

山楂叶片过氧化物同工酶分析

杨宗芳, 孟庆杰, 王光全, 孔维龙

(聊城大学 生命科学院, 山东 聊城 252059)

摘要:应用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,对山东省内 24 个山楂栽培品种样本进行过氧化物酶同工酶电泳分析,对获得的酶谱带和迁移率进行分析,并通过聚类分析法对其亲缘关系进行研究。结果表明:24 个样本之间有 1 条共同的同工酶谱带存在 17 条特异性的条带,说明供试样本之间虽然有一定的共同起源,但是在进化过程中逐渐产生差异。根据分析结果将供试的 24 个栽培品种分为 3 个聚类群组以表示各品种的亲缘关系的远近;各品种之间的亲缘关系对品种选育有重要的指导意义。

关键词:山楂;过氧化物同工酶;亲缘关系

中图分类号:S 661.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0122-03

由于植物的表型易受生长环境的影响,仅仅靠形态观察的分类势必受到一定程度的影响。植物体内的生物大分子直接或间接受遗传物质的控制,因此通过分析各物种的生物大分子来研究其亲缘关系可使古老的植物系统学焕发出新的活力。山东省山楂种质资源丰富,是我国山楂的主要栽培区。在 20 世纪 80 年代,国家农业部选定的 7 个全国山楂基地县,山东省就占 2 个(平邑县、临朐县)^[1]。山楂品种之间同物异名和同名异物的现象较普遍,该试验运用分子生物学实验技术中的过氧化物同工酶电泳的方法分析了山东省内 24 个山楂样本及其亲缘关系,以期对山楂育种起到一定的指导作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 2011 年 4~5 月分别在青岛、烟台、聊城、临沂 4 个地区采集的 24 个山楂样本:“大金星”、“冠金星”、“石棚”、“早红”、“黑红”、“皮金星”、“超金星”、“天宝甜红”、“蒙山红”、“大糖球”、“大五棱”、“临沂大金星”、“大红袍”、“五星红”、“天宝红”、“粉楂”、“沂蒙红”、“大绵球”、“实生山楂 1 号”、“欧楂”、“青条红”、“实生山楂 2 号”、“实生山楂 3 号”和“福泉红”。

第一作者简介:杨宗芳(1987-),女,山东莱州人,在读硕士,研究方向为资源植物与演化植物研究。E-mail: xiuzhudd@yahoo.com.cn。

责任作者:王光全(1957-),男,本科,教授,现主要从事园艺植物种质资源等研究工作。E-mail: wgq@lccu.edu.cn。

基金项目:山东省“十一五”农业科技成果转化基金资助项目(鲁科农(2010)79);山东省科技攻关资助项目(2009GG10009031);聊城大学重点科研基金资助项目(X071006)。

收稿日期:2011-10-13

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 取 24 种山楂叶,去中脉,分别准确称取 0.5 g,加入适量样品提取液,置于冰浴研磨匀浆后移入离心管中,8 000 r/min 离心 10 min,上清液为可溶性蛋白的粗提液。取此液 0.5 mL 加入等体积 40%蔗糖溶液,混匀后贮于 4℃冰箱备用。

1.2.2 电泳分离及染色 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳方法进行过氧化物同工酶试验分析。该试验采用 7.5%浓度的分离胶,2.5%浓度的浓缩胶。取每种样品液 10 μ L 点入点样孔内。开始电泳时电压调至 80 V,待溴酚蓝指示剂进入分离胶后将电压升至 140 V,恒压电泳 2~3 h,待溴酚蓝标志到达凝胶前沿为止。将电压调至零后断电。电泳结束后,切断电源,取出缓冲液并低温保存,可重复使用 2 次。然后松开卡板,取出凝胶板。采用 1%醋酸联苯胺染色,然后用 7%醋酸固定,同时用 7%醋酸脱色,观察各条带显色,用数码相机拍照。

1.3 数据分析

根据各酶带的迁移距离计算其相对迁移率(Rf)。Rf=凝胶中酶带的迁移距离/指示剂的迁移距离。根据迁移率和酶带的数量、颜色深浅分析酶带特征。根据所统计酶谱带的有无,把有带计为 1,无带计为 0^[2],组成 0,1 二元矩阵,用 NTS YS p c2.1 软件的 SAHN 程序和 UPGMA 方法计算材料间的相似系数并进行聚类分析^[3-4]。

2 结果与分析

2.1 山楂过氧化物同工酶电泳图及特征分析

通过对 24 种山楂样品叶片的过氧化物同工酶电泳,得到的同工酶谱如图 1 所示,不同品种(品系)的过氧化物同工酶电泳酶带在位置、宽窄、浓淡以及数量等方面既表现出了一定的相似性,又表现出了一定的差异性。

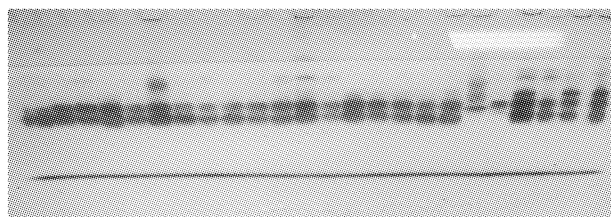


图1 山楂过氧化物同工酶谱
(自右到左分别为样品 1~24)

从数量上看,各样本的过氧化物酶酶带数目从 1~5 条不等,酶带总类型为 18 条,各样本间酶带类型和数目有差异,这些差异可以作为 24 个山楂样本间相互区别的依据。

从位置上看,24 个山楂样本的过氧化物同工酶主要分布在 $R_f=0.227\sim 0.627$ 区域。 $R_f=0.56$ 处为 24 个山楂样本共有的酶带,表明这些酶带可能是 24 个山楂样本过氧化物酶特征酶带。“大金星”、“石棚”、“大糖球”、“早红”、“黑红”、“皮金星”、“大红袍”、“冠金星”、“超金星”、“天宝甜红”、“蒙山红”、“青条红”和“实生山楂 3 号”13 个样本具有 $R_f=0.613$ 处的条带,“粉楂”、“沂蒙红”、“大绵球”和“实生山楂 1 号”4 个样本具有 $R_f=0.607$ 处的条带,“青条红”、“实生山楂 1 号”、“实生山楂 2 号”和“实生山楂 3 号”4 个样本具有 $R_f=0.333$ 处的条带,“大金星”、“冠金星”、“五星红”和“天宝红”4 个样本具有 $R_f=0.367$ 处的条带,“青条红”、“实生山楂 2 号”和“实生山楂 3 号”3 个样本具有 $R_f=0.453$ 处的条带,“天宝红”和“实生山楂 2 号”2 个样本具有 $R_f=0.6$ 处的条带,“青条红”和“实生山楂 1 号”2 个样本具有 $R_f=0.307$ 处的条带,“大红袍”和“五星红”2 个样本具有 $R_f=0.227$ 处的条带。上述 8 条多态性条带说明供试样本之间分别有共同的过氧化物酶表达。另外有 9 条特异性条带:“大五棱”样本具有 $R_f=0.627$ 处的条带,“欧楂”样本分别具有 $R_f=0.62$ 处和 $R_f=0.4$ 处的条带,“辐泉红”样本分别具有 $R_f=0.493$ 处、 $R_f=0.387$ 处和 $R_f=0.28$ 处的条带,“大糖球”样本具有 $R_f=0.36$ 处的条带,“大金星”样本具有 $R_f=0.32$ 处的条带,“平邑 13 号”样本具有 $R_f=0.253$ 处的条带。

从整个酶谱上看,“辐泉红”有 3 条特异性酶带,而“欧楂”有 2 条特异性酶带,说明二者同其它样本之间差异较明显。“青条红”和“实生山楂 3 号”的过氧化物酶种类较多,都具有 5 条酶带,“青条红”的酶带比“实生山楂 3 号”的酶带颜色要深,说明虽然它们的亲缘关系较近但是在过氧化物同工酶表达方面仍存在差异。

2.2 24 个山楂样本叶片过氧化物同工酶酶谱的相似系数分析和聚类分析

根据统计的酶带,应用 Qualitative data 得到 24 个山楂样本的相似系数。各品种间的相似系数在 0.632~

1.000。从相似系数比较分析可知,“辐泉红”与“青条红”以及“实生山楂 3 号”的相似系数最小,表明它们之间的相似性较小,即亲缘关系较远。

根据所得的相似系数,应用 NTSYS p c2.1 软件中 S AHN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析,其结果见图 2。

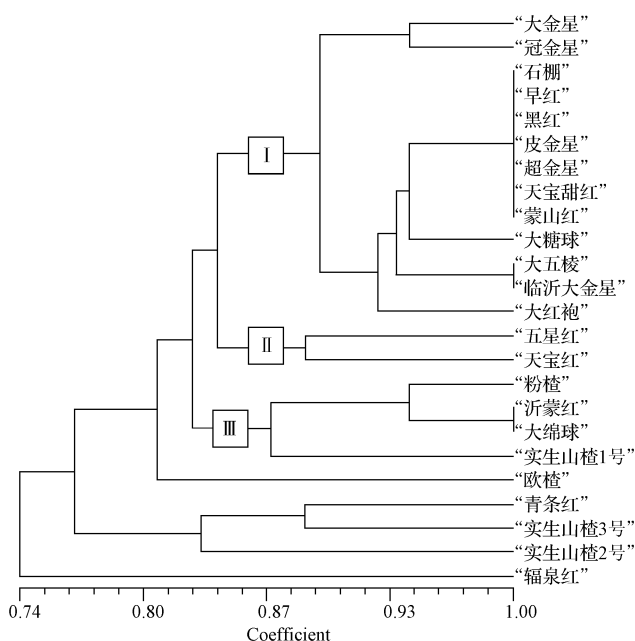


图2 24 个山楂样本聚类分析图

由图 2 可以看出,“辐泉红”跟其它 23 个样本的相似度最低,在 0.75(深度优化纯净版 1)处就与其它样本分开。其次是“青条红”、“实生山楂 3 号”、“实生山楂 2 号”和“欧楂”与其它样本分开。其余可分为 I、II 和 III 3 个聚类群组。其中 I 聚类群组包含样本最多。在 I 聚类群组中“石棚”、“早红”、“黑红”、“皮金星”、“超金星”、“天宝甜红”和“蒙山红”这 7 个样本之间相似系数最大,首先聚合到一起,表明它们之间有近的亲缘关系。但是“超金星”的果实个大扁圆,“天宝甜红”果实高糖可鲜食,“黑红”是大果厚肉的品种,虽然它们有近亲缘,但是在性状上表现不同,因此形成了不同的品种。上述 7 个样本先与“大糖球”聚合到一起,再与“大五棱”和“临沂大金星”聚合到一起,然后与“大红袍”聚合到一起,最后与“大金星”、“冠金星”聚合到一起。II 聚类群组包括“五星红”和“天宝红”2 个样本。III 聚类群组中“沂蒙红”与“大绵球”之间的相似系数也是最大,说明二者的起源是相同的。但是“沂蒙红”的抗病性强,显然“沂蒙红”品种在共同遗传物质起源的基础上又有抗病性的变异。二者先与“粉楂”聚合在一起,然后与“实生山楂 1 号”聚合在一起。

3 结论与讨论

同工酶是基因表达的直接产物,所以同工酶在很大

程度上能反映植物个体的遗传差异,常用作探测基因差异和遗传关系及品种遗传性状的指标^[4]。酶带的差异不仅反映品种基因水平的差异,还表达测定品种代谢水平的差异,因此同工酶的分析将是复杂的^[5]。如通过同工酶分析对品种间亲缘关系进行初步分类并结合其它有效方法将很有益处。

该试验应用过氧化物同工酶技术对采集的 24 个样本之间的亲缘关系进行了分析,结果表明,“福泉红”与其它 23 个样本的亲缘关系较远,“石棚”、“早红”、“黑红”、“皮金星”、“超金星”、“天宝甜红”和“蒙山红”这 7 个样本之间亲缘关系较近,“大五棱”和“临沂大金星”亲缘关系较近,“沂蒙红”与“大绵球”之间亲缘关系较近。将样本之间的初步亲缘关系与它们的优良特性相结合对于品种之间杂交选育有更直接的指导意义。

同工酶是基因表达的产物,并且同工酶电泳图谱几乎不受外界环境条件的影响^[6],因此能较真实地反映各样本间的亲缘关系。但是对于亲缘关系较近的样本之

间一种同工酶不足以将其完全分开,需要结合多种同工酶分析,或者结合其它的分子标记进一步分析其亲缘关系。

参考文献

- [1] 王光全,黄勇,孟庆杰. 山东山楂种质资源及其评价利用研究[J]. 种子,2009,28(9):56-58.
- [2] Fuentes J L,Escobar F,Alvarez A,et al. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme,RAPD and AFLP markers [J]. Euphytica, 1999,109:107-115.
- [3] 陈立强,师尚礼,满元荣. 陇东野生紫花苜蓿的同工酶分析[J]. Grassland and Turf, 2010,30(1):24-27.
- [4] 董原. 不同油豆角品种过氧化物酶活性及其同工酶酶谱分析[J]. 北方园艺,2011(6):144-145.
- [5] 连建国,孟庆杰,王光全. 罐装黄桃种质过氧化物同工酶的酶谱分析[J]. 落叶果树,2010(6):12-13.
- [6] 巫水钦,冯瑞集. 甘薯品种过氧化物酶同工酶分析初报[J]. 福建省农学院学报,1995,10(3):35-39.
- [7] 陈启林,陈毓荃,陈静,等. 同工酶 PAGE 凝胶电泳在大白菜品种鉴定中的应用研究[J]. 西北农业学报,1998,7(2):94-97.

Peroxide Isozyme Analysis of Hawthorn Leaf

YANG Zong-fang, MENG Qing-jie, WANG Guang-quan, KONG Wei-long
(School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract: With the techniques of polycrylamid gel electrophoresis the peroxide isozyme of 24 cultivar samples were detected and analyzed. These 24 cultivar samples were collected from four different district in Province of Shandong. The enzyme bands and migration rate obtained by polycrylamid gel electrophoresis were studied. And the genetic relationship was analyzed through the clustering analysis. The results showed that there are 1 common band and 17 specific bands among 24 cutivar samples. It indicated that these 24 cultivar samples had common origin to a certain extent, but in the evolutionary process differences gradually generated among these samples. According to the results of analysis 24 cultivated varieties were divided into three clustering group. They demonstrated the genetic relationship among the varieties. The genetic relationship among the varieties had guiding significance for breeding.

Key words: hawthorn; peroxide isozyme; genetic relationship

农业部发布 2011 年农产品质量安全例行监测信息

2011 年,农业部根据农产品质量安全监测计划组织开展了 4 次农产品质量安全例行监测工作。全年共监测全国 144 个大中城市 5 大类产品 91 个品种 91 项参数,抽检样品近 4 万个。监测结果显示,按往年同口径统计,蔬菜、畜禽产品和水产品监测合格率分别为 97.4%、99.6% 和 96.8%,农产品质量安全水平总体稳定,逐步趋好。

农业部已将监测结果通报各地,要求对监测发现的问题进行认真整改,有针对性地跟进开展农产品质量安全监督检查,会同有关部门严肃处理不合格农产品及其生产经营企业。同时,继续深入开展蔬菜高毒农药残留、畜产品“瘦肉精”、生鲜乳违禁物质和假劣农资等专项整治行动,严厉打击不法行为,加强源头治理和种养殖环节监管,消除安全隐患,进一步提高农产品质量安全水平。全面部署并启动 2012 年农产品质量安全例行监测工作,加大春节前监测力度,努力确保节日期间农产品质量安全。

摘自 中国农业信息网