

# 毛白杨种内过氧化物同工酶变异

杨自湘 顾万春 李 玲

(中国林业科学研究院林业研究所)

**摘要** 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离了105份毛白杨的过氧化物同工酶,经三年重复,共获8种酶谱,表现了毛白杨种内遗传多型性。第一种酶谱是毛白杨种的主要酶谱型,占全部试材的85.7%。同属一种酶谱型的材料,其形态、性别及生长习性都有明显差异,曾被定为新种、变种或变型;不同酶谱材料的形态分歧应晚于酶分子水平的分歧。将8种酶谱的相似系数值进行聚类,第I、II、III、IV类酶谱因发生较早可聚为一类,此类是毛白杨的主要类型。第V、VI、VII、VIII种酶谱是近代毛白杨与派内几个种进行多元化、多地、多次杂交的新类型。

**关键词** 毛白杨; 过氧化物同工酶; 酶谱相似系数

毛白杨(*Populus tomentosa* carr)是我国特有的白杨派树种。分布广,适应性强,生长迅速,材质优良,为人喜爱。据记载已有2000多年栽培历史。有关林木育种和生物系统学研究表明,毛白杨为杂种起源<sup>[1]</sup>,种内形态变异复杂,分类学家在毛白杨种下进行了各种分类,最终未有统一结果。为了育种需要,本试验应用电泳分离过氧化物同工酶,分析毛白杨种下各形态变异类型的遗传差异。

## 一、材料与 方法

### (一) 材料

表1 漳河林场105份材料的来源及过氧化物同工酶谱表现

采集地点	(°N)	(°E)	采集数	酶 谱 类 型								
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
北 京	39.90	116.40	2	2								
河北易县	39.60	115.50	1		1							
河北邢台、邯郸	36.70	114.50	6	5		1						
河南新乡、焦作	35.35	113.50	8	4		2	1		1			
河南郑州	34.70	113.60	9	4		1	3				1	
河南陕县	34.78	111.20	15	15								
山东泰安	36.70	117.0	3	3								
山东冠县	36.47	115.50	9	7				2				
陕西渭南户县、眉县	34.28	107.74	30	29		1						
陕西武功	34.31	108.81	2	1								
甘肃天水	35.66	105.85	20	20								1
总 数			105	90	1	5	4	2	1	1		1
百分率(%)				85								

本文于1989年8月30日收到。

1. 105份毛白杨无性系试材采自河北漳河林场毛白杨收集圃(该圃材料来源于6省、市15个地区)。在该场进行三年重复育苗试验(表1), 每年一次电泳分析。

2. 对比材料来源:

- (1) 42份形态有差异材料, 采自河南焦作毛白杨收集圃。
- (2) 17份用形态特征定名材料, 采自河南农科院内。
- (3) 11株毛白杨实生后代, 采自山东冠县苗圃。

### (二) 分析方法

在1g一年生毛白杨剪碎树皮中, 加入3ml样品提取液(pH7.2, 0.02ml磷酸缓冲液中含20%蔗糖, 10%甘油)研磨。用垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶2.5%, 分离胶7.5%, 电泳电压250V, 电泳4h。用联苯胺染色)。

### (三) 计算方法

1. 酶带迁移率

$$(Rf) = \frac{\text{酶带迁移距离}}{\text{溴酚蓝迁移距离}}$$

2. 酶谱相似系数 将每一条酶带作为一个性状, 借王义弘<sup>[2]</sup>表征分类的相似系数, 参考胡志昂<sup>[3]</sup>提出酶谱距离进行计算:

$$\text{酶谱相似系数} = \frac{\text{两分类群酶谱相同酶带数}}{\text{两分类群酶谱总酶带数}}$$

## 二、结果分析

### (一) 谱带多型性

与植物种内形态多形性一样<sup>[4]</sup>, 林木种群内分子水平上的变异也具多样性, 这种分子水平上差异是遗传的, 因而林木种群内的遗传多型性也普遍存在。同工酶谱是酶分子的表现形式, 酶谱多样性也就是酶分子差异的表现。将105份试材的过氧化物同工酶分析结果归纳出8种酶谱(图1、表1), 观察到同一类型酶谱的染色深浅有差异, 这仅反映了酶活性的相对

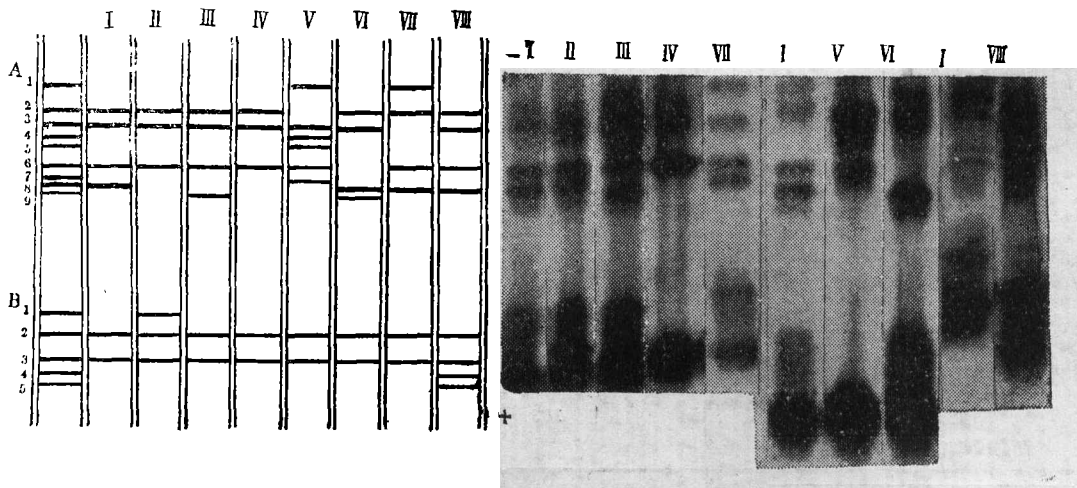


图1 毛白杨种内的8种过氧化物同工酶谱

差异，而不是结构基因的差异，故暂不讨论。8种酶谱都可分电泳慢区(A)和快区(B)。A区共分离出9条酶带(A<sub>1</sub>~A<sub>9</sub>)，B区分离出5条酶带(B<sub>1</sub>~B<sub>5</sub>)。各条酶带的迁移率(Rf)值列入表2。A区9条酶带组成6种构型，第I、II、VIII种酶谱相同为一种构型，其余五种不一。B区差异较小，组成三种构型，第II种酶谱多B<sub>1</sub>酶带，第VIII种酶谱多B<sub>4</sub>~B<sub>5</sub>酶带，第IV、V无B区的染色弥散区。

表2 八种酶谱型各条区带的迁移率

酶带	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>
迁移率	0.10	0.15	0.18	0.20	0.22	0.26	0.28	0.29	0.31	0.55	0.59	0.63	0.66	0.68
I		1	1			1		1			1	1		
II		1	1			1		1		1	1	1		
III		1	1			1			1		1	1		
IV		1	1			1					1	1		
V	1		1	1	1	1	1				1	1		
VI		1	1					1	1		1	1		
VII	1	1				1		1			1	1		
VIII		1	1			1		1			1	1	1	1

三个来源的对照材料，同样具有酶谱多型性。①从焦作毛白杨收集圃采集的材料可分离出4种谱带，即上述8种酶谱的前4种(第I~IV种酶谱)。②从河南省农科院苗圃采集的17份不同形态的毛白杨，也同样分离出前4种酶谱。③从山东冠县采集的11株毛白杨实生后代表现出第I、III、V3种酶谱。由此可见漳河林场毛白杨收集圃材料较为齐全，有代表性，可作毛白杨种内变异研究试材。上述的8种酶谱表现了毛白杨种类酶谱多样性和遗传多型性。

## (二) 酶谱的地域差异

105份材料中归第I种酶谱材料有90份，占全部试材的85.7%(表1)，它们的分布与毛白杨种的分布区吻合；采自北京圆明园的百年老树也表现出此种酶谱，一般认为这株老树与毛白杨定名的模式相似。第II种酶带只有1份(易县毛白杨)。第III种酶谱有5份，分布在河北省邢台、邯郸，河南省新乡、焦作、郑州，陕西省渭南、户县、眉县等地。第IV种酶谱共4份材料，分布在河南省新乡、焦作、郑州，其余四种只出现在个别地区。从表1还可看出，河南省新乡、焦作、郑州一带酶谱类型多，共有五种，形态特征较为复杂。C. A. 斯特斯<sup>[6]</sup>认为分类群的歧异中心就是该物种起源中心，因此可认为河南省中部新乡、焦作、郑州一带应是毛白杨起源地之一。

## 三、谱带差异与种内形态差异的关系

属于第I种酶谱的90份材料，在形态、物候、生长习性、性别及地理分布上并不完全相同，一些分类学家已根据形态差异从中划分出一些新变种，如陕西的截叶毛白杨、山东的抱头毛白杨、河北的塔形毛白杨、河南毛白杨、小叶毛白杨等<sup>[1,6,7]</sup>。河南农科院钱士金先生提供的不同形态毛白杨中，也有属第I种酶谱而具不同形态的差异(表3)，以上说明种内形态的差异并不一定反映在同工酶的差异上。本试验发现有差异的酶谱，其形态都有明显不同，

众所周知，同工酶是由基因直接控制表达的性状，而形态性状差异是受环境制约的。分类学家划分物种的主要根据是形态差异及地理分布，很少考虑亲缘关系，而育种学家划分种群则注意物种的遗传差异及亲缘关系研究。事实证明同工酶及蛋白质的分子结构在进化中具有一定的保守性<sup>[9]</sup>，不受环境的制约，所以过氧化物同工酶分子进化速率是稳定的，可用来比较分类群间亲缘关系<sup>[3]</sup>。由于形态特征、形态进化不稳定，受环境制约，因而毛白杨种群遗传差异的研究用同工酶差异作标记更为有益。不同形态型的毛白杨具有同一种酶谱，说明这些不同形态型间的毛白杨亲缘关系很近，只有形态分化、性别分化，没有酶分子水平分化。

表3 17份毛白杨的形态型与酶谱型

酶谱类型	毛白杨形态型
I	塔形箭杆、细板箭杆、粗板箭杆、光皮小叶、灰皮、大皮孔、密孔三杈毛白杨
II	银丛、塔形银白、钻天箭杆毛白杨
IV	密孔、青皮、苍白皮、梨叶、光皮圆叶、梨叶灰白、中皮孔毛白杨

表3还可看出，属于第III、IV种酶谱的一些毛白杨各自具有不同的形态型，如全面考虑毛白杨种内的形态变异，很难分辨出主要性状和次要性状，加上形态分类种逐渐增多，无法归并，易造成混乱。如果增加酶谱变异分析，就可将多种形态变异归为几类，使分类的层次更清晰。由此可见用同工酶差异作为形态分类补充的优越性。

#### 四、谱带分类

表4表明8种酶谱的相似系数变异幅度很大，从0.50~0.93。种内性状相似系数的阶元线应划在什么地方？尚未确定。分类学家基本观点是要求种内形态差异小，遗传基础一致，对于种内酶谱的相似系数的变异范围了解不多。从核桃属10个种植物过氧化物同工酶谱相似性研究<sup>[9]</sup>看出，种间相似系数变异在0.22~0.79，种内相似系数变异在0.75~1.00之间。张相歧等研究蕃茄属内四个种的过氧化物同工酶<sup>[10]</sup>，种间相似性0.60左右，种内相似性在0.96~

表4 8种酶谱的相似系数值<sup>1)</sup>

酶谱类型	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
I									
II	0.93								
III	0.88	0.82							
IV	0.86	0.87	0.75						
V	0.86	0.80	0.86	0.83					
VI	0.86	0.79	0.71	0.71	0.71				
VII	0.83	0.77	0.83	0.83	0.67	0.67			
VIII	0.53	0.50	0.53	0.53	0.62	0.53	0.62		

属于第II种酶谱的易县毛白杨比第I种酶谱多一条B<sub>1</sub>酶带。这种酶谱与第I种酶谱分子水平差异说明易县毛白杨与毛白杨的亲缘关系远于上文所列举的几种形态型(新变种的毛白杨)。进行毛白杨种内杂交(毛白杨×小叶毛白杨或河南毛白杨)，可获得种子较多，而进行毛白杨×易县毛白杨杂交很难得到种子。这也说明毛白杨与易县毛白杨的亲缘关系远些，不亲合性高。

1.00之间。唐稚英等研究<sup>[11]</sup>黑杨派种间相似值均大于0.60，白杨派内山杨与银白杨种间相似值为0.83，可见毛白杨种内遗传差异较大。如果以第I种酶谱为基本类型，则与其它7种酶谱相似系数分别为0.93、0.88、0.86、0.86、0.86、0.83、0.53(表4)，可见除第V种酶谱外，与其它六种酶谱都有较近亲缘关系。第I种酶谱与第II种酶谱(易县毛白杨的酶谱)又比与其它六种酶谱更相似，亲缘更近些。第I种酶谱与第VIII种酶谱关系

稍远于第Ⅱ种酶谱。已知第Ⅷ种酶谱材料是用毛白杨作亲本进行白杨派内人工杂交种的无性系。从山东省冠县苗圃采集毛白杨实生后代里发现一株具有第Ⅲ种酶谱,因无法考证其花粉的来源,也就无法确定是引入外种花粉,还是亲本杂种的分离,但至少也相似于第Ⅷ种酶谱的材料(引入过白杨派内外种基因)。具有第Ⅴ种酶谱的毛白杨也是天然种子繁殖的后代,同样无法确定双亲的遗传基础,但从表4看出,此种酶谱与毛白杨酶谱分歧较大,因此可认为这种毛白杨是由于重复几次引入了外种基因的后代产生的遗传变异。

为了更进一步分析8种酶谱间的亲缘关系,将酶谱相似系数聚类(图2)。离差平方和距离为0.23时,8种酶谱分成四类:第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ种酶谱为一类(它们亲缘较近);Ⅵ、Ⅷ种为第二类;Ⅴ种第三类;Ⅶ种为第四类。将离差平方和距离增加至0.28时,第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅵ、Ⅷ六种酶谱可划为一类。第Ⅴ、Ⅶ还是各属一类。

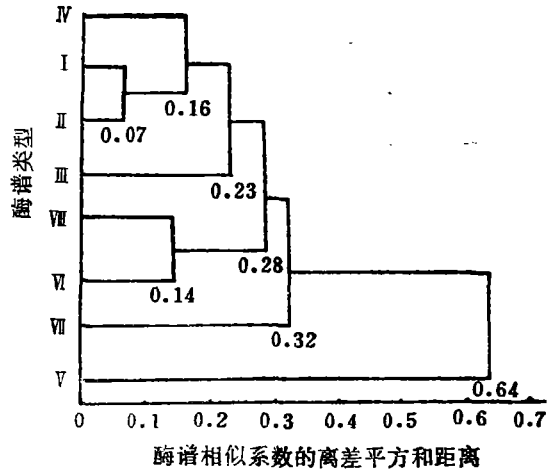


图2 毛白杨种内8种过氧化物同工酶谱相似系数聚类

### 三、结果与讨论

1. 毛白杨是一个形态变化复杂的物种,过氧化物同工酶存在着分子水平差异,种内具有8种酶谱,表现了种内同工酶的遗传多型性。

2. 分类学家根据形态划分的一些变种如截叶毛白杨、抱头毛白杨、河南毛白杨、小叶毛白杨、塔形毛白杨……等等虽然形态上有差异,但过氧化物同工酶谱一致,没有分子水平的差异,而易县毛白杨与毛白杨之间不单有形态差异还存在同工酶分子水平的差异,因而它们之间遗传差异不应是同一分类水平上的差异。

3. 根据各种酶谱出现频率及酶谱聚类结果,可认为具第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ种酶谱的材料应是毛白杨种的主要类型(发生较早),而具第Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ种酶谱的材料与毛白杨亲缘关系较远(近代发生的)。因为毛白杨本身是杂种起源,现代毛白杨种群应是毛白杨与派内几个种多元化、多地性和多次性进行杂交的杂种种群。

### 参 考 文 献

- [1] 陕西省林业研究所, 1981, 毛白杨, 中国林业出版社。
- [2] 王义弘, 1982, 介绍几种植被分析方法, 东北林学院学报, (1): 153~158。
- [3] 胡志昂等, 1983, 裸子植物的生化系统学(一)——松柏植物的过氧化物酶, 植物分类学报, 21(4): 423~437。
- [4] 徐炳声等, 1983, 植物群体的多态现象, 植物学通报, 1(1): 24~25。
- [5] 斯特斯, C.A., 1980(韦仲新等译, 1986), 植物分类学与生物系统学, 科学出版社, 158~178。
- [6] 河南农学院, 1978, 毛白杨类型的研究, 中国林业科学, (1): 14~20。
- [7] 姚秀林, 1976, 甘肃毛白杨资源调查报告, 甘肃林业科技, (2): 1~7。

- [8] Gottlieb, L. D., 1982, Conservation and duplication of isozymes in plants, *Science*, 216, 373~380.
- [9] 杨自湘等, 1989, 核桃属十种植物的过氧化物同工酶分析, 植物分类学报, 27(1), 53~57.
- [10] 张相歧等, 1987, 蕃茄属四个种的过氧化物同工酶分析, 植物研究, 7(7), 133~149.
- [11] 唐稚英等, 1987, 黑龙江省杨树过氧化物同工酶分析, 东北林学院学报, 15(3), 41~45.

## INTRASPECIFIC ISOPEROXIDASE VARIATION OF *POPULUS TOMENTOSA* CARR

Yang Zixiang Gu Wanchun Liling

(The Research Institute of Forestry CAF)

**Abstract** The results of studies on plant breeding and biosystematics showed that *P. tomentosa* originated in hybrid. Taxonomists have made a classification of various varieties of *P. tomentosa* but couldn't get unified opinion.

The genetic variation of 105 clones collected from 15 regions of 6 provinces in main distribution area of *P. tomentosa* was analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. 8 types of isoperoxidase pattern were obtained from them, which showed genetic polymorphism within *P. tomentosa*.

The clones, which showed the characteristics of type 1, occupied 85.7% of the total. Their distribution areas coincide with the distribution areas of *P. tomentosa*. The clones which belong to type 1, type 3, or type 4 possess different morphology, phenology, growing habits, sex and distribution. They were nominated as new varieties in some books. The differentiation of isoperoxidase is earlier than differentiation of morphology, so using these differences to supplement morphological taxonomy can make complicated things simpler.

In order to further analyse the relationships among the 8 types of isoperoxidase patterns, we adopted their SCIP. When similarity distance (similarity coefficient + similarity distance = 1) is 0.23, the varieties of type 1 to type 4 can be grouped into one. They should be the major type of *P. tomentosa*. The varieties of type 5 to type 8 have distant relationships with *P. tomentosa* and they possibly occurred in modern times. Because *P. tomentosa* is self originated in hybrid, its modern population should be the hybrid population derived from the crossing of *P. tomentosa* with many other species of sect. *Leuce* repeatedly.

**Key words** *Populus tomentosa* Carr; isoperoxidase; similarity coefficients of isoperoxidase patterns