

君子兰杂交后代过氧化物酶同工酶酶谱多样性分析

庞 赫, 郭太君

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 采用聚丙烯酰胺不连续系统垂直板电泳方法, 对杂交亲本及其 10 个子代的君子兰叶片过氧化物酶同工酶谱进行了分析。结果表明: 试材间的酶谱有一定的差异, 利用系统聚类分析法, 将 12 个试材分成 4 个组。其中有 7 个子代与父本聚为 1 组, 母本自己聚为 1 组, 其它 3 个子代分别聚为 2 组。

关键词: 君子兰; 过氧化物酶同工酶; 聚类分析

中图分类号: S 682.31; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0038-04

君子兰(*Clivia* Lindl.)原产南非的纳塔尔^[1]。为石蒜科君子兰属多年生常绿草本花卉。1823 年, 英国的鲍威等人在现今的南非好望角一带首次发现。日本明治年代中期(1890~1910 年)从欧洲引种到日本, 因其拉丁学名含有“高贵”的含义, 便取名“君子兰”。从此, 该名称在日本、中国沿用至今。

目前中国生产上应用的原始品种主要是大花君子兰(*C. miniata* Regel), 于 1932 年从日本传入中国。现保留下来的都是垂笑君子兰和大花君子兰杂交得到的“品种”, 主要有: 大胜利、和尚、染厂、黄技师、油匠、圆头、花

脸、短叶、彩色君子兰(金丝兰)。

从日本及外省引进的与长春君子兰有亲缘关系的品种: 日本兰、横兰、雀兰^[2]。由于长期的杂交, 人工选择及环境因素影响, 现在许多君子兰品种的形态特性已经与前人的描述产生了很大差异, 至今仍未形成统一的君子兰品种分类系统, 其命名亦存在混乱现象, 限制了君子兰种质资源的进一步研究及应用, 很难满足君子兰分类鉴定和选育工作的需要。

同工酶是一种特异蛋白质, 是基因的直接产物。同工酶与生物的遗传、生长发育、代谢调节等都有一定关系。同工酶做为遗传基因的表达产物, 在生物的一定部位和一定的发育阶段, 某酶具有相对的稳定性和可遗传性, 在一定的程度上可反映个体间的遗传差异^[3,5]。因此, 同工酶特征可作为植物分类与亲缘关系探讨的重要指标, 其中又以过氧化物酶应用最广^[4]。过氧化物酶是植物体内普遍存在的、活性较高的一种酶。它与呼吸作

第一作者简介: 庞赫(1983-), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: panghe5210@163.com.

通讯作者: 郭太君(1957-), 男, 教授, 现从事园林植物资源与栽培生理的研究工作。E-mail: guotj126@sina.com.

收稿日期: 2008-12-22

Study on N, P, K Nutritional Characteristics of Plug-seedling Scarlet Sage and the Effects of Controlled Release Fertilizer

ZHOU Bo, LIU Deng-min, NIE Jun-hua, JIA Wen

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: N, P, K nutritional characteristics and the effects of controlled-release fertilizer applied in plug-seedling with medium of scarlet sage were studied. The controlled-release fertilizer (20-8-10) was used to study the feasibility of it on plug-seedling and the optimum amount. And the different effects between general fertilizer and controlled-release fertilizer were studied. The results showed that: the content of nitrogen, phosphorus and potassium had not significant difference in prophase, after that the nitrogen content changed smoothly, phosphorus increased, and potassium declined. The ratio of N, P, K was 1 : 0.195 : 0.309 between the whole seedling stages. The growth and the quality of the seedling were improved by controlled-release fertilizer. The optimum amount of fertilizer on scarlet sage seedling was N 30.00 g/kg, P 5.24 g/kg, K 12.45 g/kg.

Key words: Scarlet sage; Nutrition characteristic; Controlled release fertilizer

用、光合作用及生长素的氧化等都有关系。测定这种酶的活性或其同工酶,可以反映某一时期植物体内代谢的变化^[6,7]。同时,过氧化物酶与植物的抗逆性之间也有着密切的联系,如抗虫、抗寒、抗旱等。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定同工酶,方法简便,灵敏度高,测定结果便于观察、记录和保存^[8]。近年,国内对君子兰的鉴赏标准、解剖结构及化学成分、栽培管理、组织培养及主要病虫害等方面^[9-12]进行了广泛的研究,而对君子兰的品种分类研究的很少。该研究的目的是通过过氧化物酶同工酶分析,从生化角度对君子兰“品种”进行亲缘关系的鉴定,研究杂交后代的变异情况,以期对君子兰的分类研究和品种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料取自吉林省长春市宏大兰地有限公司陈家基地,君子兰父母本分别为油匠、圆头,及其 10 个子代的叶片,分别编号为 ♂、♀、1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、6 号、7 号、8 号、9 号、10 号。

1.2 方法

1.2.1 酶液提取 取中、下部成熟叶片,用蒸馏水洗净吸干后称取 1 g,剪碎后加 5 mL Tris-HCl(pH 8.0)提取液研磨匀浆,4 000 rmp 离心 10 min,取上清液做分析酶液。

1.2.2 凝胶制备 采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶系统,分离胶浓度 7.5%(pH 8.9),浓缩胶浓度 3.8%

(pH 6.7)。
1.2.3 电泳 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3)。每孔槽加样 40 μL。预电泳为 10 mA、80 V,待样品到达两层胶界面并将进入下层胶时,将电泳条件变为 20 mA、120 V。用 1%溴酚蓝前沿指示剂,前沿指示距底部 1 cm 处时结束电泳,时间约 6 h。电泳在 4℃冰箱内进行。每样品电泳重复 4 次。

1.2.4 染色 采用抗坏血酸-联苯胺法染色^[13]。

1.2.5 谱带记录及凝胶保存 染色结束后,绘制酶谱模式图、照相、计算酶带泳动速率(Rf)=酶带的迁移距离/溴酚蓝的迁移距离。按各个试材的酶谱计算出一组酶谱相似系数,来确定对比试材的酶谱相似程度,列出不相似矩阵(如表 2),以利分析它们之间的亲缘关系,用聚类分析的方法绘制树状图。相似系数参考王义弘^[14]的计算方法进行。过氧化物酶同工酶酶谱间相似系数 $c=2w/(a+b)$,其中 c 为酶谱间相似系数, w 为 A 和 B 两个分类群相同的酶带数, a 为分类群 A 在酶谱中的酶带数, b 为分类群 B 在酶谱中的酶带数。

2 结果与分析

2.1 试材的同工酶谱特征

经聚丙烯酰胺凝胶电泳表明,各君子兰试材间在酶带数量、相对迁移率(Rf)等方面均有较大差异,见图 1、2 和表 1。

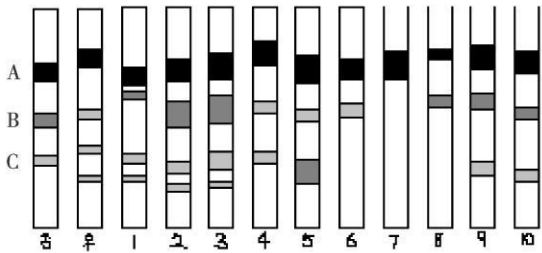


图1 试材的过氧化物酶同工酶酶谱模式图
注: A.深色带; B.浅色带; C.较浅色带

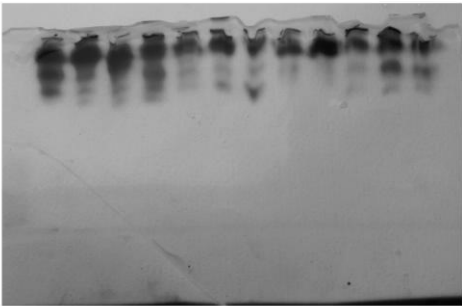


图2 试材的过氧化物酶同工酶谱型图

Fig. 1 Mode chart of POX isozyme banding pattern of cultivars

Fig. 2 Picture of POX isozyme banding patt

从酶带数量上看,12 个君子兰试材的过氧化物酶同工酶,共有 12 条不同的 Rf 值酶带, Rf 值变动在 0.06~0.38 之间。从酶带数量上看,♀与 1 号、2 号和 3 号酶带数最多,有 4 条酶带;7 号酶带数最少,仅有 1 条酶带;其它试材一般为 2~3 条酶带。试材间的酶带除在 12 个位置上的表现不同外,在酶带的活性、宽窄等方面,亦存在差异。如 ♂、2 号、3 号、5 号、6 号、7 号的第 2 带较宽,着

色深、活性较强。而 5 号的第 10 带较宽,但着色浅,活性较弱。
从酶带的 Rf 值上反映出 ♂与 3 号试材有 3 条相似酶带(第 2、5 和 9 带); ♂与 4 号试材有 2 条相似酶带(第 5 和第 9 带),与 6 号试材也有 2 条相似酶带(第 2 和第 5 带);而 ♂与 2 号、5 号、7 号、8 号试材仅有 1 条相似酶带(第 2 带);而 ♀与 1 号、9 号试材分别有 2 条相似酶带

(第4带、第11带和第1带、第4带); ♀与8号试材有1条相同酶带(第4带), 与4号、10号试材有1条相似酶带(第1带); 1号试材与8号、9号试材有1条相似酶带(第4带); 2号试材与5号试材有3条相似酶带(第2、6和10带); 2号试材与3号、10号试材分别有2条相似酶带(第2带、第12带和第6带、第10带); 2号试材与9号试材仅有1条相似酶带(第10带); 3号试材与4号、6号试材分别有2条相似酶带(第5带、第9带和第2带、第5带); 4号试材与6号试材有1条相似酶带(第5带); 5

号试材与10号试材有2条相似酶带(第6带和第10带); 5号试材与9号试材仅有1条相似酶带(第10带); 8号试材除与9号试材仅有1条相似酶带(第4带); 9号试材与10号试材有2条相似酶带(第1带和第10带)。但是 ♂、2号、3号、5号、6号、7号和8号试材7个试材(包括1个父本和6个子代)在第2酶带上几乎完全相似, 可以认为, 第2酶带是12个君子兰试材的特征酶谱也可能是君子兰属或大花君子兰的特征酶带。

表 1 君子兰属植物过氧化物酶同工酶 Rf 值

Table 1	Rf value of POX isozyme of <i>Clivia</i> Lindl.											
酶带 Enzyme belt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
♂		0.09			0.21				0.31			
♀	0.06			0.19			0.26				0.36	
1号			0.11	0.19				0.29			0.36	
2号		0.09				0.23				0.34		0.38
3号		0.09			0.21				0.31			0.38
4号	0.06				0.21				0.31			
5号		0.09				0.23				0.34		
6号		0.09			0.21							
7号		0.09										
8号		0.09		0.19								
9号	0.06			0.19						0.34		
10号	0.06					0.23				0.34		

表 2 父本、母本及子代过氧化物酶同工酶谱不相似矩阵

Table 2	Male parent, female parent and filial generation POX isozyme in dissimilarity matrix											
样品 Sample	♂	♀	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号	10号
♂												
♀	1											
1号		0.500										
2号	0.714		1									
3号	0.143	1	1	0.500								
4号	0.333	0.714	1	1	0.429							
5号	0.667	1	1	0.143	0.714	1						
6号	0.200	1	1	0.667	0.333	0.600	0.600					
7号	0.500	1	1	0.600	0.600	1	0.500	0.333				
8号	0.600	0.667	0.667	0.667	0.667	1	0.600	0.500	0.333			
9号	1	0.429	0.714	0.714	1	0.667	0.667	1	1	0.600		
10号	1	0.714	1	0.429	1	0.667	0.333	1	1	1	0.333	

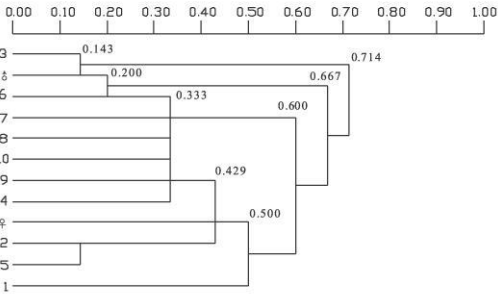


图3 POX 同工酶聚类分析树系图

Fig. 3 The dendrogram of POX isozyme cluster annlysis chart

2.2 君子兰不同单株过氧化物酶同工酶酶谱聚类分析

为了对研究结果进行定量的分析, 根据酶谱之间的相似性, 进行12株君子兰类群的聚类分析。按各个试材的酶谱计算出一组酶谱相似系数, 来确定对比试材的酶谱相似程度, 列出不相似矩阵(如表2), 以利分析它们之间的亲缘关系。不相似值越小, 亲缘关系越近; 不相似值越大, 亲缘关系越远。

利用系统聚类法 选取相似系数 $L_1 = 0.55$ 和 $L_2 = 0.60$ 对所有试材进行分类。由图3可以看出, $L_1 = 0.55$ 将亲本和10个子代分成2组I: (3号、♂、6号、7号、8号、10号、9号、4号、♀、2号、5号); II: (1号)。当在 $L_2 = 0.60$ 处取一结合线时, 12个君子兰试材可划分为4类 I: (3号、♂、6号、7号、8号、10号、9号、4号); II: (♀); III

(2 号、5 号); IV: (1 号)。

3 讨论

3.1 君子兰酶谱表型及分类研究

君子兰过氧化物酶同工酶的 *Rf* 值酶带较多, 有 12 条带, 酶带最多 4 条, 最少 1 条, 区带着色深, 较清晰。特征酶带在第 2 酶带上, 从以上 2 种同工酶酶带的表型特征上看出, 君子兰父母本及其子代的同工酶酶谱虽有差异, 但它们呈规律性表达, 进一步证明君子兰的同工酶确实具有特异性、稳定性和重现性。关于利用过氧化物酶同工酶谱进行植物分类关系的探讨, 已被证明是可行的。何大彦等(1990)对桑属几个种及品种过氧化物酶同工酶的研究, 从二维排序结果上看出, 山桑、白桑、鲁桑、鸡桑、蒙桑 5 个品种及纳溪桑、琵琶桑、剑鲁桑 3 个品种被聚为一个大类群。其中白桑与鲁桑、山桑与鸡桑的酶谱距离很近, 表明它们之间关系更密切。这一结果, 从形态特征上观察也得到证实^[9]。因而利用同工酶的研究, 探索君子兰植物的起源、进化、分群、分类和亲缘关系是可能的。

3.2 君子兰杂交后代变异的问题

我国目前市场上君子兰“品种”主要是大花君子兰(*C. miniata* Regel)不同品种间的杂交后代群体。而通过该试验的分析, 杂交得到的子代共分成 4 类, 说明群体内遗传变异较大。所以目前生产应用的君子兰“品种”不能作为一个品种, 而是一种变异的杂种群体。从试验结果来看, 3 号、6 号、7 号、8 号、10 号、9 号、4 号与 ♂聚为一个类群, ♀被聚为另一类。2 号、5 号为第 3 类, 1 号为第 4 类。大约有 70%子代倾向于父本遗传, 有 30%发生了变异。在育种中可以选择具有优良性状的君子兰作为父本, 因此杂交得到的子代将有大约 70%符合育种要求。该试验结果为今后进一步研究君子兰种内遗传多样性变化提供了理论依据。

另一方面, 由于同工酶酶带的多态性和活性的不同, 在聚类时可能产生一定的误差, 因此利用同工酶也要兼顾形态分类进行整合, 才能更准确的确定君子兰品种间亲缘关系, 为君子兰育种和选育工作提供理论依据。

参考文献

[1] 王莲英, 秦魁杰, 吴涤新. 花卉学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 480.
[2] 刘晓钟. 长春君子兰识别鉴赏与莳养技艺[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2006: 24-28.
[3] 焦培娟, 郭太君, 李继海, 等. 秋子梨过氧化物酶同工酶系统聚类研究[J]. 特产研究, 1997(2): 16-18.
[4] 林新春, 蒋伦伟, 蒋鸟琴. 7 属 11 种木兰科植物的过氧化物酶同工酶分析[J]. 江西林业科技, 2004(4): 6-7.
[5] 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬. 远源杂交的分子基础. DAN 片段杂交假设的一个论证[J]. 遗传学报, 1979, 6(4): 405-413.
[6] 张维强, 唐秀芝. 同工酶与植物遗传育种[M]. 北京: 北京大学出版社, 1984: 86.
[7] 朱友林, 刘纪辟. 向日葵抗病性基因及其遗传背景与过氧化物酶同工酶关系的研究[J]. 中国农业科学, 1996, 29(3): 27-32.
[8] 吴少伯. 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳[J]. 植物生理学通讯, 1979, 6(1): 30-33.
[9] 夏春森, 朱义君. 新名花卉标准栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 161-167.
[10] 孙建云. 大花君子兰营养器官的解剖学结构[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 364-368.
[11] 李淑华, 袁增玉, 陈力, 等. 君子兰组织培养再生植株的研究[J]. 黑龙江农业科学, 1988(4): 39-41.
[12] 董慧芳. 君子兰上粉蚧的发生和释放隐唇瓢虫防治试验[J]. 生物防治通报, 1993, 9(1): 12-13.
[13] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 108-111.
[14] 阳含熙. 植物生态学的数量分类方法[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 215-224.
[15] 何大彦, 冯文和. 桑属几个种及品种过氧化物酶同工酶的研究[J]. 桑业科学, 1990, 16(3): 129-134.

Analysis on Classification Diversity by The Peroxidase Isozyme Technique in Filial Generation of *Clivia* Lindl.

PANG Ha GUO Tai-jun

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: The peroxidase isozyme patterns in leaves of parent strain and 10 filial generations of *Clivia* Lindl. cultivars which were analysed via polyacrylamide electrophoresis technique and 12 bands of 12 cultivars had some differences. Furthermore, the 12 cultivars were classified into four groups based on cluster analysis. In 12 cultivars, there were 7 filial generations with male parent were gathered to one group the male parent was gathered to the other kind alone, 3 filial generations were gathered to two groups respectively.

Key words: *Clivia* Lindl.; Peroxidase isoenzym; Cluster analysis