

## 空间环境对苜蓿叶片过氧化物同工酶的影响

李 红<sup>1</sup>, 李 波<sup>2</sup>, 杨 墾<sup>1</sup>

(1.黑龙江省畜牧研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161000; 2.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** 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对经由返回式科学与技术试验卫星搭载苜蓿种子, 地面种植后筛选的 47 株变异苜蓿株系的叶片, 进行过氧化物同工酶的分析。结果表明: 空间诱变苜蓿株系和对照苜蓿的过氧化物酶同工酶带数和带级各不相同, 酶活性明显增强或减弱, 空间环境能引起苜蓿过氧化物同工酶的变化。

**关键词** 空间环境; 苜蓿; 过氧化物同工酶

## Influence of Space Environment on Peroxidase Isozyme of Alfalfa Leaves

LI Hong<sup>1</sup>, LI Bo<sup>2</sup>, LI Xue-ting<sup>1</sup>, YANG Wei-ran

(1.Animal Science Institute of Heilongjiang, Qiqihar 161000, China;

2.School of Life Science and Agroforestry, Qiqihar university ,Heilongjiang Qiqihar 161006 China)

**Abstract:** The seeds of Alfalfa were loaded by return type science and technology experiment satellite, In this paper, POD isoenzymes of 47 variant strains leaves of Alfalfa in the ground planted were analyzed by SDS-PAGE. The results showed: Mutation Strains and control Alfalfa peroxidase existence difference bands and bands class. Enzyme activity was significantly enhanced and weakened. Space environment can cause peroxidase isozyme changes of Alfalfa.

**Keywords:** Space environment; Alfalfa; Peroxidase Isozyme

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是豆科苜蓿属多年生草本植物, 是一种豆科牧草, 它具有产量高, 牲畜用的饲料利用价值高, 适口性好的优点。自 1987 年以来, 中国利用卫星搭载技术已经诱变育成一系列高产、优质、多抗的作物新品种、新品系及新种质。

同工酶是受基因控制的一种酶的多分子形式。其存在于植物体的任何部位。参与植物体内所有代谢过程。基因改变的微小的差别都可在同工酶中反映出来。在生物的种群间, 同工酶的差异是可以反映遗传基础差异的。针对同工酶进行的研究可以用来阐明卫星搭载苜蓿株系间的差异性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

2008 年收获的紫花苜蓿龙牧 801 种子于 2008 年 10 月 15 日~11 月 2 日期间, 经由返回式科学与技术试验卫星搭载, 经过 17d 的空间诱变处理后返回地面, 于 2010 年 5 月在齐齐哈尔大学生物园实验基

## 第六届中国苜蓿发展大会

地种植。经两年的地面生长后，以形态上初步筛选的47份空间诱变苜蓿株系和未搭载的苜蓿（对照）的叶片为材料，材料编号见表1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品制备

分别取0.5g相同部位的幼嫩叶片，在冰浴中用pH=8.0 Tris-HCl样品提取液3ml进行匀浆研磨后，12000 rpm 离心10 min，上清液于-20℃冰箱中备用。

#### 1.2.2 聚丙稀酰胺凝胶制备

采用不连续垂直板聚丙稀酰胺凝胶电泳，分离胶浓度7%，浓缩胶浓度3%。

#### 1.2.3 电泳

起始电压调至100 V，当溴酚蓝到达下层分离胶时电压调至200V，待溴酚蓝移至距玻板下端1.0cm处停止电泳。在4℃冰箱中4~5h。用0.1%溴酚蓝作前沿指示剂，待指示剂离板底1cm时停止电泳。电极缓冲液为Tris-Gly 缓冲液(pH=8.3)。

#### 1.2.4 染色

过氧化物酶(POD)用醋酸联苯胺染色液，于室温下显色5~10min，即得到POD同工酶的蓝色酶谱。

#### 1.2.5 数据分析

用扫描仪对胶片进行扫描，利用BandScan5.0对图片进行分析酶带，根据酶谱计算迁移率 $R_f$ 。

$$R_f = r_i/R$$

式中， $r_i$ -从“电泳泳道”的点样点到电泳条带的距离； $R$ -从“电泳泳道”的点样点到溴酚蓝条带的距离。同工酶聚类分析

参照Sheath和Sokal于1973年的报道，根据任何2份材料同工酶酶谱相似值的估算，可知2份材料之间的相似性系数。

相似性系数=两品种间共同具有的酶带数/两品种酶带总数。

表1 供试苜蓿单株材料编号

编号	单株	编号	单株	编号	单株	编号	单株
1	CK	13	5L-12	25	2L-6	37	4L-7
2	1L-4	14	3L-12	26	2L-12	38	3L-9
3	2L-1	15	6L-9	27	2L-2	39	7L-1
4	1L-1	16	3L-8	28	3L-10	40	7L-6
5	8L-11	17	5L-7	29	8L-12	41	3L-3
6	6L-1	18	6L-6	30	8L-8	42	5L-13
7	5L-11	19	3L-13	31	5L-1	43	3L-6
8	6L-5	20	7L-5	32	4L-1	44	7L-13
9	5L-9	21	6L-11	33	4L-13	45	1L-5
10	5L-4	22	1L-3	34	5L-5	46	3L-7
11	8L-10	23	5L-10	35	8L-9	47	5L-6
12	2L-8	24	2L-9	36	2L-5	48	8L-1

## 2 结果与分析

### 2.1 POD 的酶谱分析

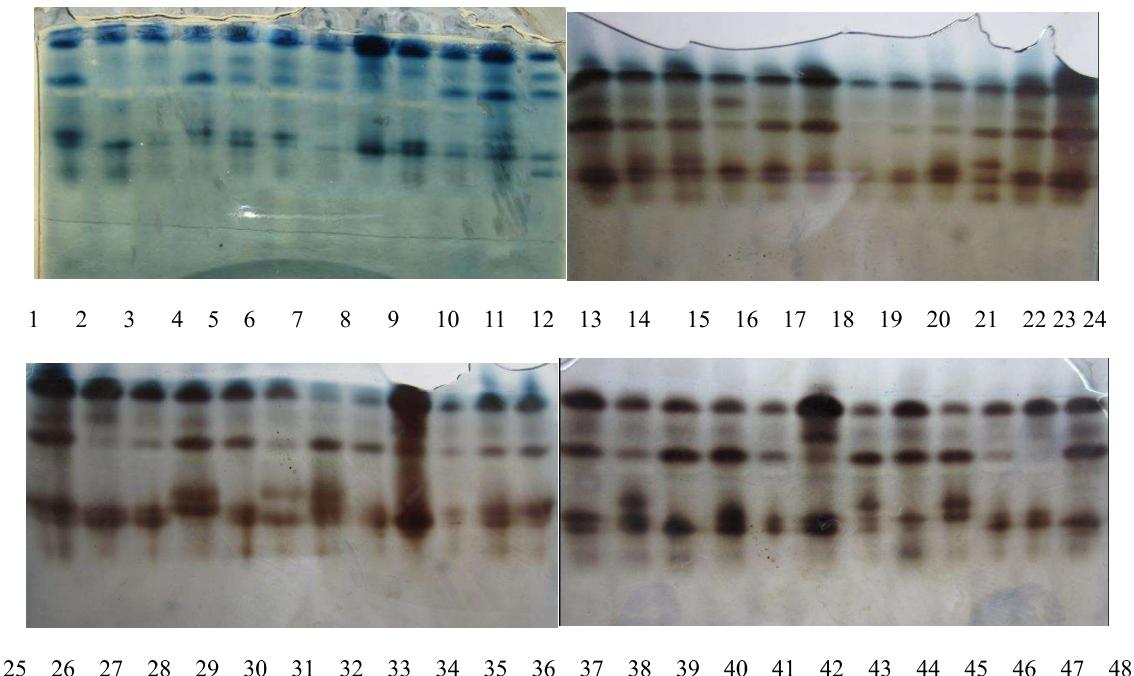
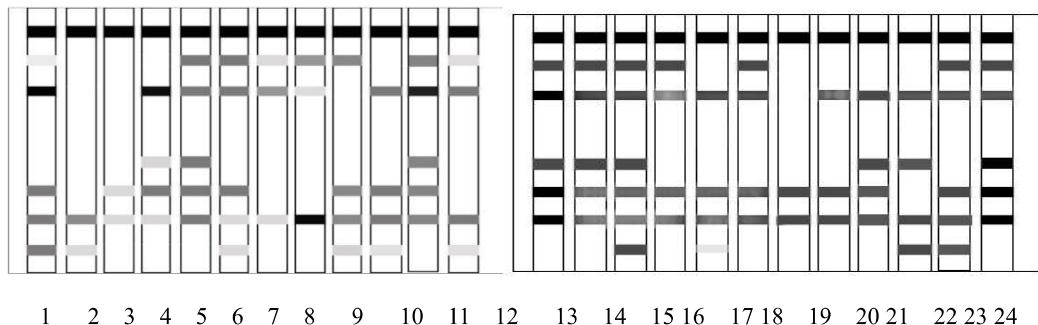


图 1 苜蓿株系的 POD 同工酶电泳图谱

供试的 48 份苜蓿株系的过氧化物同工酶电泳图谱和酶谱模式图见图 1 和 2。从图 2 可以看出，各卫星搭载苜蓿单株的酶带数量、位置、酶活强弱各有不同。其中酶带数最多有 7 条，最少有 3 条。其中株系 6L-5 表现出了一条与对照明显不同的超强的特征酶带，株系 1L-4 较对照缺失 3 条酶带，株系 3L-13 较对照明显缺失第 3 条酶带，株系 3L-8 在 A 区 (0.06~0.18) 展现的酶带位置和酶带强弱程度明显和对照不同。这些特征酶带和差异酶带的显现说明了空间环境对苜蓿过氧化物酶的表达产生了影响。



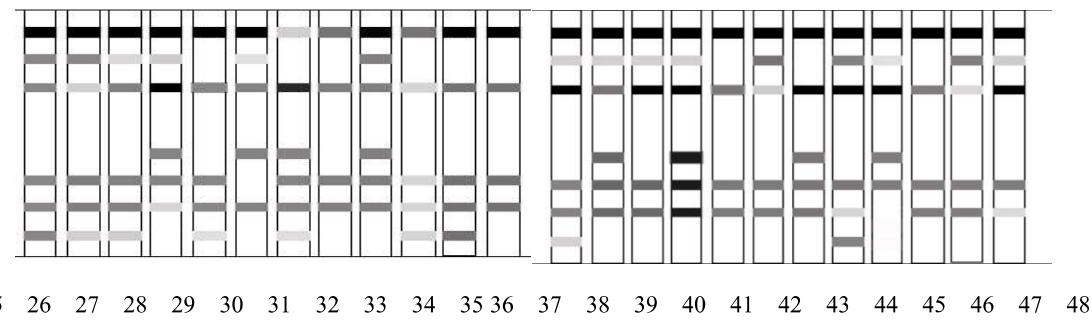


图 2 苜蓿株系 POD 同工酶酶谱模式图

注：酶带由弱至强顺序依次为：

根据酶带的特征，计算从负极到正极按迁移率 ( $R_f$ =酶带迁移的距离/溴酚蓝迁移的距离)，见表 2，按特定可划分成 3 个区：A 区 (0.06~0.18)，B 区 (0.18~0.28)，C 区 (0.28~0.43)。其中酶带数量较多、活性较强、分布较集中的是 C 区。而 B 区没有酶带出现。

表 2 POD 同工酶谱带迁移率

株系	酶带数及迁移率			总酶带 (条)
	A 区 (0.06~0.18)	B 区(0.18~0.28)	C 区(0.28~0.43)	
1	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
2	1(0.06)	0	2(0.35;0.43)	3
3	1(0.06)	0	2(0.32;0.35)	3
4	2(0.06 ,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	5
5	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
6	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(;0.32;0.35;0.43)	6
7	3(0.06,0.12,0.18)	0	1(0.35)	4
8	3(0.06,0.12,0.18)	0	1(0.35)	4
9	2(0.06,0.12)	0	3(0.32;0.35;0.43)	5
10	2(0.06,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	5
11	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
12	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.35;0.43)	5
13	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
14	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
15	3(0.06,0.12,0.18)	0	4(0.28;0.32;0.35;0.43)	7
16	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.32;0.35)	5
17	2(0.06 ,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	5
18	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.32;0.35)	5
19	1(0.06)	0	2(0.32;0.35)	3
20	2(0.06,0.18)	0	2(0.32;0.35)	4

21	2(0.06,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	5
22	2(0.06, 0.18)	0	3(0.28; 0.35;0.43)	5
23	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
24	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
25	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
26	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
27	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
28	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
29	2(0.06, 0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	5
30	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.28; 0.35)	5
31	2(0.06, 0.18)	0	4(0.28;0.32;0.35;0.43)	6
32	2(0.06, 0.18)	0	2(0.32;0.35)	4
33	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
34	2(0.06, 0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	5
35	2(0.06, 0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	5
36	2(0.06, 0.18)	0	2(0.32;0.35)	4
37	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
38	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
39	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.32;0.35)	5
40	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	6
41	2(0.06, 0.18)	0	2(0.32;0.35)	4
42	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.32;0.35)	5
43	2(0.06, 0.18)	0	3(0.28;0.32;0.35)	5
44	3(0.06,0.12,0.18)	0	3(0.32;0.35;0.43)	6
45	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.28;0.32)	5
46	2(0.06, 0.18)	0	2(0.32;0.35)	4
47	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.32;0.35)	5
48	3(0.06,0.12,0.18)	0	2(0.32;0.35)	5

## 2.2 同工酶聚类分析

通过各株系所具有的酶带数，计算出相似性系数，相似性系数在0~1之间，相似性系数愈小，说明两品种间差异越明显<sup>[29]</sup>。利用SPSS17.0软件进行聚类分析，对照和47份卫星搭载苜蓿株系的相关性系数见表3，筛选出相关性系数大于0.445的7株苜蓿株系。

## 3 讨论

同工酶是基因表达的产物，是植物系统分类学研究的重要工具。其酶带的多少，迁移率的大小，

## 第六届中国苜蓿发展大会

都是由结构基因所控制的。采用同工酶分析法对物种进行分析能较为客观的反映物种内的遗传差异，是一种较为方便、有效的手段。并且同工酶可以较直接的反应出植物间某些基因的异同和受到的诱变，虽然相对于遗传信息载体 DNA 水平的标记，同工酶所能反映出的遗传变异并不能完全代表差异。但同工酶作为生化水平的标记，反映的是遗传信息载体 DNA 所编码的蛋白质差异，也就是表型差异的一种，并且其操作相对于 DNA 来说比较简单，适合于大量的植物差异筛选<sup>[1]</sup>。

本实验中，对 47 株经卫星搭载的苜蓿株系进行了过氧化物同工酶的分析。大部分的过氧化物同工酶酶谱都与地面对照不同，同工酶受基因调控，空间环境会改变基因的结构和功能，进而表现在过氧化物同工酶上，所以本实验通过过氧化物同工酶作为形态指标后的第二步筛选方法，如果酶谱较地面对照差异明显，则说明其受到的空间诱变效果越强，如果酶谱较地面对照相似，则说明其受空间环境的影响较小，通过过氧化物同工酶酶谱的分析可以发现，大部分的株系都有酶带的增加和缺失、酶活性的增强和减弱，卫星搭载苜蓿株系 6L-9 较对照增加了一条条带，卫星搭载苜蓿株系 1L-4 较对照缺失了 3 条条带，这些都反应出了空间诱变的结果，并且证明了酶是受基因调控的一种蛋白质。刘润堂等研究发现，近缘品种间随着进化程度的提高过氧化物同工酶酶带条数有增加的趋势<sup>[2]</sup>。但王秀伶等的研究结果于之恰恰相反，她们发现进化品种叶片的过氧化物同工酶带数反而要少于普通品种的酶带数。本研究中卫星搭载苜蓿单株 1L-4 同工酶酶谱仅表现出 3 条条带，但其却是经卫星搭载后长势最好的，这和王秀伶等的研究结果是一致的<sup>[3]</sup>。有些株系酶带较地面对照明显增强，卫星搭载苜蓿株系 6L-5 酶带亮度显著高于对照，说明其酶活显著增强，说明其需要比正常株系更多的酶来清除过多的活性氧来维持正常的细胞功能。形态上此株长势低矮，叶片黄绿等特征。有研究表明当植物受到空间的强烈辐射时，其体内的过氧化物酶活性也表现出显著增加的特征。这与本实验的研究也是一致<sup>[4]</sup>。

同工酶是植物体内重要的酶之一，它参与了植物体内许多的生理生化反应，本研究结果表明，当苜蓿种子经空间环境的高辐射，微重力，低温等极端环境诱变后，过氧化物同工酶酶带和酶活强弱都有显著变化，这是植株适应的标志，通过过氧化物同工酶酶的筛选和对酶谱的分析可以进一步探讨空间环境对植物诱变的机制<sup>[5]</sup>。

表 3 卫星搭载株系与地面对照的相关性系数

株系	相关性系数	株系	相关性系数
对照	0. 000	2L-2	0. 340
6L-5	0. 490	3L-10	0. 340
1L-4	0. 445	5L-1	0. 340
2L-1（死亡）	0. 445	4L-13	0. 340
3L-13	0. 445	7L-6	0. 340
7L-5	0. 445	4L-1	0. 309
1L-1	0. 445	5L-4	0. 297
5L-9	0. 445	6L-6	0. 297
3L-8	0. 445	2L-12	0. 297
5L-7	0. 404	8L-12	0. 297

1L-3	0. 404	5L-5	0. 297
8L-8	0. 404	8L-9	0. 297
3L-9	0. 404	7L-1	0. 297
3L-6	0. 404	5L-13	0. 297
1L-5	0. 404	8L-1	0. 297
5L-6	0. 404	6L-9	0. 289
5L-11	0.360	6L-10	0.250
2L-5	0.360	5L-12	0.250
3L-3	0.360	3L-12	0.250
3L-7	0.360	6L-11	0.250
8L-11	0.340	5L-10	0.250
8L-10	0.340	2L-9	0.250
2L-8	0.340	4L-7	0.250
2L-6	0.340	7L-13	0.250

#### 4 结论

通过对差异带、特征带和迁移率的分析和计算，表明了卫星搭载对苜蓿过氧化物同工酶的表达产生了影响。通过聚类分析，得出了卫星搭载苜蓿各株系的相似性系数，并通过相似性系数筛选出7株差异较大的卫星搭载株系，进行进一步筛选。

#### 参考文献（略）