

利用过氧化物同工酶法分析三十七个主要蓖麻栽培品种亲缘关系的研究

王玉荣, 李凤娟, 刘清岱, 杨朝晖, 李伟, 王琳

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要:以 37 份不同来源主要蓖麻栽培品种为试材, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分析比较了其过氧化物同工酶酶带特征, 并对 37 个蓖麻栽培品种间的亲缘关系进行了聚类分析。结果表明: 37 个蓖麻种质的过氧化物酶谱迁移率在 0.23~0.87 之间, 共 7 条谱带, 不同品种的谱带数 3~7 条; 酶带及聚类分析表明, 在相似系数为 0.79 时, 37 个蓖麻栽培品种可以分为 5 个类群; 大部分相同来源的蓖麻种质首先聚在一起, 呈现一定的地域特征。

关键词:蓖麻; 过氧化物同工酶; 聚类分析

中图分类号:S 565.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0095-04

蓖麻(*Ricinus communis* L.)是大戟科 1 a 生或多年生草本植物, 世界十大油料作物之一, 是一种特殊工业油源作物^[1]。由蓖麻籽制取的蓖麻油(含油量 47%~60%)是一种不干性油, -18℃ 时不凝固, 500~600℃ 下不变质、不燃烧^[2], 在工业和化工领域有着广泛的用途, 是可以代替石油的可再生“绿色石油”资源^[3-4]。优良品种的选育是蓖麻产业的重中之重, 也是推动蓖麻产业快速发展的源动力^[5]。蓖麻种质资源研究是蓖麻育种的基础, 目前, 国内外对蓖麻种质的分类和亲缘关系等研究主要采取 SRAP、RAPD、ISSR、AFLP、SSR、SNP 等分子标记手段^[6-14], 同工酶方面的研究报道较少。同工酶与植物的遗传发育、代谢调控及抗性等相关, 是基因表达的产物, 是基因在蛋白质水平上的表现型, 具有相对的稳定性, 又有种属的特异性, 因此同工酶能够反映基因水平的差异, 一直以来都被作为一种遗传标记^[15-16]。过氧化物酶(POD)是细胞内抗脂质过氧化作用保护系统的主要成分之一, 具有把生物体有害的过氧化物转化成无害氧化物的能力, 可有效地清除生物体内的过氧化物^[17]。POD 同工酶被广泛应用于植物亲缘关系的鉴定, 植物种质资源的分类鉴定, 杂种优势预测及杂种鉴定、雄性不育系与保持系的鉴定等方面^[18-22], 同时过氧化物酶又是植物抗旱的指标之一^[23-26]。该试验对我国 37 个主要蓖麻栽培品种的 POD 同工酶的遗传多样性进行了研究, 对当前我国广泛种植的蓖麻种质资源的亲缘

关系进行了分析, 以为今后蓖麻品种的分类、鉴别、抗旱鉴定及遗传育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 37 份蓖麻种质见表 1。

表 1 材料及来源

Table 1 Materials and their origins

编号	品种名	来源	编号	品种名	来源
1	“豫祥 1 号”	山东	20	“汾蓖 7 号”	山西
2	“豫祥 2 号”	山东	21	“CS-R63. 268”	山西
3	“淄蓖 1 号”	山东	22	“哲蓖 3 号”	内蒙古
4	“淄蓖 2 号”	山东	23	“通蓖 5 号”	内蒙古
5	“淄蓖 3 号”	山东	24	“通蓖 6 号”	内蒙古
6	“淄蓖 4 号”	山东	25	“CS-R6. 181”	内蒙古
7	“淄蓖 5 号”	山东	26	“CS-R24. 181”	内蒙古
8	“淄蓖 6 号”	山东	27	“海泰 1 号”	内蒙古
9	“淄蓖 101 号”	山东	28	“农家品种 1 号”	内蒙古
10	“淄蓖 108 号”	山东	29	“农家品种 2 号”	内蒙古
11	“淄蓖 308 号”	山东	30	“秀 1”	北京
12	“中北 1 号”	山西	31	“秀 2”	北京
13	“中北 4 号”	山西	32	“秀 5”	北京
14	“中北 5 号”	山西	33	“大粒王”	河北
15	“中北 6 号”	山西	34	“农家品种 3 号”	河北
16	“中北 7 号”	山西	35	“A007”	云南
17	“中北 8 号”	山西	36	“T202”	云南
18	“中北 9 号”	山西	37	“红左塔”	吉林
19	“晋蓖 2 号”	山西			

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 挑选籽粒饱满的蓖麻籽, 用蒸馏水 25℃ 浸泡 24 h, 然后把种子置于铺有滤纸的培养皿中 25℃ 催芽, 待种子破口露白后播种于盛有河沙与珍珠岩的塑料花盆中, 河沙与珍珠岩的比例为 1:1(V/V)。每隔 24 h 用 Hoagland 营养液浇灌 1 次, 待蓖麻长出 2 片

第一作者简介:王玉荣(1976-), 男, 山东莱州人, 硕士, 副研究员, 现主要从事食品生物技术方面的研究工作。E-mail: wangyurong@tust.edu.cn.

收稿日期:2012-07-30

真叶后,采摘叶片并置于一80℃的冰箱中保存备用。

1.2.2 过氧化物同工酶酶的提取 取0.2 g样品,加入2 mL 0.1 mol/L的 Tris-HCl 缓冲液(pH 为 7.5,含1%的 PVPP)及少量石英砂,冰上研磨成匀浆,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为提取的酶液。

1.2.3 电泳 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度10%,浓缩胶浓度5%,电压为150 V,待指示剂进入分离胶后,电压增至200 V,当指示剂移至距胶版下缘1 cm 停止电泳。

1.2.4 染色 采用NH₄Cl-联苯胺法^[27],100 mL 染色液中包含3% H₂O₂ 2 mL、2%联苯胺 20 mL、5%氯化铵 10 mL、5% Na₂EDTA 10 mL、蒸馏水 58 mL,室温染色至出现清晰的条带为止(约10 min),照相并对过氧化物酶同工酶酶谱进行分析。

1.3 数据分析

测量酶带迁移距离(点样处至各酶带中部的距离),溴酚兰指示剂的迁移距离,计算相对迁移率,并绘制酶带模式图。

酶带的相对迁移率(Rf)=酶带的迁移距离/溴酚兰的迁移距离,将凝胶上出现的条带分类并绘图。按照

条带有无分别赋值,有带记为1,无带记为0。计算不同品种间的 Jaccard 遗传相似系数(GS:Genetic similarity),并利用 GS 按非加权组平均法(UPGMA,unweighted pair-group method with arithmetic means)进行聚类,构建不同蓖麻品种间的亲缘关系树状图。以上分析采用 NTSYS2pc-2.10e 统计分析软件完成。

2 结果与分析

2.1 不同蓖麻品种过氧化物同工酶酶谱特征

蓖麻 POD 同工酶谱带图及模式图分别见图 1、2,迁移率见表 2。由图 1 可知,因品种不同,蓖麻的 POD 同工酶酶谱带数目、酶活性强弱各不相同。POD 同工酶酶谱分析结果共显示 7 条酶带,分别称之为 P1、P2……P7。其中“T202”最多,共 7 条。“中北 5 号”、“农家品种 1 号”、“大粒王”、“农家品种 3 号”最少,只有 3 条。其中 P2 为 37 个蓖麻品种的基本酶带,这条带显色过程中出现较早、显色清晰且颜色较深、迁移率相对稳定,为供试品种所共有。品种间差异较大的是 P4、P5、P6、P7 的 4 条酶带,这些酶带的有无和活力强弱往往因品种不同而不同,是品种间的特征谱带。

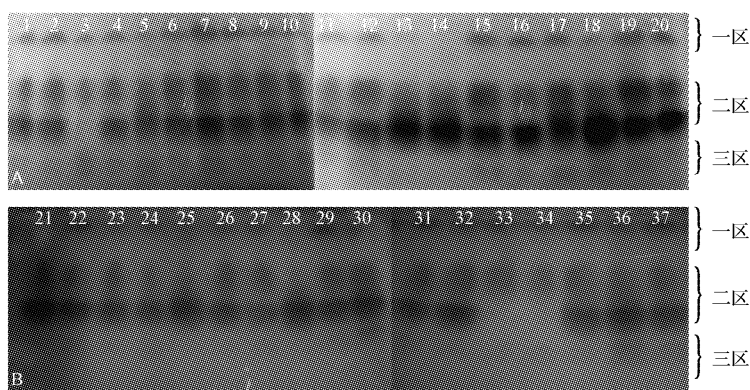


图 1 蓖麻 POD 同工酶电泳图

Fig. 1 The electrophoresis enzymogram of POD isozyme in castor plant cultivars

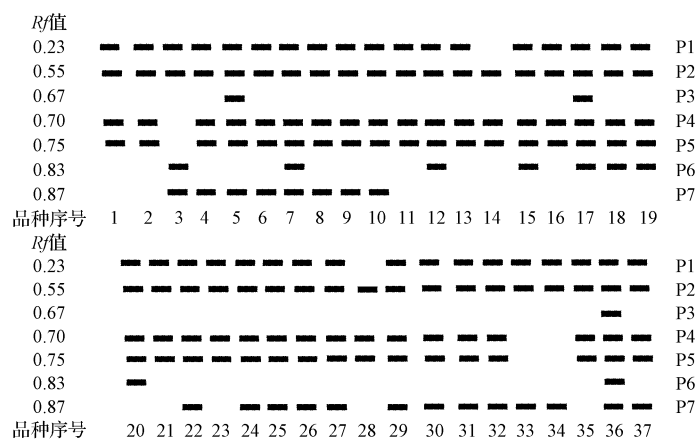


图 2 蓖麻 POD 同工酶电泳模式图

Fig. 2 The model chart of POD isozyme in castor plant cultivars

表 2 37 份蓖麻品种过氧化物酶酶带的迁移率

Table 2 The R_f value of POD isozyme in 37 castor plant cultivars

酶带	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
相对迁移率	0.23	0.55	0.67	0.70	0.75	0.83	0.87

根据蓖麻过氧化物同工酶酶带的特征,可以把酶带分为 3 个区,分别称之为 I 区($R_f=0.23$)、II 区($R_f=0.55\sim0.75$)、III 区($R_f=0.83\sim0.87$)。I 区只包括 P1 1 条带,其 R_f 值为 0.23。II 区包括 P2~P5 4 条带,其 R_f 值分别为 0.55、0.67、0.70、0.75。III 区包括 P6、P7 2 条酶带,其 R_f 值分别为 0.83、0.87。I 区酶带各品种间差异不大,除“中北 5 号”、“农家品种 1 号”没有外,其余品种都有。II 区中共有 4 条酶带,颜色较深,染色时显色也较早。III 区酶带各品种差异较大,大多为特征酶带,颜色大部分较浅。

2.2 蓖麻过氧化物同工酶的系统聚类分析

采用 NTSYS2pc-2.10e 分析软件通过 UPGMA 法

对 37 个蓖麻栽培品种间的亲缘关系进行聚类分析,得出聚类树状图。由图 3 可知,在相似系数为 0.58 时,37 个蓖麻品种被分成 2 个类群。第一大类群主要包括“淄蓖 1 号”、“农家品种 3 号”和“大粒王”,其余的被聚为一类。当相似系数为 0.70 时,37 个蓖麻品种被分成 3 个类群。第一类群包括“淄蓖 1 号”、“农家品种 3 号”和“大粒王”;第二类群包括“淄蓖 3 号”、“T202”、“中北 8”;其余的被聚为一个类群;当相似系数为 0.79 时,37 个蓖麻品种被分成 5 个类群,第一类群包括“淄蓖 1 号”、“农家品种 3 号”和“大粒王”;第二类群包括“中北 8”;第三类群包括“淄蓖 3 号”、“T202”;第四类群包括“淄蓖 5 号”、“淄蓖 2 号”、“淄蓖 4 号”、“淄蓖 6 号”、“淄蓖 101 号”、“淄蓖 108 号”、“哲蓖 3 号”、“通蓖 6 号”、“CS-R6.181”、“CS-R24.181”、“海泰 1 号”、“农家品种 2 号”、“红左塔”、“秀 1”、“秀 2”、“秀 5”;其余品种聚为一类。

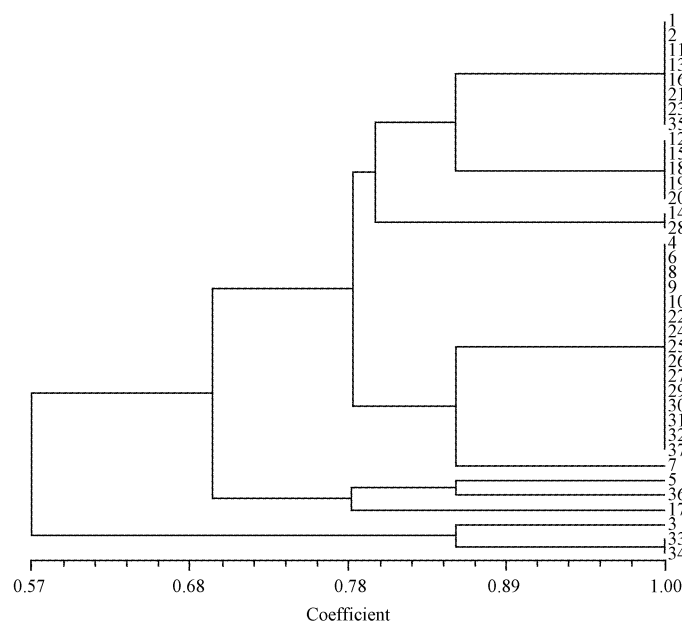


图 3 不同品种蓖麻亲缘关系聚类图

Fig. 3 The clustering dendrogram of POD isozyme in 37 castor plant cultivars

该试验结果表明,蓖麻品种具有一定的地域性,从种质资源水平上看,一般同一地域来源的聚成一类,甚至亲缘关系非常接近,不同地域间品种的亲缘关系相对较远。该研究表明 POD 同工酶在蓖麻种质分类上具有可行性。试验结果对蓖麻品种的选育工作具有一定的指导作用。试验中,也对酯酶进行了研究,但在蓖麻中,酯酶的分类效果不如 POD 酶明显。

3 讨论

过氧化物酶是基因表达的产物,具有一定的稳定性,在很大程度上能够反映植物个体的遗传差异、代谢水平的差异以及样本间的亲缘关系。目前国内外关于

蓖麻过氧化物酶的研究鲜有报道,该研究结果表明蓖麻种质的亲缘关系具有一定的地域特征,类内的品种遗传相似系数较高,这与郑鹭等利用 SRAP 分析 81 份蓖麻品种材料的研究结论相同,表明利用过氧化物酶分析蓖麻种质亲缘关系具有可行性。相对于其它作物,蓖麻种质遗传方面的研究较少,目前蓖麻的分子标记有 RAPD、AFLP、SNP、ISSR、SRAP、SSR 等^[6-14],过氧化物酶标记与分子标记相比,分析速度相对较快,分析结果也具有一定的指导意义。造成蓖麻品种亲缘关系地域特征的原因可能是由于不同地域地理环境的影响,也可能是人工杂交选育的结果,同一单位选育的品种亲缘关系非常

接近,这也说明蓖麻品种的育种需要加强跨地域的交流。利用过氧化物酶聚类分析的品种间的遗传相似系数较高,这与利用 SRAP、ISSR、AFLP、SSR 等分子标记手段^[6-7,9]得到的结论相符合,总的来说蓖麻品种间的遗传多样性较低。过氧化物酶的表达受环境的影响,有一定的局限性,需要结合其它标记进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 孙福来. 特用工业油源作物蓖麻[J]. 中国种业, 2005(3): 21-22.
- [2] 汪多仁. 蓖麻籽与蓖麻油应用进展[J]. 粮食与油脂, 2000(2): 12-14.
- [3] 张耀奇, 王恩, 徐淑荣. 以蓖麻籽为原料系列化工品的研究[J]. 内蒙古石油化工, 1999, 26: 33-34.
- [4] 包红霞, 张春华, 李金琴, 等. 国外蓖麻研究及产销概况[J]. 内蒙古农业科技, 2003(4): 6-8.
- [5] 曾祥艳, 王东雪, 马锦林. 我国蓖麻良种选育研究现状及发展策略[J]. 广西热带农业, 2010(6): 27-29.
- [6] 郑鹭, 祁建民, 方平平, 等. 蓖麻品种遗传多样性与亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 武汉植物研究, 2010, 28(1): 1-6.
- [7] 黄文霞, 何觉民, 朱宏波. 蓖麻种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 182-184, 187.
- [8] 吴昊. 我国蓖麻种质资源的综合评价[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9203-9204, 9212.
- [9] Allan G, Williams A, Rabinowicz P D, et al. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs[J]. Genet Resour Crop Ev, 2008, 55(3): 365-378.
- [10] Pranavi B, Sitaram G, Yamini K N, et al. Development of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.) and their utilization for genetic purity testing of hybrids[J]. Genome, 2011, 54(8): 684-691.
- [11] Bajaj M M, Pinheiro J B, Batista C E A, et al. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production[J]. Conserv Genet Res, 2009, 1(1): 237-239.
- [12] Gajera B B, Kumar N, Singh A S, et al. Assessment of genetical diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers[J]. Ind Crops Prod, 2010, 32(3): 491-498.
- [13] Qiu LJ, Yang C, Tian B, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 278.
- [14] Foster J T, Allan G J, Chan A P, et al. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*) [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 13.
- [15] 张维强. 同工酶与植物遗传育种[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 52-55.
- [16] 张以忠, 张云, 邓琳琼, 等. 荞麦酯酶同工酶研究[J]. 种子, 2011, 30(6): 38-41.
- [17] 王琳, 王林嵩, 马剑敏. 萝卜过氧化物酶的稳定性研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2004, 32(3): 81-83.
- [18] 路丹, 贺学礼, 刘妮, 等. 九种蒺藜属植物过氧化物酶同工酶分析[J]. 生物技术通报, 2008(3): 241-246.
- [19] 张新中, 纪瑛. 苦参和苦豆子的过氧化物酶同工酶谱分析和比较[J]. 植物生理学通讯, 2009(7): 681-683.
- [20] Veasey E A, Vencovsky R, Martins P S, et al. Germplasm characterization of *Sesbania* accessions based on isozyme analyses[J]. Genet Resour Crop Ev, 2002, 49(5): 449-462.
- [21] Singh A K, Mishra A, Shukla A. Genetic assessment of traits and genetic relationship in blackgram (*Vigna mungo*) revealed by isoenzymes [J]. Biochem Genet, 2009, 47(7-8): 471-485.
- [22] 李培英, 朱昊, 孙宗玖, 等. 偃麦草 EST 和 POD 同工酶遗传多样性分析[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(1): 166-171.
- [23] 阎勇, 罗兴录, 张兴思, 等. 不同供水条件下玉米耐旱生理特性比较[J]. 中国农学通报, 2007(9): 323-326.
- [24] 王贺正, 马均, 李旭毅, 等. 水稻开花期一些生理生化特性与品种抗旱性的关系[J]. 中国农业科学, 2007(2): 399-404.
- [25] Wang W B, Kim Y H, Lee H S, et al. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses[J]. Plant Physiol Biochem, 2009, 47(7): 570-577.
- [26] Akcay U C, Ercan O, Kavas M, et al. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings[J]. Plant Growth Regul, 2010, 61(1): 21-28.
- [27] 程东升, 潘学仁. 食用菌过氧化物酶同工酶不同染色法效果比较[J]. 中国食用菌, 1994, 13(3): 15-18.

Study on Analysis of Genetic Relationship of 37 Main Castor Varieties by Peroxidase Isozyme

WANG Yu-rong, LI Feng-juan, LIU Qing-dai, YANG Zhao-hui, LI Wei, WANG Lin

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)

Abstract: Taking 37 castor (*Ricinus communis* L.) varieties as materials, the peroxidase isoenzymes of them were determined using polyacrylamide gel electrophoresis technique, and genetic relationship of 37 castor varieties were clustering analyzed. The results showed that the electrophoretic mobilities of the isoenzymes spectra were among 0.23~0.87. There were seven peroxidase-active bands observed with a range from three to seven bands among different varieties. The zymograph and cluster analysis on the isoenzyme spectra indicated that the germplasms of the 37 castor cultivated varieties could be divided into five groups based on 0.79 of similarity coefficient. The germplasm resources from geographic regions were clustered in the same group firstly. The castor germplasms showed a certain regional characteristics.

Key words: *Ricinus communis* L.; peroxidase isoenzyme; cluster analysis