

Analysis on the Method of Corn Seed Purity Identification

Jianhua Sun, Yuandong Zou*

Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing
Email: 1913000874@qq.com, ^{*}zyydd@163.com

Received: May 1st, 2020; accepted: May 18th, 2020; published: May 25th, 2020

Abstract

Corn is a plant of the genus *Poaceae*. By 2020, it will consume more than 100 million tons per year as food, feed and industrial raw materials. In order to improve the quality and output of corn and protect the rights of corn varieties, seed managers need to explore more standard and effective Corn seed purity inspection technology. This paper analyzes the advantages and disadvantages of the commonly used corn seed purity identification methods, such as: seed morphological identification method, seedling morphological identification method, plot planting identification method, biochemical identification method and molecular marker detection technology, and the scope of application. The cost-saving and cost-saving methods provide theoretical basis, and evaluate the advantages and disadvantages of each method, and at the same time forecast the future development trend of seed purity identification.

Keywords

Corn, Seed Purity, Morphological Identification, Biochemical Identification, DNA Marker

关于玉米种子纯度鉴定方法分析

孙建华, 邹原东*

北京农业职业学院, 北京
Email: 1913000874@qq.com, ^{*}zyydd@163.com

收稿日期: 2020年5月1日; 录用日期: 2020年5月18日; 发布日期: 2020年5月25日

摘 要

玉米是禾本科玉蜀黍属植物, 截止2020年, 每年消耗一亿多吨用作粮食、饲料和工业原料, 为了提

*通讯作者。

高玉米的质量和产量、保护玉米品种权, 种子管理者需要探索更加标准、有效的玉米种子纯度检验技术。本文通过比较分析种子形态鉴定法、幼苗形态鉴定法、小区种植鉴定法、生化鉴定法和分子标记检测技术这几类常用玉米种子纯度鉴定方法的优缺点及适用范围, 为选择结果准确、简便易行、节约成本的方法提供理论依据, 并对每种方法的优缺点进行评价, 同时对未来种子纯度鉴定的发展趋势进行展望。

关键词

玉米, 种子纯度, 形态鉴定, 生化鉴定, DNA分子标记

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 玉米种子纯度鉴定概述

玉米种子纯度鉴定在农业生产中占有十分重要的地位, 其内容包括品种真实性鉴定和品种纯度检验两方面。目前, 玉米种子纯度检验已从传统鉴定法发展到了技术难度较大的分子检测水平, 但是在实际操作中真正推广应用的方法很少。传统的形态学鉴定法主要根据肉眼可见的形态特征、生物学特性进行鉴定, 其包括种子形态鉴定、幼苗形态鉴定和小区种植鉴定[1]。

形态鉴定法非常直观, 但是由于植株形态受许多因素的影响, 具有一定的局限性。由于种质资源共享化, 育种家利用有限的优良品种培育自交系, 且多数性状易受种植环境和栽培条件的影响, 仅靠形态特征不能准确鉴定种子纯度, 其中, 小区种植鉴定是一种较准确的方法, 也是种子贸易纠纷中的重要依据, 但是种植与鉴定过程中需要严格、规范的操作, 有很大的改进空间, 近年来已普遍采用温室、人工气候室和异地种植[2]。另外, 小区种植法检验周期长, 为避免损失, 在种子销售及播种之前仍然有必要对种子进行准确、快速的纯度鉴定, 主要使用生化鉴定法和分子标记检测技术。

生化鉴定法近年来在玉米种子纯度鉴定中有非常广阔的应用, 是通过电泳把种子或植株中的蛋白质或者同工酶分离出来, 染色后进行图谱差异分析, 由于玉米中的蛋白质、同工酶具有丰富的多态性, 检测结果比形态鉴定更加准确。盐溶蛋白聚电泳法由于准确、稳定、重复性好, 是目前应用前景较好的玉米种子纯度检验方法[3]。

分子标记鉴定技术随着分子生物学的发展不断延伸, 成为作物纯度检验比较广泛应用的方法, 是研究 DNA 分子由于缺失、插入、易位、倒位、重排或因存在长短、排列不一的重复序列等机制而产生的多态性。分子标记鉴定法与传统鉴定法相比不受外界环境条件的影响, 标记的位点多, 具有丰富的多态性, 对于杂合亲本关系较近的种子, 是一种准确性高的遗传标记法。目前, 主要推广应用的技术有 RFLP (限制性片段长度多态性 restriction fragment length polymorphism)、RAPD (随机扩增多性 random amplified polymorphism DNA)、AFLP (扩增片段长度多态性 amplified fragment length polymorphism)、SSR (简单重复序列 simple sequence repeat)等[4]。

2. 本研究的意义和目的

玉米是三大粮食作物之一, 而玉米种子纯度鉴定对玉米种子的质量、贸易及其产量提高有十分重要的作用。到目前为止, 玉米纯度鉴定领域出现很多检验方法, 但由于检验品种、目的不同, 各种种子纯

度检验方法所要求的工作环节和特点会有很大的差异, 因此, 在鉴定工作中建立一个实验成本低、准确、快捷的玉米种子纯度鉴定技术十分有必要。本研究阐述了目前几种常规检验技术的原理和过程, 并对分子检测技术进行了简述, 一方面使读者快速、全面地了解玉米纯度检验技术, 使技术得到推广应用。一方面通过对比几种检验技术, 特别是对目前通用的一些方法的重演性、适用性、可操作性、经济性的比较分析, 针对不同检验目的和要求, 建立具有时效性强、准确性高的种子检验标准方法, 并就现有的玉米种子检测技术提出改进和建议, 供相关单位和技术人员参考。

3. 小区种植鉴定法

小区种植鉴定法非常直观, 可以全生育期对玉米的形态特征进行观察, 其缺点是种植过程繁琐、占用田地、生长周期长、成本高、还受到生长季节限制; 另外, 植株表现型不稳定, 极易受栽培环境及气候条件的影响造成鉴定结果误差; 此外, 不同鉴定者鉴定经验不同, 对同一性状的评价也存在主观差异, 难免产生误差; 其次, 随着玉米育种的资源共享化, 能够用来识别的形态特征越来越少。所以小区种植鉴定法可以作为辅助手段, 与其他鉴定技术结合使用以提高鉴定结果的准确性。

3.1. 实验准备

为避免误差, 首先, 根据该批种子的发芽率确定种植株数, 一般应按照 $4N$ 原则确定最少种植株数, 种植株数最少要达到 N 的 4 倍, N 的简化计算公式是: $N = 100 \div (100 - X)$ (注: X 代表种子标注纯度的分子数) [5] [6]。选择肥力一致、气候适宜、无重茬的田块, 按照生育期的不同把已经编号的玉米种子种到各小区中, 并设置一个对照组, 加强田间管理, 使小区内植株正常发育。

3.2. 鉴定时期

鉴定时要求由两名以上经验丰富的种子检验员共同完成, 玉米全生育期皆可观察, 主要鉴定苗期、花期和成熟期三个时期的特征, 并相互结合鉴定结果较为准确。1) 苗期: 幼苗长出五叶一心时, 重点观察幼苗的叶鞘颜色, 综合观察叶色、叶形、光泽、长势等为典型性状进行鉴定并记录。2) 花期: 主要鉴定花药颜色、花丝颜色、雄穗形状、穗位、护颖颜色, 结合其他株型、株高、节间长度、分枝多少及分枝松散程度、叶片数、叶色、叶片张开角度等特征进行分析, 这一时期对不确定的植株重点观察并做标记。虽然有些主要玉米品种苗期芽鞘颜色的特征明显, 但为了更加准确鉴定品种纯度及真实性, 尤其是难以判断的品种, 必须结合花期的特征得出最终结果。3) 成熟期: 鉴定观察的特征包括粒型、穗型、穗位高低、粒色、穗轴色等 [7]。鉴定者须在无风晴朗的天气逆光观察, 并当场填写表格。

3.3. 对于改进小区种植法的建议

1) 鉴定程序按《农作物种子检验规程》进行, 制定针对杂交玉米种子特征特性分类的种植, 从而保证鉴定工作的科学性和准确性 [8]。2) 有关部门在品种审定时要对新品种进行 DUS (特异性、一致性、稳定性) 三性测定, 对不符合条件的种子禁止流入市场, 同时大力推广优势品种, 方便管理和检验。3) 建立种子标准样品储藏库, 例如把京科 665 幼苗叶紫色, 叶片绿色, 叶缘淡紫色, 花药淡紫色, 颖壳淡紫色等标准数据、图像和样品存入数据库。4) 必须选择最佳鉴定时期对植株进行鉴定, 对典型形状进行标记并记录。5) 鉴定者要认真分析各种因素可能对植株表现形状的影响, 如环境条件、病虫害等, 在田间管理上禁用除草剂和植物生长调节剂, 以免影响植株生长状态, 影响鉴定结果的准确性 [9]。鉴定结束后, 可对该批种子的田间价值进行估值, 再次利用, 减免浪费。

4. 种子形态鉴定法

4.1. 实验方法

随机取待检玉米种子样品, 使用放大镜、解剖镜、种子重量分析仪等工具, 对照标准品种逐粒观察, 仔细辨别每粒种子的形态特征。粒型有马齿型、半马齿型、硬粒型等; 种子顶部形状有长方形、长圆形、圆形; 粒色有白色、黄色、浅黄色、红色、淡红色、橙黄色、紫色等[10]; 种粒的质地有粉质或硬质; 胚的大小及其形状, 胚部有无褶皱及数量; 花丝中遗迹的位置与明显程度[10]; 稃壳颜色(白色、浅红、紫红等)及其深浅, 正常种植环境下的千粒重, 认真区别并计算品种纯度。例如金海 5 号的典型特征: 籽粒黄色, 马齿形, 千粒重 327 克。

4.2. 评价

此方法简单、直观、成本低, 其中利用种子的胚乳直感现象来鉴定父本与母本有明显差异的杂交种的自交粒是一种十分有效的方法, 但对于形态差异不明显的品种及其亲本很难区分, 只能鉴定少量有明显特征的玉米种子, 在种子管理中可以做初步鉴定, 防止玉米种子混杂, 如需准确结果, 还要结合其它鉴定技术进行检验。

5. 幼苗形态鉴定法

5.1. 实验方法

在温室中把样品培养成为的幼苗, 观察其萌发的整齐度及叶形、叶色、叶上茸毛、芽鞘、中胚轴和近根处颜色, 其次, 观察次生根的粗细、长短和数量多少。幼苗鉴定和田间种植鉴定结果有较高的一致性, 通过观察幼苗芽鞘及第一叶颜色的变化来鉴定种子纯度[11]。

5.2. 计算方法

小区种植鉴定法和幼苗鉴定法的鉴定结果用典型株数占鉴定总株数的百分比表示: 品种纯度(%) = 供检株数 - 非典型株数) ÷ 供检株数 × 100% [12]。

小区种植法的鉴定结果要结合苗期的鉴定数据, 两者取平均值, 并保留一位小数。

5.3. 评价

幼苗鉴定法简单、直观、成本低, 可以同时检测种子的发芽率, 对于幼苗有明显特征差异的品种的适用性很强。例如父本为红色叶鞘、母本为绿色叶鞘的组合: 丹玉 6 号、铁单 4 号、本玉育 9 号等品种, 检验结果较为准确[13]。由于籽粒大小容易受授粉和环境条件的影响, 造成较大误差, 另外, 某些亲缘品种也很难区分, 因此检验结果不是很可靠, 需要结合小区种植技术。

6. 生化鉴定法

6.1. 盐溶蛋白电泳法

6.1.1. 原理

玉米种子内含的蛋白质、同工酶不同, 利用分子筛效应、电泳技术把蛋白质或同工酶从种子中提取出来, 染色后可以看到清晰的蛋白质谱带, 利用指纹图谱鉴别蛋白质的差异, 从而检验品种真实性。

6.1.2. 实验方法

按 GB/T3543.5 的要求, 从送验样品中随机取玉米种子粉碎, 放入离心管中, 用滴管加入与样品体积

相同的样品提取液[14], 经过处理取上清液用于电泳。以下操作参考玉米种子纯度鉴定盐溶蛋白电泳鉴定方法 NY/T449-2001。

电泳操作:

1) 准确插入样品梳: 做好实验准备后, 将样品梳须水平插入到浓缩胶中, 以样品梳底部距离分离胶顶部 0.5 cm 为最适宜。

2) 点样: 浓缩胶聚合后, 拔出样品梳, 清理样品槽, 吸出样品槽中多余的水分, 并在每个样品槽中加入微量不同玉米种子的样品上清液, 用去离子水清洗进样器 2~3 次, 防止样品的交叉污染[15]。

3) 电泳: 首先, 拧紧电泳槽, 防止缓冲液外流, 然后小心倒入电极缓冲液。电泳过程保持室温左右, 避免阳光直射, 上槽接通正极, 下槽接通负极, 调压至 500 V 进行电泳。待甲基绿指示剂下移至胶板底部时, 蛋白质达到分离效果, 立即关闭电源。

4) 卸板: 电泳结束后, 立即倒出电极缓冲液, 卸板后用去离子水冲刷清洁凝胶板。

5) 染色: 在 30℃ 恒温条件下染色 2~4 h 即可。

6) 洗板: 染色结束后, 用清洁剂刷洗干净即可。

7) 结果鉴定: 观察电泳谱带的特征并计算。

8) 计算公式: $\text{电泳测定值} = (\text{检样品粒数} - \text{非本品种粒数}) / \text{供检样品粒数} \times 100\%$

从大量的检验结果与大田种植鉴定结果来看, 只要取样均匀准确, 样品数量达到要求, 可以将电泳值直接作为大田纯度值[16]。

9) 胶板保存于电脑, 方便日后查阅。

6.1.3. 结论

玉米种子盐溶蛋白电泳鉴定方法操作简单、不受环境限制、出结果快、结果可靠, 相比小区种植法实验成本高、周期长、受环境限制的缺点, 此法有很大的优势, 但操作过程中需要技术员非常细心, 因为溶液配制容易出错而使检验失败。

6.2. 同工酶电泳法

6.2.1. 原理

由于遗传信息不同, 不同品种玉米种子的酶组分存在差异, 利用电泳技术把种子中的同工酶分离出来, 与标准同工酶谱带对比进行区分品种真实性和纯度。

6.2.2. 实验方法

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法, 取样品逐粒作酯酶同工酶电泳鉴定, 每个品种用其自交种和杂交种作对照。先将玉米总之用自来水清洗, 浸泡在 30℃ 的恒温箱中培养 24 h, 然后取下玉米胚, 提取微量同工酶酶液滴在准备好的干净胶片上, 在 0℃~4℃、2 mA 的条件下, 电泳 14~16 h [17], 电泳操作过程与盐溶蛋白电泳操作过程相似, 取下胶片, 染色后进行分析鉴定。

6.2.3. 评价

酶的活性容易丧失, 提取过程中对电泳条件要求较高, 操作繁琐, 试剂价格较高, 分析周期长, 最重要的是, 即使同一批种子, 也会因不同子粒个体之间的生活力存在差异, 导致不同种子的同工酶很难在同一时期表达, 最终导致鉴定结果不准确, 所以并没有得到大范围的推广。

7. 分子标记检测技术

随着分子生物技术在理论和操作方面的成熟, 分子标记检测技术得以应用于种子纯度检测领域。此

技术是在分子水平上鉴定品种纯度的高科技, 需要精密的实验仪器, 操作难度较高, 以 DNA 的形式表现品种差异, 不受组织类别、发育阶段等因素制约, 因此具有较高的准确性和稳定性。同时, 提取的样品 DNA 可长期保存, 方便追溯。

7.1. RFLP

RFLP (限制性片段长度多态性 restriction fragment length poly morphism)的原理是由于遗传物质的差异, 玉米产生的限制性酶切片断的数目和大小不同, 因此通过 Southern 杂交分析技术杂交分析显示出特定的 DNA 片段, 然后与标准品种 RFLP 指纹图谱比较进行结果分析, 就能检验出玉米的品种纯度。由于基因组限制性酶切位点的突变、相邻位点间 DNA 结构重排, 所以 RFLP 具有多态性稳定、重复性好等优点, 可以鉴定多种玉米品种。RFLP 技术的缺点是操作繁琐、DNA 用量大、花费时间长、浪费人力, 检测中使用的放射性同位素对实验人员的身体有潜在的伤害[18], 因此 RFLP 标记技术在玉米纯度鉴定中并没有广泛地应用。

7.2. RAPD

RAPD (随机扩增多态性 random amp lified poly morphism DNA)以 PCR (polym erase chin reaction)为基础。由于不同基因组 DNA 序列存在差异, 不同区段上与引物同源互补的位点不同, 通过 PCR 反应, 产生不连续的、数量、大小不同的 DNA 扩增产物[19], 由此鉴定种子的品种纯度。RAPD 具有经济、灵敏度高的优点, 且相比较其他分子标记检测技术操作简单、DNA 需求量少, 可以快速区分玉米自交系, 而得到非常广泛的应用。但 RAPD 技术检测显性遗传, 扩增产物的稳定性有待提高, 提供信息不完整, 不能鉴定遗传关系较近的自交系组配杂交种, 对于从未检测过的品种需要重新筛选引物[20], 因此, 随机扩增多态性在玉米纯度鉴定中, 需与其他鉴定技术结合应用。

7.3. AFLP

AFLP(扩增片段长度多态性 amplified frag ment length poly morphism)是基于 RFLP 和 PCR 相结合发展起来的技术, 皆具可靠性和高效性。其原理是用限制性内切酶消化基因组 DNA, 以获得大小不同的酶切片段, 再把这些酶切片段与含有共同黏性末端的人工接头连接在一起, 作为进一步扩增的模版, 根据需要选用在引物末端加上选择性核苷酸[21], 进行随机扩增而产生多态性。由于 AFLP 结合了 RAPD 的灵敏性和 RFLP 的可靠性, 可以同时最高可检测到 100-150 个扩增产物, 具有丰富的多态性、高重复性和高准确性特点, 在国内外有很广泛的应用。但是 AFLP 技术有放射性同位素标记, 需要精密、昂贵的实验仪器和较高的实验操作水平, 且对内切酶的质量和 DNA 纯度要求高, 操作耗时、步骤繁多、试剂昂贵[22], 因此只能在少数研究室使用。

7.4. SSR

SSR (简单重复序列 simple sequence repeat)是一种真核生物基因组中普遍存在的重复序列, 一般由 1~5 个碱基为重复单位组成的序列, 因重复次数的不同, 形成了等位基因之间的多态性[23]。此项技术在基因组中分布的数量丰富、多态性好、重复性好、操作简单、实验成本低、准确性高、用时少, 并且对 DNA 质量和数量要求不高[24]。SSR 标记方法结合了 RFLP、RAPD、AFLP 三种方法的优点, 可以快速、准确地鉴定大量杂交玉米种子, 是目前在玉米种子纯度鉴定中应用最广泛的技术之一。另外, SSR 标记技术也有局限性, 只能鉴定常规品种, 对于转基因作物、辐射育种回交等方法选育的品种, 不能直接鉴别和分析。

8. 结语

目前, 在种子纯度鉴定领域还没有比较全面、智能的仪器设备, 只能通过传统的鉴定方法, 依赖检测员的判断。本文通过对常见玉米种子鉴定方法的对比的分析, 建议各单位和研究机构结合实际情况, 因地制宜, 加强对各种检验技术的综合应用, 建立科学、规范的鉴定程序, 选择更为有效、经济的方法。

在依赖鉴定者主观判断的现状下, 玉米种子纯度鉴定领域迫切需要建立的标准数据库。把主要玉米品种的形态特征图谱及蛋白质、同工酶、DNA 指纹图谱录入数据库, 利用人工智能识别、分析, 使鉴定过程更加简便、快捷, 使鉴定结果更加准确。近年来, 我国有在种子纯度鉴定中使用生化指纹图谱分析的案例, 大大的提高了玉米品种纯度鉴定的工作效率。另外, 对于优势玉米品种, 建立标准数据库不仅可以有效控制种子质量, 不仅可以防止假冒伪劣产品流入市场, 又可以保护玉米品种权和广大农民的利益。

基金项目

北京市教育委员会科技一般项目:“金野”紫穗槐性状基因标记的研究, 项目编号: KM202012448003。

参考文献

- [1] 夏永茂, 韩淑霞. 谈大田种子纯度的检验方法[J]. 农民致富之友, 2010(11): 40.
- [2] 赵新子. 玉米种子纯度数字图像处理与识别技术的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学, 2005.
- [3] 王洁, 闫米格. 蛋白质凝胶电泳法鉴定杂交玉米种子纯度与田间种植鉴定法的相关性研究[J]. 山西农业科学, 2009, 37(4): 41-43.
- [4] 车卓. DNA 分子标记技术在玉米纯度鉴定中的应用综述[J]. 种子产业, 2013(2): 51-53.
- [5] 胡德成, 张采凤, 高慧霞, 等. 杂交玉米种子田间小区种植鉴定技术[J]. 中国种业, 2005(8): 56-56.
- [6] 崔巍峰. 玉米种子纯度田间小区种植鉴定的主要技术[J]. 种子科技, 2017, 35(10): 63, 65.
- [7] 王灵敏. 海南玉米种子纯度田间种植技术要点[J]. 种子世界, 2018(7): 97-99.
- [8] 韩品国. 小区种植鉴定杂交玉米种子纯度的问题研究[J]. 大科技, 2018(2): 192-193.
- [9] 周阿文. 玉米田间小区纯度种植鉴定方法[J]. 种子世界, 2017(5): 55-56.
- [10] 刘菊. 形态鉴定玉米种子纯度的方法[J]. 种子产业, 2002(4): 40-41.
- [11] 闫启云. 玉米种子纯度鉴定的方法[J]. 农技服务, 2013, 30(7): 676-677.
- [12] 吴秀婷. 玉米种子纯度鉴定技术简述[J]. 农业工程技术, 2017(10): 81.
- [13] 解明伟. 玉米种子纯度鉴定方法比较[J]. 农业科技与装备, 2013(4): 63-64.
- [14] 张金汉. 玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法[J]. 农业科技与信息, 2014(2): 36-37.
- [15] 玉米种子纯度鉴定盐溶蛋白电泳鉴定方法 NY/T449-2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [16] 王峰, 杨淑梅. 玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法[J]. 种子世界, 2014(9): 39-40.
- [17] 谭玉坤, 王宝君. 同工酶电泳鉴定玉米种子纯度准确性初探[J]. 杂粮作物, 2000, 20(6): 25-27.
- [18] 李宗新, 曲树杰, 李文才. 玉米丰产增效栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [19] 杨婷婷, 徐静, 曾国浩. 常用分子标记技术在玉米种子鉴定方面的比较与分析[J]. 云南农业, 2013(10): 34-36.
- [20] 罗黎明, 刘丽, 于丽娟, 等. DNA 分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用[J]. 生物技术进展, 2011(1): 7-13.
- [21] 吴秋华, 张春娇, 张宝顺. 玉米种子纯度鉴定技术概述[J]. 种子世界, 2014(12): 16-19.
- [22] 龚秋菊. 玉米纯度检验方法的评价[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [23] 玉米种子纯度 SSR 分子标记鉴定方法[R]. 沈阳: 沈阳质量技术监督局, 2017: 5.
- [24] 孔菲. SSR 分子标记在玉米种子纯度鉴定中的应用[J]. 种子世界, 2011(2): 33-34.