

甘蓝型油菜 5个同质 CMS系及其保持系、 杂交种的同工酶比较^{*}

于澄宇¹, 胡胜武¹, 郭蔼光², 张春红¹, 路 明³

(1. 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100; 3. 民建中央, 北京 100027)

摘 要: 以甘蓝型油菜 5种同质异核不育系及相应保持系、5种恢复系、15种杂交 F₁为试材, 进行酯酶(EST)、过氧化物酶(POD)同工酶分析。结果表明: 各不育系与其近等基因系——保持系的 EST、POD同工酶谱较为相似, 而 5种不育系间及 5对不育系与保持系间的差异无规律可循。聚类结果表明聚在一起类群均有亲缘关系。同工酶表现为明显的共显性, EST尤为明显, 不同材料具有各自特殊条带, 杂种 F₁综合了双亲条带, 因而也有与每一亲本不同之处。说明共显性的 EST等同工酶可用于分析亲缘关系、建立品种指纹及鉴定杂交种纯度等。

关键词: 甘蓝型油菜; CMS; 同工酶

中图分类号: S565.403 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2003)01-0005-03

Comparison of Some Isozymes among Five CMS Lines with Same Cytoplasm and Their Maintainers in *Brassica napus* L.

YU Cheng-yu¹, HU Sheng-wu¹, GUO Ai-guang², ZHANG Chun-hong¹, LU Ming³
(1. College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China; 3. The Central Committee of the China National Democratic Construction Association, Beijing 100027, China)

Abstract The zymogram of esterase and peroxidase are examined using PAGE in 5 cytoplasm male sterility lines with same cytoplasm, their maintainer, and their hybrid, those are all *B. napus* L. The results showed that every sterile line had similar isozyme pattern to its maintainer, and that their differences had no rule. These materials and their progenies that had similar pattern were clustered in near groups. These isozymes were codominant, especially in EST. Every accession has specific bands. Nearly every hybrid had all its parent's bands, so it was different from its parent. Such codominant isozymes as EST and POD can be used to determine the parentage of different accessions, to construct their fingerprint, and to examine the purity of the hybrid.

Key words *Brassica napus* L.; CMS; Isozyme

油菜是较早成功利用细胞质雄性不育(CMS)三系配套来获得产量杂种优势的作物之一, 其不育系的遗传规律、分子生物学机理、生理生化特征等方面研究一直是其重要研究内容。生理生化方面研究基于一种理论, 即形形色色的不

育材料的发生过程必然要通过各自特定的生理生化过程来实现。油菜中这一方面研究并不多, 王保仁^[1]、刘志松^[2]对 Polima CMS类型的湘矮 A 的过氧化物酶(POD)同工酶等进行分析, 发现两系间 POD 条带存在差异, 但结论不同。李殿荣^[3]对

^{*} 收稿日期: 2002-10-22
基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2000-SM12)
作者简介: 于澄宇(1973-), 男, 助理研究员, 生物化学与分子生物学专业硕士生, 从事油料作物遗传育种研究, Tel: 029-7082242。

陕 2A 陕 2B及杂交种同工酶的酯酶 (EST)进行研究,也找到其区别特征条带。但 CMS的发生机理较为复杂,若仅用个别不育系与保持系比较,很容易得出各种互不相同的结论。本文以甘蓝型油菜 5种同质异核不育系及相应保持系为试材,进行同工酶分析,研究是否可找到在不同核背景下细胞质不育与可育同工酶差异的普遍规律。同工酶在杂交种中的表现及是否可用同工酶分析不育系×恢复系配制杂交种之间的亲缘关系、寻找杂交种“指纹”并用于品种纯度鉴定等。

1 材料与amp;方法

采用 5种甘蓝型油菜不育系 (均系用陕 2A 转育的稳定不育系)及其保持系、5种恢复系,其材料来源见表 1

表 1 材料及其来源

Table 1 Materials and their sources				
不育系及保持系 Sterile line and maintainer		来源 Source	恢复系 Restorer	来源 Source
A1	B1	L451	C1	L161
A2	B2	L89	C2	秦油 3号 Qinyou No. 3
A3	B3	L656	C3	L227
A4	B4	D89	C4	秦油 1号 Qinyou No. 1
A5	B5	中双 2号 Zhongshuang No. 2	C5	豫油 5号 Yuyou No. 5

各材料种子在 25℃、光照下水培 7日,称取其全株幼苗各 1 g,加入 1 mL缓冲液 (0.1 mol/L Tris·Cl, pH 7.0,含 2-巯基乙醇 0.5%),匀浆,10 000 r/min离心 10 min,取上清液加甘油 2滴,−20℃存放。花期取各材料 2~3 mm花蕾 0.3 g,加 200μL缓冲液,处理过程同上。用 3%浓缩胶和 8% (EST)、7% (POD)分离胶的 PAGE不连续缓冲电泳系统,上样量 30μL,先稳压 80 V 1h,再升压至 250V 3~4 h。染色:EST (E. C. 3. 1. 1. 2)用 Fast Blue RR和 α-乙酸萘酯 β-乙酸萘酯; POD (E. C. 1. 11. 1. 7)用 vG H₂O₂和联苯胺。显色后用 Tannon-GIS凝胶成像系统扫描存储。酶谱根据条带相对前沿迁移率编号为 A_{xx}。用 A2、A4、A5与 5种恢复系配制 15种杂交组合,也分析其同工酶。以 1 0表示某一条带的有无,输入电脑。用 RAPDistance^[5]、PHYLP的 Neighbor^[6]等软件分别进行 Dice系数求解、UPGMA聚类和绘图。

2 结果与分析

2.1 不育系和保持系的过氧化物酶同工酶的比较

由图 1可见,子叶期 POD同工酶有 4~8条带,迁移率均较小,分布于 3个区域。最前端的 A₅₉带只在 A3、A4中出现,但由于受 PAGE分辨率所限,不太清晰。A1有 5条带,比 B1缺少 A₂₃、A₅₉; A2与 B2的 6条带相同; A3有 6条带,比 B3多了一条 A₂₃带; A4只有 4条带,比 B4缺少 A₀₄; A5有 5条带,比 B5多 1条 A₁₈带。可见各个不育系 POD相互不同,而与相应保持系差别也各异。与 EST相比,POD条带少,分布集中,谱型差异不易观察,因此更难找出 5对两系间的普遍规律。



图 1 子叶期不育系与保持系的 POD

Fig. 1 The POD of male sterile lines and maintainers (from left A1. B1. A2. B2. A3. B3. A4. B4. A5. B5)

2.2 不育系和保持系的酯酶同工酶的比较

5对不育系、保持系表现出 10多条 EST同工酶带,大致分布于 5个不同的区域。不同材料之间部分条带有多态性。子叶期:5种不育系酶谱不同,保持系与相应的不育系酶谱较为相似。A3、B3、A4、B4、A5、B5中均有 A₇₂带,而 A1、A2、B1、B2中没有, A4、B4近阳极端的一组条带与其它材料不同,其 A₂₅、A₂₉带与其它材料中的虽位置稍有不同,但似有对应关系,下文所述其杂交种中此 2条带消失,而出现 A₂₃、A₂₆,即可说明这一点。花期:2 mm蕾中 EST分布趋势与子叶期的有相同之处,也有几个区域,但其整体迁移率增大,前端 A₇₇带活性很强,以至染色过度,染料结片,容易脱落。谱型与子叶期有差别。A1、B1中条带少,活性也减弱; A2比 B2缺少 A₈₀带; A3比 B3多 A₈₀带; A4、B4中均有 A₆₅带; A5、B5中都有 A₈₀带。总的看来,各不育系与其近等基因系——保持系的 EST同工酶酶谱较为相似,而 5种不育系间及 5对不育系与保持系间的差异无规律可循。

2.3 子叶期不育系、恢复系及其 F₁ 的 EST和 POD分布规律

比较 A2 A4 A5三种不育系与 5个恢复系所配 15种杂交组合 F₁ 与其双亲的酶谱(图 2)。结果表明 EST和 POD同工酶在 F₁ 中总体呈现共显性,双亲的大多数酶带在 F₁ 中均可见到,尤以 EST为甚,POD条带少,规律不很明显。对于 EST,只在 A5* C5中发现一条双亲均无的 A₇带,此即一般所谓“杂种带”,说明油菜 EST单体形式较多,一般也不形成异源二聚体;仅在 A4* C4 F₁ 中发现双亲均有 A₂₅ A₂₉,而 F₁ 没有,却出现与其它材料中相同的 A₂₃ A₂₆,说明 A₂₅ A₂₉分别与 A₂₃ A₂₆带是同一基因座的产物,这一现象笔者在其它试验中也曾发现,产生原因可能是某种分子修饰机制。

从图 2可见,各杂交种的 EST酶谱为双亲条带的互补型,由于亲本各自有特殊带,其 F₁ 带型更复杂,兼有双亲之特征,且各 F₁ 也互不相同。如 A4* C1有 C1的 A₇₆和 A4的 A₇₂,而 A4* C4则有 C4的 A₇和 A4的 A₇₂等。

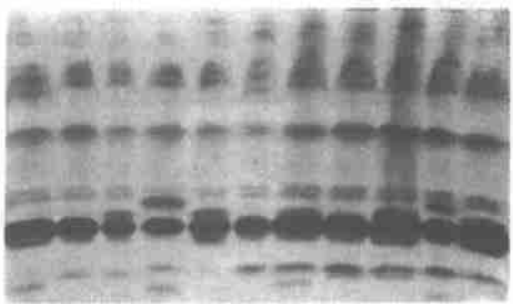


图 2 A4与恢复系、F₁ 的 EST
Fig. 2 The EST of A4, restorers and their F₁
(from left C1, C2, C3, C4, C5, A4, A4* C1, A4* C2, A4* C3, A4* C4, A4* C5)

2.4 聚类分析

按上述所得 EST POD数据进行聚类(图 3)。C1与 A4酶谱较为相似,故聚为一类。A5 C5 A2也相似,与 A2* C5聚在一处。C4由于具有特殊条带,并传递给其 3种 F₁,所以这 4者聚为一类。其它同在一起的类群均有较近的亲缘关系。可见共显性的 EST POD等同工酶可用于亲缘关系分析。

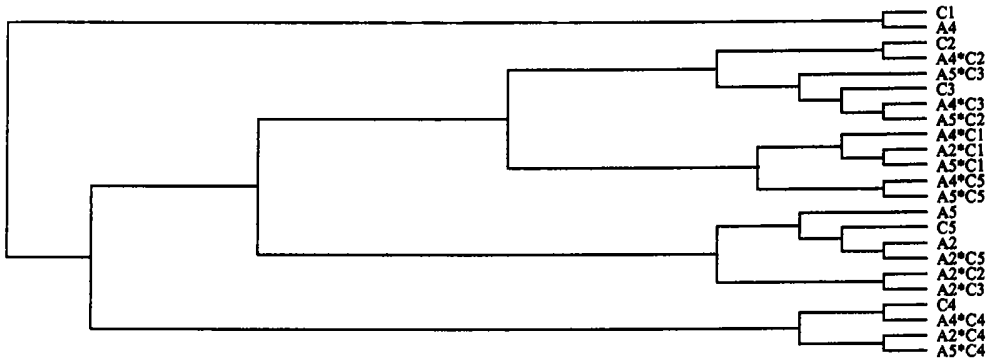


图 3 23种材料 UPGMA聚类图
Fig. 3 The dendrogram of these 23 materials clustered by UPGMA

3 讨论

细胞质不育系与保持系的核基因无甚差异,其遗传差异主要在于二者具有不同类型的细胞质,某些线粒体基因异常。但线粒体编码同工酶基因不多,主要是一些 ATP酶、NADH脱氢酶、细胞色素氧化酶,至今并没有发现 CMS与同工酶有连锁关系。不育系与保持系的同工酶既受同核控制,又受异质的影响,质核互作不可忽视。用 1对不育系和保持系去研究 CMS与同工酶的关系,了解的只能是这 1对材料的一些代谢差异。并不能说明与 CMS有关,只有用同一细胞质而异核的多种不育系和其对应保持系做比较,才有可能发现

这种细胞质与核之间的互作。所以各种不同 CMS类型的花蕾 POD、SOD、细胞色素氧化酶等差别有共同规律,而在非花器官中则不会有。刘忠松^[5]的结果也显示,多种植物 CMS两系非花器官的多种同工酶,19项研究无差异,18项研究有差异。本文研究表明不同核背景对同一 CMS类型的不育系非花器官同工酶表达影响不同,有些使其酶带数目增加,有些却使其减少,并无规律可循。用酯酶同工酶既能区分不同品种,也能区分杂交种与其亲本,又能追溯后代的系谱来源。笔者在研究中发现,油菜子叶期全株 EST条带数目多、多态性好、活性较强、酶谱清晰、表达比较稳

(X_3 , $P_3 = -3.8129$)。其中单株叶片数(X_7)、株高(X_1)、茎粗(X_2)、单株分枝数(X_8)对产量贡献作用大,节间数(X_3)、节间长(X_4)成为限制产量的主要因子。决策系数大小排序依次为: $R^2_{(2)} > R^2_{(8)} > R^2_{(6)} > R^2_{(5)} > R^2_{(1)} > R^2_{(7)} > R^2_{(4)} > R^2_{(3)}$,且 $R^2_{(3)} < 0$,表明茎粗、单株分枝数对产草量的提高综合作用大,而节间数限制作用明显。因此,在育种材料选择和获取高产方面尽量提高茎粗、单株分枝数,限制节间数,基本保持株高。

3.4 利用简单相关、偏相关和通径分析等不同研究方法分析了影响苜蓿单株产草量相关性状间的关系。简单相关系数只反映各性状直接与间接效应的代数和,而对于结果性状影响较小的一些性状效应容易被其他性状的间接效应所掩盖。因此当多个性状同时影响某一性状,而且这些性状彼此间又存在相关关系时,应尽可能多研究几个性状,并采用通径分析等统计方法,才有助于使问题更加清楚明了。

3.5 本研究结果与前人研究结果基本一致,但均有不同之处。George研究结果表明,株高、单株分枝数对产草量的提高起了巨大的作用,节间数、叶

片数作用较小^[8]。Frakes研究认为株高、单株分枝数主要通过间接作用影响产量^[9]。本文结果表明,茎粗对产草量作用最大,其次是株高、单株分枝数。节间数作用较小取得了一致的共识。

参考文献:

[1] 莫惠栋. 农业试验统计 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984. 537~ 545.

[2] 杨允菲, 葛 滢. 纤毛鹅观草种群籽粒产量性状相关因素的多元分析 [J]. 草业科学, 1990, 7(2): 47~ 51.

[3] 许广波, 吕龙石. 影响田间持水量主要因子的通径分析 [J]. 延边大学农学学报, 1997, 19(4): 242~ 245.

[4] 张慧林, 郭亚宁. 用奶牛乳房性状预测产奶量的研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(5): 44~ 47.

[5] 袁志发, 周静芋. 决策系数—通径分析中的决策指标 [J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(5): 129~ 133.

[6] 李拥军, 闵继淳. 留种苜蓿单株粒重与相关性状的通径分析 [J]. 草地学报, 1996, 4(2): 141~ 147.

[7] George H L Liang, Willam A. Riedl. Agronomic Traits Influencing Forage and Seed Yield in Alfalfa [J]. Crop Sci, 1964, (2): 394~ 396.

[8] Frakes R V, Davis R L. The breeding behavior of yield and related variable in alfalfa. II . Associations between characters [J]. Crop Sci, 1961, 3: 207~ 209.

(上接第 7 页)

定、品种内单株间重现性较好,分析方法简单易操作、成本也低,是一种比较理想的遗传标记方法,也可以与其它方法联合应用。因此对于作物品种指纹图谱构建、品种保护、纯度检验等工作具有较强的实用价值。

参考文献:

[1] 王保仁, 常桂菊, 胡能书, 等. 湘矮型油菜“三系”及其杂交种过氧化物酶同工酶的初步研究 [J]. 湖南农业科技, 1980, (6): 16~ 21.

[2] 刘忠松, 官春云. 甘蓝型油菜玻里马细胞质雄性不育系与保

持系的生化比较 [J]. 中国油料, 1990, (3): 1~ 5.

[3] 李殿荣, 王保仁. 同工酶谱分析鉴定杂交油菜菜油 2 号种子纯度技术研究 [J]. 陕西农垦科技, 1992, 2(22): 2~ 8.

[4] 刘忠松, 官春云, 陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 50~ 75.

[5] Armstrong J. S., Gibbs A. J., Peakall R. *et al.* The RAPDistance Package [CP]. 1994, <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>.

[6] Felsenstein J. PHYLIP, version3. 6a [CP]. <http://evolution.genetics.washington.edu/>.

[7] Roderic D. M. Treeview, version1. 5 [CP]. 1998, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.