

大豆叶片过氧化物酶及其同工酶的研究*

刘学军 苗以农

张红缨

(东北师范大学生物系)

(吉林大学酶工程实验室)

提 要

不同生育期大豆叶片过氧化物酶活性和同工酶谱存在着明显的品种间差异。新品种较老品种过氧化物酶活力高比活较低;高蛋白与低蛋白品种相比,高蛋白品种过氧化物酶活力较高,比活较低;结荚期,随植株节位降低,叶片过氧化物酶比活、活力和同工酶活性均呈增强趋势,但最下部老叶过氧化物酶活力和同工酶活性降低;未展开叶较展开叶的过氧化物酶同工酶谱阳极区酶活性所占比例较大;中部节位叶片酶谱清晰,条带数多,适于品种间比较。

关键词 大豆;节位;过氧化物酶;同工酶

植物体内过氧化物酶活性及其同工酶谱随着细胞分化、组织器官及植株的生长、成熟和衰老发生规律性的变化(王熊等 1981,唐锡华 1983,李继耕等 1980,童哲 1980),据推测该酶可能与某些植物的发育过程关系密切,(Verma 等 1970,Gaspar 等 1972,Wuchok 等 1974,Thorpe 1978)。

关于过氧化物酶在大豆分类及抗性方面的研究已有报导(Buttery 1968,宋英淑 1986)。大豆个体发育过程中,不同器官的过氧化物酶活性及其同工酶谱有明显差异(Brim 1969,李云荫 1984)。

同工酶是较好的遗传信息表达标志,它确定着品种间的差异,调控着植物的代谢、生长、发育过程(梅慧生 1980)。

本文比较分析了大豆植株不同生长发育时期及不同节位叶片过氧化物酶活力、比活及其同工酶谱的变化;比较品种间差异,以便为大豆遗传育种及生理生化研究提供有用的资料。

* 国家自然科学基金资助项目内容之一。

吉林省农科院大豆所提供大豆品种表示感谢。

本文于1990年4月10日收到。This paper was received on April 10, 1990.

材料和方法

供试大豆材料:三、四十年代推广品种金元1号、小金黄、大白眉;六十年代推广品种吉林13号;七、八十年代推广品种吉林20、吉林21;此外还有高蛋白品种永吉大粒(蛋白含量为48.0%)、低蛋白含量品种吉林3号(蛋白含量为40.0%)、结瘤和不结瘤 Harosoy 品系,以及辽豆3号、铁丰18号、阿姆索和7622-4、7335-4等有亲缘关系的品种(系)。

试验是于1987-1988两年进行的。每年4月末将上述品种栽培于东北师范大学校园生物系试验田中,管理同一般农田。

酶提取液的制备:取正常生长植株叶片,去中脉,0°C-4°C冰箱内放置半小时,剪碎混匀,准确称取200mg,加入4ml预冷的0.1mol/L Tris-HCl(pH8.0)样品提取液(内含20%蔗糖),冰浴研磨,4°C下10,000 γ 离心15分钟,上清液放入冰箱备用,每次采样重复三次。

凝胶电泳及染色:用聚丙烯酰胺凝胶双垂直板法。分离胶浓度为7.5%,缓冲液为0.5mol/L Tris-HCl系统,pH8.9,电极缓冲液为Tris-Gly系统,pH8.3。每孔上样量为50 μ l。整个电泳过程在0°C-4°C冰箱内进行。起始电压为100V,半小时后调至200V,约4-5小时完成。凝胶过氧化物酶同工酶染色采用改良的醋酸联苯胺法,并略有改动,即醋酸联苯胺溶液为1.6g联苯胺+14ml冰醋酸+106ml蒸馏水,染色时用量为30ml,0.6% H_2O_2 用量为10ml。室温染色约10分钟左右。

过氧化物酶活性的测定:参照华东师大植物生理实验指导(1980)方法进行。酶活力以 $\Delta OD_{(470nm)} g^{-1} F. W \min^{-1}$ 为单位,酶比活以 $\Delta OD_{(470nm)} mg^{-1} Pro. \min^{-1}$ 为单位。每样重复三次。与此同时,采用考马斯亮兰G-250法(李琳等1980)测定可溶性蛋白含量。

过氧化物同工酶谱测定:染色后的凝胶拍照后于日本-岛津CS-910双波长薄层扫描仪上取470nm作原位透射扫描测定,以酶带扫描峰的峰面积代表同工酶的活性。

实验结果

一、过氧化物酶活性

1. 不同生育期

随着生育进程,大豆植株上部充分展开叶(上数第4节位叶片)的过氧化物酶活力及比活均呈明显的增强趋势(表1、表2),特别是鼓粒末期,过氧化物酶比活比前几期增加了几倍。

2. 不同品种

除花期新老品种相差不大外,其它各生育期新品种的过氧化物酶活力均高于老品种(表1);鼓粒末期之前,新品种的过氧化物酶比活高于老品种(表2)。

表1 不同品种大豆不同生育期过氧化物酶活力

Table 1 Peroxidase activity of different soybean cultivars in different developmental stages

	苗期 Seedling	分枝期 Branching	花期 Flowering	鼓粒初期 Early pod filling	鼓粒末期 Late pod filling	平均 Average
金元1号 Jin Yuan 1	51.6	73.2	123.6	430.8	430.8	222.0
小金黄 Xiao Jin Huang	50.4	72.0	127.2	417.6	457.2	224.9
大白眉 Da Bai Mei	55.2	78.0	105.6	328.8	385.2	190.6
平均 Average	52.4	74.4	118.8	392.4	424.4	212.5
吉林13 Ji Lin 13	67.2	91.2	132.0	446.4	516.0	250.6
吉林20 Ji Lin 20	58.2	67.2	106.8	555.6	548.4	267.2
吉林21 Ji Lin 21	64.8	88.8	106.8	468.0	524.4	250.0
平均 Average	63.4	82.4	115.1	490.0	529.6	256.1

表2 大豆不同品种不同生育期过氧化物酶比活

Table 2 Peroxidase specific activity of different soybean cultivars in different developmental stages

	苗期 Seedling	分枝期 Branching	花期 Flowering	鼓粒初期 Early pod filling	鼓粒末期 Late pod filling
金元1号 Jin Yuan 1	1.89	3.86	5.74	10.66	26.05
小金黄 Xiao Jin Huang	2.06	3.54	5.63	9.85	29.01
大白眉 Da Bai Mei	2.46	4.04	5.56	10.67	44.90
平均 Average	2.14	3.81	5.64	10.39	33.32
吉林13 Ji Lin 13	2.29	5.08	5.76	10.89	28.60
吉林20 Ji Lin 20	2.42	4.46	5.36	16.65	30.64
吉林21 Ji Lin 21	3.91	4.34	6.49	11.50	19.82
平均 Average	2.87	4.63	5.87	13.01	26.35

表3 大豆不同品种叶片的可溶性蛋白含量、过氧化物酶活力及比活
Table 3 Soluble protein content, peroxidase activity and specific peroxidase activity of different soybean leaves.

	可溶性蛋白 S.P.C	活力 A	比活 S.A
永吉大粒 Yong Ji Da Li	36.47	266.8	6.22
吉林3号 Ji Lin 3	19.50	190.8	9.78
Harosoy 结瘤品系 Harosoy (nodulated)	25.60	188.4	7.36
Harosoy 不结瘤品系 Harosoy (non-nodulated)	10.94	157.2	14.37

S.P.C., Soluble protein content; A, Activity;

S.A., Specific activity.

高蛋白品种永吉大粒与低蛋白品种吉林3号相比,具有较高的过氧化物酶活力及较低的酶比活;同样,叶片可溶性蛋白含量高的 Harosoy 结瘤品系较 Harosoy 不结瘤品系,酶活力高而比活低(表3)。

铁丰18×Amsoy 杂交后代辽豆3号和7335-4×7622-4 杂交后代吉林21号的叶片可溶性蛋白含量、过氧化物酶活力及比活均介于各自的两亲本之间(表4)。

表4 大豆不同品种叶片的可溶性蛋白含量、过氧化物酶活力及比活

Table 4 Soluble protein content, peroxidase activity and specific peroxidase activity of leaves of different soybean cultivars

	可溶性蛋白 S.P.C	活力 A	比活 S.A
铁丰18 Tei Feng 18	15.77	124.8	7.92
Amsoy	22.91	232.8	10.17
辽豆3号 Liao Dou 3	22.46	216.0	9.62
7622-4	17.46	108.8	10.24
7335-4	30.16	220.8	7.32
吉林21 Ji Lin 21	22.91	201.6	8.80

* 结荚期 At Pod set stage.

3. 不同节位叶片

在结荚期随着节位上升(从主茎下部第一复叶节算起),叶片可溶性蛋白含量呈上升

趋势;过氧化物酶活力及比活均呈下降趋势,但过氧化物酶活力在下部老叶和顶部嫩叶中分别有所降低和增强;有趣的是,叶片可溶性蛋白含量、过氧化物酶活力及比活在6—8节位均呈平缓变化特征(图1)。

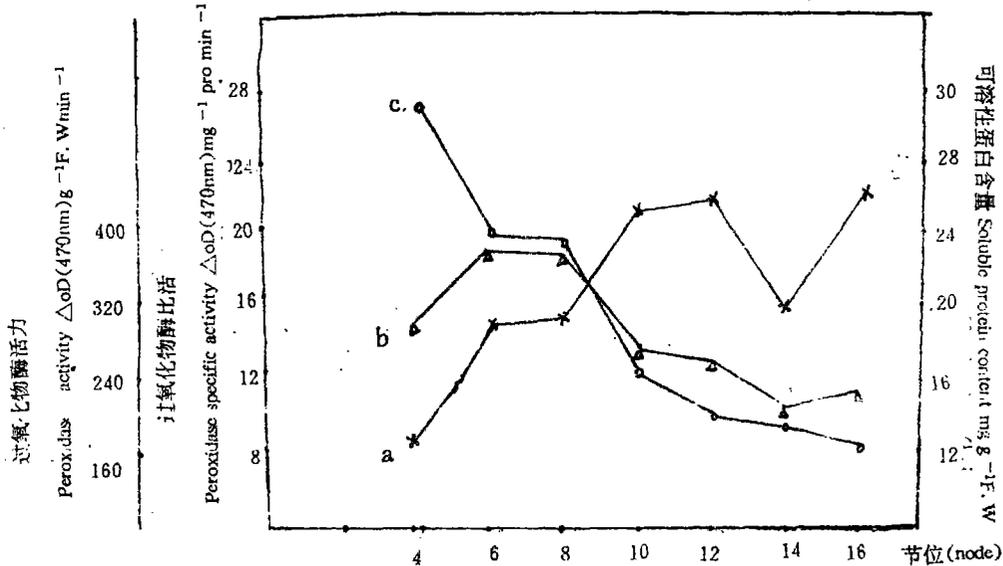


图1 大豆植株不同节位叶片 a)可溶性蛋白含量变化; b)过氧化物酶活力的变化;c)过氧化物酶比活的变化。(结荚期)

Fig. 1 Soybean leaves at different nodes a)The change of soluble protein content; b)The change of peroxidase activity; c)The change of specific peroxidase activity. (At pod-setting stage)

二、过氧化物酶同工酶谱

本实验中供试大豆叶片的过氧化物酶同工酶共有11条酶带,从阴极到阳极可将整个酶谱分成一个零位带和A、B、C和D四个区(图2)其中A₁、A₂和C₁酶带着色较深,出现频率较大,可看作是主酶带。

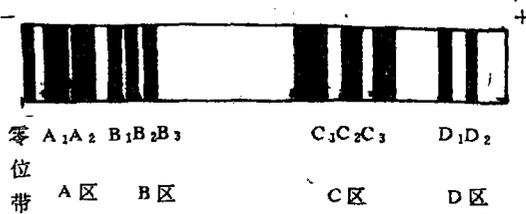


图2 大豆叶片过氧化物酶同工酶谱

Fig. 2 The peroxidase isozymogram of soybean leaf

1. 不同品种

高蛋白品种永吉大粒与低蛋白品种吉林3号相比,过氧化物酶同工酶总活性较高,D区尤其明显[图3(a)]。

Harosoy结瘤品系与Harosoy不结瘤品系相比,A、B、和D区酶活性及同工酶总活性较高,但在C区,Harosoy不结瘤品系酶活性较高,且多出两条带[图3(b)]。

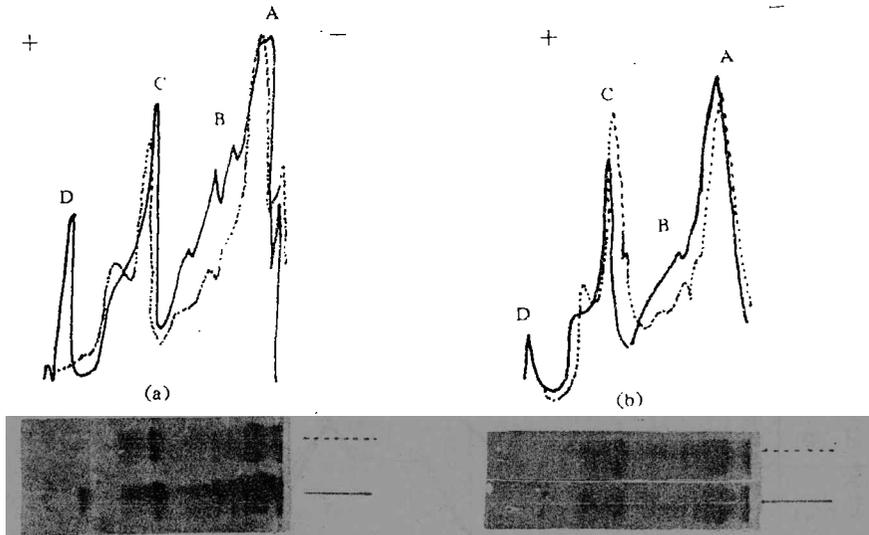


图3 大豆不同品种叶片过氧化物酶同工酶谱(结荚期)

Fig. 3 The peroxidase isozymogram of leaves of different soybean cultivars at pod setting stage

----吉林3号 Ji Lin 3 ——永吉大粒 Yong Ji Dali

----不结瘤 Harosoy 品系 Non nodulated Harosoy ————结 Harosoy 瘤品系 Nodulated Harosoy

由图4可知,杂交后代辽豆3号和吉林21的过氧化物酶同工酶谱特征介于各自亲本之间,且接近于酶活性高,酶带数目多的父本。

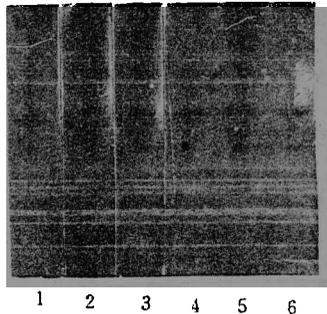


图4 杂交后代与亲本过氧化物酶同工酶谱

Fig. 4 The peroxidase isozymogram of the hybrids and their parents

1. 铁丰18 Tie Feng 18; 2. Amsoy; 3. 辽豆3号 Liao Dou 3;

4. 7335-4; 5. 7622-4; 6. 吉林21 Ji Lin 21。*：鼓粒期 At pod set stage

2. 不同节位叶片

同一植株(结荚期)各节位充分展开叶的过氧化物同工酶谱均具有11条酶带。随着节位降低同工酶总活性呈增强趋势,但在最下部老叶中有所下降。在顶端第1、3节位未展开叶(嫩叶)中只有4-5条酶带,缺少A₁、C₂、C₃和D₂酶带,B区酶带着色较浅或缺失(图5)。

A、B、C区及D₂酶带酶活性在不同节位叶片中的变化趋势与同工酶总活性变化趋势基本一致。D区中,不同节位叶片D₁与D₂带酶活性变化趋势相反。如果以C区与A和B区酶活性之和的比例粗略代表同工酶谱阳极区与阴极区的酶活性比例,则可以看出,大豆

植株顶端嫩叶过氧化物酶同工酶谱中阳极区酶所占比例较大。

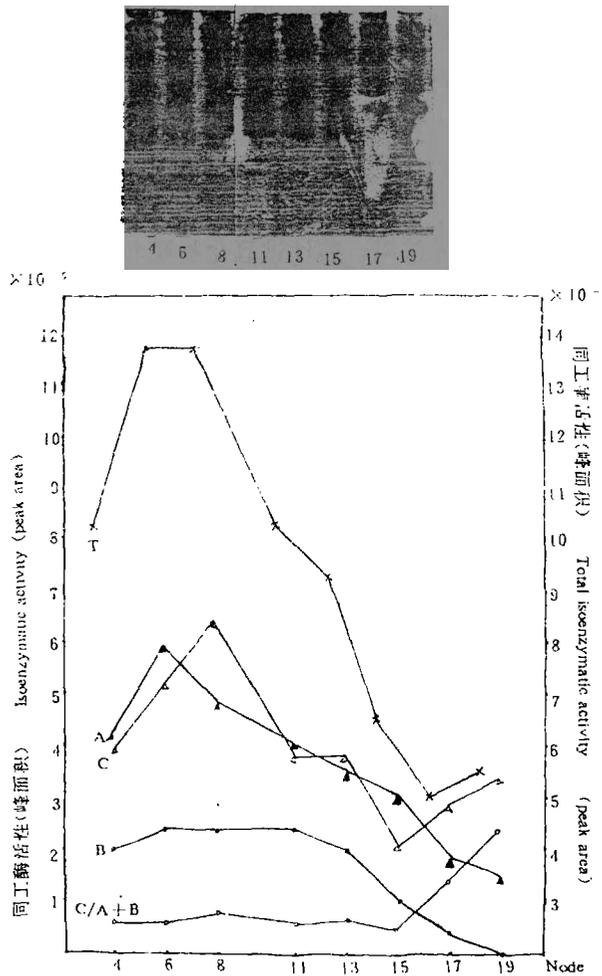


图5 大豆不同节位叶片过氧化物同工酶谱不同酶区的酶活性 T:同工酶总活性
 Fig. 5 The activity of different peroxidase isoenzymatic area of leaves on different soybean node T: Total isoenzymatic activity

讨论

鼓粒末期,过氧化物酶活力增加幅度减缓,而比活的增加幅度增强,估计这可能与这时的叶片可溶性蛋白含量下降有关。且发现,可溶性蛋白含量较高的叶片试样,其过氧化物酶活力及同工酶活性较高,比活较低。

本文分析的两个杂交后代的酶活性及酶谱特征均介于各自两亲本之间,且有偏父现象。辽豆3号及吉林21在丰产性、适应性、株型及抗性等方面都有超亲现象。这与李继耕

(1985)关于具有酯酶同工酶谱偏父本的玉米杂交后代在株高、叶面积和产量等方面都表现出较强的杂种优势的结果一致。所以大豆的偏父型杂交后代值得重视。

随着大豆植株节位的降低,叶片过氧化物酶谱的各酶带及同工酶总活性呈规律性的变化,未展开叶片与展开叶相比,同工酶总活性较低,但 C₁及 D₁带活性较高;且阳极区酶活性所占比例较大。这表明在大豆叶片发育过程中存在着基因的选择性转录及顺序性表达(唐锡华等 1983)。

邢从本(1986)发现大豆种子成熟和萌发过程中,过氧化物酶活性的消长和分布与 SOD 相似。本文不同节位叶片过氧化物酶活力变化情况与庄炳昌(1988)关于大豆不同节位叶片 SOD 活力的变化情况相似。估计过氧化物酶和 SOD 在大豆叶片代谢过程中起着相似的作用。

从实验可看出,不同品种、不同生育期及不同节位叶片的过氧化物酶活力及比活存在明显的差异;大豆植株中上部节位叶片的过氧化物酶同工酶谱清晰,条带数目多,是各生育期品种间比较的最适部位。因此,过氧化物酶可以作为遗传育种的主要参考指标。

参 考 文 献

- [1] 马德伟:1986,甜瓜过氧化物同工酶研究初报.河北农业大学学报,9:9
- [2] 王熊、罗士韦:1981,烟草组培过程中过氧化物酶同工酶的变化.植物生理学报,7:73
- [3] 庄炳昌等:1988,超氧化物歧化酶在大豆不同节位叶片和种子中的分布,中国油料(3):252
- [4] 李云荫等:1984,不同纬度地区大豆短日照处理对过氧化物酶同工酶的影响.大豆科学(3):121
- [5] 李琳等:1980,应用蛋白染色剂考马斯亮兰 G-250 测定蛋白质的方法.植物生理学通讯(6):52
- [6] 华东师范大学生物系植物生理教研组主编:1980,植物生理学实验指导.高等教育出版社 143
- [7] 宋英淑:1986,过氧化物酶活性与大豆抗旱性的关系.黑龙江农业科学 10(1):41
- [8] 苗以农等:1988,大豆不同节位叶片全氮含量的变异性,大豆科学.(2):113
- [9] 唐锡华、潘国桢:1983,高等植物胚胎发育生物学研究Ⅷ:稻胚发育过程中过氧化物酶活性、出现位置及其同工酶的变化规律,植物生理学报,9:357
- [10] 童哲:1980,小麦幼根和幼苗中几种同工酶的初步研究.植物学报,22(2):146
- [11] 梅慧生:1980,植物同工酶研究的某些进展,植物生理学通讯,(3):1
- [12] Buttery BR, Buzzell RI. 1968, Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. Crop science. 8:722.
- [13] Cunningham BA. et al., 1977, Peroxidase activity in Near Isogenic Hight lines of Triticale. The journal of Heredity. 66:151.
- [14] Gaspar T, ANwar A, Fries. D. 1972, Hormonal control of isoperoxidase in Lentil embryotic axis. Plant physiol. 51:146
- [15] Murakami y, Matsumaka S. 1963, The effect of gibberellin on components of phosphatase and peroxidase in rice plant. Plant Physiol. Suppl. 38: xliii.
- [16] Schannon LM. 1968, Plant isozymes. Ann Rev. Plant Physiol. 19:187.
- [17] Slegel BZ, Galston W. 1967, The isoperoxidase of pisum sativum Plant Physiol. 42:221.
- [18] Verma DPS, Huystee NH. 1970, Cellular differentiation and peroxidase isozymes in cell culture of culture of peanut cotyledons. Can. J 18:429.
- [19] Wachok ZS, Bureson. B. 1974, Isoenzyme activity and induction in cultured tissues of wild cotton: a comparison of proembryos and embryos. Physio Plant. 31:73

RESEARCH OF THE PEROXIDASE AND ITS ISOZYMES OF SOYBEAN LEAVES

Liu Xuejun Miao Yinong

(Biology Department, Northeast Normal University)

Zhang Hongying

(Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University)

The peroxidase activity, specific peroxidase activity and isozymogram of soybean leaves were tested in different cultivars at different developmental stages and different nodes. The results showed that the peroxidase activity and specific activity of the upper most fully expanded leaf tended to increase when the plant developed. At the late pod—filling stage, increase rate slowed down for the peroxidase activity, while increased for the specific activity.

The peroxidase activity of new cultivars was higher than that of the old ones.

Cultivar Yongjidali with a higher protein content (48.11%) showed higher peroxidase activity and isozyme activity than cultivar Ji Lin 3 with a lower protein content (43.48%), while the specific activity of Yongjidali was lower. The peroxidase characteristic of the two hybrids, Liao Dou 3 and Ji Lin 21, were in between their parents respectively, and the two hybrids had a bias towards the male parents in terms of more isozyme bands and higher isozyme activity.

As the position of nodes goes down, the leaf specific peroxidase activity increased gradually. While the peroxidase activity and the isozyme activity showed a similar increase tendency, and they decreased in the oldest leaves. The isozyme activity proportion in anode region of isozymogram in unexpanded soft leaves was higher than that in expanded leaves.

The isozyme patterns of upper—middle leaves were clear and showed more isozyme bands. These nodes may be suitable position for a comparative test among soybean cultivars.

Key words Soybean; Node; Peroxidase; Isozymes