

## 青岛市 19 个樱花品种的酯酶同工酶鉴定

周春玲<sup>1</sup>, 陈芳<sup>1</sup>, 苗积广<sup>2</sup>, 韩德铎<sup>3</sup>, 李彩丽<sup>1</sup>

(1. 青岛农业大学 环境艺术学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛中山公园管理处, 山东 青岛 266109;  
3. 聊城大学 历史文化学院, 山东 聊城 252059)

**摘要:**以 1 a 生枝的树皮为材料, 利用酯酶同工酶技术对青岛市 19 个樱花品种进行亲缘关系鉴定和品种分类研究。结果表明: 19 个樱花品种的酯酶同工酶酶谱共有 12 条酶带, 其中 P7 为基本酶带, 活性强, 为大部分品种所具有, 其他谱带在品种间有差异。根据酶谱进行 UPGMA 聚类分析, 得出反映各品种间亲缘关系的树状聚类图。聚类结果以花的重瓣性将 19 个樱花品种分为两大类群, 根据种源、花色和枝姿的不同又分为不同的亚类群和类, 其结果与传统分类学结果具有一致性, 表明种源、重瓣性、花色和枝姿都可作为樱花品种分类的重要指标, 有较好的稳定性。

**关键词:** 樱花; 酯酶同工酶; 亲缘关系; 品种分类

中图分类号: S685.990.23

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2008)03-0040-04

### Identification of 19 *Cerasus* Cultivars on Esterase Isozyme in Qingdao

ZHOU Chun-ling<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>1</sup>, MIAO Ji-guang<sup>2</sup>, HAN De-duo<sup>3</sup>, LI Cai-li<sup>1</sup>

(1. Environmental Art College, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China;  
2. Department of Management, Qingdao Zhongshan Park, Qingdao, Shandong 266109, China;  
3. College of History and Culture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China)

**Abstract:** Phylogenetic relationship identification and classification of 19 *Cerasus* cultivars in Qingdao were studied by esterase isozyme technology by using of the bark of annual and branches as materials. There were 12 esterase isozyme bands for 19 *Cerasus* cultivars. P7 was basic band, which had high activity and was owned for most of the cultivars. Other bands were different between all cultivars. A dendrogram showing genetic relationships was constructed through an UPGMA (Unweighted Pair-group Method Arithmetic Average) method. 19 *Cerasus* cultivars were divided into two groups based on the characteristics of double petals. Each group was divided into several subgroups and kinds based on the provenance, color of flowers and posture of branches. Esterase isozyme technology provided the same results of classification on *Cerasus* cultivars to the traditional method. Provenance, the characteristics of double petals, color of flowers and posture of branches were the important index for classification of *Cerasus* cultivars, which had high stability.

**Key words:** *Cerasus*; esterase isozyme; phylogenetic relationship; cultivar classification

樱花是世界著名的木本观赏花卉, 隶属于蔷薇科(Rosaceae)樱属(*Cerasus*)。目前许多城市都栽植樱花, 其中以武汉、南京、无锡、苏州、青岛和北京最有名<sup>[1]</sup>, 尤其在青岛, 樱花作为重要的景观之一, 在园林绿化中起着更为重要的作用, 且形成了一定的规模和特色。青岛中山公园、八大关、植物园及城

阳区很多街道广为栽植。青岛种植樱花已有近百年的历史, 大部分为日本引进的品种, 且樱花在长期的自然杂交、人工选择和环境条件的影响下, 形成了许多变异, 产生了丰富的栽培品种。随着野生樱花资源的发掘和杂交育种工作的普遍开展, 樱花栽培品种还将继续增加。因此, 造成了很多名称不定、同名

收稿日期: 2007-05-09 修回日期: 2007-11-22  
基金项目: 青岛农业大学博士科研启动基金项目(630425)  
作者简介: 周春玲(1975-), 女, 山东青岛人, 副教授, 园林植物与观赏园艺专业。

异物及同物异名等现象,导致品种资源的流失,严重影响新品种的选育及杂交育种工作的进行,迫切需要对樱花品种资源进行分类鉴定。

目前我国对樱花的研究多集中在传统分类学<sup>[2-4]</sup>和繁殖技术的研究<sup>[5-7]</sup>,对樱花品种进行分子水平的分类研究尚未见报道。赵莉<sup>[8]</sup>虽对青岛市樱花品种做过资源调查和品种分类方面的研究,主要在形态学、数量学、孢粉学和过氧化物酶同工酶等方面,还不能形成完整的分类体系。利用酯酶同工酶技术对青岛市19个樱花品种做进一步分类研究,以揭示各品种间的亲缘关系,为今后樱花的品种分类、资源调查、品种鉴定、推广应用、提高育种效率等方面的研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为青岛市19个樱花品种(表1)1、2 a 生枝的树皮。2006年春在青岛各地采集材料,将其放入冰壶内,带回实验室后置-4℃冰箱保存,备用。

### 1.2 方法

1.2.1 酶液的提取 称取1.0 g干净且木质化程度较低的树皮,放入预冷的研钵中,加入2 mL预冷的0.1 mol·L<sup>-1</sup> tris-HCl 抽提液(pH8.0),冰浴中迅速研磨成匀浆,4℃下12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液即为供试酶液,置0~4℃冰箱中保存,备用。

表1 用于同工酶分析的樱花品种

Table 1 The materials of *Cerasus* used for isozyme analysis

编号	名称	品系	编号	名称	品系
1	‘衣通姬’ <i>Cerasus</i> × <i>yedoensis</i> ‘Sotorihime’	杂交樱	11	‘浅黄’ <i>C. lannesiana</i> ‘Qianhuang’	日本晚樱
2	‘染井吉野’ <i>C.</i> × <i>yedoensis</i> ‘Yedoensis’	杂交樱	12	‘绯云’ <i>C. lannesiana</i> ‘Feiyun’	日本晚樱
3	‘大岛樱’ <i>C. lannesiana</i> ‘Makino’	日本晚樱	13	‘香雪’ <i>C. lannesiana</i> ‘Xiangxue’	日本晚樱
4	‘郁金’ <i>C. lannesiana</i> ‘Grandiflora’	日本晚樱	14	‘明月’ <i>C. lannesiana</i> ‘Mingyue’	日本晚樱
5	‘普贤象’ <i>C. lannesiana</i> ‘Albo-rosca’	日本晚樱	15	‘麒麟’ <i>C. lannesiana</i> ‘Kirin’	日本晚樱
6	‘松月’ <i>C. lannesiana</i> ‘Superba’	日本晚樱	16	‘积雪’ <i>C. lannesiana</i> ‘Jixue’	日本晚樱
7	‘关山’ <i>C. lannesiana</i> ‘Seki-yama’	日本晚樱	17	‘玉蕊’ <i>C. lannesiana</i> ‘Yurui’	日本晚樱
8	‘御衣黄’ <i>C. lannesiana</i> ‘Gioiko’	日本晚樱	18	‘含香’ <i>C. lannesiana</i> ‘Hanxiang’	日本晚樱
9	‘一叶’ <i>C. lannesiana</i> ‘Hisakura’	日本晚樱	19	‘玉碟’ <i>C. lannesiana</i> ‘Yudie’	日本晚樱
10	‘垂枝樱’ <i>C. lannesiana</i> ‘Chui-zhiying’	日本晚樱			

1.2.2 电泳 使用DYY 10型三恒电泳仪、DYY III型电泳槽,采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳系统。分离胶浓度7%,浓缩胶浓度3%,起始电流0.75 mA,待样品进入分离胶后,加大电流至1.5 mA,4℃下电泳4~5 h,电泳至溴酚兰指示剂迁移到距胶板下端约1 cm时停止电泳,重复3次。

1.2.3 染色及酶谱记录 称取乙酸- $\alpha$ -萘酯100 mg,溶于5 mL丙酮中,称取坚牢蓝RR盐(固蓝RR盐)200 mg,溶于少量(5~10 mL)丙酮中。将上述2种溶液溶于100 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH7.0的磷酸缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 73.5 mL, 0.2 mol

·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 26.5 mL)中,即为酯酶的染色液,黑暗条件下37℃恒温箱中染色10~60 min至褐色酶带显示。用自来水漂洗,拍照保存,并记录。

1.2.4 电泳资料的统计分析 酶带以“0”和“1”统计建立数据库,对19个品种同工酶酶谱带进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,依据遗传距离DPS 3.1 软件进行树状聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 樱花酯酶同工酶的电泳结果

樱花EST同工酶谱带图(图1)表明,樱花品种

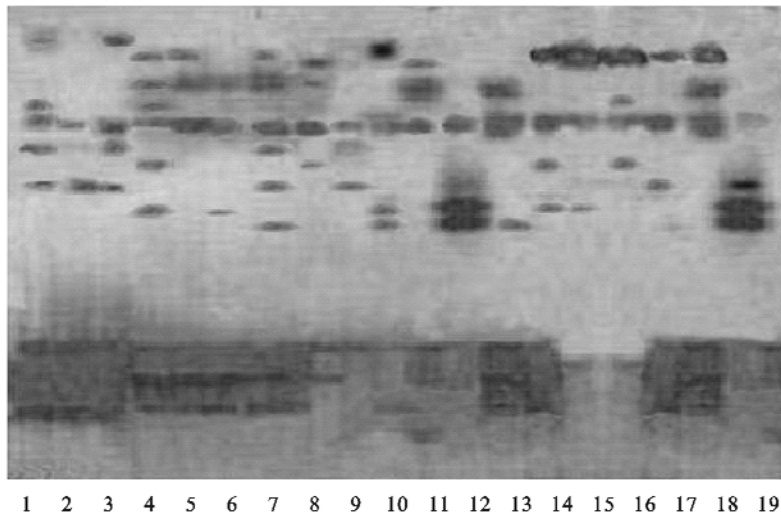


图 1 樱花 EST 同工酶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis zymogram of EST isozyme

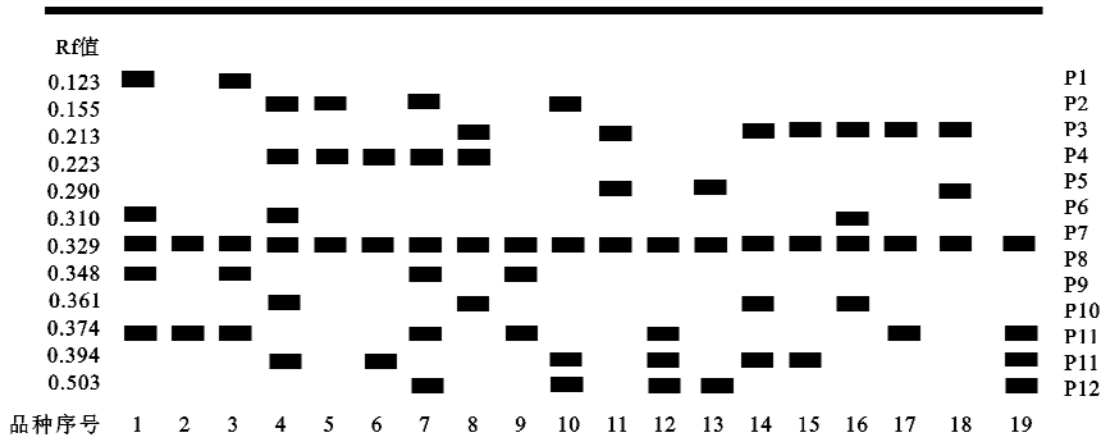


图 2 樱花 EST 同工酶电泳模式图

Fig. 2 Model chart of EST isozyme on cerusus cultivars

不同,其酯酶同工酶酶谱带数目、酶活性强弱各不相同。同工酶从负极到正极共有 12 条酶带,分别称之为 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>……P<sub>12</sub>。其中‘关山’和‘郁金’最多,各 6 条;‘染井吉野’最少,只有 2 条;P<sub>7</sub> 为 19 个樱花品种的基本酶带,这条带显色过程中出现最早、显色最清晰且颜色较深、迁移率相对稳定,为大部分品种所共有(图 2)。品种间差异较大的是 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>10</sub>、P<sub>12</sub> 5 条酶带,它们的有无、活力强弱因品种不同而不同,是品种间的特征谱带。其余 6 条酶带在各品种间存在缺省的情况。

### 2.2 樱花酯酶同工酶的系统聚类

以青岛市樱花的 19 个品种作为分类运算单位,采用系统聚类分析方法中离差平方和法,按照各品种酶谱带数目、R<sub>f</sub> 及其酶活性强弱的差异性,进行编码联机,并绘出各品种酶谱的系统聚类树系图(图 3)。

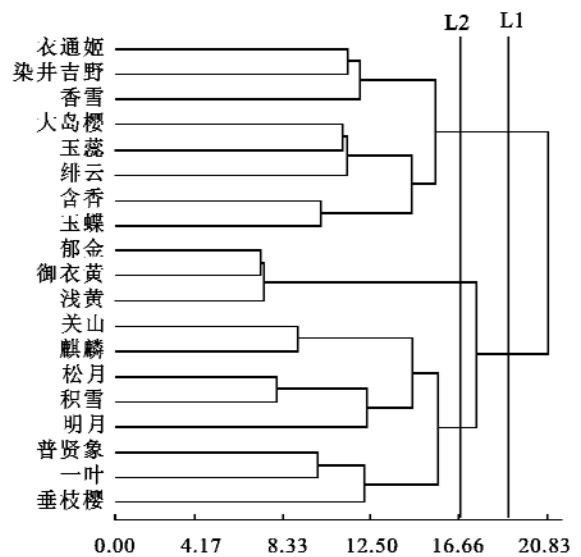


图 3 19 个樱花品种的 EST 同工酶系统聚类图

Fig. 3 The clustering dendrogram of EST isozyme for 19 *Cerasus* cultivars

由图3可以看出,在遗传距离18.63处时,供试19个品种可划分为2个大类群,亲缘关系相对较远。第一类群主要为单瓣品种,包括‘衣通矩’、‘染井吉野’、‘大岛樱’、‘香雪’、‘玉蕊’、‘绯云’、‘含香’、‘玉蝶’8个品种,依起源的不同可以分为两类,第一类包括‘衣通矩’、‘染井吉野’和‘香雪’3个品种;第二类包括‘大岛樱’、‘玉蕊’、‘绯云’、‘含香’、‘玉蝶’5个品种。

第二类群主要为复瓣和重瓣的11个品种,在遗传距离16.66处,该类群又可以分为两类,第一类为绿色花瓣的3个品种,包括‘御金’、‘御衣黄’、‘浅黄’;第二类为红色和粉色花的8个品种。

聚类结果表明,青岛市19个樱花品种的酯酶同工酶聚类结果与赵莉的过氧化物酶同工酶的研究结果基本一致<sup>[8]</sup>。种源、重瓣性和花色可以作为品种分类的指标,有较好的遗传稳定性。

### 3 结论与讨论

酯酶和过氧化物酶是广泛存在于植物体内的重要酶类,在一定程度上反映供试材料间的遗传差异,在农作物<sup>[9]</sup>、草学<sup>[10]</sup>、园艺<sup>[11]</sup>及园林植物<sup>[12]</sup>上都得到广泛应用,是目前检测植物遗传多样性最普遍的方法之一。实验结果证明同工酶在青岛市樱花品种分类上是可行性的,用其作为研究青岛市樱花种质资源的依据具有一定的价值,所得结果与赵莉的形态学和过氧化物酶同工酶分类结果具有一致性<sup>[8]</sup>。赵莉的过氧化物酶同工酶聚类结果以种源、重瓣性和枝姿将19个樱花品种分为不同的类群,本试验中的酯酶同工酶聚类结果则以种源、重瓣性和花色将19个樱花品种分为不同的类群,体现出了花色的遗传性状,而枝姿这一遗传性状在酯酶同工酶研究中没有得到体现。这充分证明了多个酶系统的综合分析,可在一定程度上避免人为影响及单个酶系统分析中的局限性,研究中应多选几种酶,从中找出1种或几种最适合的酶或酶系。

植物的同工酶表现,有着组织器官的特异性及发育阶段的特异性,这对于利用同工酶进行品种鉴定和分类是一个不利因素。但它也存在着相对稳定的时期和适宜的采样部位,研究樱花的同工酶,不能

简单地把酶带的增加或缺失看成基因的增减,而应首先考虑基因表达与否,因此用同工酶检测植物时,要采用不同的取样部位,如叶片、根、茎、树皮、种子等进行比较,使其酶基因产物尽可能表达而被发现。因为成熟的种子酯酶含量较其他器官高,其次是树皮,叶片中含量最少。但部分重瓣樱花品种不结种子,所以,为保持试验材料的统一性,本试验于树体旺盛生长期选用1、2 a生枝的树皮为试验材料,试验过程中也用5月份的成熟叶片为材料进行了对比试验,结果因叶片中酯酶含量较树皮低,所以未得出理想的试验结果。同工酶技术虽存在一定的局限性,但在实际工作中,只要注意排除假象,酶谱还是比较稳定的。将同工酶作为分子水平的指标,用以追溯物种间的历史渊源和亲缘关系有着特殊的意义,这些基因不可能完全代表植物的种性,但它无疑是证实其他研究结果的有力证据之一。

### 参考文献:

- [1] 陈汉斌,郑亦津. 山东植物志(下卷)[M]. 山东青岛:青岛出版社,1997:345-347.
- [2] 王贤荣,向其柏. 樱属植物叶腺体形态研究及其在分类中的意义[J]. 南京林业大学学报,1997,21(4):63-67.
- [3] 王瑾,黄栋,李冬林. 青岛崂山樱属植物的分布种类及资源利用研究[J]. 江苏林业科技,2004,31(3):19-22.
- [4] 王贤荣. 早樱种系的分类及其观赏价值[J]. 南京林业大学学报,2000,24(6):44-46.
- [5] 段晓梅. 冬樱花扦插繁殖研究[J]. 西南林学院学报,2003,23(1):43-46.
- [6] 吕月良,陈璋,施季森,等. 福建山樱花扦插繁殖及其影响因子研究[J]. 福建林业科技,2006,33(2):1-7.
- [7] 孟月娥,李艳敏,赵秀山,等. 日本晚樱组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报,2006,22(10):264-266.
- [8] 赵莉. 青岛市樱花资源调查及品种分类研究[D]. 青岛:莱阳农学院,2005.
- [9] 陶芳,张文明,姚大年. 酯酶同工酶鉴定杂交水稻品种及其亲本纯度的研究[J]. 种子,2007,26(2):28-32.
- [10] 张春,周水红,于海清. 鹅观草属、披碱草属、猫草属和仲彬草属物种的酯酶同工酶分析[J]. 四川农业大学学报,2006,24(2):130-135.
- [11] 周清元,李加纳,殷家明,等. 羽衣甘蓝与其几个近缘种的酯酶同工酶比较[J]. 西南农业大学学报,2004,26(5):535-538.
- [12] 郭凤根,陈娟,王仕玉,等. 云南紫苏资源的酯酶同工酶分析[J]. 中国农学通报,2005,21(5):101-103.