

水杉同工酶遗传变异的研究

张文英¹ 李明鹤²

(1 华南农业大学林学院, 510642, 广州; 2 华中农业大学林学系)

摘要 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 以种子胚乳为材料, 对水杉原产地 3 个小群体的 6 种同工酶的遗传方式进行了研究, 确定了由 16 个基因座位编码的 65 个等位基因。GOT、MDH、PGI 和 EST 分别受 3 个多态座位控制, α -AMY、ME 分别受 2 个多态座位控制, 所有座位均为多态座位。各种同工酶的遗传表达基本稳定。

关键词 水杉; 同工酶; 等位基因; 等位酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 S722.31

近年来, 同工酶技术被广泛应用于树木遗传育种研究的各个方面, 其中最有效的是用以检测树木群体遗传变异 (Brown et al, 1983; Mitton, 1983)。由于针叶树种子的胚乳为单倍体, 故只要分析其同工酶谱带便可确定树木的遗传方式和连锁关系, 而不需进行控制杂交和子代分析 (葛颂等, 1987; Adams, 1983; Mitton, 1983)。

水杉 (*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng) 原产我国湖北、湖南、四川三省交界处, 珍贵孑遗树种之一。本研究首次采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对水杉自然群体 6 种同工酶的遗传多态性进行研究, 为进一步了解水杉群体的遗传结构提供依据。

1 材料与方法

1.1 采样和样品处理

从原产地水杉 3 个小群体, 共计 49 个单株上分株采集球果并编号, 球果净种后, 种子置冰箱中保存待用。各单株种子经浸泡催芽, 胚根微露时分离胚和胚乳。胚乳用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 匀浆提取, 在 0℃ 下离心 (12 000 r/min) 15 min, 取上清液置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 电泳和染色

采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。检测了以下 6 种同工酶: 谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (Glutamate oxaloacetate transaminase; GOT; E. C. 2. 6. 1. 1), α -淀粉酶 (α -Amylase; α -AMY; E. C. 3. 2. 1. 1), 苹果酸酶 (Malic enzyme; ME; E. C. 1. 1. 1. 40), 苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase; MDH; E. C. 1. 1. 1. 27), 6-磷酸葡萄糖异构酶 (Phosphoglucose isomerase; PGI; E. C. 5. 3. 1. 9), 酯酶 (Esterase EST; E. C. 3. 1. 1. 2)。GOT、ME、PGI、 α -AMY 均为 7% 分离胶, 其中 α -AMY 在凝胶中加入 0.5% 的淀粉, EST、MDH 为 10% 分离胶。浓缩胶均为 2.5%。电极缓冲液为 0.005 mol/L Tris-0.038 mol/L 甘氨酸 (pH 8.3)。进样量 25~50 μ L。稳流电泳, 待指示剂移至距起点 10 cm 时, 停止电泳, 剥胶染色。

染色方法依据 Vajellos (1983) 和 Siciliano & Shaw (1980) 的方法, 略作修改。

1993-09-01 收稿

1.3 酶谱遗传分析

同工酶座位和等位基因命名参照 Allenderf & Utter (1979) 的方法,酶的缩写字母代表酶系统,缩写加连字号和数字代表不同座位。各座位上等位基因依据迁移率 Rf 值不同分别用小写英文字母 a,b,c..... 等表示,不表达等位基因(Null allele)用 o 表示。

根据胚乳的酶谱判断母树基因型时,若每株分析 N 粒胚乳,则正确判断母树基因型的概率为 $1-(1/2)^{N-1}$ (Adams, 1983)。本实验中每株树每种酶分析 7~15 粒胚乳,等位基因分离与理论期望比例(1:1)的适合度用经过矫正的 χ^2 分析检验(葛颂等, 1987)。

2 结果与分析

电泳分析证明,6 个酶系统共由 16 个基因座位编码,所有座位均为多态座位,每座位至少有 2 个等位基因,共计有 65 个结构基因。

现将 6 种同工酶分述如下:

2.1 GOT 同工酶(E. C. 2. 6. 1. 1)

GOT 有 3 个多态座位。Got-1 具有 4 个等位基因,表现为 3 个不同迁移率的单带表现型和 1 个无带表现型。Got-2 具有 2 个等位基因,表现为 1 个单带表现型和 1 个无带表现型。Got-3 靠近负极,具有 2 个等位基因,表现为 2 个三带表现型变异(图 1)。

所检验测单株中,约 24 株至少在 1 个座位上有基因分离现象,25 株在 3 个座位上均无分离。

2.2 α -AMY 同工酶(E. C. 3. 2. 1. 1)

由 2 个多态座位控制, α -Amy-1 有 2 个等位基因,表现为 1 个双带表现型和 1 个无带表现型。 α -Amy-2 靠近负极,有 5 个等位基因,表现为 2 个单带表现型和 3 个双带表现型。此座位上各单株均纯合,差异只存在于个体间(图 2)。有 8 个单株在 α -Amy-1 上杂合,41 株纯合;所有单株在 α -Amy-2 上纯合。

2.3 ME 同工酶(E. C. 1. 1. 1. 40)

有 3 个染色区,染色区 1 酶谱不清晰,不做分析。染色区 2 由多态座位 Me-1 控制,有 2 个等位基因,表现为 1 个单带表现型和 1 个无带表现型。染色区 3 由 Me-2 控制,具 5 个等位基因,表现为 3 个单带表现型,1 个双带表现型和 1 个无带表现型(图 3)。Me-1 在所有单株中纯合,Me-2 在 25 株中纯合,22 株中杂合。

2.4 MDH 同工酶(E. C. 1. 1. 1. 37)

由 3 个座位控制。Mdh-1 由 3 个等位基因组成,表现为 1 个单带表现型、1 个双带表现型和 1 个无带表现型。Mdh-2 有 2 个等位基因,分别表现为三带表现型和四带表现型,前者在群体中所占比例很大,后者只在 3 个单株中出现。Mdh-3 具有 2 个等位基因,表现为 2 个单带表现型(图 4)。

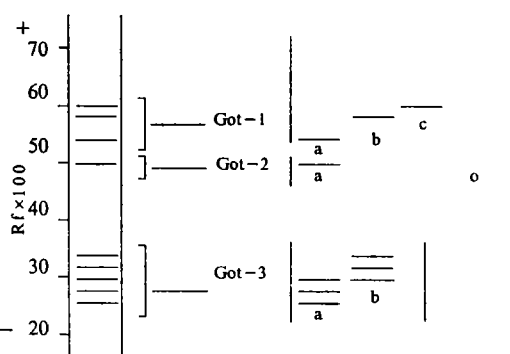


图1 Got 座位上等位基因的分离模式

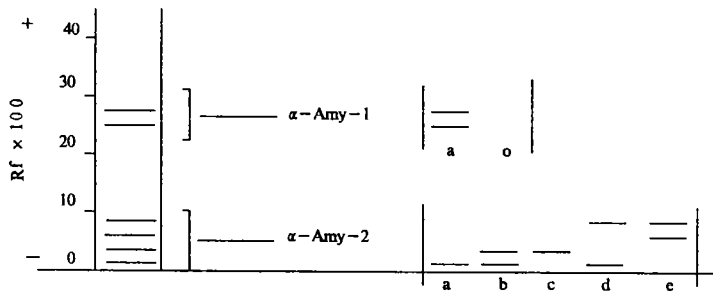


图 2 α -AMY 座位上等位基因的分离模式

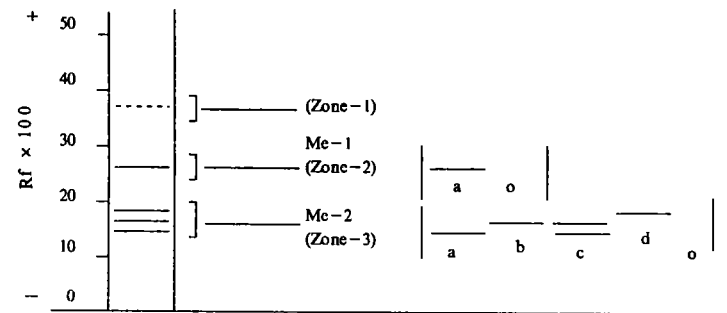


图 3 ME 座位上等位基因的分离模式

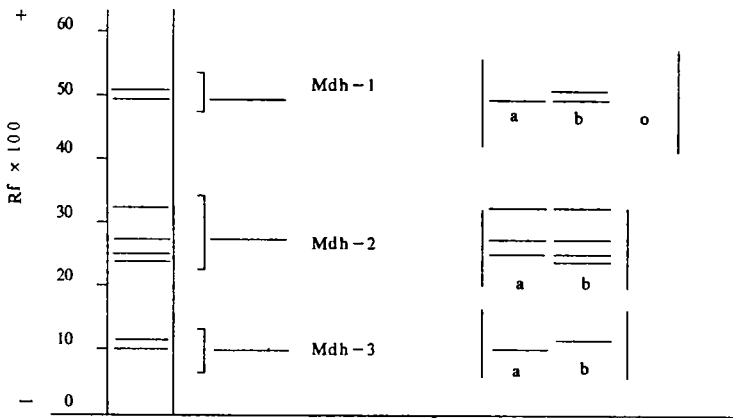


图 4 MDH 座位上等位基因的分离模式

2.5 PGI同工酶(E. C. 5. 3. 1. 9)

观察到 3 个染色区, 染色区 1 由具有 11 个等位基因的多态位点 Pgi-1 控制, 表现为 3 个单带变异、4 个双带变异、3 个三带变异和 1 个无带变异。该位点谱带变化较大, 可能与酶本身特性、当时电泳条件及对酶带的人为划分等因素有关。染色区 2 由具有 4 个等位基因的 Pgi-2 控制, 表现为 3 个单带变异和 1 个无带变异。染色区 3 由具有 2 个等位基因的 Pgi-3 控制, 表现为 1 个单带表现型和 1 个无带表现型(图 5)。

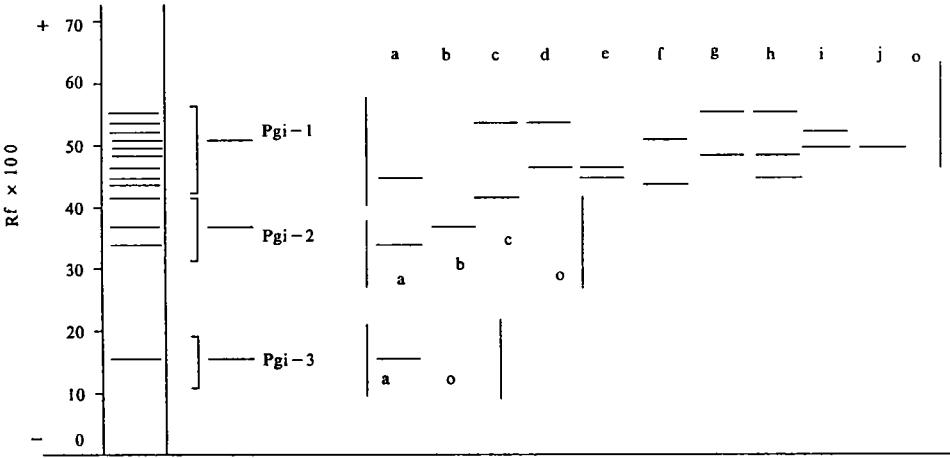


图 5 PGI 座位上等位基因的分离模式

2.6 EST 同工酶 (E. C. 3.1.1.2)

有 4 个染色区。染色区 1 由具有 2 个等位基因的 Est-1 控制, 表现为 1 个单带表现型和 1 个无带表现型。染色区 2 由具有 9 个等位基因的 Est-2 控制, 表现为 3 个单带变异, 3 个双带变异, 2 个三带变异和 1 个无带变异。染色区 3 酶带不清晰, 不作分析。染色区 4 由具有 8 个等位基因的 Est-3 控制, 表现为 4 个单带变异, 3 个双带变异和 1 个无带变异 (图 6)。

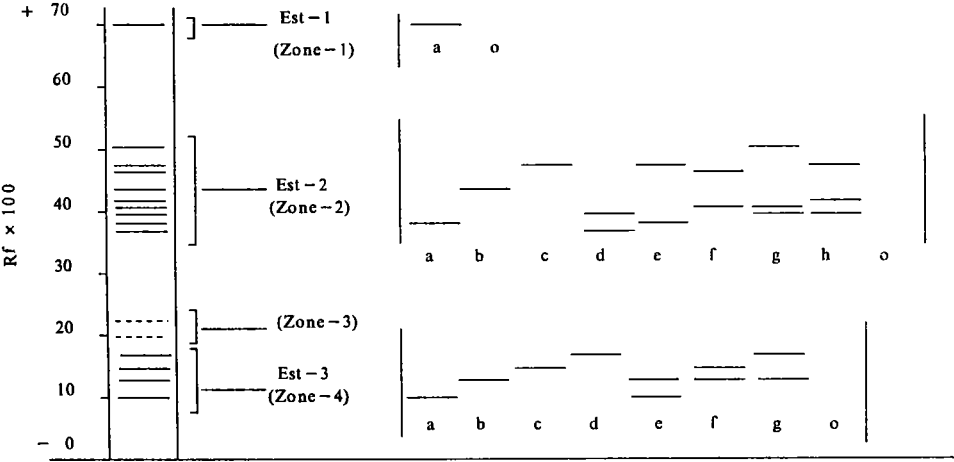


图 6 EST 各座位上等位基因的分离模式

为了解以上各酶座位谱带分离情况, 对 49 个单株在 12 个多态座位上的杂合情况进行统计, 共有 108 次/株杂合单株, 统计等位基因观察值并计算理论值 (1:1) 进行 χ^2 检验, 经检验, χ^2 值均未达统计显著, 说明各座位上杂合单株二等位基因的分离与理论期望比例相符, 不存在致死等位基因。

3 讨论

水杉中 GOT, α -AMY, ME, MDH, PGI 和 EST 的同工酶在 16 个基因座位上由 65 个结构基因编码, 这 16 个多态座位的同工酶谱带均符合分离和自由组合规律, 所以这 6 种同工酶都是属于同一座位上不同等位基因所表达的同工酶, 即等位酶 (Allozymes)。

应用同工酶可进行座位间的连锁分析 (葛颂等, 1987; Adams, 1983)。水杉种子胚乳极

小,一个胚乳提取的酶液最多只能分析两种酶,无法进行连锁分析。建议采用淀粉凝胶电泳,可减少酶液用量及电泳次数,并可检验位点间的连锁关系。

参 考 文 献

- 葛颂,黄敏仁,许 农. 1987. 马尾松 GOT、LDH 和 MDH 同工酶的遗传方式和连锁关系. 遗传学报, 14(6): 428~435
- Siciliano M J, Shaw C R. 1980. 凝胶上酶和分离和显现. 1976. 植物生理学通讯, (4): 59~70
- Adams W T. 1993. Application of isozymes in tree breeding. In: Tanksley S D, Orton T J. eds. Isozymes in plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 381~400
- Allendorf F W, Utter F M. 1979. Population genetics. Fish Physiology, 8: 407~475
- Brown A H D, Weir B S. 1983. Measuring genetic variability in plant population. In: Tanksley S D, Orton T J. eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 219~239
- Mitton J B. 1983. Conifers. In: Tanksley S D, Orton T J. eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 443~472
- Vajellos C E. 1983. Enzyme activity staining. In: Tanksley S D, Orton T J. eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 469~516

A STUDY ON GENETIC VARIATION OF ISOZYME IN *Metasequoia glyptostroboides*

Zhang Wenying¹ Li Minghe²

(1 College of forestry, South China Agr. Univ., 510642, Guangzhou;

2 Dept. of Forestry, Huazhong Agr. Univ.)

Abstract The inheritance of six polymorphic isozyme systems in *Metasequoia glyptostroboides* was studied by polyacrylamide gel electrophoresis. Analysis using haploid endosperm tissues of open-pollinated seeds collected from the original distribution range demonstrated that allozyme variants in six enzymes were encoded by a total of 65 structural genes in 16 loci. Among these isozyme systems, GOT, MDH, PGI and EST were controlled by three loci, respectively; α -AMY and ME were controlled by two loci. It was found that every locus was polymorphic.

Key words *Metasequoia glyptostroboides*; Isozyme; Allozyme; Polyacrylamide gel electrophoresis

