

# 墨兰、春兰变种和品种间同工酶分析

孙彩云 张明永 梁承邨 叶秀\*

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要:** 通过酯酶 (EST)、苹果酸酶 (ME)、磷酸葡萄糖异构酶 [PGI(NADP)]、磷酸葡萄糖变位酶 [PGM(NAD)]、超氧化物歧化酶 (SOD) 5 种酶系统研究墨兰和春兰 17 个变种及品种的同工酶多样性, 并探讨这些材料间的亲缘关系。5 种酶系统所得的 11 个位点中 7 个是多态性位点。EST、PGM(NAD) 和 SOD 具有多态性。上述 5 种酶系统能够把供试品种和变种区分开, 并划分为墨兰和春兰类。

**关键词:** 墨兰; 春兰; 同工酶; 亲缘关系

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 01-0075-03

## 1 目的、材料与方法

墨兰 (*Cymbidium sinense*) 和春兰 (*Cymbidium goeringii*) 广泛分布于我国西部和华南地区, 由于各种变种、品种以及自然杂交种的存在, 仅凭植株的形态特征进行种质鉴定较为困难。应用同工酶技术研究兰属植物种间或品种间亲缘关系, 已有报道<sup>[1, 2]</sup>。作者以墨兰和春兰为材料, 选用 EST、ME、PGI(NADP)、PGM(NAD)、SOD 等 5 种酶系统进行研究, 目的是扩大兰属植物遗传多样性研究中可选用的酶系统, 为扩展研究方法提供有益思路。

研究材料均为活体植株, 其中墨兰 3 个品种: 黑墨、白墨和海南墨兰, 6 个变种: 桃姬、文山奇蝶、日月红、凤凰、玉狮子、状元红, 均来自华南植物研究所; 春兰 5 个品种: 朵香、豆瓣兰、云南小雪素、黄花莲瓣兰、莲瓣兰, 3 个野生单株: 野生春兰 A、B、C, 均来自云南。取当年生嫩叶 0.1 g, 加 0.5 mL 复杂磷酸提取液<sup>[3]</sup>用于酯酶 (Esterase. E. C. 3. 1. 1)、苹果酸酶 (Malic Enzyme. E. C. 1. 1. 1. 40) 的提取, 或 Tris-HCl 提取缓冲液<sup>[3]</sup>用于磷酸葡萄糖异构酶 (Phosphoglucose isomerase. E. C. 5. 3. 1. 1. 9)、磷酸葡萄糖变位酶 (Phosphoglucose mutase. E. C. 5. 4. 2. 2)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase. E. C. 1. 15. 1. 1) 的提取。充分研磨后, 8 000~10 000 r/min 离心 2 min, 分装于 5 个小离心管 (0.5 mL), -30℃ 保存备用。保存时间不超过两周。以 11.1% 的 Sigma (S-4501) 水解淀粉制胶。EST 和 ME 用硼酸锂/Tris-柠檬酸 (Lithium-borate, pH 8.3)<sup>[3]</sup>, PGI(NADP), PGM(NAD) 和 SOD 用硼酸锂/Tris-柠檬酸 (Lithium-borate, pH 8.0)<sup>[3]</sup>电泳缓冲液系统进行电泳。在 LKB 电泳仪上, 4℃, 260~280 V, 150 mA, 电泳 6~8 h。各种酶的染色方法参考文献<sup>[4]</sup>。每种酶重复 3 次。用彩色负片拍照记录。供试材料每一种酶谱的基因型用 POPGENE version 1.3 分析, 计算 Nei 的遗传一致度和遗传距离, 用 UPGMA 进行聚类分析和 Treeview version 1.50 软件处理, 得出树状分枝图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶谱情况

对供试的 17 个材料分析了 5 种同工酶, 其中 EST, PGM(NAD) 和 SOD 具有多态性。酶谱显示: ME 只有 1 个位点, EST 和 SOD 各获得 3 个位点, PGI(NADP) 和 PGM(NAD) 各获得 2 个位点, 总共为 11 个位点。其中 Me, Pgi-1、Pgi-2、SOD-3 为保守位点, 其余为多态性位点, 多态性位点百分率为

收稿日期: 2001-05-08; 修回日期: 2001-07-04

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (960467)

\* 通讯作者, E-mail: XiuLinYe@yahoo.com

60%。5 种酶不同位点酶谱的谱带模式见图 1。由于有的酶（如酯酶）在不同材料间酶谱差异较大，酶谱类型较多，不可能全部列出。所以，模式图中列出的是各种酶在不同位点酶谱的类型。某一材料在某种酶不同位点处酶谱类型的组合就成为该材料的酶谱类型。同工酶谱照片见图 2。

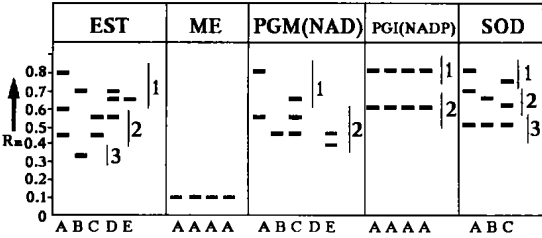


图 1 墨兰、春兰变种和品种的同工酶谱带模式图  
图中 Rm 指相对迁移率 (Relative mobility)。对于多位点酶，最靠近阳极的位点记为“1”，其余依次记为“2、3……”。

“A、B、C……”代表某种酶在不同位点的酶谱类型。  
Fig. 1 Schematic illustration of Isozyme in varieties and cultivars of *C. sinense*, *C. goeringii*  
Rm is the abbreviated from Relative mobility. For some isozymes with polymorphic loci, the most anodal locus is designated “1”, and slower migrating loci are assigned progressively as “2、3……” higher numbers. “A、B、C……” represent the phenotype of certain isozyme in different loci.

2.2 遗传距离和树状图

墨兰各品种间遗传距离主要集中在 0.110 ~ 0.400 之间，平均为 0.378。春兰品种间遗传距离集中在 0.015 ~ 0.200 之间，平均为 0.124。墨兰和春兰材料间的遗传距离主要在 0.130 ~ 0.500 之间，平均为 0.347。树状分枝图见图 3。

从树状图上看，春兰的 8 个品种聚在一起：豆瓣兰和云南小雪素，野生春兰 B 和 C 先分别聚

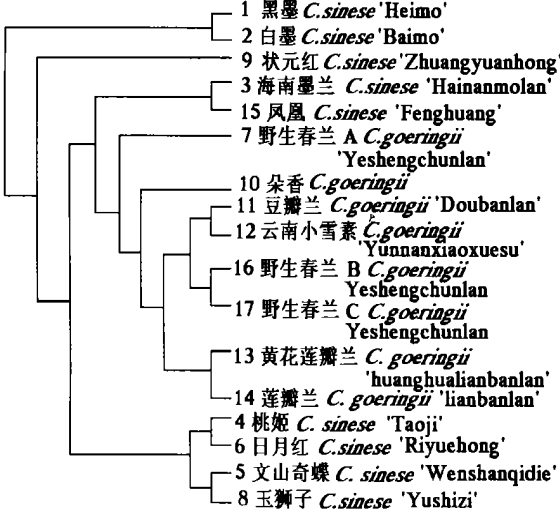


图 3 墨兰、春兰变种和品种间同工酶的 UPGMA 聚类树状图  
Fig. 3 UPGMA dendrogram of varieties and cultivars of *C. sinense* and *C. goeringii* based on Nei's genetic distance obtained from five isozymes

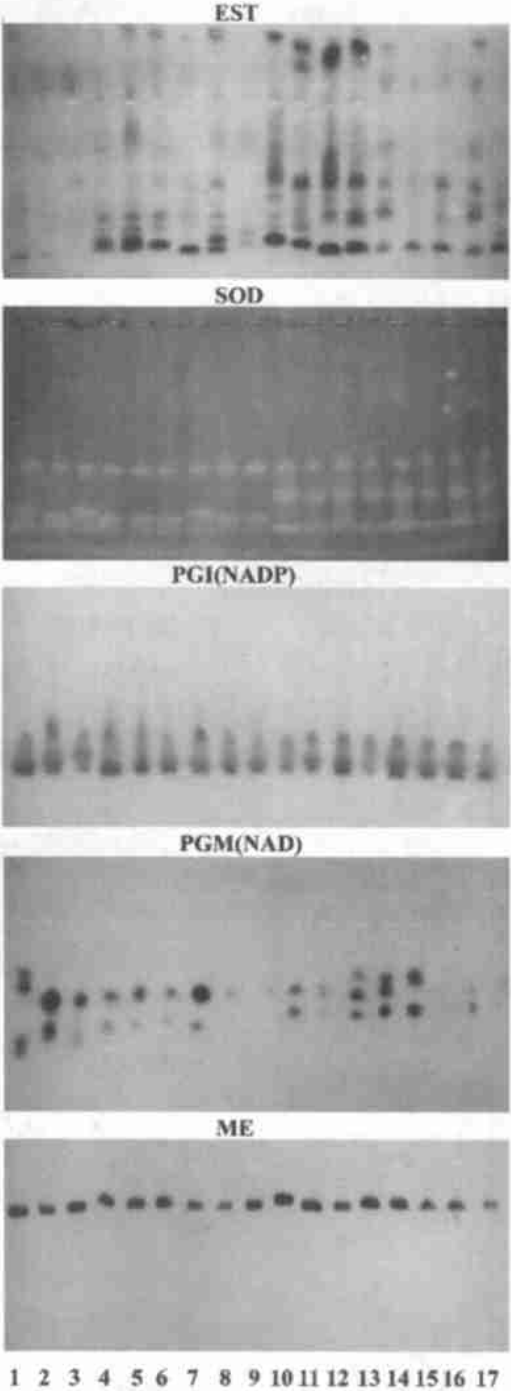


图 2 墨兰、春兰变种和品种间叶片同工酶酶谱  
图中材料编号与正文中材料先后顺序对应。  
Fig. 2 Isozyme maps of cultivars and varieties leaves of *C. sinense* and *C. goeringii*  
The No. of samples in pictures correspond to those in the text.

合在一起, 黄花莲瓣兰和莲瓣兰进一步聚合, 野生春兰 A 与它们的亲缘关系最远, 其次是朵香兰。这样的划分结果与这些品种形态特征的相似程度相符。墨兰的供试材料中, 海南墨兰和凤凰与春兰类亲缘关系最近, 黑墨和白墨与它们亲缘关系最远。其余的 5 个变种中, 桃姬和日月红, 文山奇蝶和玉狮子聚成一组, 表明四者亲缘关系较近。状元红与黑墨和白墨的关系最近。墨兰的供试材料未象春兰的各个品种一样直接聚成一组。联系前面的遗传距离, 墨兰 9 个品种之间的遗传距离远高于春兰 8 个品种间的遗传距离, 前者虽同属墨兰, 但彼此间亲缘关系不如春兰各品种间那么近, 因而未直接聚成一个独立的分支组。形成这种情况的原因之一是桃姬、日月红、文山奇蝶、玉狮子、状元红是墨兰的变种, 春兰的材料都是品种。本试验所用材料中, 只有白墨、海南墨兰、朵香和莲瓣兰被梁红健等<sup>[1]</sup>、叶庆生等<sup>[2]</sup>选用。从本文的树状图上看, 莲瓣兰属于春兰的一个品种, 这与陈心启等<sup>[5]</sup>的观点一致。梁红健等<sup>[1]</sup>则认为莲瓣兰与春兰和墨兰是平行关系。白墨、海南墨兰和朵香在本文中的分类学位置与梁红健等<sup>[1]</sup>的研究结果相符。

综上所述, 5 种同工酶能够把供试材料清楚划分为墨兰类和春兰类。树状图表明了各材料间的亲缘关系与传统分类所得的基本相同。当然, 本试验所选的酶种类和所得位点数不够多, 现有结果不能将所有供试个体两两区分, 说明用同工酶研究兰属的类群间亲缘关系, 需要多选择酶系统以获得足够的多态性位点, 才能使研究结果更具科学性。与此同时, 有理由相信, 随着更多位点数多、多态性高的酶系统的选用, 将很有可能弥补传统形态分类方法的不足, 更准确地反映出分类群间真实的亲缘关系。

#### 参考文献:

- 1 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
- 2 叶庆生, 文 李, 潘瑞炽. 利用同工酶和 SDS PAGE 技术对一些兰属 (*Cymbidium*) 品种的分析 (简报). 热带亚热带植物学报, 1999, 7 (4): 337~ 341
- 3 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996. 82~ 90
- 4 Weeden N F, Wendel J F. Visualization and interpretation of plant isozyme. In: *Isozymes in Plant Biology*. London: Chapman and Hall Ltd. 1990. 5~ 46
- 5 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书. 北京: 中国林业出版社, 1998. 96~ 97

## Analysis of Isozyme in Varieties and Cultivars of *Cymbidium sinense* and *Cymbidium goeringii*

Sun Caiyun, Zhang Mingyong, Liang Chengye, and Ye Xiulin  
(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

**Abstract:** Five isozyme systems, EST, ME, PGI(NADP), PGM(NAD) and SOD, were used to study the variation of isozyme in varieties and cultivars of *Cymbidium sinense* and *C. goeringii* as well as the relationships among these taxa. Eleven loci were generated. Seven of them were polymorphic. EST, PGM(NAD), SOD were polymorphic, two of them could be used to distinguish all of varieties and cultivars. The result showed that these isozyme systems could be used to distinguish cultivars and varieties clearly, and these cultivars and varieties were divided into *C. goeringii* and *C. sinense*.

**Key words:** *Cymbidium sinense*; *Cymbidium goeringii*; Isozyme; Variation; Relationship