

大白菜品种纯度快速检验技术研究

秦智伟 崔崇仕 李桂英

(东北农业大学园艺系·哈尔滨)

摘要:利用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,分析了大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 7个类型 23个品种(其中包括品种、自交系、一代杂种和亲本)在干种子期、芽期及幼苗期的过氧化物酶和酯酶两种同工酶的表现,结果表明:大白菜不同类型、不同品种间芽期和幼苗期过氧化物酶同工酶谱表现出明显的差异,干种子期的两种同工酶期的两种同工酶及幼苗期酯酶同工酶谱带不明显。在芽期或幼苗期进行过氧化物酶同工酶分析,可以在种子采收后的 4 天内完成大白菜品种纯度质量检验工作。试验初步建立了供试品种标准酶谱档案和大白菜品种纯度快速检验技术程序。

关键词:大白菜,品种纯度,同工酶,电泳。

前言

大白菜是黑龙江省的重要蔬菜之一,约占全省秋菜面积的 60%以上,其种子 95%以上是从省外繁殖和调入的。近年来,由于品种纯度质量不合格,每年都有重大的种子质量事故发生。除了给蔬菜生产者和种子经营者造成重大经济损失外,还造成了不良的社会影响。导致此问题发生的主要原因是:我省的秋菜种子繁育基地多数设在山东、河南等地。这些地区大白菜种子采收期同我省白菜播种期仅相差 2—3 周时间。所以采用常规的田间种植鉴定方法,来不及进行品种纯度质量检验,结果把一些不合格的混杂低劣种子也投放生产,造成严重后果。

目前,国内蔬菜种子生产和经销部门,主要是采用田间种植鉴定方法来检验品种纯度质量。这种方法虽比较直观可靠,但检验所需时间长,占用大量土地,耗费人力和物力。且还受自然季节环境条件的影响。因此,探索大白菜及十字花科蔬菜作物品种纯度质量快速检验技术,是目前国内和省蔬菜生产中急待解决的问题。

本试验目的是:利用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,通过对我省主栽大白菜品种及类型进行过氧化物酶

和酯酶同工酶分析,建立我省大白菜品种同工酶标准的酶谱档案及品种纯度质量快速检验技术程序,应用于大白菜生产。

材料和方法

(一)供试材料:试验选择了我省近十年主要推广的大白菜 7 个类型共 23 份材料(见表)。其中包括不同白菜类型、不同品种、一代杂种与亲本和同一品种的不同品系等等。

(二)方法

1. 材料处理,每份材料设三个处理:(1)干种子:每份材料随机抽取干种子 0.5g。(2)催芽:从每份材料中数取 150 粒种子,放入直径为 8cm 的发芽皿中置于 25℃ 恒温箱中催芽 3 天至芽长 2.5—3.0cm 左右取样。(3)播种:每份材料取 150—200 粒种子,播种在温室播种箱内。室温 14—25℃,覆土 0.5cm。播种后 7—8 天待幼苗“拉十字”时进行取样。

2. 制备样品:(1)干种子:每份材料各取 0.5g,放入小研钵中,再分别加入 0.5ml 的样品提取液。进行冰浴匀浆后,以 4000 转/分离心 10 分钟,吸取上清液分别放

北方园艺 (总 97) 1

入冰箱冷冻室内长期保存。(2)芽期:每份材料各取1.0g,分别加入提取液5.0ml。以下同(1)。(3)幼苗期:1)混合取样:每份材料各取30株混合后称取2.0g,加入提取液6.0ml。以下同(1)。2)单株取样:在每份材料内随机取50个样(单株),每个单株加提取液2.0ml,以下同(1)。

3. 电泳采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。下层(分离)胶浓度为7.5%,上层(浓缩)胶浓度为2.8%。胶板厚度为0.10cm,样品量为20μl,点样量为45μl。电泳仪为上海产DYY-Ⅲ型,电极缓冲液是Tris-甘氨酸缓冲系统,PH=8.3。电泳在4℃冰箱内进行,电泳电压270—300V,电流为40—50A,电泳时间5小时左右。

试验材料来源及类型表

取样序号	品种名称	类型	年份	来源	备注
01	牡丹江一号	矮桩牛心	1989年	省种子所	
02	牡丹江一号	矮桩牛心	1988年	省园艺所	
03	牡丹江一号	矮桩牛心	1989年	牡丹江蔬菜所	春化采种
04	龙白一号	矮桩牛心	1988年	省园艺所	
05	龙白一号	矮桩牛心	1989年	省种子所	
06	牡丹江二号	矮桩牛心	1989年	牡丹江蔬菜所	春化采种
07	九号白菜	高桩型	1988年	省园艺所	
08	黄籽矮菜	直筒型	1988年	省园艺所	
09	玉青白菜	直筒型	1987年	本院	
10	D ₁₃ 平头白菜	平头型	1987年	本院	
11	翻心白菜	花心型	1987年	省园艺所	
12	二牛心	矮桩牛心	1987年	本院	
13	007—9—8	矮桩牛心	1987年	本院	龙协白一号母本
14	002—3—6	矮桩型	1987年	本院	龙协白一号父本
15	龙协白一号	高桩型	1987年	本院	龙协白一号正交组合
16	龙协白一号	高桩型	1987年	本院	龙协白一号反交组合
17	高潮二牛心 I	高桩牛心	1987年	本院	自交系
18	高潮二牛心 II	高桩牛心	1987年	本院	自交系
19	高潮二牛心 III	矮桩牛心	1987年	本院	自交系
20	佳白一号	矮桩牛心	1988年	佳木斯蔬菜所	
21	佳白二号	矮桩牛心	1988年	佳木斯蔬菜所	
22	牡丹江一号	矮桩牛心	1989年	佳木斯蔬菜所	
23	牡丹江一号	矮桩牛心	1986年	本院	

4. 染色:(1)过氧化物同工酶采用醋酸联苯胺法,电泳结束后剥下胶板用自来水冲洗两次,倒入50—100ml染色液,在25℃温箱内保温15min,每隔几分钟摇动一次。待胶板呈现出清晰的深蓝色谱带为止,倒掉染色液,用流水冲洗1小时,换蒸馏水泡12小时。(2)酯酶同工酶采用醋酸-α-萘脂、醋酸-β-萘脂和坚牢兰B系

统。染色液在染色前30分钟时配制,电泳后剥板,水洗胶板两次,倒入50—100ml染色液于25℃温箱内保温30分钟,不断摇动。待胶板上呈现出清晰的褐红色谱带后,倒掉染色液,用流水冲洗1小时后,换蒸馏水泡12小时。(3)制干板将泡后的胶板用5%的冰醋酸固定,进行拍照。计算迁移率(Rf)值。最后将胶板用0.3%的甘油浸泡15—20分钟后,用两层薄玻璃纸将胶板包紧,自然风干制成干板长期保存。

试验结果

一、大白菜不同品种干种子同工酶和酯酶同工酶酶谱表现都不清晰,不能利用此期的同工酶进行品种纯度鉴定。这一点与甘蓝相同。

二、大白菜不同品种芽期同工酶酶谱表现

1. 过氧化物酶同工酶:(1)不同类型、不同品种间过氧化物酶同工酶酶谱表现。供试的23份材料芽期过氧化物酶同工酶谱如图1所示。各品种酶谱带数量在3—8条之间,其中酶谱带最少的是17号(高潮二牛心 I),最多的是12号(二牛心)。整个酶谱可分为:Per—I区(快带区,Rf值在0.57—0.65之间),Per—II区(中带区,Rf值在0.29—0.44之间)和Per—III区(慢带区,Rf值在0.10—0.22之间)等三个区。其中,Per—III区是大白菜特征谱带区,各品种类型之间表现一致。品种和类型间的重要区别表现在Per—I区和Per—II区。在这两个区内的酶谱带迁移率、谱带数量、酶活性及谱带形状等方面,都因品种类型不同而有差别。a. 不同类型之间酶谱

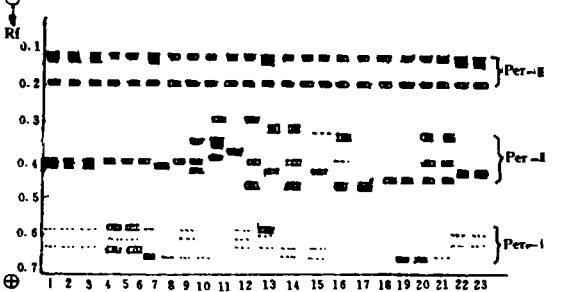


图1 大白菜不同品种芽期过氧化物酶同工酶酶谱表现出明显的差异。供试23份材料,按园艺学分类法分属于七个类型(见表)。这七个类型间酶谱表现具有明显差异。以1号(牡丹江一号)为代表的矮桩牛心型品种都显示出5—6条带。其中在Per—II区有一条深而宽的带(Rf=0.39),在Per—I区有2—3条浅而窄的带。以9号(玉青白菜)为代表的直筒型品种。显示出6条带,其中在Per—II区有三条深宽带,在Per—I区只有一条浅窄带。以10号(平头白菜)为代表的平头白菜,只有5条

带,除两条特征带外,其余3条全显示在Per—Ⅰ区,而且谱带呈深宽特殊形状。以11号(翻心菜)为代表的花心类型品种,在Per—Ⅰ区只有一条深宽带($R_f=0.36$)。在Per—Ⅰ区有三条浅窄的带。b.同一类型不同品种之间酶谱表现出差异。在供试材料中有9个属于矮桩牛心型的全省主栽大白菜品种(见表),但是其过氧化物酶同工酶酶谱表现却不相同。品种间酶谱差异最大的是牡丹江一号、二牛心、佳白一号和佳白二号。佳白一号和佳白二号在Per—Ⅰ区和二牛心有同样数量的谱带(都是三条),但带的深浅宽窄和迁移率($R_f=0.32$ 、 0.37 和 0.40)不同于二牛心。而且在Per—Ⅰ区比二牛心少了两条带,只有一条($R_f=0.59$)。这三个品种的酶谱表现与其它同类型品种存在明显的差异。其原因在于二牛心在大白菜分类上严格讲属于花心卵圆型。而牡丹江一号和龙白一号等属于派生的近似卵圆型品种。牡丹江一号、龙白一号和牡丹江二号之间酶谱表现也不同。牡丹江一号在Per—Ⅰ区有一条染色深而宽,酶活性较强的谱带($R_f=0.39$),在Per—Ⅰ区有两条染色极浅而窄的带($R_f=0.57$ 和 0.62)。龙白一号在Per—Ⅰ区比牡丹江一号多出一条浅而窄带($R_f=0.60$)。而且另外两条带也比牡丹江一号表现深而宽些。牡丹江二号在Per—Ⅰ区两条带的迁移率都不同于牡丹江一号和龙白二号,其 $R_f=0.58$ 和 0.64 。这几个品种酶谱表现不同的,主要原因也是品种的亲缘关系不同。(2)一代杂种与亲本的酶谱表现。在供试材料中,13号、14号为龙协白一号(F_1)的母本和父本。15、16号为龙协白一号的正交和反交组合。试验结果表明:杂种与其双亲酶谱表现不同。从Per—Ⅰ区和Per—Ⅰ区来看,母本在Per—Ⅰ区有两条带($R_f=0.31$ 和 0.39),在Per—Ⅰ区也有两条带($R_f=0.63$ 和 0.64)。父本在Per—Ⅰ区有三条带($R_f=0.31$ 、 0.36 和 0.42),而在Per—Ⅰ区比母本缺少了两条带。它们的杂种具有偏母本的酶带,即正交组合偏向母本,反交组合偏向父本。这一点与李玉湘报道相同,但是没有显示杂种酶谱带。(3)不同品系间酶谱表现不同。供试材料中17—19为本院选育的高潮二牛心的三个不同品系。其中高潮二牛心Ⅰ和Ⅱ为高桩牛心型,高潮二牛心Ⅲ为矮桩牛心型。从酶谱表现来看,高潮二牛心Ⅰ和Ⅱ相似。但是它们与高潮二牛心Ⅲ酶谱不同。这个结果与三个品系田间性状表现差异相同。

2. 酯酶同工酶:供试材料的酯酶同工酶表现如图2所示。大白菜不同品种芽期酯酶同工酶酶谱带数量为12—14条之间,整个酶谱可分三个区:Est—Ⅰ区(快带区, R_f 在 $0.83—0.91$ 之间),Est—Ⅱ区(中带区, R_f 在 $0.55—0.78$ 之间),和Est—Ⅲ区(慢带区, R_f 在 $0.26—$

0.46 之间)。大白菜酯酶同工酶在这三个区内都有特征谱带。在Est—Ⅰ区有三条特征带($R_f=0.84$ 、 0.87 和 0.91),在Est—Ⅱ区有四条特征带($R_f=0.60$ 、 0.65 、 0.68 和 0.70),在Est—Ⅲ区有两条特征带($R_f=0.26$ 和 0.30)。不同品种、不同类型间的酶谱差异表现是:在Est—Ⅰ区,其差主要在特征带染色深浅宽窄上;在Est—Ⅱ和Est—Ⅲ区差异主要表现在酶谱带的数量和迁移率的不同。其中,平头白菜、002—3—6、黄籽和玉青白菜与其它矮桩牛心型品种之间酶谱差异最为明显。而同一类型的不同品种间(如矮桩牛心型中的牡丹江一号、二号及龙白一号等等)酶谱差异不明显。

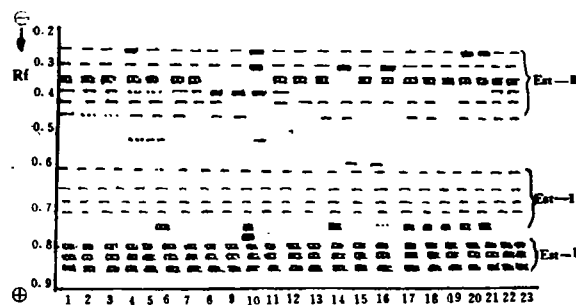


图2 大白菜不同品种芽期酯酶同工酶酶谱

在一代杂种与其亲本、不同品系及同一品种不同来源等方面,酶谱表现与过氧化物酶同工酶表现趋势一致。

三、幼苗期同工酶酶谱表现

(一)混合取样:1. 过氧化物同工酶酶谱表现

供试材料的幼苗期过氧化物酶同工酶表现如图3所示。此期的过氧化物酶同工酶与芽期酶谱表现有所不同。各品种酶谱减少一个区,谱带数量均为两条。从整体上可分为:Per—Ⅰ区(快区)和Per—Ⅱ区(慢区)。其中Per—Ⅱ区为大白菜特征酶谱带($R_f=0.20$),Per—Ⅰ区为各品种类型酶谱差异区。(1)不同类型、不同品种间酶

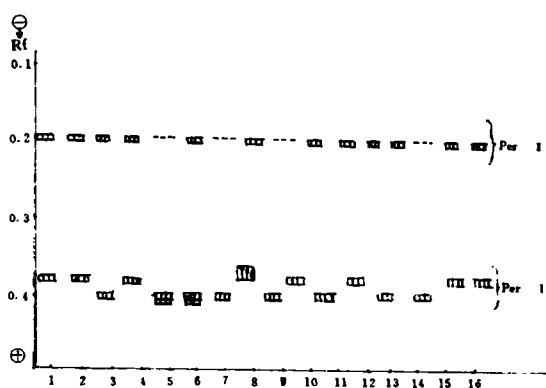


图3 大白菜不同品种苗期过氧化物酶同工酶酶谱

谱表现:a. 不同类型间酶谱表现不同。类型之间酶谱表现差异较大的是牡丹江一号、九号白菜、黄籽矮菜、玉青白菜、平头白菜和二牛心。完全可以从 Per—I 区酶谱带的迁移率、染色深浅和宽窄上将不同类型的品种分开。在 Per—I 区平头型品种谱带迁移率最小($R_f=0.35$), 染色浅而特别窄。直筒和高桩型品种(九号白菜、黄籽和玉青白菜)酶谱迁移率较大($R_f=0.40$), 谱带深而宽。并且在 Per—I 区的一条特征带极浅近于消失。二牛心在 Per—I 区谱带迁移率最大($R_f=0.41$), 带深而窄, 并且在 Per—I 区的特征带也极浅。b. 同一类型不同品种间酶谱表现, 同属矮桩牛心型的牡丹江一号、佳白一号、佳白二号之间酶谱表现基本相同, 只是牡丹江一号比佳白一号、二号酶活性高些。其余同芽期酶谱表现趋势相同。(2)一代杂种与其亲本酶谱表现: 同芽期一样, 龙协白一号(F_1)的正交组合酶谱表现偏向母本, 反交组合酶谱表现偏向父本, 具有偏母本酶谱带, 但仍未显示出杂种酶谱带。

2. 酯酶同工酶酶谱表现: 此期不同品种和不同类型间酯酶同工酶酶谱表现不清晰, 不适于进行品种鉴别。

(二)单株取样: 同一品种分单株取样分析其过氧化物酶和酯酶同工酶酶谱, 进而根据每个单株酶谱表现来检验试样品种纯度。

二牛心过氧化物酶同工酶表现: 图 4 为二牛心大白菜品种单株的过氧化物酶同工酶酶谱。从 1—13 号的 13 个单株中, 只有 2 和 5 酶谱表现不同。在 Per—I 区的一条带迁移率 $R_f=0.30$ 。5 在 Per—I 区的一条带 $R_f=0.18$ 与其它单株酶谱表现不同, 但与 16(黄籽)相似。可以认为是两个杂株。而其余单株酶谱表现相同。根据各单株酶谱计算这份二牛心品种纯度为 84%, 这一结果与田间纯度相似。

种子、芽期和幼苗期)里, 过氧化物酶同工酶酶谱表现不同。在干种子期酶谱表现不清晰。在芽期酶谱表现最清晰最典型, 而且不同品种, 不同类型间酶谱带均有差异。在幼苗期酶谱带数量大量减少(从 8 减少到 2 条)而且同一类型不同品种间酶谱区别不够明显。因此, 认为芽期是利用过氧化物酶同工酶进行大白菜品种纯度检验的最佳时期。这一时期具有时间短(催芽到取样只需 3 天时间), 环境条件易控制一致等优点。

2. 酯酶同工酶: 三个时期的酯酶同工酶, 只有芽期酶谱最为清晰明显, 而且不同类型品种间酶谱存在差异。干种子和幼苗期酯酶同工酶不明显。

五、大白菜品种纯度质量同工酶检验工作程序

1. 对预检样品随机扦样三份, 每份 1.0—2.0g。2. 从每份样品中随机数取 200 粒种子放入发芽皿中, 置于 25℃温箱内催芽 3 天。3. 取样: (1) 目的在于鉴别不同品种时采用混合取样法, 取 30 个芽混均后称取 2.0g 加提取液 10.0ml 提取。(2) 目的在于检验品种纯度时采用单株取样法, 每一样品抽取 50 株(共 150 株), 每株加入 1.0ml 提取液提取, 用指形离心管, 以 4000 转/分离心 10 分钟取上清液。4. 制胶板、电泳(同试验方法 3)。5. 染色、拍照、计算相对迁移率 R_f 值, 制干板(同试验方法 4)。6. 将试样酶谱与标准权威酶谱比较进行鉴别, 或用测定相对迁移率的方法进行鉴定。

一般利用上述方法, 配备两台上海产 DYY—Ⅲ 型电泳仪和两个双垂直板电泳槽, 一天内可以测定 160 个样品, 即一个品种。这样在种子收后 4 天内就可以完成纯度质量检验工作。

讨 论

1. 利用电泳同工酶方法进行大白菜品种纯度检验的技术关键在于取样标准、样品处理提取条件及试验方法。因为同工酶极易受温度、PH 值、离子、个体发育时期等因素的影响而变化。所以试验必须严格遵守试验规程。

2. 为了使试验结果可靠, 在取样时要除去带病种子或单株, 以免感染病菌后造成酶谱变化。

3. 在应用此项技术进行品种纯度质量检验时, 必须先建立起标准权威品种酶谱档案, 而且所用种子必须是“育种者”的种子。(参考文献略, 来稿时间: 1994 年 5 月)

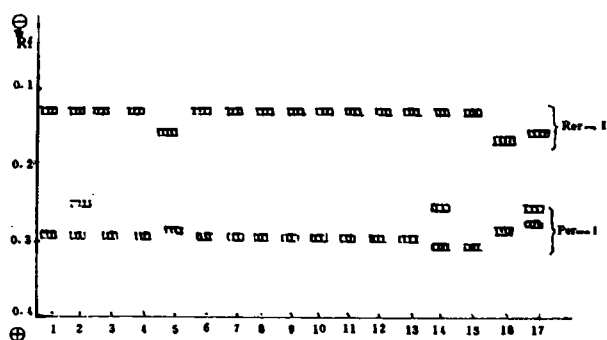


图 4 二牛心单株苗期过氧化物酶同工酶酶谱

四、同一种同工酶在大白菜不同时期的表现

1. 过氧化物酶同工酶: 在试材处理的三个时期(干