

苦丁茶冬青不同种质材料的酯酶同工酶分析

郑道君^{1,2}, 刘国民^{1,2*}, 何声进², 李娟玲^{1,2}

(1. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228; 2. 海南大学 苦丁茶研究所, 海口 570228)

摘要: 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳比较了苦丁茶冬青共 50 份种质材料酯酶同工酶的酶谱差异, 计算了供试种质材料间的 Jaccard 相似性系数, 并运用 UPGMA 法进行聚类分析。研究结果表明, 供试的 50 份苦丁茶冬青种质材料共显示出其 13 条谱带, 材料间的酯酶同工酶酶谱差异显著, 其具体表现在迁移率、酶带数目和酶带强弱的显著不同, 呈现出丰富的多态性。基于酯酶酶谱的 50 份供试种质材料间的相似系数变化范围在 0.3000~1.0000 之间, UPGMA 法聚类结果与不同种质材料的地理起源有显著的相关性。聚类结果可以把不同地域起源的材料分开, 而同一地域来源的材料则归聚在一起。酯酶同工酶的分析结果可以作为评价苦丁茶冬青种内遗传多样性以及种下类群划分的重要参数之一。

关键词: 苦丁茶冬青; 酯酶同工酶; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)02-0242-08

Esterase isoenzymes analysis of different germplasm materials of *Ilex kudingcha*

ZHENG Dao-Jun^{1,2}, LIU Guo-Min^{1,2*}, HE Sheng-Jin², LI Juan-Ling^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Researches, Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Kudingcha Research Institute, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The difference of esterase isoenzymes of 50 germplasm materials of *Ilex kudingcha* was compared in this thesis by means of polyacrylamid gel electrophoresis. Jaccard similarity coefficient of 50 germplasm materials was calculated, and the UPGMA was used for cluster analysis. The results showed that there were 13 esterase isozymes bands observed in all test materials, esterase isoenzymes of all test germplasm materials were obviously different, which embodied on the ratio of flow (Rf), the number of esterase isoenzymes bands and strong or weak of the bands, which showed abundant polymorphism for *I. kudingcha*. The similarity coefficients among the test materials based on esterase isozymes ranged from 0.3000-1.0000; UPGMA cluster result had better correlation with the origins of germplasm materials, which could distinguish the germplasm materials from different origin and cluster the germplasm materials from the same origin together. The analysis results of esterase isozymes could be considered as one of the significant references for assessing the genetic diversity and the classification of infra-specific taxa of *I. kudingcha*.

Key words: *Ilex kudingcha*; esterase isoenzymes; genetic diversity; cluster analysis

苦丁茶是近年来在我国兴起的一类最有影响的代茶保健饮料。据海南大学苦丁茶研究所收集的资料、标本以及实地考察的统计结果, 目前在不同地区被称作苦丁茶的原植物涉及到至少 12 科 30 个物种

(包括 1 个亚种和 2 个变种)(刘国民, 2003)。其中开发利用较多并形成商品出售的为冬青科冬青属植物和木犀科女贞属植物。在冬青属植物中, 主要有 5 种植物在不同文献、不同地域或不同民族中被称

收稿日期: 2007-11-13 修回日期: 2008-07-28

基金项目: 国家自然科学基金(39860048, 30060040)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(39860048, 30060040)]

作者简介: 郑道君(1979-), 男, 海南海口市人, 硕士研究生, 主要从事苦丁茶种质资源研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: kudingcha_nol@yahoo.com.cn)

之为“苦丁茶”,包括苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha*), 大叶冬青(*I. latifolia*), 枸骨(*I. cornuta*), 五棱苦丁茶(*I. pentagona*)以及霍山冬青(*I. houshanensis*) (刘国民, 1997a, b; 俸宇星等, 1998; 何云核, 2002; 李维林等, 2003; 张灿坤, 1994; 张永田, 1994; 王玉国等, 2000)。苦丁茶冬青在所有各种苦丁茶中目前是人工栽培面积最大, 产品价格最昂贵, 在国内外影响最大, 被认为是“正宗苦丁茶”(刘国民, 2003; 陈兴琰, 1992; 曾沧江, 1981; 吴赵云等, 2002; 陈杖洲, 1996)。近年来苦丁茶冬青种植业发展较快, 而且尚有进一步发展的潜力。但到目前为止, 在生产上大面积推广种植的苦丁茶冬青尚无一个经省级农作物品种认定机构审定的品种, 其种苗仅仅是一个遗传背景十分复杂的混合群体。由于种苗来源的复杂性, 大田植株的抗病性、株型、芽色以及产品的汤色、口感等, 均表现出极大的差异, 严重影响到苦丁茶冬青产品质量和产量, 产业发展后劲不足。因此, 加速培育和推广优质、高产、抗逆性强和性状稳定一致的苦丁茶冬青新品种已成为育种工作者的当务之急。要实现这一目标, 就必须了解各类苦丁茶冬青种质材料的遗传背景和亲缘关系。遗憾的是, 到目前为止, 育种工作者对这方面的了解极为有限。酯酶同工酶具有可重复性, 作为植物亲缘关系和遗传多样性研究的一种手段, 已在多个物种中得到广泛应用(李国强等, 2001; 汤圣祥等, 2002; 刘学诗等, 2005; 邹春静等, 2005; 段中岗等, 2006; 黄琳凯等, 2006; 陈存武等, 2006; 兰秀锦等, 2001)。本文对苦丁茶冬青不同种质材料所进行的酯酶同工酶进行了较系统的分析, 旨在从生化水平上揭示苦丁茶冬青不同种质材料的亲缘关系和遗传多样性, 为苦丁茶冬青今后的育种工作及各类种质材料的原产地鉴定提供遗传背景资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以海南大学苦丁茶种质资源圃中定植的采自海南、广西和广东等省区的 50 份野生苦丁茶冬青种质材料为供试材料, 各份种质材料的编号及采集地如表 1 所示。

1.2 方 法

1.2.1 酶液制备 于上午 9:00 左右摘取嫩叶, 称取 0.4 g, 加入液氮研磨至细粉末状, 迅速转入 1.5 mL

离心管中, 加入 800 μ L 提取缓冲液(25 mL pH7.5 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, 0.28 g 四硼酸钠, 0.08 g 偏亚硫酸氢钠, 0.4 mL 巯基乙醇, 0.01 g EDTA, 25 mL 20% 甘油), 摇匀。于 4 $^{\circ}$ C 条件下 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一离心管中, 加入两滴 0.5% 溴酚蓝, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2.2 电泳及谱带记录 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度 7.5%, pH8.9; 浓缩胶浓度 3%, pH6.7。电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸系统。每个梳孔酶液的上样量为 34 μ L。电泳在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行, 浓缩胶电压为 150 V, 待指示剂迁移至分离胶时电压改为 300 V, 即分离胶电压为 300 V, 电泳约 4 h, 指示剂迁移至距凝胶板下限约 1 cm 处时停止电泳。染色: 染液用前配制, 100 mg 固兰 RR 盐溶于 4 mL 丙酮- β -乙酸萘脂(1 g/100 mL)和 4 mL 丙酮- α -萘乙酸(1 g/100 mL)中, 染色前加入 150 mL 1.0 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH6.0), 置于摇床上于室温条件下染色约 0.5 h。

1.2.3 谱带记录和数据统计 用 hp scanjet 3570c 扫描仪对胶片进行扫描。测量并计算各酶带的迁移率(Rf 值), 根据酶带的迁移率及酶带的强弱绘制酶谱模式图。根据酶谱中某一位置酶带的有无, 有酶带记作“1”, 同一水平位置无酶带记作“0”, 由此生成 0 和 1 原始矩阵。用 NTSYS-PC(2.02j)软件中的 SIMQUAL 程序计算供试材料间的 Jaccard 相似性系数, 并获得相似系数矩阵; 用其中的 SAHN 程序和 UPGMA(unweighted pair group method arithmetic averages)方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶冬青不同种质材料的酯酶酶谱分析

从不同原产地(主要为海南、广西和广东的不同地区)选取了 50 份苦丁茶冬青种质材料(表 1)进行酯酶同工酶分析。这 50 份苦丁茶冬青种质材料的聚丙烯酰胺凝胶酯酶同工酶, 根据酶谱中酶带的迁移率大小和酶带的强弱绘制了酶谱模式图(图版 I)。

由图版 I 看出, 供试的 50 份苦丁茶冬青种质材料间的酯酶同工酶酶谱差异显著, 其具体表现在迁移率、酶带数目和酶带强弱的显著不同, 表现出丰富的多态性。供试的 50 份苦丁茶冬青种质材料共显示出 13 条谱带(即 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L

表 1 苦丁茶冬青种质材料概要
Table 1 Summary of the germplasm materials of *Ilex kudingcha*

| 泳道 Lanes | 编号 No. | 材料来源 Origins | 泳道 Lanes | 编号 No. | 材料来源 Origins |
|----------|--------|------------------|----------|--------|------------------|
| 1 | W-001 | 海南省白沙县青松乡 | 26 | W-035 | 广西平果县新圩乡内洪村大兰屯 |
| 2 | W-002 | 广东省英德市石灰铺镇木榔村 | 27 | W-040 | 广西武鸣县罗波镇四陈村三队 |
| 3 | W-003 | 广东省英德市石灰铺镇木榔村 | 28 | W-044 | 广西宾阳县思陇镇贵龙村公所廖屋村 |
| 4 | W-004 | 广东省英德市石灰铺镇木榔村 | 29 | W-048 | 广西宾阳县思陇镇贵龙村公所廖屋村 |
| 5 | W-005 | 广东省清新县石潭镇大坑村 | 30 | W-049 | 广西宾阳县思陇镇贵龙村公所廖屋村 |
| 6 | W-006 | 广东省清新县石潭镇大坑村 | 31 | W-050 | 广西宾阳县思陇镇贵龙村公所廖田村 |
| 7 | W-007 | 广东省清新县石潭镇大坑村 | 32 | W-051 | 广西宾阳县思陇镇贵龙村公所廖田村 |
| 8 | W-008 | 广东省大埔县大麻镇炭头村 | 33 | W-052 | 广西宾阳县思陇镇贵龙村公所廖田村 |
| 9 | W-009 | 广东省大埔县大麻镇炭头村 | 34 | W-059 | 广西宾阳县思陇镇六盘村公所登山村 |
| 10 | W-010 | 广东省大埔县大麻镇炭头村 | 35 | W-064 | 广西宾阳县思陇镇平安村公所内潭村 |
| 11 | W-011 | 广东省大埔县大麻镇炭头村 | 36 | W-065 | 广西宾阳县思陇镇平安村公所那蒙村 |
| 12 | W-012 | 广东省大埔县大麻镇炭头村 | 37 | W-066 | 广西宾阳县思陇镇平安村公所那蒙村 |
| 13 | W-014 | 广西马山县古零镇羊山村西湾屯 | 38 | W-067 | 海南省白沙县打安乡绍傲村 |
| 14 | W-015 | 广西马山县古零镇乔老村六登屯 | 39 | W-068 | 海南省白沙县打安乡绍傲村 |
| 15 | W-016 | 广西马山县加度乡局仲村覃世雷茶地 | 40 | W-069 | 海南省白沙县打安乡绍傲村 |
| 16 | W-017 | 广西上林县镇圩镇排生屯 | 41 | W-070 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 |
| 17 | W-018 | 广西上林县镇圩镇北凌屯 | 42 | W-071 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 |
| 18 | W-021 | 广西上林县西燕镇寨陆村下寨庄 | 43 | W-072 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 |
| 19 | W-022 | 广西马山县双联乡双联村弄力屯 | 44 | W-073 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 |
| 20 | W-023 | 广西马山县双联乡双联村弄力屯 | 45 | W-075 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 |
| 21 | W-024 | 广西马山县双联乡双联村弄力屯 | 46 | W-077 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 |
| 22 | W-025 | 广西马山县双联乡双联村弄力屯 | 47 | W-080 | 广西上林县镇圩镇排垌村 |
| 23 | W-026 | 海南省白沙县阜龙乡可任老村红岭 | 48 | W-082 | 广西上林县镇圩镇排垌村 |
| 24 | W-034 | 广西平果县坡造乡内理村内理屯 | 49 | W-083 | 广西上林县镇圩镇排垌村 |
| 25 | W-084 | 海南省保亭县七仙岭 | 50 | C-015 | 海南省保亭县七仙岭 |

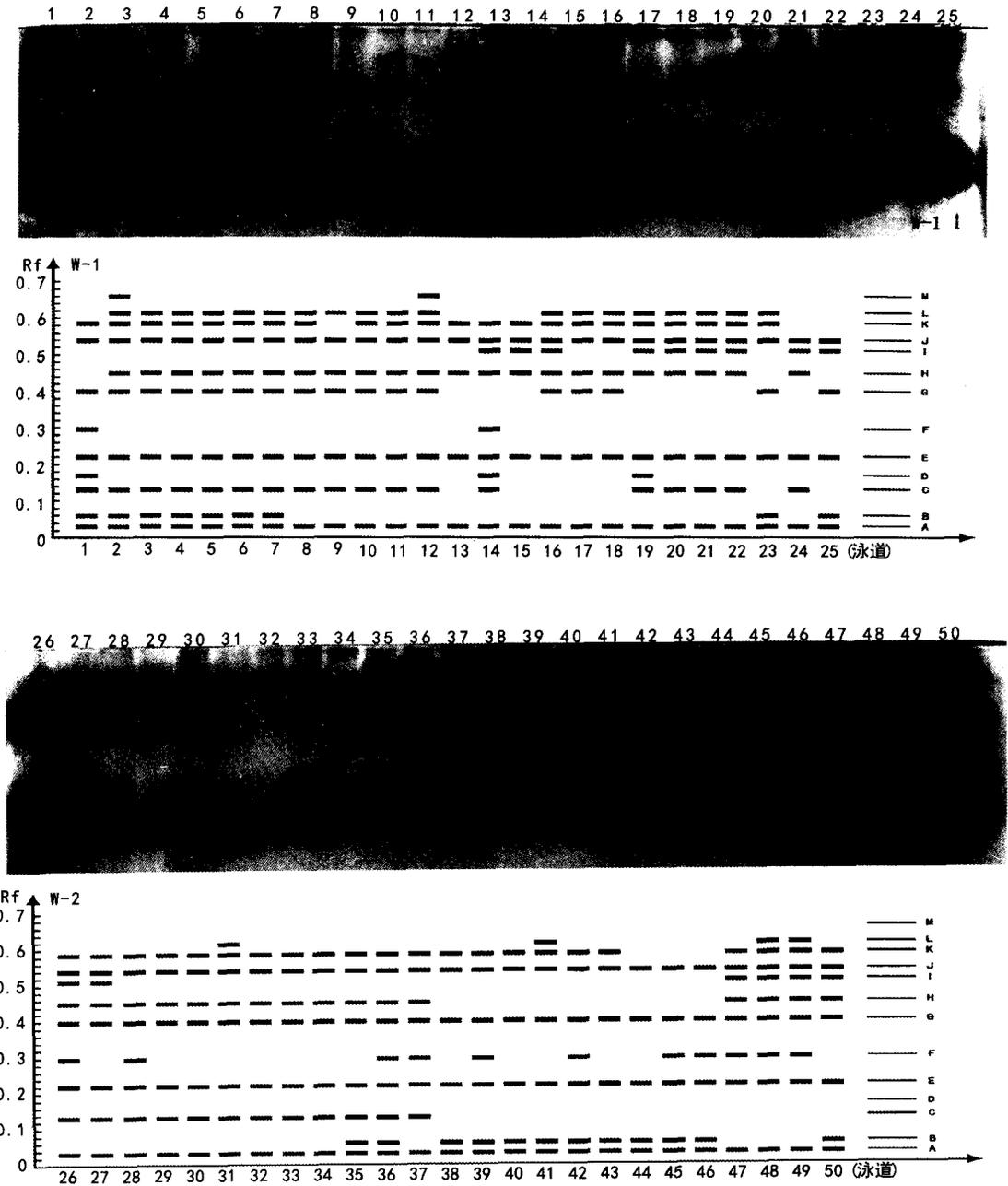
和 M 带), 13 条谱带的 Rf 值在 0.03~0.66 之间, 其中有 3 条谱带是所有供试材料的共有谱带, 即 A 带 (Rf 值为 0.03)、E 带 (Rf 值为 0.21) 和 J 带 (Rf 值为 0.54), 多态性谱带率为 76.9%, 其中 J 带在所有材料中均为强带。在供试的 50 份种质材料中, 来自广东省境内的种质材料所显示的酶带最少, 为 10 条; 产自广西境内的材料显示的酶带最多, 为 12 条。来自海南岛的种质材料显示的酶带次之, 为 11 条; 其中所有来自广西和广东的材料中均出现 H 带, Rf 值为 0.45; 而所有来自海南岛的材料中均缺少 H 带。由于迁移率的差异, 整个酶谱大致上可分为两个区域, 即快区 (Rf 值为 0.40~0.60) 和慢区 (Rf 值为 0.03~0.29)。快区中的谱带相对较清晰, 且大多数为强带, 其中包括了 1 条所有供试苦丁茶冬青种质材料的共有酶带 (J 带) 和 1 条所有来自广西和广东的共有酶带 (H 带)。慢区的谱带较大且相对模糊, 包括了两条所有供试材料的共有酶带 (A 带和 E 带)。从以上分析结果看出, 苦丁茶冬青不同的种质材料之间存在共有的谱带; 而各份材料间的酶谱在迁移率、酶带数目和酶带强弱均存在一定的差异。这一方面说明了这些材料间存在着共同的遗传基础, 或者说, 它们之间有不同程度的亲缘关系; 另一方面也反映了各材料间存

在着不同程度的遗传差异。

2.2 基于酯酶同工酶谱的聚类分析

把 50 份不同地域来源的苦丁茶冬青种质材料的酯酶同工酶谱量化成“0”和“1”二元矩阵, 并由软件生成酶谱相似系数矩阵 (略)。结果表明, 各供试材料酯酶同工酶谱间相似系数的变化为在 0.3000~1.0000, 平均相似系数为 0.6509。由此可见, 供试种质材料间的相似性变化较大, 也就是说它们之间存在较大的遗传差异。此外, 小部分材料间的相似系数为 1.0000, 如 W-026 和 W-070, W-044, W-049 和 W-066, 等。也就是说, 它们的酯酶谱带数和迁移率是完全相同的。

以 UPGMA 法生成聚类分析图 (图 1)。在图 1 中, 苦丁茶冬青种质材料均按起源地域的不同分别聚类, 同时, 不同起源地域种质材料之间的亲缘关系也清晰地显示在图中。当相似系数在 0.5219~0.6216 时, 可以把所有的供试种质材料分为 A、B 两大类群。来自海南岛不同地区的 13 份种质材料, 即海南白沙县阜龙乡的 W-070, W-071, W-072, W-073, W-075 和 W-077, 海南白沙县打安乡的 W-067, W-068 和 W-069, 白沙县青松乡的 W-001 以及海南保亭县的 C-015 与 W-084, 归聚为 A 类群。A 类群中不存在与广



图版 I 50 份苦丁茶冬青种质材料的酯酶同工酶谱
 Plate I Spectra of esteras isozymes of 50 germplasm materials of *Ilex kudingcha*
 泳道编号同表 1, 下同。The lane codes were the same as that showed in Table 1, the same below.

西和广东起源的种质材料形成的交叉聚类。这显然是由于琼州海峡长期的地理隔离所致,使早先原产于海南岛上的苦丁茶冬青种质资源在系统发育过程中没有受到外来基因的影响,在一个比较封闭的体系和一个独特的生态系统中形成一系列特殊的种质材料,这一系列特殊的苦丁茶冬青种质材料在遗传分化上明显有别于来自广东和广西的苦丁茶冬青种质材料。在 A 类群的所有苦丁茶冬青种质材料中,基本上是

按照不同的小地域来源聚类的。其中,来自白沙县阜龙乡和打安乡的 10 份聚为一支,再与来自保亭县的 2 份聚类;来自白沙县青松乡的 W-001,其遗传物质与来自海南其它苦丁茶冬青之间较大的差异,在聚类时,W-001 独立于所有海南岛中的其他苦丁茶冬青种质材料,而单独形成一小支。这一结果可能与 W-001 的原产地独特的地理位置和独特的地形地貌密切相关。据刘国民(1998)实地考察,W-001 这份野生苦丁

茶冬青种质材料,其所在地四周高山林立,交通极为闭塞。原产此地的野生苦丁茶冬青种质材料,极少有机会与海南岛其他地区的苦丁茶冬青种质材料进行基因交流,故在系统发育过程中形成了一支遗传性状明显有别于海南岛境内其他地域的苦丁茶冬青种质材料。从植株的形态特征上也可以明显地观察到这一点,尤其是叶片的形态特征:W-001的叶片较其他海南苦丁茶冬青种质材料要小得多(至少平均小一倍之多),而且其叶缘上的锯齿状缺刻亦不那么粗深,叶背面的侧脉亦不那么凸突。

B类群由来自广东的清新、英德和大埔4个县(市)和广西平果、武鸣、宾阳、上林和馬山5个县共37份苦丁茶冬青种质材料组成。由于这些材料其产地在地理上较为接近,它们在系统发育过程中存在较多基因交流的机会,而且其产地内的气候条件等生态因子也比较接近,因而它们的遗传基础比较接近。从图1可以看出,B类群可分为B-I和B-II两组。其中B-I组又可分为B-I-1和B-I-2两支。B-I-1支又可分为a、b两个分支。a分支均来自广东省境内的种质材料(共11份),包括W-002,W-003和W-004等3份来自广东省英德市石灰埔镇的种质材料,W-005,W-006和W-007等3份来自广东省清新县石潭镇的种质材料,以及W-008,W-010,W-011,W-012以及W-009等5份来自广东省大庾镇的种质材料。除了W-009单独聚类外,a分支中的其他10份材料均是根据自己的原产地分别聚类为“英德—清新小分支”(共6份材料)以及“大埔小分支”(共4份材料)。

b分支中共12份种质材料,除1份来自广西平果县新圩乡(W-035),另一份来自广西武鸣县罗波镇(W-040)以外,其余10份均来自广西宾阳思陇镇,它们分化为两个小分支,每个各5份种质材料。平果县新圩乡毗邻武鸣县罗波镇,而宾阳思陇镇与平果县和武鸣县的两份种质材料的原产地相距较远。因此,在聚类时,W-035(平果)与W-040(武鸣)归聚为一个小分支,而所有供试的宾阳苦丁茶冬青的种质材料(共10份)则归聚为一个与“平果—武鸣小分支”平行的另一个小分支。然后,这两个平行的小分支归聚在一起,组成b分支。

B-I-2支共6份种质材料,均来自广西上林县。其中W-080,W-082和W-083等3份种质材料来自该县镇圩镇排邕村,它们归聚为一个小分支(可称为“排邕小分支”);而W-017(来自上林县镇圩镇排生屯),W-018(来自上林县镇圩镇北凌屯),以及W-021(上林

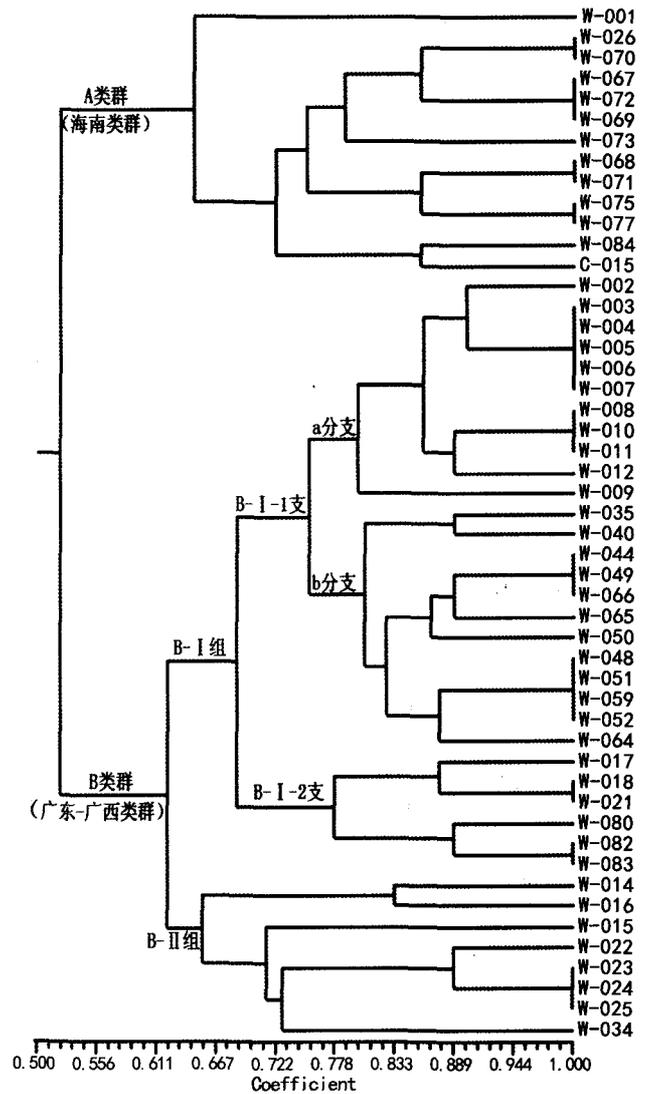


图1 50份苦丁茶冬青种质材料的聚类分析图

Fig. 1 Cluster analysis dendrogram for 50 germplasm materials of *I. kudingcha*

县寨陆村下寨庄)则组成与“排邕小分支”相互平行的另一个小分支,可称为“排生—北凌—寨陆小分支”。

B-II组由8份种质材料组成,除1份(W-034)来自广西平果县外,其余7份均来自广西马山县。其中,W-034(平果县坡造乡内理村内理屯)单独归聚为一个独立小分支,而来自广西马山县双联乡双联村弄力屯的4份种质材料(W-022,W-023,W-024和W-025)归聚为一个小分支,然后再与W-034聚类。平果县坡造乡内理村内理屯与马山县双联乡双联村弄力屯在地理位置上非常接近,考虑到这一因素,这5份分别处于不同行政县的材料(马山县4份,平果县1份)归聚在同一小分支之中,也就很好理解了。W-014

(广西马山县古零镇羊山村西湾屯), W-015(广西马山县古零镇乔老村六登屯)及 W-016(广西马山县加度乡局仲村)这 3 份材料的原产地虽然比较靠近,但由于它们呈零星状散布于 3 个不同的地点,它们之间存在着相对较大的遗传差异,在聚类图中可以将其清晰地区分开来。前述的 4 份马山县双联乡材料,在与平果县坡造乡的 W-034 归聚为一小支之后,再与来自马山县古零镇乔老村六登屯的 W-015 聚类,最后再与 W-014(广西马山县古零镇羊山村西湾屯)及 W-016(广西马山县加度乡局仲村)聚在一起,共同组成 B-II 组。

值得指出的是,图 1 所示的聚类分析图虽然可以把 50 份供试的苦丁茶冬青按照各自的起源地域明确地区分开来,同时能够显示出来自不同地域的种质材料之间的亲缘关系及遗传差异的大小,但同一小地域内的不同种质材料,其个体之间的遗传差异在很多情况下仍不能根据酯酶同工酶多态性的聚类分析来加以区分。例如 A 类群中的 W-067, W-069 以及 W-072 等;又如 B 类群中的 W-003, W-004, W-005, W-006 以及 W-007 等。但这种现象并不能说明这些材料就肯定是重复的种质材料。因为同工酶分析只是一种生化标记,与 DNA 分子水平的多态性相比较,同工酶的谱带所能反映的多态性是非常有限的。而且,在进行 UPGMA 聚类分析时,数据是根据酶谱中某一位置有无酶带来统计,有带作为“1”;同一水平位置无带则作为“0”。因此,这种方法无法反映出酶带的强弱,只有说明其有或无。如果我们对照同工酶酶谱照片就可以看出:某些材料在聚类分析图中虽不能彼此加以区分,但在同工酶酶谱中,其某些酶带的强弱实际上仍有较大差异。如果我们采用 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA), SSR(Simple Sequence Repeat 简单序列重复)或 ISSR(Inter-simple Sequence Repeat, 简单序列重复区间)等基于 DNA 分子水平多态性的分子标记技术,就有可能将这些亲缘关系比较近的种质材料之间的遗传差异,清晰地反映在聚类分析图中。在这方面我们已进行了不少工作,相关的研究结果将陆续公开发表。

3 讨论

3.1 关于同工酶酶谱与聚类分析

同工酶是基因表达的直接产物,在很大程度上能反映植物个体的遗传差异;同工酶结构的相似性反映

了生物间的亲缘关系,酶谱资料可以作为鉴定物种,研究分类、进化、遗传和变异的重要参数(魏秀华等, 2004)。自同工酶技术诞生以来,已有众多学者将同工酶用于植物研究的许多领域。但多数学者对试验结果的分析只停留在直观描述上(徐根娣等, 2002; 朱钧等, 2006)。近些年来,国外和国内许多公司和单位都相继开发了谱带分析软件,简化了繁复的统计计算程序,减少酶谱分析的主观性,使得分析结果更加精确(唐红等, 2003)。本研究结果也充分表明了这一点。目前已有将同工酶研究与聚类分析相结合的报道(张春等, 2006; 于晶等, 2006; 张柯等, 2004; 陈存武等, 2006; 兰秀锦等, 2001),但聚类分析的原始数据多以酶带迁移率为依据;一些学者对同工酶量的影响并未进行分析,或者说他们在聚类分析时并没有综合考虑谱带强弱对聚类分析结果影响(沈镛等, 2004; 郑玉红等, 2003; 黄琳凯等, 2006; 区炳庆等, 2003; 张光花等, 2003)。植物不同个体在不同的生境中或处于不同的生理状态下,其体内的同一同工酶的表达量是有差别的。因此,同工酶谱带的强弱一直以来都是同工酶分析中判断个体差异的重要参数(全妙华等, 2006; 王家保等, 2004)。在聚类分析时如果结合谱带强弱的综合分析,将使结果更准确、客观,可使个体间的差异更加直观表现出来。本课题的研究结果也表明:在聚类分析图中,部分来自同一地域的不同苦丁茶冬青种质材料虽不能彼此分开而显示出个体差异,但在酯酶酶谱中它们某些酶带的强弱仍是有较明显差别。也就是说,这些材料间仍是有遗传差异的,只不过这种遗传差异仅表现在酶带强弱的不同。

3.2 关于广东省英德市、清新县及大埔县(市)的野生苦丁茶冬青与广西南宁地区的野生苦丁茶冬青之间的亲缘关系

据海南大学苦丁茶研究所多次实地考察,广东的野生苦丁茶冬青主要分布在英德市石灰埔镇木榔村,清新县石潭镇的大坑村以及大埔县大麻镇的岌头村。此外,肇庆市鼎湖山一带亦有少量分布。英德、清新和大埔 3 个地点的野生苦丁茶母树有一些共同特点:(1)均是分布于某一个村庄的房前屋后,或村庄附近的旱作耕地旁。因而,严格地说,是处于一种半野生状态。(2)从植株个体大小及长势长相看,同一地点的野生苦丁茶植株,其树龄大致相同。(3)除了这 3 个分布点以外,各点所处的县(市)境内,乃至广东省其他地方均未发现有野生苦丁茶母树分布。在本研究的聚类分析图中,来自广东省上述 3 县(市)共 11

份苦丁茶冬青种质材料组成 a 分支,与之平行的一个分支(b 分支)系由 10 份来自广西宾阳县的种质,1 份广西武鸣县的种质材料(W-040)以及一份广西平果县的材料(W-035)共同组成,然后 a 分支与 b 分支汇合,共同组成 B-I 组中的 B-I-1 支。也就是说,酯酶同工酶分析表明,广东省上述 3 县(市)的种质材料与广西宾阳、武鸣等县一带所产的野生苦丁茶有着比较密切的亲缘关系,广东的这些材料不像海南岛所产的野生材料那样,是单独地归类为一个类群(A 类群),而仅仅是构成一个小分支(a 分支),a 分支在 B 类群中所扮演的是一个非常次要的角色。它需先与 b 分支汇合组成 B-I-1 支;B-I-1 支又需与 B-I-2 支汇合组成 B-I 组;最后,B-I 组才与 B-II 组汇合成 B 类群。从上述实地考察的情况以及聚类分析的结果看,我们可以有根据地推测:广东省英德市、清新县以及大埔县等地的苦丁茶冬青种质材料,有可能是在历史上的某一个时期由广西南宁市附近的宾阳或武鸣等县区域内引种过去的。张凤琴,刘国民等人在对不同省区的苦丁茶冬青种质材料进行 RAPD 分析时也观察到类似的情况,并作出了相似的推论。

4 结论

(1)酯酶同工酶谱的聚类分析结果表明:供试种质材料间的聚类关系与其地理起源呈明显相关性;根据聚类分析图,可以将苦丁茶冬青种质材料清晰地分为两大类群:即 A 类群(海南类群)和 B 类群(广东—广西类群)。(2)供试种质材料个体间的遗传差异不仅表现在酶的带数和迁移率的不同,而且还表现在酶带强弱的不同。不同地域起源的苦丁茶冬青种质材料其酯酶同工酶多态性丰富。(3)酯酶同工酶分析结果可以作为判断苦丁茶冬青不同种质材料的起源地域、遗传多样性和亲缘关系的重要参考依据。

参考文献:

- 于晶,陈君,徐荣,等. 2006. 不同种源黄芩的过氧化物同工酶研究[J]. 中药材,29(7):647—649
- 刘国民. 1997a. 绿色黄金苦丁茶[J]. 植物杂志,136(2):15
- 李维林,郭荣麟,傅晖,等. 2003. 苦丁茶、功劳叶和枸骨的本草考证[J]. 中药材,26(8):595—598
- 陈杖洲. 1996. 开发利用前景广阔的苦丁茶[J]. 茶叶通报,18(3):9—11
- 陈兴球. 1992. 中国皋卢(苦丁)茶的源流及其真伪考[J]. 农业考古,(2):214—218
- Chen CW(陈存武),Zhou SB(周守标). 2006. Isoenzyme pattern analysis for five kinds of enzyme in six species of *Polygonatum* from Dabieshan Mountain(大别山区六种黄精属植物的五种同工酶分析)[J]. *Guihaia*(广西植物),26(4):395—399
- Duan ZG(段中岗),Zheng F(郑枫),Liang CY(梁承邺). 2006. Genetic diversity among different compatible varieties in rice (*Oryza sativa*) using isozyme markers(不同亲和性水稻材料的同工酶遗传多样性分析)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报),14(5):366—373
- Feng YX(俸宇星),Chen SK(陈书坤),Zhao RF(赵瑞峰),et al. 1998. On the identity of Kudingcha in Chinese Holly(*Ilex*)(中国冬青属苦丁茶名实辨证)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报),36(4):353—358
- He YH(何云核). 2002. A new species of the genus *Ilex* from Anhui, China(安徽冬青属一新种)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报),40(4):380—382
- Huang LK(黄琳凯),Zhang XQ(张新全),Ma X(马啸),et al. 2006. Isozyme fingerprint of six varieties of *Lolium multifolium* in south-west China and their genetic background(西南区多花黑麦草品种同工酶指纹图谱的构建及遗传背景分析)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),34(3):426—427,443
- Lan XJ(兰秀锦),Liu DC(刘登才),Wei YM(魏育明),et al. 2001. Diversity of esterase isozyme in *Aegilops tauschii* Cosson(节节麦的酯酶同工酶分析)[J]. *Guihaia*(广西植物),21(1):77—80
- Li GQ(李国强),Wang ZT(王峥涛),Li XB(李晓波),et al. 2001. The isoenzyme analysis of *Isatis* species and its systematic signification(菘蓝属植物的同工酶分析及其系统学意义)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报),10(4):22—28
- Liu GM(刘国民). 2003. Investigations on the species diversity and exploiting situation of the substituting-for-tea plant of Oleaceae in China(中国木犀科代茶植物的多样性与开发状况)[J]. *Guizhou Sci*(贵州科学),21(1—2):69—77
- Liu GM(刘国民). 1997b. A report on the discovery of the wild kuding tea tree in Hainan Island and the observation of its botanic characteristics and properties(海南岛野生苦丁茶树的发现及其植物学特征性的观察)[J]. *Nat Sci J Hainan Univ*(海南大学学报·自然科学版),15(2):129—133
- Liu XS(刘学诗),Liu JX(刘建秀). 2005. Preliminary study on germplasm resources diversity of *Eremochloa ophiuroides* in east China—analysis of isoenzymes(中国东部假俭草种质资源多样性初步研究 IV——同工酶分析)[J]. *J Bio*(生物学杂志),22(2):18—20
- Ou BQ(区炳庆),Ren JJ(任吉君),He LL(何丽烂). 2003. Comparative study of isozymes of peroxidase and polyphenol oxidase in the cultivars of pumpkin(不同品种南瓜 POD 及 PPO 同工酶的比较研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),21(1):77—80
- Quan MH(全妙华),Chen DM(陈东明),Fu M(付明),et al. 2006. Study on peroxidase isoenzyme of winged bean(四棱豆过氧化物酶同工酶的研究)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),22(4):203—205

- Shen D(沈镛), Zhu DW(朱德蔚), Li YX(李锡香), *et al.*. 2004. Analysis of genetic diversity of germplasm resources in taro using five isozymes(用5种同工酶分析云南芋种质资源的遗传多样性)[J]. *J Plant Genet Res*(植物遗传资源学报), 5(3): 239-246
- Tang H(唐红), Lv XR(吕小瑞). 2003. Studies on rapid identification techniques for turfgrass seed varieties. II Computer analysis of peroxidase isozyme bands of cold-season turfgrasses(草坪种子品种快速鉴定技术研究II几种冷季型草坪草过氧化物同工酶谱计算机分析)[J]. *Prat Sci*(草业科学), 20(6): 62-67
- Tang SX(汤圣祥), Jiang YZ(江云珠), Wei XH(魏兴华), *et al.*. 2002. Genetic diversity of isozymes of cultivated rice in China(中国栽培稻同工酶的遗传多样性)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), 28(2): 203-207
- Wang JB(王家保), Jiang CD(姜成东), Li JC(李金成), *et al.*. 2004. Evaluations of 11 wax apple germplasms by isozymes(11份莲雾资源的同工酶评价)[J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 25(2): 15-19
- Wang YG(王玉国), Wei FN(韦发南). 2000. Studies on the micromorphology of a medica plant, *Ilex kudingcha* and its relative species—characters of foliar surface under SEM(药用植物苦丁茶与近缘种的微形态研究——叶表皮特征的扫描电镜观察)[J]. *Guihaia*(广西植物), 20(3): 229-232
- Wei XH(魏秀华), Zhou YH(周永红), Yang RW(杨瑞武), *et al.*. 2004. Study on esterase isozymes of three roegneria(poaceae: triticeae) species and their accessions(鹅观草属三个物种及其居群间的酯酶同工酶分析)[J]. *J Sichuan Agric Univ*(四川农业大学学报), 22(2): 117-120
- Wu ZY(吴赵云), Bao XS(包雪声), Shun QS(顺庆生), *et al.*. 2002. Texture research on the origin of "Ku Ding Cha"(苦丁茶的本草及植物来源考证)[J]. *Shanghai J Trad Chin Med*(上海中医药杂志), (11): 43-44
- Xu GD(徐根娣), Liu P(刘鹏), Qian L(钱丽). 2002. The study of peroxidase isoenzyme and esterase isoenzyme in two species of *Ranunculus*(毛茛属两种植物的过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶的研究)[J]. *J Zhejiang Norm Univ(Nat Sci Edi)*(浙江师范大学学报·自然科学版), 25(1): 62-65
- Zeng CJ(曾沧江). 1981. Contribution to the Aquifoliaceae of China(中国冬青科植物志资料)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 1(1-2): 20-44
- Zhang CK(张灿坤). 1994. Original plants and market drugs investigation of "Kudingcha"(苦丁茶的原植物及商品调查)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 17(5): 14-15
- Zhang C(张春), Zhou YH(周永红), Yu HQ(于海清), *et al.*. 2006. Studies on esterase isozymes among species of *Roegneria*, *Elymus*, *Hystrix* and *Kengyilia* in *Triticeae*(鹅观草属、披碱草属、猬草属和仲彬草属物种的酯酶同工酶分析)[J]. *J Sichuan Agric Univ*(四川农业大学学报), 24(2): 130-134
- Zhang GH(张光花), Xu YF(徐玉芳), Li CX(李春香), *et al.*. 2003. Peroxidase isozyme and cluster analysis of *Allium ascalonicum*, *A. cepa* and *A. fistulosum*(胡葱与洋葱、葱过氧化物酶同工酶研究及聚类分析)[J]. *J Plant Genet Res*(植物遗传资源学报), 4(1): 47-50
- Zhang K(张柯), Ye ZQ(叶镇清), Qiao CL(乔传令). 2004. Genetic diversity of isoenzyme in *Culex pipiens* complex field populations sampling from distinct area of China(不同地区库蚊复种群体的同工酶遗传多样性研究)[J]. *Hereditas*(遗传), 26(2): 172-176
- Zhang YT(张永田). 1994. Which of the origin of "Kudingcha" is really(苦丁茶的原植物)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 32(1): 100
- Zheng YH(郑玉红), Liu JX(刘建秀), Chen SY(陈树元). 2003. Study on diversity of germ plasm of cynodon dactylon in China—[. Analysis of electrophoretic isozyme(我国狗牙根种质资源多样性研究—I. 同工酶分析)[J]. *Grassland of China*(中国草地), 25(5): 52-57
- Zhu J(朱钧), Chen P(陈平), Pan CY(潘翠荫), *et al.*. 2006. Isozyme analysis of esterase and peroxidase in creeping bentgrass new strain(匍匐翦股颖新品系酯酶和过氧化物酶同工酶研究)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 22(12): 213-216
- Zou CJ(邹春静), Sheng XF(盛晓峰), Xu WD(徐文铎), *et al.*. 2005. Isozyme of different ecotypes of *Picea mongolica*(沙地云杉生态沙地云杉生态型同工酶研究)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 11(2): 138-140