

## 外源 DNA 导入糯玉米自交系 D<sub>0</sub> 代变异 植株过氧化物酶同工酶分析

庾韦花<sup>1</sup>, 张慧英<sup>2</sup>, 韦家川<sup>2</sup>, 吴子恺<sup>2</sup>, 郝小琴<sup>2</sup>, 王小敏<sup>3</sup>

(1. 广西农业科学院, 广西南宁 530007; 2. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 3. 玉林师范学院, 广西玉林 537000)

**摘要:** 采用改良浸种法分别将甘蔗总 DNA 与孟加拉超甜玉米自交系总 DNA 导入糯玉米自交系 12-9-10, 在 D<sub>0</sub> 代分别获得变异植株, 采用聚丙烯酰胺垂直电泳法对该植株及供受体进行了过氧化物酶同工酶分析, 其结果表明: 植株 D<sub>0</sub>(糯×甘300) 的过氧化物酶同工酶在迁移率 Rf<sub>5</sub>=0.33 和 Rf<sub>6</sub>=0.40 分别出现一条供体特有而受体没有的酶带, 其酶带强弱与供体相同; 在迁移率 Rf<sub>8</sub>=0.61 出现一条供受体都没有的弱带。植株 D<sub>0</sub>(糯×孟甜300)-2 在迁移率 Rf<sub>6</sub>=0.59 增加了一条供受体都没有的弱带。说明了外源 DNA(或 DNA 片段)已转移到糯玉米自交系 12-9-10 中, 并得到了表达。

**关键词:** 浸种法; 外源 DNA; 变异; 过氧化物酶同工酶

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0510-03

## Study on the isoenzyme of the variant plants derived from exogenous DNA introduction into the inbreds of glutinous maize

YU Wei-hua<sup>1</sup>, ZHANG Hui-ying<sup>2</sup>, WEI Jia-chuan<sup>2</sup>,  
WU Zi-kai<sup>2</sup>, HAO Xiao-qin<sup>2</sup>, WANG Xiao-min<sup>3</sup>

(1. *Guangxi Academy of Agricultural Sciences*, Nanning 530007, China; 2. *Agricultural College, Guangxi University*, Nanning 530005, China; 3. *Yulin Teachers' College*, Yulin 537000, China)

**Abstract:** Through the improved methods of soaking embryo, the total DNA of sugarcane and inbreds of sweet maize was successfully introduced into the inbreds of glutinous maize 12-9-10 respectively. And the variant plants were obtained from D<sub>0</sub> generation. We had analyzed the zymograms of the peroxidase isozyme by PAGE. The results showed that a peroxidase-isozyme strip which was of donor but not of receptor appeared at Rf<sub>5</sub>=0.33 and Rf<sub>6</sub>=0.40 of the plant D<sub>0</sub>(waxy×sug300), a peroxidase-isozyme weak strip which was not of donor and receptor appeared at Rf<sub>8</sub>=0.61. For the plant D<sub>0</sub>(waxy×mt300)-2, a peroxidase-isozyme strip which was not of donor and receptor appeared at Rf<sub>6</sub>=0.59. Thus, it was confirmed that exogenous genes(or DNA segments) were introduced into glutinous maize 12-9-10 and on expression.

**Key words:** methods of soaking embryo; exogenous DNA; variation; peroxidase-isozyme

周光宇(1988)提出 DNA 片段杂交假说, 外源总 DNA 浸种法就是基于此理论发展起来的一种进行 DNA 片段“杂交”的可行方法。该技术已在水稻

(文锦芬等, 2003)、大豆(江巨鳌等, 2004)、烤烟(杨丽娟等, 2003)等多种农作物上取得了一定的成果, 实现了目标性状基因的转移。自 2003 年, 我们将黑

收稿日期: 2005-03-28 修回日期: 2005-10-10

基金项目: 广西自然科学基金项目(桂科基 0236005); 广西教育厅项目(桂教科研[2002]316) [Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(0236005); Education Department of Guangxi([2002]316)]

作者简介: 庾韦花(1978-), 女, 广西永福人, 硕士, 助理研究员, 主要从事作物育种工作。

皮甘蔗总 DNA 和孟加拉超甜玉米自交系总 DNA 分别导入糯玉米自交系 12-9-10 后, 在 D<sub>0</sub> 代获得果穗叶片呈对生型变异植株 D<sub>0</sub>(糯×甘300) 和弯曲生长及叶片呈撕裂状的变异植株 D<sub>0</sub>(糯×孟甜300)-2。但在玉米变异后代的筛选和鉴定上, 以过氧化物酶同工酶为生化指标进行研究尚不多见。本文对 D<sub>0</sub> 代变异植株的过氧化物酶同工酶进行分析, 旨在探讨变异植株与供受体之间的关系, 为浸种法在远缘杂交上的应用提供理论依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

受体糯玉米自交系 12-9-10, 由广西大学农学院吴子恺教授提供。供体包括: (1) 广西陆川县推广的黑皮甘蔗; (2) 孟加拉超甜玉米自交系(超甜 20 号推广种父本)。

### 1.2 方法

1.2.1 取材方法 变异植株 D<sub>0</sub>(糯×甘300) 与供受体在 2004 年 5 月 12 日取材, 变异植株 D<sub>0</sub>(糯×孟甜300)-2 与供受体在 2004 年 5 月 18 日取材, 除黑皮甘蔗外, 取材时间均为孕穗期, 上午 9:00~10:00。取材部位均为果穗上一功能叶的中上部, 取材之后立即进行同工酶的提取, 提取液在 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 同工酶的提取方法 称取叶片 1 g, 并加 3 mL 的 Tris-HCl (pH=8.0) 缓冲液及少许石英砂在冰浴中研磨成匀浆后, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液置 -20℃ 冰箱中保存, 电泳时取其置于冰上缓慢溶解后即用于。

1.2.3 电泳方法 采用垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 电极缓冲液为 pH=8.3 的 Tris-Gly 缓冲液, 浓缩胶浓度为 3%, pH=6.7, 分离胶浓度为 7.2%, pH=8.9, 利用稳压直流电源, 分离胶 200 V (30 mA), 浓缩胶 100 V, 4℃ 下进行电泳, 以溴酚蓝为指示剂, 点样用量相同, 均为 60 μL, 重复 2 次。

1.2.4 过氧化物酶同工酶的染色方法 过氧化物酶同工酶采用醋酸-三联苯胺, 37℃ 进行, 大约 3~5 min 显色, 显色后立即用清水洗净染色料, 以获得最佳染色效果。染色完毕后的胶置于 70% 的醋酸液中保存。最后对胶进行拍照、Rf 值的计算及模式图的绘制。相对电泳率 Rf 值参照 Rubus 介绍的计算方法, 即 Rf 值为酶带迁移距离与溴酚蓝迁移距离的比值。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑皮甘蔗总 DNA 处理后的 D<sub>0</sub> 代变异植株的过氧化物酶同工酶谱的变化

通过对黑皮甘蔗总 DNA 处理后的 D<sub>0</sub> 代变异植株过氧化物酶同工酶的测定, 其电泳结果见图 1。从图 1 可看出, 分类学上不同属的供受体间的过氧化物酶同工酶酶带总数有很大差异, 供体黑皮甘蔗 7 条, 受体糯玉米 4 条, 酶带位置也呈显出较大差异, 供受体仅在迁移率 Rf<sub>5</sub>=0.59 有相似酶带, 但强弱不同。在该处植株 D<sub>0</sub>(糯×甘300) 的酶带强弱与供体相同, 为中强带, 受体为弱带。植株 D<sub>0</sub>(糯×甘300) 的过氧化物酶酶带总数与供体相同, 其位置也出现一定的相似性, 在迁移率 Rf<sub>5</sub>=0.33 和 Rf<sub>6</sub>=0.40 分别出现一条供体特有而受体没有的酶带, 其酶带强弱与供体相同, 在迁移率 Rf<sub>8</sub>=0.61 出现一条供受体都没有的弱带。说明了外源 DNA (或 DNA 片段) 已转移到糯 12-9-10 中, 并在过氧化物酶同工酶上得到了表达。

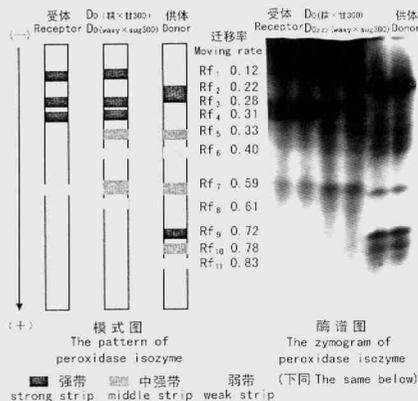


图 1 植株 D<sub>0</sub>(糯×甘300) 的过氧化物酶同工酶谱及模式图  
Fig. 1 The zymogram and pattern of peroxidase isozyme of the plant D<sub>0</sub>(waxy×sug300)

### 2.2 孟加拉超甜玉米自交系总 DNA 处理后的 D<sub>0</sub> 代变异植株的过氧化物酶同工酶谱的变化

经过检测, 得出一株植株过氧化物酶同工酶谱发生变异, 如图 2。从图 2 可看出, 受体糯 12-9-10

与供体孟加拉超甜玉米的过氧化物酶同工酶谱带在迁移率  $Rf_1$ 、 $Rf_2$ 、 $Rf_3$ 、 $Rf_4$  都有相同的酶带(也称共性带),反映了玉米种的遗传保守性、专一性和同源性,后代植株  $D_0(\text{糯} \times \text{孟甜}300)-2$  在迁移率  $Rf_5 = 0.59$  增加了一条供受体都没有的弱带,在  $Rf_7 = 0.68$  的酶带较供受体粗。这说明该植株的过氧化物酶同工酶发生变异。

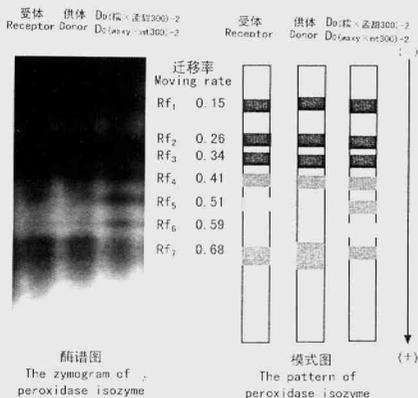


图2 植株  $D_0(\text{糯} \times \text{孟甜}300)-2$  过氧化物酶同工酶谱及模式图  
Fig. 2 The zymogram and pattern of peroxidase isozyme of mutant plant  $D_0(\text{waxy} \times \text{mt}300)-2$

### 3 讨论

#### 3.1 同工酶是基因作用的直接表达

$D_0(\text{糯} \times \text{甘}300)$  过氧化物同工酶谱出现供体特有而受体没有的酶带,这可能由于外源 DNA 中的某一完整的过氧化物酶同工酶结构基因整合到受体基因组中,引起与供体过氧化物酶同工酶有相同表达类型的变化,即产生供体特有而受体没有的酶带。 $D_0(\text{糯} \times \text{甘}300)$ 、 $D_0(\text{糯} \times \text{孟甜}300)-2$  都出现供受体都没有的酶带,此种情况可能是外源 DNA 片段调控序列整合到受体基因组中,打破受体基因组原有的过氧化物酶同工酶的表达类型,出现与受体原过氧化物酶同工酶不同的酶带,即产生供受体都没有的酶带(刘春林等,1994)。至于是哪一种 DNA 功能片段整合到了受体基因组内,还需从分子生物学方面进行深入探讨。

#### 3.2 植株 $D_0(\text{糯} \times \text{甘}300)$ 性状变异

植株  $D_0(\text{糯} \times \text{甘}300)$  过氧化物酶同工酶发生变异,从性状表现上观察也发生了变异,果穗、叶片均为对生型,株高 93 cm,比受体 130 cm 矮 37 cm。这与田秋元等(1994)报道“株高小于 170 cm 的对生玉米出现过氧化物酶同工酶变异”的结果一致,在本研究中该植株的过氧化物酶同工酶的变异是否与玉米的对生性状表现有关还需进一步研究。

#### 3.3 不同供体 DNA 处理后的 $D_0$ 代变异植株过氧化物酶同工酶的比较

黑皮甘蔗 DNA 导入糯 12-9-10 的  $D_0$  代变异植株— $D_0(\text{糯} \times \text{甘}300)$  的过氧化物酶同工酶在迁移率  $Rf_5$ 、 $Rf_6$ 、 $Rf_7$ 、 $Rf_8$  四条酶带上均发生变异;孟加拉超甜玉米 DNA 导入糯 12-9-10 的  $D_0$  代变异植株— $D_0(\text{糯} \times \text{孟甜}300)-2$  过氧化物酶同工酶在迁移率  $Rf_1$ 、 $Rf_7$  两条酶带上发生变异,可见在属间进行处理的  $D_0$  代变异植株发生变异的酶带数多于种间处理。其共同点是在迁移率  $Rf_5$  与  $Rf_7$  都发生了变异,这说明酶带发生变异的位置可能与供受体的品种有关。

#### 参考文献:

- 周光宇. 1988. 农业分子育种——授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学工作者, 21(3): 1—6.
- Jiang JA(江巨鳌), Ma H(麻浩), Zhou ZM(周治森), et al. 2004. Genetic and breeding effects of introduction of exogenous DNA into soybeans by improved seed-soaking method [应用改良浸种法将外源 DNA 导入大豆的遗传种效应研究][J]. *Hunan Agric Sci* (湖南农业科学), (2): 10—13.
- Liu CL(刘春林), Hong YH(洪亚辉), Zhao Y(赵燕), et al. 1994. The isozymogram analysis of good strains obtained by DNA soaking method(DNA 浸泡法所获水稻优良系酶同工酶分析)[J]. *J Hunan Agric Coll* (湖南农业学报), 20(6): 527—529.
- Tian QY(田秋元), Cheng BJ(程备久), Wang B(王波), et al. 1994. The genetical and isozymatical analysis of the corn, opposite leaf characteristic(玉米对生性状的遗传及同工酶分析)[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 22(3): 216—218.
- Wei JF(文锦芳), Deng MH(邓明华), Li LY(李良勇), et al. 2003. Variation of rice progeny derives from introduction of DNA from *Phytolacca esculenta* (商陆 DNA 水稻引起后代性状变异初报)[J]. *Crop Res* (作物研究) (1): 13—15.
- Yang LJ(杨丽娟), Bai Y(白岩), Bai S(白嵩). 2003. Analysis of amino acids content from the genetic mutation of D2 generation tobacco transformed with foreign DNA by seed-immersion method(应用浸种法导入外源 DNA 转化烤烟变异株 D2 代的氨基酸含量分析)[J]. *Agric & Tech* (农业与技术), 23(3): 69—72.