

EST-PAGE 法对向日葵杂交种及 自交系品种纯度的鉴定*

胡辉林¹, 党润盈¹, 王 军²

(1 杨凌秦丰农业科技股份有限公司, 陕西 西安 710016; 2 西北农林科技大学 推广处, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 建立了种子酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定向日葵杂交种及自交系的技术, 并对 3 对自交系及 8 个向日葵品种进行了鉴定。结果表明: (1) 自交系与其杂交种酶谱有明显区别, 杂交种酶型具双亲互补性; (2) 8 个向日葵品种可从酶谱区分; (3) 该法快速、成本低, 具一定适应范围, 鉴定向日葵品种纯度效果良好。

[关键词] 向日葵; 酯酶同工酶; PAGE; 品种鉴定

[中图分类号] S565.503.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0065-04

我国向日葵杂交育种研究及优势利用始于 20 世纪 70 年代中后期, 1979 年正式列入国家油料作物种植计划, 是居油菜、花生、大豆之后的第 4 大类油料作物, 播种面积居世界第 7 位。目前已育成 40 多个杂交品种, 80 年代起又从国外引进优质品种, 如 G101、利马 349 等杂交油葵以及 DK119、DK188 等杂交食葵品种, 其中多数已成为各生态区的主栽品种。多年来, 向日葵品种纯度一直以不同生长阶段的形态特征来鉴定, 室内快速鉴定是个难点。目前用的方法主要是种子蛋白和同工酶电泳法。种子蛋白质电泳已广泛应用于玉米、大麦、小麦等品种鉴定^[1~4], 并被列入国家新的检验规程^[3,4], 在杂交向日葵的研究中也有一些相关的报道^[5~7]。酯酶同工酶法也应用于许多作物种质、分类研究^[8,9], 包括一些油料作物的品种鉴别^[10]。作者经过几年的试验和摸索, 选用酯酶同工酶法, 建立了一项快速、简便的室内向日葵杂交种及自交系纯度鉴定的种子酯酶同工酶(EST)PAGE 技术, 并对 8 个向日葵品种和 3 对自交系及其 F₁ 进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要药品

供试材料共 14 份, 杂交油葵 G101 及其两个亲本自交系、杂交油葵利马 349 及其两个亲本自交系、杂交食葵 DK119 及其两个亲本自交系、新葵杂 4、2099、杂交食葵 DK188、杂交油葵康地 5 号、星火花葵(常规食葵), 除康地 5 号为购得, 其余均由秦丰农业质管部提供。其中杂交油葵 G101、杂交食葵

DK119 为秦丰农业引自美国迪卡布公司, 杂交油葵利马 349 为秦丰农业引自法国利马格兰公司。

主要药剂为丙烯酰胺(Acr)、亚甲基双丙烯酰胺(Bis)、Tris、HCl、Gly、坚牢兰 RR 盐。除 Bis 为化学纯外, 其余均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 将供试向日葵去壳, 单粒放入 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL Tris-Gly 提取液, 用专用微型钴研磨成糊状, 浸提 30 min, 5 000g 离心 2~3 min, 置冰箱静置约 30 min 后待用。

1.2.2 凝胶及缓冲系统 采用碱性不连续电泳凝胶缓冲系统, 催化剂为过硫酸胺, 加速剂为四甲基乙二胺, 浓缩胶浓度 3.6%, pH 6.8; 分离胶浓度 10%, pH 8.9; 电极缓冲系统为 Tris-Gly, pH 8.3。

1.2.3 电泳 每梳孔点样 5 μ L, 上槽接负极, 下槽接正极, 电泳前给上槽加 1~2 滴 1% 溴酚兰前沿指示剂。400 V 恒压条件下电泳, 指示剂距槽底 0.5~1 cm 时结束电泳, 时间约 80~90 min。电泳时室温以不超过 25 $^{\circ}$ C 为宜。

1.2.4 染色 坚牢兰 RR 盐 200 mg 用质量分数 1% 的 α -Hac-萘乙酯 7.5 mL, β -Hac-萘乙酯 4 mL 溶解过滤后制成染色液待用。染色时每 100 mL Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中加 10 mL 染色液, 染色中不断摇动染色盒, 室温下约 30 min 染色即完成。

2 结果与分析

2.1 杂交油葵 G101 及其亲本酯酶同工酶谱

杂交油葵 G101 及其两个亲本自交系(不育系

* [收稿日期] 2002-07-12

[作者简介] 胡辉林(1973-), 男, 陕西户县人, 农艺师, 主要从事质量检测及检测技术研究。E-mail: gold_eafhl@163.net

恢复系)种子 EST 同工酶谱见图 1。从图 1 可看出,不育系(母本)可分离出 3 条一级酶带及 1 条二级酶带, Rf 分别为 0.564, 0.586, 0.620, 0.652; 恢复系(父本)可分离出 3 条一级酶带, Rf 分别为 0.642, 0.665, 0.70; 杂交种 G101 继承了母本全部的 4 条

酶带及父本的 Rf 0.665, 0.70 两条带位, 其双亲、杂交种间均有明显区别。其父本 Rf= 0.640 酶带在杂交种中没有得到表达, 而 Rf= 0.665 酶带在杂交种中酶谱着色较浅, 变为二级带位, 整个杂交种谱带形成偏母型互补酶谱。

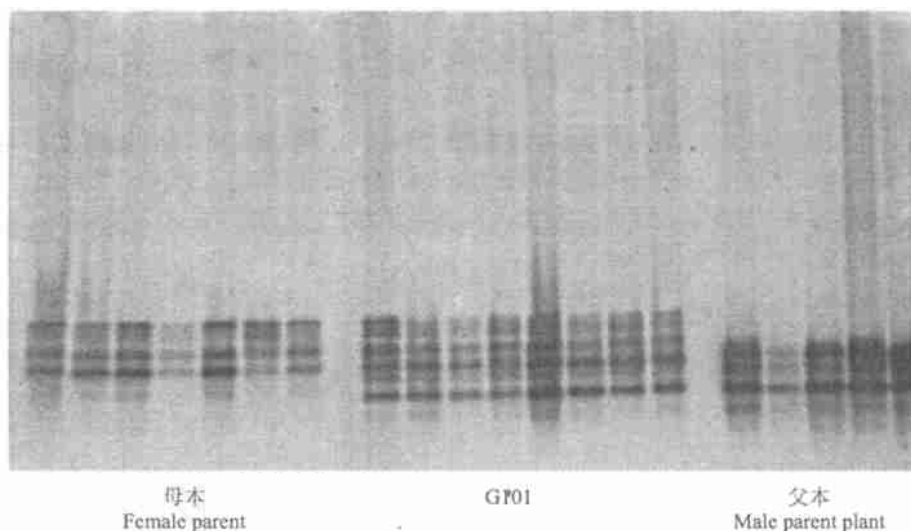


图 1 G101 及其亲本酶谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of G101 and the inbreds

2.2 杂交油葵利马 349 及其亲本酯酶同工酶谱

杂交油葵利马 349 及其双亲自交系酯酶同工酶电泳分离后, 酶谱(图 2)显示, 利马 349 完全互补的继承了其双亲的酶谱。其亲本不育系(母本)可分离出 4 条一级酶带, Rf 分别为 0.573, 0.593, 0.615,

0.653; 恢复系(父本)可分离出 3 条一级酶带, Rf 分别为 0.678, 0.705, 0.738; 杂交种利马 349 完全继承了母本的 4 条酶带及父本的 4 条带位, 双亲、杂交种间有明显区别。

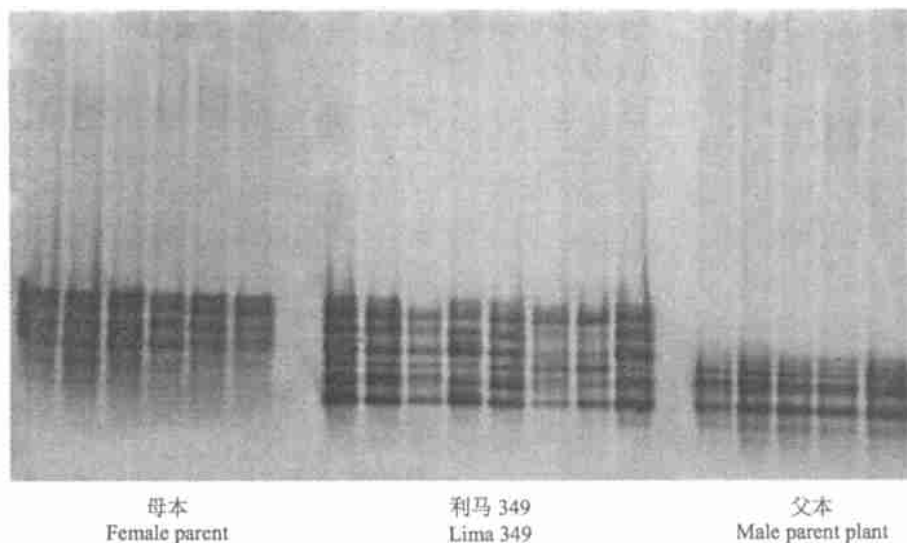


图 2 利马 349 及其亲本酶谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of the Lima 349 and the inbreds

2.3 杂交食葵 DK119 及其亲本酯酶同工酶谱

杂交食葵 DK119 及其亲本酯酶同工酶电泳分离酶谱见图 3。由图 3 可见, DK119 在大部分带位上

基本互补的继承了其双亲的酶谱。但其亲本不育系(母本)经电泳分离后的样本材料酶谱类型不完全一致, 而相同条件下父本样本的一致性却极好。同样,

G101、利马 349 的双亲自交系都很整齐, 分析原因有两种可能: 一是材料不纯, 二是遗传不稳定。由于其亲本源自国外, 具体的原因尚需进一步研究。仅就酶谱而言, 父母本、杂交种三者之间基本有明显差别, 不育系至少可分离出 3~7 条一级带位, 其特征

酶带 R_f 为 0.774; 父本自交系可分离出 3 条一级酶带, 特征酶带分别为 $R_{f2}=0.726$, $R_{f3}=0.731$; 杂交种 DK119 同时继承了双亲的特征带位, 其余大部分带位互补后变为二级酶带。

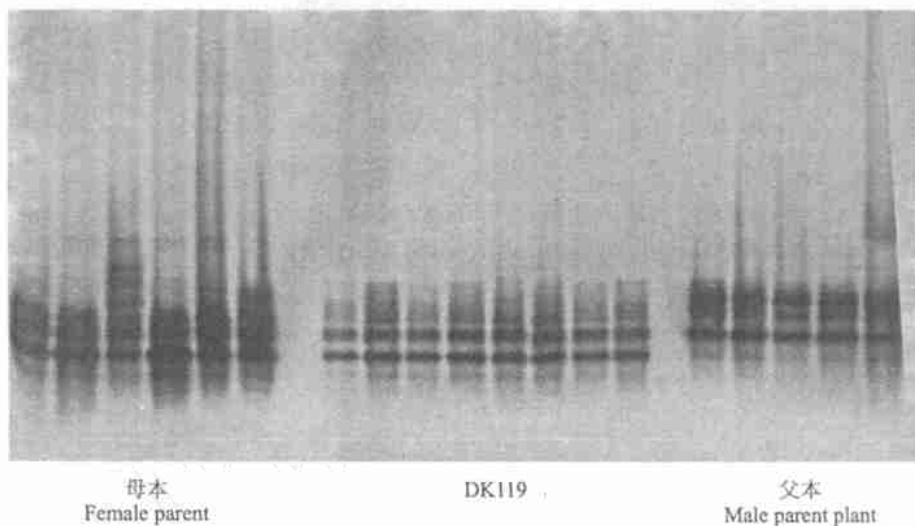


图3 DK119 及其亲本酶谱

Fig. 3 Electrophoresis patterns of the DK119 and the inbreds

2.4 杂交向日葵 G101 等品种酯酶同工酶酶谱

G101、利马 349、2099、新葵杂 4、康地 5 号、DK119、DK188、星火花葵等 8 份向日葵品种分别属于杂交油葵、食葵及常规食葵, 其中杂交油葵 5 份, 杂交食葵 2 份, 常规食葵 1 份(除星火花葵为 1 粒外, 其他品种都为 3 粒重复)。经电泳分离后各品种

酯酶同工酶之间均有较明显差异, 其一级酶带数 3~7 条, 可以从条带数目、迁移率、宽度、染色深浅区别。其中 G101、利马 349、DK119、2099 及 DK188 在 $R_f=0.67$ 都有相同或相近带位, 推测其在品种起源上有一定的关联(图 4)。

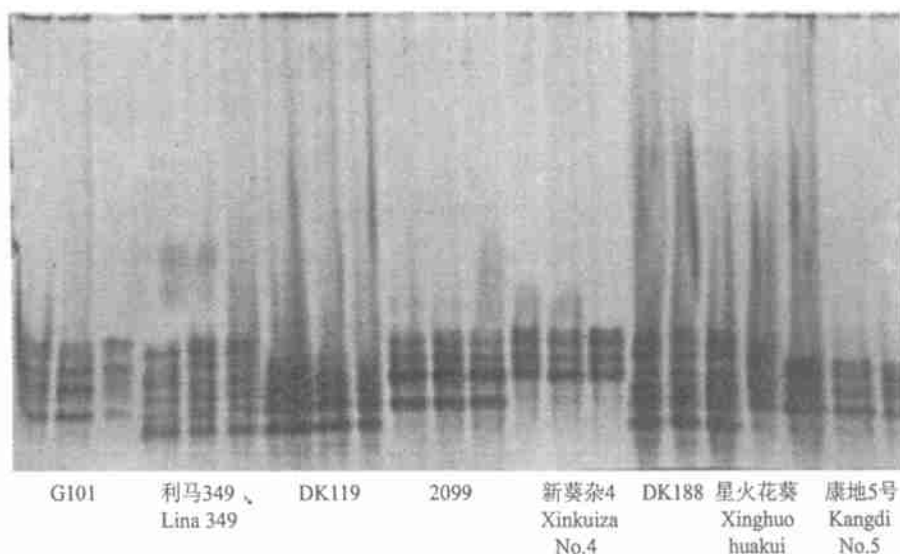


图4 G101、利马 349、DK119、2099、新葵杂 4、DK188、星火花葵、康地 5 号酶谱

Fig. 4 Electrophoresis patterns of G101, Lina 349, DK119, 2099, Xinkuiza NO. 4, DK188, Xinghuo huakui(1 pattern), Kangdi No. 5

3 讨 论

1) 用形态学特征鉴定向日葵品种, 往往难以进行快速有效的鉴定。目前所报道的向日葵品种室内鉴定主要有提取、分离种子蛋白法, 一般都要进行脱脂, 多用石油醚、正己烷等有机溶剂, 室温下连续搅拌或振荡抽提, 一个样品脱脂一般都在 10~12 h 以上^[6,7], 短的也要 3~4 h^[5], 脱脂时间长, 合适溶剂选择难度大, 且脱脂效果会直接影响实验效果^[5]。EST-PAGE 法鉴定向日葵品种纯度的特点: 一是用干种子直接作为电泳材料, 无须脱脂; 二是适用范围较宽, 对杂交油葵、杂交食葵及其自交系以及常规品种都能较好地鉴别。试验所选品种分别源于美国、法国以及我国一些优势品种, 其中有的亲源关系也较

近, 多为目前各生态区的主栽油、食葵品种, 该法基本都可以区分; 三是简便、快速, 可靠性、重现性好^[11], 取材方便, 制样、制板简单, 凝胶快, 跑胶时间短, 酶谱效果清晰, 特征酶带明显, 成本低。

2) EST-PAGE 系统的改进。经典的酯酶同工酶电泳法(浓缩胶浓度 3%, 分离胶浓度 7%~8%) 不仅制板、跑胶时间长, 而且无法区分杂交种及其双亲。改进后的分离胶浓度为 10%, 浓缩胶为 3.6%, 并对催化系统和缓冲体系各组分分配比进行了优化。改进后的浓缩胶室温下约 5 min 即聚合, 分离胶 15 min, 胶片透明、韧性好, 不粘板。跑胶时间约 80~90 min。染色时间约 30 min, 谱带较一般酯酶谱酶带平直、清晰, F_1 及其亲本特征酶带明显。

[参考文献]

- [1] 张春庆. NAU-PAGE 技术与玉米种子纯度测定[J]. 中国农业科学, 1995, 28(6): 20-24
- [2] 周展明. 玉米蛋白质凝胶电泳法鉴定品种纯度的研究[J]. 种子世界, 1992, (1): 16-18
- [3] GB/T 3543.1-7-1995, 农作物种子检验规程[S]
- [4] NY/T 449-2001, 玉米种子盐溶蛋白电泳鉴定方法[S]
- [5] 谢宗铭, 陈福隆, 孙宝启. 种子蛋白乳酸尿酸聚丙烯酰胺凝胶技术及其对向日葵自交系和杂交种的鉴定[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(3): 8-12
- [6] Anisimova I N, Gavriluyck I P, Konarev C G. Identification of sunflower lines and varieties by helianthinin electrophoresis[J]. Plant Varieties & Seeds, 1991, 4: 133-141
- [7] Varier A, Dadlani M, Cooke R J. Identification of sunflower hybrids and inbreds by SDS-PAGE of the seed proteins[J]. Seed Research, 1992, 20(2): 138-141
- [8] 赵庆忠, 程 勇, 张秀荣, 等. 芝麻核心种质与非核心种质的同工酶研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(4): 29-34
- [9] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996
- [10] 李殿荣, 王保仁, 夏永真. 利用同工酶谱分析鉴定杂交油菜秦油二号种子纯度的方法[J]. 陕西农垦科技, 1994, 24: 10-12
- [11] 胡辉林, 党润盈. EST-PAGE 法鉴定杂交油葵 G101 及其亲本品种纯度的研究[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(2): 26-28

EST-PAGE technology and identification of sunflower hybrids and inbreds

HU Hui-lin¹, DANG Runy-ing¹, WANG Jun²

(1 Yangling Qinfeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710016, China;

2 Sci-Tech Popularization Department, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: An improved technology of seed EST-PAGE suitable for sunflower inbred and hybrid variety identification was developed. Three couples of sunflower inbred varieties and 8 sunflower varieties including hybrid and inbred of oil sunflowers, edible sunflowers and ordinary sunflower were tested by it. The results were as follows: (1) the banding patterns of inbred and the F_1 were different respectively, the zymogram of the F_1 primarily consisted of the parent's; (2) 8 sunflower varieties could be tested and discriminated by the zymotype; (3) characterized by promptness and lower cost, the technology has a wide identification range. It contributes much to the study of oil crop variety identification.

Key words: sunflower; esterase; PAGE; variety identification