

榆树属植物的同工酶鉴定

谷爱莲

(乌鲁木齐市种苗场 新疆 乌鲁木齐 830013)

摘要: 实验利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 技术对白榆 (*Ulmus pumila* L)、垂榆 (*Ulmus pumilavar* PeMdul)、欧洲大叶榆 (*Ulmus laevis* Pall)、圆冠榆 (*Ulmus densa* Litv) 等4种常见榆树叶片的过氧化物酶进行分析测定, 得出4种榆树过氧化物酶的谱带, 并用排序分析法对其相似性做出分析, 以此来鉴定出4种榆树的不同之处, 并对4种榆树的形态特征进行了比较及鉴别和分类。

关键词: 榆树; 鉴别; 分类; 过氧化物酶; 同工酶

中图分类号: S718.49

文献标识码: A

文章编号: 1003-5508(2014)02-0039-05

Identification of Isoenzymes of Elm Plants

GU Ai-lian

(Seed and Seedling Farm of Wulumuqi City, Wulumuqi 830013, China)

Abstract: In this paper, polyacrylamide gel electrophoresis was used for analyzing and determining peroxidases in leaf blades of *Ulmus pumila*, *Ulmus pumilavar*, *Ulmus laevis* and *Ulmus densa*, and getting peroxidase bands of four elms. Then, the sequence analysis method was used to identify the differences of four kinds of elms. At the same time, comparison was made among the shape characteristics of four kinds of elms, and their discrimination and classification work was also done.

Key words: Elm, discrimination, classification, Peroxidase, Isoenzyme

随着现代育种科学技术的发展,一方面,大多数重要的农林生物种类已经积累了数量众多的品种。例如,月季花、菊花品种超过两万个。传统单一的形态品种鉴定方法已经难以有效区分或鉴别如此众多的品种;另一方面,许多园林、园艺植物育种越来越集中在少数优良的品种或品系上,使得许多品种更多的性状更加相似,难以区分。如何保证品种分类的准确性和品种的纯度,就成为一个常常遇到,而又非常重要的问题。近几十年来,品种分类及鉴定吸收各个时期的相关新技术,同时常规技术也得到不断充实。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质同工酶方法简便、灵敏度高、重现性强,结果便于观察、记录和保存。

榆树为园林绿化中常用树种。本实验旨在通过对榆树属植物的白榆、垂榆、欧洲大叶榆、圆冠榆等

4种榆树的形态特征进行比较;利用电泳技术对榆树过氧化物酶进行鉴定,了解其在分类中的地位。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

主要是校园中几种常见的榆树种类,包括白榆、垂榆、欧洲大叶榆和圆冠榆等4个种,取其新鲜的叶片(见表1)。

白榆	圆冠榆	垂榆	欧洲大叶榆
1号	2号	3号	4号

1.1.2 试剂

30% 丙烯酰胺母液 (30% Acr-Bis W/V): 称取

收稿日期: 2013-10-08

作者简介: 谷爱莲 (1977-), 女, 学士, 工程师, 从事园林植物引种及应用研究。

丙烯酰胺(Acr) 58 g 和甲叉双丙烯酰胺(Bis) 2 g 加蒸馏水,定容至200 ml。(Acr、Bis未纯化的试剂,配制后需过滤,放如棕色瓶冰箱贮藏);

10%的过硫酸铵(10% AP 冰箱贮藏):称取过硫酸铵5 g,加蒸馏水,定容至50 ml。(冰箱贮藏);

分离胶缓冲贮备液(Tris-HCl pH8.8):称取24.228 g Tris 加蒸馏水和1 mol·L⁻¹ HCl,再用酸度计调pH至8.8,定容至200 ml;

浓缩胶缓冲贮备液(Tris-HCl pH6.8):称取24.228 g Tris 溶于蒸水中,用1 mol·L⁻¹ HCl 调至pH=6.8,定容至200 ml;

电极缓冲液(pH8.3 Tris-甘氨酸缓冲液):称取6 g Tris, 28.8 g 甘氨酸,加蒸馏水定容至1 000 ml,用时稀释10倍;

N,N,N',N'-甲基乙二胺(TEMED);

样品处理液:称取20 g 蔗糖加蒸馏水100 ml (20%蔗糖溶液);

7%乙酸溶液:135.8 ml 36% 乙酸稀释至700 ml;

0.1% 溴酚蓝溶液:0.1 g 溴酚蓝溶于100 ml。

1.1.3 仪器

电泳仪一套(稳压电源,垂直电泳槽和相配套的凹槽玻璃);台式高速离心机、精密电子称、电冰箱、过滤漏斗、量筒、烧杯、微量进样器、注射器、注射针头、皮头滴管、研钵、刻度吸、离心管、试管架、玻璃棒、夹子、过滤纸、橡皮圈、剪刀、镊子、药勺等。

1.2 方法

1.2.1 形态观察

对白榆、垂榆、欧洲大叶榆、圆冠榆4个种的榆树冠形、树皮、枝条、花、叶片和果实进行认真的观察。对观察的几个外部特征作详细的记录,并拍照为形态学方面的比较留下依据。

1.2.2 电泳实验

玻板的制备:取两块电泳玻板(大25 cm×25 cm,小25 cm×20 cm)用热去污剂洗净,蒸馏水冲洗,直立干燥。洗净的玻板内面要避免手指触摸以防沾污。根据所需凝胶厚度选择3 mm厚的玻璃或1.5 mm Teflon 夹条,现在大板的3面边缘处用5 ml 注射器图凡士林,压上Teflon 夹条,在Teflon 夹条边缘处图凡士林,压上小玻璃板(注意:图凡士林时中间不能有断缺,以防漏液;但也不可过多,以免几如玻璃板内影响胶的质量)。将板用铁夹固定于制胶架上,加紧两层玻璃板和夹条。

凝胶的制备和灌胶:根据需要从表2中选择适

当浓度值,配制凝胶。一般同工酶可选择7.5%~10%的胶(过氧化物酶和酯酶7.5%较合适,超氧化物歧化酶用10%,可溶性蛋白可根据需要配制)。将配制好的分离胶液置真空干燥器中,再加入TEMED 10 μl,混匀后用一细玻棒引流,沿玻板上层缓缓注入玻板层室中,注胶过程防止气泡产生。胶液加到下夹条上缘到玻璃板12.5 cm处,立即用注射器轻轻在胶溶液上面铺0.5 cm高的水层,但不要扰乱丙烯酰胺胶面。待分离胶和水层之间出现清晰的界面时,表示聚合已完成。2 h后小心到出上层覆盖水,用滤纸吸干残余的水(注意:防止破坏胶面)。同时按上表配制好浓缩胶,加入6 μl TEMED,混合后加到分离胶上层,插入预先选择好的样品梳,注意不要带入气泡等待1 h。

表2 丙烯酰胺凝胶配制表

分类	分离胶	浓缩胶
T%	7.5%	4%
30% 丙烯酰胺母液(30% Acr-Bis W/V)	7.6 ml	1.3 ml
分离胶缓冲贮备液(Tris-HCl pH8.8)	6.744 ml	
浓缩胶缓冲贮备液(Tris-HCl pH6.8)		2.65 ml
蒸馏水	15.356 ml	5.95 ml
10%的过硫酸铵(10% AP)	300 μl	100 μl
TEMED	10 μl	6 μl

样品的制备:采白榆、垂榆、欧洲大叶榆、圆冠榆4种榆树的展开叶,取中部,除去叶脉,准确称取0.2 g,放入研钵,加入少量提样缓冲液1 ml,置冰浴研磨匀浆后倒入离心管;再加入0.5 ml 提样缓冲液洗出残液到入离心管;10 000 rpm 离心15 min,上清液为可溶同工酶粗提液,放入冰箱备用。

装槽:把制好的凝胶板夹在电泳槽上,将稀释10倍的电极缓冲液1 200 ml 住入上下槽,取下样品梳(注意不要拉断样槽隔墙)。

点样:将微量进样器针头插入样槽下部慢慢进样。每槽点样30~50 μl。再每样中加一滴0.1% 溴酚蓝指示剂。

电泳:上槽接负极,下槽接正极,接通电源,电流调至40~45 mA,电压为100 V,放入零下4℃冰箱中电泳(高温易使酶失去活性)至溴酚蓝标志到达凝胶前沿为止(榆树植物过氧化物酶电泳时间约为5 h)。将电流、电压调至零后断电。

剥胶:电泳结束后,取下玻板,揭掉胶布,抽出夹条,将两块玻板置自来水龙头下,借助水流,用解剖刀柄轻轻从板侧缝间撬开玻板(注意切忌敲裂胶面),将胶放入染色液中过氧化物酶、酯酶同工酶染

色和记录: 称取 1g 联苯胺, 加少量无水乙醇溶解, 依次加入 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAC 100 ml, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAC 100 mL, H_2O 700 ml, 最后加入 30 滴 ~ 40 滴 H_2O_2 。将此显色液倾入 20 cm 培养皿中, 待电泳凝胶片加入后不断搅动, 观察各条带显色的先后, 照像或用铅笔画出过氧化物酶同工酶谱。最后用 7% 醋酸固定 (注意色带在 HAC 溶液中容易褪色, 固定时间不宜过长)。拍照或制成干胶片保存结果。称取 350 mg α -醋酸萘酯, 350 mg β -醋酸萘酯, 700 mg 坚牢蓝 RR (或坚牢蓝 B), 先用约 35 ml 丙酮溶解, 再用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH5.0 的磷酸缓冲液稀释到 1 200 ml, 将胶板浸入 700 ml 此液中, 室温下显色约 20 min, 可看到桃红色的磷酸酯酶同工酶区带。弃去染色液, 用蒸馏水漂洗, 再用 7% HAC 固定。

2 结果分析

2.1 形态学分析结果

通过对榆树植物冠形、叶、果等植物形态和器官的比较。圆冠榆、欧洲大叶榆的冠形较为相似都为半球形, 垂榆为伞状冠性, 较为独特, 在 4 种榆树容易分辨。利用树皮枝条进行分辨, 垂榆枝条特征显著, 其余可以利用树皮枝条的颜色表皮特征鉴定分类。在叶形上 4 种榆树较为相似, 但可以通过比较叶形的大小、叶缘的锯齿形状, 白榆常具单锯齿, 圆冠榆、垂榆、欧洲大叶榆全为重锯齿, 且欧洲大叶榆叶片是其他 3 种榆树叶片的 3 倍 ~ 4 倍。叶片表面和背面是否光滑、有无绒毛可鉴别 4 种榆树。白榆、垂榆的翅果无毛, 而欧洲大叶榆、圆冠榆有睫毛, 白榆、圆冠榆翅果上有凹缺这是与垂榆、欧洲大叶榆的区别, 且 4 种榆树的翅果的果形和大小也有很大不同, 可作为形态标记特征 (参见表 3、4、5、6、7)。

表 3 冠形对照表

树种	冠形
白榆	落叶乔木, 高达 25 m, 胸径 0.5 ~ 1 m; 树冠卵圆形。
圆冠榆	落叶乔木, 高至 10 m, 树冠半球形, 稠密。
垂榆	落叶乔木, 高至 8 m, 树冠伞状, 稠密。
欧洲大叶榆	落叶乔木, 高达 25 m, 树冠半球形。

表 4 树皮、枝条对照表

树种	树皮、枝条
白榆	树皮暗灰色, 纵裂而粗糙; 枝条细长, 小枝灰色。
圆冠榆	树皮龟裂, 灰褐色; 嫩枝淡黄褐色或灰色; 芽长 3 mm ~ 4 mm, 卵形, 无毛, 仅鳞片边缘有睫毛。
垂榆	树皮暗灰色, 纵裂而粗糙; 枝细柔而下垂, 灰色。
欧洲大叶榆	树皮褐灰色, 枝被绒毛或光滑, 暗褐色。

表 5 叶片对照表

树种	叶片
白榆	叶椭圆状卵形或椭圆状披针形, 长 2 cm ~ 7 cm, 先端尖或渐尖, 基部近对称, 叶缘常具单锯齿, 侧脉 9 对 ~ 14 对, 无毛或叶下面脉腋微有簇毛。
圆冠榆	叶质厚, 长 5 cm ~ 7 cm, 宽 3 cm ~ 5 cm, 阔卵形, 基部圆—楔形, 不对称, 顶端尖, 边缘重锯齿; 叶柄长 6 mm ~ 7 mm, 微有绒毛; 托叶线状长圆形, 顶端有长毛, 早落。
垂榆	叶椭圆状卵形, 长 5 cm ~ 8 cm, 宽 4 cm ~ 8 cm, 先端渐尖, 基部歪斜, 叶缘重锯齿, 整齐, 叶片上面无毛, 暗绿色, 蜡质光亮, 下面绿色, 仅脉腋处生有簇毛, 叶脉凸出, 侧脉 15 对 ~ 18 对, 叶柄长 7 mm ~ 15 mm。
欧洲大叶榆	叶卵圆形或倒卵形, 长 6 cm ~ 12 cm, 宽 3 cm ~ 6 cm, 先端尖基部心形, 甚偏斜, 边缘具重锯齿, 上面光滑, 暗绿色, 下面稍有毛, 淡绿色; 叶柄长 4 mm ~ 8 mm, 被绒毛。

表 6 花对照表

树种	花
白榆	花先叶开放, 两性, 簇生或聚伞形花序; 花被钟形; 花萼 4 裂, 雄蕊 4 个 ~ 5 个, 花期 3 月 ~ 4 月。
圆冠榆	花簇生短梗上; 花被 4 裂 ~ 5 裂, 边缘有睫毛; 雄蕊 4 个, 花期 3 月 ~ 4 月。
垂榆	花先叶开放。
欧洲大叶榆	花 20 ~ 30 余朵成短聚伞花序, 具细长花梗; 花萼 5 ~ 7 浅裂, 淡红色, 边缘有睫毛, 花期 4 月中旬。

表 7 果对照表

树种	果
白榆	翅果近圆形或卵圆形, 长约 1 cm; 果核位于翅果中部或近中部, 很多接近凹缺处, 果柄长约 2 cm; 熟时黄白色, 无毛, 果期 4 月中旬。
圆冠榆	翅果长圆状倒卵形, 基部楔形或圆形, 长约 2 cm, 宽 1.2 cm, 无毛, 小坚果居翅中部以上靠近顶端凹缺, 果期 4 月 ~ 5 月。
垂榆	翅果成熟黄白色, 茎 1 cm ~ 1.5 cm, 小坚果居翅果中央, 果期 5 月中旬。
欧洲大叶榆	翅果广椭圆形, 长 12 mm ~ 16 mm, 边缘密生睫毛, 果核位于翅果中部或稍下部, 果实 5 月成熟。

常用的品种区分是比较形态学, 此标记的分类是以植物的外部形态为依据。但由于受环境影响而发生变化, 且品种之间的形态学差异越来越小, 鉴定准确性降低形态学方法随粗放、陈旧, 但简单直观、方便快捷是其他方法难以取代的。

2.2 过氧化物酶分析结果

2.2.1 榆树过氧化物酶图谱的特征

依据 4 个品种的过氧化物酶图谱 (图 1), 可将其分为 3 的基因位点, 即 Peroxidase-1、Peroxidase-2 和 Peroxidase-3。其中 Peroxidase-1 中有 4 个复等位基因, Peroxidase-2 中有两个复等位基因, Peroxidase-3 中有两个复等位基因。分析特征: 4 个品种之间无共有的酶带; 欧洲大叶榆的过氧化物酶谱带较少为 3 条, 最显著特征是不含 Peroxidase-3 位点的过氧化

物酶谱带; 欧洲大叶榆特有 Peroxidase-2a、Peroxidase-2b 两条带; Peroxidase-1d 为白榆、垂榆、圆冠榆

共有的。可见各种榆树过氧化物同工酶图谱不同, 可作为树种识别的分子标记(见图 1)。

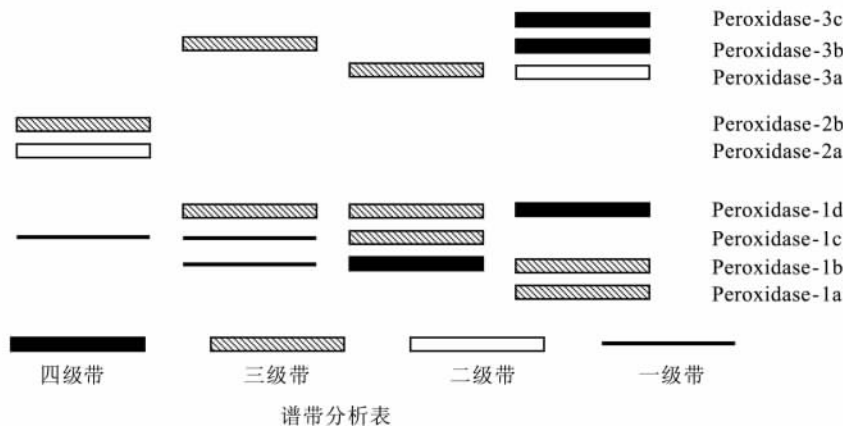


图 1

2.2.2 榆树品种间亲缘关系分析

4 个品种见过氧化物酶谱带相似系数及不相似系数见表 8, 参照王义弘(1982) 排序法进行比较, 其中 Σ 为不相似系数的总和, X_i 为所求品种沿 X 轴对 a (Σ 最大) 品种距离。供试品种中 4 号品种 Σ 最大为 275.19, 记为 a, 在 X 轴上定位 0, 与 4 号品种最不相似的(不相似植最大) 品种为 1 号(1 品种与 4 品种的不相似植为 100), 其 X_i 最远为 100。e 为各

品种在 X 轴的吻合性差度制值, 供试品种中 2 号品种 e 值最大为 45.98, 记为 a', 在 Y 轴上定为 0; 2 号品种落在 X 轴的坐标 76.75, 其近邻不超过 $L/10$ 的品种为 3 号, 并以 2 号品种与 3 号品种的不相似最大值 61.9, 因此 y 轴的另一端应为 3 号品种 Y_i 为所求品种沿 Y 轴对 a' 品种的距离。其余品种在 x、y 轴距离位置利用公式计算。同时计算 D(不相似距离) (见表 9)。

表 8 榆树过氧化物酶谱带不相似值总和 Σ 与 X_i 、e、 Y_i 的计算结果

品种代号	1 号	2 号	3 号	4 号	Σ	X_i	e	Y_i
1 号		51.52	50.00	100.00	201.52	100	0	50.77
2 号	48.48		61.90	89.47	202.89	76.75	45.98	30.84
3 号	50.00	38.10		85.72	187.62	74.24	42.85	61.18
4 号	0	10.53	14.28		275.19	0	0	54.22

表 9 榆树过氧化物酶谱带的排序间距 D

品种代号	1 号	2 号	3 号
1 号			
2 号	30.62		
3 号	27.91	30.41	
4 号	100.06	80.23	74.56

依据 X_i 和 Y_i 绘双向坐标分布图(图 2)。欧洲大叶榆(4 号) 与其他 3 个品种的亲缘关系最远, 分别与 1 号白榆 D 为 100.06, 与 2 号圆冠榆 D 为 80.23, 与 3 号垂榆 D 为 74.56; 其他 3 个品种之间的榆树的 D 值在 27.91 ~ 30.62 之间, 亲缘关系较近, 表现的过氧化物酶谱带也较为相似。圆冠榆种子不育, 仅能嫁接繁殖, 常用白榆作为砧木。根据二维分布, 可划分两个种群。4 号为一个种群, 1、2、3 号为一个种群(他们之间距离小于 12)。

过氧化物酶同工酶是一种单体酶, 一条酶带代

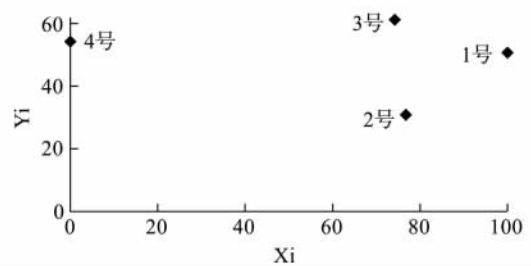


图 2

表一个基因产物, 在系统进化的遗传分析中具有快、简便、准确的优点。根据以上结果, 过氧化物酶同工酶能够反映榆树品种间的亲缘关系。

本次实验还对脂酶进行了染色, 但效果并不明显(图 3)。可推断脂酶同工酶的显色与物候期有关, 可能具有阶段性。也可能与所选植物材料的器官不同(如: 花、叶、果等) 有关或植物材料的幼嫩程

度有关。对脂酶多次电泳实验其染色结果都为失败。

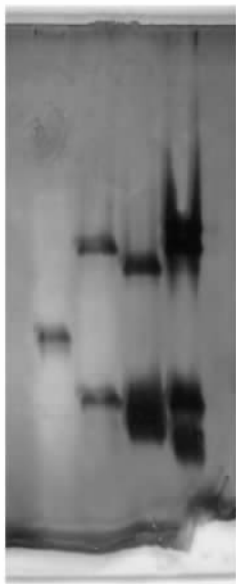


图 3

3 讨论与展望

3.1 形态学标记

形态学比较法是指那些能够明确显示遗产多态性状,如花色、花型、冠型、株高、叶形、叶质、果实等的相对差异。形态学方法在 20 世纪 70 年代以前是主要方法,起重要作用。但随着育种亲本的利用相对集中化,品种间的形态学差异越来越小,品种的形态学鉴定也随之困难起来,传统的形态学方法越来越不能满足现代繁多复杂品种鉴定和纯度分析的需要。虽然有些学者认为形态学鉴定标记方法陈旧、粗放,但是形态学的简单直观、快捷方便的特点仍然是其他标记方法不可比拟取代的。尤其是其他方法的取样基础仍然是以形态学特征作依据。对园林、园艺植物来说,许多品种的选择确定依据的就是某个形态特征,再该特征出现时期,形态学鉴定技术无疑是最准确可靠的方法和技术。所以说,形态学标记不存在所谓过时,在实践中对其仍然需要加以认

真研究对待。

3.2 同工酶电泳

同工酶电泳技术在园林、园艺植物上确有好效果。许多国家用此法用于农作物的品种鉴定和纯度分析,非常有效,曾被确定为标准农作物种子鉴定技术之一。同工酶技术也能分析大量样品,技术比较简单,易于普及推广。但是,同工酶指纹技术有一个致命的弱点。由于同工酶也是一类生物大分子,是基因产物,某酶的存在和活性具有组织、发育阶段以及地域特异性,可利用数量少、多态性少、对酶的提取要求高,对混杂样品、不同生育期样品甚至不同来源样品难以分辨。此外,还有一个关键性的不足是其标记的数量还有限,在杂种鉴别上常因同工酶选择不当而得不到应有的结果,对亲缘关系很近的品种其分辨率难以达到。因此,重复性、可靠性大打折扣。尽管如此,该方法在目前仍是品种鉴定和纯度分析最重要的方法之一,在生产实际中有很好的应用基础。

参考文献:

- [1] 陈俊愉. 中国花卉分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- [2] Hou Yanan, Li Fenglan, Gao Shumin. School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China.
- [3] 陈琉荃. 生化实验方法[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 120 ~ 124.
- [4] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 120 ~ 124.
- [5] 王英典, 刘宁. 植物生物学实验指导[M]. 北京: 高等科学出版社, 2001: 167 ~ 169.
- [6] 杨友昌, 沈观冕, 毛祖美. 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社(K), 1993: 212 ~ 217.
- [7] 高述民, 李凤兰, 陆帽一, 等. 中国大蒜(*Allium sativum* L.) 18 个品种的脂酶同工酶多态性分析[J]. 植物学通报, 2003, 20(6): 723 ~ 729.
- [8] 王义弘. 介绍几种植物分析法[J]. 东北林学院学报: 1982, 1: 153 ~ 158.
- [9] 明军, 张启翔, 张义, 等. 园林及园艺植物品种鉴定常规技术研究进展[J]. 世界林业研究, 2002, 15(6): 23 ~ 30.