

黑龙江省 25 份大豆品种的同工酶分析

沙 伟,何海燕,张艳馥

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对供试 25 份大豆品种的过氧化物同工酶(Peroxidase isozyme,简称 POD)、酯酶同工酶(Esterase isozyme,简称 EST)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,简称 SOD)进行分析。结果表明:品种间的 POD、EST、SOD 同工酶酶谱在酶带数、迁移率及酶活性等方面均较相似,同时存在一定的差异。3 种同工酶共分离出 23 条带,其中多态性条带 13 条,多态性比率为 56.52%;25 个品种间的相似性系数变幅范围为 0.56~0.95,平均值为 0.76。说明黑龙江省大豆种质资源间存在一定的遗传变异性。UPGMA 聚类分析结果表明:在 $GS = 0.8$ 处,供试材料共划分为 5 个类群。

关键词:大豆;同工酶;聚类分析

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)10-0001-04

黑龙江省大豆栽培历史悠久,在不同的生态条件影响下,大豆种质资源经历了长期的自然演化和人工选择,形成了多种多样的种质资源。黑龙江省育种研究处于国内领先水平,育成的东农号、合丰号、绥农号、黑农号等系列优良大豆品种对我国大豆生产起着重要的推动作用^[1]。分析其大豆的遗传多样性,既可发掘和创造有特殊利用价值的新种质,拓展东北地区大豆品种的遗传基础,也可有效地指导该地区大豆的生产和育种工作。

同工酶是基因编码的产物,其酶谱差异主要是由决定酶蛋白本身的等位基因或非等位基因的差异造成的。同工酶电泳图谱谱带发生多态性变化,反映了生物在蛋白质水平上的多型性,是生物发生遗传分化的证据^[2]。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和特定的染色反应,显示同工酶的不同谱带,用于物种之间、同一物种不同品种之间、品种及其后代的遗传差异鉴定,在遗传多样性研究、物种起源进化等领域有广泛的用途^[3-7]。从 20 世纪 60 年代开始,同工酶被广泛应用于大豆抗病育种^[8]、组织分化^[9]、分类^[10-11]、遗传^[12-13]、变异^[14]和亲缘关系^[15-16]研究中。

该研究试图利用 POD、EST、SOD 同工酶对黑龙江省 25 份大豆品种遗传多样性进行探讨,为大豆新品种育种提供一定的物质基础和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取来自黑龙江省不同生态区的 25 份大豆品种为材料(见表 1)。种子经萌发长成幼苗,取其第一片真叶,用清水冲洗干净,置于 -80°C 冰箱中保存备用。

表 1 供试样品材料

序号	品种名称	序号	品种名称	序号	品种名称
01	北疆 296	11	嫩丰 16	21	丰收 26
02	北疆 641	12	绥农 14	22	丰豆 3 号
03	黑农 44	13	绥农 27	23	甘优 120
04	黑农 48	14	绥农 28	24	黑河 38
05	合丰 50	15	华疆 3 号	25	东农 51
06	合丰 55	16	垦丰 16		
07	垦鉴豆 4 号	17	富兴 9 号		
08	垦农 18	18	富兴 4 号		
09	垦农 22	19	抗线 8 号		
10	北豆 14	20	抗线铁杆		

1.2 方 法

1.2.1 同工酶的提取 取叶片 0.1 g,加少量(约 0.01 g)抗坏血酸、PVP,于液氮中研磨成粉末,转入 1.5 mL 离心管中,加 1 mL 预冷样品提取液($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液, $\text{pH} 8.0$),浸提 30~60 min, 4°C , $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液即为总酶液,置于 -80°C 冰箱中保存备用。

1.2.2 电泳 聚丙烯酰胺凝胶分离胶浓度为 7.0%($\text{pH} 8.8$),浓缩胶浓度为 4%($\text{pH} 6.8$),电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液($\text{pH} 8.3$)。每槽加样量为 20 μL ,其中总酶液和 40%蔗糖各 9 μL ,溴酚蓝 2 μL 。电泳过程采用稳压电泳:浓缩胶 80 V;分离胶 160 V,待指示染料下行距胶板末端 1 cm 处,停止电泳,剥胶染色。整个电泳过程用冰水冷却。

1.2.3 染色 POD 采用改良醋酸-联苯胺法染

收稿日期:2011-04-12

基金项目:黑龙江省教育厅科研资助项目(10551331)

第一作者简介:沙伟(1963-),女,黑龙江省人,教授,博士生导师,从事植物学和植物遗传学方面的研究。E-mail:Shw1129@263.net。

色^[17],把配好的醋酸联苯胺染色液倒入培养皿内,大约 30 mL,加 400 μ L 36%的过氧化氢,混匀,将胶片剥离置于染色液中,摇床染色 1~2 min,直至蓝色酶带显示清楚为止,立即倒去染色液,加入 7%的乙酸脱色 2~3 次。注意整个染色过程要快,以防酶降解,影响结果统计。

EST 用醋酸萘酯-坚牢蓝 B 盐染色法^[18],把配好的醋酸萘酯-坚牢蓝 B(RR)盐染色液倒入培养皿内,大约 30 mL,将胶片剥离置于染色液中。摇床染色 40 min 左右,待显示玫瑰红色区带为止,立即倒去染色液,加入 7%的乙酸脱色 2~3 次。

SOD 采用 NBT 活性染色法^[19],取下胶片,于染色液 I 中避光染色 15 min,转入染色液 II 中继续避光染色 20 min,最后转入染色液 III 中,放在阳光或者光照培养箱中光照显色 40~50 min,直至整个胶片变蓝,中间显现出清晰的无色透明条带。整个染色过程要快,以防酶扩散,影响染色清晰度。

1.2.4 数据分析 用 UMAX 扫描仪对胶片进行扫描,记录其酶谱;每个样品的电泳条带按有无记录,电泳条带有时赋值为 1,否则赋值为 0;统计其酶带数及其强弱特征,计算其相对迁移率(R_f 值);利用 POPGENE32 软件计算 3 种同工酶的遗传相似性系数及遗传距离,同时用 NTSYS 软件进行聚类分析来确定各品种间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 同工酶酶谱分析

2.1.1 POD 同工酶酶谱分析 图 1 可看出,25 份供试大豆品种共出现 9 条酶谱带,除共有的酶带和酶带颜色深浅存在差异外,个别品种还具有特征性谱带。根据酶带在胶版上的分布,将 9 条酶带分为 A、B、C 三个区。

A 区($0 \leq R_f \leq 0.036$):只有 $R_f 0.036$ 一条谱带,且全部供试材料均出现该谱带,故为大豆的共有谱带。此谱带颜色较深,酶活性较高。

B 区($0.036 < R_f \leq 0.276$):共有 4 条谱带,在 $R_f 0.140$ 、 $R_f 0.208$ 出现谱带的材料占全部供试材料的 100%,应为大豆的共有谱带。在 $R_f 0.096$ 、 $R_f 0.276$ 出现谱带的材料,分别占全部供试材料的 16%、36%,出现几率较低,应为特征谱带。此区酶带颜色较浅,酶活性相对较低。

C 区($0.276 < R_f \leq 0.560$):有 4 条谱带。在 $R_f 0.460$ 出现谱带的材料占全部供试材料的 100%,应为大豆的共有谱带。在 $R_f 0.440$ 、 $R_f 0.532$ 、 $R_f 0.560$ 出现谱带的材料,分别占全部供试材料的 48%、36%、4%,出现几率较低,应为特

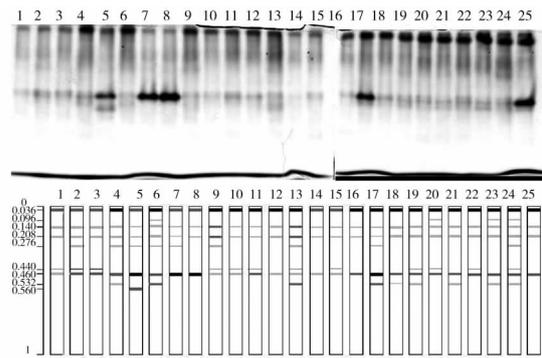


图 1 POD 同工酶电泳谱带及其模式图
泳道编号代表材料同表 1

征谱带。此区 5、7、8、17 和 25 号材料酶带颜色较深,酶活性较高,其余材料酶活相对较低。

2.1.2 EST 同工酶酶谱分析 图 2 可看出,25 份供试材料共出现 7 条谱带,这些谱带基本相同,但个别品种存在差异。根据酶带在胶版上的分布,将 7 条带分为 A、B、C 三个区。

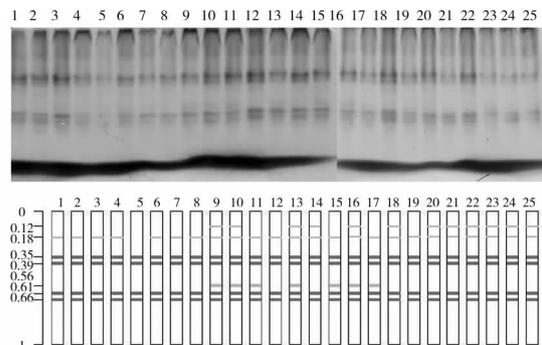


图 2 EST 同工酶电泳谱带及其模式图
泳道编号代表材料同表 1

A 区($0 \leq R_f \leq 0.18$):共有 2 条酶带。 $R_f 0.12$ 出现谱带的材料占全部供试材料的 48%,出现几率相对较低,应为特征谱带。 $R_f 0.18$ 出现谱带的材料占全部供试材料的 96%,应为大豆的共有谱带。此区酶带颜色较浅,酶活性较低。

B 区($0.18 < R_f \leq 0.39$):仅 $R_f 0.35$ 、 $R_f 0.39$ 处的 2 条酶带。且全部供试材料均出现该谱带,故为大豆的共有谱带,此区谱带颜色较深,酶活性较高。

C 区($0.39 < R_f \leq 0.66$):有 3 条谱带。 $R_f 0.56$ 出现谱带的材料,占全部供试材料的 28%,出现几率相对较低,应为特征谱带。 $R_f 0.61$ 、 $R_f 0.66$ 出现谱带的材料,占全部供试材料的 100%,应为大豆的共有谱带。此区 9、10、11、13、15、16、17 号材料,酶带颜色较浅,酶活性较低,其余材料酶活相对较高。

2.1.3 SOD 同工酶酶谱分析 由图 3 可知,25

份供试材料共出现 7 条谱带,根据酶带在胶版上的分布,将 7 条带分为 A、B、C、D 四个区。

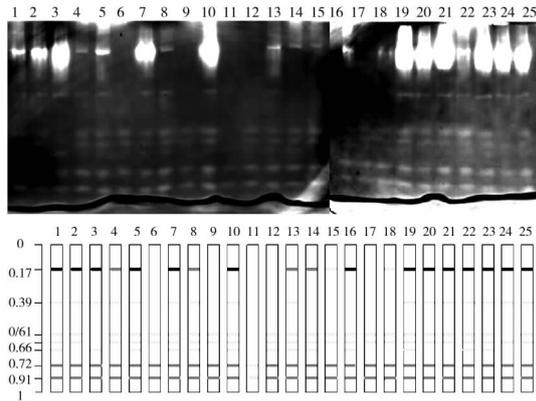


图 3 SOD 同工酶电泳谱带及其模式图
泳道编号代表材料同表 1

A 区 ($0 \leq R_f \leq 0.17$): 共有 1 条酶带。 R_f 0.17 出现谱带的材料占全部供试材料的 80%。此区酶带较亮,酶活性较高。

B 区 ($0.17 < R_f \leq 0.39$): 共有 1 条酶带, R_f 0.39 处出现谱带的材料占全部供试材料的 64%。此区酶带较暗,酶活性较低。

C 区 ($0.39 < R_f \leq 0.72$): 有 3 条谱带。 R_f 0.61、 R_f 0.66、 R_f 0.72 出现谱带的材料分别占全部供试材料的 88%、92%、52%。此区酶带较浅,酶活性较低。

D 区 ($0.72 < R_f \leq 0.91$): 仅 R_f 0.35、 R_f 0.39 处 2 条酶带,且全部供试材料均出现该谱带,故为大豆的共有谱带,此区谱带较亮,酶活性较高。

2.2 同工酶遗传相似性系数及遗传距离分析

利用 25 个供试品种的 3 种同工酶位点计算品种间的遗传相似性系数(GS),并据此计算相应的遗传距离(GD)。从所得矩阵可以看出:材料间的遗传相似性系数范围在 0.565 2~0.956 5,变幅为 0.391 3,平均值为 0.760 9。遗传距离范围为 0.044 5~0.570 5,变幅为 0.526 0,平均值为 0.287 1。其中材料合丰 50 和嫩丰 16、甘优 120 之间的相似性系数最小,其遗传距离最大,表明它们之间的亲缘关系最远。北疆 296 和北疆 641、黑农 44、垦农 18、抗线 8 号、丰豆 3 号;北疆 641 和垦鉴豆 4 号、垦农 18;北豆 14 和丰豆 3 号;绥农 28 和垦丰 16;抗线铁杆 I 和黑农 44、丰豆 3 号、东农 51;丰收 26 和富兴 4 号、东农 51 之间的相似性系数最大,其遗传距离最小,表明这些品种之间材料亲缘关系最近。由此说明黑龙江省大豆种质资源间存在一定的遗传变异性。

2.3 聚类分析

把 25 份材料所分离的 POD、EST 和 SOD 同工酶谱带结合起来进行聚类分析,有酶带的记为 1,无酶带的记为 0,逐一转化成二项数据表,然后用 NTSYSpc2.1 聚类软件进行分析,聚类结果见图 4。品种间遗传相似系数变幅在 0.75~0.96,表明各品种的亲缘关系有一定的差异。在遗传相似系数 0.80 处分为五类:

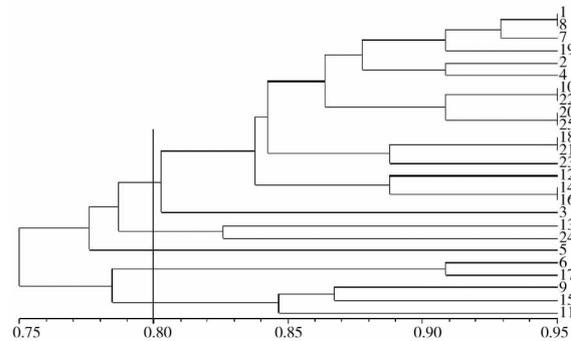


图 4 同工酶谱聚类图
(编号代表材料同表 1)

第一类共有 17 份材料,包括北疆 296、北疆 641、黑农 44、黑农 48、垦鉴豆 4 号、垦农 18、北豆 14、绥农 14、绥农 28、垦丰 16、富兴 4 号、抗线 8 号、抗线铁杆 I 号、丰收 26、丰豆 3 号、甘优 120、东农 51;第二类有 2 份材料,为绥农 27、黑河 38;第三类有 1 份材料,为合丰 50;第四类有 2 份材料,为合丰 55、富兴 9 号,第五类有 3 份材料,为垦农 22、嫩丰 16、华疆 3 号。

3 结论与讨论

大豆中存在着不同的酶,每一种酶都是大豆生长发育所必需的。各栽培大豆品种之间,性状表现各不相同,可能存在着酶系统的差异^[16]。在用于大豆研究的同工酶中,用得最多的是过氧化物酶、酯酶和超氧化物歧化酶。三者酶带谱型上丰富,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,可较好地用于鉴别基因型,进行遗传学分析^[13]。

该研究对黑龙江省 25 份大豆品种间的 POD、EST、SOD 同工酶进行分析中,同工酶酶活变化较快,故在染色过程时,要时刻注意酶带的变化,这对正确掌握酶谱是很重要的。因为若酶活性很高,染色后可能出现蓝色/褐色或透明的一团,而不是清晰的条带,这一团里可能是一条、两条或者是多条带;若酶活性低,加入乙酸脱色时该

条带颜色变淡,可能被误以为这里无带,导致得到错误的酶谱。不同同工酶在染色时酶活性变化也不同,如 POD 同工酶染色仅用 2~3 min 即可显现出清晰的条带,EST 同工酶染色需要 30~40 min,而 SOD 同工酶在光染时则需在强光照射 50 min 以上才出现小分子量透明带。

电泳数据分析表明:大豆品种间 POD、EST、SOD 同工酶酶谱在酶带数、迁移率及酶活性等方面均存在相似性,但也有一定的差异。酶谱反映了大豆不同品种之间的相互联系与区别^[20-22]。试验表明,各品种间特异的条带可用作分类鉴定的依据之一。

同工酶是基因表达的产物,不同的同工酶代表不同的基因位点。把 25 份供试材料所分离的 POD、EST 和 SOD 同工酶谱带结合起来进行聚类分析,更能充分全面地揭示黑龙江省大豆品种间的遗传多样性。但同工酶标记只能揭示编码这些蛋白的结构基因位点的多态性,对非结构基因则无能为力,所检测的位点数目因受技术限制不可能很多,所以同工酶电泳可能会低估品种间的遗传变异水平,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 秦君,李英慧,刘章雄,等.黑龙江省大豆种质遗传结构及遗传多样性分析[J].作物学报,2009,35(2):228-238.
- [2] 段会军,张彩英,张丽娟,等.河北省大豆种质资源同工酶及 RAPD 标记多样性研究[J].中国油料作物学报,2003,25(2):15-20.
- [3] Jobin-Decor M P, Graham G C, Henry R J. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives[J]. Genetic Resources and Crop Evaluation, 1997, 44: 471-477.
- [4] 赵坚义,Becker 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] 范传珠,王述民,马缘生.多花菜豆基因库种子繁殖更新后

- 遗传完整性分析[J].中国农学通报,1999(4):5-8.
- [6] 张宗文.红花品种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.
- [7] Zdeněk Pošvec, Miroslav Griga. Utilization of isozyme polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.) [J]. Euphytica, 2000, 113: 251-258.
- [8] 李星华,陈宛妹,李增禄.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.
- [9] 魏爱丽,白桦,陈云昭.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.
- [10] 洪国伟.大豆种质资源的分类、演化极其利用研究[D].重庆:西南农业大学,1991.
- [11] 成锁占,杨文衡.利用同工酶研究栽培植物分类及起源中若干问题[J].河北农业大学学报,1986,19(3):51-55.
- [12] 李军,钱波,郑师章.大豆种子库中同工酶水平的遗传多样性的初步研究[J].生态应用学报,1998,9(2):145-149.
- [13] 刘昭军,李希臣.同工酶技术在大豆育种中的应用[J].黑龙江农业科学,2001(6):35-37.
- [14] 李军,陶芸,郑师章.同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究[J].植物学报,1995,37(9):669-676.
- [15] 钟珍萍,刘德金,陈启锋,等.大豆种间的同工酶分析[J].大豆科学,1992,11(4):329-335.
- [16] 卢翠华,何志鸿,宋英淑.黑龙江省主要大豆品种同工酶谱分析[J].大豆科学,1990,9(2):145-148.
- [17] 胡能书.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南农业科技出版社,1985.
- [19] 罗广华,王爱国.植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J].植物生理学通讯,1983(6):44-45.
- [20] 陈启林,巩振辉,陈静.番茄 POD 与 EST 同工酶 PAGE 方法研究[J].西北农业学报,1999,8(1):87-90.
- [21] 祝红艺,张显西.非洲菊过氧化物酶同工酶酶谱分析[J].西北农业学报,2005,14(1):76-78.
- [22] 丁玲,陈发棣,滕年军.菊花品种间过氧化物酶、酯酶同工酶的遗传多样性分析[J].中国农业科学,2008,41(4): 1142-1150.

The Isozyme Analysis of Some Soybean Varieties from Heilongjiang Province

SHA Wei, HE Hai-yan, ZHANG Yan-fu

(Life Science and Forestry College of Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was adopted to study Peroxidase isozyme, Esterase isozyme and Superoxide dismutase of 25 soybean varieties from Heilongjiang province. The results showed that zymograms of these POD, EST, SOD of 25 soybean varieties were similarly but with some differences in terms of band number, mobility and isozymes activity (enzyme with depth). A total of 23 bands were detected in 25 cultivars using three isozymes markers, the polymorphic bands were 13, amount to 56.52%, statistical results revealed that the similarity coefficient among the 25 varieties ranged from 0.56 to 0.95, and the average was 0.76. It suggested that there were genetic variations among the varieties. According to the cluster analysis, the tested materials could be divided into 5 groups at the level GS 0.8.

Key words: soybean; isozyme; cluster analysis