

## 宽叶韭种内分化的同工酶及可溶性蛋白的研究\*

万海清 梁明山<sup>✓</sup> 许介眉  
(四川大学生物系, 成都 610064)

Q941 18.2

**摘要** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对宽叶韭的3个代表居群内不同植株间的过氧化物酶、酯酶和16个居群间的酯酶(EST)、过氧化物酶(POX)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G<sub>6</sub>PDH)、苹果酸酶(ME)、苹果酸脱氢酶(MDH)、天冬氨酸转移酶(AAT)、腺苷三磷酸酶(ATPase)、乳酸脱氢酶(LDH)8种同工酶系统以及可溶性蛋白进行了分析。结果发现:居群内不同植株的酶谱无差异;居群间的酶谱存在多态性,酶谱差异明显,且各居群均有其特征酶谱。采用“排序”方法和聚类分析,对宽叶韭16个居群酶谱的相似系数和酶谱距离进行了研究,同工酶谱表型差异彼此显著的3个代表居群的可溶性蛋白双向电泳图谱也表现出明显差异,印证了同工酶的分析结果。结合细胞学的最新核型证据,从生物化学角度确定了这16个居群间的亲缘关系和彼此的分化程度。结果表明:宽叶韭明显分为两大类,即冬季不倒苗和冬季倒苗两类,在同一类型中各居群之间彼此近缘,且冬季不倒苗的类型分化程度较高。本研究首次将多种同工酶的综合分析与聚类分析及可溶性蛋白双向电泳用于葱属植物的种内分化研究,为植物分子进化和系统学研究提供了科学依据。

**关键词** 宽叶韭; 种内分化; 同工酶聚类分析; 可溶性蛋白双向电泳

## The study on isozyme and soluble proteins of intraspecies differentiation in *Allium hookeri*

Wan Haiqing Liang Mingshan Xu Jiemei

(Department of Biology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

**Abstract** In this paper, isozymes of POX, EST of bionts of 3 populations and POX, EST, G<sub>6</sub>PDH, ME MDH, AAT, ATPase and LDH of 16 populations of *A. hookeri* and soluble proteins of 3 of the 16 populations were analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. The results indicate that the isozymes are non-different among the bionts of one population, the isozymes patterns and soluble proteins ones are remarkably different among the populations with each showing characteristic isozymes and soluble proteins pattern on the basis of the R<sub>f</sub> value and isozymes activity. Moreover, the resemblance of the isozymes patterns of the 16 populations of *A. hookeri* were analysed using the methods of arranging and clustering analysis. The results indicate that perennial *A. hookeri*, which include all three triploids populations, Pingshan, Ruyuan and Longsheng populations, and such diploids as Dafeishui, Emei Qingyinge, Muchuan, Qingshen, Wulong and Nanchuan popula-

1997-08-09 收稿

第一作者简介: 万海清, 男, 1964年出生, 讲师, 硕士, 从事生物化学科研和教学工作。

\*国家自然科学基金资助项目(项目编号39370051)

tions studied in our research, are closely related among various populations within the same type, whereas non-perennial *A. hookeri* populations, which wither during the winter, are also closely related to each other within the same type. Differentiation level of perennial populations is rather high.

The originality of this paper exists in the application of IEF/SDS-PAGE in the research of intraspecies differentiation of *Allium*, and our experiments prove that this research approach is more indicative and persuasive. In conclusion, isozymes and soluble proteins can be genetic markers of the genetic differences and relationship among intraspecies. And they provide reliable biochemical basis for the study of intraspecies differentiation of plant.

**Key words** *Allium hookeri*; intraspecies differentiation; isozyme cluster analysis; soluble protein IEF/SDS-PAGE

在植物的进化中, 染色体数目和结构变异在种内分化和物种形成中起着重要作用<sup>[2]</sup>。实际上, 就是在种内不同的居群之间, 也经常发生染色体的变异。例如, 近年来对宽叶韭在居群水平上的分化和进化研究主要集中在染色体变异上<sup>[3,4]</sup>, 揭示了宽叶韭种内存在核型多态现象和倍性变化。

宽叶韭 (*Allium hookeri* Thwaites) 是百合科 (Liliaceae) 葱属粗根组 (sect *Bromatorrhiza*) 的植物, 分布于四川、云南 (西北部) 和西藏 (东南部), 以及斯里兰卡、不丹和印度的北部<sup>[1]</sup>, 在我国南方的一些地区特别是云南和四川常栽培作蔬菜食用。

在生物的进化过程中, 变异基因经复制分离形成了不同位点基因, 从而编码同工酶等蛋白质的不同亚基, 因此同工酶是基因变异的产物, 是识别遗传基因存在的标记<sup>[5,6]</sup>。通过同工酶分析, 可以从分子水平上揭示物种的起源、形成和种内分化。同工酶分析探讨植物的系统与进化的研究较多<sup>[7~13]</sup>。但有关葱属植物同工酶的研究, 国内外报道不多, 王芳平等<sup>[14]</sup>曾对葱属 16 个品种 (包括宽叶韭一个品种) 进行了过氧化物酶同工酶分析。Haishima *et al*<sup>[15]</sup>对葱 (*Allium fistulosum* L.) 的日本地方变种 (Bunching Onion) 进行了同工酶多型现象的研究, 用等电聚焦分析了 5 种等位酶基因位点的分化情况, 测量了有关遗传距离, 表明在育种条件下发生了居群分化, 从而产生了该作物的一些地方性变种。

可溶性蛋白是比同工酶稳定的基因表达产物, 几乎不受环境的影响, 因此可溶性蛋白组分和亚基的分析已广泛用于植物的分类、进化、作物育种及遗传变异等方面的研究。用可溶性蛋白来分析葱属植物种内各居群间的分化还未见报道。我们从 1995 年 3 月至 1997 年 5 月连续对宽叶韭居群内各植株间酶谱和居群间酶谱进行了重复性研究, 得到了完全一致的结果, 这些结果对从分子水平研究宽叶韭的种内分化提供了有参考价值的背景资料。

## 1 材料和取材

1.1 材料 宽叶韭的各个居群材料均采自四川大学植物园。居群名称见表 1。

1.2 取材 均取单株为供试材料, 分析 POX 时, 取由外向内的第一片叶; 对其余酶系统的分析取由里向外的第 3 片叶。

## 2 试剂

丙烯酰胺 (Acr)、甲叉双丙烯酰胺 (Bis)、四甲基乙二胺 (TEMED) 均为 Sigma 公司产品; 两性电解质 (Ampholines) pH3.5~10、pH5~8 为 LKB 公司产品; 二硫苏糖醇 (DTT)、辅酶 I

(NAD)、辅酶Ⅱ (NADP)、氮蓝四唑 (NBT)、吩嗪甲硫酸 (PMS)、 $\beta$ -巯基乙醇均为上海生化研究所东风试剂厂产品; 其余均为国产分析纯。

表 1 宽叶韭 16 个居群名称

Table 1 The name of 16 populations of *Allium hookeri* Thwaites

编号	居群名称	编号	居群名称	编号	居群名称	编号	居群名称
1	四川宝兴 (I) (2x) Baoping (I)	5	云南大理 (I) (2x) Dah (I)	9	四川都江堰 (2x) Dujiangyan	13	四川沐川 (2x) Muchuan
2	四川峨眉清音阁 (2x) Emei qingyigge	6	四川大邑 (2x) Dayi	10	云南大理 (II) (2x) Dah (II)	14	四川青神 (2x) Qingshen
3	四川宝兴 (II) (2x) Baoping (II)	7	广东乳源 (3x) Ruyuan	11	云南大理 (III) (2x) Dah (III)	15	四川武隆 (2x) Wulong
4	四川峨眉脚盆坝 (2x) Emei jiaopenba	8	广西龙胜 (3x) Longsheng	12	四川屏山 (3x) Pingshan	16	四川南川 (2x) Nanchuan

表中 1,3,4,5,9,10,11 居群是冬季叶片枯萎型, 其余为四季生长常绿型。

### 3 方 法

#### 3.1 制样

3.1.1 酶液提取<sup>[7,9]</sup> 1 g 新成熟叶片加 1.5 mL 冷提取液 (0.1 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.8, 内含 5% (W/V) 蔗糖, 14 mmol/L 巯基乙醇), 冰浴匀浆, 在 4℃、15 000 rpm 下离心 15 min, 上清液贮于-20℃ 备用。

3.1.2 可溶性蛋白制备 参照逯斌等<sup>[16]</sup>的方法, 取 10 g 新鲜叶片, 液氮研磨成粉; 悬浮于 20 mL 提取液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 1 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L PMST), 加入少量 PVP, 短暂匀浆; 4℃、12 000 rpm 离心 15 min; 上清液与含 0.07% 巯基乙醇的冷丙酮液以 1:4 (V/V) 混合, -20℃ 下沉淀 4 h; 4℃、15 000 rpm 离心 15 min, 弃上清; 沉淀用含 0.07% 巯基乙醇的冷丙酮液洗涤一次, 4℃、15 000 rpm 离心 15 min, 弃上清; 沉淀在 10~15℃ 下真空干燥后, 溶于 6 mL "UKS" (9.5 mol/L 尿素, 5 mmol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25% SDS, 0.5% 巯基乙醇, 2% 两性电解质 (pH3.5~10), 6% Triton X-100); 16 000 rpm 离心 20 min, 取上清, 贮于-20℃ 备用。

#### 3.2 电泳

3.2.1 同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 参照张龙翔等<sup>[17]</sup>和周本正<sup>[18]</sup>的方法, 浓缩胶浓度均为 4%, 凝胶缓冲液为 pH6.7 的 Tris-HCl, 分离胶浓度为 7.5%~10%, G<sub>6</sub>PDH (葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, E. C. 1. 1. 1. 49), ME (苹果酸酶, Malic enzyme, E. C. 1. 1. 1. 40), POX (过氧化物酶, E. C. 1. 11. 1. 7), LDH (乳酸脱氢酶, Lactate dehydrogenase, E. C. 1. 1. 1. 27), AAT (天冬氨酸转移酶, Aspartate aminotransferase, E. C. 2. 6. 1. 1), ATPase (腺苷三磷酸酶, E. C. 3. 6. 1. 8) 用 7.5% 的分离胶; EST (酯酶, Esterase, E. C. 3. 1. 1. 2), MDH (苹果酸脱氢酶, Malate dehydrogenase, E. C. 1. 1. 1. 37) 用 10% 分离胶, 分离胶缓冲液为 pH8.9 的 Tris-HCl, 一样量为 50~80  $\mu$ L, 电极缓冲液均为 5 mmol/L Tris-38 mmol/L Gly, pH8.3。在 4~8℃ 冰箱中, 稳流电泳 8~20 h (同工酶不同, 电泳时间不同)。

#### 3.2.2 可溶性蛋白

3.2.2.1 等电聚焦 参照何忠效等<sup>[19]</sup>的方法修改进行, 不同在于: 配胶时, Ampholine pH 3.5~

10 为 400  $\mu\text{L}$  / 10 mL 胶, pH 5~8 为 550  $\mu\text{L}$  / 10 mL 胶, 用 TritonX-100 代替 NP-40。预电泳时按 200 v, 15 min; 300 v, 60 min; 400 v, 60 min 进行。上样量达到 600~750  $\mu\text{g}$  的蛋白质总量。电泳时, 先 400 v, 18 h; 后 600 v, 2.5 h。

3.2.2.2 第二向 SDS-PAGE 主要按梅百根<sup>[20]</sup>的方法进行。胶板厚度为 0.2 cm, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4.5%。电泳时采用先稳流 15 mA 约 1.5 h, 直至溴酚蓝达到胶下缘, 停止电泳, 取出凝胶, 进行染色。

### 3.3 染色

3.3.1 同工酶系统 EST、G<sub>6</sub>PDH、ME、MDH、AAT、LDH 的染色方法按 Soltis D.E.& Soltis P.S.<sup>[21]</sup>的方法和王中仁<sup>[5]</sup>的方法, POX ATPase 的染色方法按胡能书<sup>[22]</sup>的方法。

3.3.2 可溶性蛋白 用 0.25% 考马斯亮蓝 R<sub>250</sub>, 按常规操作进行。

## 4 结果与分析

### 4.1 宽叶韭居群内植株间同工酶谱比较 (图 1~6)

#### 4.1.1 宝兴居群 (I) (2x, 冬季倒苗)

4.1.1.1 EST 酶谱 (图 1) 酶谱表型为: 浅蓝紫色胶板上共分出 10 条谱带, 可分为 4 区 (I 区色深, II 区色浅而清晰, III 区色深, IV 区色浅)。酶谱中 8 个植株的酶带特征完全一致, 呈现出 8 个重复样的现象, 8 个植株 EST 同工酶酶谱模式图为一个式样, 如图所示。

4.1.1.2 POX 酶谱 (图 2) 酶谱表型为: 胶板上共呈现 4 条带, 分为两个区域, I 区色浅, II 区色更浅。虽然整个酶谱带数不多, 但 7 个植株的酶谱一致。

#### 4.1.2 青神居群 (2x, 冬季不倒苗)

4.1.2.1 EST 酶谱 (图 3) 酶谱表型: 淡蓝紫色胶板上有 10 条酶带, 共分 3 个区域, I 区色较深, II 区色浅而清晰, III 区色较深。8 个植株的酶谱也是一样的。

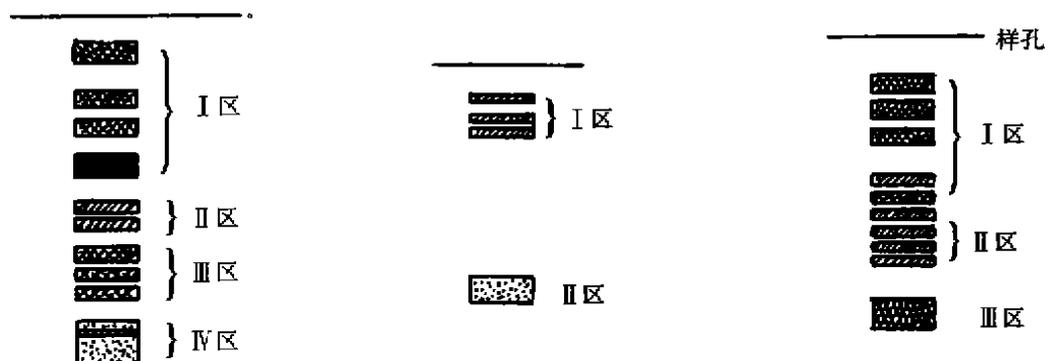


图 1 宝兴居群 (I) 8 个植株 EST 同工酶酶谱

Fig. 1 EST isozymogram of eight bionts of Baoxing population

图 2 宝兴居群 (I) 7 个植株 POX 同工酶酶谱

Fig. 2 POX isozymogram of seven bionts of Baoxing population

图 3 青神居群 8 个植株 EST 同工酶酶谱

Fig. 3 EST isozymogram of eight bionts of Qingshen population

4.1.2.2 POX 酶谱 (图 4) 酶谱表型: 无色胶板上共可分清 8 条酶带, 可分 3 个区域, I 区染色深, II 区色浅清晰, III 区色很浅。所试 8 个植株的 POX 同工酶酶谱完全相同。

#### 4.1.3 广西龙胜居群 (3x, 冬季不倒苗)

4.1.3.1 EST 酶谱 (图 5) 酶谱表型: 浅蓝色胶板上共呈现 8 条酶带, 可分为 3 区, I 区色深, II 区色浅清晰, III 区色浅, 测试的 7 个植株的 EST 同工酶酶谱也完全一致。

4.1.3.2 POX 酶谱 (图 6) 由图 6 可看出, 龙胜居群 7 个植株的 POX 同工酶酶谱仍然全部相同。无色胶板上共显现 7 条酶带, 明显分为两区, I 区染色稍深, II 区色浅, 各带都清晰。

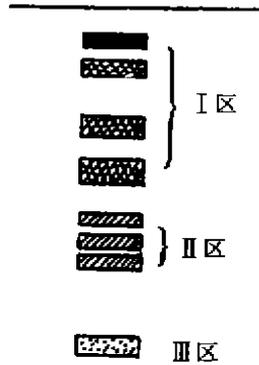


图 4 青神居群 8 个植株 POX 同工酶酶谱  
Fig. 4 POX isozymogram of eight biotypes of Qingshen population

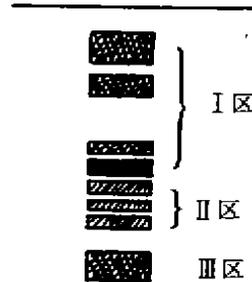


图 5 龙胜居群 7 个植株 EST 同工酶酶谱  
Fig. 5 EST isozymogram of seven biotypes of Longsheng population

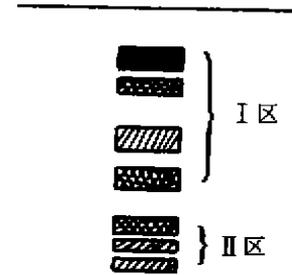


图 6 龙胜居群 7 个植株 POX 同工酶酶谱  
Fig. 6 POX isozymogram of seven biotypes of Longsheng population

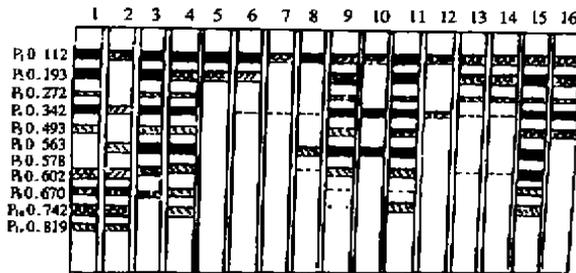


图 7 16 个居群 POX 同工酶酶谱 (编号见表 1)  
Fig. 7 POX isozymogram of 16 population of *A. hookeri* (No. of populations refer to table 1)

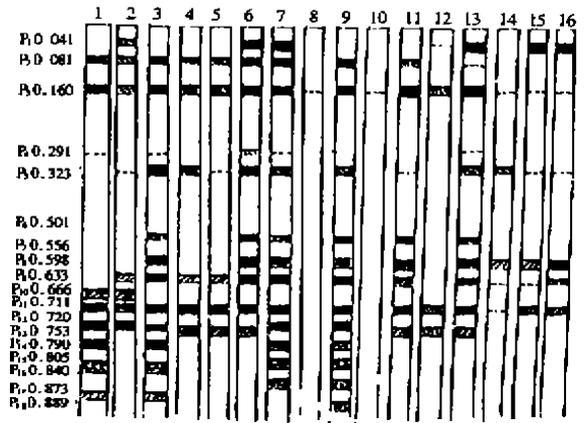


图 8 16 个居群  $G_6PDH$  同工酶酶谱 (编号见表 1)  
Fig. 8  $G_6PDH$  isozymogram of 16 population of *A. hookeri* (No. of populations refer to table 1)

#### 4.2 宽叶韭 16 个居群间同工酶酶谱的测定和分析 (图 7~14)

4.2.1 酶谱表型特征 根据电泳结果, 就不同酶而言, 由于不同酶带的  $R_f$  值不同, 16 个居群共分离出一系列不同谱带。不同谱带在 16 个居群中的表达及活性强弱不同, 因而各个居群的酶谱差异集中体现在特定区域, 其中能反映居群差异的特征带可为分析种内分化提供遗传依据, 并确定出有关居群间的亲缘关系。

4.2.2 酶谱排序

采用江洪等<sup>[23]</sup>的方法, 求出各个居群间酶谱 ( $R_f$ ) 的相似系数、不相似系数, 并以此进行酶谱排序。

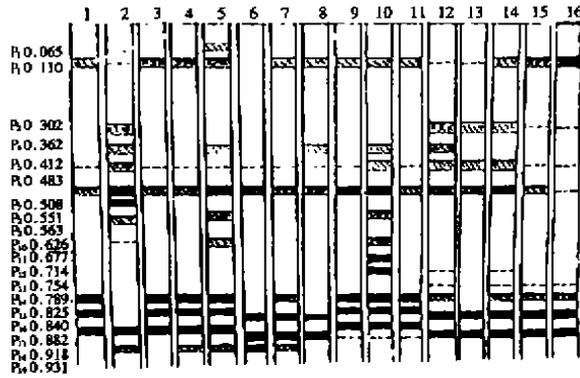


图9 16个居群 EST 同工酶酶谱(编号见表1)  
Fig. 9 EST isozymogram of 16 population of *A. hookeri*  
(No. of populations refer to table 1)

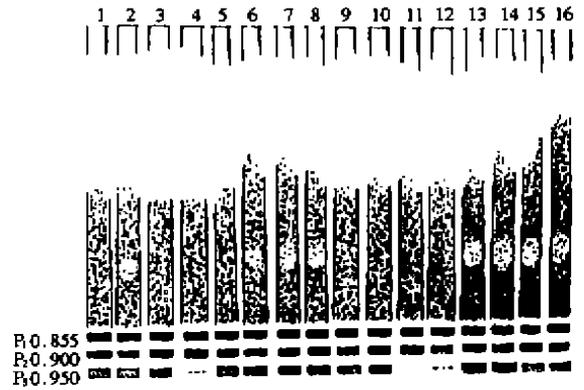


图10 16个居群 MDH 同工酶酶谱(编号见表1)  
Fig. 10 MDH isozymogram of 16 population in of *A. hookeri*  
(No. of populations refer to table 1)

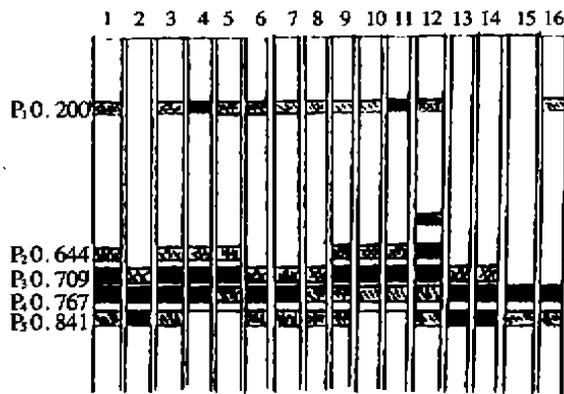


图11 16个居群 ME 同工酶酶谱  
Fig. 11 ME isozymogram of 16 population of *A. hookeri*

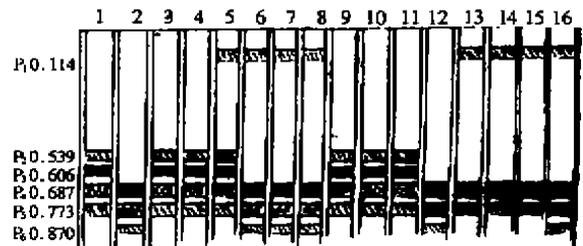


图12 16个居群 AAT 同工酶酶谱  
Fig. 12 AAT isozymogram of 16 population in of *A. hookeri*

4.2.2.1 居群酶谱相似系数 (c):

$$c = \frac{2 \times A、B \text{ 两居群酶谱 } (R_f) \text{ 相同或相近 } (R_f \pm 0.02) \text{ 酶带数}}{A、B \text{ 两居群酶谱带总带数}} \times 100\%$$

4.2.2.2 居群间酶谱 ( $R_f$ ) 的不相似系数 (d) 及总和 ( $\sum$ )

$$d = 100\% - c \quad \sum: 16 \text{ 个 } d \text{ 之和}$$

4.2.2.3 确定各个居群酶谱在 x 轴上的位置 ( $X_i$ )

把不相似值总和最大的居群 (第 i 号) 酶谱作为 a 标记在 x 轴的 o 位, 找出与第 i 号居群酶谱最不相似的酶谱 (第 j 号) 以 b 标记在 x 轴的另一端。其标记座标按一定比例 (如 1:10 等), 确定其余各个居群酶谱沿 x 轴对第 i 号居群的距离 (x<sub>i</sub>)。x<sub>i</sub> 可由公式算出:

$$X_i = \frac{L^2 + D_a^2 - D_b^2}{2L}$$

(L: 居群 i 与 j 间酶谱的不相似值; D<sub>a</sub>: 居群 i 与所求居群间酶谱的不相似值; D<sub>b</sub>: 居群 j 与所求居群间酶谱的不相似值。)

所求出的各 d、各 Σ 及各 X<sub>i</sub> 可列入一矩阵表中, 不同同工酶都有相应的矩阵表 (表 2~9)。

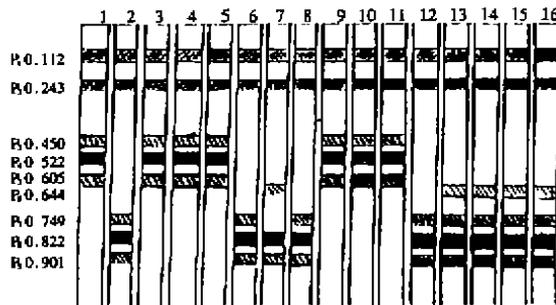


图 13 16 个居群 ATPase 同工酶酶谱

Fig. 13 ATPase isozymogram of 16 population of *A. hookeri*

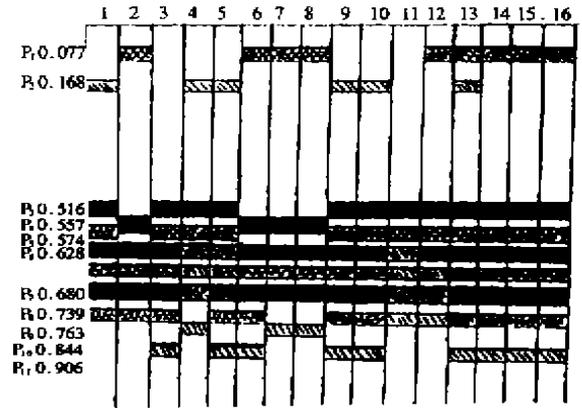


图 14 16 个居群 LDH 同工酶酶谱

Fig. 14 LDH isozymogram of 16 population in of *A. hookeri*

表 2 宽叶韭 16 个居群 POX 同工酶系统的不相似系数总和与 X<sub>i</sub> 值

Table 2 The values of the sum of dissimilarity coefficient and X<sub>i</sub> of POX isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																Σ	X <sub>i</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		25	18	64	64	73	80	82	25	67	29	80	50	50	22	29	758	28.3
2	25		33	38	78	78	75	56	43	40	47	75	80	80	38	67	853	0
3	18	33		6	60	60	78	60	7	46	23	78	46	46	6	23	590	33.6
4	64	38	6		61	64	72	50	23	50	23	72	29	29	23	29	570	43.8
5	64	78	60	64		20	50	77	64	60	64	50	43	43	64	43	844	66.5
6	73	78	60	64	20		20	43	50	34	50	20	43	43	50	25	673	66.5
7	80	75	78	72	50	20		34	64	20	64	0	43	43	64	43	762	63.6
8	82	56	60	50	77	43	34		38	24	38	34	34	34	38	56	698	52.4
9	25	43	7	23	64	50	64	38		50	0	64	29	29	0	29	515	46.3
10	67	40	46	50	60	34	20	24	50		50	20	50	50	50	50	661	34.4
11	29	47	23	23	64	50	64	38	0	50		64	29	29	12	29	551	48.6
12	80	75	78	72	50	20	0	34	64	20	64		43	43	64	43	752	63.6
13	50	80	46	29	43	43	43	34	29	50	29	43		0	29	20	568	80
14	50	80	46	29	43	43	43	34	29	50	29	43	0		29	20	568	80
15	22	38	6	23	64	50	64	38	0	50	12	64	29	29		29	518	43.8
16	29	67	23	29	43	25	43	56	29	50	29	43	20	20	29		535	66.6

表3 宽叶韭 16 个居群 G<sub>6</sub>PDH 同工酶系统的不相似系数总和与 X<sub>i</sub> 值  
Table 3 The values of the sum of dissimilarity coefficient and X<sub>i</sub> of G<sub>6</sub>PDH isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																Σ	X <sub>i</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		41	24	47	47	48	45	80	52	80	43	54	47	71	73	73	825	68.4
2	41		40	29	29	22	33	78	40	78	14	33	22	38	29	29	555	78.4
3	24	40		33	33	18	20	85	25	85	20	62	12	41	44	44	586	82.7
4	47	29	33		0	25	47	81	44	81	14	40	25	37	34	34	571	68.3
5	47	29	33	0		25	47	81	44	81	14	40	25	37	34	34	571	68.3
6	48	22	18	25	25		21	82	36	82	11	43	0	33	25	25	496	82.1
7	45	33	20	47	47	21		86	12	86	33	59	13	44	37	37	620	86
8	80	78	85	81	81	82	86		85	0	78	60	82	67	71	71	1087	0
9	52	40	25	44	44	36	12	85		85	30	62	36	41	44	44	680	84.2
10	80	78	85	81	81	82	86	0	85		78	60	82	67	71	71	1087	0
11	43	14	20	14	14	11	33	78	30	78		50	11	23	29	29	477	72
12	54	33	62	40	40	43	59	60	62	60	50		43	44	40	40	730	43.7
13	47	22	12	25	25	0	13	82	36	82	11	43		33	25	25	481	81.1
14	71	38	41	37	37	33	44	67	41	67	23	44	33		9	9	594	57.8
15	73	29	44	34	34	25	37	71	44	71	29	40	25	9		0	565	64.3
16	73	29	44	34	34	25	37	71	44	71	29	40	25	9	0		565	64.3

表4 宽叶韭 16 个居群 EST 同工酶系统的不相似系数总和与 X<sub>i</sub> 值  
Table 4 The values of the sum of dissimilarity coefficient and X<sub>i</sub> of EST isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																Σ	X <sub>i</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		50	0	8	29	64	38	50	8	33	8	38	50	47	43	43	509	16.7
2	50		50	53	43	60	53	50	53	55	53	45	50	58	56	56	785	0
3	0	50		8	29	64	38	50	8	33	8	38	50	47	43	43	509	16.7
4	8	53	8		22	50	29	54	14	37	14	41	54	50	47	47	528	32.6
5	29	43	29	22		62	44	53	33	22	33	43	65	60	58	58	654	13.4
6	64	60	64	50	62		17	27	50	65	50	47	27	43	38	38	699	60
7	38	53	38	29	44	17		23	29	47	29	29	23	25	20	20	464	51
8	50	50	50	54	53	27	23		38	44	38	27	17	33	29	29	562	44.8
9	8	53	8	14	33	50	29	38		26	0	29	38	37	33	33	429	32.6
10	33	55	33	37	22	65	47	44	26		26	27	56	52	50	50	623	20
11	8	53	8	14	33	50	29	38	0	26		35	38	37	33	33	429	32.6
12	38	45	38	41	43	47	29	27	29	27	35		25	5	11	11	451	23.6
13	50	50	50	54	65	27	23	17	38	56	38	25		20	14	14	541	44.8
14	47	58	47	50	60	43	25	33	37	52	37	5	20		6	6	526	42.6
15	43	56	43	47	58	38	20	29	33	50	33	11	14	6		0	481	44.1
16	43	56	43	47	58	38	20	29	33	50	33	11	14	6	0		481	44.1

#### 4.3 同工酶系统的平均酶谱距离和类平均聚类分析<sup>〔11,24〕</sup>

##### 4.3.1 16 个居群 8 种同工酶系统的平均不相似系数总和 ( $\bar{\Sigma}$ ) 及 $\bar{x}_i$

首先由前面所得的 8 个矩阵表可求出各个不相似系数的平均值, 然后求出  $\bar{\Sigma}$  和  $\bar{x}_i$  值, 见表 10.

##### 4.3.2 16 个居群的 8 种同工酶谱在 x 轴上的排序, 如图 15 所示。

## 4.3.3 类平均聚类分析

根据表 10, 按熊全沫<sup>(24)</sup>的方法, 宽叶韭各居群聚类图如图 16。

由图 16 可见, 如果在相似系数为 58% 处划线, 则宽叶韭种内这 16 个居群可分为两大类, 冬季倒苗的二倍体居群为一类, 冬季不倒苗二倍体居群和三倍体居群为一类, 这与宽叶韭的生活习性等特性进一步相互印证。每大类内各居群间相似系数均大于 71%。

表 5 宽叶韭 16 个居群 MDH 同工酶系统的不相似系数总和与  $X_1$  值Table 5 The values of the sum of dissimilarity coefficient and  $X_1$  of MDH isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																$\Sigma$	$X_1$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
2	0		0	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
3	0	0		20	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
4	20	20	20		20	20	20	20	20	20	0	0	0	20	20	20	240	0
5	0	0	0	20		0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
6	0	0	0	20	0		0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
7	0	0	0	20	0	0		0	0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
8	0	0	0	20	0	0	0		0	0	20	20	20	0	0	0	80	20
9	0	0	0	20	0	0	0	0		0	20	20	20	0	0	0	80	20
10	0	0	0	20	0	0	0	0	0		20	20	20	0	0	0	80	20
11	20	20	20	0	20	20	20	20	20	20		0	0	20	20	20	240	0
12	20	20	20	0	20	20	20	20	20	20	0		0	20	20	20	240	0
13	20	20	20	0	20	20	20	20	20	20	0	0		20	20	20	240	0
14	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20		0	0	80	20
15	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0		0	80	20
16	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0		80	20

表 6 宽叶韭 16 个居群 ME 同工酶系统的不相似系数总和与  $X_1$  值Table 6 The values of the sum of dissimilarity coefficient and  $X_1$  of ME isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																$\Sigma$	$X_1$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		25	0	11	11	11	11	11	0	11	11	0	25	25	43	25	220	46.4
2	25		25	43	43	14	14	14	25	43	43	25	0	0	20	33	367	22.7
3	0	25		11	11	11	11	11	0	11	11	0	25	25	43	25	220	46.4
4	11	43	11		0	25	25	25	11	0	0	11	43	43	67	43	358	67
5	11	43	11	0		25	25	25	11	0	0	11	43	43	67	43	358	67
6	11	14	11	25	25		0	0	11	25	25	11	14	14	34	28	247	37
7	11	14	11	25	25	0		0	11	25	25	11	14	14	34	28	247	37
8	11	14	11	25	25	0	0		11	25	25	11	14	14	34	28	247	37
9	0	25	0	11	11	11	11	11		11	11	0	25	25	43	25	220	46.4
10	11	43	11	0	0	25	25	25	11		0	11	43	43	67	43	358	67
11	11	43	11	0	0	25	25	25	11	0		11	43	43	67	43	358	67
12	0	25	0	11	11	11	11	11	0	11	11		25	25	43	25	220	46.4
13	25	0	25	43	43	14	14	14	25	43	43	25		0	20	33	367	22.7
14	25	0	25	43	43	14	14	14	25	43	43	25	0		20	33	367	22.7
15	43	20	43	67	67	34	34	34	43	67	67	43	20	20		20	619	0
16	25	33	25	43	43	28	28	28	25	43	43	25	33	33	20		475	22.7

表7 宽叶韭 16 个居群 AAT 同工酶系统的不相似系数总和与  $X_i$  值  
Table 7 The values of the sum of dissimilarity coefficient and  $X_i$  of AAT isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																$\Sigma$	$X_i$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		43	0	0	11	50	50	50	0	0	0	43	43	43	43	50	426	42.3
2	43		43	43	50	14	14	14	43	43	43	0	33	33	33	14	463	0
3	0	43		0	11	50	50	50	0	0	0	43	43	43	43	50	426	42.3
4	0	43	0		11	50	50	50	0	0	0	43	43	43	43	50	426	42.3
5	11	50	11	11		33	33	33	11	11	11	50	25	25	25	33	373	50
6	50	14	50	50	33		0	0	50	50	50	14	14	14	14	0	403	16.1
7	50	14	50	50	33	0		0	50	50	50	14	14	14	14	0	403	16.1
8	50	14	50	50	33	0	0		50	50	50	14	14	14	14	0	403	16.1
9	0	43	0	0	11	50	50	50		0	0	43	43	43	43	50	426	42.3
10	0	43	0	0	11	50	50	50	0		0	43	43	43	43	50	426	42.3
11	0	43	0	0	11	50	50	50	0	0		43	43	43	43	50	426	42.3
12	43	0	43	43	50	14	14	14	43	43	43		33	33	33	14	463	0
13	43	33	43	43	25	14	14	14	43	43	43	33		0	0	14	406	29.6
14	43	33	43	43	25	14	14	14	43	43	43	33	0		0	14	406	29.6
15	43	33	43	43	25	14	14	14	43	43	43	33	0	0		14	406	29.6
16	50	14	50	50	33	0	0	0	50	50	50	14	14	14	14		403	16.1

表8 宽叶韭 16 个居群 ATase 同工酶系统的不相似系数总和与  $X_i$  值  
Table 8 The values of the sum of dissimilarity coefficient and  $X_i$  of ATase isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																$\Sigma$	$X_i$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		60	0	0	0	60	60	60	0	0	0	60	64	64	64	64	556	0
2	60		60	60	60	0	20	0	60	60	60	0	9	9	9	9	476	59.5
3	0	60		0	0	60	60	60	0	0	0	60	64	64	64	64	556	0
4	0	60	0		0	60	60	60	0	0	0	60	64	64	64	64	556	0
5	60	0	60	60		60	20	0	60	60	60	0	9	9	9	9	476	59.5
6	60	0	60	60	60		20	0	60	60	60	0	9	9	9	9	476	59.5
7	60	20	60	60	60	20		20	60	60	60	20	9	9	9	9	536	59.5
8	60	0	60	60	60	0	20		60	60	60	0	9	9	9	9	476	59.5
9	0	60	0	0	0	60	60	60		0	0	60	64	64	64	64	556	0
10	0	60	0	0	0	60	60	60	0		0	60	64	64	64	64	556	0
11	0	60	0	0	0	60	60	60	0	0		60	64	64	64	64	556	0
12	60	0	60	60	60	0	20	0	60	60	60		9	9	9	9	476	59.5
13	64	9	64	64	64	9	9	9	64	64	64	9		0	0	0	493	64
14	64	9	64	64	64	9	9	9	64	64	64	9	0		0	0	493	64
15	64	9	64	64	64	9	9	9	64	64	64	9	0	0		0	493	64
16	64	9	64	64	64	9	9	9	64	64	64	9	0	0	0		493	64

#### 4.4 可溶性蛋白双向电泳图谱分析

用 IEF/SFS-PAGE 分析同工酶谱差异较大的 3 个代表居群〔广东乳源居群 (3 x, 冬季不倒苗)、宝兴居群 (I) (2 x, 冬季倒苗)、青神居群 (2 x, 冬季不倒苗)〕的可溶性蛋白组分。电泳结果见图 17~19。

表 9 宽叶韭 16 个居群 LDH 同工酶系统的不相似系数总和与  $X_i$  值  
 Table 9 The values of the sum of dissimilarity coefficient and  $X_i$  of LDH isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																$\Sigma$	$X_i$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		38	14	14	7	43	54	54	7	7	8	14	12	20	20	20	332	53.6
2	38		38	54	36	8	17	17	43	43	33	38	33	28	28	28	482	19.7
3	14	38		28	7	28	50	50	7	7	8	14	12	7	7	7	284	50
4	14	54	28		33	57	38	38	20	20	23	28	25	33	33	33	477	31.6
5	7	36	7	33		33	57	57	0	0	14	12	6	12	12	12	306	57
6	43	8	28	57	33		23	23	33	33	38	28	25	20	20	20	432	23.6
7	54	17	50	38	57	23		0	57	57	42	28	47	43	43	43	599	0
8	54	17	50	38	57	23	0		57	57	42	28	47	43	43	43	599	0
9	7	43	7	20	0	33	57	57		0	14	13	6	12	12	12	293	57
10	7	43	7	20	0	33	57	57	0		14	13	6	12	12	12	293	57
11	8	33	8	23	14	38	42	42	14	14		8	20	14	14	14	320	42.2
12	14	38	14	28	20	28	28	28	13	13	8		12	7	7	7	265	31.9
13	12	33	12	25	6	25	47	47	6	6	20	12		6	6	6	269	47.6
14	20	28	7	33	12	20	43	43	12	12	14	7	6		0	0	257	43.4
15	30	28	7	33	12	20	43	43	12	12	14	7	6	0		0	257	43.4
16	20	28	7	33	12	20	43	43	12	12	14	7	6	0	0		257	43.4

表 10 宽叶韭 16 个居群八种同工酶系统的不相似系数总和与  $\bar{X}_i$  值  
 Table 10 The values of the sum of dissimilarity coefficient  $\Sigma$  and  $\bar{X}_i$  of 8 isozymes of the 16 populations of *A. hookeri*. (No. of populations refer to table 1)

编号	居 群																$\Sigma$	$\bar{X}_i$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1		35.2	7.0	7.0	21.1	35.6	42.2	48.4	11.5	24.8	14.9	37.0	38.9	40.0	38.5	38.0	440.1	18.8
2	35.2		36.1	57	42.4	24.5	28.2	28.6	38.4	45.2	39.1	19	30.9	30.8	26.6	29.5	482.5	51.9
3	7.0	36.1		14	18.9	36.4	38.4	45.8	6.0	22.8	11.2	37	34	34.1	31.2	32	386.1	19.6
4	7.0	57	14		16.5	58.5	49	49	10	10	11.5	44	44.5	48.5	48.5	48.5	516.5	0
5	21.1	42.2	18.9	16.5		32.2	34	48.2	20.4	21.8	19.5	40	36.4	35.5	40.5	35.9	463.3	22.7
6	35.6	24.5	36.4	58.5	32.2		12.8	21.8	30.2	43.6	38	14	19	22	23.6	18.1	436.1	58.5
7	42.2	28.2	38.4	49	32	12.6		20	35.4	43.1	40.4	24	22.9	24	27.5	22.5	464.2	48.4
8	48.4	28.6	45.8	49	48.2	21.8	20		42.4	32.5	43.9	14	29.6	26.8	29.6	29.5	510.1	46.6
9	11.5	38.4	6.0	10	20.4	36.2	35.4	42.4		21.5	9.4	36.5	32.6	31.4	29.9	32.1	393.7	18.9
10	24.8	45.2	22.8	10	21.8	43.6	43.1	32.5	21.5		23.5	36.5	45.5	41.4	44.6	42.5	499.3	13.9
11	14.9	39.1	11.2	11.5	19.5	38	40.4	43.9	9.4	23.5		34	31	34.1	35.2	35.2	420.5	18.0
12	37	19	37	44	40	14	24	14	36.5	36.5	34		10.5	8.0	8.0	8.0	370.5	44.1
13	38.9	30.9	34	44.5	36.4	19	22.9	29.6	32.6	45.5	31	10.5		9.9	14.2	16.5	416.4	43.1
14	40.0	30.8	34.1	48.5	35.5	22	24	26.8	31.4	41.4	34.1	8.0	9.9		8.0	10.2	404.7	45.2
15	38.5	26.6	31.2	48.5	14.5	23.6	27.5	29.6	29.9	44.6	35.2	8.0	14.2	8.0		7.9	413.7	44.6
16	38.0	29.5	32	48.5	35.9	18.1	22.5	29.5	32.1	42.5	35.2	8.0	16.5	10.2	7.9		406.4	46.5

将双向电泳图谱分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 9 个主区, 其中 A、B、C、D、E 5 个区蛋白斑点较多, 而 B、C、D、E、F 5 个区蛋白斑点清晰而稳定, 其它区斑点少而淡。3 个代表居群的主要区别表现在 A、B、C、E 4 个主区; 图 17、19 的示意图中 A、B 区所指示出的蛋白组分是广东乳源居群所没有的, 这可能是二倍体居群所特有的; 图 18 示意图中 E 区所指示斑点是两个二倍体

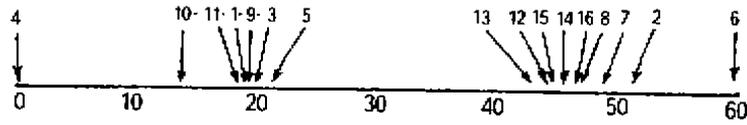


图 15 16 个居群 8 种同工酶谱平均距离在 x 轴上排序 (比例 1:15)  
 Fig. 15 Orderation of the 16 populations of *A. hookeri* in x axis by pattern of 8 kinds of isozymes

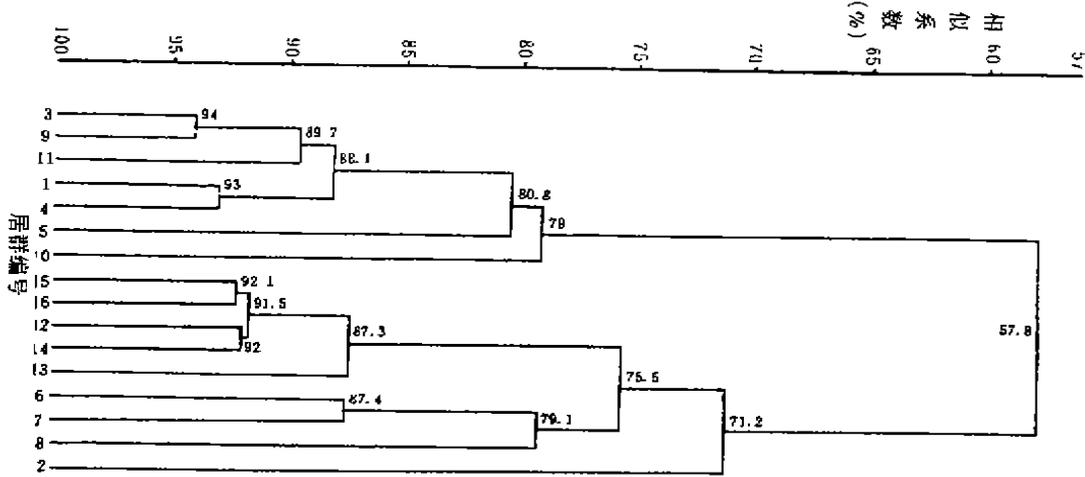


图 16 宽叶叶, 16 个居群同工酶谱带相似性类平均聚类分析树系图  
 Fig. 16 Dendrogram illustrating the relationships among the 16 populations of *A. hookeri*, number as in Table 1, based on the similarities of 8 kinds of isozymes

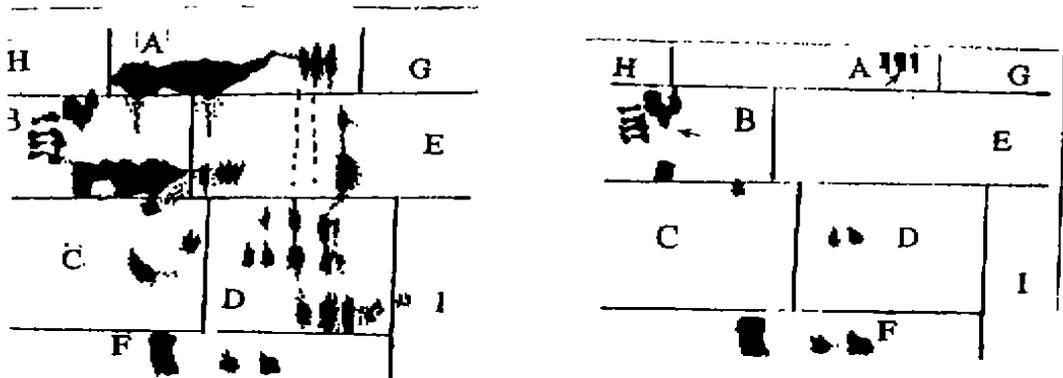


图 17 宝兴居群 (I) 可溶性蛋白双向电泳图谱  
 Fig. 17 IEF / SDS-PAGE pattern of the soluble proteins extracted from Baoxing population of *A. hookeri*

居群所没有而三倍体的广东乳源居群所有的; 图 18、19 的示意图中 C 区所指示的斑点又是冬季不倒苗居群所特有, 而宝兴居群 (I) 所没有; 其它区域中, 这 3 个居群同样存在明显差异, 如 F、D 区等。这些区别与表 10 中所包含的结果一致。由此可说明, 能反映出蛋白质成分和亚基组分差别的蛋

白质双向电泳可为种内分化研究提供重要的鉴定指标<sup>[25,26]</sup>。

图 17~19 还表明, 冬季不倒苗的这两个居群总的蛋白斑点明显多于冬季倒苗居群, 这反映出冬季不倒苗类型的蛋白组分复杂些, 相应的基因组也要复杂些。冬季不倒苗的两个居群的可溶蛋白图谱相似程度较大, 与冬季倒苗的宝兴居群相似程度较小, 这一结果也与同工酶酶谱分析的结果相符(图 7~14)。

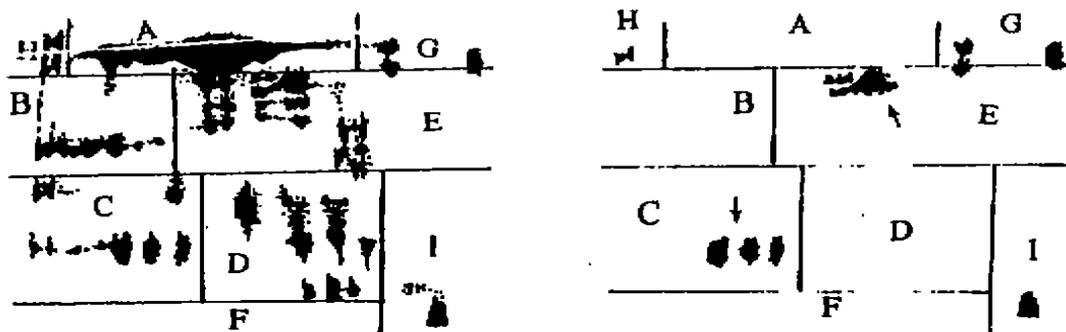


图 18 乳源居群可溶性蛋白双向电泳图谱  
Fig. 18 IEF / SDS-PAGE pattern of the soluble proteins extracted from Ruyuan population of *A. hookeri*

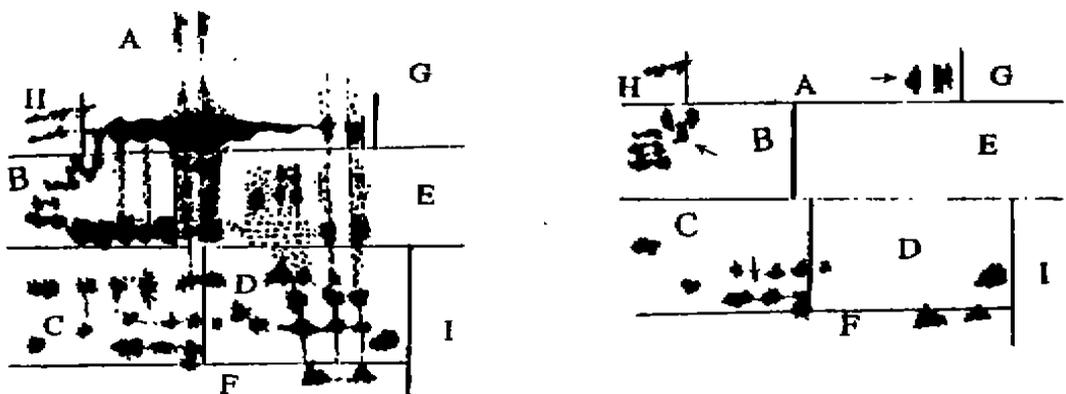


图 19 青神居群可溶性蛋白双向电泳图谱  
Fig. 19 IEF / SDS-PAGE pattern of the soluble proteins extracted from Qingshen population of *A. hookeri*

## 5 讨论

(1) 居群选择和酶的选择。四川大学植物园现有 16 个宽叶韭居群, 其中包括二倍体冬季不倒苗型、二倍体冬季倒苗型、三倍体冬季不倒苗型。我们根据居群形态差异较大、地理位置相差较远、以及生长特性和核型, 选择了 3 个代表性居群: 宝兴居群 (I) (2x, 冬季倒苗), 青神居群 (2x, 冬季不倒苗), 广西龙胜居群 (3x, 冬季不倒苗)。

根据植物生长时期不同同工酶的表达有差异, 我们选择了常用而可变程度较大的酯酶和过氧化物酶进行居群内植株间同工酶分析, 酯酶是植物生命活动旺盛期的重要酶类, 它的同工酶丰富并有特征

性谱带, 它能代表植物生理生化某一方面酶的表达程度。过氧化物酶是植物保护系统中的重要成员, 在植物的不同发育阶段都较丰富且稳定性好。

(2) 由实验结果可知, 各分析居群内不同同工酶谱在植株间的表现完全一致, 而且特征稳定。这是因为宽叶韭的有性生殖退化, 仅以无性生殖进行繁殖, 所以一个居群实为一个无性系, 个体间遗传特性一致。至于同一居群内个体间的 POX 和 EST 的 PAGE 图谱与不同居群间的 PAGE 图谱内的 POX 和 EST 图谱表现差异, 是因分别实验时间前后间隔了一年多, 同工酶的表达有时空差异, 所以在前后实验中, 此两种同工酶谱出现差异, 属正常现象。

(3) 就居群间而言, 根据相似性大小, 可将 16 个居群明显分为冬季倒苗和冬季不倒苗两大类 (图 16), 而且这两大类正好具有不同的生活习性, 宝兴 (I) 和 (II) 居群、峨眉脚盆坝居群、大理 (I)、(II) 和 (III) 居群、都江堰居群为冬季倒苗类群, 即到了冬季地上部分要枯萎死亡, 仅靠地下部分越冬, 次年春季出苗; 其余的所有居群则为冬季不倒苗类型, 即到了冬季地上部分不枯萎, 继续保持生活状态过冬。在冬季倒苗的类型中, 各居群间的相似系数大于 79%; 在冬季不倒苗的类型中, 各居群间的相似系数高于 70%。但是这两大类群间相似系数却只有 57%。在宽叶韭种内明显分化为两大类的这一事实, 说明宽叶韭种内确实发生了遗传性上的变异。

(4) 聚类结果与宽叶韭各居群的形态特征可相互印证。形态上, 冬季倒苗的各个居群都表现出叶片柔弱, 窄而短小, 叶片表面几乎不具光泽; 冬季不倒苗类型则植株表现高大, 叶宽、质地较硬, 叶表面具有一定光泽。

(5) 从物种的演化来看, 三倍体来源于二倍体。在适应性能上, 三倍体居群比二倍体居群具明显优势, 从我们引种栽培中可以看到, 在同一生境下, 三倍体植株生长势和分生能力明显大于二倍体植株。由于我们所研究的所有三倍体居群都属于冬季不倒苗类型, 又由于绝大部分葱属植物具有冬季休眠习性, 所以我们认为冬季不倒苗习性是后期出现的, 加上可溶性蛋白组分的双向电泳也反映出了冬季不倒苗类型的遗传基因要复杂些, 因此宽叶韭中冬季不倒苗类型是分化程度较高的类型。

(6) 宽叶韭这种行无性繁殖的植物, 其三倍体是由二倍体通过芽变产生的。现有的宽叶韭各居群都属于栽培类型, 在栽培上, 三倍体具有适应低海拔生境的生物学习性, 加上较好的农艺性状而被选留下来。在栽培过程中, 由于不同地区的土壤、气候等外界条件的差异, 也有助于宽叶韭的种内分化 (从图 16 中可以看出)。

(7) 采用“排序”方法所得到的结果与聚类分析所得结果基本一致, 宽叶韭的 16 个居群同样明确分成冬季倒苗和不倒苗两大类, 且两大类间酶谱 ( $R_f$ ) 在 x 轴上的间距远远大于每大类中各居群间的酶谱间距。冬季不倒苗类型是分化程度较大的类型。图 15 则显示出了各居群的分化程度大小, 沿 x 轴分化程度变大, 其中峨眉脚盆坝居群 (图 15 中的 4) 相对来说是分化程度最小的, 大飞水居群 (图 15 中的 6) 是分化程度最大的。就方法而言, “排序”方法和聚类方法均可达到定量比较水平, 从而避免片面性, 适用于植物种内分化的研究。

## 参 考 文 献

- 1 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志第十四卷. 北京: 科学出版社, 1980, 208
- 2 洪德元. 植物细胞分类学. 北京: 科学出版社, 1990, 76~87
- 3 晏一祥等. 葱属粗根组 5 种材料的核型研究. 植物分类学报, 1990, 28 (3): 177~184

- 4 Huang Rui-fu, xu Jie-mei *et al.* A study on karyotypes and their evolutionary trends in *Allium sect. Bromatorrhiza Ekhery* (Liliaceae). *Cathaya*, 1985, 7: 133~145
- 5 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996, 44~50
- 6 陈家宽, 杨 继. 植物进化生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 157~159
- 7 仇志军. 西瓜品种资源亲缘关系的同工酶分析. 湖南农学院学报, 1994, 20 (3): 222~227
- 8 方德秋等. 应用同工酶进行柑桔分类和进化研究. 植物分类学报, 1993, 31 (4): 329~352
- 9 包满珠等. 梅野生种与栽培品种的同工酶研究. 园艺学报, 1993, 20 (4): 375~378
- 10 陈志秀. 蜡梅17个品种过氧化物酶同工酶的研究. 植物研究, 1995, 15 (3): 403~411
- 11 苏应娟等. 湖北八角莲属植物过氧化物酶同工酶分析. 武汉植物学研究, 1994, 12 (1): 44~47
- 12 Fernandez J A *et al.* Biochemical variation to determine phylogenetic relationships between *Hordeum chilense* and other American species of the genus *Hordeum* (Poaceae). *Pl. Syst. Evol.*, 1987, 157: 105~119
- 13 Jerrold I D *et al.* Isozyme variation and species delimitation among diploid populations of the *Pennisetia nuttallina* complex (Poaceae): Character fixation and the discovery of phylogenetic species. *TAXON*, 1993, 42: 585~599
- 14 王芳平等. 葱属几个种的同工酶研究. 福建师范大学学报(自然), 1984, 2: 103~110
- 15 Haishima M *et al.* Isozyme polymorphism in native varieties of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *Japanese Journal of Breeding*, 1993, 43 (4): 537~547
- 16 逮斌等. 一种改良的植物蛋白双向电泳方法. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16 (6): 480~481
- 17 张龙翔等. 生物化学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981, 94~111
- 18 周本正. 实用电泳及免疫电泳技术. 武汉: 湖北科技出版社, 1988, 98~104
- 19 何忠效, 张树政. 电泳. 北京: 科学出版社, 1990, 155~161
- 20 梅百根. 蛋白质的双析凝胶电泳. 植物生理学通讯, 1983, (5): 52~54
- 21 Soltis D E & Soltis P S. Isozyme in Plant Biology. Portland OR: Dioscorides press, 1989, 16~33
- 22 胡能书等. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科技出版社, 1985, 70~85
- 23 江 洪等. 柏木属植物过氧化物酶同工酶的研究. 植物分类学报, 1986, 24 (4): 253~258
- 24 熊全沫. 同工酶电泳数据的分析及其在种群遗传上的应用. 遗传, 1986, 8 (1): 1~5
- 25 詹英贤等. 花生属栽培种与野生种的蛋白质亚基构成分析. 植物学报, 1991, 33 (4): 280~285
- 26 滕晓月等. 水稻广亲和与非广亲和品种蛋白质的比较研究. 作物学报, 1994, 20 (6): 739~745