

不同耐盐碱性玉米自交系过氧化物同工酶分析

董 扬¹,李旭业²,杨晓杰³,梁 虹¹,曲忠诚¹,许 健¹,于海林¹

(1. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;2. 黑龙江省畜牧研究所,黑龙江 齐齐哈尔 161006;3. 齐齐哈尔大学,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:为了有效利用玉米自交系种质资源,促进玉米育种进程,采用凝胶电泳方法研究了 32 个不同耐盐碱性的玉米自交系过氧化物同工酶的谱带迁移率和聚类分析情况。结果表明:自交系品种过氧化物同工酶谱带位点及带级变化较大,谱带分布不同,且有强弱变化;32 个自交系材料共出现 258 条酶带,大致可划分为 3 个区:A 区(0~0.13),B 区(0.26~0.43),C 区(0.55~0.81);过氧化物同工酶的欧氏距离变化范围为 0~3.000,平均为 1.500;当阈值取 20 时,供试品种可聚为 10 类。

关键词:过氧化物同工酶;盐胁迫;玉米自交系

中图分类号:S513.034

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)09-0005-04

在玉米育种过程中,确定不同自交系的亲缘关系非常重要,可以为优良杂交种的选育提供理论指导,但大部分玉米自交系并不能从形态上区别其血缘关系,为杂交组合的组配带来不便。酶是基因表达的产物,具有很好的遗传标记作用,同工酶可以用作鉴别遗传变异的一种手段,它能够从分子层面对不同的材料进行鉴别,解决了从形态上无法鉴别的难题^[1-3]。利用凝胶电泳技术,把电泳所得的谱带经过染色剂染色形成酶谱,酶谱中迁移率不同的谱带视为由不同的基因所控制的蛋白分子,从而表明同工酶蛋白基因与性状表现之

间的关联^[4-5]。该试验通过对过氧化物同工酶(POD)的分析,对前期从 118 份玉米自交系中筛选出的 32 份自交系品种(16 份耐盐品种、16 份盐敏感品种)进行亲缘关系分类,为不同耐性自交系间的杂交组配提供基础数据,指导优良耐盐碱玉米杂交种的选育。

1 材料与方法

1.1 材料

16 份耐盐自交系和 16 份盐敏感自交系(均由黑龙江省畜牧研究所提供),品种名称见表 1。

表 1 供试自交系品种
Table 1 Varieties of inbred lines

编号 No.	耐盐品种 Salt tolerant varieties	编号 No.	耐盐品种 Salt tolerant varieties	编号 No.	盐敏感品种 Salt sensitive varieties	编号 No.	盐敏感品种 Salt sensitive varieties
1	DL	9	335♀改	17	农 M1	25	02-12
2	A71	10	A59	18	南引 26	26	C23
3	先玉 696♂	11	E88	19	郑 32	27	先玉 128♂
4	A92	12	A44	20	MO ₁₇	28	吉 842
5	WM33	13	A118	21	06NY-25	29	杂 C/孟 98-5
6	先玉 420♂	14	A53	22	HT05-27	30	母杂
7	泽玉 119	15	79350	23	94-24	31	NT
8	A50	16	南引 35	24	青贮 3	32	J1100-4K

1.2 方法

1.2.1 播种与育苗 玉米自交系采用沙培方法

种植,室温 20℃,每 4 d 浇 1 次 1/2Hangland 营养液,待生长至第 15 天,分别取同一部位的叶片进行同工酶试验。

1.2.2 电泳方法 此方法共分 6 个步骤。

(1)凝胶板制备:胶板装入电泳槽后用 2%的

收稿日期:2013-04-15

第一作者简介:董扬(1982-),女,黑龙江省齐齐哈尔市人,硕士,研究实习员,从事玉米育种研究。E-mail:hxmlxuye2009@163.com。

琼脂封好,配置 5% 的分离胶 20 mL,混匀后,用胶头滴管将分离胶均匀加入长、短板内,胶高 8 cm 左右,加入时小心操作,以不产生气泡为准,再马上加 3~4 mm 水层进行水封。静置约 40 min,当能看到不同折射率的折射线后,去掉上层蒸馏水。配置 3% 的浓缩胶 10 mL,混匀后,用胶头滴管吸取浓缩胶,均匀地加到已经聚合好的凝胶的上方,在浓缩胶距短玻璃板上缘距离为 0.5 cm 左右时停止加胶,把样品槽的模板小心地插到浓缩胶内,以不产生气泡为准,静置约 30 min,待凝胶“老化”。小心取出样品槽模板,将滤纸剪成窄条吸去样品凹槽的水分,倒电极缓冲液于上、下两贮槽中,缓冲液的高度标准为没过短板 0.5 cm 以上,但不能超过长板。

(2) 点样液提取:称取 0.5 g 自交系幼叶(为了获得更好更可靠的试验数据,在取样时尽量选取同位置、同阶段的自交系叶片,以便提高试验数据的准确性和可比性)。放入冰研钵中,加 3 mL 研磨缓冲液,快速研磨成匀浆,将混合液移入离心管,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取出上清液,取上清液适量与溴酚蓝按 1:5 混和,用于点样。

(3) 加样方法:用移液器吸取样液 15 μL ,向浓缩胶凹槽内加样。要求移液器的枪头尽量接近加样槽底部,缓缓推动移液器,枪头不要破坏凹形槽的胶面。加样过程中,要尽量防止所加样液散逸到其它的凹槽内,这样会影响试验的准确性,为避免和

减少样液散逸,可在操作时在枪头上沾少量的甘油。

(4) 电泳过程:将加好样的电泳槽放入 4℃ 的冰箱中,再次检查缓冲液高度,连接电源,打开开关,电流的大小设置为 10 mA 左右,待指示带通过分离胶的位置后,电流加大到 20~30 mA,电泳至指示条带距离胶版底边 1.0 cm 左右时,关掉电源开关,停止电泳。

(5) 凝胶板的剥离和染色:电泳结束后,取出凝胶胶版,从短胶板一边揭开,在胶板下方做好区别标记,用小刀切去浓缩胶部分,小心地把分离胶放入 pH 4.7 的乙酸缓冲液中浸泡 10 min。浸泡后倒去缓冲液,加入染色液,染色液要没过整个胶板,以确保染色均匀,在室温下显色 5~10 min,得 POD 同工酶的蓝色酶谱。

(6) 结果记录:于紫外凝胶成像系统下观察记录酶谱,拍照,计算相对迁移率,3 次重复取平均值。

1.2.3 数据处理 根据某一位点上酶带的有无,分别记作“1”和“0”。Excel 软件进行数据统计,SPSS 18.0 软件进行聚类分析(阈值 20)。

2 结果与分析

2.1 过氧化物同工酶(POD)酶谱分析

由图 1 可以看出,不同的自交系品种的过氧化物酶同工酶谱带位点及带级变化较大,谱带分布不同,且有强弱变化。

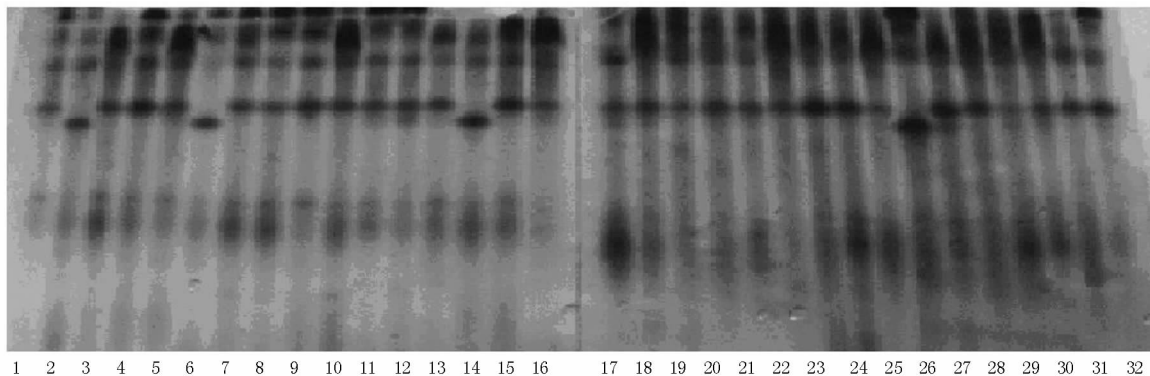


图 1 玉米自交系的 POD 同工酶电泳图谱

Fig. 1 POD electrophoretogram of maize inbred lines

图 2 为 32 个玉米自交系的过氧化物酶的模式图,由此可知 32 个自交系材料共出现 258 条酶带,其中耐盐品种有酶带 134 条,盐敏感品种有酶带 124 条。每个自交系品种酶带的数量各有不同,其中酶带最多为 12 条,酶带最少为 5 条,其余

的 6~10 条不等。共出现 13 种类型的酶带,即 A1~A13。根据酶谱迁移率(R_f = 酶带迁移的距离/溴酚蓝迁移的距离)的不同,大致可划分为 3 个区:A 区(0~0.13),B 区(0.26~0.43),C 区(0.55~0.81)。酶带数量较多、活性较强、分布

较集中的是 A 区,共出现 96 条酶带,其中耐盐品种酶带 49 条,盐敏感品种酶带 47 条;酶带数量较少的是 B 区,共有 71 条酶带,其中耐盐品种酶带

32 条,盐敏感品种酶带 39 条;C 区共有 91 条酶带,其中耐盐品种酶带 57 条,盐敏感品种酶带 34 条,且酶带活性都较弱。

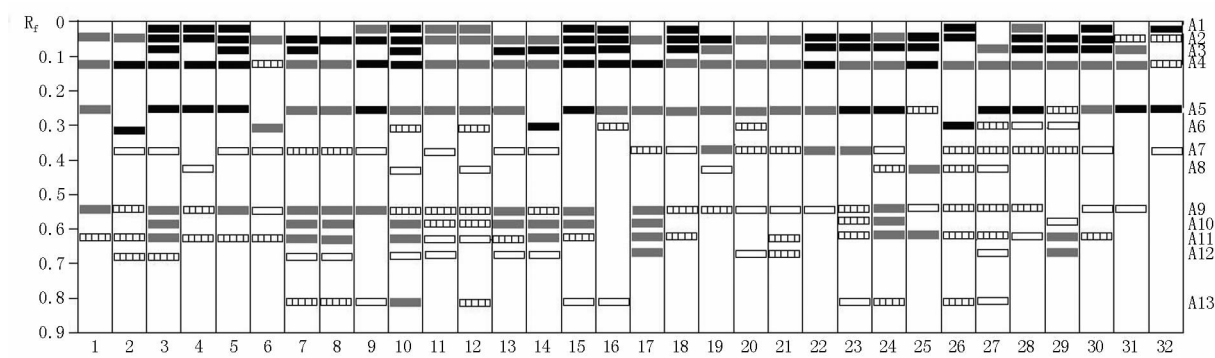


图 2 玉米自交系的 POD 同工酶谱模式


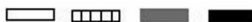
酶带由弱至强依次为: 

Fig. 2 POD Isozymic zymogram patterning of maize inbred line

Enzyme belt arranged from weak to strong 

2.2 同工酶聚类分析

利用 SPSS 18.0 软件计算出过氧化物同工酶的欧氏距离系数,通过欧氏距离的最短距离法得 32 个玉米自交系品种的欧氏距离系数矩阵,其中

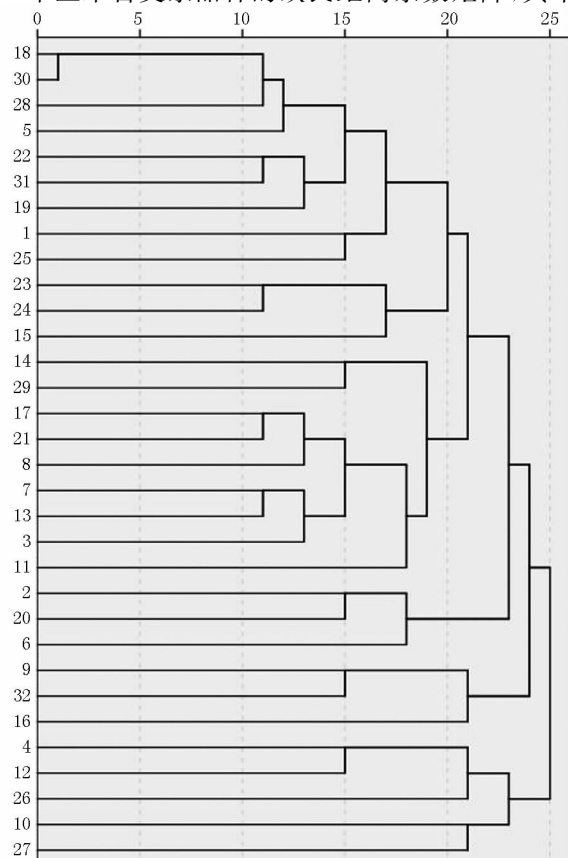


图 3 聚类分析

Fig. 3 Cluster analyze chart

最小的欧氏距离系数是自交系 18 与 30,距离系数为 0。最大的欧氏距离系数是自交系 6 与 10、12 与 13、12 与 14、4 与 29、12 与 29、10 与 32、27 与 32,它们的距离系数为 3.000,32 份玉米自交系材料间的过氧化物同工酶的欧氏距离变化范围为 0~3.000,平均为 1.500,欧式距离变化范围较大。

采用欧氏距离最短距离法进行聚类分析,得出不同自交系品种的聚类分析图。由图 3 可以看出,当阈值不同时,32 个自交系品种聚成不同类。当阈值取 20 时,供试品种可分为 10 类:自交系 18、30、28、5、22、31、19、1、25 聚为一类;自交系 23、24、15 聚为一类;自交系 14、29、17、21、8、7、13、3、11 聚为一类;自交系 2、20、6 聚为一类;自交系 9、32 聚为一类;自交系 16 单独聚为一类;自交系 4、12 聚为一类;自交系 26 单独聚为一类;自交系 10 单独聚为一类;自交系 27 单独聚为一类。

3 结论

同工酶作为遗传标记,被广泛地用于关于遗传分析研究,究其原因主要是,其作为分子水平的一个指标,按照一个基因只能编码一个同工酶的亚基的理论,能够从同工酶的表现型差异直接推测基因型差异,从这个角度来考虑,利用同工酶来研究品种的差异要优于某些形态指标研究,是一种筛选以及区分不同品种较为方便和有效的手段^[6-7]。

该试验中,32 个自交系品种之间表现出一定

的遗传性,并且每一自交系品种都有自己的过氧化物酶带^[8-9]。聚类分析得出不同自交系的聚类分析图,在同工酶水平上分析了不同耐性自交系差异性。32 个自交系材料共出现 258 条酶带,其中耐盐品种酶带 138 条,盐敏感品种酶带 120 条,共出现 13 种类型的酶带即 A1~A13,酶谱迁移率变化范围为 0~0.81。其中酶带数量较多、活性较强、分布较集中的是 A 区,酶带数量较少的是 B 区;C 区酶带活性都较弱。当阈值取 20 时,供试品种可聚为 10 类。耐盐品种酶带数较盐敏感酶带数多,并且酶带活性较强。

参考文献:

- [1] Subbaiah C C, Sachs M M. Molecular and cellular adaptations maize to flooding stress[J]. Annals of Botany, 2003, 91: 119-127.
- [2] Victor Quesada, Santiago Garcia-Martinez, Pedro Piqueras, et al. Genetic Architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 950-963.
- [3] 陆晓民,孙锦,郭世荣,等. 低氧胁迫下 24-表油菜素内酯对黄瓜幼苗根系生长及其无氧呼吸同工酶表达的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(11): 2497-2502.
- [4] 谭玉坤,王宝君. 同工酶电泳鉴定玉米种子纯度准确性初探[J]. 杂粮作物, 2000, 20(6): 25-27.
- [5] Yamashita M, Shimamoto A J. Variation and differentiation of allelic frequency of isozyme loci in perennial regrass (*Lolium perenne*) [J]. Plant Physiology, 1993(4): 72.
- [6] 张敏,肖千明,李红,等. 滑菇主要栽培品种间亲缘关系的同工酶研究[J]. 辽宁农业科学, 2010(4): 25-27.
- [7] Hitoshi N. Correct name for "nameko" [J]. Mycoscience, 2008, 49: 88-91.
- [8] 石凤翎,吴永敷,布和,等. 苜蓿雄性不育系及其杂种 F₁ 代同工酶分析[C]//内蒙古农业大学. 首届中国苜蓿发展大会, 2001: 62-64.
- [9] 张蕴薇,任卫波,刘敏,等. 红豆草空间诱变突变体叶片同工酶及细胞超微结构分析[J]. 草地学报, 2004, 12(3): 223-226.

The Analysis on Peroxidase Isozyme of Maize Inbred Lines with Different Salt Tolerance

DONG Yang¹, LI Xu-ye², YANG Xiao-jie³, LIANG Hong¹, QU Zhong-cheng¹, XU Jian¹, YU Hai-lin¹

(1. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161006; 2. Institute of Animal Husbandry in Heilongjiang Province, Qiqihar, Heilongjiang 161006; 3. Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: In order to use the germplasm resources of maize inbred lines effectively and promote the breeding process, band mobility and cluster analysis of peroxidase isozyme of 32 maize inbred lines with different salt tolerance were studied by gel electrophoresis. The results showed that the band sites and band classes changed greatly, distribution of bands were different and strength change; There were 258 bands which could be divided into three zones; A zone(0~0.13), B zone(0.26~0.43), C zone(0.55~0.81); the change scope of euclidean distance was 0~3.000, the average was 1.500; when the threshold was 20, tested varieties could be clustered into 10 types.

Key words: peroxidase isozyme; salt tolerance; maize inbred lines

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网 络出版总库》及 CNKI 系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部