

利用同工酶和 SDS-PAGE 技术对一些 兰属 (*Cymbidium*) 品种的分析 (简报)

叶庆生 文 李 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 利用同工酶和 SDS-PAGE 技术对兰属 (*Cymbidium*) 5 个种和 2 个变种的 11 个品种进行了分类研究, 酯酶和细胞色素氧化酶的同工酶共出现 24 条带, 其中 23 条具有多态性; SDS-PAGE 有 30 条带, 其中 25 条带为多态性。根据同工酶和 SDS-蛋白质标记进行聚类分析, 生化水平与传统的形态学分类结果基本一致, 但某些兰属品种的分类地位与传统的分类有一些差异。

关键词 同工酶; SDS-PAGE; 兰属; 聚类分析

中图分类号 Q94-336

GERMPLASM ANALYSIS IN SOME *CYMBIDIUM* CULTIVARS USING ISOENZYME AND SDS-PAGE

Ye Qingsheng Wen Li Pan Ruichi

(Biological Department, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract Isoenzyme and SDS-PAGE techniques were used to analyze 11 cultivars of genus *Cymbidium*. Among 24 bands of esterase and cytochrome oxidase, 23 were polymorphic, and 25 of 30 bands produced in SDS-PAGE were polymorphic. Based on the cluster analysis of these markers, biochemical results were consistent with those of traditional taxonomic study, except that the systematic status for several *Cymbidium* cultivars were different from the morphological classification.

Key words Isoenzyme; SDS-PAGE; *Cymbidium*; Cluster analysis

中国兰花具有很高的观赏和经济价值, 一直深受人们的喜爱。由于在自然界杂交的结果, 兰属植物变异很大, 中间类型很多, 种的界限不清楚, 给花卉品种的整理和研究带来困难^[1]。本实验室曾对兰属的光合作用、呼吸作用等生理方面作过较多的工作^[2-4], 但迄今用现代分子标记技术研究兰属植物的分类及种质资源的报道较少。

长期以来进行分类研究的主要方法是形态学分类法^[5]。自六、七十年代以来, 同工酶技术也广泛地用于这方面的研究^[6,7]。同工酶和蛋白质都是基因表达的产物, 能较直接地反映物种的遗传特性, 尤其是同工酶技术已广泛地应用于农作物、果树及园艺植物的分类研究, 如棉^[6]、柑桔^[8]、梅^[9]、大豆^[10]及兰花^[11]等, SDS-PAGE 在这方面的应用相对较少, 胡志昂等^[12]曾用蛋白质多肽分析松科植物的分类地位。目前也有大量有关分子标记技术在这方面应用的报道^[13,14]。

梁红健等曾用同工酶和 RAPD 技术对兰属的部分品种进行过一些分类研究^[1,11]。本文主要取不同于前人已检测过的兰花的部分品种为实验材料, 通过这些品种的酯酶和细胞色素氧化酶两种同工酶以及 SDS 蛋白质分析, 来初步确定它们之间的亲缘关系。

1 材料和方法

材料 试验材料为表 1 所示的 5 个种 2 个变种的 11 个品种, 除野生寒兰购自中国科学院华南植物研究所外, 其它品种均为本实验室栽培。

酯酶和细胞色素氧化酶同工酶的提取及电泳 每个品种取健康、无病害的功能叶片, 放低温冰箱(-40℃)中保存备用。称取每个品种叶片各 0.5 g, 加入 3 ml 电极缓冲液(3.03 g Tris + 14.4 g Gly 配成 500 ml, 使用时稀释 10 倍)冰浴研磨成匀浆状, 使用电极缓冲液的目的是为尽量减少酶液中的其他离子或电荷对电泳的影响。在 12000 × g, 4℃ 下离心 20 min, 取上清液用稀释 4 倍的提取缓冲液透析过夜, 用聚乙二醇 6000 浓缩至终体积为 0.5 ml, 以上操作均在 4℃ 下完成。采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度为 7%, 先用 25 mA 电泳 1 h, 再提高到 30 mA, 电泳 2-3 h。两种同工酶的染色方法基本参考胡能书等的方法^[15]。

SDS-蛋白质的提取及电泳 蛋白提取及电泳基本方法同上, 提取缓冲液中含有终浓度为 1% 的 SDS 和 10 mmol/L 的 β-巯基乙醇。配胶缓冲液中加入终浓度为 1% 的 SDS, 分离胶浓度为 10%, 采用考马斯亮蓝染色法^[16]。

统计方法 酶谱和 SDS-蛋白质带谱的分析方法参照梁红健等的方法^[1], 酶带或 SDS-蛋白质带的记录以 1 和 0 分别表示带的存在和缺失。相似系数 S_s (Similarity coefficient) 为两品种同时为 1 或 0 时的带数之和与总带数的比值。根据由相似系数所得的矩阵按邻体聚类法进行聚类分析^[17], 作出系统树状图。

2 实验结果

同工酶 酯酶和细胞色素氧化酶两种同工酶共产生 24 条带, 酯酶 13 条带, 细胞色素氧化酶 11 条带。其中 23 条为多态性带(表 2)。对于酯酶和细胞色素氧化酶这两种同工酶在兰属植物中的应用, 以酯酶的效果较好, 因为酯酶慢带区较快带区表现出更大的多态性, 酯酶酶谱在品种内的变化比较小, 建兰和墨兰的不同品种在快带区的 3 条带几乎完全相同, 而种和种之间差异则比较大(图 1A); 细胞色素氧化酶标记相对较少, 种和种之间的差异比较小, 有 1-2

表 1 用于本实验分析的兰花品种
Table 1 *Cymbidium* cultivars used in this study

种名 Species	品种名 Cultivars	编号 No.
建兰	四季兰 Sijilan	1
<i>Cymbidium ensifolium</i>	大凤素 Dafengsu	2
	铁杆素 Tiegansu	3
独占春 <i>C. eburneum</i>	象牙白花兰 var. <i>parishii</i>	4
春剑 <i>C. longibracteatum</i>	通海剑兰 var. <i>tonghaiense</i>	5
兔耳兰 <i>C. lancifolium</i>	兔耳兰	6
寒兰 <i>C. kanran</i>	野生寒兰	7
春兰 <i>C. goeringii</i>	莲瓣春兰 Lianban chunlan	8
墨兰 <i>C. sinense</i>	海南墨兰 Hainan molan	9
	白墨 Baimo	10
	徽州墨 Huizhoumo	11

条为各品种的共有带(图 1B)。

表 2 11 个兰花品种两种酶谱中的同工酶带的记录

Table 2 Character data (major bands) of the isoenzymes of esterase and cytochrome oxidase, scored from 11 cultivars

样品 Samples	酯酶 Esterase	细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase
1	0000111011100	01001010010
2	0000111011100	01001100010
3	0000111011100	01000110010
4	1110011011101	11000000100
5	0000100000011	01011000100
6	0101000111000	01000010010
7	0011000101010	01100001100
8	0010001001110	01011000010
9	0000100111100	01000100010
10	0000110011000	01000100001
11	0000110011100	01000001001

1— 酶带存在 Presence; 0— 酶带缺失 Absence

表 3 SDS-PAGE 带谱记录

Table 3 Character data of SDS-PAGE

样品 Samples	带谱 Map of bands
1	110100010001000000010000000111
2	110100010001000000010100000111
3	110100010001000000010010000111
4	110101010010000000010000100111
5	110000010010000010110000000011
6	1100100101000100101010000011011
7	111100110000110001011011000111
8	110100010000100000010000000111
9	110100001001010001010100010111
10	110100001001001001010100010111
11	110100001001001001010000010111

1— 酶带存在 Presence; 0— 酶带缺失 Absence

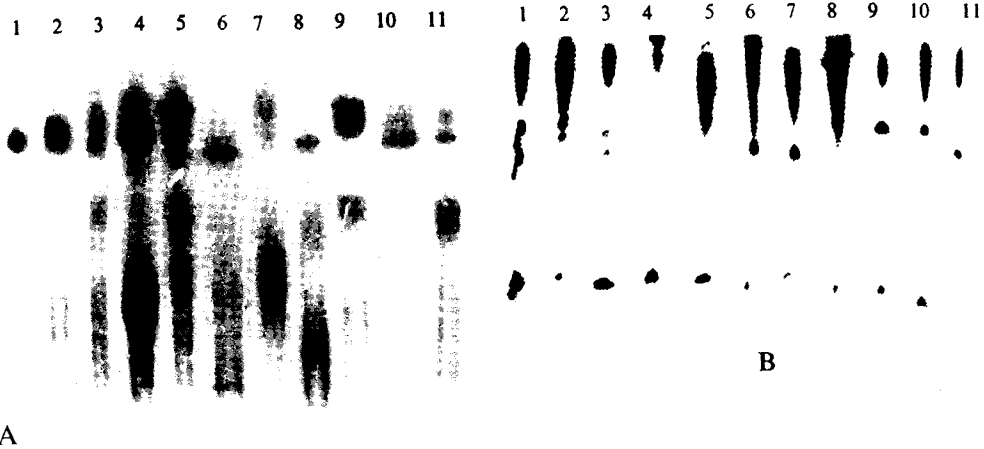


图 1 酯酶 (A) 和细胞色素氧化酶 (B) 同工酶酶谱

Fig. 1 Maps of esterase (A) and cytochrome oxidase (B) isoenzymes

1—11 见表 1, Samples of 11 *Cymbidium* cultivars see in Table 1.

SDS -PAGE SDS 蛋白质在凝胶上共有 30 条带, 其中 25 条带为多态性带, 各个种的不同品种间均有 5—7 条主带的位置相同, 较同工酶表现出更大的同源性, 不同种间带谱的差异较大, 而种内的不同品种间差异较小。从整体上来看, SDS-PAGE 在分析兰属植物种和品种间的亲缘关系要较同工酶好(图 2, 表 3)。根据两种同工酶和 SDS 蛋白质标记, 得出 11 个品种的相似系数矩阵(表 4)。

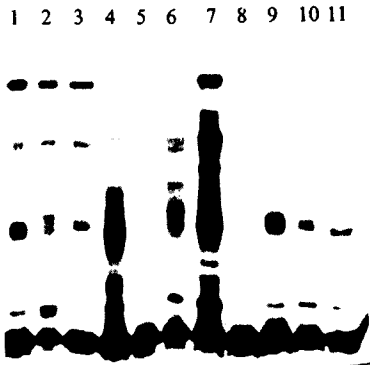


图2 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis map of SDS-PAGE
1-11 为表 1 中的 11 个样。 11 samples
of *Cymbidium* cultivars see in Table 1.

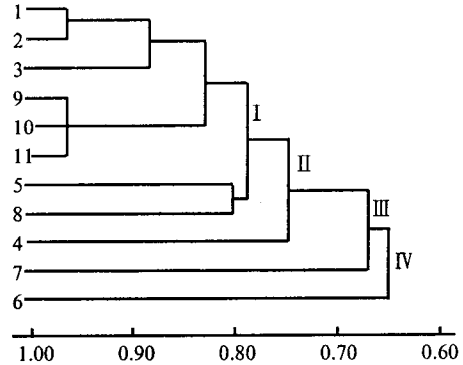


图3 兰属两种同工酶和 SDS-蛋白质系统聚类图，
横坐标为相似系数

Fig. 3 Dendrogram of *Cymbidium* cultivars see in Table 1,
based on similarity coefficient. Axis at the bottom
of the dendrogram indicates similarity coefficient

表4 两种酶谱和 SDS-蛋白质的相似系数矩阵 (%)

Table 4 Matrix of similarity coefficient among 11 *Cymbidium* cultivars calculated
according to two kinds of isoenzyme and SDS-protein (%)

样品 Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	93 ± 6.56									
3	90 ± 9.90	88 ± 7.07								
4	72 ± 2.20	74 ± 9.19	75 ± 1.31							
5	65 ± 5.56	65 ± 5.56	64 ± 3.44	63 ± 6.97						
6	61 ± 4.84	57 ± 9.19	58 ± 6.97	60 ± 9.90	63 ± 6.36					
7	57 ± 4.85	57 ± 4.85	67 ± 4.95	46 ± 4.04	59 ± 1.41	58 ± 0.71				
8	75 ± 1.31	75 ± 1.31	79 ± 1.61	69 ± 5.56	80 ± 0.71	66 ± 0.61	66 ± 6.26			
9	82 ± 1.41	80 ± 0.35	80 ± 4.95	67 ± 0.00	62 ± 2.12	66 ± 7.78	59 ± 6.36	70 ± 4.24		
10	78 ± 7.78	83 ± 0.00	76 ± 0.25	67 ± 0.00	55 ± 7.07	64 ± 4.95	62 ± 2.12	62 ± 1.31	93 ± 6.36	
11	79 ± 5.66	82 ± 2.12	74 ± 9.19	64 ± 8.49	56 ± 2.02	63 ± 0.00	63 ± 0.00	66 ± 1.61	87 ± 4.95	93 ± 6.36

3 讨论

从树状图(图3), 可以看出供试兰花各品种间的亲缘关系。 聚类分析结果与传统的形态分类结果基本一致。 供试的7个种大致可以聚为六组, 除春剑和春兰在距离0.80处聚为一组外, 其它各种各自聚为一组, 建兰的三个品种在距离0.90处聚为一组; 墨兰的三个品种在距离0.93处聚为一组。 兰属植物的分类主要以形态学特征为主, 形态学分类学家德国学者 Shlechter, 英国的 Puy 和 Cribb 将建兰、 寒兰和墨兰划为建兰组, 而春兰被归于春兰组^[5]。 吴应祥将春兰划为兰组, 建兰、 墨兰、 寒兰和春剑等划为蕙组的小花亚组, 独占春等划在大花亚组; 兔耳兰划在宽叶组^[5]。 一般认为建兰、 寒兰和墨兰的亲缘关系较近, 春兰与以上几种兰花的距离较远, 而独占春和兔耳兰与它们的距离更远。 梁红健等人用同工酶和 RAPD 标记都证实了寒兰和建兰的亲缘关系最近^[1]。 根据本实验的聚类结果, 以上六组按亲缘关系的远近又可聚为四类: 建兰、 墨兰、 春兰和春剑在0.79处聚为类 I; 类 II 为独占春中的变种象牙白花兰, 类 II 与类 I 在相似系数 0.75 处聚

合;类Ⅲ为寒兰,其与类Ⅱ聚合于0.67;类Ⅳ兔耳兰与类Ⅲ在0.66处聚合。从聚类结果可以看出建兰和墨兰的亲缘关系十分近,而建兰、墨兰、春剑和春兰这四种兰花的亲缘关系较近。

独占春、寒兰和兔耳兰与类Ⅰ的亲缘关系较远,这三类兰花中独占春离类Ⅰ的距离最近,寒兰其次,兔耳兰离得最远。建兰和墨兰各品种间的亲缘关系十分相近,相似系数为0.90-0.93。本实验结果从生化水平上证明了形态学分类法有一定的依据,但春兰和寒兰的分类地位与传统的分类方法存在不同之处。形态学分类中,寒兰和墨兰、建兰等归为一组,本研究结果却表明寒兰与这两种兰花的距离较远,说明寒兰在形态学上与墨兰和建兰的亲缘关系较近,但在本文所检测的同工酶和蛋白质图谱上却表现出较大的差异。本实验室还用毛细管电泳(CE)和RAPD技术检测兰属植物的SDS蛋白和基因组DNA的多态性,前者结果表明春兰、寒兰的分类地位与传统的分类一致,而后者的结果与本文的结果一致(待发表),因此,我们初步认为,建兰和墨兰与春兰的亲缘关系更近,而与寒兰的关系相对较远。至于建兰、春兰、寒兰和墨兰到底处于分类学的什么地位,还有待进一步的研究。

参考文献

- 1 梁红健,刘敏,钟志宇等.中国部分兰花品种RAPD分析.园艺学报,1996,23(4):365-370
- 2 Pan R C, Ye Q S, Hew C S. Physiology of *Cymbidium sinense*: a review. Sci Hortic, 1997, 70:123-129
- 3 叶庆生,潘瑞焱,丘才新.墨兰光合途径的研究.植物学报,1993,35(6):441-446
- 4 Ye Q S, Pan R C, Hew C S. Study on respiration of *Cymbidium sinense*. Chinese J Bot, 1994, 6(1):36-41
- 5 吴应祥.中国兰花,第二版.北京:中国林业出版社,1993,26-64
- 6 孙传渭,梁正兰.棉属不同种及品种的酯酶同工酶分析.植物学报,1986,28(3):263-295
- 7 廖映粉.柑桔近缘植物酯酶同工酶的研究.植物学报,1988,30(2):163-168
- 8 方德秋,章文才,肖顺元.应用同工酶进行柑橘分类和进化的研究.植物分类学报,1993,31(4):329-352
- 9 汪祖华,陆振翔,郭洪,李,杏,梅亲缘关系及分类地位的同工酶研究.园艺学报,1991,18(2):97-101
- 10 李军,陶芸,郑师章等.同工酶水平上大豆种群内分化的研究.植物学报,1995,37(9):669-676
- 11 梁红健,刘敏,张纯花等.中国兰花(Chinese *Cymbidium*)部分品种的叶片同工酶分析.实验生物学报,1997,30(3):343-348
- 12 胡志昂,刘长江,王洪新.裸子植物的生化系统学(二)—松科植物的种子蛋白质多肽.植物分类学报,1984,22(5):360-366
- 13 Schnell R J, Ronning C M, Knight Jr R J. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. Theor Appl Genet, 1995, 90:269-274
- 14 Gonzalez J M, Ferrer E. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. Genome, 1993, 36:1029-1031
- 15 胡能书,万国贤.同工酶技术及应用,第1版.长沙:湖南科学技术出版社,1985,55-85
- 16 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术,第1版.北京:人民教育出版社,1982,112-118
- 17 阳含照,卢泽愚.植物生态学的数量分类方法,第1版.北京:科学出版社,1983,97-103