

## 5 种杨树种间及品种间同工酶的比较分析

赵晓平<sup>1,2</sup>, 荣斌恒<sup>3\*</sup>, 刘玲玉<sup>2</sup>, 李珍<sup>1</sup> (1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古呼和浩特010030; 2. 包头师范学院生物科学与技术学院, 内蒙古包头014030; 3. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古呼和浩特010030)

**摘要** [目的] 为正确选择杂交亲本和杂种后代的鉴定提供依据。[方法] 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 对杨属的5种杨树过氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶同工酶的酶谱进行了比较分析。[结果] 黑杨组和青杨组杨树的过氧化物酶同工酶和细胞色素氧化酶同工酶的酶谱带数较多, 白杨组较少。形态相似的不同种之间过氧化物酶同工酶酶谱比较接近, 相似系数较高。处在同一组的两种杨树之间的细胞色素氧化酶同工酶的相似系数较大, 处在不同组之间的相似系数较小。青杨组与黑杨组的关系较近, 与白杨组的关系相对较远。[结论] 杨属中存在广泛的遗传多样性, 利用同工酶分析可以找出品种间的细微差异。

**关键词** 杨属; 过氧化物酶同工酶; 细胞色素氧化酶同工酶; 酶谱; 分析

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)06-02262-03

### Comparative Analysis of Isoenzyme Among 5 Poplar Tree Species and their Varieties

ZHAO Xiao ping et al (College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

**Abstract** [Objective] The research aimed to provide basis for selecting crossing parents correctly and identifying the hybrid progeny. [Method] With the method of polyacrylamide gel electrophoresis, the zymograms of peroxidase isozyme and cytochrome oxidase isozyme of 5 poplar tree varieties were compared and analyzed. [Result] The zymogram bands of peroxidase isozyme and cytochrome oxidase isozyme in the groups of black poplar and cathay poplar were more and that in the group of white poplar was less. The zymograms of peroxidase isozyme among different varieties with similar shape were quite close and their similarity coefficient was higher. The similarity coefficient of cytochrome oxidase isozyme between 2 varieties of poplar tree in the same group was greater and the similarity coefficient among different groups was smaller. Cathay poplar group had closer relationship with black poplar and had relatively further relationship with white poplar tree. [Conclusion] There was extensive genetic diversity in *Populus* and subtle differences among varieties could be found with the isoenzyme analysis.

**Key words** *Populus*; Peroxidase isozyme; Cytochrome oxidase isozyme; Zymogram; Analysis

杨树品种繁多、性状各异, 具有速生性、适应性强等特点, 在林业生产、环境绿化、防风固沙等方面有着广泛的用途。笔者采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对杨属的5个种和杂交种的过氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶同工酶进行了比较分析。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 5个杨属树种的特征如下: 钻天杨(*P. nigra*), 属于黑杨组的欧洲黑杨, 叶扁三角形, 叶缘波状缺裂; 加拿大杨(*P. euramericana*), 是美洲黑杨与欧洲黑杨的杂交种, 树干通直, 树皮有纵裂, 叶形近三角形; 小叶杨(*P. sinorii*), 属于青杨组, 叶小、菱形, 叶缘光滑; 新疆杨(*P. balleana*) 属于白杨组的白杨亚组, 叶缘掌状、深裂, 叶背面有绒毛; 河北杨(*P. hopeiensis*) 属于白杨组的山杨亚组, 叶卵圆形, 叶缘有浅波状锯齿<sup>[1]</sup>。5个树种均采自包头市园林处实验林场。

**仪器:** JY系列电泳仪(JY1200, 北京君意), 垂直板型电泳槽, 微量移液器, TGL1600离心机, 脱色摇床等。药品: 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、甘氨酸、过硫酸铵、蔗糖、溴酚蓝、联苯胺、过氧化氢、二甲基对苯二胺、1-萘酚。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 过氧化物酶(POD)同工酶实验过程。** POD是一族能利用过氧化氢的酶, 也是植物中最重要的氧化还原酶类之一。POD同工酶是植物体内的天然标记, 它可从分子和生化水平反映机体的各种变化, 为植物的品种鉴定、纯度分析、抗旱、抗病等方面的研究提供重要的参考价值。

**1.2.1.1 样品制备。** 取钻天杨、加拿大杨、小叶杨、新疆杨、

河北杨的叶片各1g, 洗净置于研钵中, 加0.5~1.0ml水研磨匀浆, 后将样品移至小离心管中, 3500r/min离心5min, 取上清, 混入等体积的50%蔗糖溶液, 电泳前放入冰箱中保存。

**1.2.1.2 聚丙烯酰胺凝胶系统和相关溶液的配制。** 依照刘祖洞等的聚丙烯酰胺凝胶系统的配制方法进行凝胶配制<sup>[2]</sup>, 垂直板型电泳。

电极缓冲液配制: Tris 30.0g、甘氨酸14.4g, 加水至1000ml, pH值8.3, 使用时稀释10倍。

染色液配制- 过氧化物酶染液: 醋酸联苯胺溶液5ml, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2ml, H<sub>2</sub>O 93ml<sup>[2]</sup>。

**1.2.1.3 加样和电泳。** 各取0.05ml的酶提取液, 加1小滴0.005%溴酚蓝, 用微量移液器取10μl, 分别加到各点样孔中, 然后在电泳槽中加电极缓冲液, 在稳压220V、电流18~20mA、4℃条件下电泳, 当溴酚蓝迁至凝胶下端0.5~1.0cm时, 停止电泳。电泳时间1.5~2.0h。

**1.2.1.4 染色。** 从玻璃板上取下凝胶, 将其置于一个玻璃器皿中, 加入染色液, 浸泡整个凝胶, 摇床染色10min, 呈现酶带后取出凝胶, 用水漂洗终止染色。

**1.2.2 细胞色素氧化酶同工酶实验过程。**

**1.2.2.1 电泳。** 采用不连续聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳法。先制胶, 分离胶质量浓度为70g/L, 浓缩胶质量浓度为30g/L; 细胞色素氧化酶的分离胶用质量浓度为20g/L的过硫酸铵溶液作聚合剂, 接着用微量进样器在每样品孔中加入20μl样品提取液, 接通电源, 开始以120V电压电泳30min, 待样品进入分离胶时把电压升至220V, 恒压电泳至溴酚蓝迁移到距凝胶末端0.5~1.0cm处为止<sup>[3]</sup>。

**1.2.2.2 细胞色素氧化酶同工酶实验结果记录。** 取下胶板, 用去离子水冲洗干净, 然后用二甲基对苯二胺和1-萘酚染色(在37℃的条件下恒温染色30~60h, 直至出现天蓝色谱带), 冲洗、画图、固定、记录并计算R<sub>F</sub>值。

基金项目 包头师范院校内资助项目。

作者简介 赵晓平(1956-), 男, 山西忻州人, 博士, 副教授, 从事分子遗传学与育种方面的教学和研究工作。\* 通讯作者, 博士生导师, 研究员。

收稿日期 2007-11-07

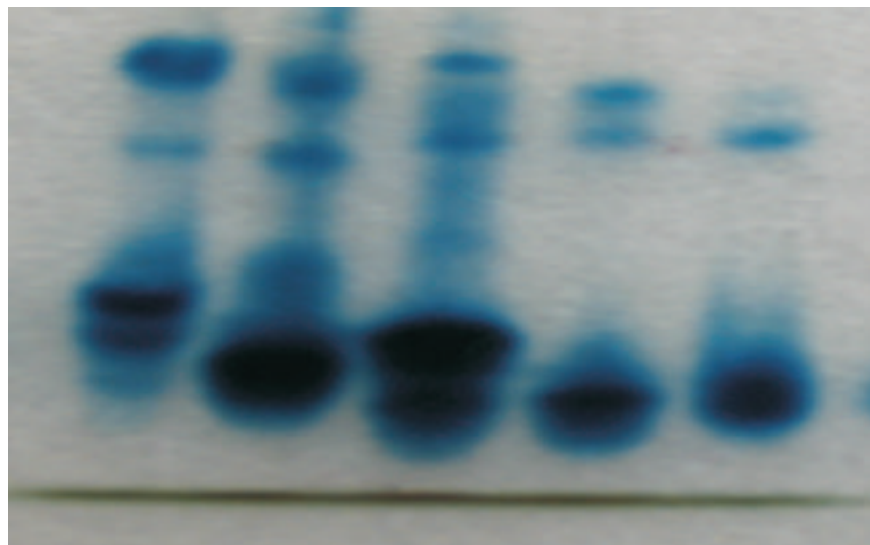


图1 5种杨树POD同工酶酶谱

Fig.1 Isozyme zymogram of POD in 5 species of poplar

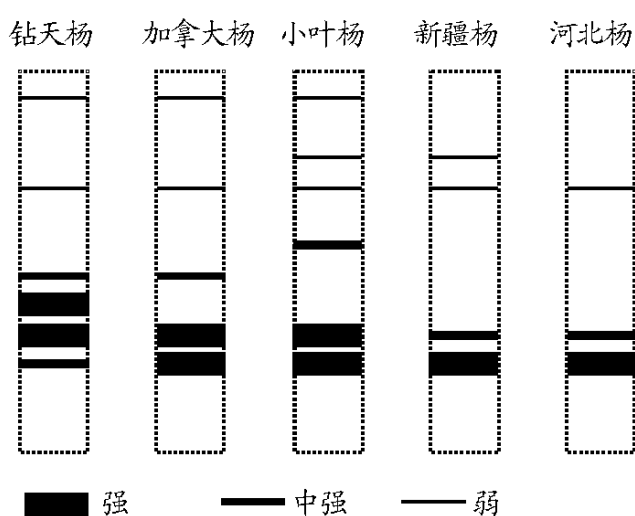


图2 5种杨树POD同工酶模式

Fig.2 Isozyme zymogram pattern of POD in 5 species of poplar

2 结果与分析

2.1 过氧化物酶同工酶实验结果与分析

2.1.1 统计酶带数并计算电泳迁移率。图1和2是钻天杨、加拿大杨、小叶杨、新疆杨、河北杨树的过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳实验结果以及所绘制的模式图。

根据酶谱电泳分离特性划分区带,用字母命名区带。按照从阴极到阳极的顺序,可将杨树的过氧化物酶同工酶谱带大致分为3个区,分别是POD A、POD B、POD C。不同区带内各条同工酶谱带,按照从阴极到阳极的方向依照所属区带再用数字编号,统计每个品种各自的酶带数和各树种的酶带总数,计算出各自酶带的相对迁移率,如表1所示。相对迁移率的计算依照如下公式:酶带迁移率  $R_f$  = 酶带迁移距离 / 溴酚蓝指示剂迁移距离。从实验结果可以看出,第1区(POD A)的谱带数有1条,电泳迁移率最小,其数值为0.22,河北杨和新疆杨缺乏此条酶带。第2区中所有的种都有1条共同的酶带,其迁移率为0.46,小叶杨和新疆杨在该区除了迁移率为0.46的酶带之外,还有1条迁移率为0.34的酶带。第3区所包含的酶带数较多,5种杨树中,钻天杨在该区酶带数最多,共有4条酶带,其迁移率分别为0.60、0.64、0.70、0.79,中间2条谱带较强。加拿大杨在该区有3条酶带,迁移率分别为0.60、0.70、0.79,前者较弱,后2条谱带较强。小叶杨在该区有3条酶带,迁移率分别为0.56、0.70和0.79,前者较弱,后二者较强。新疆杨和河北杨在该区都有2条酶带,迁移率分别为0.70和0.79,前者为弱带,后者为强带。

表1 POD同工酶酶带所属区、酶带数及相对迁移率

Table 1 The isozyme bands classification, enzyme bands number and relative movement rate of POD

种类 Species	POD A		POD B		酶带数 Enzyme bands	POD C					酶带总数 Total enzyme bands		
	酶带数 Enzyme bands	相对迁移率(A) Relative movement rate	酶带数 Enzyme bands	相对迁移率 Relative movement rate		相对迁移率 Relative movement rate							
						B1	B2	C1	C2	C3		C4	C5
钻天杨( <i>P. nigra</i> )	1	0.22	1	0.46	4	0.60	0.64	强Strong	0.70	强Strong	0.79	6	
加拿大杨 ( <i>P. euramericana</i> )	1	0.22	1	0.46	3	0.60			0.70	强Strong	0.79	强Strong	5
小叶杨( <i>P. sinensis</i> )	1	0.22	2	0.34 0.46	3	0.56	0.70	强Strong	0.79	强Strong		6	
新疆杨( <i>P. holleana</i> )			2	0.34 0.46	2		0.70		0.79	强Strong		4	
河北杨( <i>P. hopeiensis</i> )			1	0.46	2		0.70		0.79	强Strong		3	

2.1.2 相似系数的计算和亲缘关系分析。相似系数  $C = 2n / (n_1 + n_2) \times 100\%$ , 式中  $n_1$  为A酶谱的谱带数;  $n_2$  为B酶谱的谱带数;  $n$  为A × B两种相同的酶带数<sup>[4]</sup>。5种杨树相互之间的相似系数计算结果列于表2中(种的名称用各自中文名称1个汉字代表)。

表2 不同种间的相似系数

Tab.2 The similarity coefficient of different species

	钻	加	小	新	河
钻	0	0.73	0.50	0.20	0.22
加		0	0.73	0.44	0.50
小			0	0.60	0.44
新				0	0.86
河					0

可以看出,形态相似的不同种之间POD同工酶谱比较接

近,相似系数较高。比如,河北杨和新疆杨同属于白杨组,其相似系数为0.86。而河北杨和钻天杨分别处在白杨组和黑杨组,相似系数仅为0.22。较多的证据证明,青杨派和黑杨派之间的亲缘关系较近,而与白杨派的关系较远。从实验结果也可以看出,青杨派和黑杨派的POD同工酶谱也较为相似,而与它们关系较远的白杨组的POD之间同工酶谱存在较大差异。

2.2 细胞色素氧化酶同工酶实验结果与分析

2.2.1 拍照并绘制模式图。5种杨树的细胞色素氧化酶同工酶的电泳结果和模式图如图3、4所示。5种杨树的细胞色素氧化酶同工酶谱带大致分为3个区,分别是CYT A、CYT B和CYT C区。CYT A区只有钻天杨和加拿大杨显示出2条酶带,其迁移率分别为0.26和0.38。CYT B区的酶带数较

多,最多的可以达到5条,其迁移率分别为0.55、0.60、0.64、0.70和0.74。CYT-C区有1条酶带,其迁移率为0.89,钻天杨和河北杨缺乏此条酶带。

5种杨树各自酶带的分区情况和酶带数统计见表3。可知,黑杨类和青杨类的细胞色素氧化酶同工酶谱带数较多而白杨类的谱带数较少。从各自的酶带分布和数量可以明显地看出种的特征,所以同工酶分析技术是鉴定品种的有效工具。同时也看到在杨属种类中所存在广泛的遗传多样性。

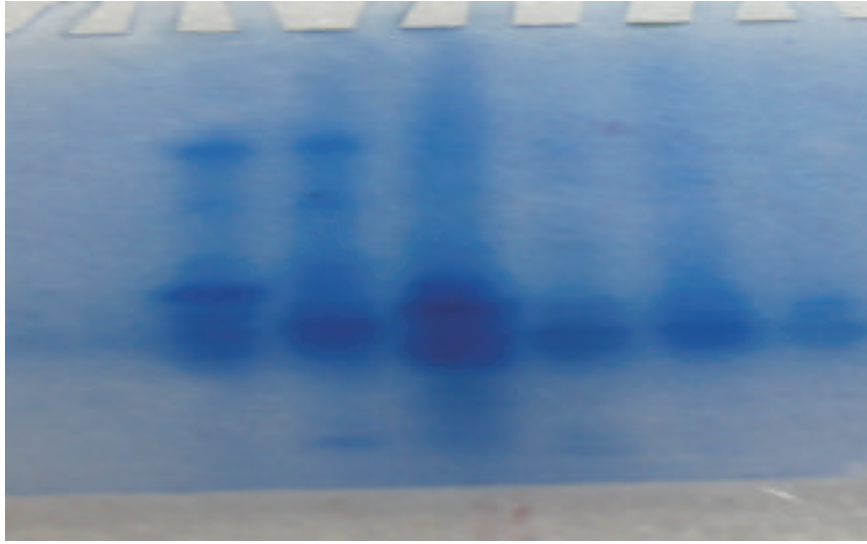


图3 5种杨树细胞色素氧化酶同工酶

Fig. 3 Isozyme zymogram of CYT in 5 species of poplar

2.2.2 计算相对迁移率、相似系数并分析亲缘关系。相对迁移率R值的计算见表3,相似系数的计算见表4。从计算结果看出,处在同一组的两种杨树之间相似系数较大而处在

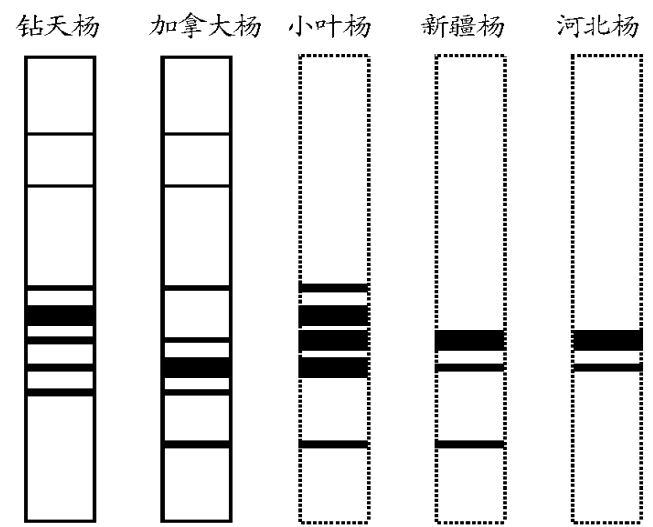


图4 5种杨树细胞色素氧化酶同工酶酶谱模式

Fig. 4 Isozyme zymogram pattern of CYT in 5 species of poplar

不同组之间的相似系数较小。例如,新疆杨与河北杨都处在白杨组,其相似系数达到0.90,而分别处在黑杨组的钻天杨与白杨组的河北杨之间的相似系数仅为0.22。这与由POD同工酶所计算出的结果基本相同。细胞色素氧化酶同工酶实验所得数据反映出的种间、派间的相互关系更加明显,即同组酶谱相近,而不同组的谱带差异显著。

许多实验证明,青杨派与黑杨派关系较近,而与白杨派则相对较远,结合其他研究成果推测白杨派较早从杨属中分离出来,而青杨派和黑杨派则较晚,上述两个实验结果也说明了这一点。

表3 细胞色素氧化酶同工酶酶带所属区、酶带数及相对迁移率

Table 3 The isozyme bands classification, enzyme bands and relative movement rate of CYT

种类 Species	CYT-A		CYT-B					CYT-C		酶带 总数 Total enzyme bands		
	酶带 数 Enzyme bands	相对迁移率 Relative movement rate		酶带 数 Enzyme bands	相对迁移率 (Relative movement rate)							
		A1	A2		B1	B2	B3	B4	B5		酶带 数 Enzyme bands	相对迁 移率 (Relative movement rate)
钻天杨 P. nigra	2	0.26	0.38	5	0.55	0.60	0.64	0.70	0.74		7	
加拿大杨 P. canadensis	2	0.26	0.38	4	0.55		0.64	0.70	0.74	1	0.89	7
小叶杨 P. simonii				4	0.55	0.60	0.64	0.70		1	0.89	5
新疆杨 P. bolleana				2			0.64	0.70		1	0.89	3
河北杨 P. hopeiensis				2			0.64	0.70				2

表4 CYT 计算的相似系数

Table 4 The similarity coefficient of different species by CYT

	钻	加	小	新	河
钻	0	0.86	0.67	0.40	0.22
加		0	0.67	0.60	0.44
小			0	0.75	0.57
新				0	0.90
河					0

### 3 结论与讨论

采用POD同工酶、细胞色素氧化酶同工酶分析,法对同属不同物种进行分析,不仅能较为客观地反映物种间的遗传差异和它们的亲缘关系,而且利用其进行物种的辅助鉴定,是一种较为方便、有效的手段。就该实验结果而论,5种材料间不仅拥有各自的酶带数、位点、分布格局以及共有带的带级各不相同,而且即使两种或多种间出现共有带,其酶的含

量、活性强度也不尽相同。说明这5种材料属于5个独立的物种,但在它们之间存在着既独立又相关联、亲疏远近距离各不相同的一种非常复杂的种间遗传关系。杨属是被子植物中最为古老的属之一,已有数百万多年的历史,形态类型具有广泛的多样性。我国杨树种质资源丰富,分布遍及全国,在国民经济中占有非常重要的地位。利用同工酶分析可找出品种间的细微差异,不存在形态学上的难以区分的中间类型,为正确选择杂交亲本和杂种后代的鉴定提供科学依据。

#### 参考文献

- [1] 尹春英,彭幼红,罗建勋,等. 杨属遗传多样性研究进展[J]. 植物生态学报,2004,28(5):711-722.
- [2] 刘祖洞,江绍慧. 遗传学实验[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,1987:267-271.
- [3] 兰小中,王景升,郑维列,等. 巨柏细胞色素氧化酶同工酶变异分析[J]. 山地农业生物学报,2006,25(4):297-301.
- [4] 邱胜军,彭宇,解江. 三种蜘蛛酯酶同工酶的比较研究[J]. 蛛形学报,2006,15(1):19-22.