

大豆种间的同工酶比较分析*

钟珍萍 刘德金

陈启锋

(福建农学院农学系) (福建农学院作物遗传育种研究所)

摘 要

比较了栽培、半野生、野生大豆4种同工酶的表现,初步认为:1. 3个大豆种的过氧化物酶同工酶叠加酶带共有25条,其中7条为共有的基本酶带,其余酶带的出现频率和活性,因种不同而存在差异。2. 有7条过氧化物酶同工酶酶带在野生大豆中不出现,而在另两个种以一定的频率出现,尤其是其中4条酶带的出现频率,随进化程度的提高而呈递增趋势。3. ATP酶、苹果酸酶及过氧化氢酶同工酶都呈现种间差异。尤其是ATP酶,不仅酶带清晰、带次分明,而且种间易于区别。因此,除了过氧化物酶同工酶外,还可在幼苗期用根、幼茎和子叶作材料,以3条ATP酶同工酶酶带AP-11、AP-12及AP-13来反映进化程度不同的3个大豆种之间的差异。

关键词 栽培大豆;半野生大豆;野生大豆;同工酶。

前 言

运用同工酶技术探讨物种间的亲缘关系及进化程度,已不乏其例。就大豆而言,也有部分学者(Görman, 1984; 虞京蕙等, 1983; 郗恩虎等, 1986)在此方面做过一些研究。在此基础上,笔者对过氧化物酶、ATP酶、苹果酸酶及过氧化氢酶等4种同工酶在大豆种间的表现差异做一比较分析,并将生化研究与数理分析结合起来,通过聚类方法对过氧化物酶同工酶研究结果进行整理分析,以进一步探讨同工酶与大豆进化程度的关系。

材料与方法

供试材料分别由中国农科院品资所,油料所及黑龙江等21个省(市、自治区)农科院

* 本文于1991年9月20日收到。

This paper was received on Sep. 20, 1991.

(所)提供。其中栽培大豆82份、半野生大豆9份、野生大豆24份(见表1)。将25份栽培大豆(分别来自黑龙江、吉林、湖北及广西、福建5省)、9份半野生大豆、24份野生大豆用于幼苗期不同器官的各种同工酶比较;幼苗期根部的过氧化物酶同工酶分析则采用全部115份供试材料。试验重复1次。

制样 在初生叶刚展开时,挖出幼苗,洗净,擦干,剪取根、幼茎、子叶、初生叶等部分,以1:2.5(W/V)加入预冷的 Tris-甘氨酸电极缓冲液(pH8.3),于冰浴中分别研磨成匀浆。10000转/分下离心5—10min,取上清液。另外,分别于始花期、盛花期、终花期、结荚期、鼓粒期剪取植株顶数第3节位已充分长成的叶片,制样方法同上。

表1 供试材料来源及数量(份)

Table1 The Sources and number of materials

地 区 Districts	栽培大豆 <i>G. max</i>	半野生大豆 <i>G. gracilis</i>	野生大豆 <i>G. soja</i>
黑龙江 Heilongjiang	8	2	2
吉林 Jilin	7		1
辽宁 Liaoning	4	1	3
山西 Shanxi	2		5
山东 Shandong	3		
甘肃 Gansu	4		1
陕西 Shanxi	4	1	2
河北 Hebei	8		2
北京 Beijing	4		2
河南 Henan	2	1	
四川 Sichuan	3		1
西藏 Tibet			1
湖北 Hubei	6		
安徽 Anhui	2	1	
湖南 Hunan	5		
江苏 Jiangshu	5	2	1
贵州 Guizhou	2		
浙江 Zhejiang			1
江西 Jiangxi	4	1	
福建 Fujian	2		2
广西 Guangxi	2		
合计 Total	82	9	24

电泳 采用聚丙烯酰胺垂直平板不连续凝胶系统。浓缩胶浓度为2.5%,pH6.7。分离胶 pH8.9,浓度却因不同的同工酶而有所不同:过氧化物酶(POD)及过氧化氢酶(CAT)采用7%;苹果酸酶(ME)、为8.4%;ATP 酶为9.1%。溴酚兰为前沿指示剂。每样品加量90μl。采用 DYY-III 型电泳仪(北京六一仪器厂)稳压电泳约5小时。

染色 在比较了黄寿松等(1980)及胡能书等(1985)所介绍的 POD 同工酶七种染色方法之后,采用其中一种并略加修改,即:10ml 醋酸联苯胺溶液(2g 联苯胺+18ml 冰乙酸

+72ml 蒸馏水)加152ml 蒸馏水,摇匀。放入凝胶板,再加1~2ml 3%过氧化氢。ATP 酶同工酶,参照胡能书等(1985)的方法。CAT、ME 同工酶则依郑德森(1989)的方法进行。CAT 同工酶染色至带型清晰后应立即拍照,否则褪色极快。

记录、分析 根据 Rf 值,酶带着色深浅及宽窄绘酶谱模式图,拍照(见图版)。并对所有115份材料的幼苗期根部 POD 同工酶酶谱资料进行统计分析。酶带按0—无带,1—有带加以编码,得原始数据矩阵后,依此求出欧氏距离并以离差平方和法聚类。有关运算均在微机 PC386×B/16上完成。

结果与分析

一、大豆种间 POD 同工酶酶谱差异

不论哪一个大豆种的 POD 同工酶均是根部最丰富(钟珍萍,1991),因此选取幼苗期

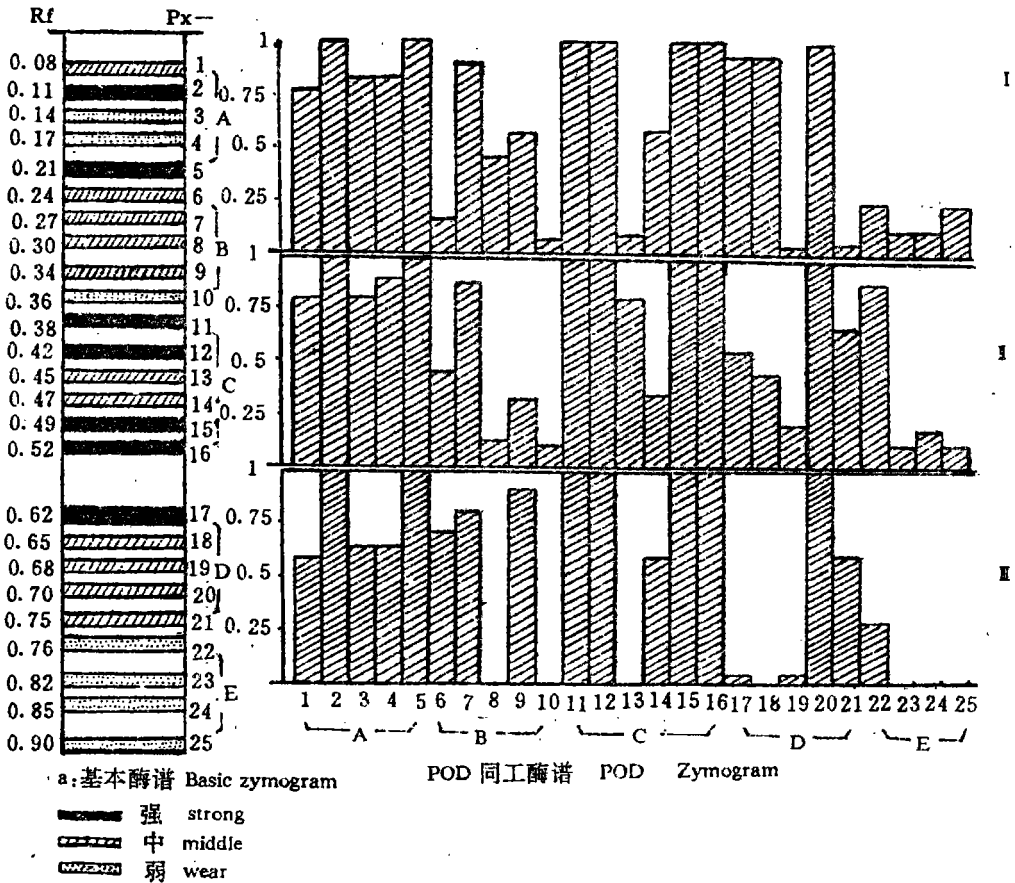


图1 大豆种间的 POD 同工酶酶谱及其酶带频率分布比较

Fig. 1 Comparison of POD zymograms and its band frequencies among species

根部的酶带作为比较的依据。由于材料间存在着差异,故列成频率分布图(图1),以便比较。

由图1看出,3个种的 POD 同工酶酶带叠加后共有25条,其中7条为种间共有的基本酶带,即 Px-2、Px-5、Px-11、Px-12、Px-15、Px-16、Px-20,表明栽培、半野生、野生大豆之间存在着相似性。但有7条酶带在野生大豆的各材料中全都不出现,如 Px-8、Px-10、Px-13、Px-18、Px-23、Px-24、Px-25,而在半野生大豆和栽培大豆中则有一些材料出现,尤其是 Px-8、Px-18、Px-23、Px-25 的出现频率,有随进化程度提高而呈递增的趋势,这揭示了种之间的相异性。根据王金陵(1947、1962)的观点,野生大豆与栽培大豆之间存在着许多过渡类型,两个种之间不存在隔绝性的差别。本试验的 POD 同工酶分析结果支持了这种看法。野生大豆经过人们的长期驯化而演化成今天的栽培大豆,在栽培种中包含着很多不同进化程度的类型(或品种),尤其在地方品种中,更有许多进化程度较低的类型。本试验所用的栽培大豆均是当地的农家品种,因此,就野生种不具有的7条酶带而言,有的品种与野生种相似,不具有这些酶带,有些品种则具有这些酶带。由此可见,进化程度不同的大豆材料之间,其 POD 同工酶表现有所不同,尤其反映在上述 Px-8、Px-10、Px-13、Px-18、Px-23、Px-24 及 Px-25 七条酶带。至于能否因此将这7条酶带作为区分大豆进化程度高低的依据,还有待于进一步的试验研究。

二、大豆种间 POD 同工酶酶谱的聚类分析

表2. 115份材料 POD 同工酶酶谱聚类地理分布表

Table 2 Geographical distribution of 115 soybean accessions on the result of POD zymograms clustering

类	Types	类内所含材料(品种)的产地及类型 The origins and types of tested materials in each type
I		黑龙江8份、吉林7份、辽宁4份、河北8份、山东8份、北京3份、山西2份、陕西4份、甘肃4份、四川2份、湖北3份、河南2份、湖南1份、江苏5份、安徽2份、贵州1份、江西1份、黑龙江1份 ¹ 、辽宁1份 ¹
II		北京1份、湖北3份、江西3份、广西2份、福建2份、四川1份、贵州1份、黑龙江1份 ¹
III		湖南4份、江苏2份 ¹ 、河南1份 ¹ 、陕西1份 ¹ 、安徽1份 ¹ 、江西1份 ¹ 、黑龙江1份 ¹ 、山西1份 ¹
IV		黑龙江1份 ¹ 、吉林1份 ¹ 、辽宁3份 ¹ 、北京2份 ¹ 、河北2份 ¹ 、山西4份 ¹ 、陕西2份 ¹ 、四川1份 ¹ 、江苏1份 ¹ 、甘肃1份 ¹ 、浙江1份 ¹ 、福建2份 ¹ 、西藏1份 ¹

注: I = 半野生种; II = 野生种; 未标号为栽培种。

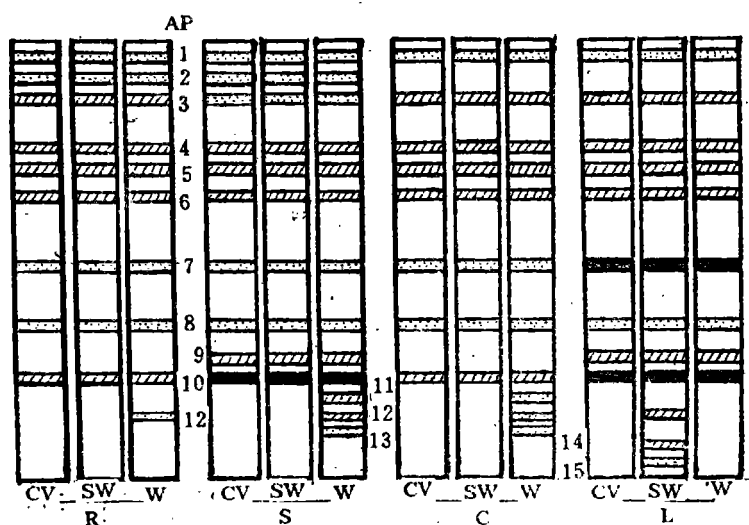
I = *G. gracilis*; II = *G. soja*; *G. max* has not marks.

经过几种聚类指标的比较,我们认为欧氏距离作为聚类指标较合理。依聚类结果绘制树状图(略),并按 $D^2=200$ 分类,可分为4类(表2):第 I 类以栽培大豆为主,且绝大多数是长江以北省份(包括东北三省)的品种;第 II 类也是栽培大豆为主,且多数是长江以南诸省份的品种;第 III 类是栽培、半野生及野生大豆均有的一类;第 IV 类则以野生大豆为主。由此可以推断,第 I 类的进化程度较高,第 II 类其次,第 IV 类最低,即表现野生性状。

三、大豆种间其它同工酶酶谱差异比较

1. ATP 酶同工酶

ATP 酶同工酶在大豆种间不同器官分布如图2。由图2可知,在幼苗期的根、幼茎和子叶上,栽培大豆和半野生大豆的酶谱完全一样,而野生大豆较栽培和半野生大豆多了1~3条酶带;而在初生叶中,半野生大豆则有些特殊,比栽培和野生大豆多了3条酶带。因此,除了 POD 同工酶外,还可在幼苗期用根、幼茎和子叶作材料,以 AP-11、AP-12及 AP-13 来研究进化程度不同的3个大豆种之间的同工酶表现差异。



CV:栽培种 (*G. max*); SW:半野生种 (*G. gracilis*); W:野生种 (*G. soja*)

R: 根(Root); S:幼茎(Stem); C:子叶(Cotyledon); L:初生叶 (Primary leaf)

图2 大豆种间 ATP 酶同工酶在不同器官的分布比较

Fig. 2 Adenosine triphosphatase(ATP)isozyme comparison among species in different tissues

2. ME 同工酶和 CAT 同工酶

幼苗期大豆种间 ME 和 CAT 同工酶在4个器官的差异如表3所示。ME 同工酶仅在初生叶中呈现出种间的差异,而其余器官均不存在差异,因此,在幼苗期,ME 同工酶较难作为分类的依据。CAT 同工酶酶谱在栽培、半野生、野生大豆之间差异较大,尤其是栽培种与另二个种之间;栽培大豆幼苗期各器官的 CAT 同工酶酶带普遍较少,活性较弱,尤其是根部仅隐约可见4条活性极弱的酶带;三个种都有自己的特有酶带,但也有的酶带为三者共有,有的酶带为半野生与野生大豆共有,如 CT-4、CT-8等;也有的酶带尽管为两个种共有,但表现器官却因种而异,如 CT-1、CT-2,只在栽培大豆的初生叶中出现,而在半野生大豆中,却表现于根和幼茎。所有这些,既反映了大豆种间的相异性,也说明了它们之间的亲缘关系和进化程度。

表3 大豆不同器官同工酶在种间的主要差异

Table 3 The major difference of soybean isozymes among species in different tissues

同工酶 Isozymes	酶带 bands	根 Root			幼茎 Stem			子叶 Cotyledon			初生叶 Primary leaf		
		CV	SW	W	CV	SW	W	CV	SW	W	CV	SW	W
ME	ME-1												+
	ME-3										+		
	CT-1		+			+					++		
CAT	CT-2		+			++					+		
	CT-3						+						
	CT-4							++	++	++			
	CT-5				+								
	CT-6										+		
	CT-7					++							
	CT-8		++	++									
	CT-9		+++	+++		+++	+++		+++	+++			
	CT-11										++		
	CT-12			+			++			+			+
	CT-13			+			++			++			++

+弱带(wear); ++中带(middle); +++强带(strong)。

小 结

三个大豆种115份材料的 POD 同工酶酶带共有25条,其中7条为3个种共有的基本酶带,其它18条的出现频率和活性变化,种间和材料间有较大的不同。Px-8、Px-10、Px-13、Px-18、Px-23、Px-24、Px-25等7条酶带仅存在于半野生种和栽培种的有些材料,而野生种中不出现,特别是 px-8、Px-18、Px-23和 Px-25四条酶带的出现频率随进化程度提高而呈递增趋势。通过对 POD 同工酶酶谱聚类,可将野生种及绝大多数栽培品种单独分开,而一些进化程度较低的栽培品种则与半野生种并为一类。对 ATP 酶、ME 及 CAT 同工酶的分析结果,同样说明了同工酶的表现与大豆的进化程度有关,有必要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 王金陵,1947.大豆性状之演化,农报,12(5):6-11
[2] 王金陵,1962.大豆的进化与其分类、栽培及育种的关系,中国农业科学,1,11-15
[3] 郑德森,1989.甘蔗遗传育种中的同工酶(博士论文),福建农学院
[4] 胡能书、万贤国,1985,同工酶技术及其运用,湖南科学技术出版社

- [5] 郝恩虎、牛淑贞, 1986, 大豆酯酶同工酶的研究, 中国油料, 2: 41—46
- [6] 钟珍萍, 1991, 大豆核型与同工酶的初步研究, 福建农学院博士论文
- [7] 黄寿松、翁坚, 1980, 几种植物中的过氧化物酶同工酶分析, 遗传, 2(3): 7—10
- [8] 虞京燕、夏文胜、黄伟英等, 1983, 大豆酯酶同工酶的初步研究, 大豆科学, 2(2): 104—108
- [9] Gorman, M. B. . 1984. An electrophoretic analysis of the genetic variation in the wild and cultivated soybean germplasm. Dissertation Abstract International, B(Science and Engineering), 44(11): 3300B

ISOZYMES COMPARISON AMONG SOYBEAN SPECIES

Zhong Zhenping¹ Liu Dejing¹ Chen Qifeng²

(¹Dept. of agronomy, Fujian Agricultural College;

²Institute of Genetics and Crop Breeding, Fujian Agricultural College)

Abstract

4 isozymes were compared among 3 soybean species, *Glycine. max*, *G. gracilis* and *G. soja*. It was considered primarily as follows. 1. The total band number of peroxidase (POD) isozyme was 25 in 3 soybean species. 7 bands were basic bands existed in 3 species, but other bands' frequencies and activity were different among species. 2. 7 bands of POD isozyme were not found in *G. soja*, but appeared with some frequencies in other two species. Especially, the frequency of its 4 bands increased with soybean's evolution trend, 3. The isozymes of adenosine triphosphatase (ATPase) malic enzyme (ME) and catalase (CAT) all had difference among species. Particularly, the bands of ATPase isozyme were not only distinct and distinguishable but also easy to be differentiated among species. So we could test ATPase isozyme of roots, stems and cotyledons in seedling stage, and use Ap-11, Ap-12, Ap-13 to indicate the variance among 3 soybean species, besides POD isozyme.

Key words *Glycine. max*; *G. gracilis*; *G. soja*; Isozyme(isoenzyme)