

种子蛋白质超薄等电聚焦电泳鉴定杂交水稻种子纯度的准确性初探

严敏^{1,4,*}, 赵婷^{2,4}, 彭元成^{3,4}, 姜德锋¹

¹ 青岛农业大学植物科技学院, 山东青岛 266109; ² 新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究所, 乌鲁木齐 830009;

³ 曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜 273165; ⁴ 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642

Preliminary Study on Identification Seed Purities of Hybrid Rice (*Oryza* spp.) F₁ by Ultrathin-layer Isoelectric Focusing of Seed Protein (UTLIEF)

YAN Min^{1,4,*}, ZHAO Ting^{2,4}, PENG Yuan-Cheng^{3,4}, JIANG De-Feng¹

¹ College of Plant Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ² Institute of Quality

Supervision and Inspection of Xinjiang Municipality, Urumqi 830009, China; ³ College of Life Sciences, Qufu Normal University,

Qufu, Shandong 273165, China; ⁴ College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

摘要: 分别用超薄等电聚焦电泳技术和田间小区种植技术鉴定杂交水稻 64S×EP431 F₁ 种子纯度和比较两者吻合程度的结果表明: 这两种方法鉴定的纯度完全吻合。显示超薄等电聚焦电泳技术可用于鉴定杂交水稻种子纯度。

关键词: 超薄等电聚焦电泳; 准确性; 杂交水稻; 种子纯度鉴定

杂交水稻种子的纯度一直困扰着我国水稻种子生产, 特别是在自然环境条件下, 两系杂交水稻由于光温敏不育系易受光温等条件的影响, 制种期间若出现异常低温可能会引起育性波动导致不育系部分自交结实, 种子纯度降低, 给两系杂交水稻大面积生产带来风险(陈小荣等 2002)。所以杂交水稻品种纯度的鉴定一直备受人们关注, 从简单的形态学鉴定到复杂的分子生物学鉴定, 每一种方法均在不同的水稻品种中找到应用范围。种子蛋白质的超薄等电聚焦电泳技术(ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein, UTLIEF)是由 Radola (1980) 发展起来并一再改进的一种非常实用的电泳技术。此法用于检验种子纯度和品种真实性时, 具有简便、快速、准确、经济的特点, 已在水稻品种鉴定中取得了较好的结果(王晓峰等 2000; 王晓峰和赵婷 2000; Wang 等 2001; 严敏和王晓峰 2003; Zhao 等 2005; Yan 等 2006)。但以前评价其鉴定结果的准确性时, 都是从同一样品中分取 2 份试品, 分别用电泳方法和大田种植鉴定方法鉴定纯度, 然后比较二者的吻合程度, 吻合程度高则准确性高, 否则准确性就低(胡昕等 2001; 胡群宝等 2004)。这种验证方法所用的 2 份试样虽然是随机取得, 从统计学来说, 二者的纯度一样, 但实际上二者的纯度或多或少地

还是有差别的。这样, 在比较电泳鉴定和大田种植鉴定结果之间的吻合度时, 样品本身之间在纯度上的差别就会干扰比较结果, 因而不同实验室甚至同一实验室的不同重复之间的鉴定结果经常出现较大的差别。为了消除电泳鉴定和大田鉴定样品之间在纯度上的差异, 我们将水稻种子横切为 1:1 的两半, 无胚半粒用于实验室的快速鉴定, 有胚半粒则用于田间种植, 由于相对应的两个半粒种子在纯度上完全一致, 这样就可消除两种方法样品之间在纯度上的差别, 从而便可更正确地评价电泳技术鉴定结果的准确性。迄今, 这方面的研究还未见报道。

材料与方法

1 实验材料

两系杂交水稻(*Oryza* spp.)组合(64S×EP431)的父本、母本和 F₁ 种子, 由华南农业大学农学院提供。

2 方法

从 F₁ 种子中随机数取 3 份样品, 每份 200 粒净种子[农作物种子检验规程(GB/T3543-1995)]。

收稿 2007-10-17 修定 2007-11-26

资助 广东省自然科学基金(000590)、广东省教育厅自然科学基金(200068)和青岛农业大学人才基金(630723)。

* E-mail: yanmin75@163.com; Tel: 0532-88030342

一份样品用于田间小区种植鉴定纯度。一份样品用超薄等电聚焦电泳鉴定纯度。另一份逐粒用经1% (W/V)次氯酸钠消毒的刀片从中间横切为无胚半粒和有胚半粒, 将2个半粒编上同样的号码。有胚的半粒在实验室内发芽后, 将幼苗移植到田间进行大田种植鉴定; 而不带胚的半粒用于提取蛋白质, 进行超薄等电聚焦电泳。比较实验室鉴定和大田种植鉴定结果的一致性。具体操作如下。

(1)大田种植鉴定: 将在实验室中萌发好的幼苗移植, 全粒种子萌发的随机栽插, 而有胚半粒种子萌发的幼苗按编号单本栽插。开花期和成熟期进行农艺性状鉴定。

(2)种子蛋白质超薄等电聚焦电泳: 提取种子蛋白质, 取上述种子用单粒种子粉碎机逐粒粉碎, 全粒种子和半粒种子分别加入120和60 μL 30% (V/V)的2-氯乙醇蛋白质提取液, 于常温下提取1 h后, 以4 000 $\times g$ 离心5 min。取20 μL 上清液用于电泳点样。电泳按Wang等(2001)的方法进行。所加两性电解质(servalyt)为pH 5~8。

结果与讨论

1 种子蛋白质超薄等电聚焦电泳的鉴定

用电泳技术判定 F_1 种子是否为真正的杂交种

子, 主要是看它是否同时具有父、母本的特征蛋白质带, 如有, 则为真实的杂交种子; 若只具有母本特征带而无父本特征带, 则为“假杂种”; 若既无父本特征带又无母本特征带, 则为品种混杂。我们曾在该组合中找到2条父本特征带, 此种半粒种子拥有与全粒种子相同的父本特征带(Zhao等2005)。组合培矮64S \times EP431 F_1 无胚半粒种子的蛋白质电泳的部分图谱(图1)表明, 第2、7、8、15、16、21、28粒种子没有父本特征蛋白质带, 为母本自花授粉种子; 第5、13粒种子的带型与其它种子明显不同, 为其它品种种子。

2 大田种植鉴定

大田鉴定结果表明, 第2、7、8、15、16、21、28粒种子为母本自花授粉种子, 第5、13粒种子为其它品种种子。这与电泳结果吻合(表1)。从表1可以看出, 3份样品鉴定出来的纯度存在差异, 但不显著, 说明他们之间的差异主要是由取样造成的。

总之, 从传统上讲, 验证某一种子纯度的室内鉴定方法是否可靠, 一般采用全粒种子进行, 即从同一种子批中随机抽取2份样品, 一份用作实验室鉴定, 一份用作大田鉴定, 然后比较两者

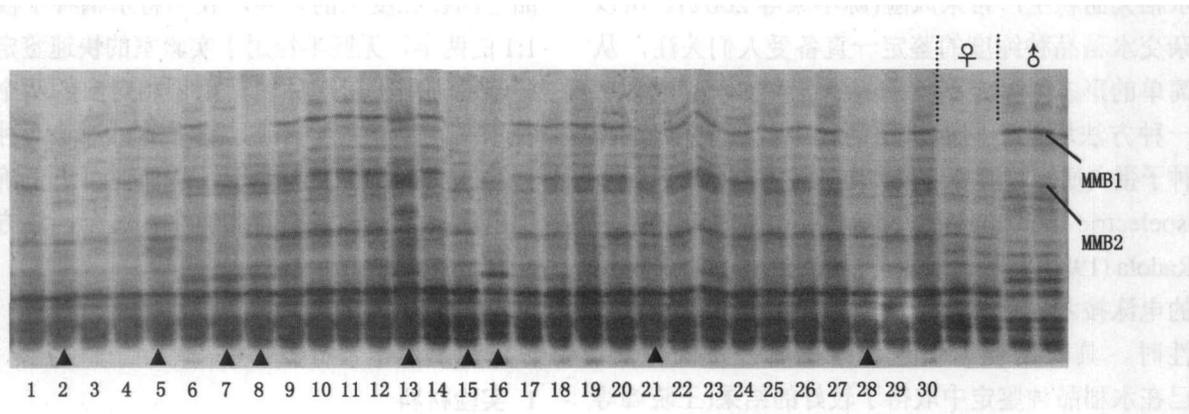


图1 杂交水稻组合培矮64S \times EP431 F_1 无胚半粒种子的蛋白质超薄等电聚焦电泳图谱
MMB1、MMB2: 父本特征带1、2; ▲: 母本自花授粉或其他品种种子。

表1 杂交水稻组合培矮64S \times EP431 F_1 种子超薄等电聚焦电泳和田间小区种植鉴定的比较

	超薄等电聚焦电泳	田间小区种植
半粒种子	种子纯度为95.5%, 其中第2、7、8、15、16、21、28粒种子为母本自花授粉种子, 第5、13粒种子为其它品种种子。	种子纯度为95.5%, 其中第2、7、8、15、16、21、28粒种子为母本自花授粉种子, 第5、13粒种子为其它品种种子。
全粒种子	种子纯度为97.0%	种子纯度为96.0%

的吻合程度。正如在前言中所提到的, 2份样品本身由于在种子纯度上存在或多或少的差异, 因此经常会影响到鉴定结果准确性的评价。从本文结果来看, 将种子横切为两半, 无胚半粒用于电泳鉴定, 而有胚半粒用于田间小区种植鉴定就可避免上述问题。由于有胚半粒和无胚半粒不仅在总的纯度上是一致的, 而且可以相应编号的样品, 其鉴定结果也是一致的, 因而评价结果似乎更正确一些。

参考文献

- 陈小荣, 田振涛, 钱海丰, 薛庆中(2002). 两系法杂交水稻种子生产中存在的问题及解决的途径. 种子, (1): 59~60
- 胡群宝, 夏清华, 陈森, 蔡惠娇, 何德银(2004). 杂交稻博优998种子真实性与纯度的IEF鉴定. 中国农学通报, 20(4): 158~159
- 胡昕, 王运智, 张功礼(2001). 电泳法鉴定玉米种子纯度与种植鉴定结果的一致性和相关性分析. 种子科技, 19(4): 222~223
- 王晓峰, 黄惠玲, Knoblauch R, Leist N (2000). 超薄等电聚焦电泳技术在水稻品种鉴定上的运用. 种子, (4): 6~9
- 王晓峰, 赵婷(2000). 超薄等电聚焦电泳技术及其在种子纯度鉴定中的运用. 种子, (6): 55~57
- 严敏, 王晓峰(2003). 杂交玉米、水稻和辣椒种子品种真实性和纯度的室内快速鉴定. 华南农业大学学报(自然科学版), 24(2): 6~8
- Radola BJ (1980). Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. Electrophoresis, 1: 43~56
- Wang XF, Knoblauch R, Leist N (2001). Identification of varieties and testing of hybrid purity of rice by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. Inter Rice Res Notes, 26(1): 18~19
- Yan M, Ye H, Wang XF (2006). Investigation into the feasibility of assessing the hybridity of immature rice grains. Seed Sci Technol, 34(1): 1~8
- Zhao T, Yan M, Lu YP, Yang F, Huang J, Wang XF (2005). Genetic purity testing of two-line hybrid rice seeds by ultrathin-layer isoelectric focusing of proteins. Seed Sci Technol, 33(1): 45~52