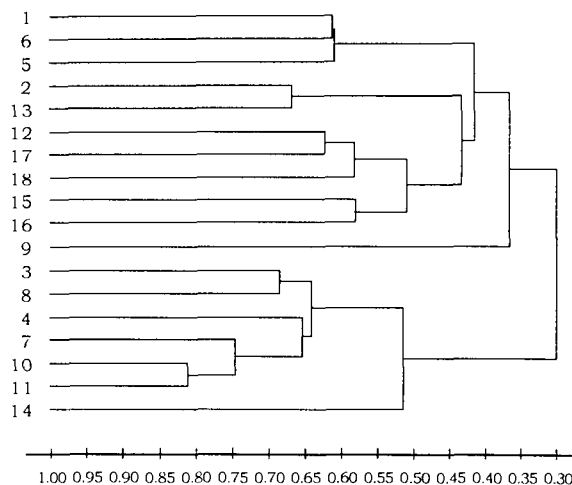


图 2 王百合和通江百合 18 个样品的 PPO 同功酶酶谱相似系数聚类图

Fig. 2 Association among 18 samples of *L. regale* and *L. sargentiae* by cluster analysis with similarity coefficient of PPO isozyme bands

表 3 王百合与通江百合 18 个样品分类与形态特征

Table 3 Classification and morphology of 18 samples in *L. regale* and *L. sargentiae*

类别 Classification	样品号 Sample number	形态特征 Morphological character
第一类 Group 1	1、5、6	(1)样品 1 和 5:鳞茎大,圆形,球宽 9.2cm,鳞片紫红色。地上茎健壮,高 120cm。灰绿色,具紫色斑点。叶多散生,狭长。花径 12.8cm,喇叭形,白色,喉部黄色,花被外面略带红紫晕。 (2)样品 6:鳞茎卵圆形或梨形,球宽 5.5cm,鳞片紫红色。地上茎 65~75cm。茎灰绿色到绿色,叶散生,狭长。花喇叭形,白色,花径 7.8~8.9cm。
第二类 Group 2	2、13	(1)样品 2:鳞茎最大,圆形,球宽 9.9cm、地上茎高达 131cm,花径 13.8cm。 (2)样品 13:鳞茎宽 5.0cm;地上茎 72cm。花径 8.2cm。
第三类 Group 3	12、15、16、17、18	(1)样品 12:鳞茎宽 5.1cm,地上茎绿色,高 77cm;花径 8.3cm。 (2)样品 15、16、17、18:鳞茎圆形,球宽 4~5cm,鳞片浅紫红色,基部黄色;茎绿色,高 90~100cm,上部叶腋处有深绿色或黑色珠芽;花喇叭形,白色略带紫红,雄蕊紫色,花径 7.2~8.1cm。
第四类 Group 4	9	样品 9:鳞茎特别小,仅 4.3cm,茎高 57cm,花径 7.7cm。
第五类 Group 5	3、4、7、8、10、11、14	(1)样品 3 和 4:鳞茎,圆形,球宽 9cm,鳞片紫红色。地上茎健壮,高 120cm。灰绿色,具紫色斑点。叶极多,散生,狭长。花大,径 12.7~13.4cm,喇叭形,白色,喉部黄色,花被外面红紫色。 (2)样品 7、8、10、11 和 14:鳞茎卵圆形或梨形,球宽 4.5~5.5cm,鳞片紫红色或上部紫红色,下部黄色。地上茎 65~75cm。茎灰绿色到绿色,叶散生,狭长。花喇叭形,白色,花径 7.8~8.9cm。

采样点间无显著差异。

### 3 结论与讨论

同功酶分析作为一种普遍应用的遗传标记技术,在了解植物天然居群的遗传结构,探索种内遗传多样性、种间遗传关系等方面有较好的效果(王中仁,1996)。多酚氧化酶同功酶在其他物种的分类研究中有较多应用,效果较好(区炳庆等,2003)。多酚

氧化酶(PPO)是百合中较重要的酶之一,对百合鳞茎贮藏过程中品质生理(蒋益虹,2003)和生长发育过程中抗逆性以及花色形成(McRae,1998),具有重要作用。

本文对两个百合种的叶片多酚氧化酶同功酶做了初步研究,发现王百合与通江百合多酚氧化酶在不同的居群内和居群间都显示了一定的变异。通过相似系数法聚类分析,发现岷江流域 7 个采集点(居群)的野生王百合和通江百合可分为 5 个类群,王百

含有 50% 的样品集中在第五类群, 还有 50% 的样品则分布于其他 4 个类群中, 而且王百合样品 12 正好与通江百合 4 个样品一起, 全部集中于第三类群中。究其原因, 可能是本研究中的通江百合(4 个种质资源) 的种性纯度要高于王百合(14 个种质资源); 也可能是王百合生态型分化多, 类型比较丰富, 居群间差异较大, 随着生态条件的改变而变化更大。

另外, 通过比较 5 个类群的样品形态特征, 发现通江百合的种内差异也较小, 而王百合则表现为在同一个采样点(居群) 中, 尽管样品的多酚氧化酶同工酶差异较大, 但多数样品的形态特征比较接近, 形态特征差异主要表现在采样点间。与多酚氧化酶同工酶差异表现相似的是, 在第二类群和第四类群的王百合样品中, 不但分布的样品数目少, 第二类群中只有样品 2 和 13, 第四类群中只有样品 9, 而且最大的特点是, 样品 2 的鳞茎宽度、地上茎高、花径等各指标值在所有样品中均为最大, 而单独分布在第四类的样品 9 则表现为各指标值为最小。这对进一步分析王百合的遗传多样性具有一定意义。

#### 参考文献:

王中仁. 1996. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社.

四川省测绘局. 1981. 四川省地图集[M]. 成都: 四川省测绘局出版, 253—263.

何忠效, 张树政. 1999. 电泳[M]. 北京: 科学出版社(第二版), 286—298.

He P(何平), Tan F(谈锋). 1996. Numerical analysis of isozyme variation within and among the population of *Deutzia multiradiata* (多辐洩疏群体同工酶变异的数量分析)[J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 18(2): 167—175.

Jiang YH(蒋益虹). 2003. Study on relationship between lily browning and activities polyphenol oxidase and peroxidase (百合褐变与多酚氧化酶和过氧化物酶活性关系的研究)[J]. *J Univ(Agric Life Sci)* (浙江大学学报(农业与生命科学版)), 29(5): 518—522.

Long YY(龙雅宜), Zhang JZ(张金政). 1998. The conservation and utilization of lily plant resources(百合属植物资源的保护与利用)[J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境), 7(10): 40—44.

McRae EA. 1998. Lilies [M]. Portland, Oregon: Timber Press.

Ou BQ(区炳庆), Ren JJ(任吉君), He LL(何丽兰). 2003. Comparative study of isozymes peroxidase and polyphenol oxidase in the cultivars of pumpkin(不同品种南瓜 POD 及 PPO 同工酶的比较研究)[J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 21(1): 77—80.

Zhao XY, Chen XL, Li DM, et al. 1996. Resources and research situation of the genus *Lilium* in China[J]. *Acta Hort*, 414: 355—361.

(上接第 48 页 Continue from page 48)

系统养分循环中的作用)[J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 19(2): 30—35.

Lowman MD. 2001. Plants in the forest canopy: some reflections on current research and future direction[J]. *Plant Ecol*, 153: 39—50.

Lowman MD, Rinker HB. 2004. Forest Canopies 2nd Edition [M]. USA Academic Press.

Luttge U (ed). 1989. Vascular plants as epiphytes: evolution and ecophysiology[M]. Springer-Verlag.

Madison M. 1977. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features[J]. *Selbyana*, 2: 1—13.

Nadkarni N. 1984. Epiphytes biomass and nutrient capital of a neotropical elfin forest[J]. *Biotropica*, 16: 249—257.

Nadkarni NM, Merwin MC, Nieder J. 2001. Forest canopies plant diversity[J]. *Encyclopedia of Biodiversity*, 3: 27—40.

Nadkarni NM, Schaefer D, Matelson TJ, et al. 2004. Biomass and nutrient pools of canopy and terrestrial components in a primary and a secondary montane cloud forest, Costa Rica [J]. *Forest Ecol Management*, 198: 223—236.

Silvola J, Aaltonen H. 1984. Water content and photosynthesis in peat mosses *Sphagnum fuscum* and *S. angustifolium* [J]. *Annual Bot Fennic*, 21(1): 1—6.

Wolf JHD. 1993. Diversity patterns and biomass of epiphytic bryophytes and lichens along an altitudinal gradient in the Northern Andes[J]. *Annual Missouri Bot Garden*, 84: 928—960.

Zhang ZH(张朝辉), Wang CL(王承录), Wang ZH(王智慧). 1997. A preliminary survey of the bryophytes in the Mountain Yuntai Karst forest area, Shibing County, Guizhou Province(贵州施秉云台山喀斯特地区苔藓植物初步调查)[J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), 15(1): 70—76.