

## 禾本科牧草的同工酶分析

李万良

(中国科学院植物研究所, 北京)

**摘要** 本文分析了23种禾本科牧草的酯酶同工酶和过氧化物酶同工酶。结果表明, 如果统一取材标准及实验条件严格, 酶谱资料是稳定可比较的, 有一定的系统分类价值。酶谱并结合其它资料证明了成立鼠茅属(*Vulpia*)的合理性。酶谱资料还表明, 黑麦草属(*Lolium*)可能是小麦族和羊茅族相互联系的桥梁。根据酶谱距离的资料, 讨论了小麦族的某些属间关系。例如, 作者发现, 酶谱资料显示出鹅观草属与披碱草属、赖草与披碱草属之间有更近的亲缘关系。

**关键词** 禾本科; 同工酶

在禾本科中, 不同的作者先后报道了山羊草、小麦、黑麦、高粱、玉米及水稻等作物的过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶研究<sup>[1, 3, 4, 6, 8, 9]</sup>。但这些研究多偏重于与远缘杂交及作物育种相联系的各个方面。禾本科牧草的同工酶, 尤其是应用于植物系统分类的研究报道不多。本文用垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析了部分禾本科牧草的过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶, 以期帮助解决某些系统分类问题, 同时希望同工酶资料能为禾本科牧草的遗传改良提供依据。

### 一、材料与 方法

#### (一) 材料

供试材料系野生及栽培的禾本科牧草, 共23种。详见表3。

#### (二) 方法

##### 1. 样品制备

牧草种子在25℃温箱中使其萌发, 然后将萌发的幼苗转移到温室内, 在相同条件下加自来水培养, 所有的材料均自胚芽突破胚芽鞘后生长7天, 称取7天龄除根后的幼苗于-15℃的冰箱中固定1—24小时, 然后按1:1(W/V)加电极缓冲液(6g Tris, 28.8g Gly溶于1000ml蒸馏水)于冰浴中磨成糊状, 两层纱布过滤, 过滤液于10000转/分下离心10分钟, 取上清液加等体积40%蔗糖, 于4℃冰箱中保存备用。

##### 2. 电泳

垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用碱性缓冲系统。分离胶浓度为7.5%, 间隔胶2.5%。电流30mA, 电泳4—5小时。

##### 3. 染色

###### ①酯酶同工酶

染色液: 50mg  $\alpha$ -乙酸萘脂, 50mg  $\beta$ -乙酸萘脂用1:1的丙酮:水2ml溶解, 再加100mg 坚牢兰, 然后用0.1M pH 6.3的磷酸缓冲液稀释到150ml。

染色: 电泳后取出分离胶经蒸馏水漂洗后, 在25℃下与染色液保温, 1—1.5小时后区

表1 部分禾本科牧草过氧化物酶同工酶Rf值

Table 1 The peroxidase isoenzyme Rf value of some forage grasses

种名 Species name	酶带: Rf值 enzyme bands: Rf value				
老芒麦 ( <i>Elymus sibiricus</i> )	1:0.085	6:0.211	10:0.324	11:0.352	12:0.437
披碱草 ( <i>E. dahuricus</i> )	4:0.155	6:0.211	9:0.310	11:0.352	12:0.437
紫芒披碱草 ( <i>E. purpura-ristatus</i> )	6:0.211	10:0.324	11:0.352		
羊草 ( <i>Leymus chinense</i> )	3:0.141	6:0.211	8:0.282		
无芒雀麦(内蒙) ( <i>Bromus inermis</i> ) (Inner Mongolia)	3:0.141	7:0.268			
无芒雀麦(北京) ( <i>B. inermis</i> ) (Beijing)	2:0.10	3:0.141	7:0.268		
鼠茅 ( <i>Vulpia myuros</i> )	15:0.620	16:0.644	17:0.704		
多花黑麦草 ( <i>Lolium multiflorum</i> )	6:0.211	13:0.493	14:0.535		
草原羊茅 ( <i>Festuca pratensis</i> )	3:0.141	5:0.169	13:0.493		
苇状羊茅 ( <i>F. arundinacea</i> )	3:0.141	5:0.169	13:0.493		
高羊茅 ( <i>F. elata</i> )	3:0.141	12:0.437	13:0.493		

带呈桃红色。染色后的凝胶用5%乙酸固定。

#### ②过氧化物酶同工酶

染色液: 100mg联苯胺加少量无水乙醇溶解, 用100 ml pH5.0的0.1M乙酸-乙酸纳缓冲液稀释后加几滴30%  $H_2O_2$ 。

染色: 分离胶经蒸馏水漂洗后在30℃下染色40分钟, 区带呈褐色。凝胶染色后用5%乙酸固定保存。

## 二、结果与讨论

将同工酶带以 Rf 为特征, 记下带数。酶带的强度(活性)则根据带谱颜色出现的早晚或深浅估定。种间或属间比较引用了胡志昂等酶谱隔离 (zymogram distance) 概念<sup>[2]</sup>。表 1—2 表示了部分禾本科牧草酯酶同工酶及过氧化物酶同工酶的 Rf 值。

从形态及血清等特征看, 羊茅属是一个比较自然的类群。这个观点从本文过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶的研究得到了印证。羊茅属共分析了三个种。其中草原羊茅与苇状羊茅酶谱在质上没有明显差异, 在量上的差异仅表现在酶活性大小上。苇状羊茅和高羊茅过氧化物酶同工酶仅有两条带不同。酯酶同工酶情况基本相似。因而, 如果不考虑分析种类较少而产生的代表性问题, 则从同工酶观点可以认为羊茅属是一个比较自然的类群。同工酶证据亦表明披碱草属可能是一个自然的类群。

鼠茅 (*Vulpia myuros*) 是株高仅 35—60 cm 的细弱一年生禾草。这个种原先一直作为羊茅属的一个组的成员来处理。后因一些学者强调一年生, 雄蕊 1 枚而不同于羊茅属多年生、雄蕊 3 枚的其它种类, 从而将包含鼠茅在内的这个组从羊茅属中分出成立鼠茅属 (*Vulpia*)。形态上的演化直接体现在酶分子水平上: 从表 1 可以看出, 鼠茅的过氧化物酶同工酶多为阳极酶 (Rf 值偏高), 共 3 条带。羊茅属 3 个种虽也是 3 条酶带, 但无论 Rf 值或带活性强度均不同于鼠茅。酯酶同工酶的情况比较类似。鼠茅的酯酶同工酶共 4 条带, 但完全不同于羊茅属成员。这个结果表明, 同工酶证据支持形态学的观点。作者对鼠茅及羊茅属其它种类的颖果形态进行了观察, 发现鼠茅颖果的形状、长/宽比等性状明显不同于羊茅属其它种类。以上证据证明把鼠茅组 (Sect. *Vulpia*) 从羊茅属中分出单独成属的观点是合理的。

从过氧化物酶同工酶上看, 多花黑麦草 (*Lolium multiflorum*) 共有 3 条带, 其中一条 (Rf = 0.211) 同小麦族某些成员的一条带 (Rf = 0.211) 相似, 另一条酶带 (Rf = 0.493) 同羊茅属的一条带相似。这个结果似乎说明, 黑麦草属 (*Lolium*) 可能是小麦族和羊茅族相互联系的桥梁。从形态上看, 黑麦草属具有与小麦族相似的穗状花序, 故在传统的分类系统中曾把该属作为小麦族的一个亚族处理。但在一些生化特征上, 黑麦草属不同于小麦族, 例如黑麦草属胚乳的淀粉粒是复合类型, 而小麦族胚乳淀粉粒则是简单类型。相反, 黑麦草属具有与羊茅属一致的糖份, 血清关系上两属也比较接近 (作者, 1988, 印刷中), 尤其是黑麦草属能与羊茅属植物杂交产生杂种这一事实, 导致许多学者将黑麦草属从小麦族中移出并并入到羊茅族中。这些事实说明黑麦草属兼具了小麦族及羊茅族某些方面的特点, 形态学的这个特征也反映在同工酶上。

披碱草属酯酶同工酶的一条酶带 Rf = 0.129 迁移率及活性在不同材料间均比较稳定, 这条带似乎可看作是此属的标志带 (marker band)。除了标志带外, 该属不同种间材料的差异有的表现在酶带数目上, 有的则表现在酶带活性强度上。值得注意的是, 赖草 (*Leymus secalinus*) 也具有 Rf = 0.129 这条酶带。这个结果似乎说明赖草属 (*Leymus*) 与披碱草属 (*Elymus*) 可能有较近的亲缘关系。过氧化物酶同工酶反映的情况比较类似。披碱草属有两条带 (Rf = 0.211, Rf = 0.352) 较为稳定, 同时赖草属另一个种——羊草 (*Leymus chinense*) 也具有活性较近的 Rf = 0.211 带。这又从另一侧面说明了赖草属与披碱草属较近

表2 部分禾本科牧草酯酶同工酶Rf值

Table 2 The esterase isoenzyme Rf value of some forage grasses

种 名	酶带: Rf值				
species name	enzyme bands: Rf value				
老 芒 麦 ( <i>Elymus sibiricus</i> )	1:0.219	5:0.200	17:0.360	27:0.471	31:0.587
	35:0.643	41:0.686			
披 碱 草 ( <i>E. dahuricus</i> )	1:0.219	12:0.314	19:0.386	25:0.457	28:0.486
	29:0.514	37:0.657	43:0.714	49:0.757	
紫芒披碱草 ( <i>E. purpurc tristatus</i> )	1:0.219	12:0.314	19:0.386	25:0.457	28:0.486
	29:0.514	37:0.657	43:0.714	49:0.757	
赖 草 ( <i>Leymus secalinus</i> )	1:0.219	8:0.257	19:0.386	25:0.457	40:0.679
	43:0.714	53:0.786			
羊 草 ( <i>L. chinense</i> )	12:0.314	35:0.643	41:0.686	47:0.743	
扁穗雀麦 ( <i>Bromus uniloides</i> )	3:0.164	23:0.421	34:0.629	40:0.679	
无芒雀麦 ( <i>B. inermis</i> )	7:0.243	11:0.300	29:0.514	39:0.671	45:0.729
	51:0.771				
多花黑麦草 ( <i>Lolium multiflorum</i> )	8:0.257	21:0.414	28:0.486	39:0.671	
鼠 茅 ( <i>Vulpia myuros</i> )	12:0.314	14:0.357	21:0.414	39:0.671	
草原羊茅 ( <i>Festuca pratensis</i> )	10:0.286	24:0.430	27:0.471	29:0.514	
荩状羊茅 ( <i>F. arun dinacea</i> )	7:0.243	10:0.286	24:0.430	27:0.471	29:0.514
蒭 草 ( <i>Phalaris arundinacea</i> )	13:0.333	24:0.430			
莠 麦 ( <i>Avena nuda</i> )	13:0.333	20:0.389	33:0.625	50:0.764	
小 糠 草 ( <i>Agrostis stolonifera</i> )	18:0.375	22:0.417	28:0.486	36:0.653	
水 蔗 草 ( <i>Apluda mutica</i> )	46:0.736				
非洲狗尾草 ( <i>Settaria anceps</i> )	4:0.167	20:0.389	28:0.486	29:0.514	30:0.556
金色狗尾草 ( <i>S. glauca</i> )	26:0.458				
马 唐 ( <i>Digitaria sanguinalis</i> )	4:0.167	30:0.556	32:0.597	33:0.625	42:0.708
	48:0.750	50:0.764	54:0.792	56:0.819	58:0.860

续表 2

种 名	酶带 · Rf 值				
黍 ( <i>Panicum miliceum</i> )	18:0.375	38:0.667	44:0.722	52:0.778	56:0.819
拟高粱 ( <i>Sorghum propinquum</i> )	2:0.139	16:0.361	42:0.708		
稗 ( <i>Echinochloa crusgalli</i> )	9:0.264	16:0.361	29:0.500		
玉 米 ( <i>Zea mays</i> )	6:0.236	33:0.625	36:0.653	46:0.736	55:0.806
高羊茅 ( <i>F. elata</i> )	7:0.243	10:0.286	24:0.430	27:0.471	29:0.514

## 的亲缘关系。

为了了解某些属间亲缘关系,作者选择酶谱较典型的糙毛鹅观草代表鹅观草属(*Roegneria*),老芒麦(*Elymus sibiricus*)代表披碱草属(*Elymus*),沙生冰草(*Agropyro desertorum*)代表冰草属(*Agropyron*),求得属间酶谱距离。结果见表 4。从属间酶谱距离可以看出,鹅观草属与披碱草属关系较近(属间酶谱距离是 0.56),而鹅观草属与冰草属之间及冰草属与披碱草属之间(属间酶谱距离分别是 0.71, 0.75)关系较远。不仅同工酶方面,在形态学上,鹅观草属与披碱草属也显示了一定的亲缘关系。郭本兆等<sup>[6]</sup>根据花序演化理论认为,鹅观草属中的短柄组(*Sect. Brevipes*)的一些种类,虽然花序外表为每节具一小穗的穗状花序,但其小穗的两颖与第一外稃和小穗轴三者不在同一平面上,显然是披碱草属中一些种类演化而来的。即鹅观草属中的具假单生小穗的种类与披碱草属的真披碱草组具亲缘关系。

图 2 表明,来自不同地点(内蒙和北京)的无芒雀麦种子在相同条件下形成的一周龄幼苗,其过氧化物酶同工酶谱有一些差异,但种的标志带比较稳定。因此,我们在进行系统分析时,应考虑种内变异的存在,注意选择种的标志带进行种间比较。

作者从自己的工作及文献中注意到,虽然早熟禾亚科与黍亚科在同工酶分化上没有明显差异,但黍亚科的种类似乎阳极酶偏多,酯酶同工酶及过氧化物酶同工酶集中分化在阳极区。早熟禾亚科的同工酶多分化在阴极区,在阳极区变异较少。张宏斌(1985,待发表)关于高粱属叶片酯酶同工酶、黄柄权等<sup>[6]</sup>关于水稻叶片酯酶同工酶及许多学者在玉米中的工作都显示了以上分化趋势。吴郁文等<sup>[11]</sup>(1981)关于小麦、黑麦及小黑麦属乳熟末期胚乳的酯酶同工酶也显示了在阳极区酶谱比较稳定、变异较少、主要差异在阴极区。实际上,早熟禾亚科与黍亚科自小穗特征、染色体大小和基数、胚比和胚胎解剖特征、叶片解剖特征、幼苗类型、淀粉粒等许多方面都表现出明显差异。故在同工酶谱上显示出黍亚科的种类主要差异在阳极区、早熟禾亚科的种类主要差异在阴极区的分化是可以理解的。但这一猜测尚需用广泛的材料加以证实。

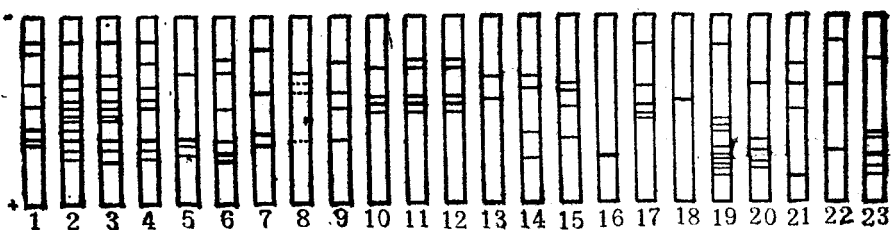


图1 部分禾本科牧草的酯酶同工酶图谱

Fig.1 The esterase isoenzyme zymograms of some forage grasses.

1. *Elymus sibiricus* 2. *E. dahuricus* 3. *E. purpuraristatus*
4. *Leymus secalinus* 5. *L. chinense* 6. *Bromus inermis*
7. *B. uniloides* 8. *Vulpia myuros* 9. *Lolium multiflorum*
10. *Festuca pratensis* 11. *F. arundinacea* 12. *F. elata*
13. *Phalaris arundinacea* 14. *Avena nuda* 15. *Agrostis stolonifera*
16. *Apluda mutica* 17. *Setaria anceps*
18. *S. glauca* 19. *Digitaria sanguinalis* 20. *Panicum miliaceum*
21. *Sorghum propinquum* 22. *Echinochloa crusgalli* 23. *Zea mays*

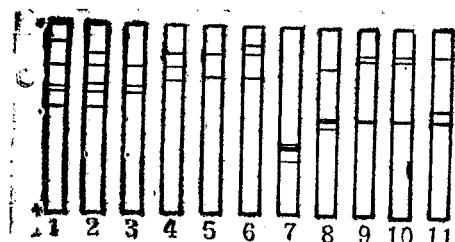


图2 部分禾本科牧草的过氧化物酶同工酶图谱

Fig.2 The peroxidase isoenzyme zymograms of some forage grasses.

1. *Elymus sibiricus* 2. *E. dahuricus* 3. *E. purpuraristatus*
4. *Leymus chinense* 5. *Bromus inermis* (Inner Mongolia)
6. *Bromus inermis* (Beijing)
7. *Vulpia myuros* 8. *Lolium multiflorum*
9. *Festuca pratensis* 10. *F. arundinacea*
11. *F. elata*

表3 材料来源  
Table 3 Origin of the materials

中 名 chinese name	学 名 scientific name	种子来源 origin of seeds
老芒麦	<i>Elymus sibiricus</i>	内蒙
紫芒披碱草	<i>E. purpuraristatus</i>	内蒙
披碱草	<i>E. dahuricus</i>	内蒙
赖草	<i>Leymus secalinus</i>	内蒙
羊草	<i>L. chinense</i>	内蒙
扁穗雀麦	<i>Bromus uniloides</i>	福建
无芒雀麦	<i>Bromus inermis</i>	北京
无芒雀麦	<i>Bromus inermis</i>	内蒙
多花黑麦草	<i>Lolium multiflorum</i>	北京
鼠茅	<i>Vulpia myuros</i>	河北
草原羊茅	<i>Festuca pratensis</i>	北京
苇状羊茅	<i>F. arundinacea</i>	北京
高羊茅	<i>F. elata</i>	美国
蒺藜草	<i>Phalaris arundinacea</i>	北京
莠麦	<i>Avena nuda</i>	内蒙
小糠草	<i>Agrostis stolonifera</i>	北京
水蔗草	<i>Apluda mutica</i>	福建
非洲狗尾草	<i>Setaria anceps</i>	福建
金色狗尾草	<i>S. glauca</i>	福建
马唐	<i>Digitaria sanguinalis</i>	福建
黍	<i>Panicum miliaceum</i>	内蒙
拟高粱	<i>Sorghum propinquum</i>	福建
稗	<i>Echinochloa crusgalli</i>	内蒙
玉米	<i>Zea mays</i>	北京

表 4 鹅观草属、披碱草属和冰草属的属间酶谱距离\*  
Table 4 Generic zymogram distances of *Roegneria*, *Elymus*  
and *Agropyron*

属间关系 <i>generic relation</i>	<i>Roegneria</i> <i>Elymus</i>	<i>Roegneria</i> <i>Agropyron</i>	<i>Elymus</i> <i>Agropyron</i>
酯酶同工酶 <i>esterase isoenzyme</i>	0.56	0.71	0.75

\* 引用朱光华等部分资料, 作者谨致谢意。

禾本科牧草酯酶同工酶及过氧化物酶同工酶在质(酶带数目和迁移率)和量(酶活性)上的差异是了解材料之间遗传变异、鉴定不同材料及筛选优良杂种和品种的物质基础, 了解亲缘关系和类群划分也有一定意义。

#### 参 考 文 献

- (1) 吴郁文等, 1981: 小麦、黑麦和小黑麦酯酶同工酶的比较研究。遗传学报, 8(4): 380—385。
- (2) 胡志昂等, 1983: 裸子植物的生化系统学—松科植物的过氧化物酶。植物分类学报, 21(4): 423—432。
- (3) 李继耕等, 1980: 栽培玉米起源的同工酶研究。遗传学报, 7(3): 223—234。
- (4) 周泽其等, 1983: 青藏高原栽培大麦与近缘野生大麦的核型与酯酶同工酶分析。遗传学报, 10(2): 203—208。
- (5) 郭本兆等, 1981: 我国小麦族花序的形态演化及其属间关系的探讨。西北植物研究, 1(1): 12—19。
- (6) 黄柄权等, 1983: 水稻酯酶同工酶Est3位点的遗传。遗传学报, 10(6): 459—464。
- (7) Coffon, R. et al., 1977: Morphological and anatomical variation of *Vulpia* (Gramineae). Bot. Notiser 130: 173—187.
- (8) Shahi, B. et al., 1969: A survey of variations in peroxidase, acid phosphatase and esterase isozymes of wild and cultivated *Oryza* species. Japan. J. Genet. 44: 303—319.
- (9) Sing, C. F. et al. 1969: Isozymes of a polyploid series of wheat. Genetics 61: 391—398.

## THE ISOENZYME ANALYSES OF SOME FORAGE GRASSES

Li Wanliang

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

**Abstract** The peroxidase and esterase isoenzymes of 23 forage grasses were analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. The results show the zymogram data are stable and comparable and are of value for plant systematics and classification if the experiment conditions are strictly controlled and the material collected are in the same developmental stage. The zymogram evidences and other data such as morphology, etc., support the taxonomical treatment, e.g., to split *Festuca* into two separate genera: *Vulpia* and *Festuca*. The author guesses *Lolium* is probably an intermediate taxa connecting tribe *Triticeae* with *Festuceae* according to zymogram and Hu's "zymogram distance" data. The systematic position and generic relationships of some genera in *Triticeae* were also discussed, for example, the author discovered the systematic relationships between *Roegneria* and *Elymus* and between *Leymus* and *Elymus* are probably very close.

**Key words** *Gramineae*; isoenzyme