

10 个苜蓿品种过氧化物同工酶(POD)分析

沙 伟, 孟凡玲, 冯昌军

(黑龙江省齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 161006)

摘 要:采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对 10 个苜蓿品种的根和叶作过氧化物酶(POD)同工酶分析。研究表明, 不同器官酶谱带数目、迁移率(R)、酶活性及分布特征均有不同程度的差异。不同品种间酶谱带有较大差异, 初步探讨了 10 个品种间亲缘关系。

关键词:苜蓿; 根; 叶; 过氧化物酶(POD)

中图分类号:S 551⁺.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)01-0150-03

同工酶的形成是生物体基因结构差异造成的, 在进化过程中有一定的保守性^[1]。同工酶分析技术主要是用凝胶电泳法进行, 通过电泳分离出来的各条谱带, 经过染色形成酶谱。酶谱中不同迁移率的不同同工酶谱带被看作是由不同基因产生的酶蛋白分子, 通常认为同工酶是基因和性状的连接物, 该技术逐渐成为分子水平上研究生命现象的一种手段^[2]。

近年来, 同工酶分析法已广泛的应用于苜蓿作物品种鉴定和分类上。吴永毅^[3]等(1988)对苜蓿品种的酯酶、过氧化物酶的同工酶进行了研究。在抗逆性关系上, 酯酶和过氧化物同工酶谱带及其活性与抗寒性成显著正相关^[4]; 超氧化物歧化酶同工酶的活性与苜蓿抗旱性成正比^[5]; 过氧化物酶和酯酶谱带与抗寒性的相关性^[6]。在种质鉴定方面, 叶组织过氧化物和酯酶同工酶区别 4 倍体和 6 倍体植株非常有效^[7]; 苜蓿地方品种间和品种内单株间有明显差异^[8]; 过氧化物同工酶因品种间亲缘关系的远近而异^[9]。在分子标记方面, Quiros^[10](1983)利用过氧化物同工酶分析了苜蓿基因的连锁结构; 何咏松^[11](1987)利用过氧化物同工酶分析了紫花苜蓿和黄花苜蓿间差异性。

POD 是与生物膜的抗氧化保护有关的还原酶, 与其它酶协同作用, 清除逆境下产生的自由基和活性氧减少膜系统的操作^[12]。现主要对引进品种和地方品种的 POD 进行分析, 为种质资源的鉴定提供理论根据。



第一作者简介:沙伟, 女, 1963 年生, 博士后, 教授, 发表论文 50 余篇, 先后主持国家自然科学基金资助项目、黑龙江省教育厅黑龙江省普通高等师范学校骨干教师创新能力资助计划项目、黑龙江省博士后科研启动资金项目、黑龙江省博士后资助项目等多项, 现主要从事植物遗传、生理方向研究。

收稿日期: 2006-07-10

1 材料和方法

1.1 材料

10 个品种苜蓿见表 1, 试验用种子取自黑龙江省畜牧研究所。

表 1 供试材料

品种代号	品种名称	来源
V ₁	Argemond	加拿大
V ₂	Pass	加拿大
V ₃	DK127	美国
V ₄	敖汉	黑畜牧所
V ₅	辽东	黑畜牧所
V ₆	龙牧 806	黑畜牧所
V ₇	Dobson	加拿大
V ₈	WL323	加拿大
V ₉	Multiflora	加拿大
V ₁₀	MF892	加拿大

1.2 样品提取

将样品用去离子水洗净吸干水分, 剪碎, 称取 0.2g 放入研钵中, 加入电极缓冲液 (pH8.3) 5 mL。在冰浴下研磨至匀浆, 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清液放在 4℃冰箱中备用。

1.3 电泳

采用 DYY-11 型稳压电泳仪, 分离胶浓度 6%, pH 8.9; 浓缩胶浓度 4%, pH6.7; 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液, pH8.3; 进样量 20 μL, 电泳电压 80~120 V, 电泳 4 h, 保持温度 0℃~4℃, 并以 0.25% 的溴酚兰作为前沿指示剂。

1.4 染色

POD 染色采用罗广华改良的联苯胺法^[13]。胶板显色后用蒸馏水冲洗, 置于 7% 的醋酸中固定, 照相。

1.5 数据处理

将在聚丙烯酰胺凝胶上出现的酶带记为 1, 不出来的为 0, 进行统计。根据所统计的片段带的有无, 用 NT-SYS-PC 程序中的 Simqual 软件算出苜蓿间遗传相似系数, 按非加权配对算术平均法 (UPGMA) 聚类分析, 构建树状图。

2 结果与分析

2.1 过氧化物同工酶分析

在相同条件下,对 10 种苜蓿根、叶 POD 同工酶进行分析,经比较可以看出,它们的同工酶谱带数、酶活性强弱不同,根最多 9 条,叶最多 8 条。10 种植物的酶带数量、位点以及分布格局具有明显不同。

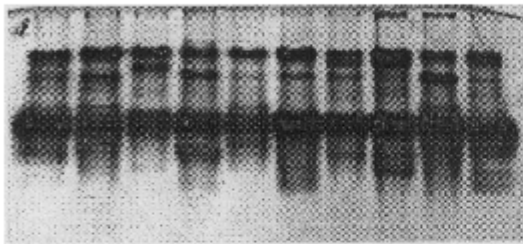


图 1 10 种苜蓿根 POD 同工酶酶谱



图 1-1 10 种苜蓿根 POD 同工酶酶谱

$V_1 \sim V_{10}$ 品种根的酶谱带分别是 5、6、4、5、5、6、6、8、8、9 条谱带(图 1-1)。按酶谱带显示的集中程度可分为 A、B、C、D 4 个区。在 A 区($Rf \leq 0.111$) $V_1 \sim V_{10}$ 等 10 个品种苜蓿酶带(酶活性)强,为主带,其中 V_8 、 V_9 还有 1 条弱带,在 B 区($Rf = 0.190 \sim 0.32$) V_8 品种苜蓿为 3 条酶带,酶带(酶活性)弱; V_2 、 V_3 、 V_{10} 等 3 个品种为 2 条酶带,其余品种为 1 条区($Rf = 0.41 \sim 0.55$),酶谱带最多是 3 条,最少是 2 条,酶带(酶活性)强。D 区($Rf = 0.69 \sim 0.81$),只有 V_2 、 V_3 、 V_5 等 3 个品种没有酶谱带表达酶带,其余品种都有酶谱带表达,但是活性弱。 V_8 、 V_9 、 V_{10} 等 3 个品种表达的酶带多并且酶活性强,根据 Gerloff, E. D.^[19] 在研究紫花苜蓿时发现低温锻炼时 POD 同工酶带数增多且活性增强和 Quiros^[1] 研究苜蓿同工酶,确定了 POD 存在 4 个基因位点 19 个等位基因,某些基因可能与抗冷性有关,并在低温下表达,根据 Gerloff, E. D. Quiros 研究结果的借鉴, V_8 、 V_9 、 V_{10} 等 3 个品种可能抗寒性强。

$V_1 \sim V_{10}$ 品种叶的酶谱带数分别为 5、5、5、4、8、5、4、4、7、7 条酶带(酶活性),比根的弱。虽然品种间可以出现 1 条或几条以上的共有酶带(图 2-2),但是其酶活性强度也是不完全相同的。从酶谱上看不同器官,过氧化物酶活性、同工酶酶谱不同。

2.2 聚类分析

从图 3 可以看出,10 个苜蓿品种的遗传相似系数在 0.27-1.00 之间。聚类分析表明,供试材料在 0.27 相似系数处被分为两组; V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 亲缘关系极为相近,为加拿大品种,其中 V_4 是驯化品种。在 0.53 相似

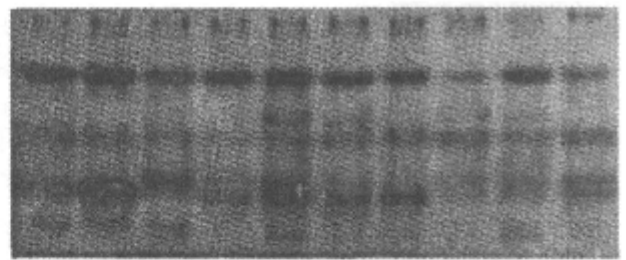


图 2 10 种苜蓿叶 POD 同工酶酶谱带

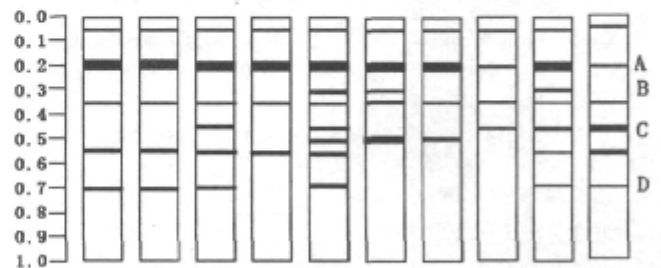


图 2-2 10 种苜蓿叶 POD 同工酶酶谱

系数处又被分为两组,其中 V_3 、 V_5 聚为一组,其相似系数是 0.71,其它的品种聚为一组,其中加拿大品种 V_8 、 V_9 、 V_{10} 亲缘关系近。

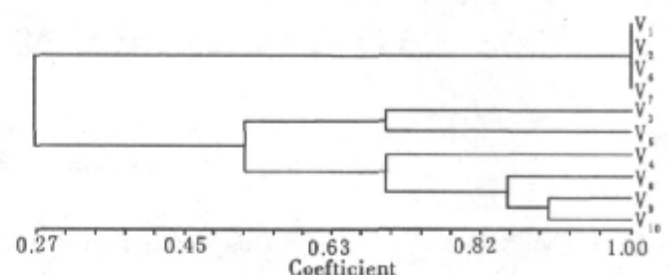


图 3 10 种苜蓿聚类图

3 讨论

目前同工酶技术已被广泛应用于植物的系统、生理、病理、遗传分析、基因标记、个体发育、杂种优势以及鉴定远缘杂种真实性等方面^[18]。

3.1 苜蓿不同器官 POD 分析

对 10 个不同品种苜蓿 POD 同工酶酶谱分析表明,同一品种不同器官的酶带数和活性不同,根的酶带数要比叶的酶带数多,根的酶活性也比叶的酶活性高,表明植物的不同器官担负着不同的生理功能,具有不同的代谢途径,要求不同的酶类表达。因此,产生同工酶分布的器官特异性。这在很多学者的研究报道中已得到证实^[8,19],黄卓烈的研究表明了各器官同工酶有着不同的遗传基础^[15],说明了各器官有不同的基因型。

3.2 不同品种同一器官的 POD 分析

同工酶的研究目的之一,主要在利用酶谱差异探讨品种间遗传差异,从而分析其亲缘关系及其演化。根据近代数量遗传学原理,利用性状的系统聚类分析方法探讨品种间的亲缘关系。在聚类过程中,类与类之间的聚类值越小,表明亲缘关系相对较近,反之则亲缘关系较远。

10个苜蓿品种间的POD差异较大,特别是引进种与地方品种亲缘关系较远。地方品种V₃、V₄亲缘关系也较远。根据相似系数6个加拿大品种分为两类,V₁、V₂、V₆、V₇等4个加拿大品种亲缘关系较相近,这说明相同地区的过氧化物酶谱特征具有高度的相似性,可以选用亲缘关系较远的品种杂交,选育新的品种。

参考文献:

- [1] 戴刘旺. 安徽产石蒜属植物三新酶同工酶的分析[J]. 生物学杂志, 2003, 2: 27-29.
- [2] Chaparo JX, Werner DJ, O'Malley D, et al. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach[J]. Ther. Appl. Genet. 1994, 87: 805-815.
- [3] 吴永敏. 用同工酶分析法鉴定苜蓿品种的探讨[J]. 牧草与饲料, 1988, 4: 8-13.
- [4] Krasnak M G A. Hydrolytic enzyme differences in cold-tolerant alfalfa[J]. Agron. 1978, 70: 579-605.
- [5] 刘朝建, 张承烈. 水分胁迫下紫花苜蓿叶片SOD、CAT活性与抗逆性的关系[J]. 中国草地, 1991, 2: 20-24.
- [6] 王承斌, 赵来喜. 牧草过氧化物酶与抗旱性的初步研究[J]. 中国草地, 1989, 5: 72-74.
- [7] Quiros C. Identification of alfalfa plant by enzyme electrophoresis[J]. Crop Sci. 1980, 20: 262-264.
- [8] 谢雪菊. 中国苜蓿地方品种亲缘关系的研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士毕业论文, 1996.
- [9] 戴玲, 林柏和. 过氧化物酶同工酶在苜蓿杂种和品种鉴定上的应用[J]. 内蒙古草原, 1985, 2: 49-53.
- [10] Quiros C. Allozymes and genetic variability in Medicago. Can. Genet. 1983.
- [11] 何咏松. 苜蓿自交不亲和性的研究[J]. 中国草地科学, 1987, 4: 6-12.
- [12] 曹仪植. 植物生理学[M]. 兰州大学出版社, 1998: 395-396.
- [13] 罗光华, 王爱国. 植物酶谱及活性的染色[J]. 植物生理学通讯, 1983, 6: 44-45.
- [14] Gerloff E. S. Soluble. Protein in alfalfa roots as related to cold hardiness[J]. Plant Physiol. 1967, 42: 895.
- [15] Quiros C F. Alfalfa isoenzyme in plant genetics and breeding. part 8 [M]. Elsevier Science Publishers. B. V. Amsterdam. 1983.
- [16] 周光宇. 有关同工酶分析的几个问题[J]. 植物生理通讯, 1983, (1): 1-4.
- [17] 高振生. 苜蓿根瘤性状遗传及其生理生态的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士研究生论文, 1994.
- [18] 黄卓烈. 几个苜蓿品种的过氧化物酶谱及其同工酶多样性的比较研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 72-75.

A Study on Isozymes of Alfalfa in Different Growth Period

SHA Wei, MENG Fan-ling, FENG Chang-jun

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Heilongjiang 161006)

Abstract: The POD isozyme of 10 alfalfa varieties on root and leaf were analysed by using polyacrylamide gel electrophoresis. The result showed that the enzymatic spectra number, Rf, enzyme activity and spectra distribution in different alfalfa organs had discrepancy. The enzymatic spectra from different varieties were significant different. The relationship among 10 varieties was studied primarily.

Key words: Alfalfa; Root; Leaf; Isozyme Peroxidase (POD)

果园冬灌技术

1 果园冬灌的好处

1.1 果园冬灌, 可以使树体放出潜热和土壤的凝结热, 提高树体的抗寒能力, 确保果树安全越冬。

1.2 果园冬灌, 可以加速有机肥料的腐熟, 有利于根系对有机物质的吸收, 提高树体营养物质的积累, 增加树体的营养物质积累, 增加土壤的含水量, 预防春旱, 提高果树的产量和品质。

2 果园冬灌技术

2.1 冬灌技术。果园冬灌的时间以果树落叶后到土壤结冻前为冬灌适期。冬灌过早, 气温还比较高, 水分蒸发速度快且数量大, 不利于蓄水保温, 从而降低果树的抗寒能力; 过晚, 气温偏低, 土壤冻结, 水分渗不下去, 积水冻结, 果树根系易遭受冻害。具体的冬灌时间一般以

5 cm 内平均地温为 5℃, 气温 3℃为宜。此时即使夜间气温降至 0℃以下, 发生冻结现象, 但白天气温回升后仍可解冻。因此, 此时为果树的最佳冬灌适期。

2.2 冬灌方式。对于水源充足, 灌水设备齐全的果园, 可采用畦灌或环状沟灌法; 对于水源充足, 灌水设备条件较差的果园, 可围绕树冠外围垒起环状的土埂进行灌水; 对于有滴灌条件的果园, 可采用滴灌或喷灌的方式灌水。

2.3 适量灌水。果园冬灌的灌水量, 以灌水后当天全部渗入土壤, 渗到果树根系分布层为宜, 即青年果树渗到 60 cm 左右, 成年果树渗到 100 cm 左右, 土壤湿度保持田间最大持水量的 60%~80% 为宜。