

# 用过氧化物酶同工酶对中国葡萄属野生种分类和亲缘关系的研究\*

马之胜

贺普超

(河北省石家庄果树研究所, 石家庄 050061)

(西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

**摘 要** 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对我国葡萄属(*Vitis*) 12 个野生种和变种进行了过氧化物酶(POD)同工酶的研究。结果如下: 绘制了葡萄属的基本酶谱, 共分离出 35 条酶带, 用过氧化物酶同工酶酶谱可把供试材料分为三组。综合同工酶谱和聚类分析的结果, 认为刺葡萄、秋葡萄、复叶葡萄、瘤枝葡萄和华东葡萄是葡萄属中较原始的类型, 山葡萄、燕山葡萄、和麦黄葡萄是较进化的类型, 种的分组与进化和地理分布有关。

**关键词** 葡萄属 过氧化物酶同工酶 基本酶谱 聚类分析

我国是葡萄属植物最重要的原产地之一<sup>[1]</sup>, 种类多, 分布广, 具有抗寒、抗真菌病害等许多宝贵性状<sup>[2~4]</sup>。一些研究者对我国葡萄属植物进行过一些分类和亲缘关系的探讨<sup>[5]</sup>, 但还存在某些争论和不明确的地方。本研究的主要目的是利用过氧化物酶同工酶分析的方法, 对起源于我国的一些葡萄属野生种进行分类, 并探讨它们之间的亲缘关系, 为有效地利用这些资源提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料取自西北农业大学野生葡萄种质资源圃, 共 12 个种和变种的 76 个株系, 所有种类为 8~10 年生嫁接苗, 砧木为欧洲种。各供试材料的种名及株系数如下(秦巴野葡萄和麦黄葡萄是未定名的野生种)。

刺葡萄(*V. davidii* (Roman) Foex.): 7 个株系; 复叶葡萄(*V. piasezkii* Maxim.): 11 个株系; 秋葡萄(*V. romanetii* Roman.): 9 个株系; 瘤枝葡萄(*V. davidii* var. *cyanocarpa* (Gang.) Sarg.): 3 个株系; 华东葡萄(*V. pseudoreticulata* W. T. Wang): 7 个株系; 毛葡萄(*V. quinquangularis* Rehd.): 12 个株系; 秦巴野葡萄(*V. ssp*): 9 个株系; 华北葡萄(*V. bryoniifolia* Bunge.): 3 个株系; 山葡萄(*V. amurensis* Rupr.): 3 个株系; 葡萄(*V. adstricta* Hance.): 3 个株系; 麦黄葡萄(*V. ssp*): 7 个株系; 燕山葡萄(*V. yeshanensis*): 2 个株系。

1997-01-31 收稿。  
\* 国家自然科学基金资助项目部分内容。

## 1.2 方法

1.2.1 样品制备 供试样品均用 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液。具体方法是: 进行过氧化物酶同工酶基本酶谱研究时, 采集不同发育时期的叶片、枝条皮层、卷须、叶柄、花蕾、果实等器官; 进行分类和亲缘关系研究时, 只采集生长健壮的功能叶片。采后用蒸馏水冲洗数次, 滤纸吸干, 然后称取 1g, 加入 2ml 样品提取液, 在冰冻研钵上研至匀浆, 四层纱布过滤, 滤液于 5 000rpm 室温离心 10min, 取上清液备用。

1.2.2 采用聚丙烯酰胺不连续垂直板凝胶电泳 分离胶浓度为 7.2%, pH8.9, 浓缩胶浓度为 4.0%, pH6.7, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统, pH8.3。稳压 220V, 电流为 40~20mA, 4 冰箱中电泳至酶在凝胶上的显现

采用联苯胺-过氧化氢系统。

1.2.4 电泳资料的统计分析 相对迁移率(Rf) 参照 Kuhns<sup>[6]</sup> 的方法计算; 标准遗传距离参考 M. Nei<sup>[7]</sup> 的方法; 依遗传距离用最短距离法进行模糊聚类分析, 绘制动态聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄属过氧化物酶(POD) 同工酶的基本酶谱

通过对葡萄属 12 个种和变种不同的发育时期的叶片、枝条皮层、卷须、叶柄、花蕾、果实等器官进行跟踪生育期 POD 同工酶分析, 经酶谱叠加, 共得到 35 条酶带, 即为葡萄属 POD 同工酶的基本酶谱, 这是在所有葡萄同工酶报道中分离出酶带数量最多的。自负极端依次编号为 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>.....P<sub>35</sub>。依酶带 Rf 值大小、活性及稳定性, 将基本酶谱分为 6 个区(图 1)。区 Rf 范围 0.044~0.250, 酶带分离不清晰; 区 Rf 范围 0.291~0.375, 酶带活性较高; 区 Rf 范围 0.400~0.458, 酶带活性较弱; 区 Rf 范围 0.500~0.708, 酶带分离清晰, 活性强, 其中 P<sub>21</sub>和 P<sub>24</sub>为两条活性极高又较宽的酶带; 区 Rf 范围 0.740~0.825, 酶带分离不清晰; 区 Rf 范围 0.850~0.916, 酶带分离清晰, 活性较高, 该区的 P<sub>32</sub>、P<sub>33</sub>和 P<sub>34</sub>三酶带在所有种类、变种中均有且清晰可见, 为葡萄属过氧化物酶同工酶的特征酶带。

试验中发现, 葡萄属的功能叶片中酶带最丰富, 它包含了枝条皮层、叶柄、卷须、花蕾、果实

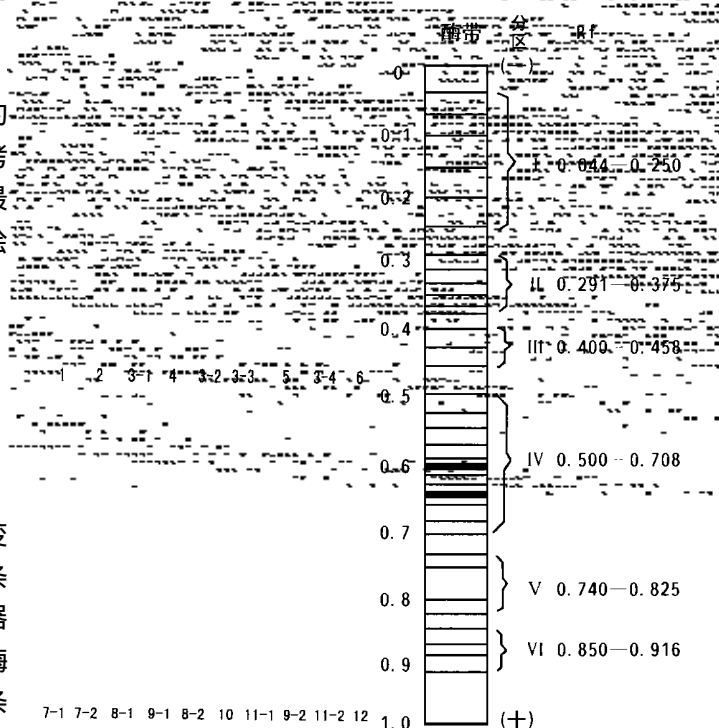


图 1 葡萄属野生种过氧化物酶酶带和基本酶谱

1. 刺葡萄; 2. 秋葡萄; 3—1~4. 复叶葡萄; 4. 麦黄葡萄; 5. 华东葡萄;  
6. 瘤枝葡萄; 7—1, 2. 华北葡萄; 8—1, 2. 毛葡萄; 9—1, 2. 葡萄;  
10. 山葡萄; 11—1, 2. 秦巴野葡萄; 12 燕山葡萄。

中的所有酶带,因此,在进行分类研究时只用功能叶片即可。

2.2 葡萄属种内的同工酶差异

从图 1 可以看出,葡萄属种内的过氧化物酶同工酶差异表现在酶带的数量和活性上,根据此特点,把一些野生种内不同株系加以分组(表 1)。由表 1 可以看出,复叶葡萄株系之间差异最大,华东葡萄、秋葡萄和刺葡萄次之,毛葡萄株系之间差异最小。差异大说明种内的“多型性”强,反之说明“多型性”差。试验中还发现属于不同种的个体,它们的酶谱却又相似的事实,这说明种间种内的酶谱是极为复杂的,同时也反映出种内个体的分化和种间关联。

2.3 用过氧化物酶同工酶酶谱对供试材料分类

表 1 过氧化物酶同工酶  
对几个葡萄野生种种内分组

根据电泳酶谱结果,难于把每个供试种类单独分开,依同工酶酶谱类型和酶带的活性,可把供试材料分为以下三组:

种 类	株 数	数 分 组	种 类	株 数	数 分 组
复叶葡萄	11	11	麦黄葡萄	7	3
华东葡萄	6	4	秦巴野葡萄	9	3
秋 葡 萄	9	5	毛 葡 萄	12	2
刺 葡 萄	7	4			

第一组:刺葡萄、秋葡萄、复叶葡萄、瘤枝葡萄和华东葡萄。该组酶带丰富,酶谱类型多,均有  $P_{21}$  和  $P_{24}$  两条酶带。

第二组:华北葡萄、毛葡萄、麦黄葡萄、秦巴野葡萄和 葡萄。该组酶带较丰富,均不具有  $P_{21}$  和  $P_{24}$  两条酶带。

第三组:山葡萄、燕山葡萄。该组酶带少,其中少部分株系有  $P_{21}$  和  $P_{24}$  两条酶带。

第一组主要分布于华中、华东地区,有的延伸到华南、西南和西北地区;第二组主要分布于华北、西北地区;第三组主要分布于东北、华北地区。由此可见,组的划分与地理分布有关。

2.4 葡萄属种间的亲缘关系

2.4.1 酶带表型频率 各酶带表型频率的差异形成了种间酶谱的差异。有些酶带在某些种内有较高的表型频率,而在另一些种中则表现较低,甚至不表现。如  $P_{35}$  酶带除了在麦黄葡萄和葡萄中不表现,在山葡萄中表型频率相对较低外,在其它供试种类中均有很高的表型频率。 $P_9$ 、 $P_{20}$ 、 $P_{22}$  和  $P_{25}$  酶带在瘤枝葡萄中没有显现,在其它种中表型频率都较高。其它酶带也有类似情况。

2.4.2 标准遗传距离 依 Nei 氏方法计算的标准遗传距离见表 2。标准遗传距离能反映葡萄属种间的遗传差异和亲缘关系,遗传距离越大,亲缘关系越远,反之,遗传距离越小,亲缘关系越近。葡萄属种间的遗传距离大都集中于 0.0400~0.2500 之间,说明其种间亲缘关系是很近的。但不同种间的遗传距离差异也很大,秋葡萄和刺葡萄的遗传距离最小(0.0466),葡萄和瘤枝葡萄的遗传距离最大(0.4698),两者相差近 12 倍,这又说明,葡萄属植物种的分化历史是比较远的。

2.4.3 模糊聚类分析 为了更好了解葡萄属种间的分类和亲缘关系,按最短距离法进行聚类,得到葡萄属野生种动态聚类图(图 2)。从图中可以看出:(1)刺葡萄、秋葡萄、复叶葡萄、瘤枝葡萄、华东葡萄和华北葡萄六者亲缘关系较近,而与其它一些种的亲缘关系较远。(2)图 2 中从左到右基本上是葡萄属野生种地理分布的情况,左边的几个种分布于东北、西北和华北地区,右边的几个种、变种主要分布于华中、华南和西南地区,有的延伸到西北地区,中部的几个种主要分布于西北和华北地区,这说明种、变种的亲缘关系与地理分布有关。

表 2 葡萄属种间标准遗传距离

种类	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
(1)刺葡萄	0											
(2)秋葡萄	0.0466	0										
(3)复叶葡萄	0.0542	0.0651	0									
(4)瘤枝葡萄	0.1319	0.1004	0.0919	0								
(5)华东葡萄	0.1415	0.1034	0.0953	0.1248	0							
(6)华北葡萄	0.1479	0.1343	0.1191	0.2241	0.0607	0						
(7)秦巴野葡萄	0.1410	0.1669	0.1712	0.3472	0.2331	0.1006	0					
(8)毛葡萄	0.2147	0.2283	0.1993	0.3583	0.1594	0.1167	0.1070	0				
(9)燕山葡萄	0.1352	0.1227	0.1338	0.2337	0.1233	0.1966	0.2298	0.3373	0			
(10)麦黄葡萄	0.1491	0.1365	0.1546	0.3000	0.2027	0.1253	0.1286	0.1450	0.2374	0		
(11)葡萄	0.2510	0.3309	0.2519	0.4698	0.2874	0.1989	0.1628	0.2284	0.2615	0.1435	0	
(12)山葡萄	0.1930	0.2524	0.2886	0.3400	0.1768	0.2209	0.1849	0.2214	0.3221	0.1705	0.1818	0

依据同工酶进化理论, 结合同工酶谱和聚类分析的结果, 认为刺葡萄、秋葡萄、复叶葡萄、瘤枝葡萄、华东葡萄是葡萄属较为原始的类型, 山葡萄、燕山葡萄、和麦黄葡萄为较进化的种。

3 结论与讨论

本试验分离出葡萄属过氧化物酶同工酶带 35 条, 这是在所有葡萄属同工酶报道中最多的, 绘制了基本酶谱, 其中 P<sub>32</sub>、P<sub>33</sub>、P<sub>34</sub> 为葡萄属的特征酶带。基本酶谱的绘制有助于从整体上把握葡萄属的酶谱特点。

葡萄属不同的种具有明显的种内“多型性”, 复叶葡萄的“多型性”最明显, 华东葡萄、刺葡萄、秋葡萄等次之, 毛葡萄最不明显, 同时, 不同种间的株系酶谱又互相交叉, 这意味着种内的分化和种间的关联。

过氧化物酶同工酶是进行葡萄属野生种分类的亲缘关系研究较为理想的酶系。葡萄属种间差异大于种内差异。用过氧化物酶同工酶酶谱不能把供试的种类都单个分开, 只能分为三组, 组的划分与地理分布有关。葡萄属种间 Nei 氏标准遗传距离较小, 说明葡萄属野生种间亲缘关系是很近的。

刺葡萄、秋葡萄、复叶葡萄、瘤枝葡萄和华东葡萄是葡萄属中较原始的类型, 山葡萄、燕山

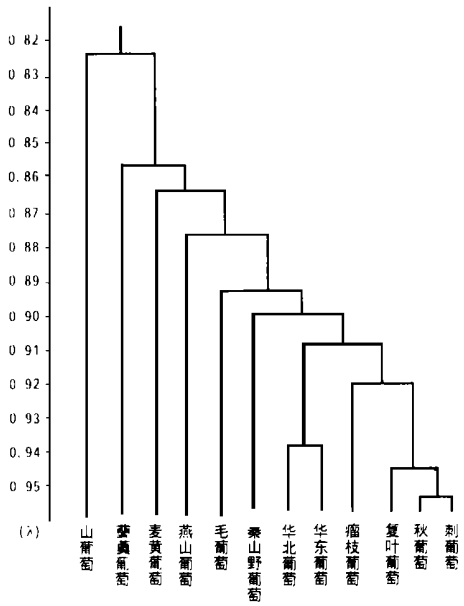


图 2 中国葡萄属野生种动态聚类图

葡萄、葡萄和麦黄葡萄是较进化的类型。种的亲缘关系与地理分布有关。

### 参 考 文 献

- 1 左大勋, 袁小苇. 我国葡萄属植物资源的地理分布及利用. 见: 南京中山植物园论文集. 南京: 江苏科技出版社, 1981, 25~31
- 2 贺普超, 牛立新. 我国葡萄属野生种抗寒性的研究. 园艺学报, 1989, 16(2): 81~88
- 3 贺普超, 王国英. 我国葡萄属野生种霜霉病抗性的调查研究. 园艺学报, 1986, 13(1): 17~24
- 4 贺普超, 王跃进. 中国葡萄属野生种抗白腐病的鉴定研究. 中国果树, 1988, (1): 5~8
- 5 晁无疾, 袁志发. 我国葡萄属植物分类和亲缘关系的探讨. 西北农业大学学报, 1990, 18(2): 7~11
- 6 Kuhns LJ, et al. Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis I. Extraction and storage of protein and active enzymes from rose leaves. J Amer Sci, 1978, 103(4): 503~508
- 7 Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. New York: Academic Press, 1975, 86

## A Study on the Taxonomy and Relationship of Wild Vitis Native to China with POD Isozyme

Ma Zhisheng

(Shijiazhuang Pomology Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061)

He Puchao

(Northwestern Agricultural University, Yangling 712100)

**Abstract** Peroxidase (POD) was used together with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the tests of 76 clone of 12 wild vitis species and varieties native to China. The results are as follows: <sup>1</sup> A basic zymogram of POD isozyme was drawn based on functional leaves of vitis, and 35 iso-POD bands were found in the zymogram. <sup>④</sup>12 species and varieties were divided into 3 groups on the basis of the POD isozyme zymogram. <sup>(四)</sup>The analysis of the isozyme zymogram and the cluster analysis suggested that *V. davidii*, *V. romanetii*, *V. piasezkii* and *V. pseudoreticulata* belonged to the primitive category, and *V. amurensis*, *V. yeshanensis* and *V. adstricta* evolutionary category. <sup>¼</sup> The grouping and evolution of species was related to their geographical distribution.

**Key words:** Vitis; Peroxidase (POD); Isozyme; Basic zymogram; Cluster analysis