

张杂谷不同生育期同工酶特性研究

郭秀林^{1,3} 张春锋² 王 云¹ 刘子会^{1,3} 赵治海⁴

(1. 河北省农林科学院 遗传生理研究所 河北 石家庄 050051; 2. 河北省农林科学院 河北 石家庄 050051; 3. 河北省植物转基因中心重点实验室 河北 石家庄 050051; 4. 河北省张家口市农科院 河北 张家口 076650)

摘要: 为探索谷子杂种优势形成机理,首次以张杂谷3号、5号和6号及其父母本为材料,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究了不同品种不同生育期酯酶、谷草转氨酶、谷氨酸脱氢酶同工酶酶谱特性。结果表明:张杂谷酯酶同工酶共分离出14条带,杂种和父母本酶谱不同,有互补酶谱和显性酶谱;谷草转氨酶同工酶共分离出7条带,杂种和父母本属于同型酶谱;谷氨酸脱氢酶同工酶只有1条带,属于同型酶谱;不同品种不同生育期酯酶和谷草转氨酶酶带数和酶活性存在差异,酯酶和谷草转氨酶同工酶与杂种优势相关;谷氨酸脱氢酶同工酶与杂种优势关系不明显。

关键词: 张杂谷; 酯酶; 谷草转氨酶; 谷氨酸脱氢酶; 同工酶

中图分类号: S515.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0164-05

Analysis of Isozymes of Different Growing Stages of Hybrid Millet Zhang and Their Parents

GUO Xiu-lin^{1,3} ZHANG Chun-feng² WANG Yun¹ LIU Zi-hui^{1,3} ZHAO Zhi-hai⁴

(1. Institute of Genetics and Physiology Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences Shijiazhuang 050051, China; 2. Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences Shijiazhuang 050051, China; 3. Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province Shijiazhuang 050051, China; 4. Zhangjiakou Academy of Agriculture Sciences Zhangjiakou 076650, China)

Abstract: Three isozymes of esterase(EST) glutamate oxaloacetate transaminase(GOT) and glutamate dehydrogenase(GLD) were performed by means of polyacrylamide gel electrophoresis to study the forming mechanism of heterosis of Foxtail Millet using hybrid Millet Zhang No. 3 5 6 and their parents respectively. The results indicated that the isozyme bands of EST, GOT and GLD were 14, 7 and 1 respectively in hybrid Millet Zhang and their parents. The tested individuals and parents differed in number, Rf activity or width of the EST and GOT bands. Esterase isozyme bands type of hybrid Millets were mainly parental complementary zymogram pattern of both GOT and GLD in hybrid Millets were same as their parents. There is a correlation between the isozymes of patterns of EST and GOT and the formation of heterosis in hybrid Millet Zhang.

Key words: Hybrid Millet Zhang; EST; GOT; GLD; Isozyme

历史上我国谷子种植面积曾达到过1 000万 hm^2 ,是主要粮食作物,为新中国的建立做出过重要贡献,但因为常规谷子产量低,影响了农民种植的积极性,近年来已经严重缩减。由我国首创的“谷子光(温)敏不育两系法”育种技术成功解决了谷子杂优利用的制种难题,使杂交谷子产量高达12 150 kg/hm^2 ,初步实现了杂种谷子的产业化^[1]。

国外只有少数国家对谷子开展研究,日本主要从事一些谷子品种资源的保存工作^[2],美国主要集

中在谷子的分枝性少数特异性状的QTL定位^[3],法国、加拿大则主要开展谷子的近缘野生植物-狗尾草的抗除草剂特性研究^[4],挖掘谷子野生种的有益性状。近年来,随着科学的发展和广大科研工作者对谷子认识的日益深入,国外重新开始投入人力财力研究谷子,尤其是美国于2008年启动了谷子基因组的测序工作。我国是世界上唯一系统研究谷子的国家,谷子杂优利用研究已成为我国谷子研究的亮点。但是,关于谷子杂种优势产生的机理无论从生

收稿日期:2012-08-25

基金项目: 国家科技支撑计划(2011BAD06B00); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(11965517D)

作者简介: 郭秀林(1970-),女,河北康保人,研究员,博士,主要从事作物抗逆生理及分子生物学研究。

理生化的角度还是从分子生物学角度均未见报道。我国在水稻、小麦等自花授粉作物上杂优机理研究认为,杂种优势产生的机理在于基因表达的差异^[5]。这为我们开展谷子杂优机理研究提供了思路。但是,由于水稻、小麦均为 C_3 植物,而谷子属 C_4 植物,其杂种优势产生的机理必然存在着差异。

由于对谷子杂优机理缺乏科学的认识,不能为杂优应用研究提供应有的理论和技术支撑,从而制约了杂种优势利用等应用研究的进一步开展。近年来,国内外学者在小麦、水稻等作物上的研究发现,叶绿素、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、酯酶同工酶等生理指标与杂种优势有关,可用于杂种优势预测^[6-10]。为此,本研究以系列张杂谷为试材,研究酯酶、谷草转氨酶和谷氨酸脱氢酶同工酶酶谱特性,旨在探询与谷子杂优机理形成相关的生理生化指标,从而为谷子杂种优势快速预测提供理论依据和技术指标。

1 材料和方法

1.1 材料及种植

试验选取张杂谷 (*Setaria italica* (L.) Beauv) 3 号、5 号和 6 号(来自同一母本)及其父母本为材料,由张家口市农科院提供。材料于 6 月 27 日播种于河北省农林科学院大河实验站,常规种植,每品种 3 个小区,小区面积 $4 \times 5 \text{ m}^2$,随机区组,基施农家肥。待谷苗长至 3~5 叶时,间苗定苗约 30 万株/hm²。分别于 7 月 26 日、8 月 9 日、8 月 3 日和 9 月 15 日取新展开叶片或功能叶片,混合均匀,每样品称取 0.5 g,锡箔纸包裹,液氮速冻, -70℃ 冰箱储藏备用。

1.2 同工酶分析

1.2.1 样品制备 提取时 0.5 g 叶片加入 2 mL 酶抽提液,充分研磨。抽提液为 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.5),内含 0.2% 的巯基乙醇和 10% 的蔗糖。研磨匀浆后在 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清液保存于 -20℃ 冰箱中待用。

1.2.2 电泳 上清酶液进行垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度为 8%,浓缩胶浓度为 3%,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 值 8.7)。每样品槽加样 20 μL ,用溴酚蓝作前沿指示剂。HX1050 恒温循环器保持电泳槽 4℃ 环境,稳压,浓缩胶 100 V,电泳约 30 min,分离胶 200 V,电泳约 3 h。

1.2.3 染色 室温染色,待酶带清晰后,用蒸馏水漂洗 2~3 次,7% 乙酸脱色固定,用 BIO-RAD 凝胶成像拍照。染色液组成如下:

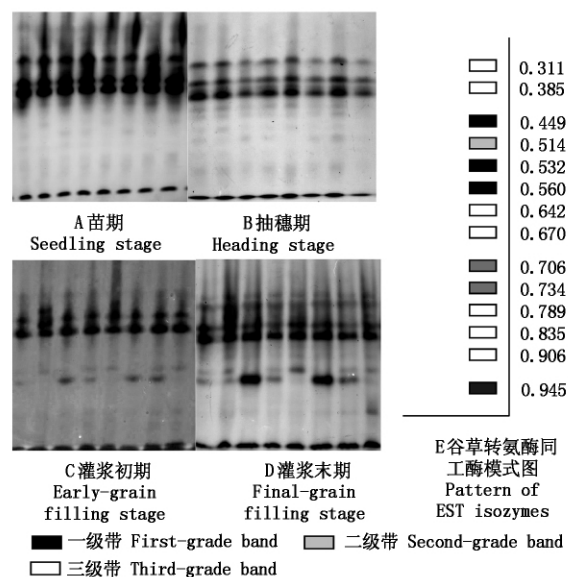
酯酶: 坚固蓝 RR 盐 75 mg, pH 值 6.4 磷酸缓冲

液 75 mL, 2% β -醋酸萘酯 2.5 mL。谷草转氨酶: pH 值 8.0 Tris-HCl 缓冲液 120 mL, L-天冬氨酸 120 mg, α -酮戊二酸 120 mg, 吡哆醛-5-磷酸 3 mg, pH 值大于等于 4, 室温下浸泡染色胶 15 min, 然后加固蓝 BB 240 mg。30 min 左右显出蓝色条带。谷氨酸脱氢酶: pH 值 9.2 磷酸缓冲液 150 mL, L-谷氨酸 7 g, NAD 0.15 g, 染色前加 NBT 0.05 g, PMS 0.012 5 g。黑暗处温育胶,直到蓝带显示。

2 结果与分析

2.1 张杂谷及其父母本酯酶同工酶谱特性

图 1 显示,张杂谷酯酶同工酶共分离出 14 条带, Rf 分别为 0.311, 0.385, 0.449, 0.514, 0.532, 0.560, 0.642, 0.670, 0.706, 0.734, 0.789, 0.835, 0.906, 0.945, 其中 Rf 0.706 条带在母本中不表达,而 Rf 0.734 条带在杂 3 父本中微弱表达,在杂 5 和杂 6 父本中不表达。按酶谱颜色和宽度可将所有酶带分为三类:一级带、二级带和三级带。一级带颜色最深,宽度最大,酶活性也最强;二级带次之;三级带颜色最浅,宽度最小,酶活性也相对较弱。Rf 0.532 和 Rf 0.560 条带表达量较大,属于一级带; Rf 0.449 表达量次之,属于二级条带;其余的属于三级条带,在所有三级条带中, Rf 0.734 条带随生育期延长而由弱变强。



样品顺序为: 杂 3、杂 3 父本、母本、杂 5、杂 5 父本、母本、杂 6、杂 6 父本。
Sample sequence: Hybrid Zhang No. 3, Male of hybrid Zhang No. 3, Female, Hybrid Zhang No. 5, Male of hybrid Zhang No. 5, Female, Hybrid Zhang No. 6, Male of hybrid Zhang No. 6.

图 1 不同生育期所有杂谷品种酯酶同工酶谱特性

Fig. 1 Characteristics of leaf EST isozymes in all varieties of hybrid millit of different growing stages

就不同生育期一级和二级带表达活性而言(图 2), 苗期杂 5 和杂 6 表达活性较高, 抽穗期杂种活性

均高于父母本,母本弱于父本,到灌浆初期,杂5和杂6表达活性仍高于父本,至灌浆末期,杂种酶活表达优势不明显,杂5和杂6及其父本的表达活性明

显低于杂3,但母本仍保持较高活性,且Rf 0.734条带呈现出较高的表达活性。其他三级条带表达变化不明显。

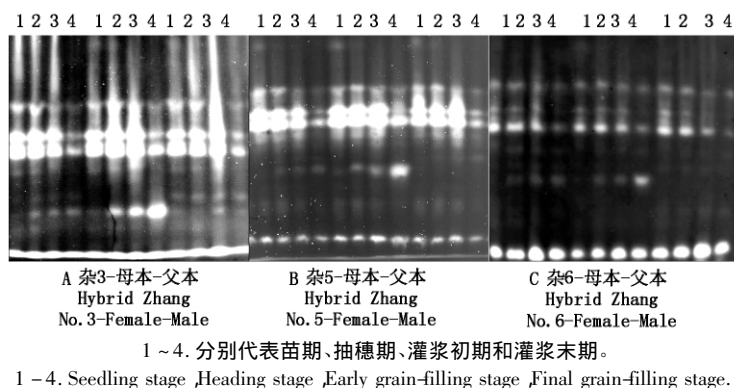


图2 不同杂种组合不同生育期酯酶同工酶活性比较

Fig. 2 Comparison of EST isozymes activity of different hybrid combination of different growing stages

不同生育期比较发现(图2):母本一级和二级条带活性由强到弱顺序为灌浆初期、抽穗期、苗期、灌浆末期;杂种基本表现为抽穗期最强,灌浆末期最弱;杂3和杂5父本表现为灌浆初期最强、末期最弱,而杂6父本随生育期延长而活性逐渐减弱。特别是,在所有父本中Rf 0.706条带均随生育期延长活性增强,同样,Rf 0.734条带在杂种和母本中活性也随生育期延长而明显增强。

2.2 张杂谷及其父母本谷草转氨酶同工酶谱特性

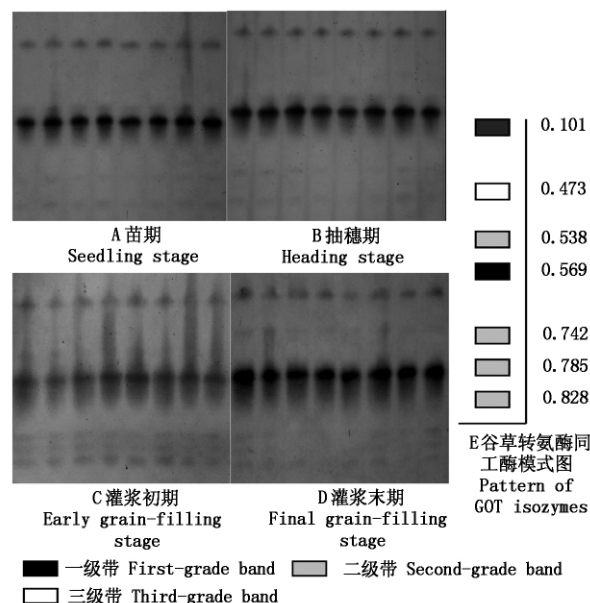
图3显示,张杂谷及其父母本谷草转氨酶同工酶共分离出7条带,Rf分别为0.101, 0.473, 0.538, 0.569, 0.742, 0.785, 0.828。其中Rf0.569条带表达量大,条带清晰,属于一级带;Rf0.101表达量次之,属于二级条带;其余的表达很弱,属于三级条带。依据酶带相对迁移率大小和酶带集中程度,酶谱从负极(点样孔端)到正极(分离胶底部)明显分为3个区,所有条带在供试品种中均出现。杂种及其父母本属于同型酶谱。

就一级带表达活性而言,苗期除杂6表达活性稍强外,其他差异不明显;抽穗期杂交种和母本较强,优于父本,杂5组合弱于杂3和杂6;灌浆初期杂交种均表现出较强活性,尤其是杂5组合;至灌浆末期,杂5和杂6组合均减弱,杂3仍保持较强活性。

不同生育期比较,杂交种和母本酶活由强到弱顺序基本表现为灌浆初期和抽穗期高于苗期和灌浆末期,杂3和杂6父本也表现类似趋势,而杂5父本随生育期进程酶活降低不明显。

2.3 张杂谷及其父母本谷氨酸脱氢酶同工酶谱特性

图4显示,张杂谷及其父母本谷氨酸脱氢酶同工酶只有1条带,不同品种及不同生育期,酶条带表达强弱没有明显差异。



样品顺序: 杂3、杂3父本、母本、杂5、杂5父本、母本、杂6、杂6父本。图4同。

Sample sequence: Hybrid Zhang No. 3, Male of hybrid Zhang No. 3, Female, Hybrid Zhang No. 5, Male of hybrid Zhang No. 5, Female, Hybrid Zhang No. 6, Male of hybrid Zhang No. 6. The same as Fig. 4.

图3 所有杂谷品种不同生育期谷草转氨酶同工酶谱特性

Fig. 3 Characteristics of leaf GOT isozymes in all hybrid millit varieties of different growing stages

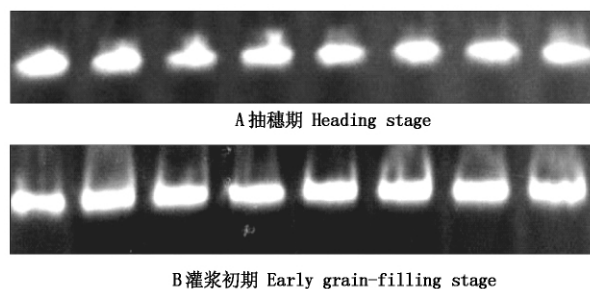


图4 所有杂谷品种谷氨酸脱氢酶同工酶谱特性

Fig. 4 Characteristics of leaf GLD isozymes in all hybrid millit varieties of two growing stages

3 讨论

张家口市农科院是最早开展杂交谷子研究的单位之一,目前,张杂谷系列品种已经大面积用于生产。杂交谷子的推广已经引起国际农业组织的高度重视,联合国粮农组织已将我国杂交谷子引到塞内加尔、尼日利亚、贝宁等9个非洲国家试种,取得初步成效,这对解决粮食紧缺问题具有重大意义。但是,关于谷子杂种优势基础理论研究方面属于空白。

同工酶是一种特异蛋白质,其差异主要由基因的差异决定。它不仅是一种鉴定外源遗传物质的有效手段,而且还能够揭示亲本的遗传物质在杂种中的遗传特性^[11]。同时,同工酶技术具有快速、便捷、不易受环境条件影响等优势,因此,同工酶已经被广泛用于杂交育种、品种资源考查和遗传基因定位等方面^[12-14]。人们对杂种优势预测的生理系列化指标的研究主要偏重于同工酶的研究。在杂交水稻中研究的同工酶有酯酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶、谷草转氨酶、异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶等,其中以酯酶研究较多^[15-17]。结果表明,水稻杂种优势的酯酶同工酶具有多型性,有互补酶谱、显性酶谱和独特酶谱,均与杂种优势有关,另外亦有优势杂种具有同型酶谱。朱英国^[7]研究也表明,不同同工酶与水稻杂种优势相关性大小不同,以酯酶同工酶相关性最大。小麦上的研究认为,双亲互补匀浆酯酶同工酶,基本上能反映 F_1 酶谱类型,可以预测试配组合的优势^[18]。关于谷草转氨酶同工酶的报道较少。Chen等^[19]对7个大粒组荞麦进行谷草转氨酶同工酶研究结果发现,谷草转氨酶同工酶在同种不同品系之间很少有差异,但是不同种间表现明显的差异。彭建^[20]对24份栽培和野生荞麦种子的谷草转氨酶同工酶进行研究结果表明,谷草转氨酶同工酶酶带共8条,不同物种的酶带数为3~6条,甜荞和苦荞分别有3条和4~5条,其特征谱带分别为GOT22和GOT21。谷氨酸脱氢酶同工酶简报不多。

本研究结果表明,张杂谷酯酶同工酶共分离出14条带,其中12条在所有品种中均表达,而Rf 0.706条带在母本中不表达,Rf 0.734条带在父本中微弱表达或不表达。表明张杂谷酯酶同工酶有互补酶谱和显性酶谱。在所有条带中,一级带只有2条,二级条带1条;其余的表达量较弱,均属于三级条带。不同于其他三级条带,Rf 0.734条带随生育期延长而表现出由弱变强的趋势,具体功能还需进一步研究。

从苗期到灌浆初期,杂种一级和二级带表达活

性均较高,初步表明,酯酶同工酶与杂种优势存在相关性。杂种基本表现为抽穗期最强、灌浆末期最弱,而父、母本表现为灌浆初期最强;杂种特性来自于父、母本双方,尤其是Rf 0.706和Rf 0.734条带随生育期表达特性变化充分证明了这一点。

张杂谷及其父母本谷草转氨酶同工酶共分离出7条带,一级、二级条带各一条;其余均属于三级条带。杂种表现为同型酶谱。就一级带表达活性而言,从抽穗期开始杂种表现出优势,尽管不同杂种活性出现最强的时期有所差异,但基本上表现为灌浆初期和抽穗期高于苗期和灌浆末期。表明谷草转氨酶同工酶与谷子的杂种优势也相关。

谷氨酸脱氢酶是细胞中L-谷氨酸的合成过程的关键酶之一。张杂谷及其父母本谷氨酸脱氢酶同工酶只分出1条带,杂种表现为同型酶谱,不同品种及不同生育期,酶条带表达强弱没有明显差异,相对而言比较保守。表明谷氨酸脱氢酶同工酶与杂种优势关系不明显。

参考文献:

- [1] 赵治海,许巍生,朱学海. 谷子杂种优势利用的途径和前景[J]. 张家口农专学报, 2000(1): 1-2.
- [2] Hirano R, Naito K, Fukunaga K, et al. Genetic structure of landraces in foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) revealed with transposon display and interpretation to crop evolution of foxtail millet[J]. Genome, 2011, 54(6): 498-506.
- [3] Doust A N, Devos K M, Gadberry M D, et al. Genetic control of branching in foxtail millet[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(24): 9045-50.
- [4] Laplante J, Rajcan I, Tardif F J. Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*[J]. Theor Appl Genet, 2009, 119(4): 577-85.
- [5] 魏亦勤, 张改生, 李树华, 等. Ven-K型小麦雄性不育系春性 F_1 杂种的优势表现及与叶绿素含量和同工酶谱的关系[J]. 西北植物学报, 2001, 21(6): 1092-1102.
- [6] 黄永芬, 汪清胤, 王海廷. 从番茄过氧化物酶同工酶表型差异探讨杂种优势机理[J]. 遗传学报, 1985, 12(3): 193-199.
- [7] 朱英国, 张卫国. 杂交水道苗期同工酶与杂种优势关系的研究[J]. 作物学报, 1987, 13(2): 89-95.
- [8] 李艳波. 作物杂种优势机理和优势预测的研究[J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2004, 2: 83-85.
- [9] 林宝刚, 张明龙, 张龙. 甘蓝型油菜杂种优势和过氧化物酶的关系分析[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 36-39.

- [10] 范淑英, 吴才君, 曲雪艳, 等. 从芸薹属作物同工酶和蛋白质表型差异探讨杂种优势机理 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(3): 323 – 326.
- [11] Brown A H D, Weir B S. Measuring genetic variability in plant population [M]// Tanksley S D, Orton T J. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983: 219 – 239.
- [12] 吴红美, 徐跃进, 万正杰. 甘蓝型油菜 (Eru CMS) 与甘蓝种间杂种的同工酶和蛋白质分析 [J]. 植物科学学报, 2011, 29(1): 87 – 92.
- [13] 马志民, 刘兰服, 张松树. 甘薯远缘杂交强优势组合同工酶分析 [J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 176 – 179.
- [14] Chaparro J X, Weiner D J, Malley D, et al. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme and RAPD markers in peach [J]. Theor Appl Genet, 1994(87): 805 – 815.
- [15] 朱 鹏, 孙国荣, 等. MDH 和 GDH 活性与水稻杂交优势预测 [J]. 武汉大学学报, 1991(4): 89.
- [16] 刘文华. 杂交水稻及三系在发育过程中的脂酶同工酶比较研究 [J]. 武汉植物学研究, 1987, 5(3): 267.
- [17] 李明爽, 傅洪拓, 龚永生, 等. 杂种优势预测研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 117 – 122.
- [18] 白丽荣, 刘植义. 细胞匀浆互补法结合同工酶谱法预测 T 型小麦杂种优势的初步研究 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 1999, 23(3): 397 – 401.
- [19] Chen Qing Fu, Sai L K Hsam, Friedrich J Zeller. A Study of Isozyme and Interspecific Hybridization on Big-A-chene Group of Buckwheat Specis (*Fagopyrum*, Polygonaceae) [J]. Crop Sciences, 2004, 44: 1511 – 1518.
- [20] 彭 建, 陈庆富. 大野莽种子中的谷草转氨酶同工酶研究 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(3): 9 – 11.