

王 波,彭 宏,罗绪标,等. 盐溶蛋白电泳和 SSR 标记鉴定苏玉 20 种子纯度的比较研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):72-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.018

盐溶蛋白电泳和 SSR 标记鉴定苏玉 20 种子纯度的比较研究

王 波,彭 宏,罗绪标,郭 玲
(江苏明天种业科技有限公司,江苏南京 210014)

摘要:为建立一套经济、快速、准确鉴定苏玉 20 纯度的方法,利用盐溶蛋白电泳和 SSR 标记同时对该品种进行了纯度鉴定,并对 2 种方法及结果进行了比较分析。研究发现,同一批次种子,2 种方法纯度结果基本一致,但盐溶蛋白电泳法纯度结果比 SSR 分析结果平均高 0.78 百分点。经综合分析,在实际操作中,建议用 SSR 标记,利用 1~2 对引物即可完成苏玉 20 的纯度鉴定,其结果更真实准确。

关键词:玉米种子;苏玉 20;盐溶蛋白;SSR 标记;纯度鉴定

中图分类号: S513.037 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0072-02

盐溶蛋白电泳一直是种子企业鉴定玉米种子纯度的主要方法之一。该方法简单、便于操作,对技术人员和检验设备要求不高,一般的种子企业检验室都可开展该项工作,因此在实际检验工作中被广泛应用。包和平等利用玉米盐溶蛋白 PAGE 法和田间小区种植鉴定法对吉林省生产商应用的 16 个杂交玉米种子纯度进行测定,试验表明,同一样品种子纯度田间小区鉴定普遍高于蛋白 PAGE 法鉴定纯度值,纯度越高 2 种方法所测值偏差越小^[1]。郭景伦等将玉米杂交种子纯度室内鉴定结果与田间种植鉴定结果进行了对比研究,结果表明,2 种方法鉴定结果较吻合,一般相差在 5.0% 以内,并且玉米种子纯度越高,室内鉴定结果和田间鉴定结果相差越小;纯度越低,2 个结果差异越大^[2]。

但盐溶蛋白 PAGE 法有一定的局限性,有些品种双亲蛋白质水平上的差异较小,难以鉴定;鉴定大批量玉米种子纯度时,药品配制量大且步骤繁琐,有些试剂容易失效;另外盐溶蛋白的电泳谱带分辨率低,有时会出现误读或谱带难以辨别,因此对结果判定有一定的影响。近几年来随着 SSR 分子标记的发展和应用,表现其独特的优越性。孟庆长等以苏玉 20 杂交种及其亲本为材料,筛选出在苏玉 20 双亲之间多态性明显、重复性较好的 4 对引物 bnlgl306、phi065、bnlg2291 和 umc1590 用于苏玉 20 鉴定^[3]。此标记特异性好,田间鉴定与利用 SSR 标记鉴定结果高度一致。本试验利用孟庆长等筛选的 4 对引物,结合盐溶蛋白电泳法对苏玉 20 种子纯度进行鉴定,并比较分析,验证 2 种试验结果的相关性,以便建立一套适应苏玉 20 品种纯度准确、快速鉴定的试验方法。

1 材料与方法

收稿日期:2015-02-06
基金项目:江苏省现代种业发展项目。
作者简介:王 波(1979—),男,江苏泗阳人,助理研究员,主要从事作物遗传育种和种子质量检验工作。E-mail: wangbo20088@163.com。

1.1 材料
苏玉 20 杂交种及其亲本苏 951 和苏 651 种子均由江苏明天种业科技有限公司提供。

1.2 方法
1.2.1 盐溶蛋白电泳法 参照 NY/T 449—2001《玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法》。

1.2.2 SSR 分子标记 切取少量胚乳,利用碱煮法^[4]提取玉米基因组 DNA。利用文献[3]中提供的 4 对引物(表 1)用于苏玉 20 纯度鉴定,所用引物由上海英俊生物工程有限公司合成。PCR 反应体系:DNA 模板 1.0 μL, Super Taq Mix 5.0 μL (上海浦迪生物科技有限公司), ddH₂O 3.0 μL, 上下游引物(2.0 μmol/L)各 0.5 μL。PCR 扩增程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应在 BIO-RAD 5808R 型 PCR 仪上进行。

PCR 反应产物在 30% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(N,N-亚甲基二丙烯酰胺:丙烯酰胺=1:29)分离 1.5 h 后,经 0.2% AgNO₃ 银染后显色,拍照观察并记录。

表 1 用于 PCR 扩增的引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
bnlg2291-F	CCTCTCGATGTTCTGAAGCC
bnlg2291-R	GTCATAACCTTGCCCTCCCAA
bnlg1306-F	CACCTTGAAAGCATCCTCGT
bnlg1306-R	CAAAAACAAATGGCAGCTGA
phi065-F	AGGGACAAATACGTGGAGACACAG
phi065-R	CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC
umc1590-F	CAGAGTCTGATAGTCCGAACCCAG
umc1590-R	GTAAAGCTCACAGCTTCCGACAG

2 结果与分析

2.1 盐溶蛋白及 SSR 分子标记电泳结果
参照农业行业标准 NY/T 449—2001《玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法》,将待检批次的苏玉 20 及其父、母本蛋

白质上样,电泳并分析(图 1)。结果表明:苏玉 20 及其亲本自交系间存在差异,且杂交种 F_1 代和双亲谱带互补。图 1 中,有 1 个泳道的谱带呈偏母本型,可能是母本接受外来花粉造成的混杂,可以确定为非杂交种。这表明盐溶蛋白电泳可用于苏玉 20 品种纯度鉴定。

利用孟庆长等筛选出的 4 对引物^[3]对苏玉 20 杂交种及亲本进行扩增,其中引物 umc1590 经 PCR 扩增后, F_1 代图谱出现 3 条互补带,因此不建议作为区分此品种的首选引物。而引物 bnlgl306、phi065、bnlg2291 经 PCR 扩增后父母本各为 1 条带,杂交种为双亲的 2 条互补带,可很好地区分(图 2)。

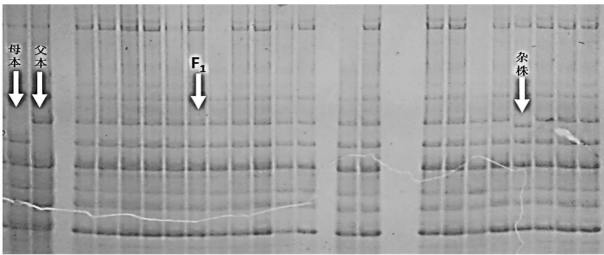


图1 苏玉20种子纯度的盐溶蛋白电泳鉴定

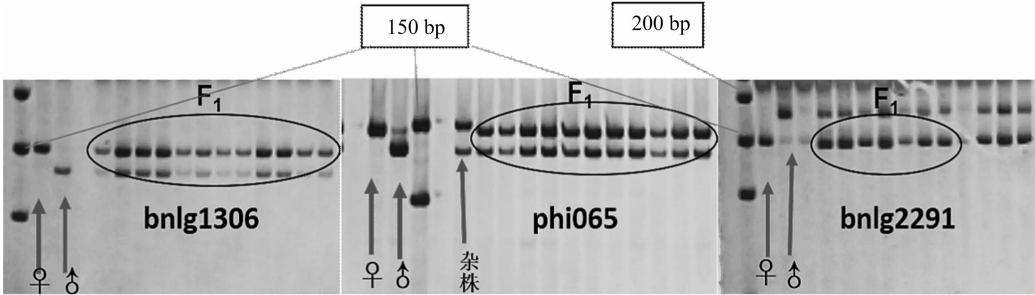


图2 苏玉 20 种子纯度的 SSR 标记鉴定

2.2 2 种方法的结果比较

对 10 个不同批次种子同时用 2 种方法进行对比(表 2),研究发现,同一批次种子,蛋白电泳纯度数值比 SSR 分子标记数值高平均 0.78 百分点,差异范围在 -0.8 ~ 3.1 百分点。2 种方法数值有一定的相关性,种子纯度越高,2 种方法数值越接近,如果纯度越低,SSR 分子标记数值相对越低。

表 2 苏玉 20 利用一对 SSR 引物和盐溶蛋白法鉴定的纯度结果				
种子编号	检验样品数(个)	纯度(%)		备注引物
		SSR	盐溶蛋白	
C13/1657	152	96.7	98.4	bnlg2291
C13/1658	152	98.7	98.1	bnlg2291
C13/1659	152	93.4	96.3	bnlg2291
C13/1660	152	97.8	97.8	bnlg1306
C13/1661	152	98.0	97.2	bnlg1306
C13/1662	152	98.7	98.4	bnlg1306
C13/1663	152	97.4	97.8	bnlg1306
C13/1664	152	94.1	97.2	phi065
C13/1665	152	97.4	98.0	phi065
C13/1666	152	96.7	97.5	bnlg1306

为进一步验证筛选出的 3 对引物能否很好地鉴定品种纯度,每一粒种子经玉米单粒磨碎仪研磨后,取少许胚乳做 DNA 模板,对应的种胚做盐溶蛋白电泳。经比较,2 种方法的纯度结果基本吻合(表 3)。另外研究发现,152 个检测样品,4 个母本自交系种子在不同引物标记及蛋白电泳检测中表现均一致,而经 phi065 检测显示为父本的个体在其他方法中显示为 F_1 代,经 bnlgl306 和蛋白电泳检测显示为杂株的个体在其他检测方法中显示为 F_1 代。这种现象可能和玉米种子在不同发育时期蛋白表达不同有关。同时也说明在实际工作中,应结合该批种子是自交苗、回交苗、其他类型杂株还是遗传不稳定因素,根据实际情况,选择合适的引物对,对各单株检测结果进行综合判定,确定待测杂交种的纯度。

表 3 苏玉 20 利用 3 对 SSR 引物和盐溶蛋白法鉴定的纯度结果

检验样品数(个)	母本(个)	父本(个)	杂株(个)	纯度(%)	方法
152	4	1	0	96.7	SSR(phi065)
152	4	0	1	96.7	SSR(bnlgl306)
152	4	0	0	97.4	SSR(bnlgl2291)
152	4	0	1	97.5	盐溶蛋白

3 讨论与结论

刘宏魁等利用盐溶蛋白 PAGE 法和 SSR 分子标记对先玉 335 和泽玉 11 指纹图谱进行了分析,研究发现,盐溶蛋白法可大批量用于纯度检测,对于难以鉴定的品种可用 SSR 分子标记法作为辅助手段进行鉴定^[5]。本试验以同一玉米种子为材料,提取不同取样部位的基因组 DNA,利用 SSR 分子标记法和盐溶蛋白电泳法对苏玉 20 纯度进行了鉴定,结果表明 2 种方法均可区分亲本自交系和杂交种。这说明碱煮法适于苏玉 20 的提取,盐溶蛋白电泳法也可以用于此品种的纯度鉴定。

试验中利用 3 对 SSR 引物和蛋白电泳进行比较(表 3),研究发现 2 种方法结果比较吻合。但各个引物的 SSR 标记图谱和蛋白电泳图谱个别个体表现并非一一对应,这正解释了 SSR 标记作为一种随机 DNA 标记,个体在不同引物间存在一定差异,而 SSR 标记和盐溶蛋白法个体的差异表现正说明蛋白质电泳图谱易受种子(或幼苗)发育阶段及表达器官的影响,不够稳定从而影响了鉴定结果的准确性。这和赵久然的研究结果^[6]是一致的。

参考文献:

[1]包和平,曹丽娟,杨 光. 用盐溶蛋白 PAGE 法检测杂交玉米种子纯度[J]. 中国种业,2006(6):36-37.

蔡凤香,陈豆豆,杨 飞,等. H_2O_2 对水稻幼苗生长和生理的调节[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):74-77.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.019

H_2O_2 对水稻幼苗生长和生理的调节

蔡凤香,陈豆豆,杨 飞,郑 欣,张思韬,赵风云

(山东理工大学生命科学院,山东淄博 255049)

摘要:用水稻 (*Oryza sativa* L.) 中花 11 号分析了 0.06%、0.006%、0.000 6% H_2O_2 处理 5 d 对水稻幼苗生长、 H_2O_2 产生、细胞死亡及生长素积累分布的影响。结果表明,高浓度 H_2O_2 (0.06%) 抑制地上部分和不定根的伸长及不定根上侧根的形成和生长,但对初生根上的侧根生长无明显影响。低浓度 (0.000 6%) H_2O_2 促进初生根和不定根的伸长及其侧根数量增多和长度增加。根尖 H_2O_2 积累和细胞死亡随着 H_2O_2 浓度的增大而增加。利用 DR5-GUS 转基因水稻分析显示高浓度 H_2O_2 促进生长素在根尖的过量积累,本试验条件下 H_2O_2 对生长素积累和分布的调节与其激活转录有关。由此可见,高浓度 H_2O_2 对水稻幼苗生长的抑制作用与其诱导细胞死亡及生长素过度积累有密切关系。

关键词:过氧化氢 (H_2O_2); 生长素; 水稻; 幼苗; 生理调节; 侧根数量; 侧根长度; 根尖细胞

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0074-04

H_2O_2 是植物体内重要的信号分子,参与调节众多细胞应答过程,包括生长发育、向地性生长和激素信号等^[1]。对 H_2O_2 与根系生长发育的关系研究发现,在正常和胁迫条件下 H_2O_2 都参与根系形态建成的调节。如用不同胁迫处理拟南芥,产生的表型非常相似,暗示有共同的分子-生理系统调节胁迫下的形态应答,推测 H_2O_2 在控制形态建成变化中可能起关键作用^[2]。非胁迫条件下,清除 H_2O_2 促进拟南芥根的伸长但抑制根毛的形成^[3-4]。研究还发现, H_2O_2 既是玉米根细胞壁松弛和伸长生长所必需的^[5],也是水稻根生长所必需的^[6]。 H_2O_2 是黄瓜^[7]和绿豆 [*Mucuna pruriens* (Linn.) DC. var. *utilis*]^[8] 不定根形成和发育的信号分子。这些结果表明, H_2O_2 对调节根系的生长发育可能起关键作用。众所周知,生长素是调节根系生长发育不可缺少的信号分子,它们是根细胞分裂、伸长生长、向地性应答和侧根发育必需的^[9]。研究显示, H_2O_2 与生长素的相互作用对根系的生长发育产生影响。在正常生长条件下,生长素诱导 H_2O_2 的产生是玉米根向地性生长所必需的^[10]。用绿豆研究发现,外源生长素 IBA

诱导 H_2O_2 的过量产生,从而促进不定根的形成^[8]。生长素促进番茄根尖 H_2O_2 积累但抑制根的生长^[11]。对拟南芥研究表明, H_2O_2 代谢的变化可能通过影响生长素的平衡而控制胁迫诱导的形态生长应答^[2]。氧化胁迫抑制拟南芥主根的伸长,但是能促进侧根的形成。在胁迫诱导的生长重新定向过程中, H_2O_2 可能促进生长素驱动的细胞分裂^[2]。这些研究表明, H_2O_2 和生长素之间的相互作用参与了根系生长发育的调节。笔者前期研究发现,Cd 胁迫诱导水稻根系生长的变化与 H_2O_2 的积累有关^[12]。Zn 对 Cd 胁迫水稻根系生长的调节与其减少 H_2O_2 产生并诱导生长素积累和分布的变化有密切关系^[13]。本试验旨在研究非胁迫条件下外源 H_2O_2 调节水稻幼苗生长的生理机制。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

挑选籽粒饱满的水稻种子 (品种为中花 11 号),去壳后消毒:75% 乙醇 (30 s)、0.1% 氯化汞 (15 min)、2% 次氯酸钠 (20 min),用无菌水冲洗干净,再将种子植入 MS 培养基上,放入培养箱内 [光周期为 14 h 光照,光照强度为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度 26 $^{\circ}\text{C}$,夜间 10 h,温度 20 $^{\circ}\text{C}$;相对湿度约为 50%~60%] 培养 6 d 后转到 Hoagland 营养液,使其适应 12 h 后进行 H_2O_2 处理:在 Hoagland 营养液中分别添加 0.06%、0.006%、0.000 6% 的 H_2O_2 处理 5 d。每天更换 1 次培养液,每种处理重复 3 次,每次至少 3 个重复,每个重复约 50 株。

收稿日期:2015-01-19

基金项目:山东省自然科学基金 (编号:ZR2014DM010、ZR2015CL009); 山东省淄博市科技发展计划 (编号:111089、113106)。

作者简介:蔡凤香 (1989—),女,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事分子生物学研究。

通信作者:赵风云,博士,教授,主要从事分子生物学研究。E-mail: zfy1226@126.com。

[2] 郭景伦,赵久然,王风格,等. 玉米杂交种纯度室内与田间鉴定结果比较研究[J]. 种子世界,2004(7):22-24.

[3] 孟庆长,陈艳萍,杨兴华,等. 利用 SSR 技术鉴定苏玉 20 的纯度[J]. 江苏农业学报,2009,25(3):508-512.

[4] 王建华,田宝华,杨丽维,等. 玉米单粒播种种子质量评价与检测技术手册[M]. 北京:中国农业大学种子科学与技术研究中心,

46-52.

[5] 刘宏魁,闫洪朗,原亚萍. 应用盐溶蛋白电泳和 SSR 分子标记鉴定玉米种子纯度的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(19):11396-11398.

[6] 赵久然. 玉米种子真实性和品种纯度鉴定新方法[J]. 北京农业科学,1999(3):25-40.