

# POD、PPO 指纹图谱在芸薹属蔬菜分类上的研究\*

周 荣, 任吉君, 王 艳  
(佛山科学技术学院园艺系, 广东 佛山 528231)

**摘 要:** 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对芸薹属 21 个品种根 POD 同工酶和 PPO 同工酶进行了研究, 并用类平均法 (UPGMA) 进行了聚类分析。结果表明: 大白菜、小白菜、菜心、油菜、壬生菜、京水菜、芜菁属于芸薹种下的亚种或变种, 结球甘蓝、紫甘蓝、抱子甘蓝、羽衣甘蓝、花椰菜、青花菜、紫花菜、苕蓝、芥蓝属于甘蓝种下的亚种或变种, 雪里蕻、结球芥菜属于芥菜种下的变种。从蛋白质分子水平上分析了芸薹属三大类蔬菜的亲缘关系, 并确定了特征指纹图谱。

**关键词:** 芸薹属; 同工酶; 指纹图谱; 聚类分析

**中图分类号:** Q949.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2010) 04-0106-05

## Taxonomy Study by Fingerprint of POD and PPO Isozymes in *Brassica* Vegetables

ZHOU Rong, REN Jijun, WANG Yan

(Department of Horticulture, Foshan University, Foshan 528231, China)

**Abstract:** Peroxidase (POD) isozyme and polyphenol oxidase (PPO) isozyme in the roots of 21 *Brassica* cultivars were studied by the technology of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis, and cluster analysis was made using UPGMA method. The results showed that Chinese cabbage, pakchoi, flowering Chinese cabbage and turnip were classified into subspecies or varieties of *Brassica campestris* L. Cabbage, purple cabbage, brussels sprouts, kale, cauliflower, broccoli, purple cauliflower, kohlrabi and Chinese kale were classified into subspecies or varieties of *B. oleracea* L. Leaf mustard and head mustard were classified into subspecies or varieties of *B. juncea* Coss. The genetic relationship of 3 groups of *Brassica* vegetables was analyzed at the protein molecule level and the isozyme fingerprint identifying them was determined.

**Key words:** *Brassica*; isozyme; fingerprint; cluster analysis

迄今为止芸薹属 *Brassica* 蔬菜的白菜 *B. campestris* L. 类 ( $2n = 2x = 20$ , AA)、甘蓝 *B. oleracea* L. 类 ( $2n = 2x = 18$ , CC)、芥菜 *B. juncea* Coss. 类, ( $2n = 4x = 36$ , AABB)、水菜 *B. japonica* Sieb. 类, ( $2n = 2x = 20$ , 染色体组不详)、芜菁 *B. campestris* L. ssp. *rapifera* Metz., ( $2n = 2x = 20$ , AA)、芥蓝 *B. oleracea* L. var. *alboglabra* (Bailey) Sun ( $2n = 2x = 18$ , 染色体组不详) 根据其形态学

所进行的分类, 一直存有争议。这种根据植株表现型所进行的分类难免存在一定的局限性。

同工酶作为“生化指纹”已广泛应用于研究蔬菜的起源、分类、杂种优势育种及品种纯度检验等领域<sup>[1]</sup>。但以往芸薹属种间亲缘关系鉴定、分类多采用酶谱较复杂的过氧化物酶 (POD)<sup>[2-4]</sup>, 选用的器官多为种子、幼叶、幼苗、花蕾, 并且大多只是利用 POD 分析芸薹、甘蓝、芥菜各个种内

\* 收稿日期: 2009-11-24

基金项目: 广东省农业重大攻关资助项目 (2003B21210)

作者简介: 周荣 (1966年生), 女, 副教授; E-mail: zrfstyl@163.com

变种或品种间的亲缘关系。对于从国外新引入的水菜类蔬菜<sup>[5]</sup>、芜菁, 或者利用根 POD, 以及利用多酚氧化酶 (PPO) 对芸薹属蔬菜进行亲缘关系鉴定、分类在国内外尚未见到报道。

为了在蛋白质分子水平上揭示芸薹属栽培种间的亲缘关系、分类地位及品种鉴定, 作者对芸薹属各类别 21 个品种的 POD 和 PPO 进行了酶谱分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

A 白圆一号小芜菁、B 丰抗 60 大白菜、C 矮脚黑叶白菜、D 矮脚大头清江白菜、E 南丰 45 天油青菜心、F 东莞白沙 80 天油青菜心、G 白茎千筋京水菜、H 丸叶壬生菜、I 雪里蕻、J 大坪埔大肉包心芥菜、K 早红紫甘蓝、L 京丰一号结球甘蓝、M 抱甘一号抱子甘蓝、N 羽衣甘蓝、O 兴利菜花王、P 六铃青花菜、Q 紫花菜、R 天津苕蓝、S 紫苕蓝、T 南海迟花芥蓝、U 南海中花尖叶芥蓝。

### 1.2 试验方法

1.2.1 育苗 珍珠岩育苗, 园试配方<sup>[5]</sup>。2 叶期取样。

1.2.2 酶液制备 称取 0.5 g 根或叶置于预冷的研钵 (4 ℃) 中, 加入少量预冷 (4 ℃) 0.05 mol · L<sup>-1</sup>, pH8 的磷酸缓冲液 (Tris-HCl), 研磨, 匀浆并定容至 6 mL, 于 13 000 r · min<sup>-1</sup> 下离心 10 min, 吸取上清液, 加入 1/4 体积的 ρ = 20 % 甘油, 摇匀作酶液, 于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 电泳及染色 POD、PPO 同工酶分离参照胡能书等人的方法<sup>[6]</sup>, 染色参照薛俊杰等人的方法<sup>[7]</sup>。计算迁移率, 并照相。

### 1.3 统计分析

利用 DPS5.0 统计软件计算欧氏距离  $d_{ij} =$

$$\sqrt{\sum_{k=1}^m (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

, 采用类平均法 (UPGMA) 构建聚类图。

## 2 结果分析

### 2.1 不同品种 POD 酶谱特征

2.1.1 根 POD 同工酶谱 芸薹属不同品种根共分离出 10 条 POD 酶带, 见图 1、表 1。酶带依次命名为 e1 ~ e10。A、B、C 和 D、E 和 F 的共有酶带是 e2、e3、e9, I、J 共有酶带为 e1、e2、e3、e5、e6、e7, K、L、M、N、O、P、Q、R、S 的共有酶带是 e1、e2、e8, T、U 的共有酶带是 e1、e2、e5、e8, G 和 H 共有酶带为 e1、e2、e3、e9。从

图 1 可见 e2、e5、e6、e8 分离清晰, 活性高。e2 可视为芸薹属各品种根所共有的特征酶带。



图 1 不同品种根 POD 同工酶电泳图

Fig. 1 POD zymograms in roots of the cultivars

表 1 不同品种根 POD 同工酶酶带

Table 1 POD isozymes in roots of the cultivars

酶带	R <sub>f</sub> 值	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
e1	0.139	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e2	0.190	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e3	0.241	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
e4	0.253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
e5	0.304	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
e6	0.342	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
e7	0.424	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
e8	0.430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e9	0.450	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
e10	0.470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: “+” 表示酶带出现, “-” 表示酶带不出现, 下同。

Note: “+” showed that the enzyme band appeared in cultivars, “-” didn't. the same as follows.

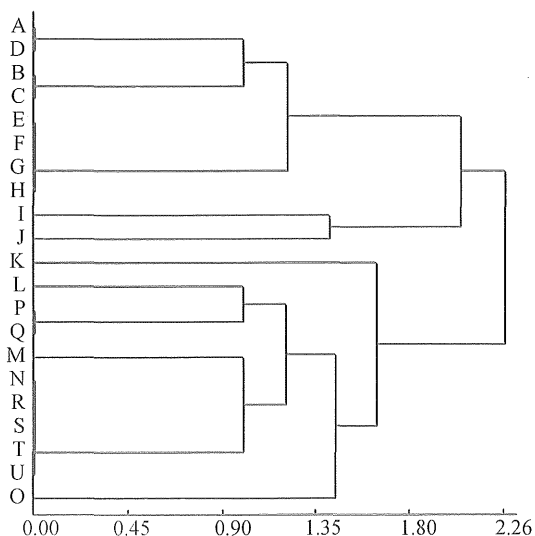


图 2 不同品种根 POD 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of POD in roots of the cultivars

根 POD 聚类结果见图 2。取欧氏距离  $d = 1.64$ , 可将芸薹属 21 个品种分成 3 大类。

I 类: 在  $d = 1.20$  水平上 A、B、C、D、E、



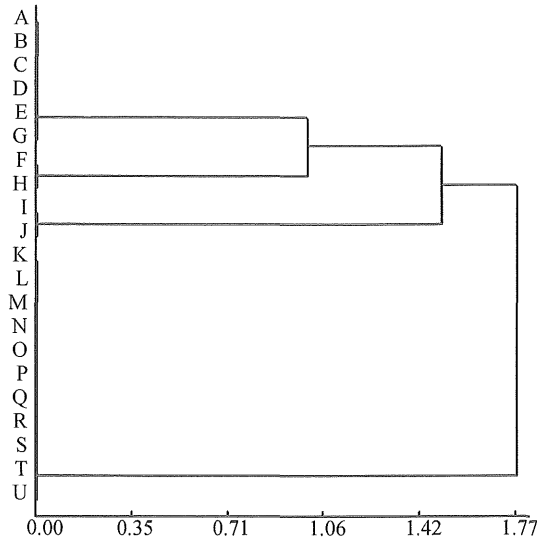


图 6 不同品种根 PPO 聚类图

Fig. 6 Dendrogram of PPO isozyme in roots of the cultivars

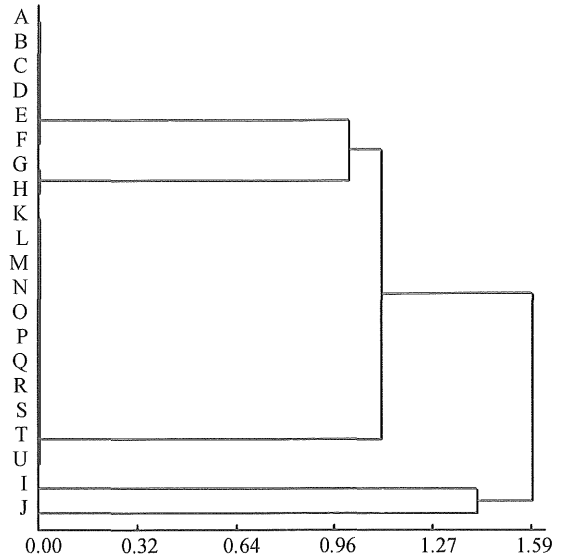


图 8 不同品种叶 PPO 聚类图

Fig. 8 Dendrogram of PPO isozyme in leaves of the cultivars

2.2.2 叶 PPO 同工酶图谱 由图 7 可知, 21 个品种叶共分离出 5 条 PPO 同工酶带。酶带依次命名为 E'1 ~ E'5, 则 E'2 为各品种叶所共有的特征酶带, 而 e'3 可视为芥菜类品种叶独有的特征酶带。A、B、C、D、E、F 一样, 具有拖尾酶带 E'2; G、H 具有拖尾 E'2 和活性稍弱的 E'4 共 2 条酶带; I、J 共有酶带是 E'2 和 E'3; K、L、M、N、O、P、Q、R、S 的共有酶带是活性较强的 E'1、E'2, 而 T、U 的共有酶带是弱酶 e'1 和活性较强的 E'2。

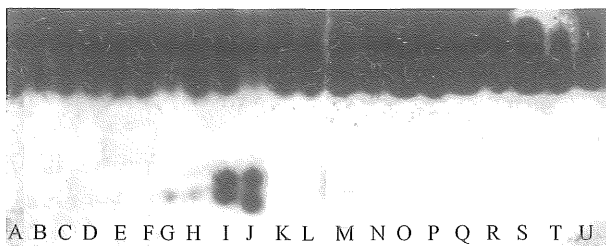


图 7 不同品种叶 PPO 同工酶电泳图

Fig. 7 PPO zymograms in leaves of the cultivars

表 4 不同品种叶 PPO 同工酶带

Table 4 PPO isozymes in leaves of the cultivars

酶带	Rf 值	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
E'1	0.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E'2	0.212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E'3	0.494	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E'4	0.537	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E'5	0.562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

叶 PPO 聚类结果见图 8。A 与 B、C、D、E、F 亲缘关系最近 (d=0), G 与 H 的亲缘关系最近 (d=0)。在 d=1.00 水平上芜菁、大白菜、小白菜、菜心、京水菜、壬生菜聚为一类, 该类蔬菜在 d=1.10 水平上同 K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U 聚为一类, 在 d=1.59 水平上再与 I、J 聚为一类。

### 3 讨论

#### 3.1 根和叶 POD、PPO 同工酶谱用于芸薹属分类的可行性

根 POD、PPO 聚类分析和叶 PPO 同工酶聚类分析结果表明: 供试的 21 个品种隶属于芸薹属白菜类、甘蓝类和芥菜类。白菜类的大白菜 B、小白菜 C、油菜 D、菜心 E 和 F 亲缘关系极其接近, 此结果与传统的形态学分类相吻合, 可以认为大白菜、小白菜、菜心、油菜皆为中国白菜种下的变种。芜菁 A、京水菜 G、壬生菜 H 的 POD、PPO 同工酶与白菜类的 B、C、D、E、F 极为相近, 因此, 将芜菁、京水菜、壬生菜归为白菜类是合理的。实验结果支持曹家树、曹寿椿提出的将中国白菜、日本水菜和芜菁作为芸薹种的三个亚种, 结球白菜列为中国白菜 (小白菜) 亚种下的一个变种即 *B. campestris* ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *pekinensis* (Rupr) Sun<sup>[8-9]</sup> 这个建议, 水菜为 *B. campestris* L. ssp. *japonica* (Sieb.) Hort.。

芥蓝的 T、U 与甘蓝类的紫甘蓝 K、结球甘蓝 L、抱子甘蓝 M、羽衣甘蓝 N、花椰菜 O、青花菜 P、紫花菜 Q、苜蓝 R 和紫苜蓝 S 的 POD、PPO 同工酶生化指纹极为接近, 欧氏距离  $d=0$ 。由于它们的染色体数相同, 同时, 芥蓝与结球甘蓝、花椰菜存在高达 90% 以上的杂交率<sup>[10]</sup>, 因此, 宜将芥蓝归为甘蓝类, 其学名定为 *B. oleracea* L. var. *alboglabra* (Bailey) Sun 是合理的, 亦与王晓蕙的结果相吻合<sup>[11-12]</sup>。

叶 POD 同工酶聚类分析将已知的白菜类、甘蓝类和芥菜类聚类到一起, 显然不能利用叶 POD 进行芸薹属种间分类。

与 POD 同工酶谱相比, 采用 PPO 同工酶谱分析芸薹属种间亲缘关系具有更为简单、直观、准确、方便等优点; 另外, 与 AFLP、PAPD 等分子标记技术相比, 具有对设备要求不高, 容易操作、成本低廉等优势。

### 3.2 芸薹属不同种蔬菜 POD、PPO 特征酶带

根 POD 酶带中的 e2 可视为芸薹属各品种根所共有的特征酶带, 根 PPO 酶带中 E2 可视为芸薹属各品种根所共有的特征酶带, 而 E4、E5 可视为芥菜类根的特有酶带, E6 可视为甘蓝类根独有的特征酶带。叶 POD 酶带中 E'5 可视为芥菜类叶的特有酶带, 叶 PPO 酶带中 E'2 为芸薹属各品种叶的共有特征酶带, 而 E'3 可视为芥菜类叶独有的特征酶带。

### 参考文献:

- [1] 刘华, 贾继增. 指纹图谱在作物品种鉴定中的应用[J]. 作物品种资源, 1997(2): 45-48.
- [2] 张彦萍, 刘海河, 马德伟. 蔬菜同工酶研究现状及存在问题[J]. 中国蔬菜, 1997(3): 46-50.
- [3] 周长久. 几种十字花科蔬菜的同工酶研究[J]. 北京农业大学学报, 1980(1): 69-73.
- [4] 罗美中, 贾士荣. 几种结球甘蓝过氧化物酶同工酶的某些生化和遗传特性[J]. 园艺学报, 1988, 2(1): 45-49.
- [5] 野菜园艺大事典编纂委员会. 野菜园艺大事典[M]. 东京: 株式会社养贤堂, 1977: 1229-1232.
- [6] 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: 171-180.
- [7] 薛俊杰, 张震云, 弓春瑞, 等. 几种木本豆科植物过氧化物酶和多酚氧化酶同工酶研究[J]. 山西农业大学学报, 2000, 20(1): 55-58.
- [8] 曹家树, 曹寿椿. 中国白菜与同属其它类群种皮形态的比较和分类[J]. 浙江农业大学学报, 1994, 20(4): 393-399.
- [9] 陈云鹏, 曹家树, 缪颖, 等. 芸薹类蔬菜基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2000, 26(2): 131-136.
- [10] 刘海涛, 关佩聪. 芥蓝的分类学研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 82-86.
- [11] 王晓蕙, 罗鹏. 芥蓝和结球甘蓝染色体组型及 C 带带型的研究[J]. 植物学报, 1987, 29(2): 149-155.
- [12] YARNELL S H. Cytogenetics of the vegetable crops. II Crucifers[J]. Bot Rev, 1956, 22(2): 81-166.