

甘蓝型杂交油菜品种垦油 1号 三系的酯酶同工酶分析^{*}

张明龙 崔海瑞 郑晓微

景尚友

(浙江农业大学核农所)

(黑龙江省农垦科学院)

摘要 本试验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对甘蓝型杂交油菜垦油 1号三系叶片和花药的酯酶同工酶进行了分析。结果表明垦油 1号三系叶片和花药的酯酶同工酶酶谱都存在着差异,它们都有各自的特征酶带。酯酶同工酶的酶谱表现与育性具有相关性,酯酶同工酶分析可以用于鉴别甘蓝型杂交油菜垦油 1号三系的纯度。

关键词 甘蓝型油菜 细胞质雄性不育三系 酯酶同工酶

中图分类号 S634.3

同工酶是基因表达的直接产物,也即分子水平上的表现型,因此,可以利用它作为一种遗传标记,研究生物的基因表达、遗传变异、起源、进化以及与生物学特征特性和经济性状相关性等理论与实践问题,为育种工作者提供重要的遗传信息^[1]。酯酶是一种非特异性的酶,一般认为它是单链或二聚体形式的蛋白质存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中,在生理代谢中具有转酯和解毒的作用。近年来,酯酶同工酶分析也已引入油菜育种,人们试图用它来预测杂种优势、鉴别杂种纯度及探索它与雄性不育的关系等^[2,3,4]。

垦油 1号是黑龙江省农垦科学院油菜育种室育成的高产、优质、抗(耐)病春性甘蓝型油菜品种,该品种 1995年 2月通过黑龙江省品种审定委员会审定并命名,随后种植面积不断扩大。本试验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对其三系的酯酶同工酶进行分析,目的是研究其雄性不育三系的酯酶同工酶差异,为甘蓝型杂交油菜品种垦油 1号的三系纯度及探讨其细胞质雄性不育的机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

甘蓝型杂交油菜品种垦油 1号的三系 040A、040B和 040C,春季播种于田间,一般管理,在三叶期和开花期分别取真叶和花药作为分析材料。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 把所取材料放入研磨中,按 1:2(W/V)加入样品提取液(磷酸缓冲液, pH = 8.0),在低温下研磨。磨碎后转入离心管,在 TGL-16B离心机上以 12 000 rpm 离心 10 分钟,上清液即为酶的粗提液,贮存于冰箱中备用。

1.2.2 电泳分离 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶不连续系统,分离胶浓度为 7.5% (pH = 8.9),浓缩胶浓度为 3% (pH = 6.7) 进样量为 30 μl,在 LKB电泳设备上电泳,电极缓冲液为 Tris-

甘氨酸 (pH= 8.3), 起始时电流为 30mA, 20分钟后调为 50mA, 4℃下稳流电泳至溴酚兰线距胶板底部 0.5~ 1cm 时, 停止电泳

1.2.3 染色 取下凝胶板, 用水冲洗 2~ 3次, 然后倒入染色液^[5], 于 37℃染色至酶带清晰时为止. 用水冲洗后, 测量溴酚兰和各酶带的移动距离, 计算迁移率, 按迁移率由小到大把各酶带编号.

2 结果与分析

2.1 垦油 1号三系 040A 040B和 040C叶片的酯酶同工酶分析

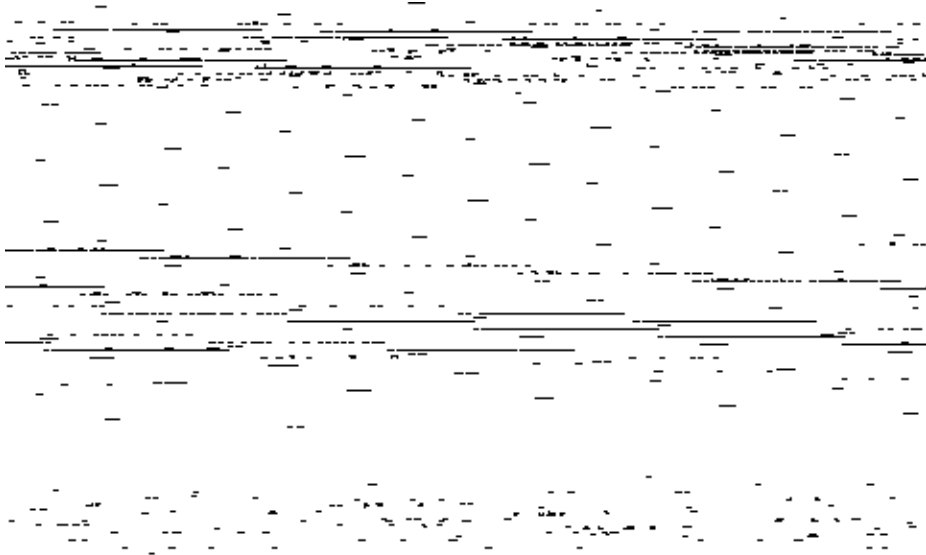


图 1 垦油 1号三系叶片的酯酶同工酶模式图

图 2 垦油 1号三系花药的酯酶同工酶模式图

垦油 1号三系 040A 040B和 040C叶片的酯酶同工酶酶谱模式图如图 1所示. 由图 1可以看出, 垦油 1号三系在苗期可以分离出 11条酶带, 各条酶带的迁移率见表 1. 其中, 不育系 040A有 10条酶带, 酶带 L1 L2 L11活性较高, 酶带 L3 L4 L6 L7表现中等, 酶带 L8~ L10则相对较弱; 保持系 040B有 9条酶带, 酶带 L1 L5活性较强, 酶带 L8~ L10活性较弱; 恢复系 040C有 8条酶带, 酶带 L1活性较强, 酶带 L2 L3 L6 L7活性中等, L8~ L10活性较低. 三系间有共同的酶带, 如酶带 L1 L2 L6~ L10, 但也有不同的酶带, 如 L4 L5 和 L11. 酶带 L4(迁移率约为 0.508)为不育系 040A特有, 酶带 L5(迁移率约为 0.517)则为保持系 040B特有, 恢复系 040C的特征是比 040A和 040B少了酶带 L11(迁移率约为 0.958). 结果说明, 在苗期 040A 040B 040C植株基因表达就有不同, 从而在基因表达产物—酯酶同工酶的酶谱在酶带数量和活性上出现差异.

表 1 三系叶片酯酶同工酶酶带迁移率

酶带编号	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
迁移率	0.158	0.458	0.492	0.508	0.517	0.642	0.700	0.783	0.813	0.867	0.958

2.2 垦油 1号三系 040A 040B和 040C花药的酯酶同工酶分析

垦油 1号三系 040A 040B和 040C花药的酯酶同工酶酶谱模式图如图 2所示. 共可以分离出 15条酶带, 各条酶带的迁移率见表 2.

表 2 三系花药酯酶同工酶酶带迁移率

酶带编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
迁移率	0.1154	0.1547	0.2077	0.2316	0.2564	0.2897	0.3761	0.4034
酶带编号	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	
迁移率	0.4376	0.4966	0.5368	0.5906	0.6342	0.6667	0.7051	

在开花期,垦油 1号三系花药的酯酶同工酶表现与苗期的趋势相近,既有共同的酶带,也有各自特有的酶带。在分离出的 15条酶带中,酶带 A1 A2 A5 A7~ A10 A12~ A14为三系共有;酶带 A15为不育系 040A(迁移率为 0.7051)特有,酶带 A₃(迁移率= 0.2077)为保持系 040B特有,酶带 A11(迁移率为 0.5368)则为恢复系 040C所特有。从各系酯酶同工酶酶带活性上来看,酶带 A5 A7 A13在三系中都表现相对较强,A1 A6相对较弱,A2 A9表现中等,其它各酶带在三系间表现有所差异。040A中酶带 A12表现活性较高,酶带 A4 A8 A14 A15表现中等,酶带 A10则较弱;在保持系 040B中酶带 A3 A8活性较强,酶带 A4 A6 A14中等,A10 A12较弱;而 040C中酶带 A8 A10则活性较强,酶带 A6 A11 A14中等,A12较弱。这些情况表明,垦油 1号三系花药的酯酶同工酶在酶带数量和活性上都存在着差异,它们可能与育性及恢复基因差异表达相关。

3 讨论

3.1 酯酶同工酶与雄性不育的相关性

同工酶是基因表达的产物,同工酶的差异反映遗传背景不同。从理论上讲,不育系与保持系是近等基因系,其差异仅表现在育性上。本研究所用的不育系 040A与保持系 040B是经过多年回交转育而成的一对近等基因系,只是育性有所不同,其它表型性状完全一致。本实验的酯酶同工酶分析结果显示,不育系 040A与保持系 040B酯酶同工酶的多数酶带表现相同,说明它们具有比较相近的遗传基础,但不论是在叶片还是花药中,不育系 040A与保持系 040B酯酶同工酶在酶带数量和活性上都存在着差异,如叶片中的酶带 L₄(迁移率约为 0.492)为不育系 040A特有,酶带 L₅(迁移率约为 0.517)是保持系 040B特有;花药中的酶带 A15为 040A(迁移率为 0.7051)特有,酶带 A3(迁移率= 0.2077)为 040B特有,这些酶带的出现可能是育性基因表达的差异所形成的,可以说它们与不育特性是相关的,这与以前的研究报道是一致的^[3]。

3.2 酯酶同工酶分析在生产上的应用

垦油 1号为低芥酸(芥酸含量低于 1%)、低硫代葡萄糖含量的杂交油菜,油份含量高于 40%,与常规油菜品种皮维特(Pivot)相比,一般增产 20%~ 25%,1993~ 1995年在全国北方(青海、内蒙、甘肃、黑龙江等省)春油菜联合区域试验中,产量居第一位。在黑龙江省北安及嫩江地区已得到了大面积应用,其栽培面积已占油菜种植面积的 50%以上。整体表现具有较强的杂种优势。近年来,随着甘蓝型细胞质雄性不育杂交油菜品种垦油 1号在黑龙江省种植面积的扩大,杂交种子的用种量不断增加。为了保证其杂种优势的增产效应,生产上迫切需要高纯度的三系亲本。开花前由于不育系 040A和保持系 040B的田间植株在表观上很难区分,而三系的繁殖又分散在各农业生产单位进行,这就要求我们要有一种简便快速的检测方法,以保证三系亲本的纯度。本试验的结果表明,垦油 1号三系都有各自的特征酶带,能够利用酯酶同工酶分析的手段把三者区分开来。因此,利用该方法测试 1996年收获的三系亲本纯度 040A为 99.1%,040B的纯度为 99.8%,040C的纯度为 99%,符合制种亲本标准。在三系繁殖时,根据

它们各自特有的酯酶同工酶酶带,可以用它来快速而有效地鉴别垦油 1号三系,从而保证三系繁殖的纯度,提高制种质量,对于加速实行油菜的种子工程具有现实意义。

参 考 文 献

- 1 张维强等.同工酶与植物遗传育种.北京农业大学出版社,1993
- 2 傅廷栋等.杂交油菜的育种与利用.湖北科学技术出版社,1995
- 3 钟蓉等.油菜雄性不育的分子机理研究进展.中国油料,1995,17(4): 70~ 73
- 4 浦惠明等.甘蓝型双低油菜三系及杂交种酯酶同工酶分析.江苏农业科学,1995(2): 27~ 28
- 5 胡能书等.同工酶技术及其应用.湖南科学技术出版社,1985

Study on Esterase Isozymes in CMS“ Three Lines” of Hybrid Variety Kenyou 1 (*Brassica napus. L*)

Zhang Minglong Cui Hairui Zheng Xiaowie

(Institute of Nuclear and Agricultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou)

Jing Shangyou

(Heilongjiang Land Reclamation Academy of Science)

Abstract The esterase isozyme in leaves and anthers of cytoplasmic male sterility (CMS) “three lines” of Hybrid Variety “Kenyou 1” (*Brassica napus. L*) was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in this paper. The result showed that CMS“three lines” of Hybrid Variety “Kenyou 1” had their specific band(s) on esterase zymograms respectively, which revealed their differences in the esterase isozyme of leaves and anthers. The esterase zymogram is related to the male sterility and fertility. The esterase isozyme can be used to test the seed purity of CMS“three lines” of Hybrid Variety “Kenyou 1”.

Key words *Brassica napus. L*, CMS“three lines”, Esterase isozyme