

漆树漆酶割漆季节活性变化及同工酶研究

邵 杨, 晁 菲, 魏朔南*, 胡正海

(西北大学 生命科学院, 西安 710069)

摘 要: 采用分光光度法、SDS-PAGE电泳及等电聚焦电泳法分析了陕西平利县高八尺和大红袍2个品种漆树漆酶的活性变化规律及同工酶组成。结果表明:漆酶的活性在割漆季节中呈现6~7月下降,7~9月上升,并且高八尺漆酶的活性高于大红袍漆酶活性;确定漆酶的分子量为110 kDa;分离得到4种漆酶同工酶组成,而这4种同工酶组成在两个品种中存在差异,可以作为漆树品种鉴定的生化指标。

关键词: 漆树; 漆酶; 活性; 同工酶

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2012)06-0774-07

Variations of laccase activity and isozymes of *Toxicodendron vernicifluum* barkley at tapping season

SHAO Yang, CHAO Fei, WEI Shuo-Nan*, HU Zheng-Hai

(College of Life Sciences, Northwestern University, Xi'an 710069, China)

Abstract: It was successful to research on the variations of laccase activity and isozymes of two *Toxicodendron vernicifluum* species. Barkley varieties which were Gaobachi and Dahongpao in Pingli County of Shaanxi Province were analyzed by spectrophotometry, SDS-PAGE and isoelectrofocusing electrophoresis. The results revealed laccase activity declined from June to July, then rose from June to September and the laccase activity in Gaobachi was higher than Dahongpao at tapping season. Molecular weight was 110 kDa. In *T. vernicifluum*, there were more than four isozymes which were different between two varieties and it could be a biochemistry index to appraise *T. vernicifluum* barkley varieties.

Key words: *T. vernicifluum*; laccase; activity; isozyme

漆树(*Toxicodendron vernicifluum*)是漆树科(Anacardiaceae)漆属(*Toxicodendron*)重要经济树种,在我国大部分省(区)均有分布。生漆是漆树次生代谢产物,为优良的天然涂料,具有抗腐蚀、防潮、耐高温、防水等优点,在我国已有6 900多年的历史(甘景镐,1992;兰仲克,1996)。生漆主要由漆酚、漆酶、树胶质和水组成,其中催化生漆干燥成膜的重要物质是生漆中所含的漆酶(袁筱昆,1984)。漆酶是一种多酚氧化酶,催化活性中心是铜,它能催化多酚、多胺基苯等底物氧化(雷福厚等,2003)。漆

酶在漆酚的聚合(袁筱昆,1984)、纸浆去木质素(魏华丽等,2004)、高等植物病菌防御(Alfred等,2002)等方面都有重要作用,广泛用于食品工业(曹治云等,2004)、生物脱色(朱启忠等,2009)以及废水处理(魏华丽等,2004)等领域。

生漆采割一般在6~9月进行,在此割漆季节中不同采割时间所割生漆质量有所不同,一般认为7月、8月所割生漆质量最好。生漆质量的好坏主要表现在漆酚含量和干燥成膜性能的高低。而导致生漆干燥成膜性能差异的原因目前认为主要是由于漆

收稿日期: 2012-03-13 修回日期: 2012-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(30870136)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30870136)]

作者简介: 邵杨(1984-),女,硕士,从事植物学研究工作,(E-mail)shaoyang_sylp@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 魏朔南,男,教授,从事植物资源学研究工作,(E-mail)wsn0505@nwu.edu.cn.

酚含量(魏朔南等,2009)、漆酶活性(袁筱昆,1984)等。生漆中存在着结构不同但功能相同的酶(万云洋,等 2003,韦建学等,2000),但它们之间活性存在差异。割漆季节中漆酶活性以及同工酶组成是否存在变化,从而导致生漆干燥成膜性能变化尚无研究报道。为此,本研究以陕西平利县漆树品种高八尺、大红袍为对象,应用等电聚焦法对其割漆季节所产生漆液中的同工酶组成进行分离,并测定各酶带的等电点,建立漆酶同工酶等电聚焦分析方法,同时比较测定 2 个品种生漆中漆酶活性以及割漆季节中不同割漆时间所获漆液中漆酶活性差异,其结果对深入研究天然多酚氧化酶同工酶组成及其活性变化规律具有理论意义,而且对于鉴别漆树品种以及指导生漆的科学应用也具有现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

以陕西省平利县漆树品种高八尺、大红袍为研究对象,于 2010 年 6~9 月割漆季节中每个月采集一次生漆,选择割龄为 3 年的漆树,采用“V”形割口采集漆树主干部位漆液,共采集 4 个月份的生漆样本(表 1)。样品在 4 °C 保存。其中,大红袍样品在 9 月份只采集到 1 株,其余各株在九月份均已不流漆。

北京市六一仪器厂 DYCP-378 等电聚焦多用途电泳仪,DYY-12C 电脑三恒多用电泳仪电源,WD-9412A 型恒温循环器,WD-9406 胶片观察仪,美国 Bedford 公司 Milli-Q 超纯水仪,德国 Eppendorf 5804R 冰冻离心机,DL-180 超声波提取仪,SHB-III 循环水式多用真空泵。40% pH3-10 载体两性电解质(GE),丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、 β -巯基乙醇、考马斯亮蓝 R-250(Ameresco),亲水硅烷和疏水硅烷(北京鼎国试剂公司),甘氨酸、十二烷基磺酸钠、丙酮为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 漆酶粉末的提取 参照 Bengt(1970)的方法进行。称取 1 g 漆酶丙酮粉末溶解于 20 mL 4 °C 双蒸水中,将上述滤液按 1:1 的比例加入 4 °C 冰丙酮后经冷冻离心机离心(4 °C,10 000 r/min,10 min),弃去上清液,沉淀冷冻干燥。取干燥后的沉淀,加入超纯水制成 5% 的溶液备用。

1.2.2 漆酶活性测定 采用分光光度法(周易勇,1989),以 2×10^{-3} mol/L 对苯二胺为底物,在比色皿

中加入 1.5 mL 对苯二胺、1.45 mL 纯水及 0.05 mL 的酶液,以 1.5 mL 纯水、1.5 mL 对苯二胺作对照液测定吸光值。根据 25 °C 490 nm 处漆酶催化底物反应产生对苯醌的光吸收特征的变化值来测定酶的活性。以每分钟吸光值增加 0.001 所需要的酶量作为一个活力单位。漆酶活性按下式计算:

$$\text{漆酶活性} = (\text{5 min 时的光密度} - \text{1 min 的光密度}) / (t_5 - t_1) / \text{毫克酶}$$

将漆酶溶液与样品缓冲液按 2:1 的比例互溶,沸水浴 5 min 后上样进行漆酶的 SDS-PAGE 电泳。分离胶浓度为 12.5%,考马斯亮蓝 R-250 染色,经脱色后观察拍照。

表 1 样品采集地和采集时间

Table 1 Geographic localities and time of the populations in this study

采集时间 Acquisition time	采集地 Acquisition place	高八尺样品数 Sample number of Gaobachi	大红袍样品数 Sample number of Dahongpao
2010. 6. 30	陕西平利县	10	10
2010. 7. 30	陕西平利县	10	10
2010. 8. 30	陕西平利县	10	10
2010. 9. 16	陕西平利县	10	1

1.2.3 漆酶同工酶分析 参考郭晓君(2005)的方法,预置凝胶厚度为 0.5 mm,凝胶浓度为 7.5%,交联度 3%。预电泳 30 min 后各上样 8 μ L,1 300 V 电泳,待电流降至 2 mA 后停止。整个电泳过程循环水保持在 5 °C。用对苯二胺作为底物进行活性染色,25 °C 处保温 5 min,用水漂洗后观察。

1.2.4 漆酶等电点的测定 电泳结束后,将未加样一侧的凝胶从阳极端每隔 2 cm 切段,加入 2 mL 双蒸水 4 °C 密封保存 48 h 后测量各段的 pH 值,以胶长为横坐标,pH 值为纵坐标绘制曲线,通过酶带在凝胶中的位置找出对应的 pH 值即该酶带的等电点。

2 结果与分析

2.1 割漆季节中高八尺与大红袍漆酶活性变化规律

采用分光光度法测定 6~9 月漆酶活性结果见图 1。由于其中一株高八尺漆树(G10)和五株大红袍漆树(D6、7、8、9、10)采集到的漆液量太少,漆液自行氧化干燥而没有得到漆酶丙酮粉末。另外 G7、G8、G9 以及 D2、D3、D4、D5 七个样品在 9 月份由于漆树割后不流漆液,故未采到漆液。

分析高八尺割漆季节漆酶活性变化可知,6~9

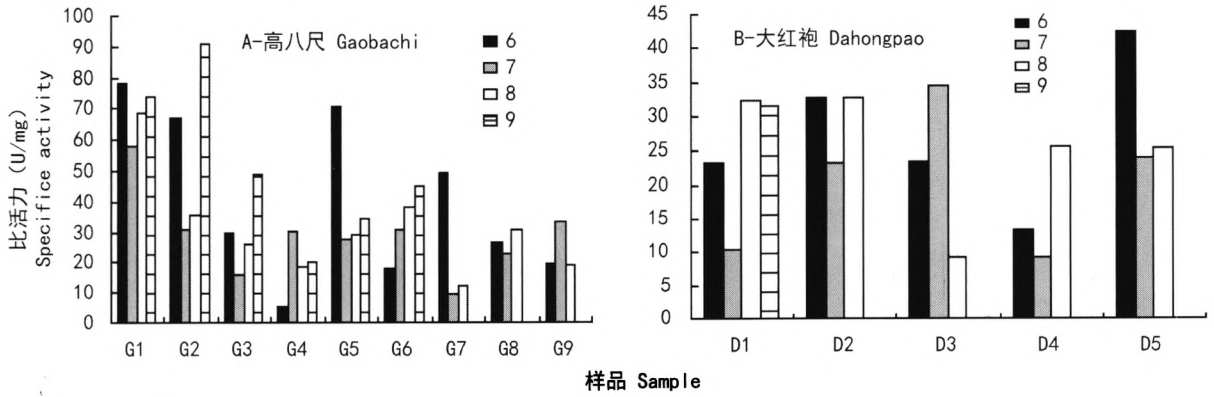


图1 高八尺和大红袍漆酶活性变化
Fig. 1 Variations of laccase activity with Gaobachi and Dahongpao

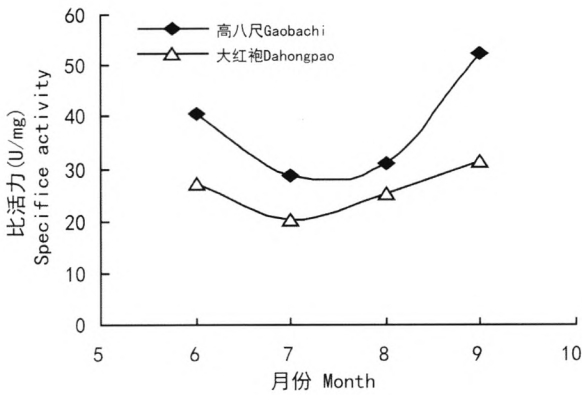


图2 高八尺与大红袍漆酶平均活性变化
Fig. 2 Variations of average laccase activity with Gaobachi and Dahongpao

月漆酶活性表现出上下波动的趋势。除 G4 和 G9 两个样品外,均呈现出先下降后上升的规律,即 6~7 月漆酶活性下降,7~9 月漆酶活性逐渐上升,其中活性最大值出现在 6 月和 9 月,最小值出现在 7 月(图 1:A)。

观察大红袍割漆季节漆酶活性变化发现,在割漆季节中漆酶活性同样存在上下波动的现象,除 D3 样品外,其余样品表现出与高八尺漆酶相似的规律,即 6~7 月漆酶活性下降,7~8 月漆酶活性上升,其最小值也出现在 7 月(图 1:B)。

比较高八尺与大红袍漆树漆酶割漆季节平均漆酶活性,其结果见图 2。高八尺漆酶活性总体高于大红袍漆酶活性。高八尺漆酶平均活性最高值达 52.3 U/mg,最低值为 28.8 U/mg,而大红袍漆酶活性最高值为 31.5 U/mg,最低值仅 20.3 U/mg。虽然大红袍漆酶平均活性小于高八尺漆酶平均活性,但是两者在割漆季节中平均漆酶活性随时间的变化趋

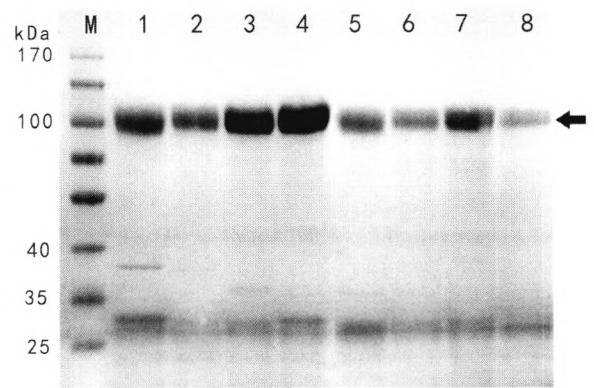


图3 高八尺和大红袍漆酶 SDS-PAGE 电泳
Fig. 3 Laccase of Gaobachi and Dahongpao by SDS-PAGE electrophoresis

1-4 分别为高八尺 6~9 月的漆酶液样品; 5-8 分别为大红袍 6~9 月的漆酶液样品。箭头所指的位置即为漆酶蛋白。
1-4 are the samples of Gaobachi laccase; 5-8 are the samples of Dahongpao laccase; arrow points to protein of laccase.

势却极为相似,即从 6~7 月下降,而 7~9 月上升,平均最高值出现在 9 月,平均最低值出现在 7 月。

2.2 漆酶分子量确定

SDS-PAGE 结果显示,经初步纯化后的漆酶液中漆酶分子量水平(图 3)。经 Gel-Pro Analyzer 4.5 分析凝胶成像图可知,漆酶分子量为 110 kDa。此外,在 28,30 kDa 处出现两条清晰的条带,该条带在所有样品中都存在,推测可能是漆酶以外的含氮物。而特殊的是 1 号(6 月高八尺)样品在 38 kDa 出现一个清晰条带,该条带在其余样品中缺失。

2.3 漆酶同工酶测定

分析 2 个漆树品种漆酶氧化酶同工酶谱可知,高八尺、大红袍两个漆树品种 6~9 月漆酶同工酶经等电聚焦分离后所有样品均出现了 1~4 条染色较

深,图像清晰、位置稳定的 4 条酶带(E、F 和 H 除外)(图 4)。

2.3.1 Gel-Pro Analyzer 4.5 分析 高八尺漆树 1、2 中 6 月和 9 月的 1-4 各条酶带颜色均较深,而 7 月和 8 月 1~4 各条酶带的颜色相对于 6 月和 9 月则较浅。表征高八尺漆树漆酶各条同工酶带活性在整

个割漆季节中存在差异,其中 6 月和 9 月各条酶带酶活性普遍高于 7 月和 8 月。这与前述所测漆酶活性的变化规律中 6 月和 9 月活性较高相一致。由高八尺 1、2 的所有同工酶条带的数量和颜色显示,在 6~9 月的 4 个月中均较为稳定,只有条带 1 明显显现出 6~7 月份颜色变浅,而 8~9 月又开始加深(图 5)。

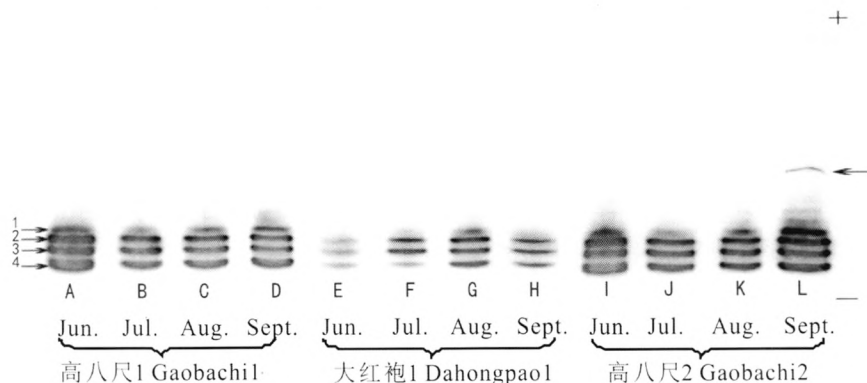


图 4 漆酶同工酶谱 右侧箭头表示上样位点。左侧箭头 1-4 分别表示 4 个不同的酶带。

Fig. 4 Isozymes of laccase Right arrow points to position of samples added, left arrows (1-4) point to diverse laccase straps.

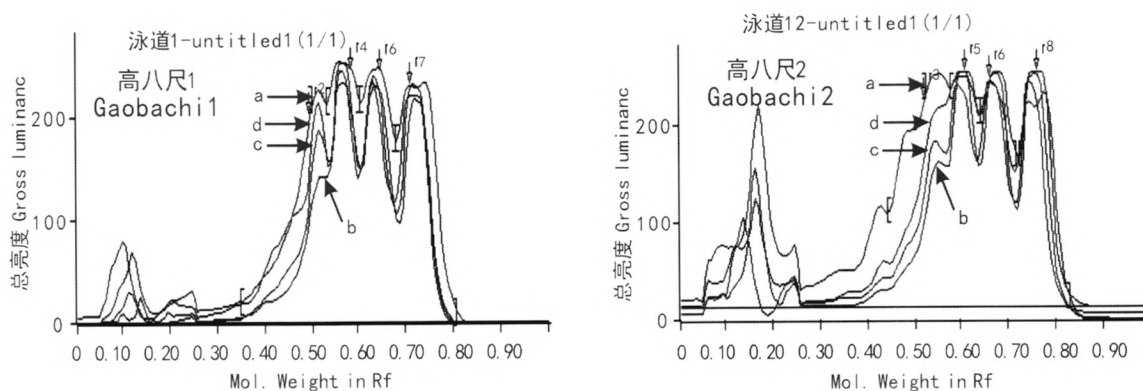


图 5 高八尺中 6~9 月酶带比较 a-d. 表示 6~9 月酶带。

Fig. 5 Comparison with enzyme belts from June to September in Gaobachi a-d. point to laccase straps from June to September.

2.3.2 大红袍漆酶同工酶分析 图 6 结果显示,除 8 月以外,其余 6、7 和 9 月只得到条带 2、3 和 4,条带 1 没有显示,表明该酶带缺失。此外,在条带 2、3 和 4 中,条带 4 的颜色在 6 月和 7 月相对较浅,表明相对于条带 2 和 3,该条带在这个时期的酶活性较低。比较 6 月、7 月条带 2、3 和 4 的颜色可以看出,6 月条带 2、3 和 4 的颜色更浅,表明该时期的酶活性更低(图 4)。8 月大红袍同工酶各条带结果与高八尺相似,也具有 1~4 条清晰的、染色明显的条带,与其他月份的条带相比较,它不仅条带颜色深于其它月份,而且明显多出条带 1,这显示 8 月漆树大红袍品种的漆酶活性相对高于 6 月、7 月和 9 月。

2.3.3 比较高八尺与大红袍 2 个品种的 1~4 各漆酶同工酶谱带可见(图 7),其谱带位置在凝胶中相同,表明这些酶带具有相同或相近的等电点,即高八尺与大红袍有着基本相同的同工酶。比较二者同工酶谱带各条带的颜色可见,大红袍漆酶同工酶条带除 8 月份与高八尺漆酶同工酶条带相似外,其余 6 月、7 月和 9 月的条带无论是条带数量还是条带颜色与高八尺条带都相差较大。

2.4 等电点测定

2.4.1 用酸度计测定装有凝胶片段的双蒸水溶液,距凝胶正极 1、3、5、7、9、11 cm 处的 pH 值分别为 2.95、4.49、5.67、6.55、7.91、9.43。以胶长为横坐

标, pH 值为纵坐标绘制 pH-胶长线性关系图, 结果见图 8, 线性方程为 $y = 0.622x + 2.4347$, $r = 0.9942$, 线性关系良好。

2.4.2 根据同工酶谱中 1~4 酶带的位置, 对应图 8 得出各酶带的等电点列于表 2。由表 2 可见, 依据各酶带的位置可知漆酶同工酶等电点大多位于中性或偏碱位置。这与文献中报道漆酶提取时需在 pH6.8 的磷酸盐缓冲液中相一致。

3 结论与讨论

3.1 割漆季节漆酶活性变化特点

漆酶活性在不同温度下会呈现出不同的变化。万云洋等(2003)在研究漆酶的活性时发现, 所纯化出的两种漆酶同工酶 L1 和 L2, L1 活性随着温度的

升高而降低, 而 L2 活性几乎不变。表明在不同温度下漆酶的活性会呈现出不同的变化, 而这种变化并不是随着温度的升高而呈正相关。本研究以单品

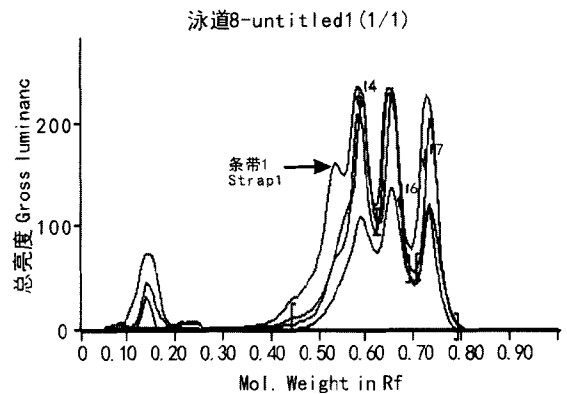


图 6 大红袍中 6~9 月酶带比较
Fig. 6 Comparison with enzyme belts in Dahongpao from June to September

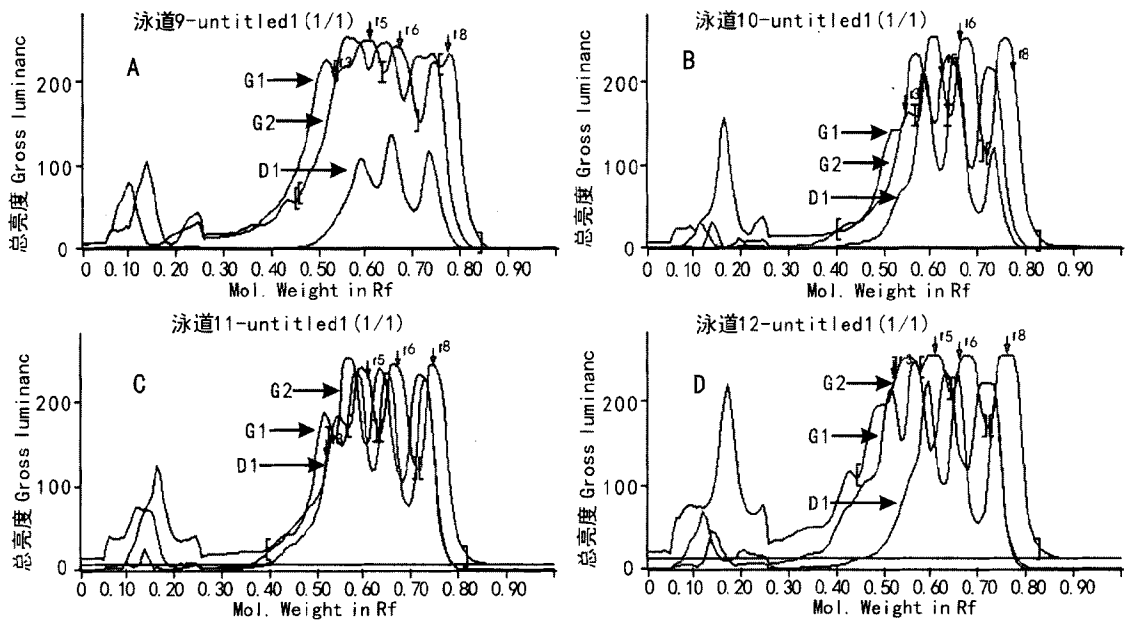


图 7 高八尺和大红袍漆酶 6~9 月酶带比较 A-D. 6, 7, 8 和 9 月酶带。
Fig. 7 Comparison with enzyme belts from June to September in Gaobachi and Dahongpao
A-D. point to laccase straps from June to September.

种单株漆树的生漆为样品, 通过对割漆季节不同月份漆酶活性变化研究表明, 在整个割漆季节中, 平均漆酶活性 6~7 月呈现下降趋势, 而 7~9 月又会逐渐上升, 平均漆酶活性在 6 月和 9 月最高, 7 月最低。对此我们推测可能与气候及温度有相关。在整个割漆季节中以 7 月和 8 月气温较高, 而在此高温情况下漆酶同工酶之间活性出现变化, 即同工酶之间活性存在有高有低, 从而影响整个漆酶活性。这也解释了为什么在 7 月生漆产量高的时候, 漆的燥

性却不好, 原因之一可能是漆酶的活性较低。漆酶活性与其抑制因子也有一定的相关性, K^+ 、 Zn^{2+} 等离子对漆酶有激活作用, 而 Ag^+ 、 Fe^{3+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 等对漆酶活性却有一定的抑制作用。另外, 高浓度的底物 (0.1~1.0 mol/L 邻苯二酚) 将对真菌漆酶活性产生不利的影响, 甚至漆树树皮的丙酮提取物即可抑制漆酶的活性(周易勇, 1992)。对此有解释认为天然酶中活性位点之间存在某种配合作用, 当底物浓度上升到某一限度以

上时即产生抑制作用(甘景镐,1992)。生漆的主要成分为漆酚,在研究漆树割漆季节所产生漆中漆酚含量变化时发现,6~9月割漆季节中漆酚含量呈现上下波动现象,其中6月和9月为两个低谷期(魏朔南等,2009)。比较本研究中割漆季节漆酶活性变化结果可以看出,当漆酶活性(6月和9月)出现高峰时正是漆酚含量的低谷期,似乎表明漆酶活性的高低与底物漆酚含量的多少有相关性。但本研究显示出高八尺、大红袍漆树漆酶活性在割漆季节出现的变化是由气温变化引起还是由底物漆酚含量抑制因子引起,还是二者共同引起的尚不能确定。

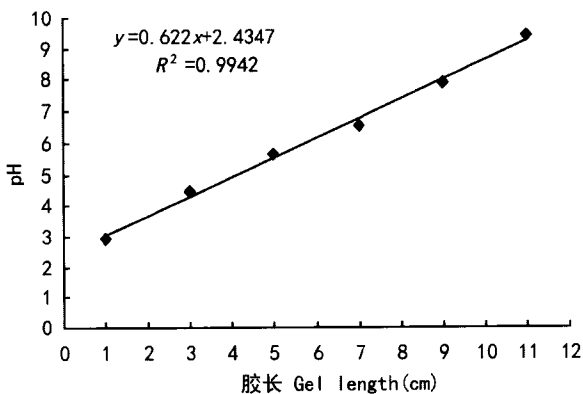


图 8 pH-胶长线性关系

Fig. 8 Relationship of pH and the length of gel

表 2 漆酶各酶带等电点

Table 2 Isoelectric point of each laccase strap

酶带 Laccase strap	距正极距离 Distance to anode (cm)	pH
1	7.1	6.85
2	7.3	6.98
3	7.6	7.16
4	7.9	7.35

3.2 不同品种间漆树漆酶活性的差异

韦建学等(2003)的研究发现,漆酶同工酶 I 最适温度在 46~50 °C 之间,而漆酶同工酶 II 的最适温度在 35 °C 左右,表明不同漆酶同工酶活性最适温度存在差异。分析高八尺在 6~9 月得到 4 条清晰的酶带中,只有条带 1 在 6~9 月变化最大,表现出与割漆月份变化密切相关。在 7 月颜色最浅,表明酶带 1 在 7 月份活性最低,8~9 月逐渐加深,以 6 月和 9 月颜色最深,表明在 6 月和 9 月活性最高。其余 3 条酶带颜色深浅变化不大,表明其活性与割漆月份的变化相关不大。因此,由同工酶带颜色深浅变化可见,不同漆酶同工酶存在着最适温度变化的

现象,而这种最适温度变化主要体现在条带 1。由于条带 1 同工酶的活性随割漆月份变化的特性,导致高八尺漆树漆酶在整个割漆季节中活性的变化,即当 6 月和 9 月都存在 4 条同工酶带时,其漆酶活性最高。此结果与漆酶活性测定结果 6 月和 9 月最高相一致。由此表明,在整个割漆季节中,漆酶活性的变化与第一条同工酶带活性变化密切相关,即同工酶带 1 对整体漆酶的活性在割漆季节中的变化规律起主要作用。由大红袍各同工酶谱带的有无和颜色深浅变化可见与高八尺不同,其 6 月各条带颜色最浅,7~9 月各条带颜色先变深后变浅,8 月达到最深。而条带 1 则出现在 8 月并颜色最深,表明在大红袍漆酶同工酶中,酶带 1 在 8 月活性最高,这意味着包括条带 1 在内的大红袍漆树各同工酶可能与高八尺的有所不同。比较高八尺漆酶与大红袍漆酶同工酶谱可见各条带位置几乎相同,但各条带颜色存在差异。高八尺漆酶条带颜色明显深于大红袍漆酶条带,显示出高八尺漆酶活性在同一月份中要高于大红袍,这与前述漆酶活性测定结果高八尺漆酶平均活性高于大红袍漆酶相一致。探讨其原因,大红袍漆树为同源三倍体漆树(尚宗燕等,1989),而高八尺漆树为正常二倍体漆树。多倍体植物不仅在外形态、生理状态以及次生代谢物含量上与二倍体植物有区别(王安虎,2009),而且在同工酶的组成与二倍体植物也有不同(赵钢等,1994)。对三倍体大红袍漆树的研究显示,其在外形态、内部结构以及遗传基础等方面均与二倍体漆树存在差异,因此染色体倍性的变化可能是造成漆酶活性差异的主要原因(赵喜萍等,2007)。黄群策等(2009)采用秋水仙素对水稻种子进行倍性处理后,发现其种子内蛋白质亚基的类型没有出现新的变异,而蛋白质亚基的表达量则发生了明显的变化。大红袍漆酶同工酶条带数量及染色深浅变化是否表明在大红袍漆树中由于染色体倍数的变化,导致转录产物 RNA 发生变化,与二倍体漆树相比,其翻译产物漆酶蛋白在种类和数量上表现出一定的差异还有待于进一步研究。

3.3 漆酶同工酶谱在漆树品种鉴定中的意义

同工酶是分子水平的指标,按照一个基因编码一个同工酶亚基的理论,可从同工酶的表现型变异直接推测其基因型的变异,显然优于某些形态学的指标,后者往往是多个基因型的综合表现型,因此,同工酶作为遗传标志已广泛用于遗传分析的研究,具有分析方便、灵敏度高等特点,已成功用于农作物

品种鉴定研究,并开始用于作物育种优势杂交组合的测定(王镜岩等,2002)。郑晓鹰等(1997)在对大白菜品种同工酶的遗传多样性研究中指出,如果能将每种酶的多样性位点放在一起分析而不是单独分析一个同工酶,每一个品种至少有一个位点与其他品种不同,由此就可以对所有测试品种进行鉴别,并认为这种图谱可以作为每一个品种的指纹,成为鉴定种质资源的有效手段。由高八尺和大红袍漆酶同工酶谱可见,高八尺漆酶同工酶在品种内无论是条带的数目、位置还是条带染色的深浅程度都具有稳定性;而比较大红袍与高八尺漆酶同工酶谱可见,它们不仅条带的数目与后者有明显区别,而且条带颜色的深浅程度与高八尺漆酶同工酶也有明显区别。因此,漆树漆酶同工酶分析可作为鉴别漆树不同品种的重要方法之一。

3.4 等电聚焦技术及其在漆酶同工酶中的应用

等电聚焦(Isoelectrofocusing)是利用蛋白质或其他两性分子等电点的不同,在稳定、连续、线性pH梯度中进行蛋白质的分离和分析,其分离的关键条件是具有稳定的、连续的以及线性的pH梯度(郭晓君,2005)。在以往的研究中,曾采用HPLC法(万云洋等,2003)、非变性凝胶电泳法(韩君莉等,2008)、柱层析法(韦建学等,2000)等方法进行漆酶同工酶分离,均得到1~2条漆酶同工酶。本研究采用等电聚焦技术,将凝胶厚度调整为0.5mm进行薄层等电聚焦,对割漆季节中单株漆树个体不同月份的漆酶样品进行同工酶分离,共分离出4条清晰酶带,达到了很好的分离效果。其结果不存在漆树个体之间生漆的混合,更准确地反映漆树漆酶的活性变化及其同工酶组成。本结果与其他方法相比,显示出等电聚焦技术分离漆酶同工酶能获得更多酶带,而且分辨率高,具有条带清晰、染色明显、用时短、低消耗等优点。

参考文献:

王镜岩,朱圣庚,徐长法. 2002. 生物化学(上册)[M]. 第3版. 北京:高等教育出版社:428-429
 郭晓君. 2005. 蛋白质电泳实验技术[M]. 第2版. 北京:科学出版社,5
 Alfred M, Mayera, Richard C. *et al.* 2002. Laccase; new functions for an old enzyme[J]. *Phytochemistry*, **60**: 551-565
 Bengt R. 1970. Purification and properties of laccase and stercorin from *Rhus vernicifera* [J]. *Biochem Biophys Acta*, **205**: 35-47
 Cao ZY(曹治云). Zheng T(郑腾). Xie BF(谢必峰), *et al.*

2004. Advances of industrial application of laccase(漆酶工业应用的研究进展)[J]. *Lett Biotech*(生物技术通讯), **15**(4): 414-416
 Han JL(韩君莉). Guo LQ(郭丽琼). Zheng XB(郑晓冰), *et al.* 2008. Purification and characterization of fungal laccase from *ganoderma lucidum* strain TR6(灵芝TR6号漆酶的分离纯化及性质研究)[J]. *Chin J Appl & Environ Biol*(应用与环境生物学报), **14**(1): 99-103
 Huang QC(黄群策), Huang YQ(黄雅琴), Xie HB(谢惠波). 2009. Differences in comparative analysis of rice seed endosperm protein colchicine treatment(秋水仙素处理后水稻种子内胚乳蛋白的差异性比较分析)[J]. *Chin Rice*(中国稻米), (3): 25-27
 Gan JH(甘景镐). 1992. Into a new type of chemical materials from the old national treasure paint(如何从古老的国宝涂料转变为新型的化工材料——谈中国生漆改造的途径)[J]. *J Chin Lacq*(中国生漆), (1): 10-15
 Lan ZK(兰仲克). 1996. Sumac and lacquer(漆树和生漆)[J]. *Hunan Fore*(湖南林业), **1**: 28
 Lei FH(雷福厚), Lan HY(蓝虹云). 2003. Similarities and differences between rhus laccase and fungal laccases(漆树漆酶和真菌漆酶的同源研究)[J]. *J Chin Lacq*(中国生漆), **1**: 4-7
 Wan YY(万云洋), Du YM(杜玉民), Yang JH(杨建红), *et al.* 2003. Study on purification and characterization of two isoforms of chinese rhus laccases from *rhus vernicifera*(漆树漆酶两种同工酶分离纯化与特性研究)[J]. *Wuhan Univ J; Nat Sci Edit*(武汉大学学报·理学版), **49**(2): 201-204
 Wang AH(王安虎). 2009. The bitter buckwheat autotetraploid and diploid physiological indicators comparative analysis(苦荞麦同源四倍体与原种二倍体主要生理指标比较分析)[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), (2): 93-95
 Wei HL(魏华丽), Shi AS(史安石), Shi SL(石淑兰). 2004. Laccase and its applications(漆酶及其应用)[J]. *Paper and Paper Mak*(纸和造纸), (6): 79-81
 Wei JX(韦建学), Zhang FL(张飞龙), Wei SN(魏朔南). 2000. Laccase isoenzyme studies(漆酶同工酶研究)[J]. *J Chin Lacq*(中国生漆), **19**(4): 4-7
 Wei HL(魏华丽), Shi AS(史安石), Shi SL(石淑兰). 2004. Laccase and its applications(漆酶及其应用)[J]. *Heilongjiang Pulp & Paper*(黑龙江造纸), (4): 38-50
 Wei SN(魏朔南), Fu SY(傅淑颖), Hu ZH(胡正海). 2009. Variation of urushiol content in raw lacquer and the bark structure of *Toxicodendron vernicifluum* in different seasons and their correlation(不同季节漆树树皮结构与漆酚含量变化及其相关性)[J]. *Fore Sci*(林业科学), **45**(1): 67-73
 Yuan XK(袁筱昆). 1984. Laccase catalysis in the lacquer(漆酶在生漆中的催化作用)[J]. *J Chin Lacq*(中国生漆), (1): 34-38
 Zhao G(赵钢), Tang Y(唐宇). 1994. Comparative study on main characters of a new strain of autotetraploid and its autodiploid parent stock in tartary buckwheat(同源四倍体苦荞新品系与原种主要性状的比较研究)[J]. *Bull Sci & Tech*(科学通报), **10**(5): 321-325
 Zhao XP(赵喜萍), Wei SN(魏朔南). 2007. Genetic evaluation of *Toxicodendron vernicifluum* cultivars using amplified fragment
 (下转第752页 Continue on page 752)

宽约 2.6 mm, 卵状舟形, 前部舟状, 先端急尖, 常向下弯, 中下部呈红色, 基部凹陷呈囊状, 囊高 3~3.5 mm, 内面无毛; 蕊柱粗短, 长约 1.5 mm; 花药卵状心形, 先端急尖; 花粉团黄色, 2 对, 长约 1.5 mm; 蕊喙短, 长约 1 mm, 先端浅 2 裂。花期 7~8 月。

原记录产我国台湾省中部与北部, 生长于海拔 2 000~3 000 m 的高山林下阴湿处苔藓丛中 (Chung, 2002)。模式标本采自台北。本种发现于我国西藏波密县岗乡自然保护区, 生于海拔 2 950 m 的高山林下倒木苔藓丛中。

本种曾被处理为高山斑叶兰 (*G. marginata* Lindl.) 的异名 (田怀珍, 2008), 而经笔者考察西藏波密县岗乡的南湖斑叶兰, 对比于田怀珍拍摄于云南省维西县的高山斑叶兰的花期照片及花部解剖照片, 认为南湖斑叶兰的叶片较高山斑叶兰小, 中脉更为清晰而侧脉不甚明显, 同时花序梗短, 花萼片无毛而不同, 所以之前的处理值得再次商榷。此外胡超考察四川省峨眉山时发现了非常类似于南湖斑叶兰的植株, 但其个体甚小, 因为没有开花所以不能完全肯定为本种。

研究标本: 中国, 西藏, 波密县岗乡自然保护区, 2 950 m, 2011 年 7 月 14 日, 95°33'56.56" E, 29°51'30.74" N, B. J. Ge GBJ00889 (CSH); 台湾: 高雄县, 二零二六山庄到关山, 3 300 m, 2004 年 9 月 25 日, P. F. Lu 8712 (TAIF); 花莲县, 小奇莱, 2 700 m, 2005 年 8 月 21 日, 121°17' E, 24°08' N, P. F. Lu 10323 (TAIF); 台中县, 南湖大山南峰至中央尖溪山屋, 2 300~3 500 m, 2005 年 7 月 7 日, S. W. Chung 7837 (TAIF); 南投县, 奇莱主山, 3 200~3 300 m, 2005 年 3 月 10 日, 121°19' E, 24°04' N, S. W.

Chung 7682 (TAIF); 台中县, 七卡山庄至三六九山庄, 2006 年 8 月 20 日, S. W. Chung 8352 (TAIF); 台中县, 七卡山庄至三六九山庄, 2 700~2 800 m, 2006 年 8 月 20 日, S. W. Chung 8383 (TAIF); 新竹县, 塔克金溪, 2 900~3 100 m, 2008 年 8 月 6 日, S. W. Chung 9278 (TAIF)。

致谢 感谢台湾林业试验所标本馆的陈建文先生提供的标本扫描图片, 感谢浙江农林大学的叶喜阳、浙江大学的刘军、上海辰山植物园的魏宇昆博士在标本采集过程中提供的帮助。

参考文献:

- 田怀珍. 2008. 国产斑叶兰属(兰科)的分类研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院
- 林维明. 1993. 英汉兰学词典[M]. 台北: 淑馨出版社: 73
- 郎楷永. 1999. 斑叶兰属[M]//郎楷永, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志(第 17 卷). 北京: 科学出版社: 128-155
- 钟诗文. 2008a. 台湾产兰科斑叶兰属之分类研究[D]. 台北: 台湾中兴大学
- 钟诗文. 2008b. 台湾野生兰(下册)[M]. 台北: 行政院农业委员会林务局, 七星生态保育基金会: 22
- Chen SC, Lang KY, Gale SW, et al. 2010. *Goodyera* [M]//Chen SC, Liu ZJ, Zhu GH (eds). *Flora of China*. Beijing: Science Press; St. Louis, Missouri Botanical Garden Press, 25: 45-54
- Chung SW. 2002. *Goodyera pendula* Maxim. (Orchidaceae), a neglected species in the flora of Taiwan[J]. *Taiwania*, 47 (4): 259-263
- Fukuyama N. 1934. *Studia Orchidacearum Japonicarum III Orchidaceae Formosanae Novae Atque Criticae* [J]. *Bot Mag*, 48(571): 432
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, et al. 2003. *Genera Orchidacearum Vol. 3. Orchidoideae (Part 2) Vanilloideae* [M]. England: Oxford University Press

(上接第 780 页 Continue from page 780)

length polymorphism markers(漆树品种的 AFLP 分析及评价(简报))[J]. *J Mol Cell Biol*(分子细胞生物学报), (4): 262-266

Zheng XY(郑晓鹰), Li L(李丽), Li XQ(李秀清). 1997. Genetic polymorphism of isozyme and seed protein in chinese cabbage (大白菜品种同工酶及水溶蛋白的遗传多样性分析)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), 24(3): 244-248

Zhou YY(周易勇). 1989. Overview of the methods of determina-

tion of laccase activity(漆酶活性测定方法概述)[J]. *J Chin Lacq*(中国生漆), 8(1): 25-27

Zhou YY(周易勇). 1992. Inhibitors of laccase(漆酶的抑制剂)[J]. *J Chin Lacq*(中国生漆), 11(1): 19-20

Zhu QZ(朱启忠), Lü XP(吕新萍), XU GY(徐国英), et al. 2009. Study on decolorization of dyes caused by laccase(漆酶对染料的脱色研究)[J]. *Res Dev & Market*(资源开发与市场), 25(6): 484-486

作者: [邵杨](#), [晁菲](#), [魏朔南](#), [胡正海](#), [SHAO Yang](#), [CHAO Fei](#), [WEI Shuo-Nan](#), [HU Zheng-Hai](#)
作者单位: [西北大学生命科学院, 西安, 710069](#)
刊名: [广西植物](#) 
英文刊名: [Guihaia](#)
年, 卷(期): [2012, 32\(6\)](#)

参考文献(23条)

1. [王镜岩;朱圣庚;徐长法](#) [生物化学\(上册\)](#) 2002
2. [郭晓君](#) [蛋白质电泳实验技术](#) 2005
3. [Alfred M;Mayera;Richard C](#) [Laccase:new functions for an old enzyme](#) 2002
4. [Bengt R](#) [Purification and properties of laccase and stellacyanin from Rhus vernici f era](#) 1970
5. [曹治云, 郑腾, 谢必峰, 陆承平](#) [漆酶工业应用的研究进展](#)[期刊论文]-[生物技术通讯](#) 2004(4)
6. [韩君莉, 郭丽琼, 郑晓冰, 周伟坚, 林俊芳](#) [灵芝TR6号漆酶的分离纯化及性质研究](#)[期刊论文]-[应用与环境生物学报](#) 2008(1)
7. [黄群策, 黄雅琴, 谢慧波](#) [秋水仙素处理后水稻种子内胚乳蛋白的差异性比较分析](#)[期刊论文]-[中国稻米](#) 2009(3)
8. [甘景镒](#) [如何从古老的国宝涂料转变为新型的化工材料--谈中国生漆改造的途径](#)[期刊论文]-[中国生漆](#) 1992(1)
9. [兰仲克](#) [漆树和生漆](#) 1996
10. [雷福厚, 蓝虹云](#) [漆树漆酶和真菌漆酶的异同研究](#)[期刊论文]-[中国生漆](#) 2003(1)
11. [万云洋, 杜予民, 杨建红, 陈荣智, 肖玲, 张艳](#) [漆树漆酶两种同工酶分离纯化与特性研究](#)[期刊论文]-[武汉大学学报\(理学版\)](#) 2003(2)
12. [王安虎](#) [苦荞麦同源四倍体与原种二倍体主要生理指标比较分析](#)[期刊论文]-[江苏农业科学](#) 2009(2)
13. [魏华丽, 史安石, 石淑兰](#) [漆酶及其应用](#)[期刊论文]-[纸和造纸](#) 2004(6)
14. [韦建学;张飞龙;魏朔南](#) [漆酶同工酶研究](#) 2000(04)
15. [魏华丽, 史安石, 石淑兰](#) [漆酶及其应用](#)[期刊论文]-[黑龙江造纸](#) 2004(4)
16. [魏朔南, 傅淑颖, 胡正海](#) [不同季节漆树皮结构与漆酚含量变化及其相关性](#)[期刊论文]-[林业科学](#) 2009(1)
17. [袁筱昆](#) [漆酶在生漆中的催化作用](#) 1984(01)
18. [赵钢, 唐宇](#) [同源四倍体苦荞新品系与原种主要性状的比较研究](#)[期刊论文]-[科技通报](#) 1994(5)
19. [赵喜萍, 魏朔南](#) [漆树品种的AFLP分析及评价\(简报\)](#)[期刊论文]-[分子细胞生物学报](#) 2007(4)
20. [郑晓鹰;李丽;李秀清](#) [大白菜品种同功酶及水溶蛋白的遗传多样性分析](#) 1997(03)
21. [周易勇](#) [漆酶活性测定方法概述](#)[期刊论文]-[中国生漆](#) 1989(1)
22. [周易勇](#) [漆酶的抑制剂](#)[期刊论文]-[中国生漆](#) 1992(1)
23. [朱启忠, 吕新萍, 徐国英, 艾良, 宋炳红, 李文静](#) [漆酶对染料的脱色研究](#)[期刊论文]-[资源开发与市场](#) 2009(6)

引用本文格式: [邵杨](#). [晁菲](#). [魏朔南](#). [胡正海](#). [SHAO Yang](#). [CHAO Fei](#). [WEI Shuo-Nan](#). [HU Zheng-Hai](#) [漆树漆酶割漆季节活性变化及同工酶研究](#)[期刊论文]-[广西植物](#) 2012(6)