

勋章菊种子及其蛋白的差异性分析

王 韡, 周晓慧, 戴 斌, 陆小平

(苏州大学 金螳螂建筑与城市环境学院, 江苏 苏州 215123)

摘 要:以从国外引进的 3 个勋章菊品种‘红纹’、‘日出’、‘星白’与在国内收集的不同花色中国勋章菊及其杂交后代共 12 个花色勋章菊植株为材料, 观察其花瓣形态与种子外观的差异, 并利用 SDS-PAGE 技术分析不同花色勋章菊种子蛋白条带存在的差异。结果表明:勋章菊花色丰富多彩, 花心多具有黑色、褐色或白色的眼斑; 不同花色品种的勋章菊种子外观形态差异较大; 12 个品种的勋章菊种子蛋白条带大致相同, 但存在一些特异条带, 能够清晰地反应出个体之间的差异。

关键词:勋章菊; 种子; 生理指标; SDS-PAGE

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0074-04

勋章菊(*Gazania rigens* L.)为菊科勋章菊属多年生草本植物, 原产于南非, 性喜温暖向阳, 是很好的园林花卉(适宜布置花坛和花境)和插花材料^[1]。勋章菊的花冠绚丽多彩, 花瓣亮泽, 清晨开放, 夜晚闭合, 单花寿命长达 10 d, 且耐旱、耐热、耐贫瘠。因此, 选择不同品种(品系)的勋章菊经短期驯化后可直接应用于城市广场、街道、公共绿地和庭院的彩化。由于勋章菊具有四季常绿、三季现花及抗逆性强的特性, 既可观叶也可观花, 是既能地栽也可盆栽的新优地被植物。

勋章菊为头状花序, 花色丰富多彩, 有些具有条纹, 花心处多有黑色、褐色或白色的眼斑。王意成^[2]报道常见栽培品种有小调(Chansonette)系列、黎明(Daybreak)系列、迷你星(Mini star)系列和天才(Talent)系列等; 沈汉国等^[3]报道常见品种有黎明(Daybreak)系列、丑角(Harlequin)系列、笑吻(Kiss)系列等。到目前为止, 关于勋章菊的分类还没有确切的定论, 未找到明确的分类依据。

种子蛋白是植物体中一类表达率高、能在种子内大量积累且不易降解的蛋白质, 其电泳谱带具有高度稳定性、专一性和叠加性。由于种子蛋白是基因表达的直接产物, 不仅能够真实地反映不同基因型的类型、个体间

的遗传差异, 而且这种差异不受植物生长环境的影响, 因此它作为遗传标记已被广泛应用于种、属间关系、种内遗传多样性分析、品种鉴定及植物繁育系统的鉴别^[4-6]。目前利用该技术对水稻^[7]、玉米^[8]、棉花^[9]、豌豆^[10]等多种作物进行品种鉴定、亲缘关系探讨已有报道, 但是用于观赏植物勋章菊的研究尚鲜见报道。该试验采用不同花色勋章菊种子进行 SDS-PAGE 电泳, 旨在探讨根据种子蛋白差异对其亲缘关系分类的可行性, 为从种子水平探讨勋章菊品种之间的亲缘关系提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试种子收集于苏州大学独墅湖校区二期试验基地, 将种子根据不同花色区分收集后, 挑选出饱满的可育种子, 放入信封置于防潮柜中干燥保存。

试剂: Tris、SDS、APS(过硫酸铵)、TEMED(N, N, N, N-四甲基乙二胺)、甘氨酸、甘油、溴酚蓝、β-巯基乙醇、考马斯亮蓝 G-250; 浓盐酸、甲醇、冰醋酸(均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司)。

仪器: Anke TGL-16G 超速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、DK-8D 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司)、DYY-10 型(ECP3000)三恒电泳仪(北京六一仪器厂)、WD-9403F 紫外仪(北京六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 每份试样各取种子 1 粒, 置于无菌的双层滤纸之间, 研碎后分别转至 1.5 mL 离心管中, 各加入 60 μL 样品提取缓冲液(0.125 mol/L Tris-HCl, pH=6.8, 4% SDS, 10% 甘油, 4% β-巯基乙醇, 0.02% 溴酚蓝), 摇匀后沸水浴 10 min, 室温下 10 000 r/min 离心

第一作者简介:王韡(1987-), 女, 天津人, 硕士, 研究方向为园林植物栽培生理。E-mail: blue7-11@163.com.

责任作者:陆小平(1958-), 男, 江苏金坛人, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事园林植物生物技术和园林植物栽培生理方面的研究工作。E-mail: szlxp@yahoo.com.cn.

基金项目:苏州市应用基础研究计划(农业)资助项目(SYN201221)。

收稿日期:2012-08-27

15 min,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.2 蛋白质检测 SDS-PAGE 采用 DYY-10 型 (ECP3000)三恒电泳仪,1.5 mm 胶板,提前配置 8% 的分离胶及 5% 的浓缩胶,制好后取蛋白上清液每孔上样 40 μ L,室温电泳至溴酚蓝指示带距凝胶底边约 3~5 mm 时停止电泳。将凝胶放入染色液(0.25% 考马斯亮蓝 G-250, 50% 甲醇,10% 冰醋酸)中染色 1 h,置于脱色液(5% 甲醇,7.5% 冰醋酸)中脱至蛋白谱带清晰、背景颜色干净。在 WD-9403F 紫外仪中利用白光拍摄凝胶电泳图像。

2 结果与分析

2.1 勋章菊外观性状分析

2.1.1 花色 勋章菊为头状花序,包含舌状花和管状花,有单瓣和重瓣 2 种。花径 7~12 cm,花色丰富多彩,有的为单色,如黄色、白色、橙色等;有的具有其它颜色的条纹,如红色条纹、橙色条纹、紫红色条纹等;花瓣基部大都具有黑色、褐色或白色的花眼,部分品种花眼上具有黄色或白色的斑点(图 1)。



图 1 勋章菊不同花色表现型

2.1.2 种子形态 经调查发现,勋章菊种子分为饱满种子和不饱满种子 2 类(图 2),饱满种子由受精胚珠发育而成,其结实率在 20%~40%,具有萌发特性;不饱满种子为败育种子,未能由受精胚珠发育而成,不具有萌发特性。勋章菊种子外被冠毛,将可育种子解剖后发现种子由外种皮、内种皮和胚 3 部分构成(图 3)。经发芽试验测定,可育种子无论是否去掉外种皮,都可以萌发,可见外种皮的存在与否对勋章菊种子的萌发影响不大。

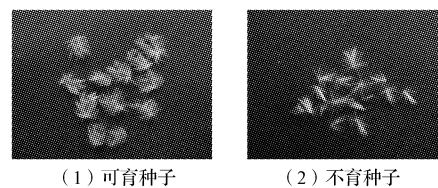


图 2 勋章菊种子分类

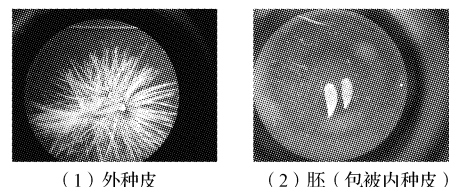


图 3 勋章菊种子解剖图

在光学显微镜下对勋章菊 12 个不同花色品种对应的种子进行形态观察,发现不同花色对应的种子外观差异较大,种子大小、冠毛形态、外种皮颜色、种脐形态特征各不相同(图 4),这些特征可作为勋章菊亲缘关系判断的参考依据。

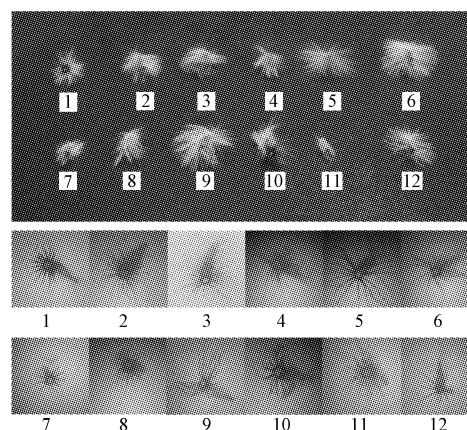


图 4 不同花色对应勋章菊种子形态

2.2 种子蛋白 SDS-PAGE 分析

种子贮藏蛋白按溶解性的不同,分为溶于水的清蛋白(Albumin)、溶于盐液的球蛋白(Globulin)、溶于醇溶液的醇溶蛋白(Prolamin)和溶于酸或碱的谷蛋白(Glutelin)4 种。该试验提取种子总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,通过对勋章菊 12 个不同花色品种的种子贮藏蛋白进行

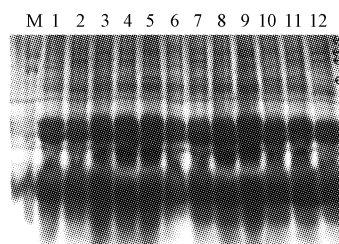


图 5 不同花色对应勋章菊种子 SDS-PAGE
注:1~12 为图 1 中对应花色的种子蛋白电泳图谱。

SDS-PAGE 电泳,对其电泳图谱进行比较,从图 5 可知,不同花色品种间条带基本一致,但有些种子缺失其它个体所共有的谱带(5、6、10 号),有些种子的蛋白表达量明显高于其它个体(4、5、8、9 号),这些条带可能是不同勋章菊种子蛋白所特有的。

3 结论与讨论

3.1 利用种子外部形态对其进行区分

勋章菊饱满种子具有萌发性,但其结实率较低,通常在 20%~40%;而不饱满种子并不具备完整的胚结构,不能萌发成幼苗。通过该试验的调查,发现饱满种子和不饱满种子的外观和质量存在很大的差异,因此可根据种子的外部形态对其进行筛选和区分,播种时将败育种子去掉,仅对饱满的可萌发的种子进行播种,保证种子质量的同时不仅可以节省人力和土壤资源,而且可以达到提高发芽率和出苗率的目的,提高单位面积的产量。

另外,调查发现 12 个不同花色品种勋章菊对应的种子其外观差异较大,种子大小、冠毛形态、外种皮颜色、种脐特征各不相同,可利用其不同外部形态对不同品种的种子进行初步的区分,对于掺杂的不同品种种子进行挑选分类,从而达到种子的初步纯化。

3.2 种子蛋白的差异

蛋白质(同工酶)是基因表达的产物,种子蛋白 SDS-PAGE 电泳技术以其快速、经济、可靠等优点成功运用于马铃薯、大豆等经济作物及菜豆、豌豆、西瓜、番茄、黄瓜、白菜、瓠瓜等蔬菜作物品种纯度的鉴定^[11]。有报道称在辣椒中,将 11 个辣椒品种种子混在一起,通过单粒取样进行 SDS-PAGE 电泳,可以将它们区分开^[12]。该试验研究表明,勋章菊不同花色品种所对应的种子不仅在外观上存在较明显的差异,对其单粒种子进行 SDS-PAGE 电泳,发现其蛋白电泳图谱具有相似性,但不同个体多具有自己的特征性条带,其条带数目、位置、宽窄和颜色深浅也存在一定的差异,一定程度上反映出品种间的不同。试验结果表明,利用这种差异在同一试验条件下用 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴别不同品种勋章菊种子

是可行的。同时,在通过质谱技术分析特异蛋白序列的基础上,可作为勋章菊种属分类的一种蛋白标记加以利用。

但是由于不同品种的种子大小存在差异,单粒种子的质量也不尽相同,导致其蛋白含量可能存在一定差异。该试验选取 12 个不同花色品种的单粒种子进行 SDS-PAGE 电泳,其自身蛋白含量的多少可导致电泳图谱上条带宽度和深浅的差异,不能完全根据蛋白条带的宽度和深浅来判定其表达量的多少。该试验仅提出利用种子 SDS-PAGE 技术对其进行品种分类鉴别的一种可能性,后续试验中要首先对单粒种子的蛋白含量进行测定,再进行 SDS-PAGE 电泳,排除外在影响,对蛋白条带进行质谱分析,探讨利用该方法进行亲缘关系鉴定的可能性。

参考文献

- [1] 杨俊杰,付红梅.勋章菊的栽培技术要点[J].温室园艺,2008(6):61-62.
- [2] 王意成.风姿浪漫勋章花[J].花木盆景(花卉园艺),2003(4):22-23.
- [3] 沈汉国,陈少萍,陈永明.勋章菊的繁殖与病虫害防治[J].中国花卉园艺,2007(16):20-21.
- [4] 胡志昂,王洪新.蛋白质多样性和品种鉴定[J].植物学报,1991,33(7):556-564.
- [5] 胡志昂,刘长江,王洪新.裸子植物的生化系统学(二)-松科植物的种子蛋白多态[J].植物分类学报,1984,22(5):360-366.
- [6] Ladizinsky C, Hymowitz T. Seed protein electrophoresis in conifer seeds[J]. Can J Bot, 1979, 48:1911-1912.
- [7] 李布青,杨剑波,刘超,等.杂交水稻种子蛋白电泳分析[J].安徽农业科学,1996,24(4):299-300.
- [8] 苏萍,戴常军,任红波,等.玉米蛋白质组分电泳特性的比较研究[J].黑龙江农业科学,2002(1):7-9.
- [9] 张春庆,伊燕桦,高荣岐,等.棉花种子蛋白多态性与品种鉴定方法的研究[J].中国农业科学,1998,31(4):16-19.
- [10] 夏幽泉,幸亨泰.箭筈豌豆 2 个品种的蛋白质电泳分析[J].云南大学学报,2003,25(增刊):115-120.
- [11] 胡志昂,王洪新.菜豆种子蛋白的变异和品种鉴定[J].华北学报,1986,1(2):1-7.
- [12] 向春阳,田秀平,崔丽亚.蛋白质电泳技术鉴定辣椒种子[J].北方园艺,1996(5):17-19.

Analysis of Differences on Seed Morphology and Protein of *Gazania rigens* L.

WANG Wei, ZHOU Xiao-hui, DAI Bin, LU Xiao-ping

(Gold Mantis School of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract: Taking *Gazania rigens* L. 'Daybreak Red Stripe', 'Sunglow', 'Mini Star White' which introduced from Japan and some other varieties collected in China (totally twelve kinds) as materials, the differences on petal morphology and seed appearance between them were observed. SDS-PAGE technique was used to observe the differences in protein bands among twelve varieties, in order to explore the possibility to distinguish the genetic relationship and classification of different varieties by seed. The results showed that petals of *Gazania rigens* L. were rich in color, and mostly there were

聚乙二醇-6000 对山白兰苗木生理特性的影响

蒋 林^{1,2}, 於艳萍¹, 刘昆成¹, 谢安德¹, 潘启龙¹, 王凌晖¹

(1. 广西大学 林学院, 广西 南宁 530005; 2. 广西国有六万林场, 广西 玉林 537000)

摘 要:选择 1 a 生山白兰苗木为试验材料, 采用盆栽土培法以不同浓度 PEG-6000 水溶液对山白兰进行处理, 研究 PEG-6000 对山白兰幼苗生理特性的影响。结果表明: 随着 PEG-6000 浓度的增大, MDA 含量增加, SOD 和 POD 都呈现先升后降的变化趋势, 游离脯氨酸一直呈上升的变化趋势, 可溶性蛋白质呈先升后降再上升的变化趋势。

关键词:园林植物; 山白兰; PEG-6000; 生理生化指标

中图分类号:S 792 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0077-03

山白兰(*Paramichelia baillonii*)为木兰科合果木属高大乔木, 其树冠优美、树叶浓绿、花朵大具香气等, 是理想的观赏绿化树种^[1], 是热带、亚热带珍贵速生用材树种之一。其天然生长于云南热带、亚热带雨林中, 由于过去乱砍滥伐严重, 目前已处于濒危状态, 为我国重点保护的稀有珍贵树种之一。在植物生理上细胞失水造成渗透胁迫, 这是干旱、盐碱和冷害 3 种胁迫引起的共同结果。而在全世界农业中, 干旱目前是最主要的胁迫, 其损失量估计超过其它逆境造成损失的总和。因此对山白兰进行渗透胁迫研究具有重大意义。以往有关山白兰研究的报道中, 郭文福等^[2]对山白兰苗木移植密度、遗传育种和生理生长等方面进行了研究, 蔡锡安等^[3]、曾小平等^[4]对木兰科植物在水分胁迫方面进行了研究, 但对山白兰的干旱胁迫方面却鲜见报道。该试验以 1 a 生山白兰苗木为试材, 采用盆栽土培法以不同浓度聚乙二醇(PEG-6000)水溶液对山白兰进行处理, 研究 PEG-6000 对山白兰幼苗生理特性的影响。

第一作者简介:蒋林(1970-), 男, 硕士, 工程师, 现主要从事林业生产和科研管理工作。

责任作者:王凌晖(1965-), 男, 博士, 教授, 现主要从事园林植物栽培及森林培育研究工作。E-mail: wanglinghui97@163.com

基金项目:广西林业厅科学基金资助项目(桂林科字[2009]第 22 号)。

收稿日期:2012-08-27

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为广西国营高峰林场优良苗木山白兰, 选择长势良好、无病虫害、健壮均匀的苗木, 2010 年 3 月 22 日移至广西大学林学院苗圃试验地(试验地为室外搭建的塑料遮雨薄膜棚, 同时在试验地外侧加盖挡水设备, 减小外界环境对试验的影响), 并栽植于口径为 20 cm, 深 18 cm 的塑料花盆中, 每盆栽植 1 株。盆内的生长基质为园土和细沙, 按照 3:1 的比例均匀混合。

1.2 试验方法

试验选用 PEG-6000 溶液模拟干旱胁迫, 采用盆栽土培法, 将 PEG-6000 以水溶液的形式浇到基质中^[5], 浓度为: 0(CK)、5%、10%、15%、20%, 对山白兰的苗期抗旱性进行鉴定和比较。上盆 1 个月后进行渗透胁迫处理, 每隔 7 d 浇灌 1 次 PEG-6000 溶液, 每次每盆 200 mL, 共进行 3 次。盆栽试验期间进行统一的常规苗木管理。

2 结果与分析

2.1 渗透胁迫对山白兰苗木丙二醛(MDA)含量的影响

丙二醛(MDA)作为脂质过氧化作用的主要产物之一, 其含量的多少可以代表膜损伤程度的大小^[6]。由图 1 可知, 随着 PEG-6000 浓度的增加, 山白兰 MDA 含量越来越高。在浓度 5% 时, MDA 含量为 CK 的 1.13 倍; 在浓度 20% 时, 为 CK 的 2.99 倍。这表明 PEG 渗透胁迫浓度越高, 山白兰脂质过氧化作用越强, 导致丙二

some black, brown or white eye spots at the base of the ray flowers. The seed appearance of the morphological of twelve varieties were different among each other. The seed protein of twelve varieties were with roughly the same protein bands, but there existed some specific bands could clearly reflect the differences between individuals. That a possibility to investigate the genetic relationship between the different varieties were provided.

Key words: *Gazania rigens* L.; seed; physiological indicators; SDS-PAGE