

# 几种紫花苜蓿过氧化物同工酶遗传规律的研究

赵志强<sup>1</sup>, 曹清国<sup>2</sup>, 张幽静<sup>2</sup>, 贾振伟<sup>1</sup>

(1. 内蒙古民族大学 农学院, 内蒙古 通辽 028043;

2. 内蒙古牙克石市乌尔其汉镇畜牧综合站, 内蒙古 牙克石 022159)

**摘要:** 利用过氧化物同工酶对云南红壤区的几种紫花苜蓿杂交组合进行初步筛选, 以期为该地区紫花苜蓿的引种驯化工作提供理论依据, 从而获得有价值的杂交后代。对各杂交组合亲本及其后代的过氧化物酶谱表现分析结果表明, 杂交过程中发生了过氧化物酶位点的遗传重组, 从而在  $F_1$  代产生了酶谱表现与亲本不同和相同的两类个体; 亲本及其后代有 3 条共有酶带; 亲本中, 爱博、射手 2 个栽培种比野生种和 AG-3 的酶谱表现好; 过氧化物酶的遗传背景差异较大的杂交组合有可能通过遗传物质的交流产生有利的性状重组, 对其进行筛选, 可获得有价值的育种材料。

**关键词:** 紫花苜蓿; 过氧化物同工酶; 红壤区

中图分类号: S551.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0093-04

## Study on Genetic Principle of Peroxidase Allozyme from Alfalfa Resources

ZHAO Zhi-qiang<sup>1</sup>, CAO Qing-guo<sup>2</sup>, ZHANG You-jing<sup>2</sup>, JIA Zhen-wei<sup>1</sup>

(1. College Agricultural of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China;

2. Wuerqihan Animal Husbandry Integrated Service Station of Yakeshi, Yakeshi 022159, China)

**Abstract:** Peroxidase is an allozyme superfamily playing important roles in plant stress resistance. Several alfalfa cross combinations have been evaluated by peroxidase allozyme recombination with expect to lend a theoretic buttress for both alfalfa breeding and hybrid selection. in this paper, we have discussed the allozyme zymogram of peroxidase from parents and hybrids of some alfalfa cross combinations growing in the red soil region of china. The results have verified that genetic recombination have occurred in some loci of peroxidase during the process of crossing, which has resulted in production of two types of offspring including those with different zymogram profile from their corresponding parents and those with the same zymogram profile ones. Parents and their hybrids can share three common allozyme bands. As for parents, cultivar Arriba and Archer can give a more favorable performance than the wild alfalfa species and the dispersed one named AG-3 on peroxidase allozyme zymogram, which may due to the artificial selection effect in the breeding process. Moreover, selection of cross combinations with comparatively more divergent genetic backgrounds may hold promise for yield of beneficial breeding materials through exchanges of genetic material leading to elite characters' recombination.

**Key words:** Alfalfa; Peroxidase allozyme; Red soil region

红壤是我国南方地区重要的土壤类型之一, 对中国的粮食生产起着重要作用。选育适合在我国红壤区种植的植物品种是提高植物体产量、促进畜牧业发展的一个有效途径。紫花苜蓿被誉为“牧草之王”, 是世界范围内广泛分布的优良牧草。然而, 适宜于我国云南红壤区土壤、气候类型的优良紫花苜蓿品种尚未见报道。为此, 2002 年, 我们以一种云南野生种紫花苜蓿和几种栽培种紫花苜蓿为育种亲本配制了杂交组合, 期望能够从后代中筛选出表现

优异的育种材料。

对后代材料的鉴定与筛选是决定育种成败的关键。利用生物体中的天然标记一同工酶对育种后代进行鉴定是人们常用的手段之一。通过同工酶在杂交组合中分离重组的比较, 可以排除非杂交后代个体, 同时预测不同组合在该酶性状上的配合力。另外, 同工酶是基因的产物, 对其性状表现的追踪可以从遗传角度探讨亲本间的遗传距离远近, 在大分子水平鉴别许多从外部形态上难以鉴别的遗传上的特

征和变异,反映其编码基因在种质创新上的遗传与重组状况,预测杂交后代在该酶性状上的表现,从而筛选出优势个体,为不同种质资源的育种工作提供指导。

过氧化物酶是同工酶中极其重要的一员。针对过氧化物同工酶进行的研究可以用来阐明植物种间、种群间的遗传多样性、遗传结构、基因流动<sup>[1,2]</sup>等,还可用于研究植物的种间杂交现象、植物体纯度检验<sup>[3]</sup>、植物体逆境胁迫的机制<sup>[4,5]</sup>等。

本研究针对各杂交组合的亲本及其后代进行了单株间过氧化物酶性状表现差异的研究,力图探索在特定红壤条件下紫花苜蓿过氧化物酶在不同杂交组合中的分离重组规律,以利于筛选出适合云南红壤区生长的优势杂交组合,鉴定性状表现突出的杂交后代,从而为下一步育种工作提供中间材料,同时丰富杂交育种中的亲本种质选配、后代筛选的理论研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

野生苜蓿、AC-3 苜蓿、爱博苜蓿、射手苜蓿及其杂交后代材料共 29 份。

野生苜蓿为国内野生苜蓿品种,AC-3 为云南本地逸散种,爱博和射手为引自国外的栽培种。

所有杂交组合均种植在云南省昆明市红壤地区。

### 1.2 方法

试验采取随机区组设计,相同处理水平。由于不同杂交组合亲本遗传物质的亲和性不同,获得的后代材料数目差异很大,因此不同杂交组合用于分析的后代材料数目不同。

以野生苜蓿为母本、AC-3 苜蓿为父本配制了杂交组合,获得 12 份后代材料,编号分别为 1~12;

以 AC-3 苜蓿为母本、野生苜蓿为父本配制了杂交组合,获得 9 份后代材料,编号为 13~21;

以爱博苜蓿为母本、野生苜蓿为父本配制了杂交组合,获得 2 份后代材料,编号为 22,23;

以射手苜蓿为母本、野生苜蓿为父本配制了杂交组合,获得 2 份后代材料,编号为 24,25。

酶的提取采用 pH 7.8 的磷酸缓冲液。同一时间选取各育种材料(此时均处于分枝期)主茎尖端完全展开的幼嫩叶片 0.5 g,冲洗 3 次后放入研钵,加入 2 mL 酶提取缓冲液,冷冻研磨成浆,转入离心管中,将研钵用 1 mL 提取缓冲液冲洗后也放入离心管内。13 000 r/min 冷冻离心 20 min,上清液为酶粗提

液。取上清液,再离心 5 min。再取上清液 2 mL,放 -10℃ 的冰箱中备用。

采用不连续的垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,电极缓冲液为 Tris 甘氨酸高离子强度缓冲液, pH 8.3。凝胶缓冲液采用 Tris-HCl 系统,浓缩胶 3.5%,分离胶 7.5%。过氧化物酶染色方法参见王中仁的方法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

电泳染色后的结果见图 1、图 2。

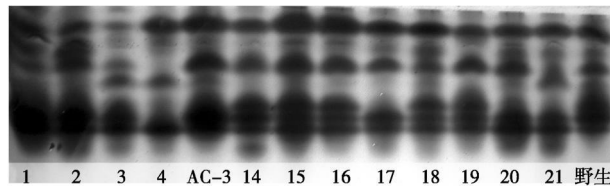


图 1 不同杂交组合亲本及其杂交后代

过氧化物同工酶酶谱-1

Fig 1 Peroxidase allozyme zymogram of parents and hybrids from different alfalfa cross combinations

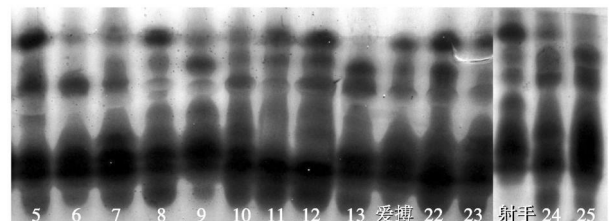


图 2 不同杂交组合亲本及其杂交后代

过氧化物同工酶酶谱-2

Fig 2 Peroxidase allozyme zymogram of parents and hybrids from different alfalfa cross combinations

电泳分析结果见表 1~表 4。

对各杂交组合酶谱进行分析表明,在杂交过程中发生了过氧化物酶位点的遗传重组,从而产生了酶谱表现与亲本不同和相同的个体后代 2 类。根据酶带的迁移率,在杂交组合中,过氧化物同工酶谱带条数为 5~8 条,其中 6,7 两条酶带显色很深,该位点过氧化物同工酶的活性较高。

酶带位点频率计数表明,位点 1,6,7 存在于所有亲本及其后代个体内,为紫花苜蓿的共同酶带;位点 3 在个体中出现的频率也很高,表现出共同酶带的特征,仅在以野生苜蓿为母本、以 AC-3 苜蓿为父本的杂交组合后代中出现该位点丢失的个体;位点 2,4,5,8 在不同育种群体中表现出差异,出现分离现象,其中位点 4,8 的分离表现最为强烈。位点 2 在 AC-3 与野生苜蓿杂交群体中产生了位点丢失的个体材料,这归因于双亲在该位点上的表现有差异,亲本野生苜蓿具有位点 2,而亲本 AC-3 表现为位点 2 缺失。

表 1 ♀ 野生苜蓿与 ♂AC-3 苜蓿杂交组合  
过氧化物同工酶酶谱特征

| Tab 1 Zymogram of peroxidase allozyme from ♀ the wild alfalfa × ♂AC-3 cross combination |  |      |      |      |      |      |      |      |                        |
|---|--|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|
| 材料<br>Material  | 过氧化物同工酶谱带<br>Zymogram of peroxidase allozyme |      |      |      |      |      |      |      | 谱带数<br>Number of bands |
|   | 1  | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |                        |
| 1   | *  | *    | *    |      | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 2   | *  | *    | *    |      | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 3   | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 4   | *  | *    |      | *    | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 5   | *  |      | *    |      | *    | *    | *    | *    | 6                      |
| 6   | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 7   | *  | *    | *    |      | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 8   | *  | *    | *    |      |      | *    | *    | *    | 6                      |
| 9   | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 10  | *  |      | *    |      | *    | *    | *    | *    | 6                      |
| 11  | *  | *    | *    | *    |      | *    | *    | *    | 7                      |
| 12  | *  | *    | *    | *    |      | *    | *    | *    | 7                      |
| 野生苜蓿<br>The wild alfalfa  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    |      | 7                      |
| 频率 Frequency  | 1.00   | 0.86 | 0.93 | 0.57 | 0.79 | 1.00 | 1.00 | 0.86 |                        |

注: \* 代表有谱带, 以下同  
Note: \* represents peroxidase band, the same below

表 2 ♀ AC-3 与 ♂野生苜蓿杂交组合  
过氧化物同工酶酶谱特征

| Tab 2 Zymogram of peroxidase allozyme from ♀ AC-3 × ♂the wild alfalfa cross combination |  |      |      |      |      |      |      |      |                        |
|---|--|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|
| 材料<br>Material  | 过氧化物同工酶谱带<br>Zymogram of peroxidase allozyme |      |      |      |      |      |      |      | 谱带数<br>Number of bands |
|   | 1  | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |                        |
| AC-3  | *  |      | *    | *    |      | *    | *    |      | 5                      |
| 13  | *  | *    | *    | *    |      | *    | *    | *    | 7                      |
| 14  | *  |      | *    |      | *    | *    | *    | *    | 6                      |
| 15  | *  | *    | *    |      | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 16  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 17  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 18  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 19  | *  | *    | *    | *    |      | *    | *    | *    | 7                      |
| 20  |  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 21  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 野生苜蓿<br>The wild alfalfa  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    |      | 7                      |
| 频率 Frequency  | 1.00   | 0.82 | 1.00 | 0.82 | 0.73 | 1.00 | 1.00 | 0.73 |                        |

表 3 ♀ 爱博苜蓿与 ♂野生苜蓿杂交  
组合过氧化物同工酶酶谱特征

| Tab 3 Zymogram of peroxidase allozyme from ♀ Arriba × ♂the wild alfalfa cross combination |  |      |      |      |      |      |      |      |                        |
|---|--|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|
| 材料<br>Material  | 过氧化物同工酶谱带<br>Zymogram of peroxidase allozyme |      |      |      |      |      |      |      | 谱带数<br>Number of bands |
|   | 1  | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |                        |
| 爱博 Arriba   | *  | *    | *    |      | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 22  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 23  | *  | *    | *    |      | *    | *    | *    | *    | 7                      |
| 野生苜蓿<br>The wild alfalfa  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    |      | 7                      |
| 频率 Frequency  | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 0.50 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.75 |                        |

表 4 ♀ 射手苜蓿与 ♂野生苜蓿杂交组合  
过氧化物同工酶酶谱特征

| Tab 4 Zymogram of peroxidase allozyme from ♀ Archer × ♂the wild alfalfa cross combination |  |      |      |      |      |      |      |      |                        |
|---|--|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|
| 材料<br>Material  | 过氧化物同工酶谱带<br>Zymogram of peroxidase allozyme |      |      |      |      |      |      |      | 谱带数<br>Number of bands |
|   | 1  | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |                        |
| 射手 Archer   | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    |      | 7                      |
| 24  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 25  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    | *    | 8                      |
| 野生苜蓿<br>The wild alfalfa  | *  | *    | *    | *    | *    | *    | *    |      | 7                      |
| 频率 Frequency  | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.50 |                        |

综合 4 个杂交组合的酶谱表现, 所有亲本中, 爱博、射手品种的酶谱表现较好, 酶带数目多, 显色深; 而 AC-3 的酶谱表现最差, 酶带数目少, 显色浅。后代个体中, ♀ 射手苜蓿 × ♂野生苜蓿组合在过氧化物酶谱性状上表现最好, 仅在第 8 条酶带上表现出丢失。父母本之间酶谱表现差异最大的是 AC-3 和野生苜蓿配制的杂交组合, 其正反交后代个体的酶谱表现差异不是很大, 与其他杂交组合相比表现较差。

3 讨论与结论

野生苜蓿产于云南德宏, 由于长期的自然选择, 具有顽强的抗逆性, 对于恶劣的环境条件具有高度的适应性; 射手、爱博是国外栽培种, 具有优良的生物学特性, 农艺性状表现较好; AC-3 为当地的农家品种。根据不同杂交组合过氧化物酶酶谱的分析得知, 亲本在过氧化物酶位点上具有一定的遗传差异, 并在 F<sub>1</sub> 发生了性状分离; 爱博、射手 2 个栽培种比野生种以及 AC-3 的酶谱表现好, 这归因于栽培种在育种过程中的人工选择效应。

对 2 个亲本及其杂交种的酶谱表现进行综合分析, 可以预测该组合在过氧化物酶位点上的配合力高低。AC-3 和野生苜蓿配制的杂交组合, 其正、反交后代个体的酶谱表现差异不是很大, 与其他杂交组合相比表现较差, 表明该组合的 2 个亲本在过氧化物酶上的配合力较差, 很难筛选出酶活力表现为强优势的后代。

野生苜蓿的过氧化物酶酶带数目和浓度与栽培种相比较差。对野生苜蓿生长状况的调查表明, 其生长势、生活力表现等与其他亲本相比表现并不突出, 但其杂交组合后代中有些个体的农艺性状表现却优于亲本。由此证明, 遗传背景差异较大的杂交组合有可能通过遗传物质的交流产生有利的性状重组, 对其进行筛选, 可能获得有价值的育种材料。然而, 仅仅根据某一个性状的表现对育种材料进行评

价很难获得全面、科学的结论,为此,还应进行多种性状的综合分析。

在所配制的杂交组合中,过氧化物同工酶谱带的条数为 5~ 8 条,其中 6,7 两条酶带显色很深,该位点过氧化物同工酶的活性较高。亲本及其后代有 3 条共有酶带。杂交过程中发生了过氧化物酶位点的遗传重组,从而在 F<sub>1</sub>产生了酶谱表现与亲本不同和相同的两类个体。过氧化物酶的遗传背景差异较大的杂交组合有可能通过遗传物质的交流产生有利的性状重组,对其进行筛选,可能获得有价值的育种材料。

参考文献:

[ 1 ] 云锦凤,鲁洪艳,李国瑞. 野生冰草种质资源同工酶遗传多样性分析与评价[J]. 中国草地, 2005, 27( 6 ): 34- 38.

[ 2 ] Jorge González-Astorga, Andrew P Vovides, Andrea Cruz-Angón, *et al.* Allozyme Variation in the Three Extant Populations of the Narrowly Endemic Cycad *Dioon angustifolium* Miq( Zamiaceae) from North-eastern Mexico[ J]. Annals of Botany, 2005, 95( 6 ): 999- 1007.

[ 3 ] 白艳菊,李学湛,吕典秋,等. 应用过氧化物同工酶( POD) 鉴定马铃薯品种及纯度的研究初报[ J]. 杂粮作物, 2005, 25 ( 6 ): 370- 371.

[ 4 ] Yan Ju-qiang, Wang Jing, David Tissue, *et al.* Photosynthesis and seed production under water- deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an arabidopsis ascorbate peroxidase gene[ J]. Crop Science, 2003, 43( 4 ): 1477- 1483.

[ 5 ] 房江育,马学泷. 硅与植物抗逆性研究进展[ J]. 中国农学通报, 2005, 21( 11 ): 304- 306.

[ 6 ] 王中仁. 植物等位酶分析[ M]. 北京: 科学出版社, 1996: 58- 162.