

荞麦种质资源过氧化物酶同工酶测定与分析

尹春¹, 刘金泉¹, 尹东方², 侯建华³, 盛晋华³

(1. 内蒙古农业大学 职业技术学院, 内蒙古 包头 014109; 2. 包头市土右旗农牧局, 内蒙古 包头 014100; 3. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对 28 份荞麦种质资源的过氧化物酶同工酶进行了研究分析。结果表明:过氧化物酶同工酶酶带 68 条, 不同物种酶带数 1~7 条。同时, 荞麦的 2 个种遗传差异很大, 且种内存在一定差异, 但这种差异明显小于种间差异。

关键词:荞麦; 种质资源; 分析; 过氧化物酶同工酶

中图分类号:S517 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2010)03-0001-04

过氧化物酶是一种能利用双氧水氧化供氢体的酶, 对双氧水的需求非常专一, 在高等植物中广泛而大量存在着, 具有明显的种属、组织和发育阶段特异性, 在一定程度上反映植物的系统发生^[1-2]。由于过氧化物酶同工酶是基因表达的产物, 因此对其酶谱的分析能够很好地判断基因的存在及其表达规律, 能够从分子水平上揭示物种的遗传基础。这一点在物种、品种鉴定、起源、进化和分类等方面已有大量研究^[3-6]。

荞麦(Buckwheat)属于蓼科荞麦属^[7-11]。有 15 个自然物种和 1 个人工合成种。分为大粒组和小粒组, 2 个组间遗传差异很大^[12-14]。荞麦种质资源中蕴藏着丰富的遗传变异, 是实现荞麦遗传改良的物质基础^[15]。该研究比较和分析了荞麦属 28 个种质资源的过氧化物酶同工酶, 以期荞麦属种间系统关系、荞麦遗传育种、荞麦开发利用等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料共有 28 份(见表 1), 27 份来自内蒙古各盟、市的地方品种。其中乌兰察布市 5 份、鄂

尔多斯市 3 份、包头市 3 份、赤峰市 4 份、通辽市 3 份、呼和浩特市 9 份, 及黑龙江地区材料 1 份。

表 1 28 份供试荞麦种质材料来源

编号	学名	代号或名称	产地	品种类型
1	<i>Fagopyrum</i> Mill	乌 0001	乌市	农家品种
2	<i>Fagopyrum</i> Mill	乌 0002	乌市	农家品种
3	<i>Fagopyrum</i> Mill	乌 0003	乌市	农家品种
4	<i>Fagopyrum</i> Mill	乌 0004	乌市	农家品种
5	<i>Fagopyrum</i> Mill	乌 0005	乌市	农家品种
6	<i>Fagopyrum</i> Mill	伊 0001	鄂市	农家品种
7	<i>Fagopyrum</i> Mill	伊 0002	鄂市	农家品种
8	<i>Fagopyrum</i> Mill	伊 0003	鄂市	农家品种
9	<i>Fagopyrum</i> Mill	固 0001	包头	农家品种
10	<i>Fagopyrum</i> Mill	固 0002	包头	农家品种
11	<i>Fagopyrum</i> Mill	固引 1 号	包头	地方品种
12	<i>Fagopyrum</i> Mill	赤 0001	赤峰	农家品种
13	<i>Fagopyrum</i> Mill	赤 0002	赤峰	农家品种
14	<i>Fagopyrum</i> Mill	赤 0003	赤峰	农家品种
15	<i>Fagopyrum</i> Mill	赤 0004	赤峰	农家品种
16	<i>Fagopyrum</i> Mill	通 0001	通辽	农家品种
17	<i>Fagopyrum</i> Mill	通 0002	通辽	农家品种
18	<i>Fagopyrum</i> Mill	通 0003	通辽	农家品种
19	<i>Fagopyrum</i> Mill	呼 0001	呼市	农家品种
20	<i>Fagopyrum</i> Mill	呼 0002	呼市	农家品种
21	<i>Fagopyrum</i> Mill	呼 0003	呼市	野生品种
22	<i>Fagopyrum</i> Mill	六荞 1 号	呼市	地方品种
23	<i>Fagopyrum</i> Mill	平荞 2 号	呼市	地方品种
24	<i>Fagopyrum</i> Mill	103	呼市	地方品种
25	<i>Fagopyrum</i> Mill	88027	呼市	地方品种
26	<i>Fagopyrum</i> Mill	88021	呼市	地方品种
27	<i>Fagopyrum</i> Mill	8714	呼市	地方品种
28	<i>Fagopyrum</i> Mill	昭苦 1 号	黑龙江	地方品种

收稿日期: 2009-12-02

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD02B06-023); 内蒙古农业大学职业技术学院应用基金资助项目; 蒙药植物种植研究园建设资助项目(NT2006-02)

第一作者简介: 尹春(1970-), 女, 内蒙古包头市人, 硕士, 讲师, 主要从事作物遗传育种的教学和科研工作。E-mail: yinchun20071111@163.com。

通讯作者: 盛晋华(1968-), 女, 山东省莱州市人, 博士, 教授, 从事作物栽培与耕作研究。E-mail: sjinhua@163.com。

1.1.1 仪器 恒温培养箱、瓷质研钵、高速台式冷冻离心机、冰箱、DYY-Ⅲ-6B型稳流稳压电泳仪、DYY-Ⅲ型垂直板电泳槽、电子天平、制冰机、50 μL 微量进样器。

1.1.2 药品 三羧甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘草酸、过硫酸胺、蔗糖、溴酚蓝、联苯胺、过氧化氢。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 将28份供试材料于2007年5月20日晒种,5月23日播种于内蒙古农业大学职业技术学院科技园区。田间试验采用随机区组排列,每个材料1行,行长6 m,行距30 cm,3次重复。播种深度3 cm,播量为30 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。管理同一般生产田。室内各项指标的测定在内蒙古农业大学职业技术学院园艺园林系实用植物生物学基础实验室及内蒙古农业大学农牧渔业生物实验研究中心进行。

1.2.2 同工酶的测定 同工酶测定采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。样品制备方法:取新鲜植株花蕾下第一片叶,用蒸馏水清洗干净并用滤纸吸干水分。称取叶片1 g加入5 mL 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.9的电极缓冲溶液中,将其置于冰域中研磨成匀浆,再置于4℃冰箱中提取10 min,于3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液即为酶谱提取液。

聚丙烯酰胺凝胶液的配制:聚丙烯酰胺凝胶

液由A液、B液和C液组成。A液:取1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸48 mL,三羟甲基氨基甲烷36 g,四甲基乙二胺0.24 mL,定容至100 mL;B液:聚丙烯酰胺30 g,甲叉双丙稀酰胺0.8 g,定容至100 mL,C液:过硫酸胺0.56 g,定容100 mL;将其按A液:B液:水:C液=1:2:1:4配成胶液。

电极缓冲液的配制:三羟甲基氨基甲烷6 g,甘氨酸28.8 g溶于1 000 mL蒸馏水中,使用时稀释10倍。

染液的配制:取醋酸联苯胺溶液按0.5 g联苯胺+4.5 mL冰醋酸溶解后置于18 mL蒸馏水中即可。

各凝胶管加入0.05 mL样品酶粗提取液,加一小滴0.005%溴酚蓝,上下电泳槽加电极缓冲液,每管电流2 mA进行电泳,当溴酚蓝迁至凝胶下端1 cm左右时停止电泳,电泳完毕后,取下凝胶用蒸馏水漂洗3次,再放入染液中浸泡5~10 min,待条带清晰后,倒掉染液并用蒸馏水洗净、测量并照相^[16]。

2 结果与分析

植物的过氧化物酶同工酶是由单基因决定的,所以同工酶的差异来自基因的差异。28种荞麦品种的同工酶迁移率见表2。

从28种荞麦种质的过氧化物酶的酶谱带来看,都具有不同数量的共同的酶谱带,而8714和

表2 谱带相对迁移率

名称	1	2	3	4	5	6	7	8	平均数
乌 0001	0.09	0.11	0.06	0.10	0.33	-	-	-	0.14
乌 0002	0.08	0.11	0.03	0.11	0.44	-	-	-	0.15
乌 0003	0.11	0.03	0.11	0.11	0.44	-	-	-	0.16
乌 0004	0.11	0.07	0.06	0.06	0.22	-	-	-	0.11
乌 0005	0.06	0.08	0.06	0.08	0.08	0.24	0.22	0.11	0.12
伊 0001	0.06	0.08	0.07	0.04	0.08	0.13	-	-	0.08
伊 0002	0.10	0.07	0.03	0.05	0.17	0.11	-	-	0.09
伊 0003	0.06	0.11	0.07	0.01	0.06	0.06	0.08	-	0.08
固 0001	0.11	0.06	0.07	0.06	0.11	-	-	-	0.08
固 0002	0.04	0.05	0.03	0.06	0.07	-	-	-	0.05

续表 2

名称	1	2	3	4	5	6	7	8	平均数
固引 1 号	0.03	0.03	0.15	0.15	-	-	-	-	0.09
赤 0001	0.09	0.09	0.05	0.06	0.38	-	-	-	0.13
赤 0002	0.09	0.08	0.04	0.06	0.36	-	-	-	0.34
赤 0003	0.08	0.06	0.06	0.13	0.19	-	-	-	0.11
赤 0004	0.38	0.38	-	-	-	-	-	-	0.38
通 0001	0.10	0.63	0.21	0.19	-	-	-	-	0.28
通 0002	0.20	0.10	-	-	-	-	-	-	0.15
通 0003	0.14	0.05	0.09	0.05	0.39	-	-	-	0.14
呼 0001	0.14	0.05	0.09	0.05	0.45	-	-	-	0.16
呼 0002	0.25	0.60	0.25	-	-	-	-	-	0.37
呼 0003	0.25	0.13	-	-	-	-	-	-	0.19
六荞 1 号	0.19	0.09	0.25	-	-	-	-	-	0.18
平荞 2 号	0.20	0.20	-	-	-	-	-	-	0.20
103	0.09	0.07	-	-	-	-	-	-	0.08
88027	0.27	0.27	-	-	-	-	-	-	0.27
88021	0.15	-	-	-	-	-	-	-	0.15
8714	0.22	-	-	-	-	-	-	-	0.22
昭苦 1 号	0.07	0.21	0.21	-	-	-	-	-	0.16

88021 只有一条共同的酶带,所以 88021、8714 与其它 26 种荞麦相比地理起源较远,即亲缘关系较远,而另外 26 种荞麦虽具有共同的谱带,但谱带的数量、宽窄、深浅以及相对迁移率等又不相同,说明它们之间既有亲缘关系又有遗传差异,属于不同的属、种、品种类型。

有研究表明,荞麦抗病性与过氧化物酶同工酶的活性关系密切,感病品种比抗病品种过氧化物酶的活性强,相对迁移率大,因此可以根据氧化同工酶的活性和酶带位置衡量品种抗病性的强弱^[17]。由表 2 可知,同工酶谱带迁移率的均值:赤 0004>呼 0002>赤 0002>通 0001>88027>8714>平荞 2 号>呼 0003>六荞 1 号>乌 0003>呼 0001>昭苦 1 号>乌 0002>通 0002>88021>乌 0001>通 0003>赤 0001>乌 0005>乌 0004>赤 0003>伊 0002>固引 1 号>伊 0001>伊 0003>固 0001>103>固 0002,由此可以推

断,固 0002 的抗病性最强,赤 0004 的抗性最差。另外,过氧化物酶同工酶谱带亦可以反映植物的抗寒性,过氧化物酶同工酶的种类多者抗寒性强^[17],所以乌 0005 的抗寒性最强,伊 0003 微强,88021 和 8714 最差。

3 讨论

关于过氧化物酶同工酶,目前在荞麦上研究报道极少。高洪君等利用荞麦的茎、叶为材料,研究了 1 个荞麦种 6 个收集系的过氧化物酶同工酶,共发现 9 条酶带^[18]。赵钢等对 3 个荞麦种进行了花期过氧化物酶同工酶研究,共发现了 16 条酶带^[19]。该研究首次对数量较多的荞麦种质资源在现蕾期进行过氧化物酶同工酶研究,共发现 68 条酶带。该研究还发现,荞麦现蕾期幼叶种间和种内都有一定的变异,以属间、种间变异最大。

参考文献:

[1] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学

- 技术出版社,1985:70-74.
- [2] 刘至斋,蔡一林,王久光. 不同低温处理对离体玉米叶片 POD 活性的影响[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004,26(4):386-388.
- [3] 张宗文. 红花种质资源的同工酶遗传多样性及分类研究[J]. 植物遗传资源科学,2000,1(4):6-13.
- [4] 赵坚义,Beeker H C. 同工酶分子标记研究中国和欧洲栽培油菜的遗传差异[J]. 作物学报,1998,24(2):213-220.
- [5] 曲柏宏,严花淑,陈艳秋,等. 同工酶分析在梨品种分类中的应用[J]. 延边大学农学学报,2003,25(1):86-91.
- [6] 杨尧军,李毅,张生华,等. 箭胡毛杨及其亲本酯酶和过氧化物酶的同工酶分析[J]. 甘肃农业大学学报,2006,41(2):46-50.
- [7] 吴征镒. 西藏植物志第一卷[M]. 北京:科学出版社,1983:604-605.
- [8] 陈庆富. 5 个中国荞麦种的核型分布[J]. 广西植物,2001,21(2):107-110.
- [9] Chen Q F. Discussion on the origin of cultivated buckwheat in genus *Fagopyrum*[C]// Seung S H, Yong S C, Nam S K, et al. Advances in buckwheat research. Chunchon Korea: Proceedings of the eighth international symposium on Buckwheat in Chunchon Korea published by the Organizing committee of the Eighth international Symposium on Buckwheat under the auspices of the International Buckwheat Research Association,2001:207-213.
- [10] Wang L, Li Y Y, Cai G H, et al. prokaryotic expression and immunological identification of tartary buckwheat allergenic protein[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006,22(4):308-312.
- [11] Wang J S, Chai Y, Zhao X T, et al. Karyotype Analysis of Chinese Buckwheat Cultivars[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2005,25(6):1114-1117.
- [12] Chen Q F. A study of resources of *Fagopyrum* native to China[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1999, 130:53-64.
- [13] Chen Q F. Hybridization between *Fagopyrum* species native to china[J]. Botanical Journal of the Linnean society, 1999,131:177-185.
- [14] Chen Q Fu. A study of isozyme and interspecific hybridization on bigachene group of buckwheat species *fagopyrum* [J]. Crop Sciences,2004,44:1511-1518.
- [15] 胡志昂,张亚平. 中国动植物的遗传多样性[M]. 南京:浙江海滨技术出版社,1996.
- [16] 尚占环,姚爱光. 生物遗传多样性研究方法及其保护措施[J]. 宁夏农学院学报,2002,23(1):66-69.
- [17] 盛晋华,张海明,李卫国. 内蒙古自治区荞麦地方品种资源的研究[J]. 内蒙古农业大学学报,2000,3(21):8-12.
- [18] 高洪君,侯旭光,李丹,等. 6 种荞麦过氧化物酶同工酶研究初报[J]. 哲里木畜牧学院学报,1994,4(2):53-56.
- [19] 赵钢,唐宇. 荞麦过氧化物酶同工酶研究[J]. 荞麦动态, 1990(2):10-15.

Determination and Analysis on Peroxidase Isozyme of Germplasm Resources of Buckwheat

YIN Chun¹, LIU Jin-quan¹, YIN Dong-fang², HOU Jian-hua³, SHENG Jin-hua³

(1. Professional Technology College of Inner Mongolia Agricultural University, Baotou, Inner Mongolia 014109; 2. Animal husbandry and Agriculture Bureau of Baotou Tuyou, Baotou, Inner Mongolia 014100; 3. College of Agronomy of Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019)

Abstract: The peroxidase isozyme of buckwheat belonging to 28 resources of genus *Fagopyrum* were studied by means of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that there are a total of sixty-eight bands of peroxidase isozyme, with a range from one band to seven bands among different buckwheat species. The results of the analysis showed that there are great difference of zymographs between the two species. And there are certain difference in one species. But the difference was smaller than between the two species clearly.

Key words: buckwheat; germplasm; analysis; peroxidase isozyme