

# 应用等电聚焦电泳测定玉米种子的纯度

王卫红,张静梅,苏瑞萍,霍庆增,陈哲,李举怀

(北京市农林科学院玉米中心,北京 100089)

**摘要:**应用灵敏度、分辨率和重复性均较高的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦(IEF)电泳测定 150 多种玉米自交系和 90 多种玉米杂交种的胚及幼芽的酯酶(EST)同工酶,通过对酶谱的比较和遗传分析,发现它们的酶谱各有特点,而且相互间又有很显著的差异,这些差异正是它们基因型差异的反映。因此,酶谱的特点及差异为玉米自交系和玉米杂交种种子纯度的鉴定从遗传和生化角度提供了科学依据。

**关键词:**等电聚焦电泳;玉米种子;纯度

**中图分类号:**S339.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2003)03-0027-05

## Determining Purity of Corn Seeds with Isoelectric Focusing Electrophoresis

WANG Wei-hong, ZHANG Jing-mei, SU Rui-ping, HUO Qing-zeng, CHEN Zhe, LI Ju-huai  
(Corn Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

**Abstract:** Esterase isozymes in more than 150 corn inbred lines and 90 corn hybrids were investigated using polyacrylamide gel isoelectric focusing electrophoresis. All of the inbred lines and hybrids could be unequivocally distinguished from one another by their zymograms. According to the zymogram, the purity of the specific corn inbred or hybrid could be counted and showed by the percentage. The germination tests were taken at the same time in the field by using the same corn inbred and hybrid. The two tests showed the same results. IEF is a very useful quick and accurate method to determine the purity of corn inbred and hybrid and is widely used in corn breeding program and corn production.

**Key words:** Isoelectric focusing electrophoresis; Corn seed; Purity

在玉米制种、生产及种子经营中常因自交系和杂交种种子纯度不高而出现各种问题,并造成重大的经济损失。然而从玉米种子的形态特征又很难准确地鉴定其纯度,采用田间种植法鉴定,不但要消耗很多人力、物力、财力,还要 60 d 左右的时间才能完成,因此迫切需要研究出快速准确的测定玉米种子纯度的新方法。

目前一些单位采用垂直板电泳方法,先测定玉米种子的蛋白质或同工酶,再通过对带谱的分析和统计得出种子的纯度,但这种电泳分辨率较差,不容易操作,制作干胶板时又容易破裂,不能长期保存电泳的真实结果。本研究应用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳(以下简称等电聚焦电泳)测定玉米自交系和

杂交种种子的纯度,取得了满意的效果。这种电泳不但分辨率高,酶带清晰,易于鉴别,而且简便、经济、快捷、容易操作,电泳真实结果的湿胶板也容易制成能长期保存的干胶板,有利于复查和积累资料<sup>[1]</sup>。

我们经过几年的研究,于 1994 年率先在国内正式将这项成熟和快速准确的技术用于鉴定玉米种子的纯度。现已为北京、天津、河北、辽宁、吉林、内蒙古、陕西、山东、山西、甘肃等地的种子分公司、种子监督检验站、科研单位等部门,测定了 150 多种玉米自交系、90 多种玉米杂交种、1 300 多批种子的纯度,这些样品代表着数千万公斤的玉米种子,为送检单位提供了可靠的测定结果,为玉米种子纯度的测定

收稿日期:2002-12-16

作者简介:王卫红(1966-),女,北京人,助理研究员,学士,主要从事农作物育种及种子鉴定等工作。

提供了一种快而准的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

玉米种子的胚和幼芽均可作鉴定纯度的材料,方法是将种子放入蒸馏水中浸泡 2~3 h,而后取胚,或培养幼芽,待其长到 1~3 cm 长时,将芽剪下作测定材料。也可将胚和幼芽放入 -20 ℃ 冰箱中冷冻、保存、备用。

### 1.2 电泳

等电聚焦电泳主要参照 Vesterbry<sup>[2]</sup> 和 Wrigley<sup>[3]</sup> 的方法,丙烯酰胺浓度为 5.5%,交联度为 4.8%,两性电解质(pH 3~9.5)或载体两性电解质(pH 3.5~10),浓度为 4.5%,TritonX-100 浓度为 0.1%,胶板大小为 190 mm×90 mm,厚度为 1 mm,每块胶板点 35~38 个样,每 1 个样为 1 个胚或 1 个幼芽,电泳在 4 ℃ 左右(冰箱中)进行,始电流为 10 mA 或 15 mA,电压约 50 V 或 90 V,电泳 5 h,终止时电压为 580 V。染色固定、pH 值测定、制干胶板参照李绍文等<sup>[4]</sup> 的方法。

### 1.3 统计

每个玉米样品测定 100 粒种子以上,如测定玉米自交系的纯度,应统计自交系及其他种子的百分数;如测定玉米杂交种的纯度则分别统计杂交种、父母本自交种子及其他种子的百分数。自交系和杂交种的百分数,即分别为它们的纯度。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米种子纯度鉴定的理论基础

同工酶(isozyme)是指具有相同或相似的催化功能,但结构不同的一组酶,它是由染色体上不同的基因位点或同一位点的不同等位基因编码的,后者又称为等位基因酶(allozyme)。同工酶是基因表达的结果,同工酶的差异反映了基因型的差异,因而这些差异为鉴定不同的玉米自交系和不同的玉米杂交种种子的纯度奠定了理论基础。现在同工酶电泳技术已成为研究动植物亲缘关系、物种进化、遗传变异、种属鉴定及杂种优势预测等的重要手段<sup>[5]</sup>。

生物体内有很多种酶,酶是有催化功能的蛋白质,不同的酶有不同的催化功能,酯酶是能催化酯键的一种酶,如催化酯键的有几种结构不同的蛋白质,

就称为酯酶同工酶。酯酶在各种动植物体内广泛存在,并参与重要的生化反应。许多研究都表明,酯酶的遗传性稳定,具有鉴定性酶的作用,可用于动植物种间、玉米自交系之间、玉米杂交种之间的生化鉴定。

因此应用等电聚焦电泳测定玉米种子的胚或幼芽的酯酶同工酶,根据酶谱的特点和遗传分析,不但能快而准地鉴定玉米自交系和玉米杂交种种子的纯度,而且还能测出杂交种中父母本自交种子及其他种子。

### 2.2 酶谱的特点及鉴定方法

2.2.1 酶谱的特点 大量的试验结果表明,玉米自交系和玉米杂交种种子幼芽的酯酶同工酶酶带从 pH 3.5~8.5 区域内都很清晰,胚的酶带在 pH 3.5~4.5 及 pH 6.5~8.5 范围内也很清晰,但在 pH 4.6~6.4 之间酶带的色较浅。同时还表明,同一玉米自交系、同一玉米杂交种的同一器官(胚或幼芽)的酯酶同工酶酶谱是一致的,不同器官的酶谱基本一致;不同的玉米自交系、不同的玉米杂交种的同一器官的酯酶同工酶酶谱是不一致的,而不同器官的酶谱也是不一致的。酶谱与母本(标准样)一致的,为母本自交种子,与父本(标准样)一致的,为父本自交种子,杂交种的酶谱则具有父母本的特征,与父母本和杂交种酶谱均不一致的为其他种子。根据这些原理就能对各种玉米自交系和不同的玉米杂交种种子的纯度进行准确的鉴定。

2.2.2 自交系纯度的鉴定 从 150 多种玉米自交系幼芽或胚的酯酶同工酶酶谱可以看出,它们的酶谱差异主要在 pH 6.5~8.5 范围内。根据前面所谈的原理,同一玉米自交系的同一器官酶谱是一致的,不一致的即为其他种子,很容易鉴定(图 1)。

2.2.3 杂交种纯度的鉴定 在所测定的 90 多种杂交种及其父母本中,绝大多数酶谱的差异都在 pH 6.5~8.5 范围内,有一部份在 pH 6.0~7.0 之间,极少数几种在 pH 3.5~4.5 处。现分别叙述如下。

pH 6.5~8.5 约有 80% 的杂交种与其父母本幼芽或胚的酶带数量、位置、深浅等在这个范围内有显著的差异,因此很好鉴定,如掖单 19、京早 8、京玉 1、烟单 14、中单 2、唐抗五、太和 1、鲁原单 14、正反交唐玉 10、农大 115、农大 3138、鑫玉 6 号、农大 80、沈单 10、郑单 958 等(图 2)。

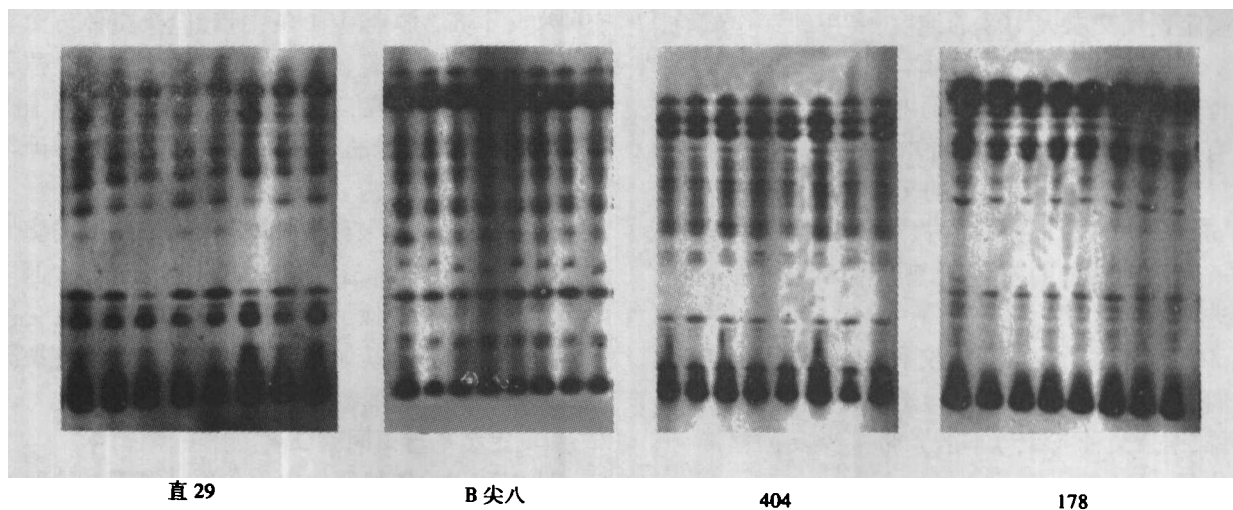


图 1 4 种玉米自交系幼芽的酶同工酶谱

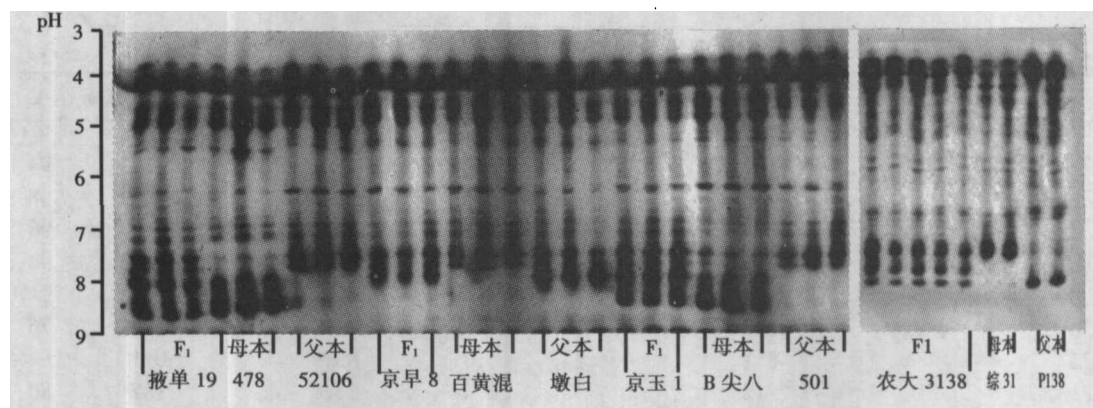


图 2 4 种玉米杂交种及其父母本幼芽(前 3 种)或胚(第 4 种)的酶同工酶谱

pH 6.0~7.0 约有 20% 的杂交种及其父母本的幼芽酶带差异在此范围内,主要是以 478, 5003, 3189, 8001 为母本的这一类杂交种,如掖单 12(478 × 81515)、掖单 13(478 × 340)、京科 59 (478 × 直 29)、晋单 27(5003 × 关 17-1)、掖单 11(5003 ×

52106)、沈单 7(5003 × E28)、掖单 18(3189 × 81515)、掖单 20(8001 × 502)等等。这些杂交种的母本均在 pH 6.0~7.0 处比杂交种少 1 条主带,这是重要的特征,它们的父本与杂交种及母本的酶带都不一致,容易识别(图 3)。

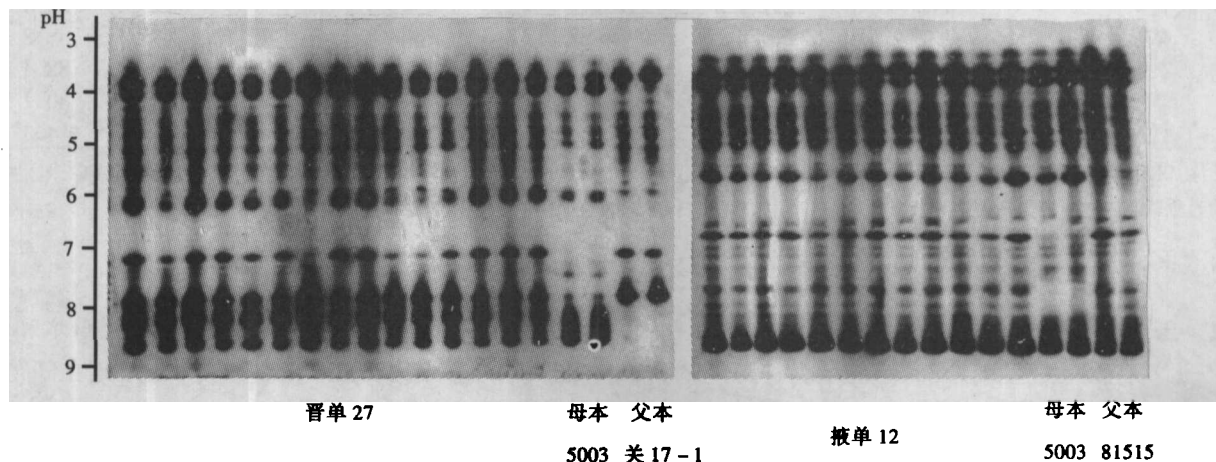


图 3 2 种玉米杂交种及其父母本幼芽的酶同工酶谱

鉴定正反交农大 108 的纯度,要用幼芽作试验材料。它们的杂交种与其父母本之间酶带的差异在这个范围或 pH 3.5~4.5 范围内。

有些杂交种如沈单 7、晋单 27、掖单 19、掖单 20、正反交农大 60 等和它们的父母本幼芽的酶谱除了在 pH 6.5~8.5 范围内有显著差异外,还在 pH 6.0~7.0 处有明显的差别,这就更有利于对种子的纯度进行鉴定。

pH 3.5~4.5 极少数杂交种如正反交冀丰 58 及它们的父母本胚的酶带差异能在这个范围内观察到,可根据杂交种与父母本的条带多少及位置将它们区分开。

正反交鲁原单 50 杂交种与其父母本胚的酶带也在 pH 3.5~4.5 之间有差异,母本鲁原 92 明显比杂

交种和父本齐 319 都少 1 条主带,但杂交种与父本的酶带差异却不显著,这就不利于对父本自交种子进行识别了。然而在自然条件下,父本自交种子很少,测定杂交种种子的纯度重点是看杂交种和母本自交种子的百分数。

正反交鲁原单 50 杂交种与父本鲁原 92 胚的酶带差异显著,与母本齐 319 胚的酶带差异不明显,但可以用其他方法进行检测。在所测的 90 多种杂交种中,除了极个别外,其他的杂交种种子纯度都容易测定。

### 2.3 测定结果与田间验证

我们和送检单位用电泳聚焦电泳测定过纯度的种子分别进行了田间纯度验证,结果吻合很好(表 1),从而肯定了电泳检测结果的可靠性。

表 1 等电聚焦电泳测定的纯度与田间验证的纯度比较

玉米名称	电泳测定结果					田间验证结果	
	测定数(粒)	母本(%)	父本(%)	其他(%)	纯度(%)	统计数(株)	纯度(%)
E28 自交系	107	0	0	3.7	96.3	133	94.0
478 自交系	111	0	0	3.6	96.4	179	98.9
B 尖八自交系	110	0	0	1.0	99.0	158	96.8
京单 901*	111	3.9	0	2.0	94.1		92.2
唐抗五*	105	4.7	2.9	1.9	90.5		91.0
唐抗五(胚)	112	25.0	0.9	1.8	72.3	217	76.5
掖单 12*	99	8.1	0	6.0	85.9	1 011	84.5
掖单 12	109	9.2	0	6.4	84.4	187	80.7
西玉 3*	108	12.1	0	4.6	83.3	1 062	84.3
丹玉 13	105	0	0	11.4	88.6	163	91.4
太和 1	105	7.6	0	2.9	89.5	191	93.2
京早 8	102	6.9	1.0	2.9	89.2	217	90.3
反交冀丰 58	113	7.1	0	5.3	87.6	238	86.6
反交冀丰 58(胚)	109	10.1	0	9.2	80.7	145	80.7
晋单 27(胚)	112	2.7	4.5	1.8	91.0	156	87.2
鲁原单 14	110	5.5	2.7	0.9	90.9	167	89.2
反交烟单 14	109	7.3	3.7	6.4	82.6	79	81.0
农大 115(胚)	112	2.7	3.6	2.7	91.0	196	88.8
农大 80	102	2.9	0	8.8	88.3	249	88.8
农大 108	103	8.7	0	8.8	82.5	244	82.4
唐玉 10	105	13.3	1	5.7	80.0	207	80.2
沈单 10	71	15.5	8.5	0	76.0	73	74.0

注:田间验证时,只能准确地统计杂交种及其亲本的植株数,有的难以将母本和父本分开,因此表中只列了田间验证的纯度。未注明测胚的均为测芽。未注明自交系的均为杂交种一代;\* 送检单位进行的田间验证

## 3 讨论

### 3.1 玉米种子纯度与产量

玉米自交系纯度高,配制出的杂交种纯度就高,其产量也高,而杂交二代以后,由于群体发生了分离,产量大幅度下降,所以不能作种子使用,因此本文所谈的测定玉米杂交种种子的纯度,全是指测定

杂交种一代种子的纯度。杂交种中如果母本和父本自交种子多,玉米的产量就要降低,因此在间苗时,一定要除掉长势弱、植株矮小、产量低的母本和父本自交苗。

### 3.2 纯度出现误差的原因

将用等电聚焦电泳测定过纯度的玉米自交系和杂交种种子进行田间种植法验证时,有时出现一定的误差,但这种误差不是因为电泳结果不准确,而是由下列一些原因引起的。

①玉米自交系普遍都长势弱、植株矮小,与其中的长势强、植株高大的杂交种很容易识别,但如混有其他自交系种子并长成植株时,有的难以从植株的形态特征上将这些自交系分开的,这就会出现误差。

②在对玉米杂交种子进行田间纯度验证时,杂交种的植株与其父母本的植株不难区别开,但其中如有其他的杂交种植株时,也是不容易区分开的,这样也会出现误差。

③在验证玉米自交系和玉米杂交种种子的纯度时,如果未将生活力弱而死于生长前期的自交系的苗统计进去,也要出现误差。

④用等电聚焦电泳测定的 100 粒种子与田间种植法验证所用的是同一批种子,但不是相同样品的种子,这是由于取样而出现的误差。

就等电聚焦电泳而言,它的精确度和准确性都是很高的,这些优点也是大家公认的,因为这是属于分子生物学范畴的检测技术,人们用感官难辨别的特性,该技术却能清楚地分辨出来。

### 3.3 试验材料的选择

玉米自交系和玉米杂交种种子的胚和幼芽的酯酶同工酶谱都很清晰,易于判读,是鉴定种子纯度的理想器官。测定胚或幼芽结果都同样准确,以什么器官作试验材料,要根据具体的种子而定。测定玉米自交系的纯度用胚或幼芽作试验材料都行。在

所测定的 90 多种杂交种中,除了正反交冀丰 58、正反交鲁原单 50 测胚外,其他的都可以用幼芽作试验材料,如果杂交种与其父母本亲缘关系远,即酯酶同工酶谱差异大的,在 pH 6.5~8.5 范围内酶带清楚的,都可以用胚作试验材料,如中单 2、唐抗五、农大 3138、掖单 19、鲁原单 14、正反交唐玉 10、农大 80、蠡玉 6 号、郑单 958、沈单 10、豫玉 22 等。

测定胚当天就能出结果,测定幼芽则需 7 d 左右才能得到结果,这是因为发芽所需的时间长,后者虽然时间长,但可以同时测定种子的发芽率,而发芽率的高低,又是衡量种子质量的一项重要指标,可谓一举两得。

应用等电聚焦电泳测定玉米种子纯度,已广泛用于玉米育种、制种、生产及种子经营等实际工作中,取得了很好的经济效益和社会效益,目前国际上也用这种技术进行玉米种子纯度的测定。

### 参考文献:

- [1] 赵久然,李举怀,郭景伦,等. 应用同工酶鉴定玉米自交系、杂交种纯度技术的研究[J]. 北京农业科学, 1996, (6):19-21.
- [2] Vesterbery O. Isoelectric focusing of proteins[J]. Methods Enzymol, 1971, 22:389-412.
- [3] Wrigley C W. Gelelectrofocusing[J]. Methods Enzymol, 1971, 22:559-564.
- [4] 李绍文,孟玉萍,张宗炳,等. 蜜蜂酯酶同工酶的研究[J]. 昆虫学报, 1985, 28(4):369-374.
- [5] 李举怀,李绍文,孟玉萍,等. 蜜蜂属的生化鉴定[J]. 华北农学报, 1987, 2(3):107-111.