

十种淫羊藿属植物的谷草转氨酶同工酶研究

宁丽丽, 陈庆富*

(贵州师范大学 生命科学院 植物遗传育种研究所, 贵阳 550001)

摘要: 用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对淫羊藿属植物 10 个种(含 7 个大花种和 3 个小花种)32 个幼叶样品的谷草转氨酶同工酶进行了研究。结果发现,谷草转氨酶同工酶酶带共 15 条。不同物种的酶带数为 2~15 条,不同植株的谱带数为 2~10 条。种间存在明显差异,可以作为物种鉴定的辅助依据。

关键词: 淫羊藿属; 谷草转氨酶同工酶; 系统关系

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)01-0107-04

Glutamate oxaloacetate transaminase isozyme in 10 species of genus *Epimedium*

NING Li-Li, CHEN Qing-Fu*

(Institute of Plant Genetics and Breeding, School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: The glutamate oxaloacetate transaminase isozyme in 32 young leaf samples of 10 species of *Epimedium*(including 7 species of the big-flower group and 3 species of the small-flower group)were studied by means of polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE). The results showed that 15 bands of glutamate oxaloacetate transaminase isozyme were discovered in all accessions, likewise, 2-15 bands in different species and 2-10 in different plant individuals, showing that zymographs among species were obviously different. Therefore, this could be an auxiliary evidence for the species identification.

Key words: *Epimedium*; glutamate oxaloacetate transaminase isozyme; phylogeny

淫羊藿(*Barrenwort*)为小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(*Epimedium*)(吴征镒, 1983), 多年生草本药用植物, 又名仙灵脾、羊合叶等。据报道, 国际上目前淫羊藿属植物物种有约 60 种(应俊生, 2001; Stearn, 2002; 何顺志等, 2003; 郭宝林等, 2007), 中国是淫羊藿属最主要的分布地区, 约占世界总数的 80% 以上。中国的淫羊藿种类约 50 种, 主要分布于贵州、四川、重庆、湖南、湖北等地区。这些地区是淫羊藿属植物的变异中心和多样性中心。

关于淫羊藿属植物分类学和系统关系等研究, 主要集中在形态学、化学成分组成及含量、DNA 多

态性等(郭宝林等, 1996; 何顺志等, 1997)。利用同工酶技术分析淫羊藿属植物的种间系统关系的报道很少, 而且只涉及少数淫羊藿属植物种类(Koga 等, 1991; 盛茂银等 2007), 而关于淫羊藿属植物的谷草转氨酶目前尚未见报道。同工酶技术可以用于研究植物种间系统关系(王艇等, 1996; Staub 等, 1997), 鉴定植物物种。由于淫羊藿属植物种类多而杂, 种类鉴别十分困难, 种间系统关系也很不清楚, 大多数种类的同工酶研究还是空白。本研究对淫羊藿属 10 个种进行谷草转氨酶同工酶的系统研究, 以便为该属植物的系统关系和种类鉴别提供依据。

收稿日期: 2010-04-12 修回日期: 2010-09-08

基金项目: 贵州省中药现代化专项(黔科合农字[2005]5052 号)[Supported by Traditional Chinese Medicine Modernization Project of Guizhou Province(2005-5052)]

作者简介: 宁丽丽(1984-), 女, 吉林长春市人, 硕士研究生, 主要从事植物遗传研究。

* 通讯作者: 陈庆富, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 长期从事荞麦、中国特有小麦等作物的遗传、进化与育种研究, E-mail: cqf1966@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

所有材料来源于贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所淫羊藿属植物种质资源库(表1)。共10个种19个收集系32个植株的幼叶样品。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 淫羊藿幼叶样品制备参照 Chen (2004)和张以忠(2008)的方法,并稍加改动。具体方法:取淫羊藿幼叶 0.15 g,加 0.15 g 石英砂,260 μL 双蒸水,冰浴研磨至匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液。

1.2.2 制胶及电泳 采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶技术,其涉及的参数及电泳方法参照胡能书等(1985)及王中仁(1996)的方法,并适当调整。分离胶总浓度为 7.5% (pH8.9) 和交联度为 2.6%,胶板为 20 cm $\times$ 12.5 cm $\times$ 0.23 cm,每槽加样约 70 μL ,上槽加 1 滴 1% 溴酚蓝,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行电泳,起始电压 100 V,2 h 后 200 V,待溴酚蓝指示线移至胶底 0.2 cm 时,终止电泳。

1.2.3 染色及记录 谷草转氨酶同工酶的染色与固定,参考 Chen 等(2004)、王中仁(1996)及毛盛兴(2000)等,并稍加改动。具体方法为:电泳完毕经双蒸水冲洗过的凝胶放入 0.1 mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中浸泡 10 min。倒出缓冲液,加入溶液(其配方为:25.5 mL pH7.5 的 0.2 mol/L 天冬氨酸钠盐、7.5 mL pH7.5 的 0.2 mol/L α -酮戊二酸、15 mL 0.1 mol/L 的硝酸钙、112 mL pH7.5 的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液和 3g 聚乙烯基吡咯烷酮),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 15 min。倒出溶液,用双蒸水冲洗凝胶,加入染色液(配方为:300 mg 固蓝 BB 盐充分溶解在 150 mL pH 7.5 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光保温 30 min,倒出染液,用自来水冲洗,拍照后放入 7% 的乙酸中保存。

2 结果与分析

对 32 份样品的谷草转氨酶同工酶进行分析,其中表现有差异的材料集中在同一块胶板上电泳(图1)。从图 1 看出,10 个种 32 个幼叶样品中合计共发现谷草转氨酶同工酶谱带 15 条。根据谱带的分

布,可分为 3 个区:快区(GOT13-15),中区(GOT6-12),慢区(GOT1-5)。

表 1 试验所用淫羊藿材料

Table 1 *Epimedium* accessions used in this study

序号 No.	种名 Species	植株 Plant	采集地 Origin	代号 Symbol
1	粗毛淫羊藿	ac3-3	贵州贵阳市	AC1
2	<i>E. acuminatum</i>	ac3-5	四川峨眉山	AC2
3		ac4-1	四川峨眉山	AC3
4		ac6-12	贵阳市花溪	AC4
5		ac9-1	贵阳市龙洞堡	AC5
6		ac10-2	贵阳市龙洞堡	AC6
7		ac10-3	贵阳市龙洞堡	AC7
8		ac11-3	贵阳市龙洞堡	AC8
9		ac13-5	贵阳市龙洞堡	AC9
10		ac13-9	贵阳市龙洞堡	AC10
11	无距淫羊藿	ec1-9	四川宝兴县	EC1
12	<i>E. ecalcaratum</i>	ec1-14	四川宝兴县	EC2
13		ec1-15	四川宝兴县	EC3
14		ec1-19	四川宝兴县	EC4
15	天平山淫羊藿 <i>E. myrianthum</i>	my4-5	贵州施秉县	MY
16	羽叶淫羊藿 <i>E. pinnatum</i>	pi1-4	德国慕尼黑	PI
17	时珍淫羊藿 <i>E. lishihchenii</i>	li5-2	四川茂县	LI
18	绿药淫羊藿	ch1-2	四川宝兴县	CH1
19	<i>E. chlorandrum</i>	ch1-13	四川宝兴县	CH2
20	柔毛淫羊藿	pubel-10	四川雅安市	PUBE1
21	<i>E. pubescens</i>	Pubel-19	四川雅安市	PUBE2
22		Pube2-2	四川雅安市	PUBE3
23	少花淫羊藿	pa1-2	四川汶川县	PA1
24	<i>E. pauciflorum</i>	Pa3-5	四川汶川县	PA2
25		Pa3-10	四川汶川县	PA3
26		pa3-13	四川汶川县	PA4
27	巫山淫羊藿	Wu1-1	贵州凯里	WU1
28	<i>E. wushanese</i>	Wu2-5	贵州凯里	WU2
29	普定淫羊藿	pul-5	贵阳市开阳县	PU1
30	<i>E. pudingense</i>	pul-6	贵阳市开阳县	PU2
31		pul-7	贵阳市开阳县	PU3
32		pul-8	贵阳市开阳县	PU4

2.1 淫羊藿属植物谷草转氨酶同工酶种内差异

本研究涉及淫羊藿属的 10 个种,种间存在显著的差异。不同淫羊藿种酶谱带数目为 2~10 条。谱带最多的是粗毛淫羊藿居群 AC1,谱带最少的是时珍淫羊藿 LI。粗毛淫羊藿有 7 个居群 10 个不同植株幼叶样品,个体谱带数目 5-10,居群间谱带存在差异,合计有 15 个谱带,即(GOT-1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15),分布于快、中、慢三个区。其中 GOT-2、9、10 为粗毛淫羊藿各植株都具有的谱带。另外, GOT-3、6、11、12 也是大多数粗毛淫羊藿植株所具有

的谱带。其它谱带在植株间存在多态性变异。

其它种类在种内不同居群间和不同植株间没有

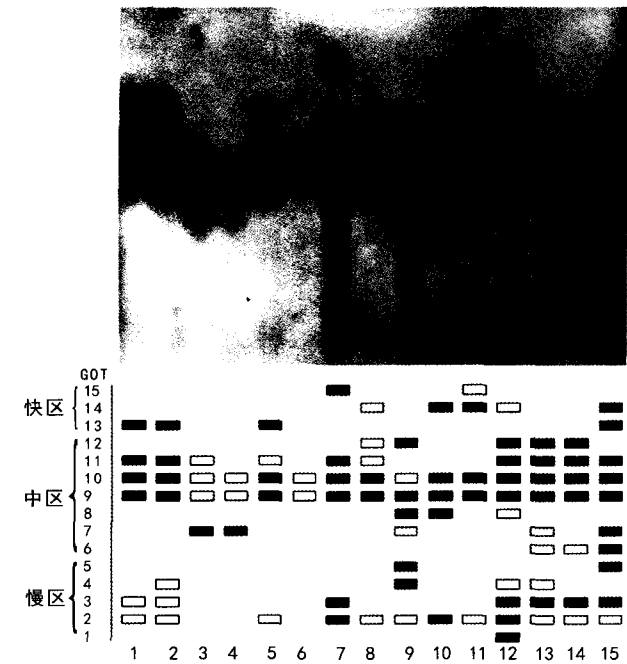


图 1 10 种淫羊藿属植物 GOT 酶电泳图(A)及其模式图(B) ■表示深带,□表示浅带。
Fig.1 Glutamate oxaloacetate transaminase isozyme enzyme electrophoretograms (A)and the schema chart(B) of 10 species of genus *Epimedium*. 1. PU2; 2. WU2; 3. PA1; 4. PUBE; 5. CH2; 6. LI; 7. PI; 8. MY; 9. EC1; 10. AC7; 11. AC5; 12. AC9; 13. AC4; 14. AC3; 15. AC1.

发现多态性变异。无距淫羊藿有 1 个居群 4 个不同植株,都有相同的 8 条谱带,分布于中、慢区。其中 GOT-2、4、5、8、9、10、12 是其主要谱带。天平山淫羊藿有 1 个居群 1 个植株样品,6 条谱带,分布于快、中、慢区。其中 GOT-9、10 是其主要谱带。羽叶淫羊藿有 1 个居群 1 个植株样品,6 条谱带,分布于快、中、慢区。其中 GOT-2、3、9、10、11、15 是其主要谱带。时珍淫羊藿有 1 个居群 1 个植株样品,谱带数最少,只有 2 条谱带,即 GOT-9、10,分布于中区,快区和慢区无带。绿药淫羊藿有 1 个居群 2 个植株样品,具有相同的酶谱,5 条谱带,即 GOT-2、9、10、11、13,分布于快、中、慢区。其中 GOT-9、10、13 为其主要谱带。柔毛淫羊藿有 2 个居群,分别有 2 个和 1 个植株样品,有相同的酶谱。它们都有 3 条谱带,即 GOT-7、9、10,其中 GOT-7 为其主要谱带。谱带只分布于中区,快区和慢区都无带。少花淫羊藿有 2 个居群,分别有 1 个和 3 个植株样品,彼此酶谱上无差异。它们都有 4 条谱带,即 GOT-7、9、10、11,其中 GOT-7 为主要谱带。谱带只分布于中区,快区和慢区都无带。巫山淫羊藿有 2 个居群各 1 个植株样品,彼此酶谱上无差异。它们都有 7 条谱带,即 GOT-2、3、4、9、10、11、13,分布于快、中、慢区。其中 GOT-9、10、11、13 为其主要谱带。普定淫羊藿有 1 个居群 4 个植株样品,彼此酶谱无差异,共有 6 条谱带,即 GOT-2、3、9、10、11、13,分布于快、中、慢区。其中 GOT-9、10、11、13 为其主要谱带。

表 2 不同淫羊藿种类谷草转氨酶同工酶谱带特征
Table 2 The characteristics of glutamate oxaloacetate transaminase isozyme bands of different species of *Epimedium*

种类 Species	PU	WU	PA	PUBE	CH	LI	PI	MY	EC	AC
类群 Group	S	B	B	S	B	B	B	S	B	B
谱带总数 Band number	6	7	4	3	5	2	6	6	8	15
快区谱带数 Band number in fast region	1	1	0	0	1	0	1	1	0	3
慢区谱带数 Band number in slow region	2	3	0	0	1	0	2	1	3	5
中区谱带数 Band number in middle region	3	3	4	3	3	2	3	4	5	7
特征谱带 Special band	GOT-2,3,13	GOT-2,4,13	GOT-7,11	GOT-7	GOT-2,11,13	—	GOT-2,11,15	GOT-2,11,12,14	GOT-2,4,5,7,8,12	GOT-2,9,10

注: B, 为大花类群; S, 为小花类群 Note: B, big-flower group; S, small-flower group.

2.2 淫羊藿属植物谷草转氨酶同工酶种间差异

比较不同淫羊藿种类之间谷草转氨酶同工酶谱带的差异,可以看出不同种类有自己的特征谱带和区别特征(表 2)。其中,以粗毛淫羊藿谱带最多、多态性最丰富,涵盖所有不同淫羊藿谱带。而时珍淫羊藿谱带最少,仅 2 条。

根据谱带数量和位置的情况,可以将供试淫羊藿种类分为 3 个类型:类型 I:慢区和快区无带,中区有带,但无 GOT-7 谱带,谱带总数很少,少于 5 个。包括时珍淫羊藿。类型 II:慢区和快区无带,中区有带,有 GOT-7 谱带,谱带总数很少,少于 5 个。包括少花淫羊藿、柔毛淫羊藿。类型 III:快区、慢区、中

区一般都有带,谱带总数较多,多于5个。包括其它种类,即天平山淫羊藿、粗毛淫羊藿、普定淫羊藿、巫山淫羊藿、绿药淫羊藿、羽叶淫羊藿、无距淫羊藿。

3 讨论

本文首次对淫羊藿属植物进行谷草转氨酶同工酶研究,发现不同淫羊藿物种的谱带数可以从2~15条,种间差异非常明显,不同物种均有自己独特的谱带特征。淫羊藿属植物全球合计约60种类,中国有50种5变种(陈谦海等,2004)。本研究发现谷草转氨酶同工酶谱带具有明显的种间差异,可以作为淫羊藿物种鉴定的依据。值得注意的是,大花种类和小花种类的谷草转氨酶同工酶谱带在分布上没有明显差异,这与将淫羊藿属植物分为大花类和小花类的分类学处理不一致。Stearn(2002)的研究表明,无距淫羊藿(中花)是原始类型,分别向大花和小花方向进行进化。本研究发现无距淫羊藿谷草转氨酶同工酶谱带丰富,达8条,仅次于广布种类粗毛淫羊藿,而且其谱带分布特点与大多数的淫羊藿种类一致。该结果与上述进化假说不矛盾。

参考文献:

- 王中仁. 1996. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社: 96—97
- 毛盛兴, 向华. 2000. 同工酶遗传学引论[M]. 北京: 首都师范大学出版社: 66—67
- 吴征镒. 1983. 西藏植物志(第1卷)[M]. 北京: 科学出版社: 604—605
- 陈谦海. 2004. 贵州植物志(第10卷)[M]. 贵阳: 贵州人民出版社: 57—71
- 胡能书, 万贤国. 1985. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社: 70—74
- Chen QF, Hsiao SLK, Zeller FJ. 2004. A study of cytology, isozyme and interspecific hybridization on the big-achene group of buckwheat species (*Fagopyrum*, Polygonaceae)[J]. *Crop Sci*, 44: 1511—1518
- Guo BL(郭宝林), Xiao PG(肖培根), et al. 2007. Two new species of *Epimedium*(Berberidaceae) from China(中国淫羊藿属(小檗科)二新种)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 45(6): 813—821
- Guo BL(郭宝林), Yu JG(余竞光), Xiao PG(肖培根). 1996. Study of chemical constituents of *Epimedium*(淫羊藿化学成分的研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 21(5): 290—292
- Guo BL(郭宝林), Xiao PG(肖培根). 1996. The analysis of the flavanone class of *Epimedium* produced in Sichuan(四川产淫羊藿属植物的黄酮类成分分析)[J]. *West China J Pharm Sci*(华西药理学杂志), 11(2): 75—77
- He SZ(何顺志), Guo BL(郭宝林). 1997. Observation on pollen morphology of medicinal *Epimedium* plants in Guizhou Province by SEM(贵州产淫羊藿属药用植物花粉形态的扫描电镜观察)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 22(5): 268—270
- Koga S, Shoyama Y, Nishioka I. 1991. Studies on *Epimedium* species: flavonol glycosides and isozymes[J]. *Biochemical Systematics Ecol*, 19(4): 315—318
- Li GQ(李国强), Wang ZT(王峥涛), Ling XB(李晓波), et al. 2001. 菝葜属植物的同工酶分析及其系统学意义[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境), 10(4): 22—28
- Liang GY(梁光义), Cao PX(曹佩雪), He SZ(何顺志), et al. 2006. Chemical constituents of *Epimedium dewuense*(德务淫羊藿的化学成分研究)[J]. *Chin J Appl Environ*(应用与环境生物学报), 12(1): 34—35
- Qiao CZ(乔传卓), Cui X(崔熙). 1984. 菝葜和欧洲菝葜的鉴别研究[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 22(3): 237—242
- Sheng MY(盛茂银), Cheng QF(陈庆富). 2007. The POD isozyme analysis of six *Epimedium* species native to Guizhou, China(6个黔产淫羊藿属植物的过氧化物酶同工酶分析)[J]. *J Guizhou Normal Univ: Nat Sci Edi*(贵州师范大学学报·自然科学版), 25(1): 5—8
- Staub JE. 1997. Attempts at colchicine doubling of an interspecific hybrid of *Cucumis sativus* XC *hystrix*[J]. *Cucurbit Genet Coop Rpt*, 20: 24—26
- Stearn WT. 2002. The genus *Epimedium* and other herbaceous Berberidaceae including the genus *Podophyllum*[M]. Incorporated: Timber Press
- Wang T(王艇), Wang YJ(王应娟). 1996. 部分裸子植物的五种同工酶分析[J]. *J Sun Yat-Sen Univ: Med Sci Edi*(中山大学学报·医学版), 35(6): 122—124
- Xu WF(徐文芬), He SZ(何顺志). 2005. Species and geographic distribution of large-flowered taxa of *Epimedium* in China(中国淫羊藿大花类群的种类与地理分布)[J]. *J Guiyang Coll Trad Chin Med*(贵阳中医学院学报), 4(28): 267—271
- Ying JS(应俊生). 2002. Petal evolution and distribution patterns of *Epimedium*(Berberidaceae)(淫羊藿属(小檗科)花瓣的演化 and 地理分布格局的研究)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 40(6): 481—489
- Zhang YZ(张以忠), Cheng QF(陈庆富). 2008. Study of glutamate oxaloacetate transaminase isozyme on resources of genus *Fagopyrum*(荞麦属种质资源的谷草转氨酶同工酶研究)[J]. *Seed*(种子), 27(5): 39—42, 46