

青花菜雄性不育系与保持系花蕾同工酶分析

李又华¹, 杨 暹², 罗志刚¹, 关佩聪²

(1 广东省深圳市农科中心 蔬菜所, 广东 深圳 518040; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法对青花菜雄性不育系及保持系花蕾的雄蕊、雌蕊、花萼和花瓣进行了过氧化物酶(POD)、过氧化物歧化酶(SOD)、多酚氧化酶(PPO)和儿茶酚氧化酶(CAO)同工酶分析。结果表明, 4种同工酶谱不仅在不育系与保持系之间有明显差异, 而且在不育系或保持系内的花蕾不同部位之间也有明显差异, 表现为花蕾的POD、CAO同工酶在不育系的谱带数多, 而保持系谱带数少, PPO、SOD同工酶则正好相反。4种同工酶在不育系与保持系之间的差异主要表现在雄蕊上。

关键词: 青花菜; 雄性不育; 同工酶; 花蕾

中图分类号: S635[°]9

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)01-0013-03

高等植物的雄性不育性在农作物杂种优势利用上具有重大的潜在价值, 因而引起人们的广泛关注^[1,4]。对雄性不育的机制, 已进行过多方面的探讨, 许多学者对玉米、小麦、水稻、萝卜、榨菜、大白菜等作物的雄性不育理化特性进行了广泛的研究^[2-5], 发现不育系与保持系在蛋白质和核酸等方面都存在差异, 而这种差异是由基因直接决定的, 因而对基因表达的产物——同工酶的研究和分析能直接推断基因的存在及表达规律。有关青花菜的生长发育规律、花球形成机理等方面, 笔者已进行了广泛的研究^[6], 而有关青花菜雄性不育机理的研究较薄弱, 本文通过探讨青花菜雄性不育系与保持系POD、SOD、PPO、CAO同工酶的关系, 对不育系和保持系作进一步的鉴定, 探讨雄性不育的败育机理。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的青花菜材料是本课题组经过多年选育而成的一对雄性不育系(S₄)和相应的保持系(Z₄), 在深圳市农科中心和华南农业大学蔬菜试验地进行。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备 取蕾期没有开花的花蕾, 按雄蕊、雌蕊、花瓣和花萼分解, 分别置于研钵中, 加入2 mL 0.1 mol/L pH 7.8的磷酸缓冲液, 在冰浴上研磨成匀浆, 在13 000 r/min、4℃的条件下离心20 min, 取上清液作供试酶液。

1.2.2 电泳 选用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法。分离胶的质量分数为7.5%, 浓缩胶质量分数为2.5%。每孔点样20 μL, 在4℃冰箱内电泳, 浓缩胶电流10 mA, 分离胶15 mA, 3 h完成电泳。

1.2.3 染色 POD采用联苯胺染色法^[3], SOD采用氮

蓝四唑(NBT)法^[3], PPO采用Schwenneson^[7]的方法, CAO采用胡能书等^[8]方法。酶带充分显色后照相。

2 结果与分析

2.1 POD同工酶

从图1(A)可看出, POD同工酶在不育系与保持系之间明显不同。不育系的雄蕊共检测出6条谱带, 而保持系的雄蕊只有4条谱带, 不育系比保持系的雄蕊多迁移率为0.290、0.390的两条谱带, 同时不育系的迁移率为0.256的谱带活性比保持系强; 不育系与保持系的雌蕊均有2条谱带, 但保持系的谱带活性比不育系强; 不育系与保持系的花瓣内均检测不到谱带; 在不育系与保持系的花萼中均具有3条谱带, 但保持系的谱带比不育系强。在不育系或保持系内, 雄蕊的谱带多且活性强, 其次是花萼, 再次是雌蕊, 而花瓣中没有谱带。可见, POD同工酶的谱带差异主要表现在雄蕊上。

2.2 SOD同工酶

从图1(B)可看出, 不育系的雄蕊共检测出3条谱带, 而保持系的雄蕊则有4条谱带, 不育系比保持系的雄蕊少1条迁移率为0.256的谱带, 同时不育系的迁移率为0.455、0.556的两条谱带活性比保持系弱; 不育系与保持系的雌蕊均有4条谱带, 但不育系的迁移率为0.256谱带活性比保持系强; 不育系与保持系的花瓣内均检测不到谱带; 在不育系与保持系的花萼中均具有3条活性基本上相同的谱带。在不育系内, 雌蕊的谱带多且活性强, 其次是花萼, 再次是雄蕊, 而花瓣中没有谱带; 而在保持系内, 以雄蕊和雌蕊的谱带多且活性强, 其次是花萼, 而花瓣中没有谱带。可见, SOD同工酶的谱带差异主要也表现在雄蕊上。

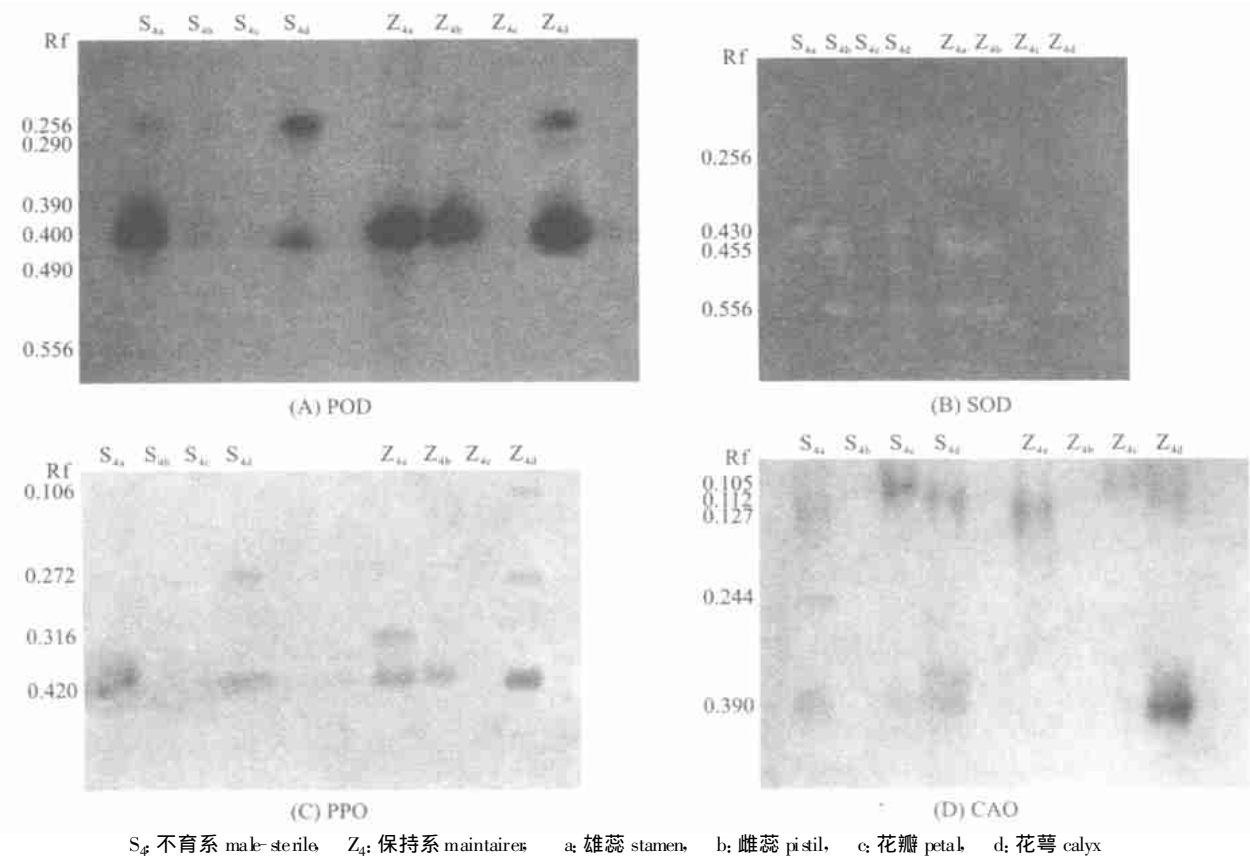


图 1 同工酶谱

Fig. 1 Isoenzymogram

2.3 PPO 同工酶

从图 1(C)可看出,不育系的雄蕊有 1 条谱带,而保持系的雄蕊则有 2 条谱带,不育系比保持系的雄蕊少 1 条迁移率为 0.316 的谱带;不育系的雌蕊没有谱带,而保持系的雌蕊有 1 条迁移率为 0.420 的谱带;不育系与保持系的花瓣内均没有发现谱带;不育系的花萼中有 2 条谱带,而保持系内则有 3 条谱带,多了 1 条迁移率为 0.106 的谱带.在不育系内,花萼的谱带最多,其次是雄蕊,而花瓣、雌蕊中没有谱带;而在保持系内,以花萼的谱带最多,其次是雄蕊,再次是雌蕊,而花瓣中没有谱带.可见,不育系和保持系的 PPO 同工酶有明显的差异,表现为不育系的谱带数少,而保持系的谱带多,主要的差异表现在雄蕊、雌蕊和花萼上.

2.4 CAO 同工酶

从图 1(D)可看出,不育系的雄蕊有 3 条谱带,而保持系的雄蕊只有 1 条谱带,不育系比保持系的雄蕊多 2 条迁移率为 0.244、0.390 的谱带;不育系和保持系的雌蕊均没有发现谱带;不育系的花瓣有 2 条谱带,而保持系比不育系少 1 条迁移率为 0.390 的谱带;不育系和保持系的花萼中均有 2 条谱带,但保持系的谱带活性比不育系强.在不育系内,以雄蕊的谱带最多,其次是花瓣和花萼,而雌蕊中没有谱带;而在保持系内,以花萼的谱带最多,其次是雄蕊和花瓣,而雌蕊中没有

谱带.以上结果表明,不育系和保持系的 CAO 同工酶有明显的差异,表现为不育系的谱带数多,而保持系的谱带数少,主要的差异表现在雄蕊、花瓣上.

3 讨论

有关雄性不育与同工酶的研究,前人多集中在 POD 和酯酶同工酶的研究.有关 POD 同工酶与不育系的关系,唐章林等^[9]分别在甘蓝型油菜上,梁燕等^[10]在结球白菜上曾做过一些研究,但研究结果不一,尚不能阐明 POD 与雄性不育的关系.杨晓云等^[11]进一步研究表明,不结球白菜保持系中 POD 同工酶酶带数多于不育系,且活性相对较强,但龚义勤等^[3]在萝卜上的研究结果正好相反.本试验结果与龚义勤等的结果基本一致,青花菜不育系的酶带数比保持系多,POD 同工酶的差异主要表现在雄蕊上.因此,初步认为雄蕊上 POD 同工酶酶带的增加与青花菜雄性不育系花的败育有关,而与雌蕊、花瓣、花萼上的 POD 同工酶的关系不甚密切.

龚义勤等^[12]认为,萝卜不育系与保持系花蕾的 SOD 同工酶酶谱无差异,不育系或保持系花蕾内各部分之间的谱带数也无差异,认为 SOD 同工酶与萝卜雄性不育花的败育无关.本试验表明,青花菜不育系的雄蕊的 SOD 同工酶谱带比保持系少 1 条,而花蕾内的雌蕊、花瓣和花萼的 SOD 同工酶在不育系与

保持系之间表达基本一致, 也即是在青花菜上雄性不育系花的败育与雄蕊 SOD 同工酶有关。

有关 PPO、CAO 同工酶与雄性不育关系的研究较少。本研究表明, 青花菜雄性不育系与 PPO、CAO 同工酶有关, PPO 同工酶表现为不育系的谱带数少, 而保持系的谱带数多, 主要差异表现在雄蕊、雌蕊和花萼上; CAO 同工酶则正好相反, 表现为不育系的谱带数多, 而保持系的谱带数少, 主要差异表现在雄蕊、花瓣上。

从以上结果可见, 雄性不育的败育机理在不同的作物上是有一定的差异, 一种同工酶不足以阐明雄性不育性, 只有多种生理指标加以综合考虑才能较准确地揭示雄性不育的机制。植物雄性不育是由一系列复杂的遗传、生理、生态结构原因造成的。酶是基因的产物, 是基因表达的结果, 因此酶在结构上的差异主要来源于基因, 按一个基因编码一个同工酶亚基的理论, 可以从同工酶的差异直接推测基因型的不同。因此, 从青花菜蕾期花器官的同工酶可推测出不育系和保持系的基因型不同, 在保持系中, 基因的表达是正常的; 在不育系中, 由于基因的不正常表达, 造成酶带的迁移率不同、数目的增加或减少、活性的增强或减弱, 从而导致一系列生理生化反应的差异, 干扰了正常的代谢, 引起新陈代谢的紊乱, 导致糖、蛋白质、内源激素等物质合成的减弱或停止^[2], 造成雄性不育。

参考文献:

[1] KAUL M L. Monographs on the theoretical and applied[M] .

New York: Springer Bedin Heidelberg, 1988. 126—132.
[2] 胡美华, 陈竹君, 汪炳良. 榨菜胞质雄性不育系及保持系过氧化物酶和酯酶同工酶的比较研究[J] . 浙江农业学报, 2000, 12(4): 201—205.
[3] 龚义勤, 汪隆植, 刘 联, 等. 萝卜雄性不育系和保持系的 POD 和 SOD 同工酶酶谱分析[J] . 中国蔬菜, 1995, 4: 24—26.
[4] 吕德彬, 常团结, 刘薇斌, 等. 普通小麦 K 型和 T 型雄性不育系花药同工酶研究[J] . 河南农业大学学报, 1998, 32(3): 208—212.
[5] 王淑华, 魏毓棠, 冯 辉, 等. 大白菜雄性不育株与可育株花蕾生理生化特性比较分析[J] . 沈阳农业大学学报, 1998, 29(2): 132—137.
[6] 杨 暹, 李德明. 氮锌营养与青花菜花球发育过程中核酸及钙调素的关系[J] . 园艺学报, 2001, 28(4): 312—316.
[7] SCHWENNESEN J, MIELKE E A. Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes[J] . Hortscience, 1982, 17(3): 366—368.
[8] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M] . 长沙: 湖南科技出版社, 1985. 102—104.
[9] 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谱分析[J] . 西南农业大学学报, 1999, 21(4): 311—316.
[10] 梁 燕, 王 鸣, 赵稚雅. 结球白菜同核异质雄性不育系同工酶研究[J] . 园艺学报, 1994, 21(3): 264—268.
[11] 杨晓云, 曹寿椿. 温度对不结球白菜波里马胞质雄性不育系育性影响的生化分析[J] . 园艺学进展, 1998, (2): 539—542.
[12] 龚义勤, 汪隆植, 徐 彦. 萝卜雄性不育系和保持系的花蕾同工酶分析[J] . 园艺学进展 1998, (2): 563—566.

Isoenzyme Analysis on Flower Bud of Male Sterile Line and Its Maintainer in Broccoli

LI You-hua¹, YANG Xian², LUO Zhi-gang¹, GUAN Pei-cong²

(1 Institute of Vegetable, Shenzhen Research Center of Agric. Sciences, Shenzhen 518040, China;
2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: By means of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis, isoenzymes of peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), polyphenolxide (PPO) and catechol oxidase (CAO) in the calyx, petal, stamen and pistil of broccoli flower buds male sterile line and its maintainer were analyzed. Results showed that isoenzyme pattern differences of the four enzymes existed not only between male sterile line and its maintainer, but also among calyx, petal, stamen and pistil within the male sterile line and maintainer. The POD, CAO isoenzymes showed more isoenzyme bands in the male sterile line than that in its maintainer, but PPO, SOD isoenzymes less isoenzyme bands in the male sterile line than that in its maintainer. The greatest difference in the four isoenzymes between the male sterile line and its maintainer was seen in the stamen.

Key words: broccoli; male sterility; isoenzyme; flower bud

【责任编辑 柴 焰】