

苹果酸脱氢酶在番茄 F₁ 杂种 纯度检测中的应用

李 丽 郑晓鹰 马连平

(北京市蔬菜研究中心, 北京 100081)

摘 要 本文应用垂直板不连续系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法, 分析了 5 个杂交一代种(佳粉一号、佳粉二号、佳粉十号、佳粉十五号、双抗二号)发芽种苗的五种同工酶(苹果酸脱氢酶(MDH)、乙醇脱氢酶(ADH)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)、酯酶(EST)、异柠檬酸脱氢酶(IDH))。发现 5 个杂交一代种中, 3 个杂交一代种与其双亲的苹果酸脱氢酶(MDH)谱带有明显稳定的区别。两个杂交一代种与其双亲的酯酶(EST)谱带有区别。在此基础上, 建立了用苹果酸脱氢酶电泳分析检测番茄一代杂交种纯度的技术, 检测结果与田间鉴定结果基本一致。

关键词 电泳 同工酶 纯度检测 番茄 F₁ 杂种

番茄是人们喜食且营养价值高的蔬菜之一, 在世界范围内广泛种植。由于优良的 F₁ 杂交种具有高产、抗病、抗逆的优势, 为农业生产带来巨大的经济效益, 在我国 85% 以上种植面积都使用了杂交品种。杂交种的效益能否体现, 有赖于种子的纯度。纯度是评价种子质量重要的一项, 传统的纯度检测方法是田间检测, 费时费工、时间要求长, 还常常会受到环境因素的影响。利用同工酶电泳技术检测 F₁ 杂交种纯度省时省力, 是种子生产中一种新的早期快速检测方法, 此种方法 90 年代在国内对大白菜、黄瓜、甘蓝、番茄等检测已有报道^[2~5]。本文分析了番茄杂交种和亲本早期幼苗的苹果酸脱氢酶和酯酶同工酶谱之间的差异, 并进一步研究了用同工酶电泳方法检验番茄杂交一代种子纯度的应用技术。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选用 5 个番茄杂种一代及其双亲, 种子均由北京蔬菜研究中心番茄育种组提供。品种有: 佳粉一号(P₁, P₇), 佳粉二号(P₂, P₇), 佳粉十号(P₃, P₇), 佳粉十五号(P₄, P₆), 双抗二号(P₅, P₈)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 取供试番茄种子, 在 25℃ 萌发 3~5d 的单株幼苗置 1.5ml 离心管中, 加样品提取液 50μl/ 棵, 冰浴中研磨成匀浆, 高速冷冻离心机 10000rpm 低温离心 5min。

样品提取液: 6% Na_2HPO_4 、70% 蔗糖、50% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5% 乙二胺四乙酸、0.5% 二硫苏糖醇、1% 抗坏血酸、1% 二乙基二硫甲酸钠、0.5% 重硫酸钠、0.001% 巯基乙醇。

1.2.2 电泳 采用不连续系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳法。电泳仪为 BIO-RAD500/200 型, 电泳槽为 DYY- 型(六一仪器厂)。分离胶浓度 7%, 浓缩胶浓度 3%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统, pH8.3。电泳在 4℃ 低温稳压条件下进行, 开始电压为 150V, 待过分离胶后(约 1h) 将电压加大到 250~300V, 电泳约 3h。

1.2.3 酶的染色 苹果酸脱氢酶: 0.8% (W/V) 苹果酸钠, 0.020% (W/V) 辅酶 I, 0.02% (W/V) 硝基四氮唑蓝, 0.005% (W/V) N-甲基吩嗪甲基硫酸盐, 依次溶于 pH8.0, 0.02M Tris-HCl 缓冲液中。在 30℃ 黑暗条件下染色 30min。

酯酶: 0.01% α -萘脂, 0.01% β -萘酯, 0.075% 固兰 BB 盐(或 RR 盐) 溶于 pH6.4 磷酸钠缓冲液, 室温下染色半小时。

1.2.4 电泳检验纯度计算 种子样品纯度检验用单株幼苗测定, 每份样品取 50~100 粒种子, 根据每粒种子的酶谱结果计算纯度。

$$V\% = S - (P_1 + P_2 + H) / S \times 100\%$$

式中, V: 纯度; S: 样品总种粒数; P_1 、 P_2 : 本样品的亲本 1 及亲本 2 种粒数; H: 其它种或品种的混杂数。

2 结果与分析

2.1 苹果酸脱氢酶酶谱分析

佳一、佳二、佳十五 F_1 杂种及其双亲的苹果酸脱氢酶同工酶谱见图 1。MDH 由 3 个位点组成, 分别命名为 MDH-1、MDH-2、MDH-3, 并且具有两个多态性位点。MDH-1、MDH-2 中, P_1 、 P_2 、 P_4 在位点 MDH-1 表现为一快带(MDH-1^F), 一慢带(MDH-1^S)。 P_6 、 P_7 在位点 MDH-1 表现为一慢带



图 1 番茄 5 个杂交组合幼苗的苹果酸脱氢酶酶谱
(从左至右的顺序为佳一, 佳二, 佳十, 佳十五, 双抗
二号, P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 , P_6 , P_7)

(MDH-1^S) F_1 杂交种佳粉一号(P_1 、 P_7), 佳粉二号(P_2 、 P_7), 佳粉十五号(P_4 、 P_6) 在 MDH-1 上除出现源自双亲的一条快带(MDH-1^F), 一条慢带(MDH-1^S) 外, 还出现一条“杂种带”——杂种二聚体(MDH-1^{FS}), 杂种带的出现为识别假杂种提供了有效的标志。可以 MDH-1 为标记位点进行佳粉一号、佳粉二号、佳粉十五号的纯度检测。此外 P_1 、 P_2 、 P_4 在位点 MDH-2 表现为一快带(MDH-2^F), P_6 、 P_7 在位点 MDH-2 表现为一慢带(MDH-2^S), 而 F_1 杂交种佳粉一号、佳

粉二号、佳粉十五号在位点 MDH-2 表现为两条互补带 MDH-2^F/MDH-2^S, 因此可用 MDH-2 为位点检测佳一、佳二、佳十五的纯度。

2.2 酯酶酶谱分析

佳十、双抗二号 F₁ 杂交种及其双亲的酯酶同功酶酶谱(见图 2)。萌发 3~5d 番茄幼苗酯酶同功酶(EST), 由 8 个位点组成, 分别命名为 EST-1、EST-2、EST-3、EST-4、EST-5、EST-6、EST-7、EST-8, 并且具有两个多态性位点 EST-5, EST-7, 其中, P₃ 在 EST-5 位点上表现为—快带 EST-5^F, P₇ 在 EST-5 位点上表现为—慢带 EST-5^S。佳粉十号在 EST-5 位点上表现为一条互补带 EST-5^F/EST-5^S; 而在 EST-7 位点, P₃、P₇ 表现为缺少一条慢带 EST-7^S, 佳粉十号表现为具有一条慢带 EST-7^S。P₅ 在位点 EST-7 表现为一条活力很强的酶带但缺少位点 EST-8 的酶带。双抗二号在位点 EST-7 表现为活力弱的酶带, 但在位点 EST-8 表现出一条酶带。

综上所述, 可结合位点 EST-5、EST-7 检测佳粉十号纯度结合位点; EST-7、EST-8 检测双抗二号的纯度。

2.3 一代杂交种商品种子的纯度检验技术

番茄 F₁ 杂交种制种的纯度受自然传粉和种子精选、包装的影响。父母双亲的自花授粉、昆虫传粉的有效性都可能影响杂交种的纯度, 产生假杂种或其它混杂种。依靠种子形态特点测定种子纯度是不可能的。在种苗阶段, 如果不是 F₁ 杂交种表现出双亲的隐性性状, 也很难判断出 F₁ 杂交种中混有的假杂种。用同功酶电泳技术检测商品种子的纯度用时少、准确可靠。根据

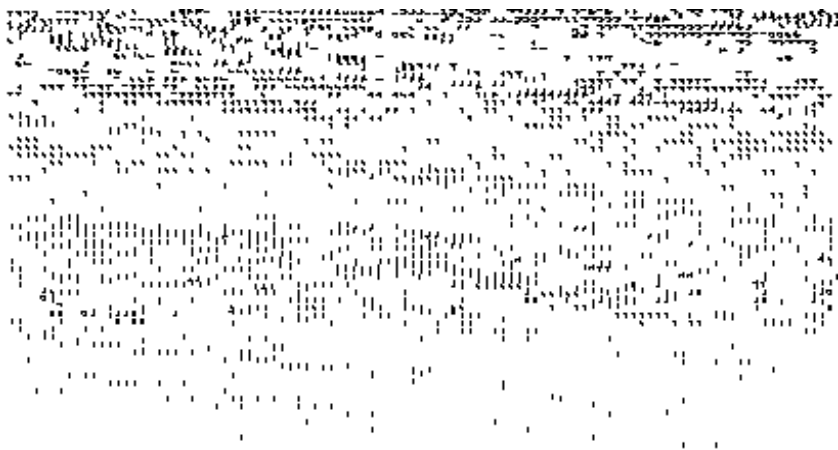


图 2 番茄 5 个杂交组合幼苗的酯酶图谱
(从左至右的顺序为佳一, 佳二, 佳十, 佳十五, 双抗二号, P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇)

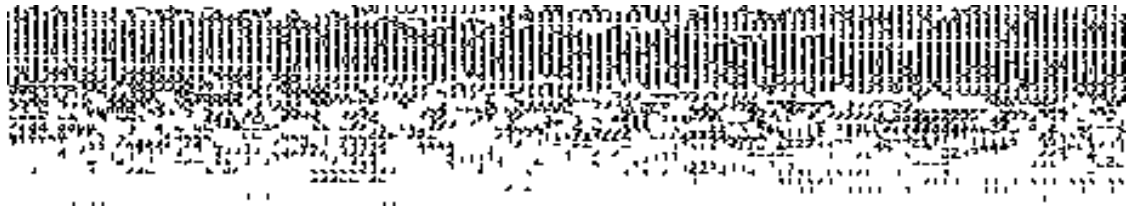


图 3 番茄(佳粉十五)纯度检测

以上研究, 我们确定了供试番茄组合 F₁ 与双亲间差异的标准酶谱, 在此基础上用苹果酸脱氢酶电泳技术检测了番茄 1 个品种两份样品, 结果列于表 1(见图 3)。

2. 4 取样种粒数对纯度百分率的影响

在实际检测中要求种苗棵数达到一定数目。棵数取得多, 费时、费力、费成本; 棵数取得过少会影响纯度百分率的准确性。为达到时间快, 成本低, 节省人力, 我们力求得到一个合适棵数, 不影响纯度百分率。经过数次取种测试, 结果如表 2。从表中测试结果看, 取样纯度达 80% 以上, 取种苗棵数在 46~90 棵之间, 分五组测试三次, 每次测试的结果比较接近。误差 6.57 是每一组取种苗棵数, 不同次数测得纯度百分率误差的总和, 是对表中所测纯度百分率试验误差的估计。方差 4.4 是试验误差加上不同取种苗棵数对纯度百分率的影响。故纯度在 80% 以上取种苗棵数 46 棵测试的结果比较接近实际纯度百分率。

表 1 电泳测定的番茄杂种一代的品种纯度与田间检验的比较

品 种	产 地	品种纯度(%)	
		电泳检测	田间检测
佳粉十五号	山东	83%	85%
	北京	98%	98%

表 2 不同取样种粒数的纯度百分率(%)

品 种	取样种粒数				
	46	58	70	84	90
	纯度百分率(%)				
佳粉十五(1)	84.8	82.8	80.0	82.2	81.1
佳粉十五(2)	87.0	82.8	82.9	85.7	84.4
佳粉十五(3)	87.0	86.2	87.1	88.1	85.6

参 考 文 献

1 周顺伍主编. 生物化学实验技术. 1991, 10

2 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. 园艺学报, 1994(1): 59~64

3 Yashikata F, Hirashi L. Identification of acid phosphatase and esterase isozyme loci in *Brassica campestris*. Japan J Breed, 1991, 41: 61~71

4 Gisela H, Neitz AWH, Lauw AI. Identification of tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*) by polyacrylamide isoelectric focusing. Euphytica, 1992, 62: 77~82

5 Tanksley SD, Jones RA. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testion the genetic purity of F₁ hybrids of tomato. Hortscience, 1981, 16(2): 179~181

Application of Dehydrogenase Allozymes in Test on Genetic Purity of F₁ Hybrids of Tomato

Li Li Zheng Xiaoying Ma Lianping

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

Abstract Five isozyme systems, namely dehydrogenase (MDH), alcohol dehydrogenase (ADH), phosphoglucumutase (PGM), esterase isozyme (EST) and isocitric dehydrogenase (IDH) in extracts from cotyledons of germinated tomato seeds were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Polymorphisms were observed at three loci (MDH-1, MDH-2, MDH-3). The purity of F₁ hybrids, Jiafen 1, Jiafen 2 and Jiafen 15, was tested by utilizing MDH-1 loci as markers, and the results compared favorably with those obtained from field purity identification.

Key words: Electrophoresis; Isozyme; Cultivar purity identification; Tomato; F₁ hybrids