

8个紫花苜蓿品种的过氧化物同工酶分析

赵菲佚, 焦成瑾, 孔彬彬, 康涛涛, 安建平

(天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃 天水 741000)

摘要: 利用非变性聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术, 对8个野生紫花苜蓿品种过氧化物同工酶进行了分析, 通过对各供试材料酶谱特征和相似系数的分析, 探讨紫花苜蓿品种间的亲缘关系。结果表明, 过氧化物同工酶在8个紫花苜蓿品种中均有表达, 但各品种间的表达谱带及不同的同工酶表达量存有差异。8个品种共获得24条酶带, 且存有1条共有表达酶条带, 其中陇东野生紫花苜蓿同工酶谱带最多, 表达有4条带; 阿尔冈金酶谱带数最少, 仅出现2条带。酶谱条带聚类分析表明, 陇南野生紫花苜蓿与阿尔冈金间亲缘关系最远, 亲缘关系呈现不同程度的差异。

关键词: 紫花苜蓿; 酶聚丙烯酰胺电泳分析; 过氧化物酶同工酶; 亲缘关系

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2016)01-0006-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2016.01.003

Analysis of Peroxidase Isozymes in Eight Alfalfa Varieties

ZHAO Feiyi, JIAO Chenjing, KONG Binbin, KANG Taotao, AN Jianping

(School of Bioengineering & Biotechnology, Tianshui Normal University, Tianshui Gansu 741000, China)

Abstract: Using native polyacrylamide gel electrophoresis, peroxidase isozymes of eight different varieties of alfalfa are analyzed. Based on the zymography characteristics of varieties tested, similarity coefficient and phylogenetic relationships among alfalfa varieties are obtained. The result shows that peroxidases in the varieties tested are expressed, however expression of all varieties varied. Total 24 peroxidase bands are observed and one major enzyme is presented. Moreover, expression level of the alfalfa cv. Longnan is predominately high and it has four enzyme bands. In contrast, expression level of alfalfa cv. Algonquin is low and possessed merely two enzyme bands. Analysis of zymography bands cluster shows that alfalfa cv. Longdong and alfalfa cv. Algonquin is the farthest in genetic distance. In addition, there are varying degrees of genetic differences between the other varieties.

Key words: Alfalfa variety; Native PAGE; Peroxidase isozyme; Genetic relationship

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为多年生豆科牧草, 抗逆性强, 适应范围广, 能生长在多种类型的气候、土壤环境下, 是世界上栽培最早、面积最大、经济价值最高的牧草, 有“牧草之王”的美称, 因此在我国被广泛种植。在生产实践中, 由于在同一地区需种植不同品种的紫花苜蓿, 或从其它地区引种进行种植示范, 使得对于紫花苜蓿不同品种的鉴定成为必要。紫花苜蓿不同品种在形态外观上差异不大, 仅从形态很难对不同品种进行准确鉴定。近年来兴起的分子标记鉴定方法, 可从核酸水平上达到此目标^[1-3]。然而, 由于紫花苜蓿栽培种大多数在遗传上属于同源4倍体, 且无法通过常规测序方法进行全基因组测序, 目

前主要使用RAPD法以筛选或建立组合分子标记方法进行不同品种的鉴定。此方法具有较好的鉴定效果, 但也存在需要合成大量的随机引物, 且需要昂贵的核酸电泳照胶仪器, 因而在条件不具备的地区应用困难。过氧化物酶广泛存在于植物体中, 是活性较高的一种酶, 它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等有关。已有研究表明, 过氧化物酶(peroxidase, POD)为一同工酶, 在植物不同品种存在不同的同工酶。POD同工酶作为一种重要的遗传标记被广泛应用于生物学研究的各个领域^[4], POD同工酶能够在很大程度上反映植物个体之间的遗传差异, 是探测基因差异和遗传变异的一种重要手段^[5]。陈永霞等对牛鞭草、何惠琴

收稿日期: 2015-10-19

基金项目: 国家自然科学基金(31260568, 31160060); 天水市科技支撑计划项目

作者简介: 赵菲佚(1972—), 男, 江苏镇江人, 博士, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究。联系电话: (0)13519385542。E-mail: tspaulzhao@163.com

通讯作者: 安建平(1965—), 男, 甘肃天水人, 教授, 主要从事生物化学研究。E-mail: jianpingan1@126.com

等对狗牙根、李景环等对披碱草和老芒麦的过氧化物同工酶进行了研究,确定了同工酶在不同植物种质特性研究中的作用^[6-8]。因而有可能通过对其同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,确定不同品种间过氧化物酶同工酶特征来鉴定不同的紫花苜蓿品种,为苜蓿的引种、育种、品种改良与栽培提供依据。

我们使用同工酶电泳技术,对甘肃省种植的8个紫花苜蓿品种进行多样性研究,考察不同品种的过氧化物同工酶的表达状况,并对其进行了聚类分析。研究结果将提供该方法进行紫花苜蓿不同品种鉴定的可行性,并对紫花苜蓿不同品种间的多样性和亲缘关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

供试的8个紫花苜蓿品种均来自于天水市农业科学研究所,其名称与原产地见表1。培养过程将供试品种种子取适量置于50 mL烧杯中,经6~8 h的吸胀后种于人工培养土中,培养土为壤土、粗沙、泥炭土、蛭石按1:1:1:1的比例配制而成。培养间温度为22~25℃、湿度50%~70%;16 h光、8 h暗培养。待长出3片真叶后取其叶片进行总蛋白提取。

表1 供试紫花苜蓿品种及其来源

序号	中文名称	拉丁名	原产地
1	阿尔冈金	Medicago s. L. cv. Algonquin	加拿大
2	润布勒	Medicago s. L. cv. Rambler	加拿大
3	陇东苜蓿	Medicago s. L. cv. Longdong	中国
4	三得利	Medicago s. L. cv. Sanditi	荷兰
5	甘农3号	Medicago s. L. cv. Gannong No. 3	中国
6	德宝	Medicago s. L. cv. Derby	荷兰
7	新疆大叶	Medicago s. L. cv. Xinjiangdaye	中国
8	德福	Medicago s. L. cv. Deft	荷兰

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总蛋白提取 剪取供试紫花苜蓿品种鲜叶各0.5 g分别置于预冷研钵中,加入少量石英砂,研磨过程中依次加入2 mL预冷0.1M Tris-HCl缓冲液(pH 8.0),样品研磨匀浆后迅速移入预冷的2 mL离心管,4℃下12 000 rpm离心15 min,取上清液0.8 mL置于新离心管中,4℃保存备用。

1.2.2 总蛋白非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 使用非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法^[9]。分离胶浓度为8%,浓缩胶浓度为4%。电极缓冲液为Tris-甘氨酸电极缓冲液(pH 8.0)。提取总蛋白样品20 μL加入3 μL 6x蛋白载样缓冲液。初始电压60 V,

约30 min后样品进入分离胶,电压升至100 V,当溴酚蓝指示剂前沿移至分离胶底部约1 cm时停止电泳并剥胶。

1.2.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶染色 聚丙烯酰胺凝胶染色使用醋酸联苯胺法。将电泳后的凝胶浸入染色液(100 mL染色液中含1 g的醋酸联苯胺,9 mL冰醋酸,40 mL ddH₂O,50 mL 3% H₂O₂)中,室温下约15 s后出现染色酶带,取出后用ddH₂O漂洗,至酶带呈棕色条带为止,进行拍照。

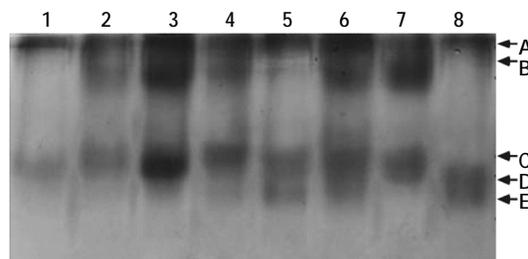
1.2.4 数据处理 酶谱带迁移率(Rf)计算:Rf=酶带迁移距离(cm)/溴酚兰迁移距离(cm)^[10]。

按酶带的相对迁移率、颜色深浅、宽度以及染色酶带数目标定酶带位置^[11]。根据所统计酶谱带的有无和强弱,将酶谱条带分为强带、较强带、弱带和无条带。计算不同品种每种谱带的相对迁移率和相似系数。使用公式 $S=2w/(a+b) \times 100\%$ 对8个紫花苜蓿品种过氧化物同工酶酶谱相似系数进行计算。公式中a、b、w分别代表a品种,b品种和a、b品种共有的酶带数,其中S以小数表示。

2 结果与分析

2.1 不同紫花苜蓿品种 POD 同工酶分析

为考察紫花苜蓿不同品种过氧化物同工酶表达的差异,对不同品种苜蓿的粗酶液经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,使用过氧化物同工酶染色液进行染色,结果如图1所示。



1-8分别代表阿尔冈金、润布勒、陇东苜蓿、三得利、甘农3号、德宝、新疆大叶、德福8个苜蓿品种。

A、B、C、D、E分别代表不同迁移率的酶带。

图1 不同紫花苜蓿品种过氧化物同工酶酶谱分布

图1结果表明,供试8个苜蓿品种共呈现24条酶带,表明8个苜蓿品种中POD同工酶均有表达。在5种不同迁移率的内同工酶带中,A条带为8个品种共有,品种1、5、8缺B带,品种8缺C带,D带为品种8独有,E带为品种5、6、8共有。8个苜蓿品种共有1条主酶带,其中品种2、3、4、5、7、8各自出现3条酶带,品种1出现1条酶带,品种6具有4

条同工酶带。尽管8个苜蓿品种出现不同的酶带,但其染色程度不同,表明8个品种中的POD同工酶活性存有差异。其中陇南苜蓿酶带染色最深、条带最宽,预示其POD同工酶活性最强;其余7种苜蓿品种过氧化物酶带着色较浅,POD同工酶活性较低,且品种间存在差异,呈现过氧化物同工酶在不同的苜蓿品种间具有多态性。

2.2 不同苜蓿品种 POD 同工酶酶带相对迁移率

为考察苜蓿不同品种各过氧化物同工酶组成状况,以苜蓿不同品种过氧化物同工酶分析为基础,对所获得苜蓿不同品种过氧化物同工酶谱带计算其相对迁移率(Rf),结果如表2所示。

品种	A	B	C	D	E
阿尔冈金	0.031 0		0.278 4		
润布勒	0.041 2	0.113 4	0.288 7		
陇南苜蓿	0.046 4	0.123 7	0.293 8		
三得利	0.051 5	0.103 1	0.257 7		
甘农3号	0.050 5		0.286 6		0.342 3
德宝	0.051 5	0.123 7	0.335 1		0.969 1
新疆大叶	0.040 2	0.134 0	0.299 0		
德福	0.061 9			0.335 1	0.938 1

由表2可知:在8个供试苜蓿品种中,共呈现24条酶带,表现出6种不同的迁移率,Rf值变动为0.031 0~0.342 3,但酶带出现的频率差异较小。

2.3 不同苜蓿品种 POD 同工酶酶谱相似系数

为考察紫花苜蓿不同品种间各亲缘关系,以不同品种的同工酶分析结果为基础,对不同品种间POD同工酶酶谱相似系数(S)矩阵进行了计算,结果如表3所示。

不同品种间的相似系数表征品种的亲缘关系,越接近1表明品种间的亲缘关系越近,反之亲缘关系越远。由表3可知,矩阵结果可将8个品种间相似系数分为5类。其中陇南苜蓿为一类;阿尔冈金为一类;润布勒、甘农3号和德福在相似系数为0.909处,可归为一类,说明此3个品种间的亲缘关系较近;三得利、德宝、和新疆大叶的相似系数

为0.933,可将其归为一类,也说明此3个品种间的亲缘关系较近。从表3中也可得知,阿尔冈金和陇南苜蓿与其余品种间的亲缘关系均较远,其中阿尔冈金和陇南苜蓿的亲缘关系最远。

3 小结与讨论

1) 使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对8个苜蓿品种过氧化物同工酶进行了分析,共获得24条POD同工酶带,存在5种不同迁移率的酶带。8个苜蓿品种的POD同工酶均可得到表达,存在5条迁移率不同的酶带。在8个供试苜蓿品种POD分析中,存在1条主酶带,为8个品种的共有条带。其中陇南苜蓿酶谱条带着色最深、条带最宽,表明陇南苜蓿中过氧化物同工酶含量比其余7个品种高,活性也比其余7个品种强。不同品种的相似系数表明,陇南苜蓿和阿尔冈金亲缘关系最远,而和其余品种间亲缘关系较远。润布勒、甘农3号和德福可归为一类,此3个品种之间的亲缘关系较近。而三得利、德宝和新疆大叶亲缘关系较近。

2) 8个苜蓿品种POD同工酶谱具有较高的多态性水平。陇南苜蓿和阿尔冈金间亲缘关系最远。8个苜蓿品种的Rf值介于0.031 0~0.342 3且都具有一条主条带,显示出其遗传稳定性,5条不同迁移率的酶带表现其多态性现象。8个品种的POD同工酶具有明显差异,因而表明,可使用POD的同工酶分析方法来鉴定苜蓿品种。

3) 过氧化物同工酶在酶带数目和迁移率(Rf)和量(酶活性)上的差异,可用于了解某一植物组织或器官的某些同工酶带在一定发育时期的出现以及在有外界环境条件影响时这些酶带减弱或消失^[10-11],或者在不同品种植物中同工酶也表现出不同的特征,这种现象说明分化基因作用和环境条件影响都会使植物产生生理生化上的差异^[12-13]。因而,在使用POD同工酶技术鉴定植物不同品种时,也应与形态学、细胞学等研究相结合,而最终予以

表3 苜蓿不同品种相似系数S矩阵

品种	阿尔冈金	润布勒	陇南苜蓿	三得利	甘农3号	德宝	新疆大叶	德福
阿尔冈金		0.750	0.500	0.600	0.689	0.545	0.600	0.667
润布勒	0.750		0.714	0.833	0.909	0.769	0.833	0.909
陇南苜蓿	0.500	0.714		0.875	0.800	0.941	0.875	0.800
三得利	0.600	0.833	0.875		0.923	0.933	0.975	0.923
甘农3号	0.689	0.909	0.800	0.923		0.857	0.923	0.975
德宝	0.545	0.769	0.941	0.933	0.857		0.933	0.857
新疆大叶	0.600	0.833	0.875	0.975	0.923	0.933		0.923
德福	0.667	0.909	0.800	0.923	0.975	0.857	0.923	

平凉市塑料大棚早春茬黄瓜引种试验初报

吴克顺¹, 董吉德²

(1. 甘肃省平凉市农业技术推广站, 甘肃 平凉 744000; 2. 甘肃省永昌县农业技术推广中心, 甘肃永昌 737200)

摘要: 在平凉市崆峒区柳湖乡新李设施蔬菜示范点钢架塑料大棚内, 对14个黄瓜品种进行了早春茬引种比较试验, 结果表明, 北农佳秀折合产量最高, 为91 481.5 kg/hm², 较对照品种博杰607增产24.43%; 全成336次之, 为86 481.5 kg/hm², 较对照品种博杰607增产17.63%; 津优35居第3, 为80 370.4 kg/hm², 较对照品种博杰607增产9.32%; 津旺19、博娜、春大将、百思特、越秀、全成335折合产量分别较对照品种博杰607增产8.06%、7.05%、4.80%、3.80%、2.77%、2.77%。从物候期、植物学性状、果实性状、抗病性、产量和市场情况综合评价, 北农佳秀、全成336、津优35、津旺19、越秀这5个品种综合表现优秀, 建议在平凉市塑料大棚早春茬推广应用。

关键词: 黄瓜; 品种; 早春茬; 塑料大棚; 平凉市

中图分类号: S642.2; S626.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2016)01-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2016.01.004

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)又名胡瓜, 为葫芦科一年生草本植物, 原产于热带森林湿润地区, 具有喜温、不耐寒、喜湿润、不耐涝、喜肥又耐肥, 且根系吸收能力弱等特性^[1]。但黄瓜在果菜中又是比较耐弱光的, 当光照强度降低到自然光

照的1/2时, 其同化量基本不下降^[2]。随着农业产业结构的不断调整, 设施蔬菜产业的大力发展, 塑料大棚栽培成为了平凉市主要的设施蔬菜种植模式, 早春茬是其最重要的茬口。黄瓜因其清香爽脆的独特风味一直是人们喜食的主要蔬菜之

收稿日期: 2015-07-07; 修订日期: 2015-09-15

作者简介: 吴克顺(1983—), 男, 甘肃平凉人, 农艺师, 主要从事经济作物技术推广工作。联系电话: (0)18293380613。E-mail: wukeshun323@163.com

确认结果的正确性。更加简便、快速和准确的以同功酶为基础的品种鉴定方法是未来研究的重点。

参考文献:

- [1] 赵丽, 柴小琴, 刘娟. 紫花苜蓿扦插繁殖技术要点[J]. 甘肃农业科技, 2012(3): 57-58.
- [2] 蒋素梅, 冯莉, 林德球. 14个黄皮品种(系)的RAPD分析[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(2): 26-29.
- [3] 黄海, 李劲松, 曹兵. 分子标记技术在石斛属植物种质资源研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(4): 75-87.
- [4] 王学军, 熊兴华, 官春云. 利用RAPD技术对5个油菜(*B. napus*)品种进行鉴别[J]. 作物研究, 2010, 24(1): 99-102.
- [5] 马向丽, 毕玉芬. 云南野生和逸生苜蓿资源POD和EST同工酶分析[J]. 草地学报, 2011, 19(3): 510-515.
- [6] GOTTLIEB L D. Gene number in species of Astereae that have different chromosome number[J]. Proc Natl Acad Sci. USA, 1981, 78(9): 3 726-3 729.
- [7] 陈永霞, 张新全, 杨春华, 等. 四川野生扁穗牛鞭草过氧化物同工酶分析[J]. 四川草原, 2005(4): 15-17.
- [8] 何惠琴, 干友民, 李绍才, 等. 不同温度下野生狗牙根过氧化物同工酶分析[J]. 中国草地学报, 2006, 28(5): 72-76.
- [9] 李景环, 云锦凤, 王树彦, 等. 酯酶同工酶标记鉴定加拿大披碱草和老芒麦的杂种后代纯种研究[J]. 种子学报, 2007, 26(11): 75-76.
- [10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术(第一版)[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 128-131.
- [11] 谢可军, 李阳春, 吴天德. 10种早熟禾属植物的过氧化物同工酶分析[J]. 中国草地, 2003, 25(2): 30-33.
- [12] 胡志昂. 裸子植物的生化系统学(一)——松科植物的过氧化物酶[J]. 植物分类学报, 1983, 21(4): 423.
- [13] 刘波, 王荔, 陈疏影, 等. 36份不同居群半夏同工酶研究[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 11-14.
- [14] 陈少裕. 膜脂过氧化与植物逆境胁迫[J]. 植物学通报, 1989, 6(4): 211-217.

(本文责编: 陈珩)