

# 利用POD同工酶电泳对辣椒进行分类

张海利<sup>1,2</sup>, 陈勇兵<sup>2</sup>, 徐坚<sup>2</sup>, 熊自立<sup>2</sup>

(1. 温州市农业科学院蔬菜科学研究所, 浙江温州325014; 2. 温州科技职业学院, 浙江温州325014)

**摘要** [目的] 通过分析同工酶的酶谱特征, 研究辣椒种类间的亲缘关系。[方法] 以12个辣椒材料为试材, 进行POD同工酶电泳, 对不同浓度分离胶进行选择, 并应用POD同工酶对12个辣椒材料, 进行亲缘关系的鉴定。[结果] POD同工酶以浓度10%的分离胶分离效果最好, 得到的酶带最清晰, 有利于进行相关分析。12个辣椒材料遗传距离在0~0.51范围内, 当遗传距离为0.36时, 可以将其分为3类; 当遗传距离为0.16时, 可以将其分为6类。[结论] 利用POD同工酶进行分类, 分类结果与根据辣椒果实性状进行的分类基本一致, 说明利用同工酶分类法可行。

**关键词** 辣椒; 同工酶; 分类; POD

中图分类号 S641.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-08952-02

## The Classification of Pepper with the POD Isozyme Electrophoresis

ZHANG Hai-li et al (Vegetable Institute, Wenzhou Academy of Agriculture Sciences, Wenzhou, Zhejiang 325014)

**Abstract** [Objective] The aim of the research was to study the genetic relationship between pepper species by analyzing the zymogram features of isozymes. [Method] 12 kinds of pepper materials were used for experiment of POD isozymes electrophoresis. Different concentrations of gel were chosen. And the genetic relationship of 12 pepper materials was identified using POD isozymes. [Result] 10% concentration of gel was suitable for POD isozyme analysis. Clear enzyme band was helpful for correlative analysis. Genetic distance of 12 varieties changed from 0 to 0.51. It could be divided into three kinds species when genetic distance was 0.36, six kinds when it was 0.16. [Conclusion] The classification result with POD isozymes electrophoresis was consistent with which identified by fruit characters.

**Key words** Pepper; Isozyme; Classification; POD

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”。同工酶技术是通过电泳和组织化学方法进行特异性染色而把酶蛋白分子分离, 并将其位置和活性直接在染色区带标记出来, 酶蛋白所显示的图像称为酶谱。该技术逐渐成为分子水平上研究生命现象的一种重要手段<sup>[1]</sup>。育种学家、种质资源保藏机构和种子公司等都希望对品种、品系、自交系、种质材料或商品种子进行快速、准确的鉴定。就杂种的鉴定意义而言, 不仅是杂种一代品种纯度检测的方法, 而且也是缩短育种周期的必要措施, 由于同工酶技术在这方面具有简便、准确、快速的优点, 因而, 受检测的蔬菜种类日益增多, 目前已见报道的蔬菜达20多种<sup>[2]</sup>。

## 1 材料与试验方法

### 1.1 材料 试验用的12份辣椒材料见表1。

表1 试验用辣椒

Table 1 12 peppers for experiment

编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name
1	九香	7	朝天椒1
2	二金条	8	川泡1号
3	胶州长海椒	9	朝天椒2
4	泸州长海椒	10	朝天椒3
5	野山椒1	11	墨西哥椒
6	野山椒2	12	川泡1号4

**1.2 仪器** CONSORT-E844 电泳仪、DYCZ-28A 单面垂直板电泳槽、微量进样器(50 μl)。

**1.3 不同浓度凝胶POD同工酶电泳** 浓缩胶配比为4<sup>#</sup>5<sup>#</sup>3<sup>#</sup>6<sup>#</sup>=1214; 分离胶浓度设计参照文献[3]方法但有所改动, 分离胶配比设计如下: A, 1<sup>#</sup>2<sup>#</sup>3<sup>#</sup>水=1214, T=7%, C=2.5%; B, 1<sup>#</sup>2<sup>#</sup>3<sup>#</sup>水=1213, T=8%, C=

2.5%; C, 1<sup>#</sup>2<sup>#</sup>3<sup>#</sup>水=1313, T=10%, C=2.5%。

同工酶电泳时, 母液配制如表2所示。电极缓冲液(7号母液)用时稀释10倍。

表2 凝胶母液配制

Table 2 Preparation of gel mother liquor

试剂名称 Name of reagent	母液编号 No. of mother liquor						
	1	2	3	4	5	6	7
1 ml/LHQ	48 ml			48 ml			
Tis	36.6 g			5.98 g			6g
TEMED	0.23 ml			0.46 ml			
Acr		28.0 g			10 g		
Bs		0.74 g			2.5 g		
AP			0.56 g				
Gly							28.2 g
蔗糖 Sucrose						40 g	
水 Water	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
pH值 pH value	8.9			6.7			8.3

**1.4 POD同工酶电泳** 按一定的比例依次配好浓缩胶和分离胶, 灌胶, 凝固后用微量进样器加样, 每泳道加20 μl 酶液; 在2个电极槽中缓慢注入电极缓冲液, 在加入时应注意防止气泡的产生; 在上槽电极液中滴加2~3滴溴酚蓝做指示剂, 在2~4℃的冰箱内电泳, 预电泳电流1 mA/cm, 进入分离胶后加大到2 mA/cm; 待指示剂移动到离底部1 cm时, 停止电泳, 剥胶染色。

凝胶染色采用醋酸-联苯胺法染色, 具体操作参照文献[4]方法。酶带显色后用自来水洗脱剩余的染色液置于蒸馏水中, 凝胶板扫描分析采用SynGene GeneTools系统。

**1.5 聚类分析** 提取12个品种材料健康成株叶片的酶液, 方法同上。采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶系统, 分离胶浓度10%, 上样量20 μl。电泳方法及凝胶板染色、扫描同前。

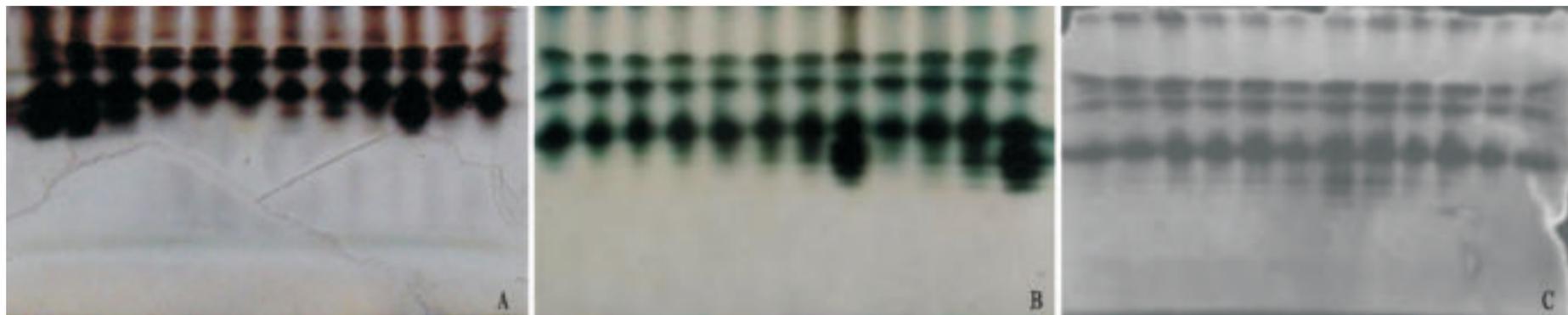
## 2 结果与分析

**2.1 不同浓度凝胶POD同工酶电泳** 关于同工酶电泳的

**作者简介** 张海利(1980-), 男, 浙江温州人, 硕士, 助理农艺师, 从事茄果类蔬菜研究。

收稿日期 2008-02-19

报道很多,但是综观所有发表的图文可以看出,几乎都是采用传统的标准胶进行的电泳,所得到的酶带多数都较模糊,不易分辨。该试验以12个辣椒为试验材料,进行了不同分离胶浓度分离效果的比较试验,结果如图1所示。从扫描图谱来看,标准的分离胶浓度对酶的分选效果不是很好,酶带



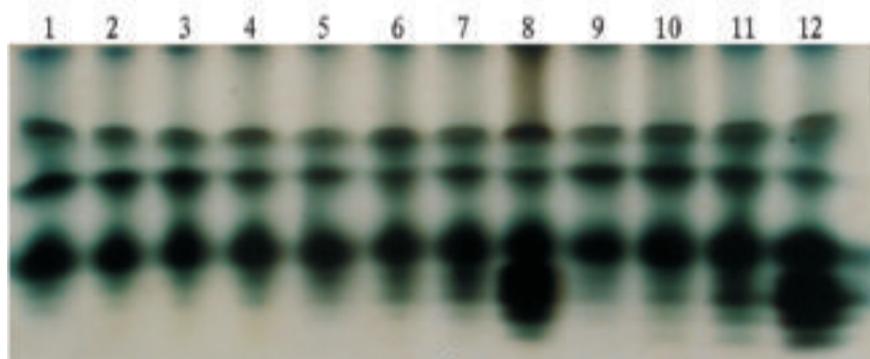
注:凝胶浓度A:7%,B:8%,C:10%。

Nte: Gel concentrations of A, B, C were 7%, 8% and 10%.

图1 不同浓度凝胶POD同工酶电泳扫描

Fig.1 Hetrophoresis scanning of POD isozyme with different gel concentrations

**2.2 品种聚类分析** 12个材料的辣椒成株叶片的POD同工酶扫描图谱如图2所示,由电泳扫描图谱可见,所有品种都出现了 $R_f$ 为0.17、0.21和0.42的3条带,这可能是辣椒的特征谱带。所有试材共出现了8条酶带,其中川泡1号、川泡1号4酶带数最多(8条),野山椒1、野山椒2、朝天椒2酶带数最少(3条)。所有品种的 $R_f$ 值为0.18~0.51,酶带的差异主要表现在第3、第6条酶带。



注:1~12为材料顺序。下同。

Nte: 1-12 are material sequences. The same as follows.

图2 12个辣椒材料POD同工酶酶谱

Fig.2 Hetrophoresis scanning of POD isozyme of 12 hot pepper materials

用1和0记录条带的有无,形成1/0矩阵,利用NISYSpc2.10的SIMQUAL法计算材料间遗传相似系数及相似系数矩阵,用SAHN功能按照UPGMA法进行聚类分析,再用TreePlot功能绘出聚类分析树状图(图3)。根据聚类分析,亲缘关系越近的种类,相似系数越接近于1,遗传距离越接近于0,彼此无关的种类其相似系数越接近于0,遗传距离越接近于1。从树形图可以看出辣椒属12个品种在遗传距离0~0.51,当遗传距离为0.36时,可以将它们分为3类:第1类:九香、二金条、胶州长海椒、泸州长海椒、川泡1号、朝天椒2、朝天椒3、墨西哥椒、川泡1号4;第2类:野山椒1、野山椒2;第3类:朝天椒1。当遗传距离为0.16时,可以将它们分为6类:第1类:九香、二金条、胶州长海椒、泸州长海椒、朝天椒3;第2类:朝天椒2;第3类:川泡1号、墨西哥椒、川泡1号4。川泡1号是由墨西哥经选育出的,川泡1号4是由川泡1号选出来的果大、果型正的材料,所以三者亲缘关系非常相近;第4类:朝天椒1;第5类:野山椒1;第6类:野

少且每个谱带较宽,拖尾比较严重,不利于酶带的分析;分离胶浓度提高到10%时,酶带分离效果最好,产生的条带数目多且清晰,非常有利于进行酶谱带的分析;8%分离胶浓度分离效果居中。由此可见,进行POD同工酶电泳分析时分离胶浓度以10%最适宜。

山椒2。

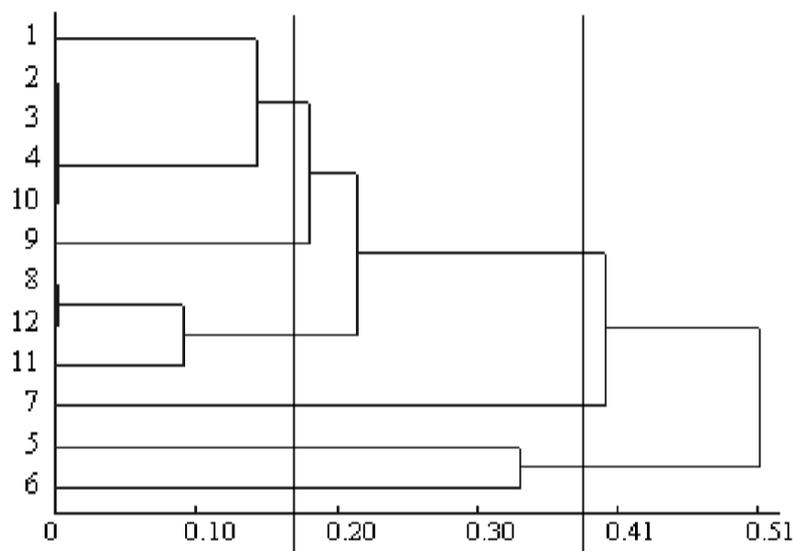


图3 12个不同抗性辣椒材料聚类树形图

Fig.3 Dendrogram of 12 varieties of hot pepper material cluster with different resistances

### 3 讨论

植物在进化过程中,形成了不同亲缘关系的物种。一定的亲缘关系反映了植物在基因型上存在某种相关,在分类学中一般依据物种所表现的性状,来判别这种亲缘关系。同工酶是具有相同功能而结构和性质不同的蛋白质分子,它的合成主要受基因的控制,根据分子遗传学理论,生物差别的根源在于蛋白质分子的氨基酸顺序,其亲缘关系越近,氨基酸顺序也越接近,同工酶作为蛋白质的一种也有同样的性质。因此,分析同工酶的酶谱特征,将其作为物种分类的一种重要指标<sup>[5-8]</sup>来研究种类间的亲缘关系。

许多学者<sup>[9-11]</sup>认为,只要取样时期和器官得当,POD同工酶具有较好的稳定性和重复性,能应用于分类和亲缘关系的研究,并且在这方面取得了一些成绩。到目前为止应用POD同工酶对物种进行分类和亲缘关系的报道已经有很多,在蔬菜分类方面应用也较多,如芥菜<sup>[12]</sup>、茄子<sup>[13]</sup>、南瓜<sup>[14]</sup>、茭白<sup>[15]</sup>等。

该研究12个辣椒材料在遗传距离0~0.51,当遗传距离为0.36时,可以将它们分为3大类;当遗传距离为1.9时,可

(下转第9007页)

有显著的抑制作用。这说明在甘蔗生产上如果过量施用氮肥特别是  $\text{NH}_4^+$ -N 如尿素将不利于某些甘蔗品种体内的固氮菌进行生物固氮。但过量的氮肥对甘蔗氮代谢的影响程度究竟有多大,以及对甘蔗生物固氮的发挥影响程度如何都需进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] LAMH M, COSCHIGANO KT, OLIVEIRA C. The molecular genetics of nitrogen assimilation in to amino acids in higher plants[J]. *Annu Rev Hart Physio and Hart Mol Bo*, 1996, 47 :569 - 593 .
- [2] VERMA DP S. Control of gene expression[M]. Boca Raton CRC Press, 1993 : 425 - 479 .
- [3] LEA PJ, MEIN J. Alternative route for nitrogen in higher plants[J]. *Nature*, 1974, 251 :614 - 616 .
- [4] WANG XZ, CHENG BS, ZHANG GZ. Relationship between nitrogen for sand plant growth and its influence factors[J]. *Journal of Shandong Agricultural University*, 1990, 21(1) :93 - 98 .
- [5] LI CF, MA FM, ZHAO Y. Effects of nitrogen forms on key enzyme activities and related products in sugar and nitrogen metabolism of sugar beet (*Betavulgaris*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(1) :128 - 132 .
- [6] BODDEY R M. Biological nitrogen fixation in sugarcane : A energetically viable lifeful production[J]. *Crit Rev Keyto Hart Si*, 1995, 14:263 - 279 .
- [7] SHAFSHAK S A, EL GEDDAWY I H, ALLAMS A H, et al. Effect of planting densities and nitrogen fertilizer on: 1 - growth criteria, juice quality and chemical constituents of some sugar cane varieties[J]. *Pakistan Sugar Journal*, 2001, 16 :2 - 11 .
- [8] JAMES E K, OLIVARES FL. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs[J]. *Rev Hart Science*, 1998, 17 : 77 - 119 .
- [9] JAMES E K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis[J]. *Field*

*Crops Research*, 2000, 65 :197 - 209 .

- [10] 谭裕模, 王伦旺, 王天算. 固氮甘蔗品种 RB72-454 田间肥料敏感试验[J]. *广西蔗糖*, 2002, 26(1) :12 - 15 .
- [11] 华东师范大学生物系植物生理教研室. 植物生理学实验指导[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980 :73 - 75 .
- [12] 邹琦. 植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999 :56 - 125 .
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000 :123 - 124 .
- [14] X. H. 波钦诺克. 植物生物化学分析方法[M]. 荆家海, 丁钟荣, 译. 北京: 科学出版社, 1981 :95 - 101 .
- [15] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976 :72 :248 - 254 .
- [16] MUNOZ ROJAS J, CABALLERO MELLADO J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth[J]. *Microb Ecol*, 2003, 46 :454 - 464 .
- [17] FERRO COSTA J MT, RUSCHEL A P. 甘蔗植株固氮菌的季节性变化[J]. *国外农学——甘蔗*, 1984(1) :26 - 30 .
- [18] II R P, MACRAE I C. Specific association of Diazotrophic acetobacters with sugarcane [J]. *Sil Bd Biochem*, 1991, 23 :999 - 1002 .
- [19] NOEL A TEJERA, EDUARDO ORTEGA, ROSA RODRIGUEZ, et al. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* [J]. *Can J Microbiol*, 2004, 50 :745 - 750 .
- [20] STEPHAN MP, OLIVEIRA M, TEIXEIRA KR S, et al. Physiology and nitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 77 :67 - 72 .
- [21] ABELLANI P, ARMAS URGUZA DE R, VALADIER MH. Shatten effect of nitrate on carbon metabolism of two sugarcane cultivars differing in their biomass production[J]. *Phytochem*, 1994, 36 :819 - 823 .
- [22] SPRENT JI, JAMES E K. N-fixation by endophytic bacteria: Questions of entry and operation [C] // FENDRICK, et al. *Asospirillum VI and related microorganisms*. Berlin, Heidelberg :Spring Verlag, 1995 :15 - 30 .

(上接第8953页)

以将它们分为6类。其中川泡1号、墨西哥椒、川泡1号4一直被归为一类,这是因为川泡1号是由墨西哥经选育出的,川泡1号4是由川泡1号选出来的果大、果型正的材料,所以三者亲缘关系非常相近。

在我国民间,很早就根据辣椒果实性状将辣椒分为牛角椒、朝天椒、线椒、圆锥椒、大甜椒等。根据果实的辣味程度分为甜椒类型、半辣类型、辛辣类型。根据熟性的早晚分为早熟椒、中熟椒、晚熟椒。我国辣椒的园艺学分类,尚未形成公认的完整体系。1923年,贝利将辣椒分为5个变种,分别为:樱桃椒、圆锥椒、簇生椒、长椒、灯笼椒。我国目前的蔬菜学教材采用贝利的这种分类方法。该研究辣椒属12个品种利用POD同工酶进行分类,分类结果与根据辣椒果实性状进行的分类基本一致,说明利用同工酶分类法可行。

#### 参考文献

- [1] 吴少伯. 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳[J]. *植物生理学通讯*, 1979(1) :30 - 33 .
- [2] 张彦萍, 刘海河, 马德伟. 蔬菜同工酶研究现状及存在问题[J]. *中国蔬菜*, 1997(3) :46 - 50 .

- [3] 陈启林, 巩振辉, 陈静. 番茄POD与EST同工酶PAGE方法研究[J]. *西北农业学报*, 1999, 8(1) :87 - 90 .
- [4] 中科院上海植物生理所和上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999 .
- [5] 景涛, 傅桂荣, 王海廷, 等. 接种TMV后番茄不同抗性品种的同工酶分析[J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 1998, 14(3) :89 - 97 .
- [6] 张兴平. 甜瓜种质资源的同工酶电泳分析[J]. *西北农业大学学报*, 1988, 16(2) :5 - 17 .
- [7] 赵尊练, 王鸣. 非洲西瓜种质资源的抗病性鉴定及其POD同工酶分析[J]. *西北农业学报*, 1994, 3(2) :87 - 91 .
- [8] 梁燕. 结球白菜同核异质雄性不育系同工酶研究[J]. *园艺学报*, 1994, 21(3) :264 - 268 .
- [9] 阮伟. 芒果过氧化物酶同工酶分析[J]. *热带作物研究*, 1991, 13(2) :48 - 51 .
- [10] 陈熹, 柯冠武. 应用过氧化物酶同工酶分析对福建龙眼品种的分类初探[J]. *中国果树*, 1989(1) :18 - 21 .
- [11] 张进仁. 我国柑橘同工酶研究进展[J]. *中国柑橘*, 1990, 19(3) :20 - 22 .
- [12] 曹砾生, 李薇, 江解增, 等. 运用过氧化物酶谱进行茭白品种分类[J]. *中国蔬菜*, 1993(4) :11 - 14 .
- [13] 刘建华, 卢鉴植, 巩振辉, 等. 辣甜主要品质性状与抗病性的相关分析初探[J]. *江苏农业科学*, 1991(3) :45 - 46 .
- [14] 方荣, 陈学军, 缪南生, 等. 辣椒主要产量性状遗传相关研究[J]. *江西农业学报*, 2005, 17(4) :36 - 39 .
- [15] 李玉华, 闫立英. 辣椒主要农艺性状的相关分析[J]. *北京农学院学报*, 2003, 18(1) :10 - 12 .