

不同类型大豆同工酶的研究*

张维民 苗以农 徐 豹

(东北师范大学生物系)

(吉林省农科院大豆所)

摘 要

本文用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳方法对不同纬度的野生、半野生及栽培大豆的苹果酸脱氢酶、酸性磷酸酯酶同工酶进行了研究,提出大豆同工酶模式酶谱。*G. soja*亚属大豆苹果酸脱氢酶共有6条酶带,酸性磷酸酯酶共有12条酶带。所有材料都出现苹果酸脱氢酶IV带,反映了遗传的同源性,并可作为*G. soja*亚属大豆的共巨酶带。种间酶带出现频率和相对含量分析表明,半野生大豆处于野生大豆和栽培大豆中间,栽培大豆系由野生大豆经过中间类型进化而来。在进化过程中既有原酶带缺失又有新酶带产生,苹果酸脱氢酶IV带,酸性磷酸酯酶VII、VIII、IX带平均相对含量在30°N—35°N最高,说明与地理分布有关。

同工酶谱分析是认识基因表达的生化指标,广泛应用于研究植物起源、进化、分类、遗传突变、遗传育种和基因定位等。从60年代始国外就开展了大豆同工酶的研究^(1,2,3)。Kiang和Gorman⁽⁴⁾发现不同组织中有6条酸性磷酸酯酶带,而且与不同发育时期有关。虞京蕙等⁽⁵⁾、郝恩虎⁽⁷⁾、邹淑华等⁽⁸⁾、李云荫等⁽⁹⁾在大豆同工酶研究方面做了不少工作。我国野生和半野生大豆资源丰富,如将这些野生和半野生大豆与栽培大豆同步进行同工酶分析,将为大豆生态、起源、进化、分类及理论研究提供有用资料。我们对我国不同纬度的野生大豆、半野生大豆和栽培大豆的苹果酸脱氢酶、酸性磷酸酯酶同工酶的分析结果如下:

材 料 和 方 法

供试材料为我国25°N、30°N、35°N、40°N、45°N、50°N的野生大豆(*G. soja*)、半野生大豆(*G. gracilis*)、栽培大豆(*G. max*),共18份,全部由吉林省农科院大豆研究所提供(见表1)。

表1 材料和原产地

类型	纬度					
	25°N	30°N	35°N	40°N	45°N	50°N
W	JW24	JW174	JW14	JW183	JW17	JW36
原产地	广东	浙江	河南	辽宁	吉林	黑龙江
SW	JW2	JW89	JW227	JW618	JW853	JW22
原产地	广西	浙江	河南	辽宁	吉林	黑龙江
C	C12	C10	C7	C4	C2	C1
原产地	广东	湖北	河南	山西	吉林	黑龙江

一、酶液制备

将大豆种子用清水洗净,于25℃恒温温箱中萌发72小时。取下胚轴,用滤纸吸干后称取50毫克,置于事先冰冻的玻璃研钵中,加0.2M Tris—HCl (pH8.0)样品提取液1mL(内含20%蔗糖),冰浴中研磨成匀浆,台式冷冻离心机(TGLL—18)中4℃,5000rpm离心10分钟,取上清液置于冰箱中备用。

*本文得到辽宁师范大学生物系姚南瑜教授、李建之副教授、姚民昌老师的大力支持和帮助,在此表示谢意。本项目受国家自然科学基金资助。

二、电泳分离

聚丙烯酰胺凝胶平板电泳采取碱性pH不连续缓冲系统。分离胶浓度为7.2%，交联度为2.6%，缓冲系统为Tris—HCl (pH8.9)。浓缩胶浓度为3.1%，交联度为20%，缓冲系统为Tris—HCl (pH6.7)。溴酚蓝为前沿指示剂，电极缓冲液为Tris—Gly (pH 8.3)系统。稳压稳流电泳仪 (DYY—IV型) 稳压在150伏，4—6℃冰箱中电泳约5小时，待指示剂距前沿2 cm时停止电泳。

三、同工酶染色

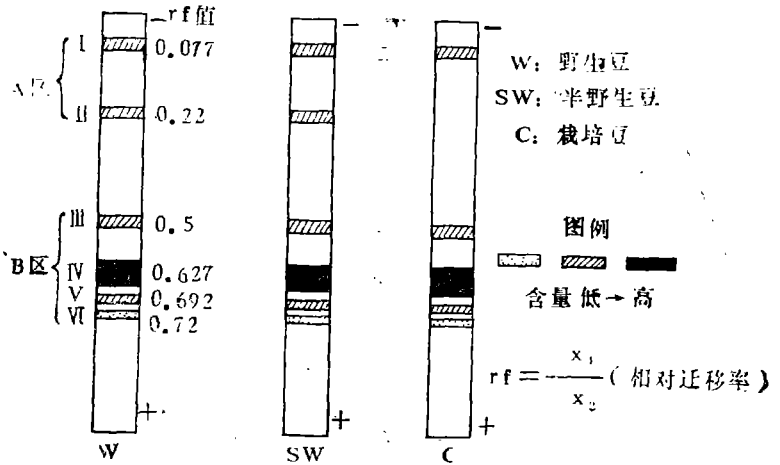
苹果酸脱氢酶按Sicilano法^[10]，暗中染色30分钟。酸性磷酸酯酶按袁晓华法^[11]，醋酸缓冲液由pH4.0改为pH4.7，染色30分钟。染色完毕，用7%冰醋酸固定脱色，制成干板并用光密度扫描仪 (DGS—型电泳光密度扫描仪) 扫描记录，用积分笔所走的格数为酶的相对含量。

结果与分析

一、苹果酸脱氢酶同工酶

(一) 模式酶带

对不同纬度的野生、半野生和栽培大豆同工酶分析结果表明，G. soja 亚属大豆共有6条酶带，按相对迁移大小分为两区。A区只有I、II带，相对迁移率较小分别为0.077、0.22。B区包括III、IV、V、VI带，迁移率分别为0.5、0.627、0.692、0.72。其中I、III、IV、V、VI带在各种类型大豆中均有出现，而II带仅为野生和半野生大豆共有，栽培大豆中无此酶带存在，因此可视为野生和半野生大豆的标志酶带 (图1)。



X_1 分离胶起点到酶带中心距离； X_2 分离胶起点到前沿指示剂中心距离

图1 大豆苹果酸脱氢酶同工酶模式酶谱

(二) 不同材料中同工酶带

1. 不同类型大豆的同工酶

(1) 频率：I、IV带在野生、半野生和栽培大豆中出现频率相同，但IV带频率为100%，是大豆的基本酶带。野生和半野生大豆II带相等，栽培大豆缺失。V带在野生、半野生大豆中频率相同，但小于栽培大豆。

(2) 相对含量: IV带平均含量最高, VI带最低, 野生半野生大豆II带含量相等。I带相对含量从野生到栽培大豆降低, 而V、VI带却增加。值得注意的是除I、II带外, 栽培大豆的III—VI带相对含量最高(表2)。

表2 各种大豆不同酶带平均相对含量

带型号 类型	I	II	III	IV	V	VI
W	64.0	22	38.0	126.3	16.00	8
SW	23.0	22	33.5	96.5	18.00	8
C	22.5	0	64.0	175.5	26.75	16

注: W—野生大豆 SW—半野生大豆 C—栽培大豆

2. 不同纬度大豆的同工酶

(1) 频率: 各纬度大豆均有IV带出现, 频率为100%。III带在35°N和30°N最高, 南北都低。II带仅存在于南方, 35°N以北未观察到此酶带。

(2) 相对含量: IV带平均含量为132.8, 居其它带首位, 而含量最高的在35°N, 最低的在25°N。I、V带相对含量以30°N最高, 南北低。总酶相对含量以35°N最高, 30°N次之(表3)。

表3 不同纬度各酶带平均相对含量

带型号 纬度	I	II	III	IV	V	VI
25°N	29.00	22	40.0	86.3	24.67	10.3
30°N	55.45	0	33.5	162.7	32.00	0
35°N	0	22	42.0	224.0	19.00	0
40°N	23.00	0	19.0	90.7	0	0
45°N	0	0	64.0	125.3	16.00	0
50°N	48.00	0	0	107.7	0	9.0

表4 不同纬度各种类型大豆同工酶带

大豆类型 纬度	W	SW	C
25°N	IV、V、VI	I、II、V、V、V	I、IV、V、VI
30°N	I、II、IV	I、II、IV	IV、V
35°N	I、II、IV	II、IV	IV、V
40°N	IV	I、II、IV	IV
45°N	IV	IV	II、IV、V
50°N	I、IV	IV、VI	I、IV

(一) 模式酶谱

酸性磷酸酯酶同工酶共有12条带, I、III、VI、XI、XII带为各种类型大豆共有, VI带为

由此可见, 不同类型大豆具有共性酶带IV, 相对含量也最高, 是G. Soja亚属的基本带和主带, 反映了遗传上的共同性。V带出现频率和相对含量均为野生、半野生大豆小于栽培大豆, 说明在进化过程中有增加的趋势, 而I带虽然出现频率相同, 相对含量却从野生大豆到栽培大豆逐渐减少。

(3) 酶带数: 各种类型大豆酶带数的地理变化趋势不同, 野生和半野生大豆从南向北减少, 而栽培大豆中纬度地区(30—40°N)酶带少, 南北较多。从25°N—30°N酶谱可以看出, 同一纬度野生、半野生酶谱比较相似, 与栽培大豆差别大, 可能与半野生大豆和野生大豆亲缘关系近有关(表4)。G. soja亚属的野生、半野生和栽培大豆具有共性酶带, 反映了共同血缘关系和地理分布的同源性。半野生大豆V带出现频率和相对含量均介于野生大豆和栽培大豆之间, 说明栽培大豆由野生大豆经过中间类型大豆进化而来。I、IV、V带平均相对含量和III带频率以30°N—35°N为最高。总酶带数以南方多, 向北方逐渐减少。说明与地理分布密切相关。

二、酸性磷酸酯酶同工酶

野生大豆特有带，IV、X带为栽培大豆特性带，V、VIII带为野生、半野生大豆共有，II带存在于野生和栽培大豆中（图2）。

(二) 不同材料中同工酶谱

1. 不同类型大豆的同工酶

(1) 频率：XI、XII带在野生、半野生、栽培大豆中出现频率相同，I带逐渐增高，IV、X带为栽培大豆特有，出现频率较高分别为66.7%和83.3%，说明了此酶带存在的普遍性，因此可视为栽培大豆特征性酶带。VII、VIII、IX带在野生和半野生

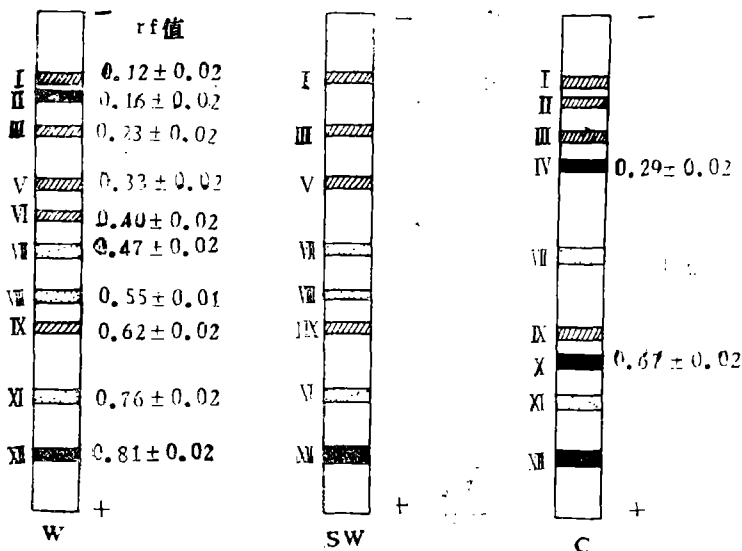


图2 大豆酸性磷酸酯酶同工酶模式酶谱

生大豆中出现频率高，为66.7—100%之间，而栽培大豆为0—16.7%，它们可能是大豆原始性状酶带。

(2) 相对含量：I、XI、XII带相对含量从野生，半野生到栽培大豆逐渐增高，而且半野生大豆倾向于野生大豆。I、II、III、IV、IX、X、XI、XII带平均相对含量在栽培大豆中最高，说明在进化进程中大部分酶带相对含量增加（表5）。

表5

不同类型各种酶带平均相对含量

类 型	带型号											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
W	27.0	64	48.0	0	34	35	35.75	32.5	45.6	0	10	86
SW	29.3	0	38.8	0	47	0	23.60	25.6	41.0	0	17	86
C	136.0	112	72.0	90	0	0	32.00	0	64.0	71.8	40	160

2. 不同纬度大豆的同工酶

(1) 频率：III、IV、IX、X带除个别纬度外，出现频率相等。VII带在40°N频率最高为100%，南北有降低趋势。V带35°N以北未观察到，只存在于南方，而且频率相等。VI带为40°N特有，XI、XII带仅出现于25°N，频率为100%。

(2) 相对含量：VII、VIII、IX、X带以30°N相对含量最高，南北均较低。III带以35—40°N高，两端低（表6）。由此可见，I带频率和相对含量，半野生大豆处于野生大豆和栽培大豆间，说明野生大豆，半野生大豆至栽培大豆的进化关系。在进化过程中，有些原始性状酶带V、VI、VII带缺失，同时又有新酶带IV、X产生，可依此鉴别不同类型大豆。总频率和总相对含量以30—35°N为高，说明酶带与地理位置有一定联系。

表6

不同纬度各酶带平均相对含量

纬度	带型号		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	25°N	48	0	50	0	34	0	0	32.0	52.0	0	22.3	108.7	
30°N	128	64	45	72	59	0	41.5	64.0	78.0	152	0	0		
35°N	88	0	60	72	35	0	32.5	32.5	60.5	104	0	0		
40°N	60	0	60	104	0	35	30.7	21.0	49.0	24	0	0		
45°N	172	0	35	112	0	0	15.0	13.5	10.5	10	0	0		
50°N	19	112	50	0	0	0	23.0	21.0	19.0	69	0	0		

讨 论

Goman^[2]对115个栽培大豆及80份野生大豆同工酶研究,发现苹果酸脱氢酶只有一种酶谱类型。本文实验结果表明, NAD型苹果酸脱氢酶共有6条酶带,在各种材料中出现多种酶谱类型,同时观察到酸性磷酸酯酶有12条带,迁移率范围大(0.125—0.875)。这与Kiang和Gorman^[4]报道不同组织中有6条酶带的结果不同。这种差异的原因可能与材料来源有关, Gorman等研究的野生大豆多取自日本和朝鲜,这两个国家位于35°N以北而且多为海洋性气候。而本文实验材料取自中国25°N—50°N的广泛地区的野生、半野生和栽培大豆,因此我们的实验结果是对前人工作的重要补充和完善。值得注意的是苹果酸脱氢酶和酸性磷酸酯酶平均相对含量,出现总频率均以30—35°N较高,什么原因,有待进一步研究。

参 考 文 献

- (1) Buttery, E.R. et al.: *Crop Sci.*, 1968, 8: 727—725.
- (2) Gorman M.B. et al.: *J. Heredity*, 1977, 69: 255—258.
- (3) Gorman, M.P. et al.: *Soybean Genet News*, 1982, 9: 140—143.
- (4) Kiang, Y.T. et al.: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, 1983, 295—328.
- (5) Hildebrand, D.F. et al.: *Crop Sci.*, 1980, 20: 83.
- (6) 虞京威等: 《大豆科学》, 1983, 第1期, 104—107.
- (7) 郝恩虎等: 《中国油料》, 1986, 第2期, 41—46.
- (8) 邹淑华等: 《中国野生大豆论文集》, 64—65.
- (9) 李云荫等: 《大豆科学》, 1984, 第2期, 122—126.
- (10) Sicilano, M.J. et al.: *William Heineman Medical Books L.Td. London*, 2: 125—209.
- (11) 袁晓华、杨中汉主编: 《植物生理生化实验》, 1983, 36—40.

ISOZYMIC STUDIES ON DIFFERENT SOYBEAN SPECIES

Zhang Weimin Miao Yinong

(Biology Department, Northeast Normal University)

Xu Bao

(Soybean Institute, Jilin Academy of Agricultural Science)

ABSTRACT

The polyacrylamide vertical slab gel electrophoresis was used to examine the isozymes of malate dehydrogenase and acid phosphatase of *G. soja*, *G. gracilis* and *G. max*, grown in 25°N, 30°N, 35°N, 40°N, 45°N and 50°N. There are six bands of malate dehydrogenase and twelve of acid phosphatase in *G. soja* subgenus. Five bands of malate dehydrogenase existed in all kinds of soybeans tested, reflecting the same origin of genetics and can be used as a basic band of *G. soja* subgenus. The analysis of frequency and relative quantity of isozymic bands of different species showed that the frequency and the relative quantity of *G. gracilis* were between those of *G. soja* and *G. max*, indicating that *G. max* evolved from *G. soja*, through *G. gracilis*, while some original bands disappeared and some new bands were produced. The average relative quantity of band IV of malate dehydrogenase and bands VII VIII IX of acid phosphatase were the highest at 30°N and 35°N, which showed that the isozymes were associated with geographic location.