

同工酶差异位点分析在蔬菜杂交种 纯度检测中的应用

郑晓鹰, 李 丽, 邢宝田

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘要: 用 10 种同工酶和蛋白质分析体系, 分析了 7 种重要蔬菜的 71 个杂交种与其亲本之间的差异位点, 以及这些差异位点用于杂交种纯度检测的可能性和存在的问题。试验表明, 作物的不同种类, 杂交种与亲本之间的亲缘关系以及作物种类的遗传多态性, 都会影响同工酶差异位点产生的多寡, 从而影响到这一技术是否能用于此种作物的纯度检测。分析了不同同工酶在不同蔬菜中的多态性以及蔬菜种子纯度检测中的表现。

关键词: 杂种纯度; 蔬菜作物; 位点; 检测

中图分类号: S603.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)01-0056-07

利用同工酶在品种之间表现的差异位点鉴别品种的研究已有多篇报道^[1~5], 但是还缺乏系统的分析和标准图谱的建立。尤其对蔬菜种类, 还缺少对检测技术的系统的研究。本文分析了利用 10 种同工酶和不同形式蛋白质的差异位点, 用于我国主栽的 7 种蔬菜商品杂交种的纯度检验的结果, 以及杂交组合中亲本的亲缘关系、作物种类的遗传多态性、各种同工酶染色技术等对检测结果的影响。同时, 分析了结果差异表现的稳定性, 以及不同分析技术在不同种类中的应用效果。

1 材料和方法

1.1 植物材料

试验中所用的 7 种蔬菜杂交种及其亲本种子来自北京蔬菜研究中心种质资源库和育种组。7 种蔬菜的杂交组合分别是: 大白菜 20 个组合; 甘蓝 10 个组合; 番茄 12 个组合; 甜辣椒 10 个组合; 黄瓜 8 个组合; 青花菜 4 个组合以及西瓜 7 个组合。

1.2 同工酶和蛋白质提取

从种子或萌发 2~8 d 的种苗提取蛋白质或同工酶。试验中使用了 4 种类型的提取液: (1) 无离子水, 20% 蔗糖(均匀胶); 无离子水(IEF)。(2) 酶提取液 I: 磷酸氢二钠 0.15 g, 蔗糖 1.75 g, PVP-40 1.25 g, EDTA 0.0125 g, DTT 0.0125 g, 抗坏血酸 0.025 g, 二乙基二硫甲酸钠 0.025 g, 焦硫酸钠 0.0125 g, 巯基乙醇 0.025 mL, 用无离子水定容到 25 mL。(3) 酶提取液

II: 0.4 mL 两性电解质, 2.0 mL 丙三醇, 0.028 mL 巯基乙醇, 0.02 mL Triton X-100 加无离子水定容至 20 mL。(4) 蛋白质提取液: 10% SDS 4 mL, 1 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 丙三醇 1.6 mL, DTT 300 mg, 加无离子水定容至 20 mL。

1.3 电泳方法

采用 2 种方式的丙烯酰胺凝胶电泳: (1) 垂直板均匀胶电泳, 分离胶浓度为 7% 或 10%, 浓缩胶浓度为 3.5%。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸体系, pH 8.3, 电泳进行为 300V 恒压, 3~4 h。(2) 平板等电聚焦电泳(IEF), 胶浓度为 6% 或 8%, 电极液正极为 1% 冰乙酸, 负极为 2% 乙二氨。电压高限为 1500V, 电泳时间为 1 h 或 1.5 h。

1.4 染色方法

试验所检测的 10 种同工酶是: 过氧化物酶(POX), 碱性磷酸酯酶(EST), 酸性磷酸酯酶(ACP), 磷酸葡萄糖变位酶(PGM), 磷酸葡萄糖异构酶(PGI), 乙醇脱氢酶(ADH), 谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT), 异柠檬酸脱氢酶(IDH), 苹果酸脱氢酶(MDH), 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6-PGD)。10 种同工酶和蛋白质的染色方法分别为: POX, EST, PGM, 6-PGD 和蛋白质染色参照郑晓鹰等^[5,6]的方法; ACP, ADH 参照王中仁^[7]的方法; MDH, GOT, IDH, PGI 参照 Wendel 等^[8]的方法。

2 结果与分析

2.1 作物种类的遗传多态性与杂交组合中同工酶差异位点的存在率

一种作物是否能用同工酶分析技术检测出杂交种的品种纯度, 取决于这个杂交种与其亲本之间是否存在同工酶的差异位点。而在某一蔬菜种类中是否容易找到同工酶差异位点又与这一种类本身的遗传多态性以及两个亲本之间亲缘关系的远近有关。试验所测定的 7 种主要蔬菜同工酶分析结果, 不同种类表现十分不同。大白菜、甘蓝、绿菜花的同工酶标记多态性表现丰富, 往往只用一两个同工酶就可以在大部分杂交组合中找到差异位点。而西瓜属于遗传多态性较窄的种类, 大部分所测同工酶标记在被试杂交种和亲本之间看不到差异位点的存在。表 1 是用 10 种同工酶体系和 2 种蛋白质体系鉴别 7 种蔬菜和瓜类杂交种与亲本差异位点的结果。

试验结果表明, 大白菜和甘蓝 30 个杂交种主要在 3 个同工酶体系存在差异位点, 可以鉴定的组合占测试组合数的 70%。用 POX 和 EST 体系测定的大白菜和甘蓝, 80% 以上组合存在差异位点。用 PGM 和 SDS 蛋白质体系测定, 杂交种与亲本存在差异位点的组合在 60% 以上。甜椒、黄瓜和番茄的 30 个杂交种用 10 种同工酶体系测试鉴别率分别为 22.5%, 20.3% 和 19.2%(表 2)。12 个番茄杂交组合, 存在差异位点最多的 MDH 体系, 可以鉴定 50% 的组合, 其他酶体系存在差异位点的组合均在 10%~30%。可以测定甜椒杂交种的体系主要是 POX 和醇溶蛋白, 分别有 30%~40% 的组合存在差异位点。黄瓜存在差异位点较多的体系主要是 POX 可以鉴别 63% 的组合。青花菜可鉴定组合为 34.6%, 主要是 2 个磷酸酯酶 EST 和 ACP 存在差异位点, 参试组合用这 2 个酶 100% 的可以鉴别。西瓜存在差异位点的比率最低, 只有 15% 的组合可以鉴定。

2.2 不同同工酶在参试蔬菜杂交种检测中的表现

如果要确定是否能用某种同工酶差异位点鉴定一个未测试过的杂交种, 往往希望从最易表现差异的同工酶开始。从本试验对 7 种蔬菜用 10 种同工酶检测的结果分析, 不同的同工酶可检出差异位点的频率不一样。在所测的 71 个不同种类的杂交种中, 用 POX 可以检测出的占 52%, EST 可检出的占 45%, PGM 占 38%, MDH 占 27.6%, ACP 占 28%, IDH, 6-PGD, GOT 分别能检出 21.7%, 16.7% 和 8.3%, ADH 和 PGI 在所检种类里没有看到差异位点(表 1)。

表 1 71 个不同种类蔬菜的杂交组合中存在同工酶和蛋白质差异位点的组合分布 个

作物 种类	测试 组合	存在同工酶差异位点的组合数										
		POX	EST	PGM	MDH	ACP	ADH	GOT	6PGD	IDH	PGI	PROT
大白菜	20	16	14	12	/	/	/	/	/	/	/	5/7
甘蓝	10	8	8	6	/	1/3	/	/	/	/	/	/
番茄	12	3	4	0/8	6	1/6	0/5	0/5	0/3	1/7	0/8	/
甜椒	10	4	1/8	0/7	0/3	0/6	0/1	0/3	0/1	2/7	0/1	8/16
黄瓜	8	5	1	3	2	0	0	/	2	/	0	/
青花菜	4	0	4	0/3	0	4	/	1	/	/	0/3	/
西瓜	7	0	1	/	0/6	1/6	/	/	/	/	/	4
合计	71	36	33	21	8	7	0	1	2	3	0	17
百分率(%)		52	45.2	38.2	27.6	28.0	0	8.3	16.7	21.4	0	56.6

注: 表内分数表示: 分母为实测组合数, 分子为存在差异组合数。

表 2 用 10 种同工酶和 3 种蛋白质体系对不同种类蔬菜杂交组合的鉴定结果

作物种类	参试组合		参试体系数	同工酶或蛋白质有		可鉴定组合
	次	数		差异位点组合次数	百分率(%)	
大白菜	67		4	47	70.1	
甘蓝	33		4	23	69.7	
番茄	78		10	15	19.2	
甜椒	68		11	15	22.5	
黄瓜	64		8	13	20.3	
青花菜	26		8	9	34.6	
西瓜	39		5	6	15.4	

从上述结果看, 过氧化物酶(POX) 存在差异位点组合比率最高。当然也受作物种类及测试品种范围的影响。在所测试的十字花科、甜椒和黄瓜组合中, POX 差异位点一般都比较稳定, 差异位点由一或两对等位基因组成。种苗的苗龄对其影响不大, 而所取种苗的部位会影响

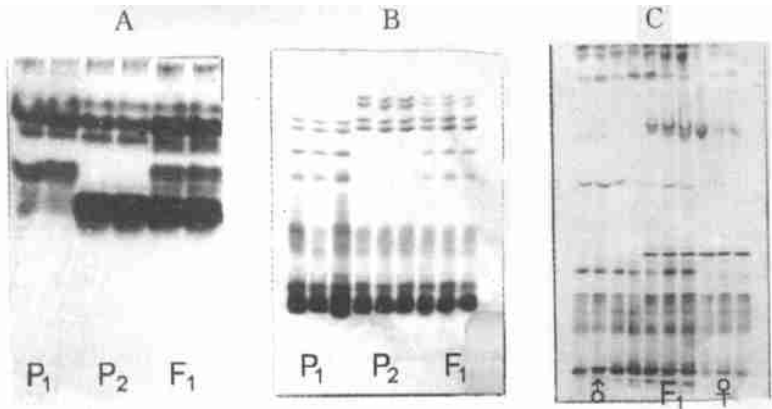


图 1 大白菜(A) 甘蓝(B) 和甜椒(C) 杂交组合过氧化物酶差异位点

过氧化物酶图谱。

碱性磷酸脂酶(EST)在几种蔬菜的检测中,多态性表现较丰富,图谱的条带比较多,一般都在 15 条以上。有的组合可以存在 1~4 个脂酶差异位点(图 2)。其差异位点在所检杂交组合中的存在率也较高。但是,EST 图谱的稳定性较差,种苗的苗龄,种子的活力和提取条件都可能反应在脂酶的图谱上,致使每次试验结果的重复性较差。

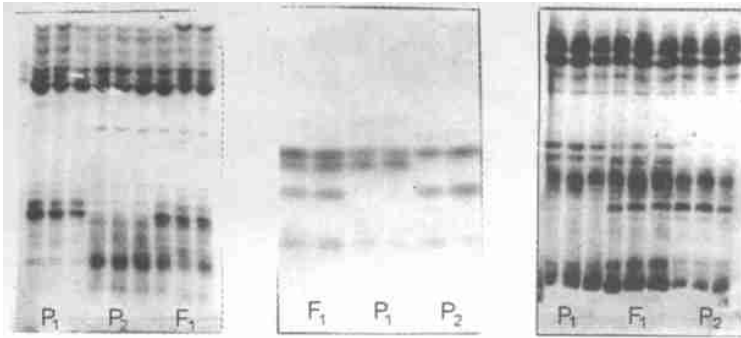


图 2 白菜(A EST;B, PGM)和甘蓝(C)

杂交组合脂酶和磷酸变位酶差异位点

PGM 同工酶用于大白菜和甘蓝的杂交种纯度鉴定有 60% 的组合,黄瓜有 37.5% 的组合存在差异位点,并且酶谱清晰,每次结果重复性好,带型非常稳定,从 2~4 d 的种苗到真叶出现期,检测结果一致。差异位点最多的 PGM-2 和 PGM-3 经试验证明是 2 组独立遗传的等位基因位点。不同带型的 2 个大白菜品种杂交后 F_2 的分离表现出 1:2:1,符合等位基因的分离规律,证明这一位点的表现形式是遗传因素所决定的,不受环境条件的影响(图 2)。但这个同工酶体系在其他种类的检测中,没有表现出多态性。

番茄和黄瓜部分杂交组合的苹果酸脱氢酶(MDH), F_1 杂交种与亲本之间存在着稳定的差异位点。这种酶在参试的几种蔬菜的种苗中活性都很高,酶谱的重复性较好,但是这个酶在品种之间的多态性不很丰富(图 3)。

酸性磷酸脂酶(ACP)在绿菜花、甘蓝、西瓜杂交组合的纯度鉴别中,都有差异位点存在(图 3)。在所测试的蔬菜品种中属于多态性丰富的同工酶,并且酶谱的条带较多。但是与 EST 相似,酶谱型不十分稳定,试验条件及种苗大小都有可能引起带型的变化,需要比较严格的控制试验条件。

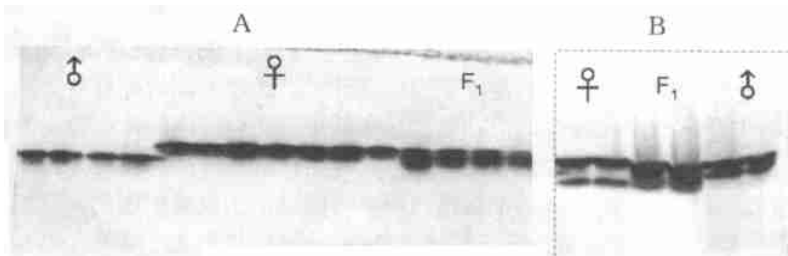


图 3 番茄(A)和绿菜花(B)杂交组合

鉴别的 MDH 和 ACP 同工酶的差异位点

在参试的 71 个 7 种蔬菜的杂交组合中, IDH, 6- PGD, GOT 检测存在差异位点的分别为 3, 2, 1 个组合, 这几种酶在这些蔬菜种类中一般只有 2~ 4 条带, 多态性位点相对较少, 有 2 个比较难鉴别的甜椒和黄瓜组合可以用 IDH 和 6- PGD 鉴别(图 4)。ADH 和 PGI 在所鉴别的组合中没有发现明显的差异位点。

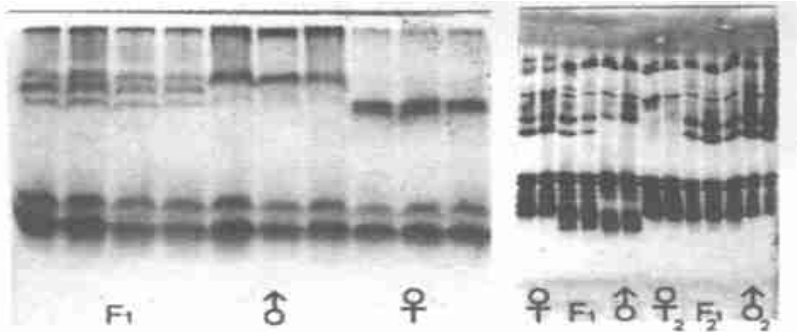


图 4 甜椒(A)和黄瓜(B)杂交组合中 IDH 和 6- PGD 同工酶差异位点

2.3 品种纯度鉴定中的电泳技术比较

在本试验蔬菜品种纯度检测技术中, 我们使用了垂直板和水平板 2 种电泳设备。使用的胶的体系包括聚丙烯酰胺均匀胶、浓度梯度胶、SDS- PAGE 和 pH 梯度等电聚焦电泳。根据不同种类的酶的染色体系选择合适的电泳方式, 可以得到清晰的检测结果。大多数酶体系都可以用垂直板均匀胶的方式分辨。这个方式相对简便, 易操作, 使用设备经济。但是对某些酶体系分辨率较差, 在几条带比较接近, 活性又高的情况下, 易形成色团。PGM, MDH, 6- PGD, ADH 等酶体系用这种方式酶谱比较清晰。平板等电聚焦电泳, 用超薄型胶 pH 梯度方式, 分辨率比垂直板强出数倍, 且操作也比较简单, 重复性好, 条件合适时谱带非常清晰。一般垂直板胶可分辨出 8~ 10 条带时, IEF 平板可分辨出 14~ 16 条带。当然, 2 种方式分离蛋白质的原理是不同的。对于 POX, EST, ACP 等在一般植物种类幼苗中条带较多的同工酶体系, 用平板 IEF 可以得到非常清晰的易鉴别的图谱。另外, IEF 电泳易于调节, 经试验选用不同的 pH 梯度, 可以使有差异的区域达到最大的清晰度。例如在上述试验中, POX 同工酶甘蓝的大多数品种在 pH4~ 6 范围, 甜椒某些品种在 pH3~ 9.5 范围, 番茄的某些品种在 pH6~ 8 范围, 才可以看到清晰的鉴别条带。

2.4 电泳差异位点在品种纯度检测中的应用和统计

在用同工酶和蛋白质电泳检测蔬菜杂交种纯度时, 一般来说, 只要亲本与 F_1 之间有一个差异位点或者是一条谱带的差异, 就足以鉴别出品种。当然如果同时存在着 2 个或更多的差异位点, 就更有助于区分杂交种中的混杂种。试验结果杂交种纯度的计算公式为:

$$\text{纯度百分率}(\%) = (\text{样品总粒数} - \text{亲本数} - \text{其他品种数}) / \text{样品总粒数} \times 100$$

如果使试验条件一致, 电泳结果中出现的误差可能是由于取样引起的。我们分别用有一个差异位点的不同纯度的 3 份番茄样品做纯度检测, 分别随机取 45, 70 和 100 粒种子做电泳分析并计算结果如表 3。这一结果表明, 样品纯度在 80% 以上时, 取样多少在检测结果之间的误差不大, 每份样品检测结果与平均值差异在 $\pm 0.3\% \sim 2.3\%$, 试验时取比较少的样品量,

也可以得到相对准确的结果。样品纯度在 50% ~ 80% 时, 每次取样在检验结果之间误差稍

表 3 不同取样数检测不同纯度番茄样品的纯度百分率 %

样品	取样粒数			平均纯度	平均误差
	45	70	100		
佳粉十五号	69. 0	78. 0	76. 0	74. 0	±2. 0~ 5. 0
佳粉十五号	87. 0	87. 1	85. 6	86. 7	±0. 3~ 1. 0
佳粉十五号	100. 0	96. 0	97. 0	97. 7	±0. 7~ 2. 3

大, 每种取样量与平均值差异在 2. 0% ~ 5. 0%, 在国际种子检验规程规定的允许误差范围之内, 但取样量稍大一些可以减少误差。

电泳检测结果与田间检测结果比较, 电泳检测所得到的纯度百分率或与田间结果一致, 或比田间结果低 1~ 10 个百分点。依据试验结果分析, 可能存在 2 种原因: (1) 田间纯度检测一般是在植物生长周期的后期可以鉴别出差异形态时进行。在蔬菜杂交种中混入的亲本相对较弱, 在前期间苗时易被除去, 而电泳检测是随机取样, 排除了人为的因素。(2) 某些品种植株的田间植物学形态差异不十分明显, 种植检测时难于鉴别, 而同工酶的表现型却存在着差异位点, 电泳检测时表现出差异。因此, 用同工酶或蛋白质差异位点检测的纯度百分率, 有时相对比田间检测数值低, 但更接近于样品的真实状况。

综上所述, 用同工酶差异位点在种子或种苗期可以相对准确、快速地检测蔬菜杂交种纯度。成功的运用这一技术的第一步是要在亲本和杂交种之间找到至少一个稳定的同工酶差异位点, 然后依据差异位点同工酶带型的表现形式确定杂交种样品的纯度。在测试的 7 种瓜菜种类中, 十字花科的几个种类表现了同工酶酶谱的丰富的遗传多态性。番茄、甜椒、黄瓜多态性谱带较少, 西瓜种子表现出有最少的多态谱带。同工酶在蔬菜种子品种差异的分析中也有不同的表现, 过氧化物酶、酯酶和磷酸变位酶差异位点相对较多。总之, 用电泳技术分析同工酶差异位点, 可以快速、准确的检测蔬菜杂交种纯度。

参考文献:

[1] 郑晓鹰, 刘 岩. 用过氧化物酶及酯酶同工酶鉴定大白菜杂交种纯度[J]. 园艺学报, 1994, 21(1): 59- 64.

[2] 黄为平, 郑晓鹰, 邢宝田. 等电聚焦种子蛋白电泳方法检测蔬菜杂交种纯度[J]. 华北农学报, 1995, 10(4): 76- 81.

[3] 黄为平, 郑晓鹰, 邢宝田. 等电聚焦同工酶电泳技术鉴定甘蓝一代杂种纯度[J]. 种子, 1995, (6): 8- 10.

[4] 黄为平, 郑晓鹰. 西瓜一代杂交种及其母本的种子水溶蛋白等电聚焦电泳分析[J]. 华北农学报, 1995, 10(2): 126- 127.

[5] 郑晓鹰, 黄为平. 同工酶和蛋白电泳技术检测甜椒种子杂交种纯度的研究[J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 119- 122.

[6] 郑晓鹰, 李 丽, 李秀清. 大白菜品种同工酶及水溶蛋白的遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 244- 248.

[7] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.

[8] Wendel J F, Parks C R. Genetic control of isozyme variation in *camellia japonica* L [J]. J Hered, 1982, 73: 197- 204.

- [9] Vosman B, Arens P, Rus- Kortekaas W, *et al.* Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 85: 239– 244.
- [10] Shigeki Gotoh, Hiroshi Ikehashi. Survey of isozyme Genes by polyamide Gel Electrophoresis in Cauliflower, Broccoli and cabbage [J]. *Janpan J Breed*, 1992, 42: 23– 32.
- [11] Yang X, Quiros C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD makers [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 205– 212.

Determining Vegetable Hybrid Seed Purity by Isoenzyme Diagnostic Loci

ZHENG Xiao-ying, LI Li, XING Bao-tian
(Beijing Vegetable Research Center, Beijing, 100089, China)

Abstract: Ten isoenzymes and seed proteins were analyzed in parental inbreds and corresponding F₁ hybrid seeds of 71 commercial varieties including Chinese cabbage, cauliflower, broccoli, tomato, sweet pepper, cucumber and water melon to determine seed purity. The results showed the species with high polymorphism isoenzyme banding pattern have more diagnostic loci between hybrid and their parental inbreds. Ten isoenzymes appeared different polymorphism. POX, PGM and EST phenotypes at 8 genetic loci were different between F₁ hybrids and their parental inbreds of the four Brassica species, cucumber and sweet pepper. Hybrids of tomato could be identified at two MDH loci and 6– PGD. Genetic stability of the diagnostic loci was analyzed and the obvious variation during seed germination from one to ten days was found. A model was developed to estimate seed purity.

Key words: Hybrid purity; Vegetable crop; Loci; Identify