

唐菖蒲电子束诱变作用同功酶及 SDS-PAGE 分析

王 丹, 张志伟, 张冬雪, 林绍森, 匡 猛

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621000)

摘 要: 为了探讨电子束对唐菖蒲诱变育种的可行性和不同剂量的电子束对唐菖蒲的影响; 用能量为 3 MeV 的不同剂量电子束辐照唐菖蒲“江山美人”和“超级”球茎, 对不同处理植株的过氧化物酶、酯酶、淀粉酶和过氧化氢酶 4 种同功酶及 SDS-PAGE 的变化进行了研究。结果表明: 同功酶及 SDS-PAGE 与对照相比均发生了明显的变化, 随着辐照剂量的改变, 出现了多种变异形式, 变化与形态学变化相一致, 但品种间存在较大差异。基于同功酶及 SDS-PAGE 谱带带型, 数据分析使用 SPSS11.5, 采用单匹配相似系数组内联结分层聚类, 分别得到了 2 品种的聚类树状图, 图中显示, “江山美人”被分成了 3 个组; 其中 2 组分别为 200 Gy 处理材料和 240 Gy 处理材料; 另一组包含了小于等于 160 Gy 剂量处理材料及对照; “超级”被分成了 3 个组; 其中 2 组分别为对照和 240 Gy 处理材料, 另一组包含了小于等于 200 Gy 的各处理材料。由聚类分析可以看出 “江山美人”比“超级”有更强的电子束耐受性。试验表明, 电子束辐照对植株能诱导明显的变异, 试验为快中子诱变机理的进一步研究打下基础。

关键词: 电子束; 唐菖蒲; 同功酶; SDS-PAGE 电泳

中图分类号: S 603.6; Q 319 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)08-0180-03

诱变育种能突破原有基因库的限制, 诱发新基因或新的基因组合, 形成有现实或潜在利用价值的新种质资源。目前, 辐照诱变育种的诱变源仍以⁶⁰Co- γ 射线为主^[1-3], 国内近年来有关离子束的报道也较多^[4,5], 而电子束对植物进行辐射育种的研究较少, 特别是在观赏植物中鲜见报道^[6-8]。并且由于同功酶及 SDS-PAGE 分析简便直接易于操作, 近年来已广泛地运用于对诱变效应的研究之中^[2,3,9], 但根据电泳条带分析唐菖蒲诱变情况却鲜见报道。试验用电子束辐照唐菖蒲种球, 通过对 M1 代唐菖蒲在发育过程中过氧化物酶的动态变化的观察, 旨在初步确定电子束对唐菖蒲 M1 代植株的诱变作用及过氧化物酶应用于诱变植物的有效性, 为电子束诱变源的有效利用及诱变机理的进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

唐菖蒲品种供试材料为“超级”, 周径为 10~12 cm; “江山美人”周径为 11~13 cm。辐射处理其休眠种球。

1.2 方法

1.2.1 辐照处理 试验在中国工程物理研究院久远辐射中心完成。以机器电压为 3 MeV 的 EPS 电束加速器对材料进行中子辐照处理, 辐照率为 40 Gy/10 s, 剂量分别是 40、80、120、160、200、240 Gy, 及对照(0 Gy), 每种处理 20 株, 设 3 次重复。

1.2.2 田间栽培 唐菖蒲球茎种植于西南科技大学农业设施实验室, 种植用土为菜园土, 另加 5%珍珠岩、1%过磷酸钙和 5%复合肥混合而成, 水肥管理一致, 至花初开期进行调查。

1.2.3 同功酶电泳分析 取种植于田间的植株及原始对照株相同部位健康叶片, 分别进行过氧化物酶、过氧化氢酶、淀粉酶和酯酶 4 种同功酶电泳。电泳采用不连续缓冲系统, 垂直板电泳; 其中酯酶同功酶的分离胶浓度为 6.6%, 其他 3 种同功酶分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度均为 3%; 电泳采用稳压方式, 电泳后胶板采用同功酶常规染色法染色^[10,11], 后经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照并分析。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳分析 取材方法同上, 叶片中蛋白的分离采用不连续缓冲系统, SDS-PAGE 垂直板电泳, 浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 10%; 电泳后胶板采用银染法染色^[11], 后经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照分析。

2 结果与分析

2.1 同功酶电泳比较与分析

过氧化物酶、过氧化氢酶、淀粉酶和酯酶 4 种同功酶电泳比较见图 1 所示。从图 1 可以看出, “江山美人”

第一作者简介: 王丹(1962-), 女, 硕士, 教授, 研究方向为园艺植物遗传育种学。

通讯作者: 张志伟(1981-), 男, 山东菏泽人, 硕士, 研究方向为园艺植物遗传育种学。E-mail: zwztg@yahoo.com.cn。

基金项目: 中国工程物理研究院横向合作研究课题资助项目(200305), 西南科技大学创新基金资助项目。

收稿日期: 2007-03-30

对照株淀粉酶在该时期表达较弱,且除 240 Gy 处理组外均只表达一条酶带(图 1-1),而“超级”酶活性较强,且处理株活性较对照并未减弱(图 1-2)。“江山美人”的过氧化物酶同功酶在该时期均只有一条酶带,且带型及酶活性基本没有变化(图 1-3),而“超级”在剂量高于 80Gy 时开始出现一条特异表达谱带(图 1-4)。“江山美人”对照株过氧化氢酶在该时期酶活性非常弱,而辐照株酶活性有所增强,但均没有新酶带出现(图 1-5),而“超级”对照及各处理植株均只有一条酶带,且酶带位置及酶活性均相同(图 1-6)。酯酶同功酶多态性较好,均至少有 4 条酶带,“江山美人”40 Gy 辐照处理带型与酶活性同对照基本相同,而高于 80 Gy 辐照处理的酶带出现特异性表达(图 1-7);“超级”酶带带型并未有明显变化,只是酶活性有所不同(图 1-8)。从图 1-9 及 1-10 可以看出,处理组叶片 SDS-PAGE 电泳图谱与对照株相比部分条带均有减少,且条带颜色与对照有所不同,说明部分蛋白表达量较对照有所变化,且处理组有一些特异性条带出现。

Simple matching coefficients of similarity, 采用 Hierarchical Cluster 分层聚类,聚类方法使用 Within-groups linkage 组内连结,对 2 品种分别进行分析,建立各处理及对照间的聚类树状图。

表 1 基于同功酶及 SDS-PAGE 带谱的江山美人单匹配相似系数矩阵

1	1.000						
2	.943	1.000					
3	.857	.914	1.000				
4	.857	.914	.829	1.000			
5	.771	.829	.800	.800	1.000		
6	.657	.714	.686	.686	.886	1.000	
CK	.914	.971	.886	.886	.800	.686	1.000

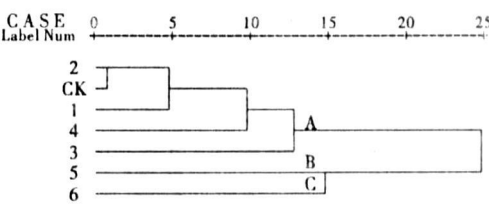


图 2 基于同功酶及 SDS-PAGE 带谱的唐菖蒲“江山美人”聚类图

由图 2 的聚类图,7 个供试材料可以明显的划分为 3 组,其中两组分别为 200 Gy 处理材料和 240 Gy 处理材料,另一组包含了小于等于 160 Gy 剂量处理材料及对照。可以看出低剂量处理与对照的相似性程度比较高,受低剂量辐照后改变并不大,只有在逐渐增大剂量后才出现明显变异,这说明“江山美人”对电子束辐照的耐受性较强。

表 2 基于同功酶及 SDS-PAGE 带谱的超级单匹配相似系数矩阵

1	1.000						
2	.947	1.000					
3	.816	.868	1.000				
4	.789	.842	.974	1.000			
5	.737	.789	.921	.947	1.000		
6	.711	.658	.737	.763	.763	1.000	
CK	.737	.789	.658	.632	.579	.553	1.000

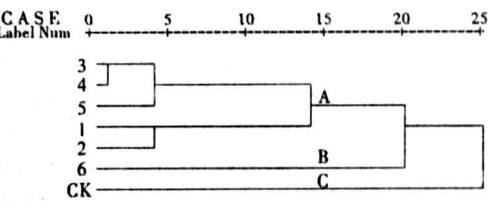


图 3 基于同功酶及 SDS-PAGE 带谱的唐菖蒲“超级”聚类图

由图 3 的聚类图可以看出,超级 7 个供试材料可以明显的划分为 3 组,其中两组分别为对照和 240 Gy 处理材料,另一组包含了小于等于 200 Gy 的各处理材料。可以看出低剂量处理材料与对照出现明显差异,这表明“超级”对电子束辐照较敏感。

3 讨论

由于外部形态标记直观快捷,长期以来人们在诱变材料的选育当中主要依靠形态学标记作为依据,但形态标记的数量有限,而且它不仅取决于遗传物质,还易受

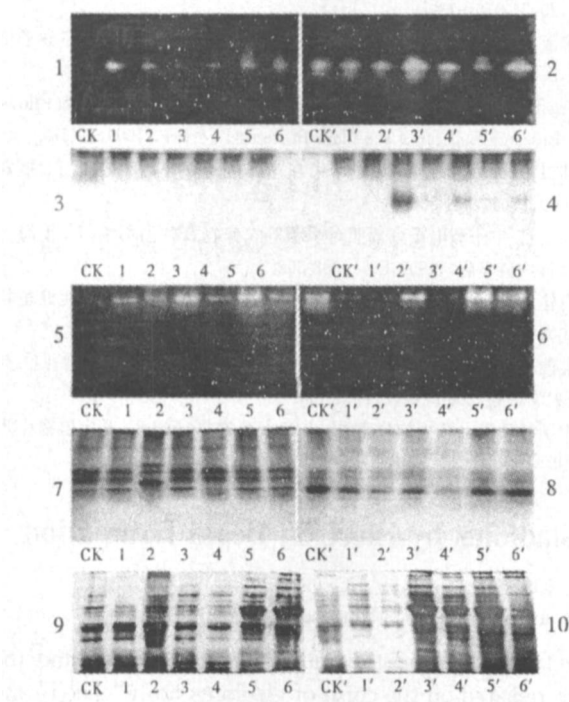


图 1 电子束辐照唐菖蒲同功酶电泳图谱

注 1.“江山美人”叶片淀粉酶酶谱图片;2.“超级”叶片淀粉酶酶谱图片;3.“江山美人”叶片过氧化物酶酶谱图片;4.“超级”叶片过氧化物酶酶谱图片;5.“江山美人”叶片过氧化氢酶酶谱图片;6.“超级”叶片过氧化氢酶酶谱图片;7.“江山美人”叶片酯酶酶谱图片;8.“超级”叶片酯酶酶谱图片;9.“江山美人”SDS-PAGE 电泳图谱;10.“超级”SDS-PAGE 电泳图谱。
CK/CK': 原始对照株;1/1': 40Gy 剂量处理组;2/2': 80Gy 剂量处理组;3/3': 120Gy 剂量处理组;4/4': 160Gy 剂量处理组;5/5': 200Gy 剂量处理组;6/6': 240Gy 剂量处理组。

2.2 基于同功酶酶带的聚类分析

数据分析使用 SPSS11.5, 对同功酶及 SDS-PAGE 电泳图谱上各泳道每一相同迁移位置,清晰且重复性好的条带记为“1”,无酶带的记为“0”,从而变换成二态性状矩阵,对二值数据的相似性测度采用单匹配相似系数

外界环境影响,因而很难全面而客观地反映变异结果。同功酶标记技术与形态性状相比,标记更加丰富,受环境影响较小,通过分析同工酶酶带的有无、出现时间的早晚及活性强弱可以推断基因水平的变异情况,与形态学标记相结合,能够更好地反映遗传多样性。

过氧化物酶、过氧化氢酶、淀粉酶和酯酶均是唐菖蒲体内存在的重要酶类,具有遗传稳定性,酶谱不易受环境的影响而变化,因此这些同功酶为研究唐菖蒲辐照诱变提供了一条较有效的途径。研究中各处理与对照在酶谱谱带上存在差异,但不同同功酶表现又不尽相同,这可能是由于不同同功酶对辐射的敏感性不同,同时,这从另一侧面不仅证明了辐照处理后材料发生了一定程度上的变异,而且也说明这种变异的复杂性、随机性和不确定性。但生物体内任何蛋白分子的合成都是由特定基因顺序决定的,并且受到调控基因的影响,从而决定了蛋白质的合成时间、数量、空间结构和在生物体内及细胞内存在部位的特异性;并且由于辐射对植株遗传序列诱变的随机性,使得植株的损伤及变异成为一个随基因的程序性表达而逐渐表现的过程,而能否得到的可遗传的变异,仍然需要对其后代进行研究。

核技术辐射诱变育种的一个原则是既有较高的变异率和较宽的变异谱,又能保证较高存活率。为了得到辐照适宜剂量,人们常常采用 LD_{50} (使 50% 植株死亡的剂量)、 VID_{50} (使活力指数下降 50% 的剂量)、 SHD_{50} (使幼苗高度降低 50% 的剂量) 和 PHD_{50} (使株高降低 50% 的剂量) 等方法,其中以 LD_{50} 最为常用。但辐照剂量与诱变情况并不完全呈线性相关关系,仅从各种调查指标的数值减少一半来确定最佳辐照剂量并不能全面而灵活的把握诱变结果,而通过聚类分析则可以更全面地把

握各辐照剂量对植株的具体诱变情况。

在辐照诱变所造成的酶谱条带变化中,新条带的产生和原有条带的消失这两种结果均是辐照诱变所造成的,对结果的分析同等重要;而单匹配相似系数同等对待正匹配与负匹配,均给予一倍的权值,试验采用单匹配相似系数进行分析能较客观地反映真实变异结果。由电泳图谱的聚类分析结果可以看出,唐菖蒲不同品种间对电子束的敏感性存在较大差异,“江山美人”的耐受性明显高于“超级”,而“超级”则更易发生变异,从两品种的田间种植结果及变异情况观察同样证明了这一结果。

参考文献

- [1] 王丹,任少雄,苏军,等.核技术在观赏植物诱变育种上的应用[J].核农学报,2004,18(6):443-447.
- [2] 黄训端,何家庆,周立人,等. $^{60}Co\gamma$ 射线辐照对花魔芋同工酶与品质的影响[J].激光生物学报,2005,14(3):213-217.
- [3] 胡超,洪亚辉,黄丽华,等.菊花辐射后代生理生化特性的研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2003,29(6):471-473.
- [4] 陈恒雷,吕杰,曾宪贤.离子束诱变育种研究及应用进展[J].生物技术通报,2005(2):10-13.
- [5] 宋云,张怀渝,畅志坚.离子束用于诱变育种的研究进展[J].分子植物育种,2004,2(2):301-305.
- [6] Tanabe K, Dohino T. Effects of electron beam irradiation on cut flowers[J]. Research Bulletin of the Plant Protection Service, 1993, 29: 1-9.
- [7] 林祖军,孙纪霞,连福惠.电子束在花卉诱变育种上的应用[J].核农学报,2002,16(6):351-354.
- [8] 张圣君.中子和电子束辐照对水稻等农作物育种的影响[J].上海大学学报(自然科学版),1999,5(5):388-392.
- [9] 毛桂莲,许兴.枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析.西北植物学报,2005,25(2):275-280.
- [10] 吴能表,谈锋.不同光照条件对少花桂幼苗同工酶谱带的影响[J].西南农业大学学报,2002,24(2):101-104.
- [11] 中国科学院上海植物生理所,上海市植物生理学会.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999:263-266.

Study on Isoenzymes and SDS-PAGE in Induced Gladiolus by Electron Beam Irradiation

WANG Dan, ZHANG Zhi-wei, ZHANG Dong-xue, LIN Shao-sen, KUANG Meng

(Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621002, China)

Abstract: The aim of the experiment is to test the feasibility of electron beam induced mutation on Gladiolus and the effects of various doses of electron beam on Gladiolus. Electron beam radiated on the corm of gladiolus both "Chaoji" and "Jiangshanmeiren" with 3 MeV energy and seven doses of 0Gy, 40Gy, 80Gy, 120Gy, 160Gy, 200Gy, 240Gy. SDS-PAGE and the isozymes of POD, CAT, AMY, EST were tested by PAGE technique. The result showed that isozymes of POD, CAT, AMY, EST and SDS-PAGE was obviously changed by electron beam irradiation. The bands of isozymes and SDS-PAGE of different treated materials were studied. Variations of mutagenic effects extent were found among varieties of irradiation dosage, and genetic differentiations are in accord with variations of morphology. But these changes varied greatly among different cultivars. Based on band types of isozymes and SDS-PAGE, the cluster analysis both "Chaoji" and "Jiangshanmeiren" was done respectively and dendrogram generated by within-groups linkage cluster analysis based on Simple matching coefficients of similarity obtained using SPSS software version 11.5. The results indicated that "Jiangshanmeiren" may be divided into three groups: lower dose group (gladiolus radiated at the dose no more than 160 Gy and CK), 200 Gy group and 240 Gy group. "Chaoji" may be divided into three groups: CK group, lower dose group (gladiolus radiated at the dose no more than 200 Gy) and 240 Gy group. Based on the difference of dendrogram, it was revealed that "Jiangshanmeiren" possessed higher resistance to radiation than "Chaoji", and "Chaoji" was more sensitive to electron beam irradiation than "Jiangshanmeiren". These results showed that electron beam induction was an effective way for Gladiolus breeding. Conclusion these results laid the foundation of electron beam irradiation mutation breeding study.

Key words: Electron beam; Gladiolus; Isozymes; SDS-PAGE electrophoresis