

大别山区六种黄精属植物的五种同工酶分析

陈存武¹, 周守标^{2*}

(1. 皖西学院 化学与生命科学系, 安徽 六安 237012; 2. 安徽师范大学 生命科学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对皖西大别山区六种黄精属植物的抗坏血酸氧化酶(AOD)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、酯酶(EST)和过氧化物酶(POD)五种同工酶进行了比较分析。结果表明:(1)五种同工酶共显示出66条酶带,其中有3条是黄精属的特征酶带;并且来源于不同种的同一种酶的谱带数、相对迁移率、酶活性均不相同,呈现多样性;(2)五种同工酶谱的模糊聚类分析结果与形态学分类的结果一致,利用酶谱差异可以将六种黄精初步区分;(3)在六种黄精属植物中,湖北黄精、轮叶黄精、多花黄精和金寨黄精是较进化类型,玉竹和长梗黄精是较原始类型。

关键词: 黄精属; 同工酶; 模糊聚类分析; 特征酶带

中图分类号: Q945, Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2006)04-0395-05

Isoenzyme pattern analysis for five kinds of enzyme in six species of *Polygonatum* from Dabieshan Mountain

CHEN Cun-wu¹, ZHOU Shou-bao^{2*}

(1. *Department of Chemistry and Life Science, West Anhui University, Liu'an 237012, China;*

2. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: The isoenzyme pattern of ascorbate oxidase(AOD), polyphenoloxidase(PPO), superoxidase(SOD), esterase(EST), and peroxidase(POD) from six species of *Polygonatum*, originated in Dabieshan Mountain in west of Anhui Province, were compared and analyzed by PAGE. The results indicate: (1) Sixty-six isoenzyme bands in total for five kinds of isoenzymes appeared in the analysis and three bands among them are special to *Polygonatum*. As to a definite isoenzyme, the isoenzyme number, isoenzyme Rf and isoenzyme activity are different for each species, showing great diversity. (2) The result by Fuzzy cluster analysis is coincidence with morphological taxonomy, and the differences of isozyme bands can be used to identify the six species from each other primarily. (3) Among six species of *Polygonatum*, *P. zanlanscianense*, *P. verticillatum*, *P. cyrtoneura* and *P. jinzhaiense* are more evolutive than *P. odoratum* and *P. zanlanscianense*.

Key words: *Polygonatum*; isoenzyme; fuzzy cluster analysis; distinct band

同工酶是指催化反应相同而结构及理化性质不同的一组酶,普遍存在于各种生物中。用电泳方法将不同的同工酶分开,通过特异性染色将其位置和活性直接在染色区带以酶谱的形式标记出来,再通

过比较不同个体间同工酶谱带的差异性,可以研究各个体间的系统关系。国内外学者(沈镛等,2004;李晓林等,2004;苏冬梅,2001)分别将同工酶分析技术应用于花椒、酸枣、沙拐枣等的分类,取得较好效

收稿日期: 2005-10-10 修回日期: 2006-02-17

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(00042415)[Supported by Natural Science Foundation of Anhui Province(00042415)]

作者简介: 陈存武(1967-),男,安徽庐江人,硕士,讲师,主要从事细胞生物学的教学与研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zhoushoubiao@vip.163.com)

果。黄精属 (*Polygonatum* Mill.) 植物是多年生草本, 分布于全国各地。由于形态上的过渡性和地理分布上的重叠性使本属植物的种间划分存在一定分歧(安徽植物志协作组, 1992; 聂刘旺等, 1999; 张定成等, 2000)。本文采用模糊聚类分析的相似关系 R-链连接法首次对产自皖西大别山区六种八居群黄精属植物的抗坏血酸氧化酶(AOD)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、酯酶(EST)和过氧化物酶(POD)等同工酶谱进行比较分析, 为黄精属植物的系统研究积累资料。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

取野外采集的地下茎, 分别种植于实验室的花盆, 贴上标签。凭证标本分别存于安徽师范大学生物系植物标本室与皖西学院化生系植物标本室。材料种名、采集人及采集地见表 1。实验于 2005 年 2 月在本院生化与分子生物学实验室进行, 使用北京

六一仪器厂的 DYY-6B 型电泳仪与 DYCZ-28D 型电泳槽, 各种试剂均为国产分析纯。

1.2 同工酶样品的制备

实验材料取自植株地下茎刚萌发的芽体, 每种(居群)取样三份, 蒸馏水洗净晾干, 各称取 1.0 g, 冰箱预冷 1 h 后剪碎, 加入 5 mL 复杂提取液(王中仁, 1998)和适量的石英砂, 冰浴研磨, 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 4℃ 冰箱中贮存备用。

1.3 电泳及染色

采用垂直板 PAGE 法稳流电泳, 循环冷却装置保证电泳在 0~4℃ 进行; 以 Tris-Gly (pH8.3) 为电泳缓冲液; 每槽上样 30 μL, 浓缩胶电流 15 mA/板, 分离胶电流 30 mA/板, 待指示剂移至前沿 1 cm 时停止电泳, 进行染色, 拍照记录染色结果。每种同工酶的电泳染色都重复四次以上, 直到酶带结果一致为止。各同工酶的染色方法分别是: PPO 用邻苯二酚-联苯胺染色法; POD 采用醋酸联苯胺法染色; AOD 用抗坏血酸与 2,6-二氯酚靛酚(DCPIP)法染色; EST 用醋酸萘酯与坚牢蓝染色法; SOD 用氮




表 1 六种八居群黄精属植物材料来源

Table 1 The origin of materials of eight populations from six species of *Polygonatum*

种名 Species	采集地区 Locality	生态环境 Habitat	海拔 Alt.	采集人 Collector	材料编号 No.	代号 Code
玉竹(<i>P. odoratum</i>) A	天堂寨 Tiantangzhai	林下 under forest	800	Shao. J. Z 陈存武等	9850603002	P1
玉竹(<i>P. odoratum</i>) B	白马尖 Baimajian	林缘 edge of forest	1000	陈存武等	04011	P2
多花黄精(<i>P. cyrtonea</i>) A	天堂寨 Tiantangzhai	林下 under forest	700	Shao. J. Z 陈存武等	9850403007	P3
多花黄精(<i>P. cyrtonea</i>) B	白马尖 Baimajian	林缘 edge of forest	1000	陈存武等	04015	P4
金寨黄精(<i>P. jinzhaiense</i>)	天堂寨 Tiantangzhai	林缘 edge of forest	850	Zhou S. B 陈存武等	9850304003	P5
长梗黄精(<i>P. filipes</i>)	天堂寨 Tiantangzhai	林下 under forest	1000	Zhou S. B. 陈存武等	9850504005	P6
湖北黄精(<i>P. zanlanscianense</i>)	天堂寨 Tiantangzhai	林下 under forest	750	Shao. J. Z 陈存武等	9850203009	P7
轮叶黄精(<i>P. verticillatum</i>)	白马尖 Baimajian	林下 under forest	1200	陈存武等	04012	P8

蓝四唑(NBT)与吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)法染色(王中仁, 1998)。

1.4 资料整理与分析

分析酶谱并画出酶带模式图, 计算各样之间的酶谱相似系数 S, 采用模糊聚类的相似关系 R-链连接法进行分析(苏冬梅, 2001)。酶带模式图中:  超强带;  强带;  中带; 弱带。

2 结果与分析

2.1 多酚氧化酶(PPO)酶谱

图 1 显示该酶共有 12 条酶带, 分布在两个带区。Rf 在 0.071 0~0.134 0 之间的为慢速区, Rf 在 0.226 1~0.381 2 之间的为快速区。从个体的酶

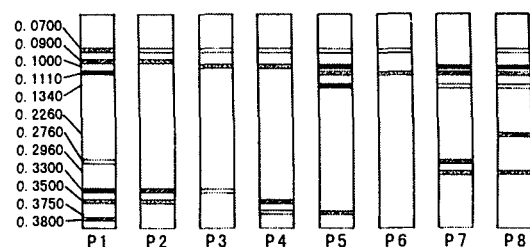


图 1 六种八居群黄精属植物 PPO 同工酶谱模式图
Fig. 1 The PPO zymogram model of eight populations from six species of *Polygonatum*

谱看, P1 的 7 条带中超强带、强带、中带各有 2 条, 均匀分布在快速区与慢速区, 说明其酶活性较强; P2 仅有 3 条弱带 1 条中带, 酶活性弱, 与种内不同居群的 P1 个体差异明显; P3、P4 和 P6 的酶谱相

似,酶带少并且没有强带,说明它们的酶活性低;P7 和 P8 的酶谱相似。

2.2 过氧化物酶(POD)酶谱

从图 2 看出,该酶谱也有 12 条酶带,分布在三个区域。慢速带区的 $R_f \leq 0.2849$,有密集排列的 5 条酶带,个体间的差异不大,几乎都是酶活性很强的强带和超强带,POD 的酶活性主要集中在该区的酶带,其中 $R_f=0.1742$ 和 0.2151 的 2 条酶带是共同酶带,可以认为是本属植物 POD 的特征酶带。中速带区仅 P7 与 P8 各有 2 条弱带。快速带区有 5 条带, R_f 在 $0.6141 \sim 0.7473$ 之间,都是中弱带。P6 与 P7 在该区没有酶带。种间的酶谱差异主要体现在快速区。

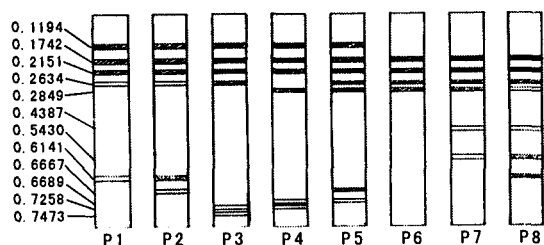


图 2 六种八居群黄精属植物 POD 同工酶谱模式图
Fig. 2 The POD zymogram model of eight populations from six species of *Polygonatum*

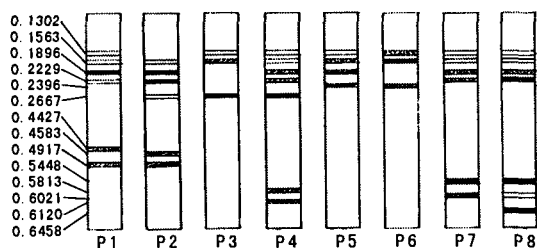


图 3 六种八居群黄精属植物 AOD 同工酶谱模式图
Fig. 3 The AOD zymogram model of eight populations from six species of *Polygonatum*

2.3 抗坏血酸氧化酶(AOD)酶谱分析

AOD 是细胞内一种活跃的氧化酶类。从图 3 可看出共有 14 条酶带,分布在两个区。慢区的 R_f 在 $0.1302 \sim 0.2667$ 间,有密集的 6 条带,是个体酶带的主要分布区。其中 $R_f=0.1563$ 的酶带出现频率高达 1.00,是本属植物 AOD 同工酶的特征酶带。快速区的 R_f 在 $0.4583 \sim 0.6458$ 间,没有特征酶带。从种间酶谱看,在快速区,P3、P5、P6 没有酶带,P1 有 2 条中速带,P4 等其他个体都有 2 条强带或超强带,说明个体之间的酶谱差异较大。P3 与 P4(多花黄精 A 与 B)在该区的酶带差异表明种内

不同的居群间,酶的表达存在较大差异。

2.4 酯酶(EST)同工酶模式图

图 4 酶谱在五种同工酶中表现最丰富,共有 16 条酶带,分成两区段。快速区的 R_f 在 $0.4903 \sim 0.7713$ 间,有 8 条酶带,主要是中弱带,个体间谱带差异较大,没有特征酶带出现。慢速区的 R_f 在 $0.0718 \sim 0.3118$ 间,也有 8 条带。从个体酶谱看,超强带与强带集中分布在 P3、P4、P6 三个样品;其余五个样品都是中带或弱带。表明 EST 同工酶的表达及其酶活性在同时期的种间存在较大的差异。

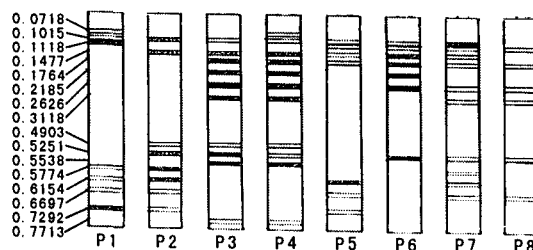


图 4 六种八居群黄精属植物 EST 同工酶谱模式图
Fig. 4 The EST zymogram model of eight populations from six species of *Polygonatum*

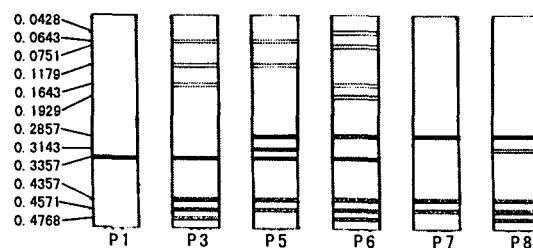


图 5 六种黄精属植物 SOD 同工酶谱模式图
Fig. 5 The SOD zymogram model of six species of *Polygonatum*

2.5 SOD 同工酶电泳模式图

图 5 共有 12 条酶带,分为快、中、慢三个带区,慢区的 R_f 小于 0.1929 ,仅存在于 P3、P5、P6 三个个体,并且都是弱带;中区的 R_f 在 $0.2857 \sim 0.3357$ 之间,主要是活性极强的超强酶带。快速区的 R_f 在 $0.4357 \sim 0.4768$ 间,除 P1 外的其他个体都有 2~3 条酶带。从个体的酶谱看,P1 酶谱最简单,只有一条位于中速带区的超强酶带,P6 有 9 条酶带,P3 与 P5 都有 7 条酶带,显示出酶谱的种间差异性。

3 讨论

3.1 五种同工酶的酶谱特征

八个样品的五种酶电泳共显示出 66 条酶带

(EST:16条,AOD:14条,SOD、PPO、POD各12条),其中有三条带是各样品共有的特征酶带(POD:2条,AOD:1条;SOD、EST、PPO等均没有特征酶带),种间有差异的酶带为57条,多态率达86%。

从八个样品的总酶带数看,五种同工酶中,EST的酶带最丰富,八个样品共显示66条酶带;其次为POD、SOD、AOD,而PPO的酶带最简单,八个样品共显示36条酶带。

表2 六种八居群黄精属植物五种同工酶相似系数矩阵表
Table 2 The matrix table of similarity coefficient of five isoenzymes of eight populations from six species of *Polygonatum*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
P1	1.00	0.72	0.33	0.32	0.56	0.39	0.45	0.42
P2		1.00	0.45	0.46	0.51	0.33	0.44	0.36
P3			1.00	0.67	0.53	0.63	0.44	0.47
P4				1.00	0.47	0.45	0.48	0.44
P5					1.00	0.61	0.62	0.58
P6						1.00	0.54	0.57
P7							1.00	0.82
P8								1.00

从酶的活性看,五种同工酶中,POD的酶活性最强,八个样品共显示47条带,其中28条为强带与超强带,强活性酶带数占总带数的59.6%。其次为AOD、SOD、PPO,酶活性最弱的是EST,八个样品共显示66条带,强带与超强带有15条,仅占酶带总数的22%。

从以上五种同工酶的分析还可以看出,就同一种同工酶而言,不论是在种间的各个体间,还是在种内的不同居群的个体间,各酶带的移动速度以及该酶带的分布、总的酶带数、超强带与强带的比例及其分布等都存在差异;至于在同一个体的不同发育阶段,同一种酶的酶谱间是否也存在差异,有待做进一步的实验研究。

3.2 同工酶与黄精属的系统分类

3.2.1 聚类分析 在物种的系统发育过程中,亲缘关系越近的种,其蛋白质组成越接近,同工酶的酶谱越相似,因而可以通过酶谱的相似性分析来研究物种的分类与进化关系(王中仁,1998;Liu XW等,2004;陶玲等,2004)分别做了很好的应用。分析本文五种同工酶所显示的66条酶带,计算这些酶带相互间的相似系数(表2),再利用相似关系R-链连接法进行模糊聚类,其结果如图6所示:在 $\lambda_1=0.82$ 时,P7与P8(湖北黄精与轮叶黄精)率先聚合为I

类;在 $\lambda_2=0.72$ 时,P1与P2(玉竹A、B)聚成II类;在 $\lambda_3=0.68$ 时,P3与P4(多花黄精A、B)聚成III类;在 $\lambda_4=0.61$ 时,P5与P6(金寨黄精与长梗黄精)聚合为IV类。这些结果与形态学分类的结果高度一致(张定成等,2000),说明同工酶分析结果支持形态学分类的结论,同工酶分析可以作为系统分类的依据之一。对于少数同工酶分析结果与形态学分类结论不一致的种类,需要结合核型、叶表皮等其他指标综合考虑。

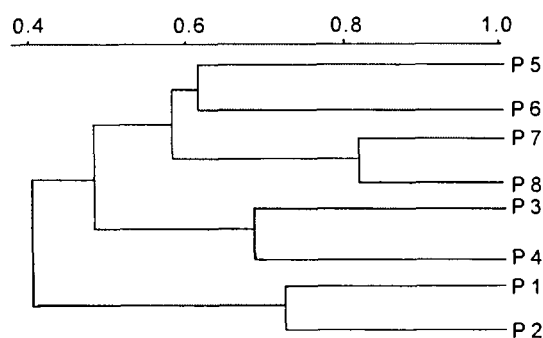


图6 六种八居群黄精属植物五种同工酶的模糊聚类图
Fig. 6 The Fuzzy cluster dendrogram of five isoenzymes of eight populations from six species of *Polygonatum*

3.2.2 种间区分 从以上酶谱可知,六种八居群的每个样品的每一种同工酶谱都有差异,可以据此探索黄精属的种间区分。以SOD为例,本实验材料的六个种中,①只具有 $R_f=0.3367$ 酶带的为P1;②都含有 $R_f=0.3143$ 酶带的是P5和P8,其中含有 $R_f=0.3367$ 的是P5,不含有 $R_f=0.3367$ 的是P8;③都不含有 $R_f=0.3143$ 酶带的分别是P3、P6和P7,其中兼含有 $R_f=0.3357$ 与 0.2857 的是P6,只有 $R_f=0.3357$ 的是P3,仅有 $R_f=0.2857$ 的是P7。根据酶谱的差异,可以将本实验材料的六种植物区分开来,由于本实验的材料仅取自地下茎的芽体,对于取自植株其他部分的材料,是否具有相同的实验结果有待进一步探讨。

3.3 同工酶与黄精属的系统演化

“同工酶越多的品系越进化”(Garva等,1977),也就是说同工酶条带少的种是较原始种,同工酶条带多的种分化程度较高,是较进化种。比较都是天堂寨生长的六种黄精属植物的五种同工酶的酶带总数(表3)可以看出:P3、P5、P7、P8(即多花黄精A、金寨黄精、湖北黄精、轮叶黄精)的同工酶酶带数分别是29条、30条、30条、31条,而P6与P1(即长梗黄精、玉竹A)分别为25条和26条,存在明显差异。

表 3 天堂寨六种黄精属植物的五种同工酶酶带统计
Table 3 The statistics of five isoenzymes band of six species of *Polygonatum* from Tiantangzhai

	P1	P3	P5	P6	P7	P8	合计	特征酶带
SOD	1	7	7	9	3	5	32	2
POD	5	6	7	4	6	7	35	3
AOD	6	3	4	3	6	7	29	2
EST	7	10	7	7	10	6	47	1
PPO	7	3	5	2	5	6	28	1
合计	26	29	30	25	30	31	181	9

也就是说多花黄精、金寨黄精、湖北黄精、轮叶黄精

分化程度较高,是较进化的类型,玉竹、长梗黄精等为较原始类型。与本属植物核型研究(邵建章等,1994)时得出的进化趋势相一致:即湖北黄精、轮叶黄精等轮叶系是进化类型,玉竹、长梗黄精等是较原始类型。

从表 3 还可看出,酯酶(EST)同工酶在不同种植物体内的酶带最多,多花黄精和湖北黄精体内达 10 条,六种植物酶带总数达 47 条,远远高于其他四种酶的酶带数。按照 Garua 等的观点,在本文所研究的五种同工酶中,我们认为酯酶是比较进化的酶类。

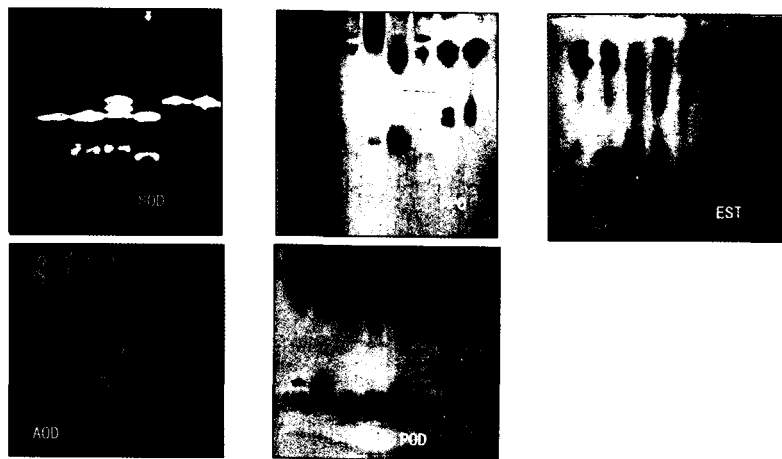


图 7 六种八居群黄精属植物 SOD、PPO、EST、POD、AOD 同工酶的 PAGE 图谱
Fig. 7 The zymograms of SOD, PPO, EST, POD, AOD of eight populations from six species of *Polygonatum* by PAGE

参考文献:

- 王中仁. 1998. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社: 82-135.
- 安徽植物志协作组. 1992. 安徽植物志(第五卷)[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社: 55-594.
- 李晓林, 梁国鲁, 郭启高, 等. 2004. 国产主要花椒的同工酶分析[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 26(4): 445-455.
- 沈 颖, 朱德蔚, 李锡香, 等. 2004. 用 5 种同工酶分析云南羊种群质资源遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 5(3): 239-246.
- 苏冬梅, 陈书君, 毕方铖. 2001. 酸枣及 17 个枣品种叶片过氧化物酶同工酶的研究[J]. 园艺学报, 28(3): 265-267.
- 聂刘旺, 张定成, 张海军, 等. 1999. 安徽黄精属五种植物的同工酶分析[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 22(1): 29-31.
- Garua A, Tsunewaki K. 1977. Electrophoretical studies on peroxidase isozymes[J]. *Japanese J Genetics*, 52: 284-286.
- Liu XW, Zeng MQ. 2000. Study of application of isozymic marker to distinguish the multiplasmic lines of maize (*Zea mays*) [J]. *Sci Agric Sin*, 33(4): 21-29.
- Shao JZ(邵建章), Zhang DC(张定成), Qian F(钱 枫). 1994. Studies on cytotaxonomy of *Polygonatum* from Anhui (安徽黄精属的细胞分类学研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 14(4): 361-368.
- Tao L(陶 玲), Ren J(任 珺). 2004. Study on relationship and cluster of *Calligonum* by isozyme electrophoresis analysis(应用同工酶进行沙拐枣属植物亲缘关系和分类的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, (西北植物学报) 24(9): 1 708-1 713.
- Zhang DC(张定成), Zhou SB(周守标), Zhang XP(张小平), et al. 2000. A classification study on *Polygonatum* from Anhui(安徽黄精属植物分类研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 20(1): 32-36.