

百合耐盐突变体同工酶电泳分析

黄海涛¹, 王 丹², 陈 霞²

(1. 绵阳市农业科学研究院, 四川 绵阳 621023; 2. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

摘 要:以东方百合离体不定芽为试材,通过 POD、SOD 同工酶电泳技术,研究了不同耐盐性的百合耐盐突变体同工酶的差异性。结果表明:百合的耐盐性与同工酶的表达有一定的相关性,耐盐突变体的 POD 同工酶谱以及不定芽的 SOD 同工酶谱与对照比较出现了新的谱带,且随着突变体耐盐能力的增强,突变体植株与对照的同工酶谱相似性越来越低,亲缘关系越来越远。

关键词:百合;耐盐突变体;同工酶

中图分类号:S 682. 2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0127-03

近年来,我国百合生产区域的化肥农药的施用量越来越多,有机肥的施用量越来越少,土壤盐渍化呈现越来越严重的趋势。百合对土壤中的盐分十分敏感,忌连作,在含盐量高的土壤环境中,百合生长发育不良,产量低,开花质量差,甚至出现绝收的情况,使百合种植户的经济效益受到严重的影响。目前百合育种的研究工作大部分是以提高观赏性为主的品质育种,而通过诱变筛选百合耐盐突变体的抗性育种工作报道较少^[1-4]。同工酶是酶的基因产物,通过同工酶酶谱的变异情况,可以了解基因型的差异^[5-9]。该试验研究不同耐盐能力的百合突变体同工酶的差异性,探索百合耐盐突变体的耐盐机理,以期为进一步培育成百合耐盐新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为东方百合离体不定芽。

1.2 试验方法

1.2.1 耐盐突变体的筛选 用⁶⁰Co 射线对百合离体不定芽进行急性辐照诱变,辐照后将不定芽立即转接到新鲜培养基上进行增殖。继代培养 2 代后将不定芽分别接种到 NaCl 浓度为 0、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50% 的培养基中进行耐盐筛选,将生长较快的材料采取逐步提高含盐浓度的方法,每 3 周转移 1 次,直到筛选出耐 0.75%、1.00%、1.25% NaCl 的百合耐盐突变体。

1.2.2 耐盐突变体 SOD 同工酶分析 分别取耐 0.75%、1.00%、1.25% NaCl 的百合耐盐突变体的芽和

叶片 1.0 g,加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8),在冰浴下研磨成匀浆,4℃ 10 000×g 离心 15 min,上清液即为 SOD 粗提液。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶质量分数为 2.5%,分离胶质量分数为 7.5%,Tris-Gly(pH 8.3)为电极缓冲溶液,0.1%的溴酚蓝为指示剂,采用氮蓝四唑染色法^[10],对重复性好的图片,经 BIO-RAD Gel-Doc 凝胶成像拍照并分析。

1.2.3 耐盐突变体 POD 同工酶分析 分别取对照和耐 0.75%、1.00%、1.25% NaCl 的不定芽和叶片 1.0 g,加入 3 mL 水于冰浴上研磨,4℃ 下 3 500 r/min 离心 15 min,上清液为芽和叶的粗酶提取液。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶质量分数为 2.5%,分离胶质量分数为 7.5%,Tris-Gly(pH 8.3)为电极缓冲溶液,0.1%的溴酚蓝为指示剂,醋酸联苯胺染色法染色 10 min^[10]。染色后经 BIO-RAD Gel Doc 凝胶成像系统拍照并分析。

1.3 数据分析

采用 SPSS 11.5 (Statistics Package for Social Science)软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 SOD 同工酶电泳比较

由图 1-a 可知,东方百合对照的叶片和不定芽的 SOD 同工酶都仅有 1 条酶带,*R_f* 为 0.615,与对照比较,耐盐突变体叶片的 SOD 同工酶酶带颜色变亮,T3 叶片新增了 1 条酶带(*R_f* 为 0.450)。由图 1-b 可知,突变体不定芽的 SOD 同工酶酶谱带与对照比较宽度及颜色有明显改变,T1 在 *R_f* 为 0.450 处出现了 1 条特异性酶带,T2、T3 新增了 *R_f* 为 0.450、0.202 的 2 条特异性酶带。由图 1 可知,不同的耐盐突变体之间 SOD 同工酶也存在一定的差异,随着耐盐能力的增强,SOD 同工酶亮度逐渐增强。

第一作者简介:黄海涛(1983-),男,湖南新宁人,在读博士,研究方向为园艺植物遗传育种。E-mail:cet_ch@163.com。

基金项目:中国工程物理研究院军民两用开发技术资助项目。

收稿日期:2012-10-22

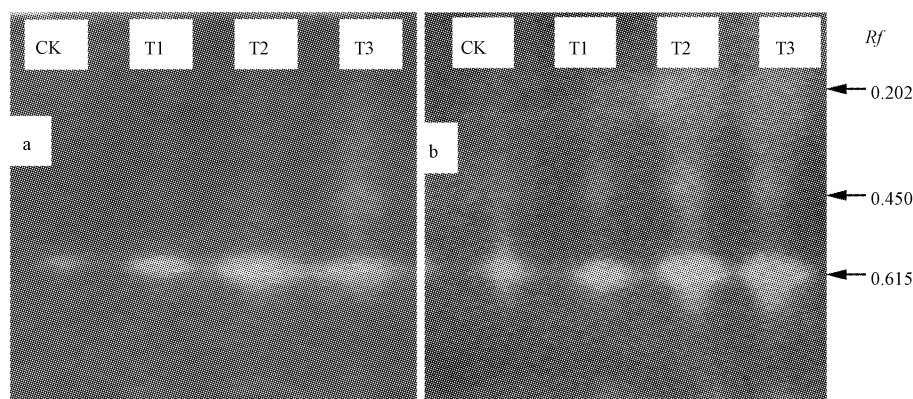


图1 耐盐突变体和对照 SOD 同工酶电泳图谱

注:a. 叶片 SOD 同工酶;b. 不定芽 SOD 同工酶;CK. 原始对照株;T1. 耐 0.75% NaCl 的突变体;T2. 耐 1.0% NaCl 的突变体;T3. 耐 1.25% NaCl 的突变体。

Fig. 1 Diagram of isozyme electrophoresis of the SOD in the mutants with salt-tolerant and the control

Note:a-SOD isozyme in the leaves;b-SOD isozyme in the adventitious Shoots;CK-the controls;T1-the mutant with salt-tolerant(0.75% NaCl;T2-the mutant with salt-tolerant(1.0% NaCl);T3-the mutant with salt-tolerant(1.25% NaCl).

2.2 耐盐突变体 POD 同工酶电泳分析

2.2.1 东方百合不定芽 POD 同工酶电泳分析 以⁶⁰Co γ 射线急性辐照筛选的耐盐突变体的不定芽为材料进行 POD 同工酶电泳。由图 2 可以看出,耐盐突变体的不定芽 POD 同工酶与对照相比,条带颜色显著加深,条带数显著增多,对照仅有 5 条 POD 同工酶酶带, R_f 分别为 0.112、0.190、0.285、0.366、0.516。随着突变体耐盐能力的增强,酶带宽度逐渐增大,颜色逐渐加深,说明酶活性逐渐增强。突变体植株 T1 出现了 R_f 为 0.168、0.190、0.458 的特异性酶带,T2、T3 比 T1 新增了 R_f 为 0.552 的特征带,比对照新增了 4 条特征带。新出现的 4 条特征带可能与百合的耐盐性有关。

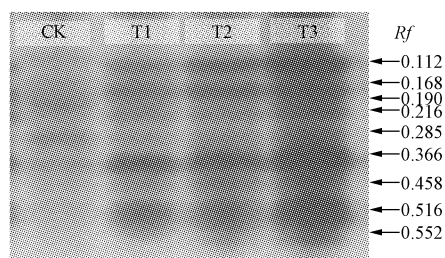


图2 耐盐突变体和对照百合不定芽 POD 同工酶电泳图谱

注:CK. 原始对照株;T1. 耐 0.75% NaCl 的突变体;T2. 耐 1.00% NaCl 的突变体;T3. 耐 1.25% NaCl 的突变体。下同。

Fig. 2 Diagram of isozyme electrophoresis of the POD in the adventitious shoots of the mutants with salt-tolerant and the control

Note:CK-the controls;T1-the mutant with salt-tolerant (0.75% NaCl);T2-the mutant with salt-tolerant(1.00% NaCl);T3-the mutant with salt-tolerant(1.25% NaCl). The same as below.

2.2.2 东方百合叶片 POD 同工酶电泳分析 由图 3 可以看出,耐盐突变体和对照 POD 同工酶的差异。对照组叶片 POD 同工酶谱仅有 3 条带, R_f 值分别为 0.105、0.180、0.300。T1 与对照组比较,叶片 POD 同工酶酶谱无显著性差异,酶带着色较浅,活性较弱。突变株 T2、T3 在 R_f 为 0.105、0.180 处的条带活性比对照组明显增强,出现了特异性同工酶酶带(R_f 为 0.238)。

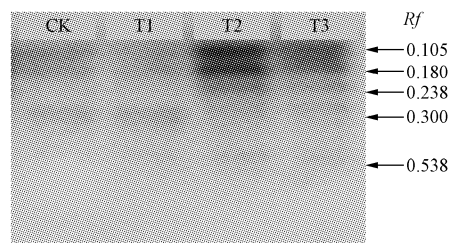


图3 耐盐突变体和对照叶片 POD 同工酶电泳图谱

Fig. 3 Diagram of isozyme electrophoresis of the POD in the leaves of the mutants with salt-tolerant and the control

2.2.3 基于同工酶的聚类分析 利用溴酚蓝确定同工酶条带在凝胶成像上的相对位置。在每个相同迁移位置上有条带记作“1”,无条带记作“0”。采用单匹配相似系数(SM, Simple matching coefficients of similarity)进行相似性测度,从而变换成各样本(CK、T1、T2、T3)的相似系数矩阵,从表 1 可以看出,⁶⁰Co γ 射线辐照所得的耐盐突变体以及对照之间的亲疏程度。聚类方法使用组内连结(Within-groups linkage),得到突变体和对照之间的亲缘关系树形图(图 4)。

表 1 CK、T1、T2 和 T3 间的相似系数矩阵

Table 1 Correlation coefficient matrix to CK, T1, T2 and T3

	CK	T1	T2	T3
CK	1.000			
T1	0.684	1.000		
T2	0.526	0.842	1.000	
T3	0.474	0.789	0.947	1.000

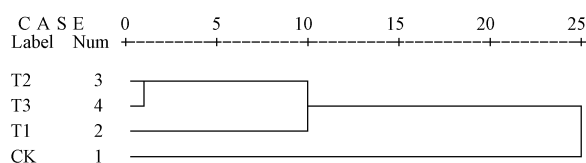


图 4 基于 SOD 和 POD 同工酶谱的聚类树形图

Fig. 4 Dendrogram of isozyme pattern of the SOD and POD with cluster analysis

由图 4 可知,4 个东方百合材料被明显分成 2 组,其中 1 组为突变体植株(T1、T2、T3),另 1 组是对照 CK,突变体植株又被分为 2 类,1 类为耐盐能力较强的突变体植株(T2、T3),另 1 类为 T1。随着耐盐浓度的增强,耐盐突变体与对照之间的遗传距离越来越大,相似系数越来越小。耐 0.75% NaCl 的突变体 T1 与对照的酶带相似系数为 0.684,而耐 1.25% NaCl 的突变体 T3 和对照之间酶谱带相似性系数仅为 0.474,亲缘关系较远(表 1)。T2、T3 相似系数为 0.947,亲缘关系较近。

3 结论与讨论

该试验用 POD 和 SOD 同工酶进行耐盐突变体的鉴定,结果表明不定芽和叶片进行 POD 同工酶电泳所得的结论基本一致,即百合的耐盐性与同工酶的表达有一定的相关性。为适应盐胁迫环境,耐盐突变体的变异系 POD 同工酶谱上有对照系所不具备的新谱带出现,同时在变异系酶谱和对照系酶谱都出现的酶带中其活性也有显著差异。但是用不同部位(不定芽和叶片)SOD 同工酶电泳所得的结论有一定的差异,以不定芽为材料电泳,耐盐突变体和对照之间 SOD 同工酶带型存在着显著的不同,出现了特异性同工酶条带,但是以叶

片为材料电泳部分突变体 SOD 同工酶未出现特异性条带,仅仅活性有所增强,这是因为同工酶的表达比较复杂,它会受植物的发育状况、器官和组织特异性及人为或环境等因素的影响。说明东方百合 SOD 同工酶比 POD 同工酶更容易受其它因素的影响,因此东方百合 POD 同工酶更适合应用于同工酶电泳分析。

在耐盐突变体同工酶酶谱聚类分析中发现对照为一大类群,另一大类群为耐盐突变体植株(T1、T2、T3),且随着所能忍耐的盐浓度的增大,突变体植株与对照的同工酶相似性越来越低,亲缘关系越来越远。分析原因随着盐浓度的增大,耐盐突变体为适应盐胁迫环境,其相应的同工酶系的底物亲和力增强从而对代谢的调控能力增强,同时产生了特异性的同工酶条带提高了生物对外界条件(NaCl)的适应性。这些同工酶变异是否为可遗传的变异,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 左志锐,高俊平,穆鼎,等.盐胁迫下百合两个品种的叶绿体和线粒体超微结构比较[J].园艺学报,2006,33(2):429-432.
- [2] 高健,卢惠萍.花卉辐射诱变育种研究进展(综述)[J].安徽农业大学学报(自然科学版),2000,27(3):228-230.
- [3] 刘小溪,吴丽芳,张艺萍,等.百合育种趋势及技术研究进展[J].浙江农业科学,2011(2):287-290.
- [4] Hoshi Y, Kondo M, Mori S. Production of transgenic lily plants by Agrobacterium-mediated transformation[J]. Plant Cell Reports, 2004, 22: 359-364.
- [5] 朱传炳,沈明希,朱海泉.冬瓜杂种一代及其亲本的同工酶比较研究[J].生命科学研究,1998,2(2):118-121.
- [6] 刘海衡,胡胜武.23 份芥菜型油菜同工酶遗传多样性分析[J].西北农业学报,2010,19(10):82-85.
- [7] 张志伟,王丹,张冬雪.唐菖蒲两变异株的同工酶及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的比较分析[J].原子能科学技术,2007,41(3):366-371.
- [8] 戚微娜,吕金印,赵军,等.⁶⁰Coγ 辐照对冬小麦幼苗保护酶同工酶表达的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(7):123-127.
- [9] 王文恩,包满珠,张俊卫.狗牙根品种及辐射诱变 M1 代变异植株的过氧化物同工酶分析[J].中国草地学报,2007,29(1):71-75.
- [10] 中科院上海植物生理研究所.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999:302-314.

Isozyme Electrophoresis Analysis of Salt-tolerant Mutant of Lily

HUANG Hai-tao¹, WANG Dan², CHEN Xia²

(1. Mianyang Academy of Agricultural Science Research, Mianyang, Sichuan 621023; 2. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010)

Abstract: Taking Oriental lily *in vitro* adventitious buds as test material, the difference of isozyme in various salt-tolerance mutants of lily by POD and SOD electrophoresis technique were studied. The results showed that the salt-tolerance of lily had certain relevance with isozyme expression. The mutants had more special new bands of POD isozyme and SOD isozyme than the control. With the increase of the ability of salt tolerance of mutant plants, the isozyme zymogram similarity was more and more low and the phylogenetic relationship was more and more far compared with the control.

Key words: lily; salt-tolerant mutant; isozyme