

# 自交对甘蓝型油菜叶片 SOD,CAT,APX 活性的影响

张亚宏,孙万仓,魏文慧,武军艳,曾 军,刘雅丽,叶 剑

(甘肃农业大学 农学院,甘肃 兰州 730070)

**摘要:**以连续自交四代的甘蓝型油菜品系 03 武 291-2X 和 03 武 240-1 为材料,以开放授粉为对照测定了  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  不同生育期叶片的 SOD,CAT,APX 活性变化。结果表明:在整个花期对照叶片的 SOD,CAT,APX 活性均显著高于自交后代,说明自交对常异花授粉植物甘蓝型油菜有一定伤害,避免过分严格的自交对于保持常规品种的优良特性是有益的。

**关键词:**自交;甘蓝型油菜;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;抗坏血酸过氧化物酶

**中图分类号:**S635 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)01-0105-04

## Changes of SOD,CAT and APX of *Brassica napus* Infected by Selfing in Total Growth Period

ZHANG Ya-hong,SUN Wan-cang,WEI Wen-hui,WU Jun-yan,ZENG Jun,LIU Ya-li,YE Jian

(Gansu Agricultural University,Lanzhou 730070,China)

**Abstract:** The SOD,CAT and APX differences between self-pollination materials and open-pollination materials were tested by using *Brassica napus* materials 03Wu291-2X and 03Wu240-1. The results showed that: the SOD,CAT,APX activity of the normal leaves were significantly higher than that of the self-generation; The self-pollination was harm to *Brassica napus*; It is useful to avoid strictly selfing for maintaining the excellent characteristics of conventional varieties.

**Key words:** Selfing;*Brassica napus*;SOD;CAT;APX

植物的繁殖方式分为有性繁殖方式和无性繁殖方式,而有性繁殖方式又包括自花授粉、异花授粉和常异花授粉 3 种类型。自花授粉是植物最主要的繁殖方式之一,自交的遗传效应有 3 个方面:自交使纯合基因型保持不变;自交使杂合基因型的后代发生性状分离;自交引起后代生活力衰退。尤其异花授粉植物有明显的自交衰退<sup>[1]</sup>。

目前,有关自交对作物后代生活力影响的研究主要集中在异花授粉作物上,如胡宝成等<sup>[2]</sup>对异花授粉的白菜型油菜连续自交四代后发现,自交后代发生严重衰退,其主要农艺性状与开放授粉或与姊妹系间的后代差异达显著或极显著水平。严继勇等<sup>[3]</sup>发现青花菜连续自交后,花球大小、蕾期亲和指数、生长势等方面表现出明显的自交衰退。张立彬等<sup>[4]</sup>对大久保桃自交后代性状研究后发现,大久保桃果皮着色度和甜酸度变异较大,自交后代基本保

持了原有的果形和果顶。周厚高等<sup>[5]</sup>对新铁炮百合自交后代主要性状的遗传变异进行了研究,结果表明:所研究的大部分性状在株系间具有较大的变异,花头数、子房长、株高、茎粗、上部叶长、上部叶长/宽、中部叶长、中部叶长/宽、下部叶长、下部叶长/宽等性状的遗传力、遗传进度均表现较高,且遗传变异系数大,早代严格选择效果明显。乌云塔娜等<sup>[6]</sup>发现砂梨在蕾期自花授粉后则表现为结实率低或不结实。赵威军等<sup>[7]</sup>对高粱  $A_3$  类型自交后发现,田间  $F_1$  组合的套袋结实率平均约 50%。贾桂霞等<sup>[8]</sup>发现日本落叶松与兴安落叶松自交结实率低,自交衰退明显。而孙万仓等<sup>[9]</sup>通过对白菜型油菜品种自交亲和指数研究后发现,白菜型油菜的自交亲和性存在较大幅度的变异,这种变异不仅存在于品种间,而且存在于品种内不同个体间。

对于常异花授粉植物来说,连续自交对后代究

收稿日期:2007-12-01

基金项目:国家支撑计划项目(2007BAD52B08);甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2005-09);甘肃省科技攻关计划项目(2CS064-A41-001-07)

作者简介:张亚宏(1979-),女,甘肃天水人,在读硕士,主要从事油菜遗传育种研究。

通讯作者:孙万仓(1957-),男,甘肃会宁人,研究员,农学博士,主要从事油菜育种研究工作。

竟有何影响鲜见报到。甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 属于十字花科 (Cruciferae) 芸薹属 (*Brassica*)<sup>[10]</sup>, 为常异花授粉植物, 天然异交率达 10% ~ 30%。本研究通过测定不同甘蓝型油菜品系自交后代叶片保护性酶活性变化情况, 为甘蓝型油菜的遗传育种研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

供试材料为甘蓝型油菜, 由甘肃农业大学农学院作物遗传育种系提供, 编号为 03 武 291-2X 和 03 武 240-1。

2007 年 3 月将  $S_1$  (自交一代)、 $S_2$  (自交二代)、 $S_3$  (自交三代)、 $S_4$  (自交四代) 和 CK (开放授粉) 种子种植于甘肃农业大学试验基地。

### 1.2 试验方法

1.2.1 取材 于五叶期、现蕾期、初花期、盛花期、终花期分 5 次取样测定。各子代每测定时期选择长势一致的植株 5 株, 测定叶片功能相关指标。

1.2.2 酶活性的测定 粗酶液提取液配制及提取程序: 提取液为 0.05 mol/L pH 7.8 的 PBS (磷酸缓冲液), 内含 5 mmol/L EDTA- $Na_2$ , 2 mmol/L AsA (抗坏血酸即维生素 C), 2% PVP, 现用现配。称取 0.5 g 待测样品, 加 0.1 g PVP, 加入少许石英砂, 加 1 mL 提取液冰浴研磨匀浆, 匀浆后加入 4 mL 提取液, 搅匀后于 4 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

SOD (超氧化物歧化酶) 活性测定 采用 NBT 光化还原法<sup>[11, 12]</sup>, 提取介质为 0.05 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液 (内含 2% PVP), 设置 3 次重复, 对照管用硬质黑纸套遮光, 显色反应体系包括 1.5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液、0.3 mL 30 mmol/L Met 溶液、0.3 mL 750  $\mu$ mol/L NBT 溶液、0.3 mL 100  $\mu$ mol/L EDTA- $Na_2$  液、0.3 mL 20  $\mu$ mol/L 核黄素和 0.1 mL 酶液, 在紫外分光光度计 560 nm 下测定吸光值。SOD 酶活性以每克鲜重酶单位表示。

CAT (过氧化氢酶) 活性测定 采用紫外分光光度法<sup>[13]</sup>, 测定体系包括 0.2 mL 酶液、1.5 mL 磷酸缓冲液、1.0 mL 蒸馏水, 设置 3 个重复一个对照, 经 25 预热后逐管加入 0.3 mL 0.1 mol/L 的  $H_2O_2$ , 在紫外分光光度计 240 nm 下测定吸光值, 每隔 1 min 读数 1 次, 共测 4 min, 以 1 min 内  $A_{240}$  减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

APX (抗坏血酸过氧化物酶) 活性测定 采用紫外分光光度法, 测定体系包括 0.2 mL 酶液、1.6 mL

0.05 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液、0.3 mL 1 mmol/L EDTA- $Na_2$ 、0.3 mL 5 mmol/L AsA、0.3 mL 蒸馏水, 把比色杯放入紫外分光光度计, 加 0.3 mL 1 mmol/L  $H_2O_2$  启动反应, 立即计时测定 290 nm 下的吸光值, 每 10 秒计数一次, 测定 1 min 内吸光值的变化, 以每分钟氧化 1  $\mu$ mol AsA 的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

1.2.3 数据处理 采用 Excel 和 DPS 数据分析软件对所得数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 自交对甘蓝型油菜叶片 SOD 活性的影响

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 在需氧原核生物和真核生物中广泛存在。它能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应形成氧分子和过氧化氢, 平衡机体内的氧自由基。可以避免超氧自由基对细胞膜的过氧化作用, 是活性氧清除系统中第一个发挥作用的抗氧化酶<sup>[14]</sup>。

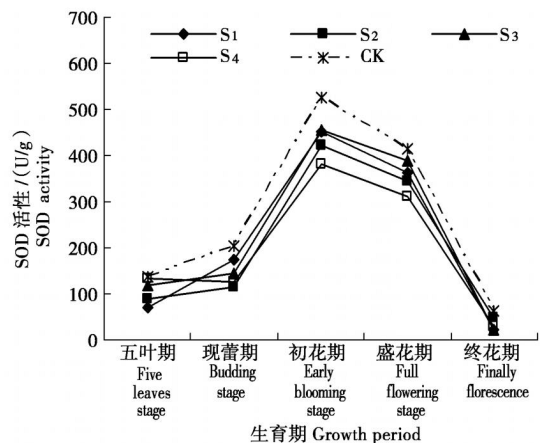


图 1 03 武 291-2X 叶片 SOD 活性的变化

Fig. 1 SOD activity changes of 03WU291-2X

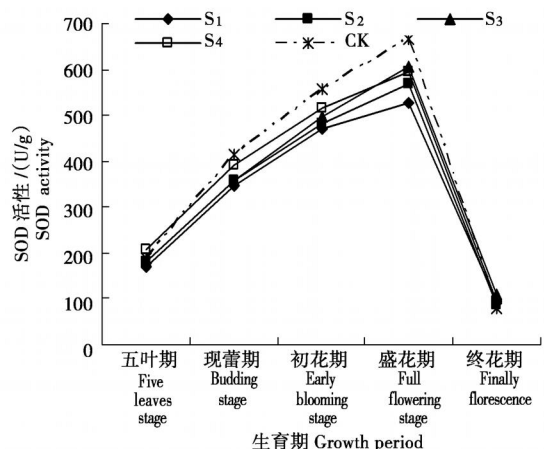


图 2 03 武 240-1 叶片 SOD 活性的变化

Fig. 2 SOD activity changes of 03WU240-1

由图 1、2 可以看出, 在整个生育期, 03 武 291-2X 与 03 武 240-1 叶片各自自交后代 SOD 活性 (以鲜质量计) 变化趋于一致, 即 SOD 活性随生育期的进

程先逐渐升高,达到一高峰值,而后随着叶片的衰老,SOD 活性逐渐下降,在终花期达到最低。03 武 291-2X SOD 活性在初花期达到峰值,而 03 武 240-1 则在盛花期出现活性高峰。处理间比较,在整个花期中,2 个油菜品系开放授粉(CK)的 SOD 活性均明显高于自交后代,且差异显著( $p < 0.05$ ),而各自交后代之间差异不显著( $p < 0.05$ )。

## 2.2 自交对甘蓝型油菜叶片 CAT 活性的影响

过氧化氢酶是生物体内重要的  $H_2O_2$  清除酶之一,主要存在于植物组织的过氧化体中,它的主要作用就是催化  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  与  $O_2$ ,使得  $H_2O_2$  不致于与  $O_2$  在铁螯合物作用下反应生成有害的羟基自由基<sup>[15]</sup>。

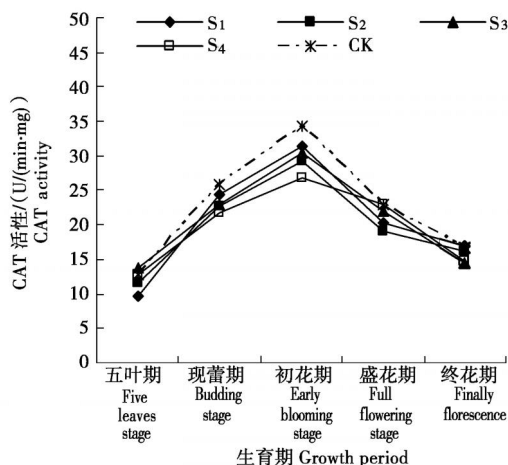


图3 03 武 291-2X 叶片 CAT 活性的变化

Fig. 3 CAT activity changes of 03WU291-2X

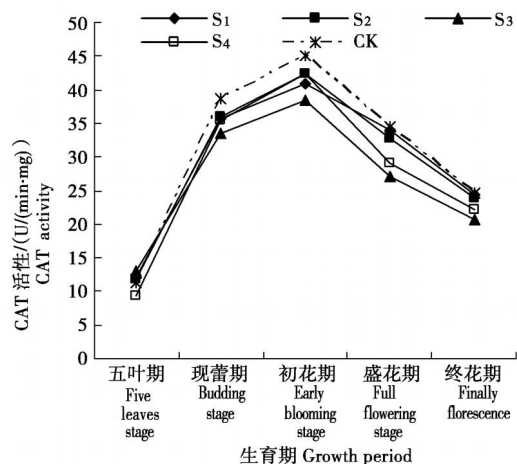


图4 03 武 240-1 叶片 CAT 活性的变化

Fig. 4 CAT activity changes of 03WU240-1

由图3,4 可以看出,03 武 291-2X 和 03 武 240-1 的  $S_1, S_2, S_3, S_4$  与 CK 叶片的过氧化氢酶活性先升高而后下降,呈单峰曲线,且都在初花期出现活性高峰。在整个花期期,03 武 291-2X(图3)与 03 武 240-1(图4)叶片 CAT 活性,CK 显著高于自交后代( $p < 0.05$ ),自交后代之间差异不显著( $p < 0.05$ )。

## 2.3 自交对甘蓝型油菜叶片 APX 活性的影响

$H_2O_2$  是植物叶绿体中光合电子传递链和某些酶学反应的天然产物,具有毒害作用,高浓度的  $H_2O_2$  可以抑制 Calvin 循环中的酶类。由于叶绿体不存在过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-POD),且叶绿体 APX 对  $H_2O_2$  的  $K_m$  值远比 CAT 小,所以 APX 是叶绿体中清除  $H_2O_2$  的关键酶<sup>[16]</sup>。

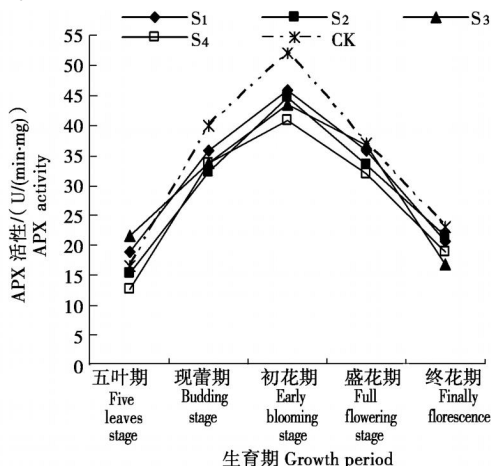


图5 03 武 291-2X 叶片 APX 活性的变化

Fig. 5 APX activity changes of 03WU291-2X

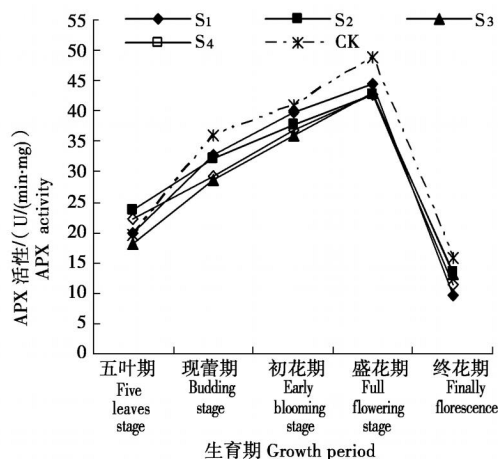


图6 03 武 240-1 叶片 APX 活性的变化

Fig. 6 APX activity changes of 03WU240-1

从图5,6 可以看出,在整个生育期,03 武 291-2X 与 03 武 240-1 的自交后代与 CK 叶片的 APX 变化趋势基本一致,即 APX 活性先升高后降低。03 武 291-2X(图5)自交后代与 CK 均在初花期出现 APX 活性高峰,且 03 武 291-2X 与 03 武 240-1 CK 活性显著高于自交各后代( $p < 0.05$ )。与 03 武 291-2X 相比,03 武 240-1(图6)自交后代与 CK 在盛花期出现 APX 活性高峰。

## 3 结论与讨论

植物体内的抗氧化酶活性和抗氧化代谢水平是

评价植物抗逆性的有效指标之一。正常情况下,植物细胞内自由基的产生和清除处于动态平衡,逆境可以打破这种平衡状态<sup>[17,18]</sup>,导致自由基在体内积累,使得膜脂双分子层中的不饱和脂肪酸易于被氧化分解,造成膜整体的破坏和过敏性死亡<sup>[19-21]</sup>。而 SOD, CAT 和 APX 都是植物对膜脂过氧化的酶促防御系统中重要的保护酶,共同组成了生物体内活性氧防御系统,在清除超氧自由基、 $H_2O_2$  和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用。

本试验测定甘蓝型油菜自交后代在整个生育期叶片保护酶活性变化的结果表明,开放授粉与自交各后代 SOD, CAT, APX 活性随生育期的推进均先升高而后下降,且开放授粉的各保护酶活性显著高于各自交后代,尤其在初花期和盛花期。随着自交代数的增加,酶活性有所下降,但是变化较小,各自交后代之间差异不显著( $p < 0.05$ )。甘蓝型油菜属于常异花授粉植物,一般认为自交对其后代影响不大,但本试验证明,自交对其也有一定伤害,且在花期更为突出,生产中应避免过分严格的自交,这对于保持常规品种的生活力和生产力无疑是十分有利的。

#### 参考文献:

- [1] 张天真. 作物育种学总论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 13 - 14.
- [2] 胡宝成, 陈凤祥. 南方白菜型油菜自交衰退和杂种优势利用方式的研究[J]. 中国油料, 1996, 18(4): 6 - 9.
- [3] 严继勇. 青花菜主要性状在自交后代中的遗传稳定性[J]. 北方园艺, 2000(2): 7 - 8.
- [4] 张立彬, 肖 啸. 大久保桃自交后代若干性状的变异和遗传倾向[J]. 果树学报, 2004, 21(4): 308 - 310.
- [5] 周厚高, 周 焱. 新铁炮百合自交后代主要性状遗传变异的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14(2): 1 - 8.
- [6] 乌云塔娜, 谭晓风. 砂梨不同 S 基因型异花授粉和蕾期自花授粉试验[J]. 中国南方果树, 2006, 35(6): 47 - 49.
- [7] 赵威军, 仪治本, 高粱 A3 类型后代花粉碘染色率与田间自交结实率的关系[J]. 华北农学报, 2006, 21(6): 37 - 40.
- [8] 贾桂霞, 杨俊明. 落叶松种间交配结实力变异和自交衰退的研究[J]. 林业科学, 2003, 39(1): 62 - 68.
- [9] 孙万仓, 范惠玲. 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.
- [10] 刘后利. 油菜遗传育种学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 32 - 34.
- [11] 罗广华, 王爱国. 植物的 SOD 凝胶电泳及活性显示[J]. 植物生理学通讯, 1983(6): 44 - 45.
- [12] 张宪政, 汪晓峰, 苏正淑. 小麦水分胁迫与活性氧伤害[J]. 国外农业 - 麦类作物, 1996(1): 18 - 21.
- [13] 赵亚华. 生物化学试验技术教程[M]. 长沙: 中南大学技术出版社, 2000: 151 - 154.
- [14] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein) [J]. J Biol Chem, 1969, 244: 6049 - 6055.
- [15] 刘昌玲, 王国庆. 细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(5): 380 - 383.
- [16] Asada K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants[J]. Physiol Plant, 1992, 85: 235 - 241.
- [17] 武孟祥, 贾建兵, 张 宇, 等. 植物低温保护剂对番茄幼苗抗寒力的影响[J]. 西北植物学报, 1994, 14(5): 95 - 98.
- [18] 王建华, 刘鸿先, 徐 同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1989(1): 1 - 7.
- [19] Bowler C, Van Montagum, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biology, 1992, 43: 83 - 116.
- [20] 李红玉, 何晨阳. 活性氧对植物防卫信号传导作用探讨[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 190 - 196.
- [21] 朱有林, 刘纪麟. 受玉米大斑病菌浸染后玉米抗感近等基因系 SOD 动态变化的研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 133 - 137.