

唐菖蒲两变异株的同功酶及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的比较分析

张志伟, 王丹, 张冬雪

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621002)

摘要:为探讨电子束对唐菖蒲诱变的可行性及不同剂量电子束对其花性状的影响,用不同剂量电子束辐照唐菖蒲“江山美人”球茎,在 40 Gy 和 160 Gy 处理组分别得到了 1 株花色和花序变异株(M1'和 M2')。对这两变异株和对照以及其相应辐照剂量(40 Gy 和 160 Gy)处理组进行了研究。M1 代植株叶片的过氧化物酶、过氧化氢酶、淀粉酶和酯酶 4 种同功酶电泳结果表明,40 Gy 和 160 Gy 处理组的酶带与对照组的相同,变异株与对照组相比,酶带有所增减。基于同功酶谱带带型,使用 SPSS11.5 进行了聚类分析并得到聚类树状图。图中显示,供试材料被分成了 3 个组:对照组(包括 40 Gy 和 160 Gy 处理组与对照),M1'组和 M2'组。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析表明,蛋白表达明显被电子束辐照所抑制,但在这两个变异株中观测到 3 条特异表达的蛋白条带,分子量分别为 96 kDa、115.4 kDa 和 137.2 kDa,这些特异表达的蛋白可能与花色与花序的调控有关。由此表明,电子束辐照诱导花色与花形突变体是 1 种有效的途径。

关键词:电子束;唐菖蒲;同功酶;SDS-PAGE 电泳;蛋白亚基

中图分类号:S603.6; Q319

文献标识码:A

文章编号:1000-6931(2007)03-0366-06

Study on Isoenzymes and SDS-PAGE of the Electron Beam Induced Mutant of Gladiolus “Beauty Queen”

ZHANG Zhi-wei, WANG Dan, ZHANG Dong-xue

(Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621002, China)

Abstract: In order to test the feasibility of electron beam induced mutation on Gladiolus and the effects of various doses of electron beam on flower traits, the corms of gladiolus “Beauty Queen” were irradiated by electron beam with different doses. Flower-colour and inflorescence mutants (M1' and M2') were obtained, respectively at the doses of 40 Gy and 160 Gy. The two mutants and the parent (CK) and those irradiated with same doses (40 Gy and 160 Gy) were studied. The isozymes of POD, CAT, AMY and EST were tested, it shows that isozymes patterns of gladiolus irradiated at the doses of 40 Gy and 160 Gy a similar to CK, but the mutants' bands were added or absent compared to

CK. Based on band types of isozymes, the cluster analysis was carried out and dendrogram generated using SPSS software version 11.5, it indicates that they may be divided into three groups: CK group (CK, gladiolus irradiated at the doses of 40 Gy and 160 Gy), M1' group and M2' group. The bands of protein subunit were analyzed by SDS-PAGE, it shows protein expression is obviously inhibited by electron beam irradiation. But three different protein bands were found in the two mutants, and their molecular weights were 96 kDa, 115.4 kDa, 137.2 kDa, respectively. These special proteins may have relation with regulation and control flower-color and inflorescence. The results indicate that electron beam irradiation is an effective way for inducing flower-color and flower-shape mutants.

Key words: electron beam; gladiolus; isozymes; SDS-PAGE electrophoresis; protein subunit

辐射诱变育种能突破原有基因库的限制, 诱发新基因或新的基因组合, 形成有现实或潜在利用价值的新种质资源。目前, 辐射诱变育种的诱变源仍以 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线为主^[1]。近年来, 有关离子束的国内报道较多^[2,3], 而电子束对植物进行辐射育种的研究较少, 特别是在观赏植物中鲜见报道^[4-6]。本实验用电子束辐照唐菖蒲球茎, M1代得到了1株花色变异株与1株花序变异株。对这两株变异株和其相同处理组中其他植株及对照株进行同功酶电泳与 SDS-PAGE 的比较分析, 旨在探讨电子束对唐菖蒲 M1代植株的诱变情况, 为电子束诱变源的有效利用及诱变机理的进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

唐菖蒲品种“江山美人”休眠球茎, 周径为 11~13 cm。

1.2 方法

1.2.1 辐射处理 试验在中国工程物理研究院久远辐射中心完成。以机器电压为 3 MeV 的 EPS 电子加速器对材料进行电子辐射处理, 辐射率为 40/10 s, 剂量分别是 40, 80, 120, 160, 200, 240 Gy, 及对照(0 Gy), 每种处理 20 株, 设 3 次重复。

1.2.2 田间栽培 唐菖蒲球茎种植于西南科技大学农业设施实验室, 种植用土为菜园土, 另加 5% 珍珠岩、1% 过磷酸钙和 5% 复合肥混合而成, 水肥管理一致, 至盛花期观察花朵变异情

况。

1.2.3 同功酶电泳分析 取种植于田间的花朵变异株及其同一处理中其他植株和对照株相同部位健康叶片, 分别进行过氧化物酶、过氧化物氢酶、淀粉酶和酯酶 4 种同功酶电泳, 每种酶至少重复进行 5 次。电泳采用不连续缓冲系统, 垂直板电泳。其中, 酯酶同功酶的分离胶浓度为 6.6%, 其他 3 种同功酶分离胶浓度为 10%, 而浓缩胶浓度均为 3%。电泳采用稳压方式, 电泳后胶板, 采用同功酶常规染色法染色^[7,8], 保证固定一致的实验条件, 对重复性好的电泳图片, 经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照并分析。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳分析 取材方法同上, 叶片中蛋白的分离采用不连续缓冲系统, SDS-PAGE 垂直板电泳, 浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 10%。电泳后胶板采用银染法染色^[8], 对重复性好的电泳图片经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照分析, 并用蛋白质 Marker(天泽基因工程公司提供) 计算特异蛋白亚基分子量。

2 结果与分析

2.1 变异株的观察

在种植于田间各处理中, 出现了较多变异, 其中, 株高变矮的最多, 约占总处理的 1.5%, 且主要集中在 40 Gy 处理组。在 40 Gy 处理组, 还观察到花序变异株, 表现为花序中每两朵花自下向上开起, 且上方的花先开, 下方的花后开(图 1 中 1'), 以下简称 M1' 株; 在 160 Gy

处理组,出现一白色花变异株,且只有两朵花同时开放,而非正常情况下的13朵左右自下而上逐次开放,株高比对照株矮近20 cm(图1中2'),以下简称M2'株。

2.2 同功酶分析

2.2.1 同功酶电泳比较

对花朵变异株及其同一处理植株和对照株进行同功酶电泳。电泳

酶带重复性较好。4种同功酶图谱如图2所示。从图2a看出, α -淀粉酶同功酶只有1条酶带,对照株表达较弱,40 Gy辐照的处理组酶带加强,160 Gy辐照处理组酶带减弱,但两花变异株M1'和M2'酶带明显增强,远高于对照及相同剂量处理的其他植株。从图2b可看出,对照株与两处理组的过氧化物酶同功酶在该时



图1 对照CK、1'(变异株M1')和2'(变异株M2')

Fig. 1 Control, flower-colour mutant 1' and inflorescence mutant 2'

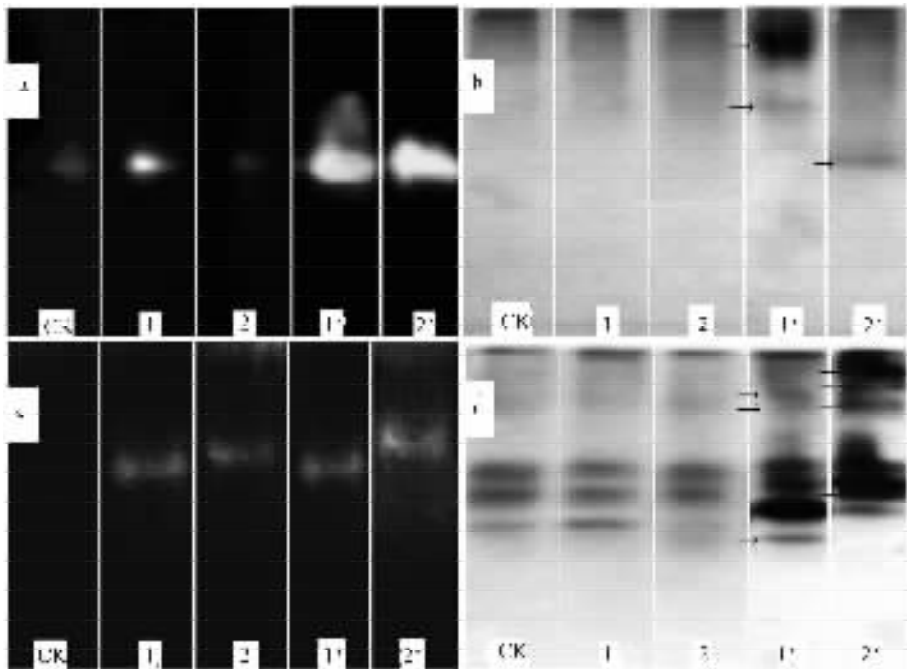


图2 变异株与对照同功酶电泳图谱

Fig. 2 Isozyme patterns in leaf of gladiolus of irradiation by electron beam

a— α -淀粉酶同功酶;b—过氧化物酶同功酶;c—过氧化氢酶同功酶;d—酯酶同功酶

CK—原始对照株;1—40 Gy处理组;2—160 Gy处理组;1'—变异株M1';2'—变异株M2'

期表达较弱,均只有 1 条酶带,且带型及酶活性无明显变化,而两花变异株 M1' 和 M2' 酶带带形有明显变化, M1' 株新出现两条特征带, M2' 也出现 1 条特异表达谱带(特异带如图 2b 中箭头所示)。从图 2c 看出,对照株在该时期酶活性非常弱,没有可见酶带,而变异株 M1' 和 M2' 及相应剂量处理组的植株均只有 1 条酶带,且酶带位置及酶活性基本相同。从图 2d 看出,对照株酯酶同功酶多态性较好,有 4 条酶带。40 Gy 处理组带型与酶活性与对照基本相同, 160 Gy 的处理组酶带变为 3 条,比对照减少 1 条;两花变异株酶带带形与酶活性较对照有明显变化, M1' 株新出现 3 条特征带,且酶活性增强, M2' 株出现 4 条特异表达谱带,酶活性亦明显增强(特异带如图 2d 中箭头所示)。由此可见,辐射处理后的植株在同功酶酶带上较对照多数表现出变化,但主要是酶活性的变化,而变异株较同处理其他植株在酶活性和酶带带谱上均有明显改变。

2.2.2 基于同功酶酶带的聚类分析 数据分析使用 SPSS11.5。对电泳图谱上各泳道每一相同迁移位置,清晰且重复性好的条带记为“1”,无酶带的记为“0”,从而变换成二态性状矩阵。对二值数据的相似性测度采用单匹配相似系数(Simple matching coefficients of similarity), Hierarchical Cluster 分层聚类,聚类方法使用组内连结(Within-groups linkage),建立样品间的聚类树状图。依此,计算出 CK、1、2、1'、2' 5 个样品间单匹配相似系数矩阵如下:

$$\begin{bmatrix} 1.000 & & & & \\ 0.933 & 1.000 & & & \\ 0.867 & 0.933 & 1.000 & & \\ 0.667 & 0.733 & 0.800 & 1.000 & \\ 0.733 & 0.800 & 0.733 & 0.533 & 1.000 \end{bmatrix}_{5 \times 5}$$

经聚类动态分析,获得了聚类树状图(图 3)。由图 3 可看出,5 个供试材料可明显划分为 3 组,其中的两组分别为两个变异株,另一组包含了两处理组及对照。这表明,两变异株与相应处理组及对照的相似性程度较低,变异株 M1' 与对照相似性系数为 0.67,变异株 M2' 与对照相似性系数为 0.73,亲缘关系较远。而与变异株具有相同辐射剂量的 40 Gy 与 160 Gy 处理组植株与变异株亲缘关系较远,但与对照

较近,最大可达 0.933,说明受辐射后改变并不大。

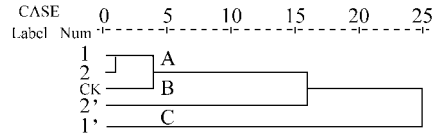


图 3 基于同功酶带谱的样品聚类图

Fig. 3 Dendrogram for induced gladiolus based on band types of isozymes

2.3 SDS-PAGE 电泳分析

从图 4 可看出,两处理组叶片的 SDS-PAGE 电泳图谱与对照株相比,条带均有所减少(如图 4 中 1 和 2 泳道箭头所示),且部分条带颜色变浅,说明蛋白表达量也较对照有所减少。两变异株叶片的 SDS-PAGE 电泳图谱与对照株相比,条带有所变化,各自出现一些特异性条带(如图 4 中 1' 和 2' 泳道箭头所示)。

变异株 M1' 特异性表达两条亚基,分子量分别是 106.4 kDa 和 126.1 kDa。这两种亚基可能与调控花序的变化有关。变异株 M2' 也特异性表达两条亚基带,其中,分子量为 106.4 kDa 的亚基与 M1' 相同,另一条分子量为 144.6 kDa,该亚基可能与调控花色有关(图 4)。

3 讨论

长期以来,在诱变材料的选育中,主要依靠形态学为依据。形态性状为指标的数量有限,它不仅取决于遗传物质,还易受外界环境的影响,因而,难以全面而客观地反映变异结果。同功酶标记技术与形态性状相比,标记更加准确,受环境影响较小,通过分析同功酶酶带的有无、出现时间的早晚及活性强弱,可推断基因水平的变异情况,与形态学性状相结合,能更好地反映遗传多样性。本研究选用了过氧化物酶、过氧化氢酶、淀粉酶和酯酶 4 种同功酶,均为唐菖蒲体内存在的重要酶类,具有遗传的稳定性,酶谱不易受环境的影响而变化。因此,这些同功酶为研究唐菖蒲辐射诱变提供了 1 条较有效的途径。该实验中的各种酶带重复性较好,变异株较同处理其他植株在酶带带谱及酶活性上均表现出更大的变异,与形态学的变化相吻合。

所以,通过酶带谱的分析,可推断植株的变异情况。但同一处理株不同同功酶间的变异情况表现并不一致,这可能是由于不同的酶具有不同的底物或诱导物,植物本身特定底物或诱导物的改变促使相应酶发生了改变,或是由于不同的酶对辐射的敏感性不同而发生的酶本身的变化,这不仅表明处理后材料发生了一定程度的变异,而且也说明变异的复杂性、随机性和不确定性。由于辐射对植株遗传序列诱变的随机性,使得植株的损伤及变异成为一个随基因的程序性表达而逐渐表现的过程,至于能否得到可遗传的变异,仍然需要对其后代进行研究。

在辐射诱变所造成的酶谱条带变化中,新条带的产生和原有条带的消失两种结果均是辐射诱变所造成的,对结果的分析同等重要;而单匹配相似系数同等对待正匹配与负匹配,均给予一倍的权值,所以,本实验选用单匹配相似系数能较客观真实地反映同功酶条带变异结果。

从聚类分析的结果可以看出,尽管受同一剂量辐射处理,不同个体之间差异明显,说明电子束辐射诱变的随机性较大,在进行电子束辐射诱变育种工作中,既应采用一些方法,如正对生长点等发育的核心部位进行辐射等,以减小随机性,同时还应特别注意变异株的选择。

从本实验可以看出,辐射后产生变异且存活状况良好的植株往往保护酶活性增强,酶谱谱带有所改变,以适应辐射处理,并且有特异性蛋白表达。没有明显变异的植株仅表现为保护酶活性不变或下降,同时蛋白表达受到抑制。利用 SDS-PAGE 电泳所得到的两条特异性表达条带可能分别与调控花色和花序的变化有关,将作为一个宝贵的资源加以研究与利用。由于电子束辐射诱变的复杂性,是否经 40 Gy 处理更易引起花序的变异而经 160 Gy 处理更易于引起花色的变异,尚有待进一步研究。

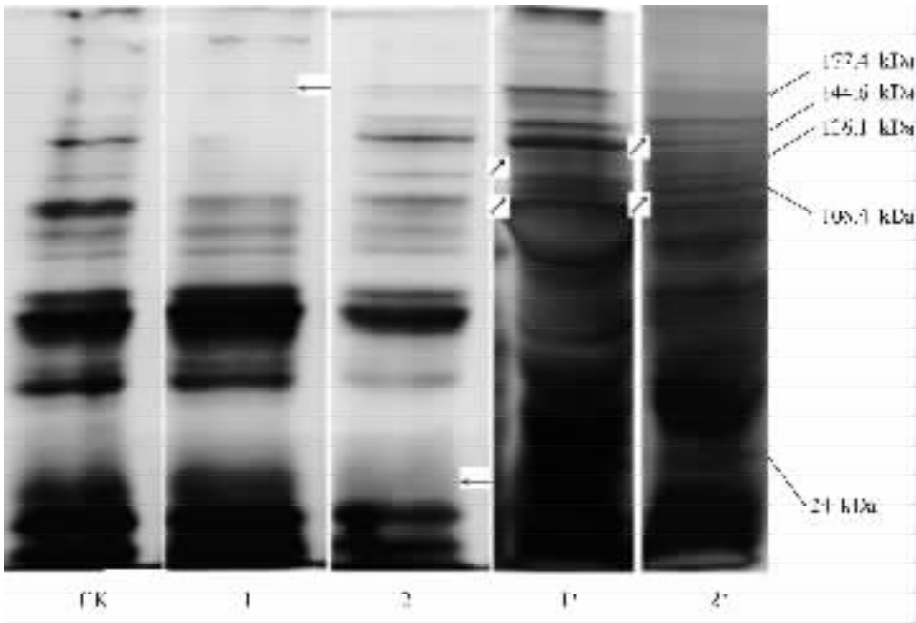


图4 变异株与对照株 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE patterns of protein subunit in leaf of gladiolus of irradiation by electron beam

参考文献:

- [1] 王丹,任少雄,苏军,等.核技术在观赏植物诱变育种上的应用[J].核农学报,2004,18(6):443-447.
WANG Dan, REN Shaoxiong, SU Jun, et al. Application of nuclear technology in radiation breeding of ornamental plants[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(6): 443-447 (in Chinese).
- [2] 陈恒雷,吕杰,曾宪贤.离子束诱变育种研究及应用进展[J].生物技术通报,2005,2:10-13.
CHEN Henglei, LU Jie, ZENG Xianxian. Advances in research and application of mutation breeding with ion beam implantation[J]. Biotechnology Bulletin, 2005, 2: 10-13 (in Chinese).
- [3] 宋云,张怀渝,畅志坚.离子束用于诱变育种的研究进展[J].分子植物育种,2004,2(2):301-305.
SONG Yun, ZHANG Huaiyu, CHANG Zhijian. Progress of mutation breeding with ion beam implantation[J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(2): 301-305 (in Chinese).
- [4] TANABE K, DOHINO T. Effects of electron beam irradiation on cut flowers [J]. Research Bulletin of the Plant Protection Service, 1993, 29:1-9 (in Japanese).
- [5] 林祖军,孙纪霞,迮福惠.电子束在花卉诱变育种上的应用[J].核农学报,2002,16(6):351-354.
LIN Zujun, SUN Jixia, ZE Fuhui. Studies on irradiation breeding by electron beam in flowers and plants[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2002, 16(6): 351-354 (in Chinese).
- [6] 张圣君.中子和电子束辐照对水稻等农作物育种的影响[J].上海大学学报:自然科学版,1999,5(5):388-392.
ZHANG Shengjun. Effects of neutron and electron beam irradiation on the breeding of rice and other plants[J]. Journal of Shanghai University: Natural Science, 1999, 5(5): 388-392 (in Chinese).
- [7] 吴能表,谈锋.不同光照条件对少花桂幼苗同工酶谱带的影响[J].西南农业大学学报,2002,24(2):101-104.
WU Nengbiao, TAN Feng. Effect of light intensity on isoenzymes of CINNAMOMUM PAUCIFLORUM seedlings [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2002, 24(2): 101-104 (in Chinese).
- [8] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999:263-266.