

酯酶电泳指纹法鉴定杂交玉米母本自交粒

刘国奇

陈小密

(南开大学生命科学学院, 天津 300071) (天津市农作物研究所)

陈志斌 王景升

(沈阳农业大学农学系)

摘 要 采用种胚酯酶电泳指纹法和田间种植法分别对掺混了母本自交粒的玉米杂交种进行鉴定。结果表明: 酯酶电泳指纹法和田间种植的成熟期鉴定结果基本与实际掺混水平接近; 苗期和花期的田间鉴定结果与实际掺混水平相差较大。准确度比较表明: 种胚酯酶电泳指纹法和田间成熟期鉴定的准确度相同, 分别是苗期和花期鉴定结果的 5 倍和 8 倍。

关键词 杂交玉米 母本自交粒 酯酶电泳指纹 田间种植 种子纯度 检验技术

在玉米杂交制种中, 由于去雄不及时或操作不规范, 常常发生母本自交系本身的花粉参与授粉受精, 形成自交粒^[1], 直接影响杂种优势的发挥。由于缺乏合适的标记性状, 多数玉米杂交组合无法在子粒形态或种苗发育早期, 将母本自交粒和杂交种分开。如华北地区大面积栽培的杂交种沈单七, 从子粒形态和早期种苗形态上很难和母本自交粒 5003 分开。常规的检验方法是田间种植鉴定, 一般需要在植株生长的苗期、花期、成熟期进行检验。由于在种子质量仲裁或杂交制种中, 有时需要对某个种子批或被怀疑母本散粉的地块及早做出判断, 田间种植鉴定难以满足这个要求。近年来, 越来越多的生化和分子标记^[2-3]已经开始运用到种子纯度检验中。本文利用种胚酯酶电泳指纹技术, 对掺混母本 5003 的沈单七杂种一代种进行检验, 并与田间种植法的检验准确度进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

沈单七杂交组合 (5003× E 28) 原种种子, 来源于沈阳农业大学。

1.2 样品的制备

取吸胀 12h 的单粒种胚, 加入几滴无离子水, 在匀浆器中研磨成乳浊液, 用无离子水定容 1.0mL, 3500r/min 离心 10min, 上清液置于 4℃ 冰箱中备用。

1.3 电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳参照张龙翔等^[4]的方法,采用北京六一厂的 DYY-II2型稳压稳流电泳仪,双垂直加宽电泳槽。浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 10%,胶片厚度 1mm。电极缓冲液为 Tris-柠檬酸系统,电泳时稳流 5mA,于 4℃冰箱里进行,约需 12h。

1.4 胶片染色和记录

电泳完毕,将胶片取出,于无离子水中漂洗两次,放入 200ml 的 α -乙酸奈酯和坚牢兰 RR 染色液中。35℃温育 30min,酶带变成棕褐色后取出,用流水冲洗干净,5%乙酸固定 30min,照相并记录 Rf 值。

1.5 母本自交粒的鉴定

参照 Smith^[5]的方法,室内配置混有 5003 的四个沈单七种子批,掺混处理水平分别为 0%、2%、4%、10%,编号为 A、B、C、D,每个水平 800 粒,其中 400 粒用于室内电泳指纹鉴定,两次重复;另 400 粒用于田间种植鉴定。酯酶指纹鉴定以图 1 指纹为标准。田间种植鉴定根据植株的生物学性状和农艺性状分别于苗期、花期和成熟期进行,田间实验设计为:每处理 7 个行区,两次重复,随机排列,保护行种植 5003 和沈单七,供鉴定时对比用。两种方法由不同的研究人员同时进行。

2 结果与分析

2.1 沈单七酯酶电泳指纹

如图 1,沈单七杂交组合中,母本 5003 指纹中有两条主酶带, Rf 分别为 0.80、0.008。在 Rf 为 0.29~0.57 处有一拖尾带。杂交种沈单七的指纹中有四条带, Rf 分别为 0.80、0.75、0.72、0.038。父本 E28 指纹中有四条带, Rf 分别为 0.80、0.75、0.72、0.05。从图 1 可以看出:子代指纹中 Rf 为 0.75、0.72 两带来自父本 E28,明显区别于母本 5003。本文将以此为依据检验人为掺混 5003 的沈单七种子批。杂交种的 Rf 为 0.038 的带是双亲的杂交带。在研究中没有发现沈单七组合的双亲和杂交种有酶谱不纯的现象。

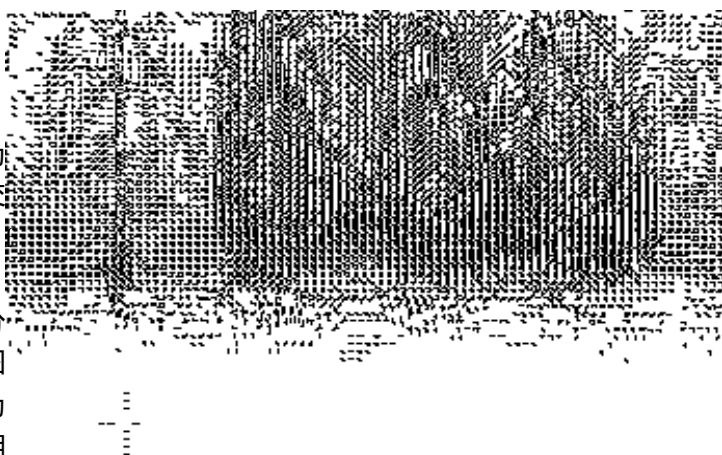


图 1 沈单七杂交组合 (5003×E28) 酯酶电泳指纹

No. 1~6 5003 No. 7~12 沈单七; No. 13~18 E28

2.2 酯酶电泳指纹法检验母本自交粒

表 1 是指纹检验结果,从中可以看出:指纹法测得的 5003 的比率,在四个处理中均基本接近实际掺混水平。表 1 中的“其它”一栏的种子,其电泳谱带与沈单七组合中母本 5003 和杂交

种沈单七的指纹均有较大的区别,推测可能是外来花粉参与了授粉受精形成的种子或是杂交制种中基因突变造成的.

2 3 田间种植鉴定结果

表 2是田间种植鉴定结果,从表中看出: 苗期和花期鉴定的结果与实际掺混的比率相差较大,尤其是花期,这是因为苗期和花期,只能凭植株营养生长性状

检验,有些沈单七的弱苗或弱株容易被误认为是自交粒 5003的植株,因而所得结果比实际掺混水平要高.而成熟期鉴定综合了植株的营养生长和生殖生长性状,特别是果穗性状来判断的,所以鉴定结果基本与实际掺混的比率接近.表 2中“其它”一栏的种子,在苗期表现为白化苗和潜在杂株,在花期和成熟期主要是潜在杂株.潜在杂株的产生主要由于基因突变或残存的异质基因分离重组造成的.

表 2 田间种植不同生长时期鉴定结果

小区号	鉴定时期	总株数	5003	其它	自交粒率 (%)	小区号	鉴定时期	总株数	5003	其它	自交粒率 (%)	自交粒均值 (%)	期望掺混率 (%)
D ₁	苗期	200	29	2	14.5	D ₂	苗期	200	30	2	15.0	14.8	10
	花期	195	50	3	25.6		花期	195	45	2	23.1	24.4	
	成熟期	192	23	2	12.0		成熟期	190	22	2	11.6	11.8	
C ₁	苗期	195	29	2	14.9	C ₂	苗期	200	24	1	12.0	13.5	4
	花期	188	30	2	16.0		花期	192	29	2	15.1	15.6	
	成熟期	188	11	2	5.9		成熟期	190	10	2	5.3	5.6	
B ₂	苗期	194	19	2	9.8	B ₂	苗期	198	23	2	11.6	10.7	2
	花期	192	20	3	10.4		花期	198	23	2	11.6	11.0	
	成熟期	192	6	3	3.1		成熟期	196	7	2	3.6	3.4	
A ₁	苗期	200	12	2	6.0	A ₂	苗期	200	13	2	6.5	6.3	0
	花期	198	22	2	11.1		花期	196	22	2	11.2	11.2	
	成熟期	198	3	2	1.5		成熟期	194	2	2	1.0	1.3	

表 3 酯酶电泳指纹鉴定与田间种植鉴定准确度比较

	田间种植鉴定												电泳指纹鉴定			
	苗期				花期				成熟期							
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
期望值 exp (5003%)	0	2	4	10	0	2	4	10	0	2	4	10	0	2	4	10
观察值 obs (5003%)	6.3	10.7	13.5	14.8	11.2	11.0	15.6	24.4	1.3	3.4	5.6	11.8	1.3	2.5	6.3	11.3
(obs-exp) ²	40	76	90	23	125	81	135	207	2	2	3	3	2	0	5	2
∑ (obs-exp) ²	229				548				10				9			
∑ (obs-exp) ²	15				23				3				3			

2.4 两种方法准确度的比较

运用下面的方法来估算掺混期望水平与实际观察值之间的偏差,进而比较各种检验方法的准确度。表3中的 $[\text{obs-exp}]^2$ 代表观察值与实际掺混水平之间的差异,此值越大,说明观察值与实际掺混水平差异越大,所得结果越不准确。从表3看出:电泳指纹鉴定与田间种植鉴定的成熟期鉴定结果的准确度基本相同,比苗期鉴定和花期鉴定的准确度分别高5倍和8倍。

3 讨论

一般地讲,良好的种子纯度检验技术必须满足如下几个要求:环境的稳定性;品种间差异的可分性;品种内个体差异达到最小;试验结果的可靠性^[6]。本试验中沈单七杂交组合的酯酶电泳指纹法基本满足了上述要求,母本自交粒的检验结果基本与实际掺混水平接近,即所得结果基本可靠。但是,由于我国目前玉米杂交育种技术的限制,自交系的选择基本是以品种纯度为标准,即根据田间种植的植株生物学性状和农艺性状进行选择,多数杂交组合并没有从指纹纯度上进行过选择。有些自交系或杂交种会出现指纹不纯现象,这是因为指纹纯度与品种纯度有一定的关系,但又不完全一致。鉴于我国玉米育种和种子检验工作的实际,对于指纹不纯的杂交组合有待摸索出指纹纯度和品种纯度的相关系数,用田间品种纯度来校正指纹纯度,必将提高指纹检验的可靠性。随着分子水平育种工作的开展及品种专利制度的实施,倘若育种者在品种报审时就提供该杂交组合的指纹,这不仅可以保护育种者本身的利益,同时也会为指纹鉴定提供更可靠的依据。

田间种植鉴定的成熟期结果是可靠的,但种植鉴定需历经玉米整个生长季节,不但费工费时,而且容易受到环境的影响,如本文中8个小区中均播种200粒,但到成熟期都无法保证全苗,在一定程度上影响了检验结果的可靠性。

Smith曾经运用21种酶的电泳指纹,对人为掺混母本自交粒的四个杂交种进行了田间种植鉴定和指纹鉴定的比较,指出:电泳指纹法比田间种植法准确度更高。由于本文所用指纹只有一种,而且所用的杂交组合也不同,指纹鉴定结果与种植鉴定的成熟期结果准确度基本相同。如果考虑到检验工作的时效性,指纹法比种植鉴定具有更大的优势。

参 考 文 献

- 1 王景升,陶承光. 种子科学与技术. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1991
- 2 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. 中国农业科学,1996(4): 1~10
- 3 Burg W J, et al. ISTA/ISHS symposium: Technological advances in variety and seed testing. Wageningen, the Netherlands, 1994
- 4 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验技术与方法. 北京:人民教育出版社,1987
- 5 Smith JSC, et al. The identification of female selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. Seed Sci & Technol 1986 14: 1~4
- 6 刘华,贾继增. 指纹图谱在作物品种鉴定中的应用. 作物品种资源,1997(2): 45~48

Checking the Female Selves Ratio of Hybrid Maize (*Zea mays* L.) with Esterase Electrophoretic Fingerprint

Liu Guoqi

Chen Xiaom i

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071) (Tianjin Crop Institute)

Chen Zhibin Wang Jingsheng

(Department of Agronomy, Shenyang Agricultural University)

Abstract Esterase electrophoretic fingerprint (EEF) and field planting (FP) were used to check the ratio of the female selves in artificial contamination seed lots of hybrid maize. Results show that the EEF method is as accurate as the FP at the maturity stage and nearly equal to the original contamination level. But the checking results of FP at the seedling stage and anthesis stage are inaccurate. Accuracy comparison of different checking techniques reveals that EEF method is 5 times more accurate than the FP at the seedling stage, 8 times more accurate than FP at the anthesis stage.

Key words Hybrid maize; Female selves; Esterase electrophoretic fingerprint; Field planting; Seed purity; Checking technique