

芸芥自交亲和系与自交不亲和系 SOD、POD和 CAT酶活性

王保成¹, 孙万仓^{1,3*}, 范惠玲¹, 孟亚雄¹, 马静芳², 叶 剑¹, 刘雅丽¹,
邵登魁¹, 燕 妮¹, 朱惠霞¹, 武军艳¹, 曾 军¹, 张亚宏¹

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业科学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:对芸芥 (*Enuca sativa* Mill) 自交亲和系 (SC) 与自交不亲和系 (SD) 柱头 SOD、POD 和 CAT 三种酶活性进行了测定。自交亲和系和自交不亲和系在授粉后都能引起 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性的变化。比较 SC 和 SD 的酶活性发现, 在未授粉时二者 SOD 酶活性差异显著, 而 POD 和 CAT 酶活性则无显著性差异; 异花授粉后 SC 和 SD 的三种酶活性表现了相似的趋势, 在各个时间段上无差异; 自花授粉后自交亲和系的酶活性显著高于自交不亲和系的酶活性。结果表明, SOD、POD 和 CAT 三种酶活性的变化与自交亲和系所具有的自交亲和基因的调控有关。

关键词: 芸芥; 自交亲和; 自交不亲和; SOD; POD; CAT

中图分类号: S565. 401 **文献标志码:** A

文章编号: 1007—9084 (2006) 02—0162—04

芸芥 (*Enuca sativa* Mill) 属于十字花科芝麻菜属植物, 自交不亲和。由于其适应性强, 具有抗旱、耐瘠、抗 (耐) 病、耐盐碱等优异的抗逆性能, 是干旱、半干旱地区的重要油料作物, 同时也是十字花科作物育种的重要优良基因资源^[1~3]。

自交不亲和在生产上具有重要的利用价值。通过选育自交不亲和系利用杂种优势已经成为十字花科蔬菜植物提高产量、改良品质的重要途径之一。但是自交不亲和特性使植物不耐自交, 具有自交衰退的共性, 因而难以获得纯系, 其品种群体是由不同基因型个体组成的杂合群体, 限制了产量潜力的增加。在杂交育种中, 由于自交不亲和系难以获得纯的亲本材料, 使品种间杂交及远缘杂交难以按常规方法进行。因为在油料作物三系或两系杂交种的选育中, 要求保持系和恢复系连续自交来提高纯合程度, 但自交系的选育面临着自交不亲和与自交衰退两大难点, 从而影响三系杂交种及其亲本的选育。研究自交亲和性, 在科研和生产中具有十分重要的意义。

前人已对自交不亲和植物自交不亲和性做了大量的研究^[4~7], 而对自交亲和性生理代谢的研究至今鲜见报道。本文报道芸芥自交亲和系与自交不亲

和系柱头 SOD、POD 和 CAT 三种酶活性的研究结果, 旨在为自交不亲和性的进一步利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料芸芥自交不亲和系 (SD) 7510 与自交亲和系 (SC) 7511 由甘肃农业大学农学院作物遗传育种系提供。芸芥自交亲和系是由自交不亲和系的突变体, 发现后连续多年套袋自交, 亲和性稳定, 多年平均亲和指数为 5.1。以下均以 SI 表示自交不亲和系, SC 表示自交亲和系。

1.2 实验方法

1.2.1 取材处理 供试材料于 2005 年 4 月种植于甘肃农业大学试验基地, 5 月下旬盛花期分别对自交亲和系与自交不亲和系花蕾期柱头去雄套袋, 然后进行自花授粉和异花授粉, 授粉前及授粉后 1h、3h、5h 和 8h 取柱头, 立即进行酶活性的测定。

1.2.2 酶活性测定方法 SOD 采用 NBT 法测定^[8]: 提取介质为 0.05mol/L pH7.8 磷酸缓冲液 (内含 1% 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 1.5mL 0.05mol/L 磷酸缓冲液、0.3mL 130mmol/L Met 溶液、0.3mL 750μmol/L NBT 溶液、0.3mL 100μmol/L EDTA -

收稿日期: 2005—08—18

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (ZS9991—A21—043—N 和 ZS031—A25—041—D)

作者简介: 王保成 (1980—), 男, 甘肃武都人, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究工作。

* 通讯作者: 孙万仓, Tel: 0931 - 7673007, E-mail: wangcangsun@yahoo.com.cn

Na₂液、0.3mL 20μmol/L核黄素和0.10mL酶液。SOD酶活性以每克鲜重酶单位表示。

POD采用愈创木酚法^[9,10]:测定体系包括2.9mL 0.05mol/L磷酸缓冲液、1.0mL 2% H₂O₂溶液、1.0mL 0.05mol/L愈创木酚溶液和0.1mL酶液。做三组重复实验。在37℃水浴中反应15min,用2.0mL 20%三氯乙酸溶液终止反应。以每分钟A_{470nm}变化0.01为一个过氧化物酶活力单位。

CAT采用紫外分光光度法测定^[11]:测定体系包括0.2mL酶液、1.5mL磷酸缓冲液、1.0mL蒸馏水,设置三个重复一个对照,25℃预热完后逐管加入0.3mL 0.1mol/L的H₂O₂,在紫外分光光度计240nm下测定吸光值,每隔1min读数1次,共测4min,以1min内A₂₄₀减少0.1的酶量为1个酶活单位(U)。

2 结果与分析

2.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性

2.1.1 异花授粉和自花授粉后SC的SOD酶活性的变化 由表1可知,芸芥自交亲和系(SC)异花授粉后SOD酶活性显著高于未授粉时的酶活性,而在授粉后3h达到极显著差异,并且随授粉时间的延长

有增长趋势,授粉8h时的酶活性是未授粉时柱头SOD酶活性的3.38倍。同样自花授粉后SOD酶活性也显著高于未授粉时的酶活性,在授粉后1h达到显著水平,授粉后3h差异达极显著水平,授粉8h酶活性是未授粉时柱头SOD酶活性的3.56倍。

芸芥自交亲和系7511无论自花授粉还是异花授粉,授粉后酶活性都显著高于未授粉时的酶活性,且随授粉时间的延长酶活性呈增长趋势,在授粉3h后SOD酶活性差异达极显著水平,这说明花粉物质启动了柱头细胞的一系列反应,产生了大量活性氧,打破了芸芥柱头组织活性氧积累与消除之间的平衡,从而使得酶活性迅速增加。因此,异花授粉和自花授粉对SC的SOD酶活性影响具有相同的趋势。

2.1.2 异花授粉和自花授粉后SI的SOD酶活性的变化 表1表明,自花授粉和异花授粉都使得芸芥自交不亲和系酶活性升高,说明无论异花授粉还是自花授粉,花粉都能引起柱头酶活性的变化;同时看出,自花授粉后3~8h间SI的酶活性没有显著差异,在5h时达到最大值6.7,此后SOD酶活性有下降趋势,在8h时酶活性降为5.0。这种下降趋势可能与柱头自交不亲和反应有关。

表1 授粉后SI和SC的SOD酶活性的比较

Table 1 Comparison of SOD activity(U/g_{fw}) after pollination between SI and SC

授粉方式 Pollination style	供试材料 Used material	授粉后时间/h Time after pollination				
		0	1	3	5	8
异花授粉	自交亲和系 7511 Self-compatible line	2.5cB	3.7bB	8.7aA	8.5aA	8.9aA
Cross pollination	自交不亲和系 7510 Self-incompatible line	2.9dD	3.7cC	9.0bB	9.6aAB	9.8aA
自花授粉	自交亲和系 7511 Self-compatible line	2.5cB	3.7bB	8.3aA	8.0aA	8.1aA
Self pollination	自交不亲和系 7510 Self-incompatible line	3.0bB	4.4bB	5.8aA	6.7aA	5.0aA

注:同一行中不同英文大小写字母表示具有5%,1%的差异显著性,下同

Note: Values in the same row followed by different capital and small letters are significantly different at P=0.05, P<0.01 respectively, the same as below

2.1.3 异花授粉和自花授粉后SC和SI的SOD酶活性差异 异花授粉后SC和SI的SOD酶活性增长趋势相似,而自花授粉后SC和SI之间酶活性差异较大,在授粉后3h时SOD酶活性达到峰值8.3,且差异达极显著水平。由于异花授粉时在SC和SI柱头上发生的都是亲和反应,所以表现出了相似的酶活性增长趋势,这也说明芸芥突变体7511(SC)保持了相同于自交不亲和系的SOD酶系统,授粉后表现出相似的生理反应;而在自花授粉后,由于SI的不亲和性使得其柱头酶活性在3~5h都低于SC。同时可以看出,授粉后SC和SI起初都显著的上升,而在后期酶活性趋势变得平缓。说明在授粉后期,

SC和SI的SOD酶呈稳定状态,活性氧消除与积累逐渐达到了一种动态平衡;由于SI自交后在柱头上发生了不亲和反应,可能导致了SOD酶系统的崩溃,酶活性在自花授粉后5h(达峰值6.7)后开始下降。

2.2 过氧化物酶(POD)活性

2.2.1 异花授粉和自花授粉后SC的POD酶活性的变化 从表2可以看出,异花授粉后,SC的POD酶活性随授粉时间的延长呈增长趋势,授粉后POD酶活性显著高于未授粉时的酶活性,并且在授粉后1h达极显著差异,授粉8h酶活性是未授粉时柱头POD酶活性的5.2倍。同时可以看出,自花授粉后

SC的 POD酶活性高于未授粉时的酶活性,并且在授粉后 1h达到了显著水平。授粉后 8h时,POD 酶活性达到最高值 5.0,是未授粉时的 4.5倍。

2.2.2 异花授粉和自花授粉后 SI的 POD 酶活性的变化 从表 2看出,授粉使得 SI酶活性发生了显著的变化,异花授粉在 0~8h间酶活性一直增加,在 8h时达 6.5;自花授粉后 5h时 POD 酶活性达到最大值 3.6,在 3h、5h和 8h三处理间酶活性没有差异,原因同 SOD。

表 2 授粉后 SI和 SC的 POD酶活性比较

Table 2 Comparison of POD activity (U/g_w) after pollination between SI and SC

授粉方式 Pollination style	供试材料 Used material	授粉后时间 /h Time after pollination				
		0	1	3	5	8
异花授粉 Cross pollination	自交亲和系 7511 Self-compatible line	1.1dD	2.7cC	3.5bBC	4.2bB	5.7aA
	自交不亲和系 7510 Self-incompatible line	1.3dD	2.8cC	3.1cC	4.1bB	6.5aA
自花授粉 Self pollination	自交亲和系 7511 Self-compatible line	1.1eE	2.5dD	3.2cC	3.9bB	5.0aA
	自交不亲和系 7510 Self-incompatible line	1.3cC	2.4bB	3.2aA	3.6aA	3.4aA

芸芥自花授粉的前 5h内,SC和 SI的 POD酶活性上升趋势相似,而在 5~8h间 SI的酶活性增长明显低于 SC的酶活性,在授粉 8h时 SC与 SI间的 POD活性差异性达极显著水平。产生这种差异的原因可能是由于发生自交不亲和反应而造成的。

2.3 过氧化氢酶 (CAT)活性

2.3.1 异花授粉和自花授粉后 SC的 CAT酶活性的变化 异花授粉后,SC的 CAT酶活性极显著高于未授粉时的酶活性,在 0h、1h和 3h处理间的酶活性差异极显著,在 5h和 8h间无差异 (表 3),说明在授粉 5h后 CAT酶活性逐渐趋于了稳定状态;自花授粉 1h时 CAT酶活性与未授粉时逐渐升高,在 8h

2.2.3 异花授粉和自花授粉后 SC和 SI的 POD酶活性差异 异花授粉时,SC和 SI的 POD酶活性上升曲线趋势相似,并且增长几乎呈线性增长趋势,这说明花粉在柱头上的反应也启动了 POD酶活性的表达,并且在一段时间内 (0~8h)酶活性稳定增长;方差分析表明,异花授粉时 SC和 SI间的 POD酶活性在相同授粉时间没有差异。这说明在异花授粉后两材料间 POD酶活性无差异,且 SC具有相同于 SI的 POD酶活性系统。

时 CAT酶活性达到 10.5,是未授粉时柱头酶活性的 3.1倍,同样异花授粉和自花授粉,SC的 CAT酶活性在相同时间内相近,且变化趋势一致。

2.3.2 异花授粉和自花授粉后 SI的 CAT酶活性的变化 异花授粉后比较 CAT酶活性可以看出 (表 3),在授粉后 3h时 CAT酶活性存在极显著差异,在 8h达到最大值 12.4;自花授粉后在 3h存在极显著差异,而在 5h和 8h之间没有差异,这说明 SI在自花授粉 5h后 CAT酶活性开始稳定,由于 SI存在自交不亲和性 CAT酶活性可能随着授粉时间的延长而下降。根据前文分析得知,授粉对 CAT活性的影响略滞后于对 SOD和 POD的影响。

表 3 不同授粉方式下 SI和 SC的 CAT酶活性的比较

Table 3 Comparison of CAT activity (U/g_w) after pollination between SI and SC

授粉方式 Pollination style	供试材料 Used material	授粉后时间 /h Time after pollination				
		0	1	3	5	8
异花授粉 Cross pollination	自交亲和系 7511 Self-compatible line	3.4dD	4.3cC	7.2bB	10.3aA	10.7aA
	自交不亲和系 7510 Self-incompatible line	3.7dC	4.1dC	8.2cB	10.2bB	12.4aA
自花授粉 Self pollination	自交亲和系 7511 Self-compatible line	3.4dD	4.1dD	6.8cC	9.4bB	10.5aA
	自交不亲和系 7510 Self-incompatible line	3.7cC	4.2cC	6.5bB	8.4aA	8.6aA

2.3.3 异花授粉和自花授粉后 SC与 SI的 CAT酶活性差异 异花授粉后比较 SC与 SI的 CAT酶活性可以看出,在 1~5h内 SC的 CAT酶活性上升趋势与 SI的相似,在 8h时 SI的酶活性略高于 SC的酶活性,这可能是因为 SI保持了酶活性增长的稳定性,而在授粉后 8h时在 SC的组织内活性氧增长趋势减慢,相应地引起了 SC的柱头酶活性趋势的下降。

自花授粉后,在 0~5h时 SC与 SI表现出相似的增长趋势,在 8h时 SC的 CAT酶活性显著高于了 SI的酶活性。其原因相似于 SOD。

3 讨论与结论

植物受精是植物为了种质繁衍和种质保存的一种精密机制^[12],授粉必然会引起特定组织内生理生化的变化。本研究中发现,自花授粉 3h后,芸芥自

交亲和系 SOD、POD 和 CAT 三种酶的活性高于自交不亲和系,且在 8h 时差异均达显著水平,这表明自交亲和系耐自交的能力大于自交不亲和系。异花授粉后,发现自交不亲和系 (SD) 和自交亲和系 (SC) 的三种保护性酶活性表现趋势相似,在各个时间段上几乎无差异。说明自交亲和系 (7511) 自身拥有了一套完整和高效的保护性酶系统,它有助于芸芥自交亲和系受精过程的完成。这种保护性酶系统可能与自交亲和系本身所具有的自交亲和基因的调控有关。

对自花授粉后不同时间段的酶活性检测发现,授粉后 3h 以前,自交不亲和系 (SD) 和自交亲和系 (SC) 的三种酶的活性变化趋势相似,而在授粉 3h 以后,自交亲和系 (SC) 的酶活性高于自交不亲和系 (SD) 的酶活性, SOD 酶活性在 3h 时差异就达极显著水平, POD 和 CAT 在 8h 时差异达极显著水平。这种现象也进一步反映了自交亲和性基因对保护性酶系统的调控。酶本身是基因表达的产物,自交亲和系 (SC) 自花授粉后由于所具有的自交亲和基因对保护性酶系统的调控,因而在授粉 3h 以后,酶活性显著提高,而自交不亲和系 (SD) 由于缺乏自交亲和基因,因而在授粉后期,三种酶活性都低于自交亲和系 (SC)。

从本实验看,自交亲和性与芸芥三种保护性酶活性具有一定的关系,自交亲和系与自交不亲和系的酶活性的差异特性可以作为判断芸芥自交亲和性弱强的生理生化指标。

参考文献:

- [1] Sun W C, Zhang T. Assessment on drought tolerance of *Enuca sativa* genotype from northwestern China[A]. 10th international rapeseed congress [C]. Canberra, 1999. 217.
- [2] 孙万仓,官春云,张金文,等. 中国芸芥遗传多样性 RAPD 标记分析 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (11): 1248—1253.
- [3] 孙万仓,官春云,孟亚雄,等. 芸芥和芸薹属 3 个油用种的远缘杂交 [J]. 作物学报, 2005, 31 (11): 36—42.
- [4] 刘宝敬,宋明,李成琼,等. 大白菜自交不亲和和氨基酸快速测定 [J]. 植物学报, 1998, 40 (11): 1028—1034.
- [5] 蓝兴国,解莉楠,李玉花. 芸薹属自交不亲和细胞信号转导研究进展 [J]. 植物学通报, 2004, 21 (4): 461—470.
- [6] 吴能表,徐光德,唐于婷,等. 甘蓝自交不亲和柱头花粉萌发和保护性酶活性变化 [J]. 西南师范大学学报, 2004, 29 (5): 848—851.
- [7] 吴能表,朱利泉,陈京,等. 甘蓝自交不亲和和授粉过程中蛋白激酶活性研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37 (6): 886—890.
- [8] 邹琦. 植物生理学试验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社出版, 2000. 163—169.
- [9] 上海植物生理研究所,上海植物生理学会. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社出版, 1999. 314—315.
- [10] Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes[J]. Plant Physical, 1980 (65): 245—248.
- [11] 赵亚华. 生物化学试验技术教程 [M]. 广州: 中南大学技术出版社出版, 2000. 151—154.
- [12] 孟金陵. 植物生殖遗传学 [M]. 北京: 科学出版社出版, 1997. 215—218.
- [13] Du X M, Yin W X, Zhao Y X, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants[J]. Chin J Biotech, 2001, 17 (2): 121—125.
- [14] Mut   J M, S   nchez - J in   ez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes[J]. Front Biosci, 1999, 4: 339—345.
- [15] Nasrallah J B, Kao T H, Goldberg M L, et al. A cDNA clone encoding an S - locus - specific glycoprotein from *Brassica oleracea*[J]. Nature, 1985, 318: 263—267.
- [16] Nasrallah J B, Rundle S J, Nasrallah M E. Genetic evidence for the requirement of the Brassica S - locus receptor kinase gene in the self - incompatibility response [J]. Plant J, 1994, 5: 373—384.
- [17] Kachroo A, Schopfer C R, Naseallah M E, et al. Allele - specific receptor - ligand interactions in Brassica self - incompatibility. Science, 2001, 293: 1824—1826.
- [18] Kachroo A, Naseallah M E, Nasrallah J B. Self - incompatibility in the Brassicaceae: receptor - ligand signaling and cell - cell communication [J]. Plant Cell, 2002, 14: 227—238.

(下转第 171 页)

- 豆下胚轴膜质过氧化的影响 [J]. 农业环境保护, 2002, 21 (5): 413—416
- [28] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 丙二醛对菠菜叶片中光合羧化酶和细胞保护酶活性的影响 [J]. 植物学报, 1989, 31: 860—866
- [29] 沈文随, 对茂炳, 徐朗莱, 等. 小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化 [J]. 植物学报, 1997, 39: 634—640
- [30] 郑海雷, 赵中秋, 张春光, 等. 稀土生物效应机理研究进展 [J]. 稀土, 2000, 21 (4): 76

Effect of La on photosynthesis and active oxygen metabolism of soybean seedlings under Cd stress

ZHANG Zhi - an, CHEN Zhan - yu, XU Ke - zhang

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To study the physiological effect of La on soybean seedlings under Cd stress, the soybean seedlings were cultivated for 10 days in solutions containing different concentration of Cd and La. The results indicated that the right amount of La alleviated the reduction of chlorophyll content and soluble protein content of chloroplast, and increased photosynthetic rate of soybean leaves and the activities of Mg^{2+} - ATPase in chloroplast under Cd stress. It also increased the antioxidant ability, decreased $O_2^{\cdot -}$ production rate, tissue autooxidation rate and H_2O_2 content, reduced the relative membrane permeability under Cd stress. During the stress period, the right amount La could maintain relatively stable superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (ASA - POD) activity, keep the balance of active oxygen metabolism. La was more effective to alleviate 30 $\mu\text{mol/L}$ Cd stress than 50 $\mu\text{mol/L}$ Cd stress. The optimal concentration of La was 0.30 $\mu\text{mol/L}$. The concentration of La exceeds 0.50 $\mu\text{mol/L}$ would aggravate the stress of high Cd concentration.

Key words: Soybean; Lanthanum; Cadmium stress; Photosynthesis; Metabolism of active oxygen

(上接第 165 页)

Studies on SOD, POD and CAT activity between self - compatible and self - incompatible lines in *Eruca sativa* Mill

WANG Bao - Cheng¹, SUN Wan - Cang^{1,3}, FAN Hui - Ling¹, MENG Ya - Xiong¹,
MA Jing - Fang², YE Jian¹, LIU Ya - Li¹, SHAO Deng - Kui¹, YAN Ni¹,
ZHU Hui - Xia¹, WU Jun - Yan¹, ZENG Jun¹, ZHANG Ya - Hong¹

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730070, China)

Abstract: SOD, POD and CAT activities were measured between self - compatible line and self - incompatible lines. The results showed that the activity of SOD, POD and CAT increased after pollination in both lines. SOD activity was significantly different between self - compatible and self - incompatible lines before pollination, but POD and CAT activities were not different. SOD, POD and CAT activities of self - compatible and self - incompatible lines showed similar trend, and the enzyme activity was not significantly different at any stage between the lines after cross - pollination. The activity of self - compatible line was significant higher than self - incompatible line after pollination. The results showed that the change of enzyme activity correlated with the expression of self - compatible genes.

Key words: *Eruca sativa* Mill; Self - compatible; Self - incompatible; SOD; POD; CAT