

同工酶技术在大豆育种中的应用

刘昭军, 李希臣

(黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 回顾了同工酶技术在大豆育种中的应用, 并指出此技术在大豆育种应用上的前景与不足。

关键词: 同工酶; 大豆育种; 应用

中图分类号: S 565.103.2 文献标识码: A 文章编号: 1002—2767(2001)06—0035—03

Application of Isozymes Analysis Technique in Soybean Breeding

LIU Zhao-jun

(Biotechnology Restarch Center, Heilongjiang Academy of Agri. Sci, Harbin, 150086)

Abstract: The principle and methods of isozyme analysis technique was briefly accounted in this paper. Application of isozymes analysis technique in soybean breeding was reviewed and its prospect and shortages were put forward.

Key words: isozyme; soybean breeding; application

同工酶是基因表达产物, 也是较好的遗传信息标志。植物发育过程中同工酶的活性以及电泳图谱谱带发生多态性的变化, 谱带多少同植物体内生化反应过程多样性、可变性及对环境变化适应性有关。

收稿日期: 2001—07—05

作者简介: 刘昭军(1972—), 男, 黑龙江省海林县人, 研实, 从事生物技术研究。

同工酶的多态性具有共显性效应, 受环境影响小, 根据酶蛋白本身所带电荷多少以及分子量大小不同在凝胶中泳动速度不同利用电泳方法将其分离。它是研究细胞分化、形态遗传的分子生物学的基础内容。

意, 因为 Se^{6+} 是高水溶性的, 极易被植物吸收利用, 容易引起中毒。

目前, 我国关于富硒产品的开发很热, 包括食品、饮料、肥料、药品等。但存在着诸如富硒载体不适当、富硒途径不合理、硒含量指标失控等诸多问题^[10]。因此, 要参照人体膳食硒摄入量的安全范围严格控制产品中硒的剂量。另外, 产品的销售地区和人群应有针对性, 对广大缺硒地区, 硒含量可以提高一些; 而以保健为目的的产品, 硒含量不宜太高。

参考文献:

- [1] 王云, 魏复盛. 土壤环境元素化学[M]. 北京: 中国环境出版社, 1995.
- [2] Combs G. F. et al. The Role of Selenium in Nutrition[J]. Academic Press, Inc., 1986, 15-40.
- [3] Yang G. S. et al. The Relationship of the Se^{6+} content Food and

the Se^{6+} toxic Disease in China[J]. The Amer. J. of Clinical Nutrition, 1983, (3): 872-888.

- [4] 陈铭, 刘更另. 高等植物的硒营养及食物链中的作用(二)[J]. 土壤通报, 1996, 27(4): 185-188.
- [5] 万洪富. 生态环境中硒及植物对它的吸收和转化[J]. 土壤学进展, 1988, 16(6): 1-7.
- [6] 林年丰. 医学环境地球化学[M]. 长春: 吉林科技出版社, 1991.
- [7] 朱永懿, 刘立宏, 杨俊诚, 等. 植物对硒的吸收研究进展[J]. 核农学通报, 1994, 15(5): 240-244.
- [8] 苏琪. 中国饲料、牧草中含硒量分布图[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1985.
- [9] 侯军宁. 硒的土壤化学研究进展[J]. 土壤学进展, 1987, 15(1): 10-17.
- [10] 陈铭, 谭见安, 王五一, 等. 环境硒与健康研究中的土壤化学与植物营养学[J]. 土壤学进展, 1994, 22(4): 1-10.

近年来同工酶测定分析技术在多种作物中陆续成功地应用,在大豆上主要是应用在抗病遗传育种的抗病机理研究、生物技术育种后代材料分析、鉴定连锁关系、组织生化分析、杂交后代鉴定与杂种优势预测、品种鉴定及分类学应用。

1 同工酶技术在大豆育种上的应用

1.1 抗病遗传育种

同工酶技术用于大豆抗病育种主要是研究病原菌,病原菌与大豆抗感品种的互作以及其生理生化变化。刘丽君等(1996)研究超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的活性及其同工酶的谱带变化,认为 SOD 酶同工酶与品种抗性有关,即感病品种在感染灰斑病菌后,脂质过氧化加强, SOD 酶的活性降低,同工酶酶谱变化很大;而抗病品种中 SOD 酶的活性增强,同工酶酶谱变化不大。李海英等(1996)、胡蕴珠等(1997)分别研究大豆品种接种灰斑病菌及大豆花叶病毒后,过氧化物酶(peroxidase, POD)有所变化,抗病品种接种病菌后过氧化物同工酶酶谱有特异带出现,而感病品种的过氧化物同工酶在接种前后却无谱带变化,就活性而言,接种前抗病品种的过氧化物酶活性高于感病品种,接种后抗病品种过氧化物酶活性增加幅度比感病品种的大。指出 POD 酶活性早期变化可作为区别大豆对灰斑病菌、大豆花叶病毒抗性的一项生化指标。李星华等(1991)、陈怡等(1993)着重研究了病毒病抗性不同大豆品种及 F_1 代过氧化物酶酯酶同工酶,指出抗病品种 \times 抗病品种的 F_1 代酶谱完全同于双亲,感病品种 \times 感病品种 F_1 代产生新的杂种谱带,抗病品种 \times 感病品种 F_1 代酶谱倾向抗性亲本,正反交 F_1 代酶谱表现一致,表明无母体效应。因此可利用接种后感病品种比抗病品种产生酶带多的特点,作为筛选抗病毒杂交后代的一种方法。费甫华等(1997)应用 PAGE 法研究大豆锈病的发病情况,根据 POD 同工酶谱带及活性不同,结果表明:不同的发病程度谱带变化较大,离病斑中心越近谱带越多,且越强,随接种时间推迟(0—32h)POD 同工酶谱带增多,酶活性增强,抗病品种 POD 活性高于感病品种,且谱带多 14 条,并认为 Rf 值为 0.78 0.85 间的酶谱与大豆锈病发生发展有密切关系。活性大小依次为 I 级 $>$ II 级 $>$ II 级 $>$ 0 级。

1.2 生物技术育种中的后代材料分析

刘德璞等(1991)、卢翠华等(1994、1995)、李希臣等(1996)、刘昭军等(1999)分别报道了用 SOD、POD、EST、GPI、IDH、PGM 几种酶的同工酶分析外

源 DNA 经花粉管通道导入大豆的获得后代材料,结果表明:供体材料与受体材料的电泳谱带在后代材料中基本都得到了反映,而且在后代材料的酶谱中出现了新带,有些后代材料缺失了一些谱带,表明 DNA 重组使某些酶表达受到抑制,酶谱差异同农艺性状改变一致,基本能反映基因差异。另外刘德璞等(1991)曾指出 SOD 同工酶的电泳图谱较稳定,不受取材时间及取材部位影响,因此能反映材料的基因背景,对我们鉴别后代材料具有指导意义。

1.3 组织生化分析

许守民等(1993)比较了结瘤与非结瘤大豆等位基因系种子荚皮发育中的 SOD 酶与 POD 酶,分析结果表明:结瘤大豆的两种酶活性均高于非结瘤大豆,在 POD 同工酶上表现尤为显著、SOD 同工酶在种子发育早期基本合成完全,而 POD 同工酶随发育逐渐增多,种子的 SOD 酶与 POD 酶活性均高于荚皮中 SOD 酶与 POD 酶活性。罗广华等(1995)、陈一舞等(1994、1997)、魏爱丽等(1999)分别详细研究了大豆组织(须根、根瘤、茎、花、叶、子、荚壳、愈伤组织)的 SOD 同工酶及其在盐胁迫下的 SOD 酶的变化,结果显示:各组织的酶谱一致,但酶活性强弱有差异,不同节位叶片 SOD 酶活性基本相同,但幼叶与老叶总 SOD 活性低,成熟叶片的酶活性较高,同时确定了不同类型 SOD 酶的组织分布与细胞定位,耐盐品种 SOD 活性相应降低,另外,盐胁迫下诱发产生新的酶谱类型,可能与歧化作用的加强有关。

1.4 杂交后代分析与杂种优势预测

刘学军等(1991)研究大豆杂交后代的叶片过氧化物酶同工酶,发现杂交后代酶活性与酶谱结构特性均介于亲本之间,并有偏父现象,值得重视的是随大豆叶片节位降低,POD 酶带及同工酶总活性呈规律性变化。不同品种、不同生育期 POD 酶活力及比活存在明显差异。杨琪等(1992)认为大豆同工酶与杂种优势及产量性状变异相关,用酯酶与过氧化物酶同工酶分析后得出结论:具有互补带的组合杂种优势高;类型相同的杂交组合 F_1 代无互补酶带;含秣食豆种质组合 F_1 代互补带比率高; F_2 单株同工酶酶谱类型丰富的组合,产量性状变异潜力大。缺失型酶谱组合的 F_1 代,主要产量性状均值最低。这一研究为配制杂交结合以及杂交后代选择提供了重要手段,是育种工作的创新。

1.5 品种鉴定及分类学研究

同工酶的电泳图谱用于品种鉴定已有很多报道,但缺乏对酶谱的谱带多少、带宽大小、颜色深浅

的系统研究,在各种作物上尚未形成一个统一的标准。卢翠华等(1990)报道了用硫辛酰氨化-还原酶(OIA),乌头酸酶(ACO),肽链内切酶(ENP)分析黑龙江省 19 个大豆品种,利用同工酶的综合酶谱将其区分。三种酶谱带表现显著差异,反映出不同品种的遗传背景差异,认为通过同工酶等位基因的显隐性关系,可确定育种程序中人工杂交得到杂交种子真伪。虞京葳等(1983)利用 PAGE 法研究了大豆的分类,用酯酶同工酶分析大豆幼苗,结果酶带明确,具有较为明显的种的专一性,对栽培大豆(*G. max*)与野生大豆(*G. soja*)的酯酶分析同形态分类学研究相互验证结果较为一致。李元萌等(1984)研究不同纬度地区大豆短日照处理对 POD 同工酶的影响,结果发现:大豆经短日照处理后发育提前,POD 酶带变化较自然日照进程快;高纬度品种变化快于低纬度品种,并认为 POD 酶带数与酶活性同植物抗病性有关,高纬度地区大豆比低纬度地区大豆谱带多 16 条,POD 活性在大豆发育中出现低→高→低的变化规律,但与酶带变化无关。裴颜龙等(1996)、钟珍萍等(1992)分别报道了对大豆亚属间、种间的酶谱谱型分析,证实居群间有明显的遗传分化,指出染色体组型同酶带谱型有关系,相近的材料谱型及酶活性相似,证明我国为野生大豆遗传变异中心。

2 存在问题与应用前景

2.1 在进行酶提取、活性测定或电泳染色时酶活性与酶本身结构会发生变化,因此操作结果的重复性不强。电泳只能检测编码酶蛋白的基因位点,对非结构基因则无能为力,所检测的位点数不可能很多(一般少于 30 个),一批等位酶位点变异并不一定代表整个基因组的变异,且有些隐避的变异可能无法用电泳检测到,在要求结果准确的检测中,同工酶检测技术只能用作辅助手段。再者对产量性状(如蛋白质、脂肪、淀粉含量)等育种中有益性状多属数量性状,同工酶标记位点则较少,因此难于准确标定。

2.2 同工酶是共显性遗传,杂合与纯合位点易于区分,因而作为一种生化标记可以选择出同其连锁的目的性状,可以作为遗传育种中选则的一种辅助手段。在用于大豆研究的同工酶中,用的最多的是超氧化物歧化酶、过氧化物酶、酯酶。三者在酶带谱型上丰富,酶活性变化大,且能充分体现材料间的基因表达差异,特别是超氧化物歧化酶谱型稳定,受取材时间、取材部位以及环境变化影响小,可较好用于鉴别基因型,进行遗传学分析。尤其在鉴定种子真伪

方面,该方法检测速度快,精度高,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 陈怡, 栾小燕, 黄承运, 等. 病毒病抗性不同的大豆品种及其后代过氧化物同工酶分析[J]. 大豆科学, 1993, 12(1): 30-36.
- [2] 刘丽君, 高明杰, 郑蔚红, 等. 大豆灰斑病菌对大豆保护酶体系的影响[J]. 大豆科学, 1996, 15(1): 17-23.
- [3] 李星华, 陈宛妹, 李增禄, 等. 大豆抗感病毒病品种过氧化物酶同工酶初步比较研究[J]. 大豆科学, 1991, 10(2): 149-152.
- [4] 袁凤杰, 徐金星, 李庆凯, 等. 大豆灰斑病菌生理小种的同工酶鉴定[J]. 大豆科学, 1998, 17(3): 219-223.
- [5] 刘学军, 苗以农, 张红缨, 等. 大豆叶片过氧化物酶及其同工酶的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 37-45.
- [6] 于秀普, 杜连恩, 魏玉昌, 等. 大豆化学诱变突体的幼芽过氧化物酶同工酶等电聚焦电泳分析[J]. 大豆科学, 1994, 13(4): 371-375.
- [7] 杨琪, 王金陵, 杨庆凯, 等. 大豆同工酶与杂种优势及产量性状变异的相关研究[J]. 大豆科学, 1992, 11(1): 1-7.
- [8] 魏爱丽, 白桦, 陈云昭, 等. 盐胁迫下大豆初生叶愈伤组织 SOD 活性及其同工酶变化的研究[J]. 大豆科学, 1999, 18(1): 85-88.
- [9] 鲍晓明, 许守民, 刘立威, 等. 大豆果实发育过程荚皮和种子超氧化物歧化酶同工酶的变化[J]. 大豆科学, 1992, 11(3): 265-267.
- [10] 罗广华, 王爱国. 大豆超氧化物歧化酶同工酶剖析[J]. 大豆科学, 1995, 14(3): 270-274.
- [11] 陈一舞, 邵桂花, 常汝镇, 等. 盐胁迫对大豆幼苗子叶各细胞器超氧化物歧化酶的影响[J]. 作物学报, 1997, 23(2): 214-219.
- [12] 卢翠华, 何志鸿, 宋英淑, 等. 黑龙江省主要大豆品种同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学, 1990, 9(2): 145-148.
- [13] 钟珍萍, 刘德金, 陈启锋, 等. 大豆种间的同工酶分析比较[J]. 大豆科学, 1992, 11(4): 329-335.
- [14] 裴颜龙, 王岚, 葛颂, 等. 野生大豆遗传多样性研究 4 个天然居群等位酶水平的分析[J]. 大豆科学, 1996, 15(4): 302-309.
- [15] 许守民, 鲍晓明, 苗以农, 等. 结瘤和非结瘤大豆同位基因及种子荚皮发育中 POD 和 SOD 活性的比较[J]. 作物学报, 1993, 19(5): 453-459.
- [16] 卢翠华, 雷勃钧, 李希臣, 等. 外源 DNA 导入大豆其后代过氧化物酶酶谱分析[J]. 中国油料, 1995, (3): 35-36.
- [17] 李希臣, 卢翠华, 雷勃钧, 等. 利用淀粉凝胶电泳技术鉴定外源 DNA 导入后代[J]. 大豆科学, 1996, 15(2): 166-169.
- [18] 卢翠华, 雷勃钧, 李希臣, 等. 外源 DNA 导入大豆其后代同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学, 1994, 13(2): 167-170.
- [19] 刘德璞, 袁蓓, 庄丙昌, 等. 外源 DNA 导入大豆变异后代 SOD 同工酶分析[J]. 大豆科学, 1991, 10(3): 194-199.
- [20] 刘昭军, 雷勃钧, 卢翠华, 等. 导入大豆的外源 DNA 同工酶鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 1999, (5): 19-21.
- [21] 胡能书. 同工酶技术与应用[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1985.
- [22] 虞京葳, 夏文胜, 黄伟英. 大豆脂酶同工酶的初步研究[J]. 大豆科学, 1983, 2(1): 104-108.