

连续自交对甘蓝型油菜叶片 POD 和 EST 同工酶的影响

张亚宏¹, 孙万仓², 雷建明¹, 唐瑞永¹, 武军艳², 王亚宏¹

(1. 甘肃省天水市农业科学研究所, 甘肃 天水 741001; 2. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 对连续自交四代和开放授粉的 4 个甘蓝型油菜品系叶片过氧化物酶(POD)和酯酶(EST)同工酶进行酶谱分析。结果表明, 4 个品系开放授粉 POD 同工酶活性强于各自交世代; EST 同工酶酶带除品系 03 武 240-1 开放授粉的酶活性较其自交世代弱外, 其余 3 个均强于自交世代, 说明连续自交会使其甘蓝型油菜后代的生活力减弱, 但品系间有差异。

关键词: 甘蓝型油菜; 连续自交; 同工酶; 影响

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)11-0014-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2015.11.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2015.11.005)

Effects of Successive Inbreeding on POD and EST Isozyme in the Leaves of *Brassica napus* L.

ZHANG Yahong¹, SUN Wancang², LEI Jianming¹, TANG Ruiyong¹, WU Jun-yan², WANG Yahong¹

(1. Tianshui Institute of Agricultural Sciences, Tianshui Gansu 741001, China; 2. Gansu Agriculture University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Using vertical plate discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis, analysis the leaf peroxidase (POD) and esterase (EST) isozyme for four successive selfing generations and open pollination four *Brassica napus* L. The result shows that the POD isozyme of the open pollinated are stronger than self-generations; the EST isozyme of the open pollinated are stronger than self-generations in addition to 03 Wu 240-1, Successive selfing led to reduction of viability of *Brassica napus* L., but there are differences between strains.

Key words: *Brassica napus* L.; Successive selfing; Isozyme; Effect

同工酶是指那些来源相同, 催化特性相同而分子结构不同的酶蛋白分子, 它反映了生物在蛋白质水平上的多样性^[1]。生物体内的大多数酶都存在多种分子形式, 它们具有相同的催化活性和多种生理功能, 是基因的直接产物, 同时又是良好的基因变异的标记, 因此, 同工酶被广泛用于作物品种资源及品种遗传多样性、杂种优势、抗性等的研究^[2-5]。甘蓝型油菜属于十字花科芸薹属, 为常异花授粉植物, 大多自交亲和^[6]。自交系选育是甘蓝型油菜育种中常用的手段, 连续多代自交对甘蓝型油菜有何影响的相关报道较少。我们应用同工酶标记技术, 分析了 4 个甘蓝型油菜品系自交后代与开放授粉后代叶片 POD 和 EST

同工酶酶谱变化情况, 以期探索连续自交对甘蓝型油菜后代的影响, 为甘蓝型油菜的遗传育种和良种繁育提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

参试 4 个甘蓝型油菜品系为 03 武 65-4、03 武 291-2X、03 武 240-1、03 武 288-3, 均由甘肃农业大学农学院提供。

1.2 试验方法

试验于 2007 年在甘肃农业大学试验基地进行。从 4 个甘蓝型油菜品系 S₁(自交一代)、S₂(自交二代)、S₃(自交三代)、S₄(自交四代)和 OP(开放授粉)中选择均匀一致的种子各 50 粒, 于培养皿中

收稿日期: 2015-04-21

基金项目: 甘肃省科技重大专项“强优势、高产油菜品种创制与示范”(1203NKDF0018)

作者简介: 张亚宏(1979—), 女, 甘肃天水人, 助理研究员, 硕士, 主要从事冬油菜遗传育种研究工作。联系电话: (0)15193822838, E-mail: yhzhang98@126.com

催芽，待根长约 2 cm 时移栽至花盆中，每盆 8 株，统一水肥管理(表1)。

表 1 试验材料

编号	品系	自交世代	编号	品系	自交世代
1	03武65-4	OP	11	03武240-1	OP
2		S ₁	12		S ₁
3		S ₂	13		S ₂
4		S ₃	14		S ₃
5		S ₄	15		S ₄
6	03武291-2X	OP	16	03武288-3	OP
7		S ₁	17		S ₁
8		S ₂	18		S ₂
9		S ₃	19		S ₃
10		S ₄	20		S ₄

1.2.1 同工酶酶液提取 5 叶期采集参试油菜叶片，称取洗净和吸干，相同叶龄和部位的样品 0.1 g 放入冰浴研钵中，加入 0.05 mol/L Tris-Cl 缓冲液 (pH 为 8.0, 预冷)5 mL 研磨匀浆，然后在 0~4 °C 条件下 10 000 ~ 15 000 rpm 离心 5 min，吸取含酶上清液于 -20 °C 下保存备用^[7]。

1.2.2 同工酶 PAGE 电泳及酶带显色 参照郭尧君方法^[8]。采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。分离胶浓度 7%，浓缩胶 3%~4%。POD 采用改良联苯胺法染色，EST 采用 α-萘酯、坚牢蓝染色法。在凝胶成像系统上观察并拍照。

1.2.3 数据分析 依据同工酶电泳照片，记录数据，求出相对迁移率(Rf)，绘制同工酶酶谱。Rf 计算方法参照袁有喜方法进行^[9]。

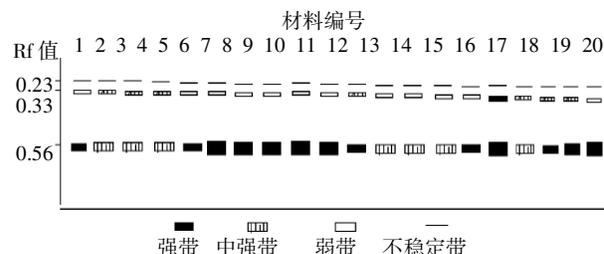
$$Rf = \frac{\text{酶带迁移距离}}{\text{前沿指示剂迁移距离}}$$

2 结果与分析

2.1 过氧化物酶(POD)同工酶酶谱变化

通过图 1、2 可以看出，参试的 4 个甘蓝型油菜品系过氧化物酶(POD)同工酶共分离出 3 条酶带，Rf 值分别为 0.23, 0.33, 0.56。4 个品系开放授粉(CK)与各自交世代之间没有出现特征谱带，仅

表现为酶活性强弱的差异，开放授粉的强带均较自交世代的亮且宽，说明开放授粉的 POD 同工酶活性强于各自交世代^[7]。

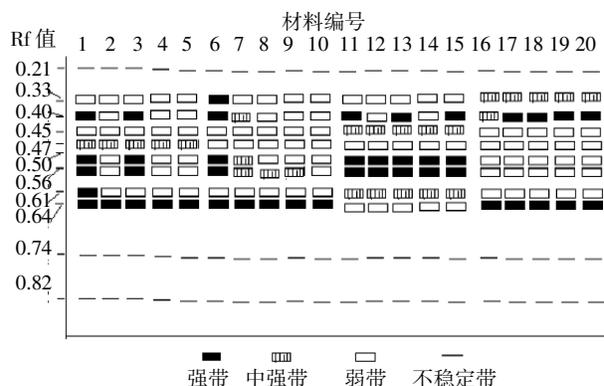


图中 1-5 依次为 03 武 65-4 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；6-10 依次为 03 武 291-2X 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；11-15 依次为 03 武 240-1 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；16-20 依次为 03 武 288-3 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄。

图 2 POD 同工酶酶谱模式

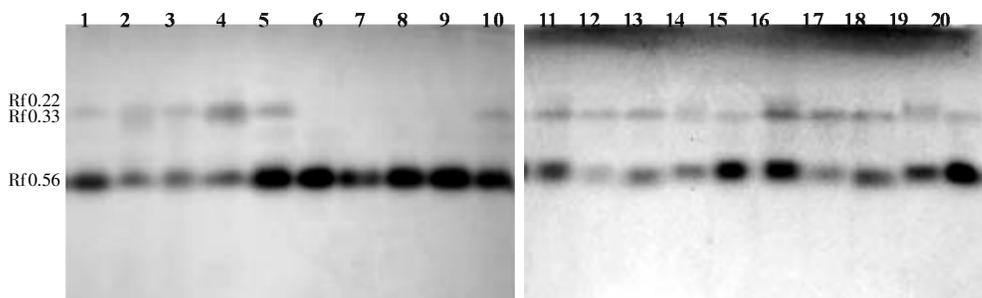
2.2 酯酶(EST)同工酶酶谱变化

从图 3、4 可以看出，4 个甘蓝型油菜品系开放授粉(CK)与自交世代的叶片酯酶共出现 11 条酶带，其 Rf 值分别为 0.21、0.33、0.40、0.45、0.47、0.50、0.56、0.61、0.64、0.74、0.82。品系 03 武 240-1 的 Rf 0.61 明显弱于品系 03 武 65-4 和 03 武 291-2X，但其 Rf 0.5 酶带比其余 3 个品系要亮。



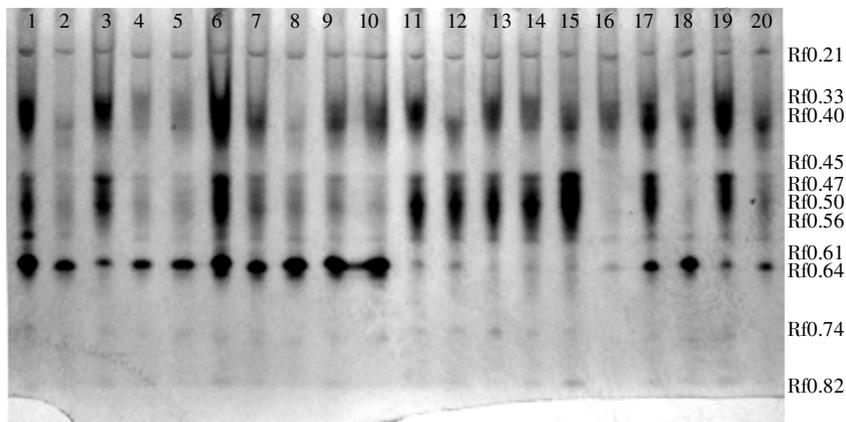
图中 1-5 依次为 03 武 65-4 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；6-10 依次为 03 武 291-2X 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；11-15 依次为 03 武 240-1 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；16-20 依次为 03 武 288-3 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄。

图 3 酯酶同工酶酶谱模式



图中 1-5 依次为 03 武 65-4 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；6-10 依次为 03 武 291-2X 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；11-15 依次为 03 武 240-1 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；16-20 依次为 03 武 288-3 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄。

图 1 POD 同工酶电泳



图中 1-5 依次为 03 武 65-4 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；6-10 依次为 03 武 291-2X 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；11-15 依次为 03 武 240-1 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄；16-20 依次为 03 武 288-3 的 OP、S₁、S₂、S₃、S₄。

图 4 酯酶同工酶电泳

03 武 240-1 开放授粉的酶带较其自交世代弱，其余 3 个品系均是开放授粉的酯酶同工酶活性高于各自交世代^[7]。

3 小结与讨论

1) 通过酶谱分析得出，4 个甘蓝型油菜品系 POD 均分离出 3 条酶带，开放授粉同工酶的强带均较各自交世代的亮且宽，开放授粉 POD 同工酶活性强于各自交世代。EST 均检测出了 11 条酶带，除 03 武 240-1 开放授粉较其自交世代弱外，其余 3 个品系开放授粉(CK)的酶活性均高于各自交世代。说明连续多代自交会使得甘蓝型油菜后代的生活力有一定程度的减弱，但品系间有差异。

2) 甘蓝型油菜属常异花授粉作物，与白菜型油菜比较自交亲和性高，自交后有较高结实率，后代退化不明显或较缓慢^[10]。同工酶主要是从蛋白质水平上显示物种或种质资源的遗传多样性，是目前仍被广泛利用的遗传标记^[11]。孙万仓对不同来源的 85 份白菜型油菜品种的自交亲和指数研究表明，白菜型油菜的自交亲和性存在较大幅度的变异^[12]。有研究显示，甘蓝型油菜连续自交后代亦有不同程度的退化现象，一般认为甘蓝型欧洲油菜较耐自交，而亚洲类型的品种自交退化较为严重，但品种不同自交退化程度也有差异^[13]。张亚宏等研究发现，自交对甘蓝型油菜后代有显著影响，连续自交导致甘蓝型油菜株高、分枝部位、有效分枝数、主花序有效结角数，单株角果数及单株产量均随着自交世代的增加而减小^[14]。本试验参试的 4 个甘蓝型油菜品系各自交世代与开放授粉(CK)之间带型基本一致，只在表达量上有差别，没有出现特征谱带，说明甘蓝型油菜连续自

交没有引起同工酶的表达差异，仅表现为酶活性强弱的不同，表明甘蓝型油菜具有较高的自交亲和性。

3) 油菜是容易异花授粉的作物，人工强制自交，特别是连续多代自交，由于隐性基因的同质化，通过选择和淘汰，可以排除某些不良的隐性基因及其控制的不良性状；与此同时，也因同质化而削弱了植物体内遗传和生理的异质性，从而导致自交系后代生长势或某些性状的衰退。这是异花授粉植物也包括常异交的甘蓝型油菜进行自交系选育必须重视的重要问题。在自交系选育过程中，要注意选择那些性状优良而又耐自交的材料，淘汰那些不良的隐性性状和自交衰退明显的单株。此外，在选择过程中，还可根据耐自交的程度，在一定的自交年代内，于隔离区中让系内株间自由授粉，以尽可能防止或克服自交衰退现象^[7]。

参考文献：

- [1] 高明君. 植物同工酶基因定位方法初探[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(2): 195.
- [2] 刘海衡, 胡胜武. 23 份芥菜型油菜同工酶遗传多样性分析[J]. 西北农业学报, 2010, 19(10): 82-85; 106.
- [3] 李桂兰, 张悦, 乔亚科, 等. 冀东沿海地区野生大豆过氧化物酶同工酶多样性研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(3): 386-390.
- [4] 吴红美, 徐跃进, 万正杰. 甘蓝型油菜 (Eru CMS) 与甘蓝种间杂种的同工酶和蛋白质分析[J]. 植物科学学报, 2011, 29(1): 87-92.
- [5] 钟俐, 李冠. 白粉病菌胁迫下甜瓜叶片中 Ca²⁺ 的细胞化学定位及外源 Ca²⁺ 对 POD、CAT 和 SOD 同工酶的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(19): 4 040-4 049.
- [6] 罗玉秀, 杜德志. 白菜型油菜自交不亲和性状的遗传分析[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2008, 26(6):

不同层积处理对3种木兰属植物种子在不同基质中发芽的影响

杨永花, 陆娟, 唐彩莲, 杨振坤, 李磊
(兰州植物园, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 对厚朴、白玉兰、紫玉兰的种子进行沙藏和冷藏处理, 在 3 种基质中进行发芽试验, 结果表明: 厚朴、白玉兰、紫玉兰经冷藏处理的种子发芽慢, 持续时间长, 发芽率低, 而沙藏处理的种子发芽快, 持续时间短, 发芽率较高。其中以厚朴经沙藏处理的种子在田园土+泥炭(1:1)的基质中发芽最快, 为 17 d; 发芽持续天数最短, 为 42 d; 发芽率最高, 为 72.0%。

关键词: 木兰属; 厚朴; 白玉兰; 紫玉兰; 基质; 层积处理; 发芽率

中图分类号: S330.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)11-0017-03

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2015.11.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2015.11.006)

Effect of Different Stratification on Three Kinds of Magnolia Seed Germination in Different Matrixes

YANG Yonghua, LU Juan, TANG Cailian, YANG Zhen-kun, LI Lei
(Lanzhou Botanical Garden, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: The seeds of Houpu, Magnolia and purple Magnolia are stored in sand and refrigeration processing, the germination test is carried out in the three different matrix. The result shows that Houpu, Magnolia and purple Magnolia seeds have been treated with cold storage, which is the germinating slowly, longer duration and low germination rate, but the seeds is stored in sand processing germination fast, shorter duration and high germination rate. Houpu seeds processed treat by stored in sand is the fastest germination in rural soil + peat (1 : 1) matrix, is 17 days; the shortest germination, is 42 days; the highest germination rate, is 72.0%.

Key words: The genus magnolia; Houpu; Magnolia; Purple Magnolia; Matrixes; Stratification; Germination rate

木兰科植物共有 15 属约 250 种, 主要分布于北半球, 集中于亚洲东南部和北美东南部及中美洲地区。我国西南部和南部地区被认为是木兰科

植物的现代分布中心和起源中心, 分布有 11 属 100 余种。木兰科的许多种类其树形优美、花大芳香、叶形多样、色彩秀丽, 是园林绿化树种中的

收稿日期: 2015-10-14

基金项目: 兰州市科技局科技攻关项目(2013-4-157)

作者简介: 杨永花 (1967—), 女, 甘肃永登人, 高级工程师, 主要从事园林植物的引种及栽培技术研究工作。联系电话: (0)13893691613。E-mail: 1147310992@qq.com

- 7-10.
- [7] 张亚宏. 自交对甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)主要性状的影响研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
- [8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 70-73.
- [9] 袁有喜, 牛应泽, 汪良中, 等. 人工合成甘蓝型油菜的同工酶分析[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(2): 153-156.
- [10] 刘宏波, 刘忠松. 油菜远缘杂交亲和性研究进展[J]. 作物研究, 2006(5): 456-458.
- [11] 王述民, 谭富娟, 胡家蓬. 小豆种质资源同工酶遗传多样性分析与评价[J]. 中国农业科学, 2002, 35(11): 1311-1318.
- [12] 孙万仓, 范惠玲, 叶剑, 张亚宏, 等. 白菜型油菜自交亲和性变异分析[J]. 西北植物学报, 2006, 26(4): 0688-0695.
- [13] 高永同, 刘后利. 甘蓝型黄籽油菜育种研究的回顾与展望[J]. 华中农学院学报, 1985(4): 19-29.
- [14] 张亚宏, 孙万仓, 雷建明, 等. 连续自交对甘蓝型油菜主要农艺性状的影响[J]. 甘肃农业科技, 2012(6): 6-9.

(本文责编: 陈伟)