

杂交兰种间及杂交后代同工酶活性和蛋白质电泳测定与分析

朱庆松¹, 张景华², 王广东³, 赵海英⁴

(1. 信阳农业高等专科学校, 河南 信阳 464000; 2. 确山县农业局, 河南 驻马店 463200;

3. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 4. 信阳市农业科学研究所, 河南 信阳 464000)

摘要: 试验测定了杂交兰亲本及其杂交 F₁ 代的 POD、SOD、CAT 的酶活性, 并分析了 EST 和蛋白质的电泳图谱。结果表明: 亲本及杂交 F₁ 代 POD、SOD、CAT 同工酶活性, 母本的酶活性低于父本; F₁ 代株系中 POD、CAT 的差异比较明显, SOD 的差异较小。由 EST 电泳酶谱可知母本有 3 条明显的酶带, 父本有 2 条酶带, F₁ 代出现了丰富的变异, 具有亲本酶带特征的 F₁ 代株系约占 33.3%。通过亲本及杂交 F₁ 代蛋白质 SDS-PAGE 电泳表明, 父本比母本多 6 条较弱的酶带, F₁ 代中比母本多 2 条较弱谱带的占 15.8%; 其余的与母本相同。

关键词: 杂交兰; 杂交 F₁ 代; 同工酶活性; 酶带

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0129-04

现兰花育种技术已日益成熟, 通过杂交育种、诱变育种、体细胞杂交、基因工程育种、转基因等方法获得了许多品种。英国权威的“散氏兰花杂种登记目录”(Sander's List of Orchids Hybrids)正式登记的人工杂交选育新种已达 50 000 个以上, 且每年都以 1 000 种以上的数目在增加^[1]。但是国内外很少有关于兰科植物杂交后

代生理生化特征研究的报道。在植物形态建成过程中其生理生化特征出现明显变化, 如蛋白质的组分、酶的活性及成分等, 同时这些指标与植物的遗传性密切相关, 通过杂交育种, 其亲本与杂交后代之间存在明显的差异, 而且这些指标与植物的抗逆性有着紧密的联系, 通过对这些指标的研究, 可从其后代中选出具有育种目标所要求的具有较强抗逆性的株系, 从而为新品种的选育奠定基础。

在植物生理生化的这些指标中, 同工酶是基因表达产物, 其功能相同但结构及组成存在差异, 间接地反映

第一作者简介: 朱庆松(1976-), 男, 河南信阳人, 硕士, 讲师, 现主要从事园艺植物的露地栽培和设施栽培研究工作。

收稿日期: 2010-10-11

Establishment of Effective Regeneration System of *Brassica rapa* in vitro

PEI Dong-li^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions Department of Life Science Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 47600; 2. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: Cotyledons and hypocotyls of *Brassica parachinensis* subspecies of *Brassica rapa* were used as explants to study the effect of different concentration ratio of NAA and 6-BA on *Brassica parachinensis* tissue culture. The results showed that the best regeneration medium for cotyledons and hypocotyls of *Brassica parachinensis* were MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L and MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L respectively. The best root medium of adventitious buds was MS+NAA 0.2 mg/L. It was also discussed the influence of the concentration of AgNO₃ on *Brassica parachinensis* tissue culture. The high inducement frequency of shoot regeneration was gained by addition of AgNO₃ in the medium.

Key words: *Brassica rapa*; plant regeneration; tissue culture

了物种的遗传信息,是一种良好的遗传标记。因而蛋白质标记已被广泛用于物种起源与进化、分子遗传图构建、种质鉴定和分类等领域^[2]。该试验通过分析杂交后代株系中蛋白质的组分、酶的活性及成分等指标与亲本之间的差异,比较不同株系的遗传性,分析对逆境条件的抵抗和适应能力,为通过远缘杂交选育出具有抗逆性较强的兰花新种质提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以杂交兰“韩国桃花”(大花蕙兰×墨兰)为母本,蕙兰为父本的种间远缘杂交获得的杂交种子无菌播种后的F₁代植株群体为材料。已经分化F₁代植株在MS培养基上进行培养,植株生长的培养基为1/2MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,琼脂粉5.6 g/L,糖20 g/L, pH 5.4;培养温度为(25±2)℃,光照强度1 000 lx,光照时间16 h/d。随机选取F₁代20个株系组培苗的叶片。

1.2 试验方法

1.2.1 酶液的制备 准确称取亲本及F₁代20个株系的叶片0.2 g,加4 mL 50 mmol/L、pH 7.0 PBS(含10% PVP),冰浴研磨,于15 000 r/min低温4℃离心20 min,取上清液供游离态POD、SOD、CAT活性测定用。

1.2.2 POD活性测定 参照李合生的方法^[3]。采用氧化愈创木酚法测定。测定时取0.1 mL酶液加反应混合液3 mL混匀,对照为0.1 mL 50 mmol/L、pH 7.8 PBS加反应液3 mL。迅速颠倒混匀后,用UVP软件动态测定A₄₇₀值45 s,分别记录10 s及40 s时的数值,并计算差值。POD活性以 $\Delta A_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$ 表示。POD活性按下式计算:POD活性=($\Delta A_{470} V_T$)/(0.01W·V₁·T)。以1 min内 ΔA_{470} 变化0.01为1个过氧化物酶活性单位(U)。V_T表示提取液总体积(mL);V₁表示测定时去用酶液体积(mL);T表示反应时间(min)。

1.2.3 SOD活性测定 参照李合生的方法^[3]。反应介质为50 mmol/L(pH 7.8)PBS,内含750 μmol/L NBT,0.1 mmol/L EDTA,130 mmol/L Met。20 μmol/L核黄素溶液(用0.1 mmol/L EDTA的50 mmol/L、pH 7.8的PBS配制)。将1个对照管置于黑暗中,测定时做空白。其它各管在4 000 lx光照20 min后,测定A_{560 nm}。SOD酶活力按下式计算:SOD酶活力=($\Delta A \cdot V_T$)/($\Delta A_k \cdot W \cdot T \cdot V_1 \cdot 50\%$)。公式中,酶活力单位(U)为1 h内1 g鲜重的酶活单位数。式中: ΔA 为 $\Delta A_k - \Delta A_E$ 的差值;V_T=提取酶液的总体积;W为样重;T为光照时间20 min;V₁为加入酶液总体积。

1.2.4 CAT活性测定 采用过氧化氢氧化法测定^[4],

结果计算:以1 min内A₂₄₀减少0.1酶量为1个酶活力单位(U)。过氧化氢酶活性=($\Delta A_{240} \cdot V_T$)/(0.1 V₁·t·W);式中:V_T—粗酶提取液总体积(mL);V₁—测定用粗酶液体积(mL);W—样品鲜重(g);T为反应时间;0.1— ΔA_{240} 每下降0.1为1个酶活单位(U)。

1.2.5 EST的电泳 分别称取亲本及杂交后代的叶片0.5 g,用1.5 mL的电泳缓冲液(Tris-HCl,pH 6.8)在预冷的研钵上冰浴研磨,然后12 000 r/m离心20 min,上清液为同工酶的粗提液,取此液0.5 mL加入等体积样品处理液,混匀后贮于冰箱备用。参考聚丙烯酰胺凝胶电泳法,为避免影响酶活性将凝胶中的过硫酸铵改为核黄素,并采用光照聚合。垂直平板电泳,每齿点样20 μL,4℃恒温稳流电泳,电泳时浓度胶90 V,分离胶160 V,待指示剂到达分离胶末端1 cm处结束电泳。酯酶同工酶显色^[5]:称取50 mg的α-醋酸萘酯+50 mg的β-醋酸萘酯+100 mg 坚牢蓝RR(或坚牢蓝B),先用约5 mL丙酮溶解,再用0.1 mol/L磷酸溶液(pH 5.0)稀释至150 mL。将胶板浸入100 mL上述液中,37℃下保存约1 h,去染色液,用蒸馏水漂洗,再用7% HAC固定。

1.2.6 SDS的电泳 取上述的上清液0.5 mL加入等体积的SDS样品缓冲液混合均匀,与沸水中保温3~5 min,冷却后分装-20℃保存备用。SDS-PAGE电泳方法参考萨姆布鲁等方法,采用4%浓缩胶,10%分离胶;电泳时,凝聚胶中的电压为80 V,分离胶中的电压为120 V。染色方法参考《分子克隆实验指南》^[6]。

2 结果与分析

2.1 亲本及杂交F₁代POD、SOD、CAT同工酶活性

由表1可知,不同F₁代株系POD的活性存在明显差异。其中有50%株系的POD活性在亲本的POD活性范围内,有株系d5、d7、a4、a8、a9、a16、a21、b31、c16、c20、c29;有约4.5%的株系高出亲本,包括:d1;低于亲本的株系有:d4、a24、a31、a39、a41、c4、c8、c9、c34,约占总株系的40%。d2与父本相近,约4.5%。

不同F₁代株系SOD的活性存在差异,90%的株系SOD活性明显的低于亲本,仅有10%的介于两亲本之间,有株系d4、b31。不同F₁代株系SOD的活性差异比较小。

CAT的活性在亲本及F₁代株系中有明显的差异。超出亲本的株系有:d1、d5、d7、a4、a9、a16、a31、b31、c29、c34等,约占45.5%;低于亲本的有d4、a21、a39、a41、c4、c8、c9等,约占31.8%;介于亲本之间的有:d2、a8、a24、c16、c22等,约占22.7%。

表1 亲本及其 F₁ 代 POD、SOD、CAT 活性差异分析

材料	POD 活性	SOD 活性	CAT 活性
	/U ° g ⁻¹ ° min ⁻¹	/U ° g ⁻¹ ° min ⁻¹	/U ° g ⁻¹ ° min ⁻¹
1. 母本	5 479 defghi	149. 7b	205. 6bcde
2. 父本	10 000ab	177. 2a	234. 3bcd
3. D ₁	10 800a	122. 5defg	323. 0a
4. D ₂	8 233bc	129. 1cde	189. 6cdef
5. D ₄	3 922ghi	144. 7bc	182. 6cdef
6. D ₅	6 421cdefgh	124. 4def	323. 7a
7. D ₇	6 941cdef	121. 2defg	323. 2a
8. A ₄	6 053cdefghi	126. 2def	270. 8ab
9. A ₈	7 873bcd	123. 0defg	231. 4bcd
10. A ₉	6 446cdefgh	122. 8defg	274. 7ab
11. A ₁₆	6 136cdefghi	118. 0efgh	253. 3abc
12. A ₂₁	4 809efghi	119. 0defgh	171. 8def
13. A ₂₄	3 563i	122. 3defg	217. 7bcd
14. A ₃₁	3 782hi	111. 5efghi	233. 7bcd
15. A ₃₉	3 946ghi	107. 8fghi	163. 3def
16. A ₄₁	3 705i	115. 2efghi	222. 7bcd
17. B ₃₁	6 560cdefg	136. 7bcd	274. 6ab
18. C ₈	3 891ghi	88. 7j	136. 2ef
19. C ₉	4 710efghi	98. 3ij	136. 9ef
20. C ₁₆	7 218cde	121. 0defg	224. 4bcd
21. C ₂₂	6 403cdefgh	117. 1efgh	267. 5ab
22. C ₂₉	6 738cdef	105. 3ghij	312. 7a
23. C ₃₄	4 470fghi	101. 6hij	271. 5ab

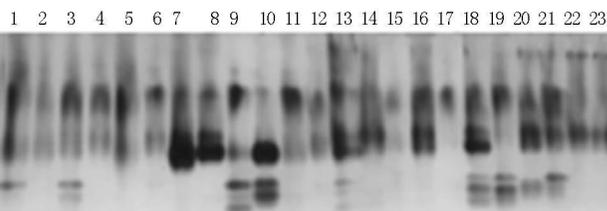
注:表中数据后不同字母代表 $P < 0.05$ 的差异显著性。

2.2 亲本及杂交 F₁ 代 EST 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

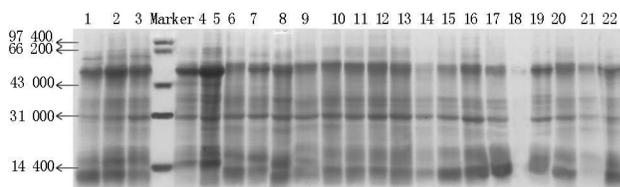
亲本及杂交 F₁ 代 EST 聚丙烯酰胺凝胶电泳见图 1。可以看出母本有 3 条酶带, 父本有 2 条明显的酶带, F₁ 代出现了丰富的变异。具有亲本酶带特征的 F₁ 代株系, 约占 33.3%。具有 3 条酶带的株系有 3 个, 约占 14.3%; 具有 2 条酶带的株系有 2 个, 约占 9.5%; 具有 1 条酶带的株系有 2 个, 约占 9.5%, 未出现酶带的约占 66.7%。此表明 F₁ 代出现了丰富的变异。

2.3 亲本及杂交 F₁ 代蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析

亲本及杂交 F₁ 代蛋白质 SDS-PAGE 电泳见图 2。父本的可溶性蛋白质表达量高于母本, 且 F₁ 代株系的蛋白质含量均在亲本之间的变异范围内, 未出现超亲株系。亲本及 F₁ 代均存在有分子量约为 50、31、15、13 KD 左右的蛋白质, 即具有 4 条相同的强谱带; 父本具有分子量约为 60 和 66 KD 的蛋白质, 即在 50~66 KD 之间比母本多 2 条较弱的谱带, F₁ 代中 d₄、d₅、d₆、e₉ 具有此谱带, 其余的不明显; 在 40~31 KD 之间, 亲本及 F₁ 代具有 3 条相同较弱的谱带; 在 31~14 KD 之间, 父本具有 4 条较弱的谱带, 母本不明显, F₁ 代中不明显。父本比母本多 6 条较弱的谱带, F₁ 代中比母本多 2 条较弱谱带的占 15.8%; 其余的与母本相同。株系具有共同谱带越多, 则亲缘关系越近; F₁ 中株系具有与父本相同的谱带多, 则遗传倾向于父本, 相反则遗传倾向于母本。

图1 亲本及其杂交 F₁ 代株系的 EST 电泳图

注: 1; a₄、2; a₈、3; a₉、4; a₂₁、5; a₂₄、6; a₃₃、7; a₄₀、8; a₄₁、9; 母本、10; 父本、11; c₄、12; c₇、13; c₈、14; c₉、15; c₁₆、16; c₁₈、17; c₂₂、18; c₃₂、19; c₃₄、20; d₄、21; d₅、22; d₆、23; d₇、12; c₇、13; c₈、14; c₉、15; c₁₆、16; c₁₈、17; c₂₂、18; c₃₂、19; c₃₄、20; d₄、21; d₅、22; d₆、23; d₇。

图2 亲本及其杂交 F₁ 代株系的蛋白质 SDS-PAGE 电泳

注: 1; d₄、2; d₅、3; d₆、4; 母本、5; 父本、6; a₄、7; a₈、8; a₉、9; a₂₁、10; a₂₄、11; a₄₀、12; a₄₁、13; c₄、14; c₇、15; c₈、16; c₉、17; d₆、18; 空白、19; c₁₈、20; c₂₂、21; c₃₃、22; c₃₄。

3 讨论

亲本及杂交 F₁ 代 POD、SOD、CAT 同工酶活性存在差异, 母本的酶活性低于父本。F₁ 代株系中 POD、CAT 的差异比较明显, SOD 的差异比较平缓。由于在保护酶系中 SOD 能将 O^T 清除为 H₂O₂, 而 POD、CAT 可把 H₂O₂ 变为 H₂O, 由于它们协调一致的作用, 可使活性氧维持于一个较低的水平^[7]。水分胁迫环境下, 有些抗旱植物体内的 POD 酶活性上升, 不抗旱的下降; 有些植物体内的 POD 酶活性可能都下降, 但是在同样胁迫程度条件下抗旱的植物 POD 酶活性下降的幅度较小; 抗逆性强的植物在逆境下, SOD 活性降低幅度小或者保持相对稳定, 因而避免或减轻了活性氧引起的伤害^[8]。

亲本及杂交 F₁ 代 EST 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果表明, F₁ 代株系出现了丰富的变异, 具有亲本酶带特征的 F₁ 代株系, 约占 33.3%。同工酶通过电泳产生的谱带通常有 3 种类型, 互补型、偏亲型和杂种型。互补型的谱带在所有杂交种中均会出现, 一般杂交种中某 2 条或数条谱带, 1 条来自母本, 另 1 条来自父本; 偏亲型即杂交种谱带同亲本相似; 杂种型则是在杂交种中出现 1 条或数条在双亲中均没有的谱带, 也只有杂种才能具备新产生的谱带, 通过互补型和新谱带型就可以鉴定品

种和测定杂交种子纯度^{9,12}。

亲本及杂交 F₁ 代蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果表明, 父本的可溶性蛋白质的表达量高于母本, 且 F₁ 代株系的蛋白质表达量均在亲本之间的变异范围内。父本比母本多 6 条较弱的谱带, F₁ 代中比母本多 2 条较弱的谱带占 15.8%, 其余均与母本相同。株系具有共同谱带越多, 说明其蛋白质组成越接近, 系统发育上亲缘关系愈密切¹³; F₁ 中株系具有与父本相同的谱带多, 则遗传倾向于父本, 相反则遗传倾向于母本。

4 结论

亲本及杂交 F₁ 代 POD、SOD、CAT 同工酶活性存在差异, 母本的酶活性低于父本, 且 F₁ 代株系中有明显的差异。

亲本及杂交 F₁ 代 EST 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, F₁ 代株系出现了丰富的变异, 母本有 3 条酶带, 父本有 2 条明显的酶带, 具有亲本酶带特征的 F₁ 代株系约占 33.3%。

亲本及杂交 F₁ 代蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果表明, 父本的可溶性蛋白质的表达量高于母本, 且 F₁ 代株系的蛋白质表达量均在亲本之间的变异范围内。亲本及 F₁ 代均存在有分子量约为 50、31、15、13 KD 左右的 4 种蛋白质, 即具有 4 条相同的强谱带; 在 40~31 KD 之间, 亲本及 F₁ 代具有 3 条相同的较弱的谱带; F₁ 代中比

母本多 2 条较弱谱带的占 15.8%。

参考文献

- [1] 李杰. 几种名贵洋兰转基因受体系统的建立及遗传转化[D]. 南京: 南京林业大学, 2005: 1-4.
- [2] 陈丽静. 番茄 AFLP 分子遗传连锁图谱的构建及抗病基因 Multi-caps 标记识别体系建立[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2006: 8.
- [3] 李合生. 现代植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-165, 167-169.
- [4] 赵晓玲. 馆溪蜜柏(*Citrus grandis*(L.) Osbeck. cv. guanxi miyou) 成熟阶段粒化过程的若干生理生化变化[D]. 福建: 福建农林大学, 2007: 33-34.
- [5] 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(1): 30-33.
- [6] 萨姆布鲁克 J. 拉塞尔著 D. W. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(下册)[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1713-1722.
- [7] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 419-420.
- [8] 郎南军. 云南干热河谷退化生态系统植被恢复影响因子研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005: 104.
- [9] 庄淑芳. 同工酶电泳技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用探析[J]. 福建农业学报, 2004, 19(4): 247-249.
- [10] 吴建梅, 吴明露, 卢勤, 等. 酯酶同工酶电泳法鉴定特优组合种子纯度效果研究[J]. 福建稻麦科技, 2003, 21(2): 18-20.
- [11] 张新, 李殿荣. 油菜种子纯度室内同工酶检验与田间种植检验的比较[J]. 陕西农业科学, 2001(9): 6-8.
- [12] 周洋. 杂交狼尾草及其母本种苗可溶性糖的变化和同工酶差异的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2008: 5-7.
- [13] 梁机, 杨振德, 黄素梅. 八种金花茶植物可溶性蛋白质电泳分析及其亲缘关系初探[J]. 广西农业大学学报, 1998, 17: 1-5.

Determined and Analyzed of Enzymatic Activity and Protein Electrophoretogram in Hybrid Orchids and Their Hybrid Generation

ZHU Qing-song¹, ZHANG Jing-hua², WANG Guang-dong³, ZHAO Hai-ying⁴

(1. Xinyang Agricultural College Xinyang, Henan 464000 2. The Bureau of Agriculture of Queshan County, Zhumadian, Henan 463200; 3. College of Horticulture; Nanjing Agricultural University; Nanjing, Jiangsu 210095 4. Xinyang Agricultural Science Research Institute; Xinyang, Henan 464000)

Abstract: The enzymatic activity of POD, SOD and CAT in hybrid orchids and their hybrid F₁ generation were determined, the electrophoretogram of EST and protein were analyzed. The results showed that the POD, SOD and CAT enzymatic activity of the female parents was lower than that of their male parents among parents and their hybrid F₁ generation. Among F₁ generation, there was significant difference in POD and CAT, while there was no significant difference in SOD. From the electrophoretogram of EST, it could be seen that female parents had three obvious enzymatic bands and male parents had two. At the same time, abundant variations had been seen in hybrid F₁ generation. The hybrid F₁, which had their parents' features of the enzymatic bands, account for 33.3%. Protein SDS-PAGE' electrophoresis of parents and their hybrid F₁ showed that male parents had six more weak bands than female ones. 15.8% hybrid F₁ generation had two more weak bands than female ones, and the rest of them had the equal number to their female parents.

Key words: hybrid orchids; hybrid F₁ generation; enzymatic activity; enzymatic bands