

文章编号:1003-8701(2007)06-0011-03

氩离子注入对北方粳稻过氧化物酶活性的影响

杨美英¹, 臧薪宇², 陈凤生³, 武志海¹

(1.吉林农业大学, 长春 130118; 2.吉林省农业科学院, 长春 130033;

3.吉林省榆树市环城乡农业技术推广站, 吉林 榆树 130400)

摘 要:对6个剂量氩离子处理条件下北方粳稻根系过氧化物酶(POD)活性和 POD 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明:不同水稻品种间有辐射敏感性差异。随氩离子诱变剂量的增加,3个水稻品种根系 POD 活性的值都明显高于对照,在3000剂量时的 POD 值最大。在处理剂量范围内,POD 活性随剂量的变化表现出先升后降的变化规律,且有一定的波动性。而且农大7各处理酶谱活性差别最大,秋田小町和农大13酶谱差别较小,但在3000系数剂量下酶带有不同程度加深的趋势。

关键词: 粳稻; 氩离子注入; 过氧化物酶**中图分类号:** S511.2²**文献标识码:** A

大规模地将离子束应用于生物新品种选育及改良方面的研究是中国科学院等离子体物理研究所余增亮等人于1986年开创的^[1,2]。离子注入技术是一种电、能、质的联合作用,同一种离子,不同剂量的注入,必将使注入生物体内的质量沉积与动量传递结果不同,从而影响了生物体的生理生化功能,造成不同程度的生理损伤。研究表明^[3],离子注入对生物体的作用像 γ 射线等传统的辐射一样在其经过的径迹周围产生大量的活性氧自由基。为了维持生命活动的正常进行,减少自由基对生物体损害,机体本能地需要“产出”较多的自由基清除酶来清除体内有害自由基以达到一种自由基产生与清除的动态平衡。过氧化物酶(POD)是生物体主要的应激酶之一。因此,能从生化水平上研究离子注入后北方粳稻的生理损伤和诱变效果。

离子束作为一种新的诱变源,在农作物新品种选育上是非常有效的。我国的离子束诱变育种已取得了很大成绩,几乎涉及所有大宗的粮食作物和经济作物,开展的比较早的作物如水稻^[4]、小麦^[5]、甜菜^[6]等都获得了一批有推广价值的新品系。但离子束应用于北方粳稻进行品种选择及改良的研究为数很少。本实验以不同剂量氩离子束处理的3个北方粳稻品种为材料,研究了苗期根系 POD 酶活性以及同工酶的变化,以期为今后离子束应用于北方粳稻的改良提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试材料为吉林农业大学水稻研究所提供的中、晚熟品种农大13、农大7号和秋田小町。

1.2 诱变处理方式

氩离子(Ar^+)处理由中国科学院等离子体物理研究所提供,采用能量为30 keV,辐射单位为 $2.6 \times 10^{13} Ar^+/cm^2$ 的脉冲注入方式。每个品种设置6个处理,系数分别为2 000、2 400、2 800、3 000、3 200、3 600,辐射材料为未去壳的干种子,含水量13%左右。以未处理干种子为对照。

1.3 酶活力测定

收稿日期: 2007-06-07**基金项目:** 吉林农业大学青年启动基金项目 200601**作者简介:** 杨美英(1974-),女,硕士,主要从事生物化学与基因工程的研究。

粗酶液的制备:将离子注入后的水稻种子进行水培,取28℃温室发芽10 d后的幼苗根系为研究材料。称取水稻幼苗根系0.5 g于预冷的研钵中,加入1 mL预冷的磷酸缓冲液冰浴研磨成匀浆,定容至5 mL,4℃,4 000 r/min离心15 min,上清液即为粗酶液。以未处理种子根系为对照,提取方法同上。

过氧化物酶(POD)活性的测定:采用愈创木酚法,取光径为1 cm的玻璃比色杯2只,一只加入反应混合液3 mL和磷酸缓冲液1 mL作为对照;另一支中加入反应混合液3 mL和上述酶液1 mL,立即开始记录时间,于分光光度计上测量波长470 nm下OD值,每隔1 min读数1次。以每分钟吸光度变化值表示酶活性大小,即以每分钟A₄₇₀的变化值0.01为一个相对酶活单位,计算植物组织内POD酶活力的大小。

1.4 POD同工酶电泳

取28℃温室发芽10 d后的幼苗根系各0.1 g,加提取缓冲液0.2 mL,冰浴研磨,4℃,4 000 r/min离心20 min,取上清液与20%甘油2:1混合后点样30 μL。浓缩胶浓度4%,分离胶浓度7.5%,醋酸联苯胺染色,详细操作步骤参照文献[7]。

2 结果与分析

2.1 不同处理对水稻根系POD活性的影响

POD是植物体内普遍存在的、活性较高的一种酶,它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化都有密切的关系,在植物生长发育过程中,它的活性不断发生变化,因此测量这种酶,可以反映某一时期植物体内代谢的变化。

从图1中可以看出,随氩离子诱变剂量的增加,3个水稻品种根系POD活性的值都明显高于对照,而且POD活性随剂量的变化呈现出不同的变化规律,随着剂量的增加,酶活性变化趋势为先升后降,且有一定的波动性。在2 000和3 000系数下,农大7的POD值基本相同且活性最高,2 400、2 800两系数诱变后的POD值较低,但也都高于3 200、3 600两剂量的活性值。农大13和秋田小町在2 400至3 600范围内的变化规律与农大7基本相同。3 000系数剂量下,农大13和秋田小町POD活性最高,而且这两个品种在2 000至3 000诱变范围内,随诱变剂量的增加POD活性也表现出增加的趋势,3 000以后依次降低。而且不同剂量下的酶活表现出品种间有辐射敏感性差异。农大7根系POD活性高于农大13,秋田小町POD活性值最低。

2.2 离子束处理对M₁代幼苗根系POD同工酶的影响

从3个品种根部电泳图谱(图2)上可以看出,农大7各处理酶带活性差别最大,秋田小町和农大13酶带差别较小。说明离子注入后对农大7根部POD同工酶影响较强,而对农大13和秋田小町根部的POD同工酶影响较弱。从不同剂量角度来看,农大7在处理剂量系数为2 000和3 000时根部POD同工酶表现为激活效应,其余剂量下均表现为抑制效应。这与叶片POD同工酶电泳结果一致^[6]。秋田小町在剂量系数为3 600时与对照酶带活性较接近,其余带弱一些。农大13没有明显变化。离子束处理对3个品种酶谱的影响都集中在靠近正极的地方,这可能是离子注入后对小分子蛋白的影响要较对大分子蛋白的作用大的原因,也可能是离子注入后激活了抑制根部小分子蛋白表达的基因所引起的。总之,从根部POD同工酶角度来说,此次试验所选择的剂量范围对农大7比较适宜。

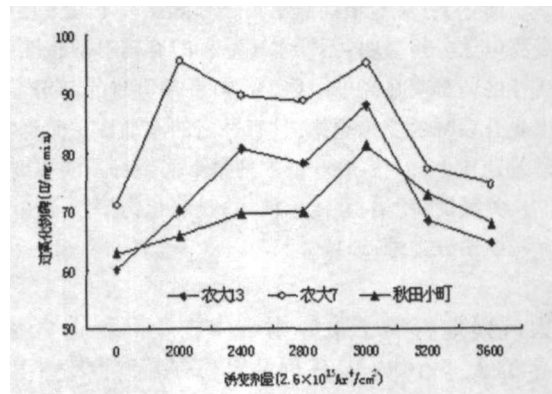


图1 不同剂量氩离子处理水稻幼苗根系POD活性分析

随着剂量的增加,酶活性变化趋势为先升后降,且有一定的波动性。在2 000和3 000系数下,农大7的POD值基本相同且活性最高,2 400、2 800两系数诱变后的POD值较低,但也都高于3 200、3 600两剂量的活性值。农大13和秋田小町在2 400至3 600范围内的变化规律与农大7基本相同。3 000系数剂量下,农大13和秋田小町POD活性最高,而且这两个品种在2 000至3 000诱变范围内,随诱变剂量的增加POD活性也表现出增加的趋势,3 000以后依次降低。而且不同剂量下的酶活表现出品种间有辐射敏感性差异。农大7根系POD活性高于农大13,秋田小町POD活性值最低。

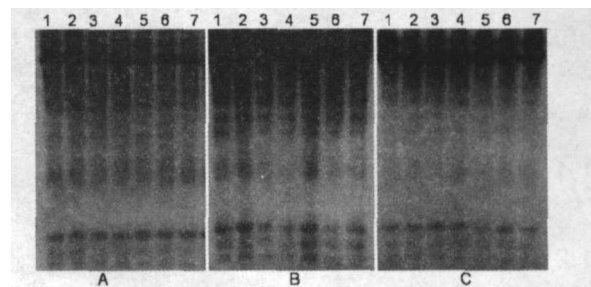


图2 不同氩离子注入3个梗稻品种根系POD同工酶变化

A.农大13; B.农大7; C.秋田小町

1 未处理种子;2~7分别是2 000,2 400,2 800,3 000,3 200,3 600为系数氩离子处理后的同工酶谱

3 讨 论

过氧化物酶(POD)是一族能利用 H_2O_2 氧化供氢体的酶,由 1 个糖蛋白和 1 个氯正铁血红素 IX 的铁卟啉辅基缀合而成。它在高等植物中广泛而大量存在,是植物中最重要的氧化还原酶类之一^[9]。在辐射遗传育种工作中,把 POD 同工酶作为一种生化指标进行早期鉴定和筛选是一种有效的方法^[10]。当生物体受到辐射处理后敏感性最强的 DNA 分子必然发生改变,由其决定的酶蛋白结构、功能也相应的发生改变,表现为同工酶的种类和数量的变化^[11]。随氩离子诱变剂量的增加,3 个水稻品种根系 POD 活性的值都明显高于对照,在 3 000 剂量时的 POD 值最大,两侧都呈降低的趋势但也有一定的波动性。

同工酶是基因表达的产物,是分子水平的表现型。因此同工酶表现型的差异在某种程度上可能反映了基因型的差异^[12]。在植物的不同部位和不同的发育时期 POD 同工酶的数量和活性都有很大变化,可以出现多种同工酶谱。这些酶谱在一定部位和一定的发育时期具有相对的稳定性^[13]。从本实验结果可以看出,不同品种对辐射敏感性不同,POD 的变化规律也不同。农大 7 各处理酶谱活性差别最大,秋田小町和农大 13 酶谱差别较小,但在 3 000 系数剂量下酶带有不同程度加深的趋势。

从育种的角度出发,以诱发突变为目的的辐射处理,必然会引起植物的生理损伤。因此,较小的生理损伤和较高的突变频率是探寻适宜诱变剂量的依据。从本实验设置的 6 个剂量来分析,3 000 \times 2.6 $\times 10^{13} Ar^+/cm^2$ 这一剂量下 POD 活性及酶谱变化较明显。因此,可粗略认为这一剂量是离子束处理粳稻的适宜剂量。但由于本试验仅设置了 30 keV 的一种能量,能量对诱变后水稻幼苗根系 POD 的影响也需进一步研究。

参考文献:

- [1] 夏英武,谢嘉华,舒庆尧,等. 氩离子注入水稻机理与效应研究[J]. 安徽农业大学学报,1994,21(3): 330-335.
- [2] D'AMATO, F. Agriculture Mediterranean Induced Mutations in Crop Improvement: basic and applied aspects (Italy). 1992, 122:30-60.
- [3] 王卫东,朱晓蕊,苏明杰,秦广雍. 离子注入对小麦三叶期 3 种保护酶活性的影响[J]. 华北农学报,2007,22(1): 13-16.
- [4] 郭玉华,胡建成,刘世强,等. 离子束生物效应的研究[J]. 辽宁农业科学,1995,5: 8-11.
- [5] 王岳光,王月福,孙锡勇,等. 射线照射和离子束注入小麦生物学效应的研究[J]. 莱阳农学院学报,1998,15(4): 258-260.
- [6] 曾宪贤,王燕飞,张石峰,等. 离子注入甜菜种子生物效应[J]. 科学通报,1999,44(4): 382-384.
- [7] 何忠效,张树政. 电泳[M]. 北京:科学出版社,1999:284-286.
- [8] 杨美英,杨 福,武志海,崔秋华. 氩离子束注入对水稻幼苗生长及过氧化物酶同工酶的影响[J]. 吉林农业大学学报,2001,23(3):37-40.
- [9] 王 爽,陈卫良. LDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析植物过氧化物酶同工酶[J]. 植物生理学通讯,2006,42(4): 713-716.
- [10] 张小冰,郝建平,裴雁曦,等. 辐射诱变甜荞高产突变体过氧化物酶活性及其同工酶的研究[J]. 华北农学报,1998,13(1): 71-73.
- [11] 胡书能,万贤国. 同工酶技术及应用[M]. 长沙:湖南科技出版社,1985:104-110,166-170.
- [12] 宋志文,曹 军,杨 光. 东北地区野豌豆属植物过氧化物酶同工酶研究[J]. 植物研究,2001,21(1): 131-135.
- [13] 梁慧敏,孙吉雄. 几种暖季型草坪草过氧化物酶同工酶分析[J]. 中国草地,1996(4): 40-42.

Effect of Ar^+ Injection on Peroxidase Activity of Japonica Rice

Yang Mei-ying¹, ZANG Xin-yu², CHEN Feng-sheng³, Wu Zhi-hai¹

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100;

3. Agricultural Technology Extension Station of Huancheng Commune, Yushu City 130400, China)

Abstract: The effect of Ar^+ injection at six different dosages on peroxidase (POD) activity and isoenzyme expression of japonica rice was analyzed by using polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the sensitivity of three rice varieties to ion implantation were different as the dosage increased. The POD activity of the injected rice was higher than that of the control and the value at 3000 dose was the highest. It at first increased and then decreased as the dosage increased at the tested range. The diversity of enzymogram band of 'Nongda 7' was broader than that of 'Nongda 13' and 'Qiutianxiaoding', but the band color at 3000 dose showed darker than that at other dosages.

Key words: Japonica rice; Ar^+ injection; Peroxidase