

文章编号: 1000-5692(2000)01-0032-05

# 厚朴种源同工酶初步研究

朱玉球<sup>1</sup>, 童再康<sup>1</sup>, 斯金平<sup>2</sup>

(1. 浙江林学院资源与环境系, 浙江临安 311300; 2. 浙江省景宁县科学技术委员会, 浙江景宁 323500)

**摘要:** 采集 5 年生种源试验林共 13 个厚朴种源 130 个单株的树叶样品, 用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳法测定了 POD、EST 和 GOT 等 3 种酶系同工酶。结果表明: GOT 同工酶各种源仅有 1 条谱带, 鄂西种源与其他种源呈等位基因分离关系; POD 和 EST 同工酶各有 7 条和 10 条带。经 3 种酶系谱带单独分析和综合 3 种酶系的相似系数聚类分析, 所划分的类群同叶形分化类型基本一致。图 4 表 2 参 9

**关键词:** 厚朴; 种源试验; 同工酶; 聚类分析

**中图分类号:** S722.7; Q946.5      **文献标识码:** A

同工酶是指一类催化同一生化反应而结构不同的酶。这种结构上的差异来自信使核糖核酸 mRNA 以及其转录模板 DNA 上的结构差异, 即源于 DNA 上基因间及一个基因位点的等位基因间差异。同工酶作为基因的直接产物, 常用来研究种内种源、家系、无性系间以及一些种间杂种间的遗传变异<sup>[1,2,3]</sup>。其中, 用等位酶确定酶基因位点来研究群体分化在国内外更为广泛。

厚朴是我国特有的珍稀保护植物, 其皮、花等属国家二级保护中药材。在分类学上包括 *Magnolia officinalis* 和 *M. officinalis* subsp. *biloba*<sup>[4]</sup>。作为分类的主要依据之一是叶的形状。从各个种源植株上, 叶子的凹与凸具有较强的遗传性, 但在二者之间存在中间类型<sup>[5]</sup>。产地系统生物学研究表明, 厚朴种内的不同性状的变异规律比较复杂, 有连续的, 也有间断的<sup>[6]</sup>。为此, 开展厚朴同工酶研究将有助于了解群体的分化及其规律。本研究选择了常用的谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)、脂酶(EST)和过氧化物酶(POD)等 3 种酶系同工酶, 采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术, 系统地研究了厚朴 13 个种源的酶谱差异, 为研究厚朴群体的分化及种源区的划分提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

样品采自浙江景宁草鱼塘林场种源试验林, 林龄为 5 a。试验林概况参见斯金平等文章<sup>[5]</sup>。于 1998 年 5 月每种源随机抽取 10 株, 各株在树冠中部采 1 片正常叶片用于酶谱分析。

### 1.2 酶谱分离方法

取试样 2 g·株<sup>-1</sup>, 加提取液 5 mL, 在冰浴条件下研磨成匀浆, 用 LG 10-24A 医用高速离心机离心 10 min (转速 8 000 r·min<sup>-1</sup>), 取上清液贮于冰箱保存备用。

收稿日期: 1999-05-20; 修回日期: 1999-12-05

基金项目: “九五”浙江省科学技术委员会资助项目(961102111)

作者简介: 朱玉球(1963-), 女, 浙江永康人, 实验师, 从事植物遗传育种研究。

聚丙烯酰胺凝胶板的制备与电泳参见胡能书方法<sup>[7]</sup>。每电泳板同时加样 2 个种源计 20 个样品, 每样格加样 10  $\mu\text{L}$ 。谱带显色参见沈全光方法<sup>[8]</sup>。

测定每条谱带的迁移率, 绘制酶谱图, 并制成干板保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 厚朴 3 种酶同工酶的基本谱型

综合 13 个参试种源共计 130 个单株 3 种同工酶基本图谱绘成图 1, 并统计各种源 3 种酶同工酶谱出现的频率, 结果列于表 1。从表 1 可以看出, GOT 谱带数最少, 各种源的单株仅出现 1 条, 所有种源仅有迁移率 0.50 和 0.52 等 2 条谱带; POD 同工酶谱带数仅有 7 条, 且集中分布于迁移率 0.50 以内, 其中迁移率 0.12 带是该种特征带, 所有种源单株共有且酶活性一致。从谱带电泳迁移看, 可分成慢区(A 区), 较慢区(B 区)和较快区(C 区)。同 GOT 和 POD 相比, EST 的谱带较为丰富, 共有 10 条带, 迁移率为 0.18~0.92, 可分成较慢区(B 区)、较快区(C 区)、快区(D 区)和特快区(E 区)等 4 个谱带区, 其中 B, C 区间还有 0.28, 0.30 迁移率带, C, D 区间有 0.64 带。

表 1 厚朴不同种源 3 种酶系同工酶谱带频率

Table 1 Frequency of zymogram bands in the 3 enzyme systems of *Magnolia officinalis* from different provenances

酶系	带型	迁移率	种 源												
			1. 鹤峰	2. 五峰	3. 恩施	4. 庐山	5. 资源	6. 城步	7. 景宁1	8. 景宁2	9. 光泽	10. 遂昌	11. 天台	12. 蒲城	13. 灌县
GOT	C <sub>1</sub>	0.50			1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	C <sub>2</sub>	0.52	1.0	1.0	1.0										
	A <sub>1</sub>	0.10		0.2											
	A <sub>2</sub>	0.12	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	B <sub>1</sub>	0.18	0.3	0.1	0.1			0.5		1.0					
POD	B <sub>2</sub>	0.24	0.6	0.9	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5	0.6	1.0	0.6	0.4	1.0
	B <sub>3</sub>	0.26	0.4	0.1	1.0	0.5				0.5	0.4		0.4	0.6	
	C <sub>1</sub>	0.40			0.2		1.0		1.0					1.0	
	C <sub>2</sub>	0.50						1.0							
	B <sub>1</sub>	0.18	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	B <sub>2</sub>	0.20	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	B <sub>3</sub>	0.28									0.5			0.3	
EST	B <sub>4</sub>	0.30	1.0		1.0				1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	0.3	
	C <sub>1</sub>	0.38	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	C <sub>2</sub>	0.40	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	D <sub>1</sub>	0.64	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	D <sub>2</sub>	0.78					1.0	1.0							
	D <sub>3</sub>	0.80					1.0	1.0							
E	0.92			1.0	1.0				1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

### 2.2 GOT 同工酶在种源间的变异

图 2 绘出了各种源 GOT 同工酶的谱带。从图 2 和表 1 中可见, GOT 同工酶在厚朴种源内单株间十分一致, 均出现一条带。多数树种研究发现, 它属于等位酶, 是受等位基因控制的<sup>[1]</sup>。可见厚朴在这一位点上处于纯合状态。从不同种源看, 湖北的鹤峰、五峰和恩施等 3 个种源与其他种源呈等位基因的对等关系, 可能它们在这一位点上已发生分离且都处于纯合状态。湖北西南部的 3 个种源, 其叶型属小凸尖型, 种源试验表明它们生长相对较慢, 厚朴酚及和厚朴酚的含量较其他种源高, 表现出较为独立的类群<sup>[9]</sup>。

### 2.3 POD 同工酶在种源间的变异

图 3 绘出各种源 POD 和 EST 等 2 种同工酶谱。由图 3 和表 1 可见, POD 同工酶除 0.12 (A<sub>2</sub>) 特征带外, 其他带在种源间均有变异。其中 B<sub>2</sub> 带各种源均出现, 差异表现在频率上。从各种源看, 五峰、

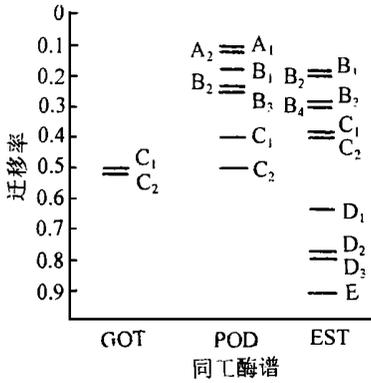


图1 3种酶系同工酶谱模式图

Figure 1 Isozyme zymogram patterns of the 3 enzyme systems

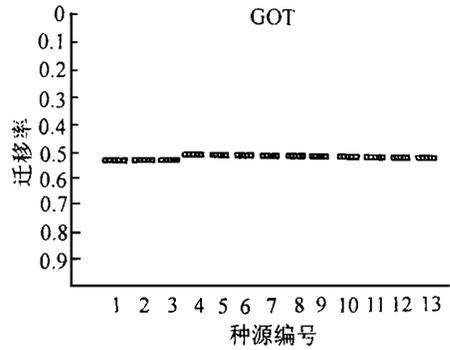


图2 厚朴叶的谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)谱带

Figure 2 Zymogram band for GOT in the leaves

恩施和鹤峰和源较一致, 其中五峰  $B_2$  频率为 0.9,  $B_3$  为 0.1, 而恩施种源 100% 单株均出现  $B_2, B_3$ , 鹤峰有 30% 单株为  $B_2, B_3$  并存, 70% 单株为  $B_2$  或  $B_3$  中的 1 条。可以看出这 3 个种源株间在这个位点上有分离。此外, 五峰种源有 20% 单株出现  $A_1$  带。

江西的庐山种源和湖南的城步种源除特征带外, 在  $B_2$  带上有分离, 其中庐山种源 50% 单株出现双带 ( $B_2, B_3$ ), 而城步种源为单带 ( $B_2$ ); 它们均有  $C_1$  带, 庐山种源出现的频率为 0.20, 城步为 1.0。此外, 城步种源还有  $B_1$  带, 频率为 0.5。四川灌县种源与城步相近, 但无  $B_1$  带。

福建的光泽和蒲城种源, 浙江的景宁 2 和天台种源, 在  $A_2, B_2, B_3$  带上极相近, 仅有较小的频率变化。其中景宁 2 种源带型最丰富, 出现了  $B_1, C_1$ , 和  $C_2$  带。相反, 浙江的景宁 1 和遂昌种源和广西的资源等 3 个种源仅出现 100% 的  $A_2$  和  $B_2$  特征带。

从 POD 酶谱综合分析看, 叶形为小凸尖型的鄂西 3 个种源可成一个较独立的类群。而凹叶型的种源与中间型种源相似性较高。

#### 2.4 EST 同工酶在种源间的变异

由图 3 和表 1 可以看出,  $B_1, B_2, C_1, C_2, D_1$  是该种的特征谱带。其中  $C_1, C_2$  在种源内单株上略有酶活性差异。庐山、资源和城步等 3 个种源基本带型相似, 均无  $B_3, B_4$  带。它们间的主要差异在  $D_2, D_3$  和 E 带上。其中, 庐山种源仅有 E 带, 而城步、资源种源有  $D_2, D_3$  带。鹤峰、恩施种源有  $B_4$  带, 且恩施种源还有 E 带, 而五峰种源均没有。但三者的相似性还是较高。除蒲城仅有特征带外, 其他种源基本一致, 均有  $B_4$  和 E 带, 光泽和四川的灌县种源还有 30%~50% 的单株出现  $B_3$  带, 而  $B_4$  带频率也低 (0.3~0.5)。从 EST 谱带看, 叶型为中间类型的种源谱带复杂且与小凸型的种源相似性高, 而凹叶种源的城步和资源种源相对分离大些。

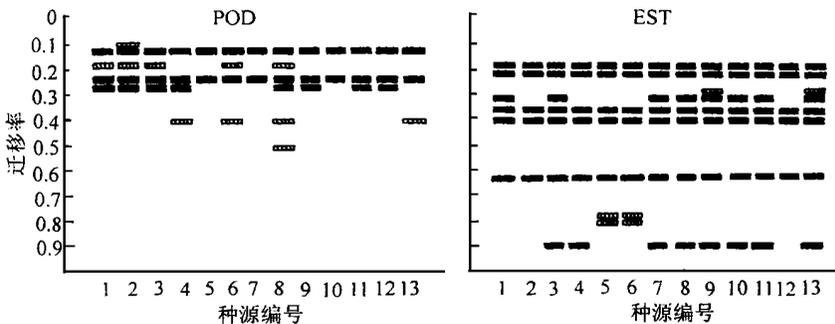


图3 厚朴叶的过氧化物酶(POD)和酯酶(EST)同工酶谱带

Figure 3 Isozyme zymogram bands for peroxidase (POD) and esterase (EST) in the leaves

## 2.5 种源间的相似性与聚类

分别计算 13 个种源间的相似系数(表 2)。以最小距离法作系统聚类, 结果绘成图 4。

表 2 厚朴不同种源间相似系数

Table 2 Similarity coefficients for different provenances of *Magnolia officinalis*

	五峰	恩施	庐山	资源	城步	景宁 1	景宁 2	光泽	遂昌	天台	蒲城	灌县
鹤峰	0.909 1	0.956 5	0.727 3	0.666 7	0.695 7	0.761 9	0.800 0	0.782 6	0.761 9	0.818 2	0.800 0	0.695 7
五峰		0.869 6	0.727 3	0.666 7	0.695 7	0.666 7	0.720 0	0.695 7	0.666 7	0.727 3	0.800 0	0.608 7
恩施			0.782 6	0.636 4	0.708 3	0.818 2	0.846 2	0.833 3	0.818 2	0.869 6	0.761 9	0.750 0
庐山				0.761 9	0.782 6	0.857 1	0.880 0	0.869 6	0.857 1	0.909 1	0.900 0	0.869 6
资源					0.909 1	0.800 0	0.666 7	0.727 3	0.800 0	0.761 9	0.842 1	0.727 3
城步						0.727 3	0.769 2	0.666 7	0.727 3	0.695 7	0.761 9	0.750 0
景宁 1							0.840 0	0.909 1	1.000 0	0.952 4	0.842 1	0.909 1
景宁 2								0.846 2	0.833 3	0.880 0	0.782 6	0.846 2
光泽									0.909 1	0.956 5	0.857 1	0.916 7
遂昌										0.952 4	0.842 1	0.909 1
天台											0.900 0	0.869 6
蒲城												0.761 9

图 4 中从相似系数 0.83 处划分, 即成 4 个群。其中叶形为小凸尖型的 3 个种源成第 I 类, 凹叶形的城步、资源种源另第 II 类; 叶为中间型的相对分离大些, 景宁 1、景宁 2、天台、遂昌、光泽和灌县成第 III 类。另外, 凹叶型的庐山种源较特殊, 它与中间型的蒲城种源成第 IV 类, 但二者从 POD 和 EST 单独分析可以看出, 它们的相似性并不高。故该类无代表性。

## 3 讨论

同工酶是基因的二级产物, 用它作为种内群体间分化的研究能比较直接地反映出种内遗传分化的程度。所划分的厚朴类群以及群间的相似性与表型性状相关性研究的结论基本吻合<sup>[5,6]</sup>。但是酶谱分析结论的可靠性易受分析酶种类数目、种源内单株数目、取样时间以及实验分离方法等多种因素的影响。

为进一步研究种内的分化程度以及种内生化水平的变异同主要经济性状的关系, 有必要进一步加大样本开展种源内酶谱变异的详细分析, 也可以开展 DNA 指纹图谱分析等分子水平的研究, 以达到全面合理地划分厚朴种源(区), 同时也为开展厚朴药材经济性状的遗传改良提供理论依据。

## 参考文献:

- 1 童再康, 范义荣, 何贤池, 等. 黄山松群体 GOT 同工酶遗传变异的初步研究[J]. 福建林学院学报, 1993, 13(1): 414~419.
- 2 方伟, 童再康, 许世亮, 等. 部分丛生竹同工酶的研究[J]. 植物分类学报, 1992, 30(3): 219~225.
- 3 张若蕙, 刘洪涛, 童再康, 等. 蜡梅科树种的同工酶种间和种内变异[J]. 北京林业大学学报, 1995, 17(增刊): 96~102.
- 4 刘玉壶, 罗献瑞, 吴蓉芳, 等. 中国植物志: 第 37 卷第 1 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 119.
- 5 斯金平, 刘饶, 蔡通爱, 等. 不同种源厚朴性状变异的初步研究[J]. 浙江林业科技, 1998, 18(3): 13~16.
- 6 斯金平, 潘心平, 童再康, 等. 产地和树叶类型与厚朴质量关系的研究[J]. 中药材, 1998, 21(11): 541~543.
- 7 胡能书. 同工酶技术及应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 73~77.
- 8 Siciliano M J, Shew C R. 凝胶上酶的分离与显现[J]. 沈全光, 译. 植物生理学通讯, 1980, (4): 89~90.
- 9 朱玉球, 曾燕如, 斯金平, 等. 厚朴外观性状与内在品质的关系[J]. 浙江林学院学报, 1999, 16(4) 387~391.

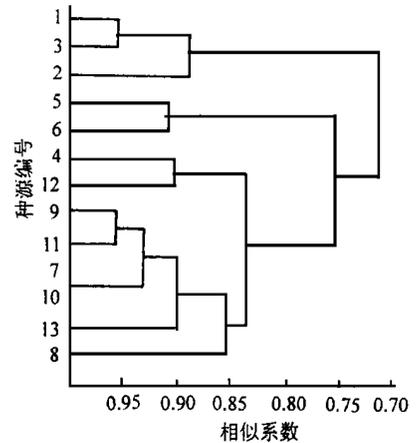


图 4 厚朴种源聚类分析树状图

Figure 4 Tree-shaped graph for cluster analysis of *Magnolia officinalis* provenances

# A Preliminary study on isozymes of *Magnolia officinalis* from different provenances

ZHU Yu-qiu<sup>1</sup>, TONG Zai-kang<sup>2</sup>, SI Jin-ping<sup>2</sup>

(1. Department of Resources and Environment, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300 China; 2. Scientific and Technological Commission of Jingning County, Jingning 323500 Zhejiang, China)

**Abstract:** Leaf samples from 130 individual trees in a 5-year experimental stand belonging to 13 provenances of *Magnolia officinalis* were collected for an analysis of isozyme systems, viz. POD, EST and GOT by means of SDS-PAGE. The results indicated that the isozymes of GOT for different provenances only had one band and allelic segregation exists between the provenance from Hubei and other provenance isozymes of POD and EST had 7 and 10 bands, respectively. Class groups were divided on the basis of separate analysis of the band patterns of the 3 enzyme systems and cluster analysis of similarity coefficients conform with types of leaf shape differentiation.

**Key words:** *Magnolia officinalis*, provenance tests; isozyme; cluster analysis

## 浙江林学院开展青年教师教学基本功比赛

历时1个月的我校青年教师教学基本功比赛于日前圆满结束。信息工程与基础科学系的王宇熙和社会科学部的钱杭园老师荣获一等奖，并代表学校参加省首届青年教师教学基本功比赛。

学校对本次活动十分重视，组成了由杨斌副院长任主任，11位专家参加的比赛评委会。各系部的青年教师积极响应，主动参与。经济管理系和林产工业系还进行了系统初选，推荐优秀者参加学校的比赛，使本次活动的参赛教师具有一定的代表性。

通过听课、比较教案和收集学生反馈信息等形式，评委们就参赛教师的教学内容、教学能力、教学态度和仪表、教学风格、教案等5项一级指标和25项二级指标逐一进行打分。结果，信息工程与基础科学系王宇熙老师的《计算机程序设计》课以其逻辑严密、讲解透彻、指导性强、注重教学内容与方法的结合和学生反映好等优势脱颖而出；社会科学部钱杭园老师的《马克思主义哲学原理》课以其课堂信息量大、内涵丰富、仪态沉稳大方、语言表达运用自如、善于组织与调节课堂气氛、循循善诱和富有吸引力而独树一帜。这2位教师捧走本次比赛的一等奖。徐秀英、刘梅娟和马掌法老师荣获二等奖，姜培坤、金荷仙和沈哲红老师获得三等奖。

评委们充分肯定了本次活动的意义，指出青年教师教学基本功比赛应形成制度，作为常规工作坚持下去，比赛的方法和形式也可以不断改进完善。通过比赛，鼓励他们培养良好的师德师风，练就扎实的教学基本功，不断提高教学水平，为培养高素质人才和学校发展作出应有的贡献。

(洪世梅)