

甘蓝型油菜显性核不育系的同工酶和蛋白质分析*

于澄宇¹, 胡胜武¹, 郭蔼光², 张春红¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以甘蓝型油菜显性细胞核不育材料 Shaan-GM S 的转育系 220AB 和对照 (6CA × 220) F₁ 为试材, 分析了不育株和可育株不同大小花蕾及其雄蕊中同工酶和水溶性蛋白的电泳图谱。结果显示: 与可育株的花蕾和不育株小花蕾及其雄蕊相比, 不育株较大花蕾及其雄蕊的酯酶、水溶性蛋白条带数目减少, 一些条带分子迁移率增大; 两种不育类型花蕾中过氧化氢酶谱差别不大; 220A 大花蕾雄蕊的 α -淀粉酶增加了 5 条新带, 在 (6CA × 220) F₁ 不育株的大花蕾雄蕊中, α -淀粉酶也增加了 2 条新带。说明甘蓝型油菜显性核不育的发生过程与雄蕊中脂类、蛋白质和糖代谢异常有关。

[关键词] 甘蓝型油菜; 显性细胞核不育; 同工酶; 蛋白质

[中图分类号] S565 403 7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)06-0071-04

Shaan-GM S 是 1994 年发现的甘蓝型油菜核不育材料, 经过多年遗传研究, 确认其属于显性核不育类型^[1,2], 该材料在杂种优势利用、群体轮回选择改良方面具有重要的应用潜力, 系统研究其遗传规律和代谢特征是重要的基础工作。在 Shaan-GM S 的鉴定和选育过程中, 本课题组采用连续回交方法, 育成了若干不同遗传背景的两用系, 群体内可育株与不育株的遗传背景高度一致, 为近等基因系 (near-isogenic line), 是分析核不育生理生化特性的理想材料。雄性不育与正常可育植物花药中物质和能量代谢方面的差异, 是形成花药或花粉畸形、败育的内因所在, 为此, 国内外均试图从生理、生化代谢角度, 探讨雄性不育发生过程的物质基础。但不同不育类型的败育过程有其相似的一面, 也有各自的特殊性。本研究分析比较了双显性核不育材料 Shaan-GM S 和 6CA^[3] 的同工酶和蛋白质电泳图谱, 以期对雄性不育的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为甘蓝型油菜 Shaan-GM S 转育系 220AB (回交 6 代) 和对照 (6CA × 220) 的 F₁ (6CA

完全不育系由上海农科院李树林研究员馈赠)。分别选取两种群体中不育株和可育株各 5 株混合采样, 在花期采其无柄叶片和花序, 用冰壶带回实验室, -40℃ 存放。再从花序上取长度为 1~5 mm 的花蕾及小蕾 (2~3 mm)、大蕾 (4~5 mm) 的雄蕊 (不育株上更大的花蕾已开始明显败育、雄蕊干缩, 故未分析), 取材部位及编号见表 1。

1.2 方法

取 0.2 g 鲜样, 加 200 μ L 缓冲液 (pH 7.0, 0.1 mol/L Tris-HCl, 体积分数 0.5% 的 2-巯基乙醇), 匀浆, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液加甘油 2 滴, -20℃ 存放。电泳采用 30 g/L 浓缩胶和 70 g/L 分离胶的不连续缓冲 PAGE 系统, 分析过氧化氢酶 (CAT) 和 α -淀粉酶 (α -AMY) 时, 凝胶中预加入 5 g/L 可溶性淀粉。上样量 30 μ L, 先稳压 80 V 电泳, 待前沿进入分离胶后再升压至 250 V 电泳 3~4 h。染色时酯酶 (EST) 用 Fast Blue RR, α -乙酸萘酯和 β -乙酸萘酯, 过氧化氢酶用 H₂O₂ 和 KI, α -淀粉酶用 E-KI, 水溶性蛋白 (Prot) 用 Coomassie Bright Blue R 250。显色后用 Tannon-GIS 凝胶成像系统扫描存储。酶谱记录条带相对前沿的迁移率 (Rf), 参考黄原^[4]的方法进行分析。

* [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目 (2000SM 12); 西北农林科技大学科研专项 (2000-48)

[作者简介] 于澄宇 (1973-), 男, 陕西岐山人, 硕士, 主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: yuchyu-001@163.com

表 1 取材部位编号

Table 1 Parts of materials and their codes

编号 Code	取材部位 Part of material	编号 Code	取材部位 Part of material
A 1	220A 的 1 mm 花蕾 1 mm long buds of 220A	Bb	220B 大花蕾的雄蕊 Stamens of 220B's large bud
A 2	220A 的 2 mm 花蕾 2 mm long buds of 220A	A	220A 的无柄叶片 Sessile leaves of 220A
A 3	220A 的 3 mm 花蕾 3 mm long buds of 220A	B	220B 的无柄叶片 Sessile leaves of 220B
A 4	220A 的 4 mm 花蕾 4 mm long buds of 220A	A 1'	(6CA × 220) F ₁ 不育株的 1 mm 花蕾 1 mm long buds of sterile plant in (6CA × 220) F ₁
A 5	220A 的 5 mm 花蕾 5 mm long buds of 220A	A 2'	(6CA × 220) F ₁ 不育株的 2 mm 花蕾 2 mm long buds of sterile plant in (6CA × 220) F ₁
B 1	220B 的 1 mm 花蕾 1 mm long buds of 220B	A 3'	(6CA × 220) F ₁ 不育株的 3 mm 花蕾 3 mm long buds of sterile plant in (6CA × 220) F ₁
B 2	220B 的 2 mm 花蕾 2 mm long buds of 220B	A 4'	(6CA × 220) F ₁ 不育株的 4 mm 花蕾 4 mm long buds of sterile plant in (6CA × 220) F ₁
B 3	220B 的 3 mm 花蕾 3 mm long buds of 220B	A 5'	(6CA × 220) F ₁ 不育株的 5 mm 花蕾 5 mm long buds of sterile plant in (6CA × 220) F ₁
B 4	220B 的 4 mm 花蕾 4 mm long buds of 220B	A s'	(6CA × 220) F ₁ 不育株小花蕾的雄蕊 Stamens of sterile plant's little bud in (6CA × 220) F ₁
A s	220A 小花蕾的雄蕊 Stamens of 220A's large bud	A b'	(6CA × 220) F ₁ 不育株大花蕾的雄蕊 Stamens of sterile plant's large bud in (6CA × 220) F ₁
A b	220A 大花蕾的雄蕊 Stamens of 220A's large bud	B s'	(6CA × 220) F ₁ 可育株小花蕾的雄蕊 Stamens of fertile plant's little bud in (6CA × 220) F ₁
B s	220B 小花蕾的雄蕊 Stamens of 220B's little bud	B b'	(6CA × 220) F ₁ 可育株大花蕾的雄蕊 Stamens of fertile plant's large bud in (6CA × 220) F ₁

2 结果与分析

2.1 酯酶(EST)同工酶的变化

甘蓝型油菜花蕾的 EST 同工酶条带清晰可见者有 10 多条, 相对于子叶期^[5]变化较大, 靠近阴极端的条带活性变弱, 而近阳极的, 尤其迁移率较大的条带活性很强, 以致染色过度, 色料聚集太厚, 局部脱落。

220AB 可育株不同大小花蕾及其雄蕊的 EST 谱型近乎相同。不育株 1~ 3 mm 花蕾与可育株谱型相同, 4 mm 花蕾缺少 Rf_{0.725} 带, 而其 Rf_{0.242} 和 Rf_{0.403}

带与 Rf_{0.210} 和 Rf_{0.371} 带相对应, 可能是因分子修饰而位置前移所致。小花蕾的雄蕊缺少阴极端 Rf_{0.210} 带, 大花蕾的雄蕊缺乏 Rf_{0.210} 和 Rf_{0.371} 带, 其他阳极端带活性减弱。无柄叶片的 EST 条带比花蕾中的活性强, 而不育株与可育株的带型完全相同(图 1)。

(6CA × 220) F₁ 的花蕾中 EST 谱型基本相似, 不育株的 4 mm 花蕾中缺少了 Rf_{0.619} 和 Rf_{0.667} 2 条带。而不育株的雄蕊中 Rf_{0.238}, Rf_{0.395}, Rf_{0.619} 和 Rf_{0.667} 4 条带消失, 大花蕾的雄蕊比小花蕾的雄蕊进一步缺失了 Rf_{0.000}, Rf_{0.825} 和 Rf_{0.984} 3 条带(图 2)。

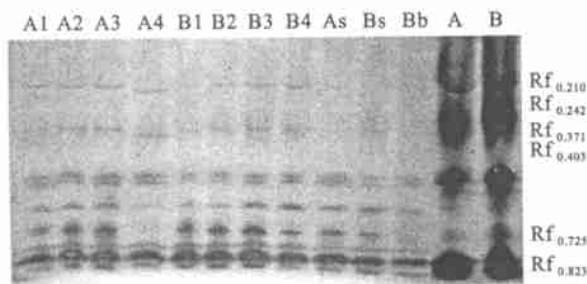
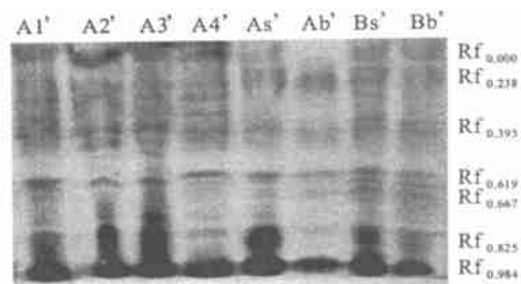


图 1 220AB 的酯酶同工酶

Fig 1 EST of 220AB

2.2 水溶性蛋白(Prot)的变化

甘蓝型油菜花蕾的水溶性蛋白电泳条带较多, 近阴极的数目少而含量多, 近阳极的数目较多却含量很少。220AB 可育株的大小花蕾间 Prot 差异不大, 而不育株的 4 mm 花蕾蛋白质降解, 尤其阳极端

图 2 (6CA × 220) F₁ 的酯酶同工酶Fig 2 EST of (6CA × 220) F₁

含量锐减; 不育株雄蕊中的水溶性蛋白含量显著低于可育株, 条带数目也相应减少。大花蕾雄蕊中对应 Rf_{0.150} 的条带前移, 可能系部分降解所致(图 3)。不育株与可育株无柄叶片的蛋白质差别不大。(6CA × 220) F₁ 不育株小花蕾雄蕊中的蛋白质基本正常, 大

花蕾雄蕊中对应的 $Rf_{0.086}$ 带前移到 $Rf_{0.100}$ 位置, Rf 值更大的带基本消失(图4)。

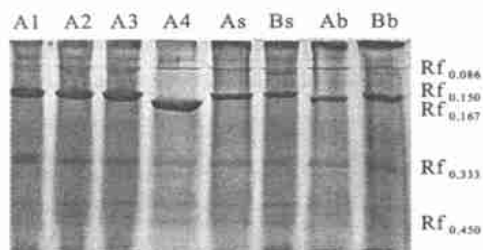


图3 220AB的水溶性蛋白图谱

Fig 3 Soluble protein of 220AB

2.3 过氧化氢酶(CAT)同工酶的变化

甘蓝型油菜花蕾中共出现8条 Rf 值不同的CAT条带(图5), 分布于3个区域。220AB的大蕾雄蕊中出现 $Rf_{0.211}$ 带, 可能系对应的 $Rf_{0.200}$ 带因分子修饰而产生。220AB不育株中1, 3和5mm花蕾的

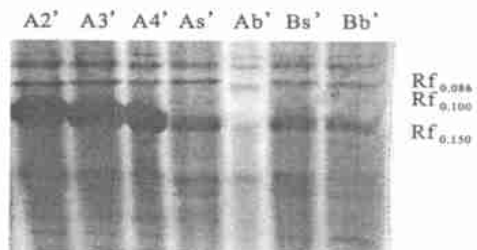


图4 (6CA × 220)F₁的水溶性蛋白图谱

Fig 4 Soluble protein of (6CA × 220)F₁

CAT带型相同, 不育株大花蕾雄蕊比其花蕾缺少 $Rf_{0.145}$ 和 $Rf_{0.200}$ 条带, 与可育株雄蕊相比, 酶活性稍弱, 但差异不显著。(6CA × 220)F₁ 中, 5mm花蕾的CAT比1和3mm花蕾中的酶活性稍强, 而带型相同。

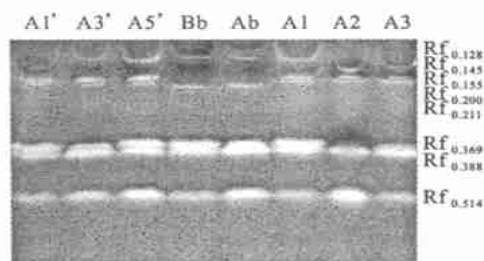


图5 (6CA × 220)F₁和220AB的过氧化氢酶

Fig 5 CAT of (6CA × 220)F₁ and 220AB

2.4 α-淀粉酶(α-AMY)同工酶的变化

甘蓝型油菜花蕾及其雄蕊的αAMY呈现出 $Rf_{0.169} \sim Rf_{0.530}$ 共12条带(图6)。大花蕾雄蕊中的谱带变化极显著, 220B有4条带, 而220A则有8条之多, 其中出现了 $Rf_{0.229}$, $Rf_{0.325}$, $Rf_{0.349}$, $Rf_{0.386}$ 和 $Rf_{0.469}$ 5条新带; (6CA × 220)F₁ 中不育株大花蕾雄蕊也比可育株雄蕊增加了 $Rf_{0.229}$ 和 $Rf_{0.386}$ 2条αAMY带。这一变化说明, αAMY分子形式的多元化及其大量合成, 导致了能源贮藏物淀粉的分解, 与雄性不育有密切关系。

3 结论与讨论

刘忠松等^[6]总结了植物雄性不育的生化特征, 认为不育株与可育株间多种同工酶有明显不同, 且其变化与败育时期对应。雄性不育基因表达产生了一系列次级效应, 其中包括同工酶种类和数量的变化, 导致细胞代谢发生逆转, 引发花药各种营养物质的降解或消减。水稻、小麦和玉米不育株的普遍特征是早期花药的POD和CAT活性显著降低, H_2O_2 积

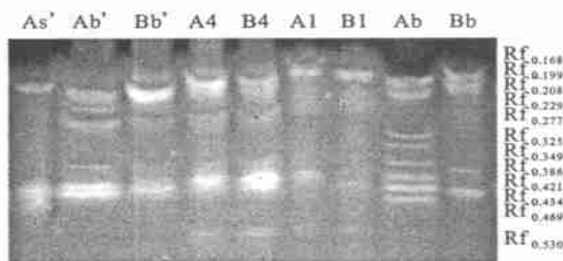


图6 (6CA × 220)F₁和220AB的α-淀粉酶

Fig 6 αAMY of (6CA × 220)F₁ and 220AB

累和膜脂过氧化增强^[6]。张鲁刚等^[7]研究表明, 大白菜细胞质不育系与保持系EST差异最大, 前者的αAMY活性强于后者。王亚馥等^[8]研究表明, 大白菜两用系中不育株花蕾的Prot种类显著少于可育株, POD酶带则相反。在甘蓝型油菜中, 刘忠松等^[9]研究认为, 细胞质不育系花蕾的POD弱于保持系, 唐章林等^[10]、张学昆等^[11]发现, 细胞核+细胞质双重不育系花蕾的CAT活性比保持系高, 二者的EST也有差异, 双重不育系的含糖量比保持系高, 而其蛋白质含量比保持系低。

本研究结果则表明, 在相近的遗传背景下, 220AB与(6CA × 220)F₁花蕾及其雄蕊同工酶表达既有相似性, 又有区别。在不育发生过程中, 花蕾及雄蕊中酯酶和可溶性蛋白条带数目减少, 光密度降低, 而αAMY条带数目明显增加, 说明败育过程与脂类、蛋白质和糖代谢异常有关, 营养供应不足是败育的重要影响因素之一。

两种显性核不育材料花蕾的发育过程相似, 小于3mm花蕾的雄蕊外观均正常, 稍大花蕾雄蕊开

始表现生长滞后,大于 5 mm 的花蕾雄蕊干缩。本研究发 220AB 和 (6CA × 220) F₁ 不育株的 EST, CA T, αAM Y 和 P_{rot} 的变化与雄蕊外观发育基本一致,明显转变点在花蕾长度为 3~ 4 mm 时。甘蓝型油菜 2 mm 左右花蕾正处于花粉母细胞减数分裂期^[12],而 3~ 4 mm 花蕾的小孢子发育正是四分体-单核期。所以,这两种材料败育可能就发生于这一时期,这与余凤群^[13]、杨光圣等^[14]报道的宜 3A、S45A 和 9012A 等比较接近,而相比一般细胞质不育系发

生要晚一些,但却比其败育更迅速、更彻底。

花药之外器官组织中同工酶的差异或有或无^[6],原因在于不同的不育类型或不同作物中代谢各异,非花组织同工酶与不育并无必然的对应关系,分析对象的遗传背景是否一致、组织发育是否同步,也是获得可靠结果的决定因素。本研究结果显示,不育株与可育株叶片的 EST 和 P_{rot} 无差异,但与花蕾中情况不同,这说明花蕾中不育性状表达与同工酶变化有密切关系。

[参考文献]

- [1] 胡胜武,于澄宇,赵会贤,等.甘蓝型油菜新型不育材料Shaan-GM S 的遗传研究[J].西北植物学报,1999,19(6): 63- 67.
- [2] Hu SW, Yu C Y, Zhao H X, et al. The discovery of a new kind of male sterility accession in *B. rassica napus* L. and a primary genetic study [J]. Acta A riculture Boreali-O ccidentalis Sinica, 2000, 9(3): 90- 94.
- [3] 李树林,钱玉秀,吴志华.甘蓝型油菜细胞核雄性不育遗传规律探讨及其应用[J].上海农业学报,1985,1(2): 1- 12.
- [4] 黄 原.分子系统学——原理、方法及应用[M].北京:中国农业出版社,1998. 255- 270.
- [5] 于澄宇,胡胜武,郭蔼光,等.甘蓝型油菜 5 个同质CM S 系及其保持系、杂交种的同工酶比较[J].西北农业学报,2003,12(1): 5- 7.
- [6] 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,2000. 50- 75.
- [7] 张鲁刚,柯桂兰.大白菜胞质雄性不育系和保持系同工酶及可溶性蛋白质分析[J].西北农业学报,1999,8(4): 67- 70.
- [8] 王亚馥,胡昌勤,安旺盛.大白菜雄性可育株与雄性不育株花苞的核酸、蛋白质、酶的初步分析[J].兰州大学学报(自然科学版),1984,20(1): 90- 96.
- [9] 刘忠松,官春云.油菜雄性不育性的研究 I. 甘蓝型油菜波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- 4.
- [10] 唐章林,张学昆,朱利泉,等.甘蓝型油菜雄性不育的酶活性和同工酶分析[J].西南农业大学学报,1999,21(4): 311- 316.
- [11] 张学昆,李加纳,唐章林,等.油菜双重不育系花蕾中糖和蛋白质代谢特点[J].西南农业大学学报,2000,22(2): 105- 107.
- [12] 李懋学,张赞平.作物染色体及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1996. 218- 223.
- [13] 余凤群.甘蓝型油菜几个雄性不育系花药的细胞形态学观察[J].武汉植物研究,1990, (8): 209- 215.
- [14] 杨光圣,瞿 波,傅廷栋.三个甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系小孢子发生的细胞学观察[J].华中农业大学学报,1999,18(6): 520- 523.

Electrophoretic analysis of the isozyme and soluble proteins of two dominant genic male sterility lines in *B. rassica napus* L.

YU Cheng-yu¹, HU Sheng-wu¹, GUO Ai-guang², ZHANG Chun-hong¹, LUM ing¹

(1 College of Agronomy; 2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The electrophoresis patterns of esterase (EST), soluble protein (Prot), catalase (CA T), and α-amylase (αAM Y) in different size buds and stamens of two dominant genic male sterile (DGM S) accessions, named 220AB (derived from Shaan-GM S) and (6CA × 220) F₁, were produced using PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). The number of esterase's and soluble protein's bands in the 3~ 4 mm long buds and their stamens were less than those in smaller buds of sterile plants and those in fertile plants, both in 220AB and (6CA × 220) F₁. Some bands of EST, Prot, and CA T moved forward and their R_f values became bigger because the molecular were modified. The zymograms of CA T were similar between the two DGM S types. αAM Y showed some new bands in the stamens of sterile plant's 4 mm long buds in 220AB and (6CA × 220) F₁. The results indicated that abnormal metabolism of lipid, protein and saccharide occurred in the sterile stamens and caused the male sterility.

Key words: *B. rassica napus* L.; dominant genic male sterility; isozyme; protein