

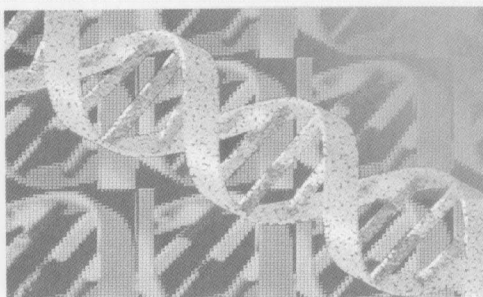
玉米品种DNA指纹鉴定技术 研究与应用

赵久然 王凤格 主编



中国农业科学技术出版社

玉米品种DNA指纹鉴定技术 研究与应用



GG AATGTCCTCCGCTGGG AATGTCCTCCGCTGGG AATGTCCTC
GTCTTCCGCTGGG AATGTCCTCCGCTGGG AATGTCCTCCGCTG

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

玉米品种 DNA 指纹鉴定技术研究与应用 / 赵久然, 王凤格主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2009. 4

ISBN 978 - 7 - 80233 - 863 - 0

I. 玉… II. ①赵…②王… III. 玉米 - 品种 - 脱氧核糖核酸 - 鉴定 - 研究 - 中国 IV. S513. 035. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 053901 号

责任编辑 冯凌云

责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82109704(发行部) (010)82106630(编辑室)

(010)82109703(读者服务部)

传 真 (010)82106636

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 13. 375

字 数 300 千字

版 次 2009 年 4 月第 1 版 2009 年 4 月第 1 次印刷

定 价 100. 00 元

《玉米品种 DNA 指纹鉴定技术研究与应用》

编辑委员会

主 编：赵久然 王风格

副主编：孙世贤 王守才 杨俊品 陆卫平
杨国航 朱 兵

主要编写人员（按姓氏笔画排顺）

王风格	王守才	王 璐	吕 波
朱 兵	任 洁	刘亚维	许理文
孙世贤	杨 坤	杨国航	杨俊品
李 林	李晓辉	李瑞媛	宋 伟
张静梅	陆卫平	易红梅	赵久然
原亚萍			



前 言

种子纯度和真实性鉴定是玉米种子质量检测的重要内容。在北京市科委、北京市农业局及农业部的项目资助下，在国家及各省品种管理部门、农业部品种权保护部门及国内主要科研部门的大力支持下，北京市农林科学院玉米研究中心深入开展了 DNA 指纹技术在玉米纯度及真伪检测方面的应用研究，现已构建了国内第一个玉米标准 DNA 指纹库，累计入库品种 6 000 多份，该项研究处于国际前沿水平。目前中心已成为北京市高院品种权司法鉴定的指定单位，农业部国家区试玉米品种一致性及真实性 DNA 检测的技术牵头单位，辽宁、吉林、北京、内蒙古、宁夏、山东、河北、天津等省区试玉米品种 DNA 检测的委托鉴定单位，农业部植物品种权保护玉米品种分子检测的委托鉴定单位，UPOV 组织 BMT 技术工作组专家。已承担玉米品种对外检测工作，先后为全国各地数百家玉米种子科研、生产、经营、管理及执法部门分析样品 6 000 多批次，成功完成玉米侵权案件法院委托鉴定 400 多批次。

北京市农林科学院玉米研究中心自 1993 年起，通过多年不懈努力，不断探索新技术在玉米品种纯度和真实性鉴定方面的研究应用，从同工酶标记到 RAPD、SSR、SNP 标记，在利用 DNA 指纹技术进行玉米品种纯度和真实性鉴定方面取得了显著成效。为了进一步扩大 DNA 指纹技术在品种鉴定中的作用和提升国内玉米品种管理水平，适应广大玉米生产经营单位和种子质量检测单位对纯度和真伪检测技术的需求，中心拟于 2009 年起定期召开玉米品种纯度和真实性检测技术培训班，以期提高国内种子质量检测技术人员的检测能力和实际操作水平，加快技术推广应用，促进我国玉米种业持续健康发展。培训班的主要内容是讲解玉米品种纯度和真伪检测所必备的理论基础知识，培训基本操作技能，在理解和熟悉的基础上，提高学员的实际检测水平，达到最终能够胜任种子质量检测工作的目的。为方便培训交流，我们总结了多年来在玉米品种鉴定方面的研究工作，编著了这本培训教材。



本书编写过程中得到了全国农业技术推广服务中心、农业部植物新品种测试中心、中国农业大学国家玉米改良中心、四川省农业科学院作物研究所、扬州大学农学院、吉林大学植物科学学院、吉林省农业科学院生物技术研究中心等单位的支持，在此表示诚挚的感谢。

本书可作为玉米种子质量检测、品种管理、品种权保护、侵权案司法鉴定、品种选育、农业科研教学等从业人员的参考书籍。由于时间仓促，难免有遗漏和不足之处，敬请专家和读者批评指正。

编 者

2009 年 3 月 20 日



目 录

第一章 玉米种子质量鉴定技术的发展	(1)
第一节 玉米种子质量及种子质量检测的重要性	(1)
第二节 主要的种子鉴定技术	(3)
一、常规鉴定技术	(3)
二、现代鉴定技术	(4)
第三节 分子技术在玉米品种鉴定中的发展趋势	(11)
一、从 RAPD 标记到 SSR 标记的技术提升	(11)
二、从 SSR 标记到 SNP 标记的技术探索	(11)
三、从非功能标记向功能标记的转变	(12)
第二章 玉米品种 DNA 指纹鉴定标准试验体系的建立	(16)
第一节 DNA 提取方法的研究	(16)
一、DNA 提取的基本方法及原理	(16)
二、DNA 快速提取方法研究——碱煮法	(23)
三、高质量 DNA 提取方法研究——改良高盐低 pH 法	(26)
四、果皮组织 DNA 提取方法研究	(27)
第二节 PCR 扩增反应程序和反应体系的研究	(29)
一、通用 PCR 扩增反应程序的建立	(29)
二、多重 PCR 扩增体系的建立	(33)
第三节 电泳检测方法的研究	(36)
一、主要电泳检测方法的比较	(36)
二、PAGE/快速银染检测法的研究	(37)
三、毛细管电泳多色荧光检测与变性 PAGE 电泳银染检测两种检测方法的比较	(40)
四、毛细管电泳荧光检测中的异常电泳类型及原因分析	(43)
第三章 核心引物的筛选确定及复合扩增体系的建立	(49)
第一节 玉米 DNA 指纹鉴定中核心引物组合法的确立	(49)
一、特征谱带法、引物组合法和核心引物组合法的概念	(49)
二、特征谱带法、引物组合法和核心引物组合法的比较研究	(49)
第二节 玉米通用 SSR 核心引物筛选及高通量多重 PCR 复合扩增体系建立	(51)
一、研究目的	(51)
二、研究思路	(51)
三、核心引物的筛选	(53)



四、核心引物的重新设计	(59)
五、荧光多重 PCR 组合的建立	(63)
第四章 玉米 DNA 指纹库数据统计及建库标准化规范	(65)
第一节 DNA 指纹库数据的统计	(65)
一、建库 SSR 引物基本信息	(65)
二、原始数据统计记录方式	(67)
三、原始数据导入数据库的方式	(68)
第二节 玉米 DNA 指纹数据库建库标准化规范的建立	(69)
一、标记方法及标记来源	(69)
二、检测平台	(69)
三、试剂质量保证	(69)
四、样品的来源及性质	(70)
五、引物及流程的评估	(70)
六、不同来源数据的有效整合	(71)
七、构建品种 DNA 指纹模式库	(72)
八、构建品种 DNA 指纹扩展库	(72)
九、数据库数据的随机盲测	(72)
第五章 玉米 DNA 指纹数据库管理系统的建立	(73)
第一节 数据信息表的整理	(73)
一、信息类资料	(73)
二、数据类资料	(75)
三、图片类资料	(76)
第二节 分析功能的设计及实现	(76)
一、主要功能及定义	(76)
二、品种查询比较功能的设计	(77)
三、亲子鉴定功能的设计	(78)
四、品种指纹图谱绘制功能的设计	(79)
五、一致性鉴定功能的设计	(79)
六、纯度鉴定功能的设计	(81)
第三节 网站用户权限分类及设计	(81)
第四节 未来发展战略规划	(82)
一、建立玉米 DNA 指纹国际联合数据库及管理系统	(82)
二、建立 DNA 指纹数据库、分子标记辅助育种、单倍体育种技术三位一体的 高效玉米育种技术体系	(82)
第六章 DNA 指纹技术在玉米品种纯度、一致性、特异性鉴定中的研究及应用 ..	(84)
第一节 DNA 指纹技术在玉米品种纯度鉴定中的应用研究	(84)
一、玉米杂交种纯度鉴定核心引物的选择标准	(84)
二、特定品种纯度鉴定特异引物选择标准	(85)
三、双亲互补带型——适于玉米杂交种纯度鉴定的谱带类型	(88)



四、玉米杂交种纯度鉴定具体工作流程	(88)
第二节 DNA 指纹技术在玉米品种一致性鉴定中的应用研究	(89)
一、一致性检测中异型带的类型	(90)
二、不同品种、不同位点一致性分布特征	(91)
三、一致性检测标准的制定	(93)
四、造成品种一致性差的原因分析	(95)
第三节 DNA 指纹技术在玉米品种特异性鉴定中的应用研究	(95)
一、现行的形态 DUS 测试系统面临的问题	(95)
二、分子技术在玉米特异性测试中的应用策略	(96)
三、分子测试标准的制定	(98)
四、需探讨的几个问题	(99)
第四节 DNA 指纹技术在玉米品种区域试验中的应用	(100)
一、我国玉米区域试验品种 DNA 指纹检测工作历程	(100)
二、玉米区域试验品种 DNA 指纹检测工作特点	(101)
三、DNA 指纹监控工作值得思考的几个问题	(105)
四、玉米区试 DNA 指纹检测工作的意义	(106)
五、关于加强品种市场管理的对策建议	(107)
第七章 玉米品种实验室鉴定技术具体操作程序	(109)
第一节 玉米 SSR 标记鉴定技术	(109)
一、DNA 提取	(109)
二、PCR 扩增	(117)
三、电泳检测	(118)
第二节 玉米种子清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定技术	(122)
一、实验目的	(122)
二、仪器设备与试剂	(122)
三、溶液配制	(122)
四、电泳操作技术	(123)
第三节 玉米种子酯酶同工酶等电聚焦电泳	(124)
一、实验目的	(124)
二、仪器设备与试剂	(124)
三、溶液配制	(125)
四、电泳操作技术	(125)
附录 法规文件汇编	(128)
国家玉米品种试验 DNA 指纹鉴定管理办法	(128)
玉米品种鉴定 DNA 指纹方法 (NY/T1432—2007)	(130)
国家区试玉米品种一致性 & 真实性 DNA 指纹检测技术	(138)
农作物种子质量监督抽查管理办法	(145)
最高人民法院关于审理侵犯植物新品种权纠纷案件具体应用法律问题的若干 规定	(150)



农业植物新品种权侵权案件处理规定 (152)

北京市高级人民法院关于印发《北京市高级人民法院关于知识产权司法鉴定
若干问题的规定（试行）》的通知 (155)

农作物种子质量纠纷田间现场鉴定办法 (159)

北京市种子管理站行政处罚条例 (162)

DNA 指纹图谱测试指南：分子标记选择和数据库构建（概要） (168)

中华人民共和国种子法 (171)

农业转基因生物安全管理条例 (180)

中华人民共和国植物新品种保护条例实施细则（农业部分） (187)

主要农作物品种审定办法 (196)

农业植物品种命名规定 (201)

主要参考文献 (203)



第一章 玉米种子质量鉴定技术的发展

第一节 玉米种子质量及种子质量检测的重要性

玉米是我国主要的粮食、饲料及工业原料作物。常年播种面积已达到 3 000 万 hm^2 ，产量占粮食作物总产量约 30%，年制种量超过 10 亿 kg，其中杂交玉米已达 95% 以上。玉米在我国农业生产中占有举足轻重的地位。

种子质量 (seed quality) 是综合评价商业种子的不同特性，以此来判定其优劣而形成的一种概念。与籽粒品质 (grain quality) 不同，种子质量包括品种质量 (genetic quality) 和播种质量 (seeding quality)。品种质量是指与遗传特性有关的品质，主要用以表达种子内在的价值，可用真、纯两个字概括。真是指种子真实可靠的程度，可用真实性表示；纯是指品种典型一致的程度，可用品种纯度表示。播种质量是指种子播种后与田间出苗有关的质量，主要用以表达种子外在的价值，可用净、壮、饱、健、干、强 6 个字概括。净是指种子清洁干净的程度，可用净度表示；壮是指种子发芽出苗齐壮的程度，可用发芽力、生活力表示；饱是指种子充实饱满的程度，可用千粒重和容重表示；健是指种子健康的程度，通常用种子病虫害感染率表示；干是指种子干燥耐储藏的程度，可用种子水分百分率表示；强是指种子强健，抗逆性强，增产潜力大，通常用种子活力表示 (颜启传, 2001)。目前，在国家标准乃至国际标准中，往往采用种子纯度、净度、发芽率、水分这 4 项指标来衡量种子质量并以此定级。在这 4 项指标中，尤以种子纯度最为重要。

有关专家对我国与欧美发达国家在玉米种子质量上的差距进行分析后指出，我国玉米品种在丰产性、稳产性、直立性以及后期保绿性等方面正在接近国际先进水平，而最大的差距是在种子质量方面，尤其表现在种子纯度上。国家技术监督局从 1993 年起，每年都对玉米、水稻、棉花、茄果类蔬菜等作物种子质量进行抽检。1993 ~ 1995 年 3 年抽检四项样品合格率分别为 2.8%、8.6% 和 9.0%。其中，杂交种样品合格率仅为 1.3% ~ 1.6%。1994 年，纯度在 90% 以上的样本为 14.8%，1995 年为 23.8%。1996 ~ 1998 年，玉米种子质量有了很大提高，3 年抽检样品合格率达到 46.9% ~ 85.8%，其中杂交种样品合格率为 43.5% ~ 85.7%。农业部委托全国农作物种子质量监督检验测试中心等 4 个部级种子质量监督检测机构，对 2003 年河北、山西等 9 省 29 个种子生产经营企业的玉米种子质量进行抽查。抽查结果表明：全部样品的净度、发芽率和水分均符合标准规定值 (标签标注) 要求，但只有 92.7% 样品的品种纯度符合标准规定值 (标签标注) 要求 (农业部农办农 [2004] 14 号, 2004)。从全国玉米及其他作物种子质量抽检结果看，主要问题是种子纯度偏低。因此，种子质量问题，特别是纯度问题，已成为制约生产再发展



的重要因素。据试验结果,玉米种子纯度每降低 1%,亩减产 1.5~2.5kg,以我国大田用种一般纯度在 90% 左右来计算,比国家标准低 6% 左右,每亩减产约 12kg;全国 3 亿亩玉米仅因纯度一项,每年要减产 36 亿 kg。可见,提高和保证玉米杂交种纯度,对粮食增产和农民增收起着巨大作用。

我国玉米育种研究和种子生产经营正在向商业化转移,越来越多的企业投资玉米产业。由于玉米种子生产蕴涵着巨大的经济利益,市场上经常出现侵权或违规经营的行为,例如,以甲品种充当乙品种、以未审定品种充当审定品种、随意更换杂交种亲本改变品种特性、窃取或冒名他人杂交组合等不法现象,侵权行为越来越严重,产权纠纷案件频频发生,严重损害了育种家权益和农民利益。对这些不法现象的审理基本属于品种同一性或亲子鉴定范畴,因此快速判别品种的真实性(同一和亲子鉴定)已刻不容缓。随着育种思路的拓宽和育种技术的不断提高,新杂交种大量涌现,很多品种的生物特性非常接近,同时骨干自交系的使用日益集中,导致我国玉米育种和生产用种的遗传基础渐趋狭窄,给种子质量的判定带来很多困难。因此不论育种者、经营者或使用者的都越来越重视种子质量和保护自身的合法权益。

伴随着植物育种和种子贸易的发展,国内外育种者和种子经营者对新品种保护申请的意愿越来越强烈。植物新品种选育周期长、受自然因素影响大、可控性差、地域性强、技术保密性弱。有资料统计,取得国家级和省、部级科技进步奖的成果研制周期最长为 35 年,一般成果研制周期为 5~8 年,最短的也需 3 年(中国农业科学院调研室,1995)。新品种的示范推广需要在大田里开放进行,致使育种材料和新品种容易扩散和流失。国际贸易和经济全球化的发展趋势使植物新品种的开发研究与种子贸易早已超出了国内市场的范畴,这就要求新品种权人的权益在其他国家得到保护。随着我国加入 WTO 和市场经济体制的建立与发展,特别是知识产权保护与贸易关税挂钩,无论对国内还是对国外,都必须保护新品种的知识产权,才能调动育种者的积极性和引进国外新品种,加快新品种的选育和推广,促进我国玉米产业发展,这无疑对玉米品种真实性鉴定和纯度检验提出了更迫切的要求。

种子检验(seed testing)是指应用科学、先进和标准的方法对种子样品的质量进行正确的分析测定,从而判断其质量的优劣,评价其利用价值的一门技术。种子检验就是对品种样本的真实性和纯度,种子净度、发芽力、生活力、健康状况、水分和千粒重进行分析检验。

在我国现行标准《农作物种子检验规程》(GB/T3543.1~7-1995)中,玉米种子的净度、发芽率、水分三项指标均可在室内快速检验;但是种子纯度检验技术却有所不同。它作为种子最主要的质量指标之一,是质量检验的核心,是对一批种子中个体与个体之间的特征特性以及典型一致性程度的检验和种子真实性的鉴定,是判定种子质量最复杂的检验过程。

种子真实性是指一批种子所属品种、种或属与文件(品种证书、标签等)是否相符,即种子样品的真假问题。作为一个品种,应该具有明显区别于其他品种的标志性状,即特性。品种间可以区分的基础是彼此遗传特性有差异,即调控性状发生发育的基因差异。不同的基因构成使不同品种有不同的性状表现。这些性状的差异可能表现在很多方面,如产生的化学成分(包括蛋白质和同工酶)存在差异,种子、幼苗以及整个植株的结构和形



态特征存在差异等。因此，种子检验是通过采用有效的手段检测品种遗传物质本身及其调控产物的差异进行品种真实性鉴定。

随着我国市场经济的发展和加入 WTO，国内种业市场日趋成熟，国际间的种子贸易逐渐增多，而种子市场的竞争优势主要是种子质量。建立健全质量保证体系是我国玉米种子生产经营急需解决的问题。《中华人民共和国种子法》实施后，标签管理成为种子管理的重要内容，种子管理部门急需一种快速、有效、科学的方法评价种子纯度指标，作为种子管理的依据。同时，随着《中华人民共和国植物新品种保护条例》的贯彻实施、知识产权保护与贸易关税的挂钩和 1999 年 4 月我国正式成为 UPOV 成员国并接受国内外玉米新品种保护的申请，农作物品种保护与侵权被正式提到议程。总之，研究和推广一套快速、准确、有效的品种真实性鉴定和纯度检测技术体系已迫在眉睫。

第二节 主要的种子鉴定技术

种子检验起源于 19 世纪中叶，当时欧美种子贸易往往不讲信用与道德，掺杂种子司空见惯，于是 F. Nobble 教授于 1869 年在德国兰德（Tharandt）建立了世界上第一个种子实验室。1906 年在德国汉堡举行了第一次国际种子检验大会；1921 年创立了欧洲种子检验协会，1924 年更名为国际种子检验协会（ISTA）。ISTA 在 20 世纪 50 年代以前发展了小区鉴定和田间检验方法，1956 年开始提出种子检验室鉴定品种的可能性和价值，1971 年发展了电泳法，90 年代开始了计算机模拟形态分析和分子技术的应用。

一、常规鉴定技术

1. 种子形态鉴定

不同的品种由于遗传基础不同，在籽粒形态和内部结构上常存在许多稳定的遗传差异，因而可根据籽粒粒型、粒色及其深浅、籽粒顶部形状、顶部颜色和粉质多少、胚的大小及其形状、胚部褶皱有无及多少、稃色及其深浅、籽粒上棱角有无和明显程度、花丝遗迹有无与明显程度等逐粒进行观察，区别本品种和异品种，计算品种纯度百分率。此外，还可以依据花粉直感现象，较准确地将玉米杂交粒与母本自交粒区分开。种子形态鉴定是种子真伪鉴别诸方法中最省时、简便、快速、直观经济的方法，但其准确性较差，受环境条件和发育状况影响较大，尤其是母本相同、粒型粒色相近的品种难以准确鉴定，并且由于种质基础较窄和商业育种等原因，品种间种子形态差异越来越小，因此，依靠种子形态特征来鉴别品种变得越来越困难。

2. 幼苗形态鉴定

该方法是待幼苗发育至一定阶段，出现固有色泽和特征时，根据不同品种幼苗的独特性状进行检验，主要依据幼苗芽鞘颜色、生长锥和子叶的形状、颜色、大小等来区别不同品种和自交系。该方法比较简单，所需时间也相对较短，但能用于鉴别的性状较少，且受环境影响较大，因此，无法鉴别性状差异不明显的品种，其适用范围较窄，可靠性不高。

3. 田间种植鉴定

田间种植鉴定是目前普遍使用的最为可靠、准确的品种真实性和种子纯度鉴定方法，



是我国种子贸易中的仲裁检验。它是将一定量的作物种子在田间种植一个小区，单粒播种，不间苗，不定苗，并设有标准品种小区作对照，根据植株在生育期间的各种特征、特性将不同品种加以鉴别，鉴定时应注意品种的主要性状和特殊性状，参考次要性状和易变性状。一般以抽雄吐丝期和籽粒成熟期这两个时期的鉴定结果为准。该方法能够观察、比较的性状较多，结果可靠。但近年来普遍采用在温室或海南异地种植鉴定，周期长、费用高，而且此法受环境和基因显隐性等的影响颇大，对不发芽的种子和形态相近的材料也不能鉴别，使得鉴定结果的准确性受到影响。另外，鉴定者的观测经验也制约鉴定的准确性。

4. 快速测定法（物理、化学特性鉴定）

鉴定品种的物理特性主要是指不同品种的种子或幼苗在紫外光照射下发出荧光特性的差异；荧光扫描图谱、扫描电镜拍摄形态图和高压液相色谱法图谱的差异。而化学特性主要是指不同品种的种子或幼苗，由于其遗传特性的差异，经化学药剂处理后可显现出颜色差异，据此鉴定不同品种。目前常用的有适于水稻、小麦、大麦等种子的苯酚染色法、适于高粱的氢氧化钾染色法、适于小麦的氢氧化钠染色法、适于大豆的愈创木酚显色法等。这类方法简单、快速，花费少，重演性好，但大多数情况下只能将种子分成几类，再与其他方法结合应用，而且其应用范围较窄。

此外，还有一种根据生理学特征鉴定的培养生长箱测定法，该法依据不同品种的种子或幼苗对异常温度、光周期、除草剂受害症状、微量元素缺乏症、激素反应敏感性和抗病虫特性等生理学特征的差异来鉴定不同品种。此法的局限性在于对株高、穗数等数量性状的测定无法鉴定异型株。

二、现代鉴定技术

1. 计算机模拟形态分析技术

常规的形态鉴定法要求观察和记载大量的形态特征，不仅费时耗力，而且结果较主观，不准确。但是，这些形态性状中常含有对品种鉴定有价值的信息，且一个品种的田间描述性状通常又必不可少。于是，20 世纪 90 年代发展了一种较客观的、数量化、自动化的计算机模拟形态分析法。该方法分析速度快，鉴别力强，而且便于电子贮存和数字传输。同时，对植株和种子一般没有破坏性，且能通过照片、底片和影印件等进行分析，十分方便。Keefe（1992）和 Warren（1997）分别对小麦和菊花进行了分析，结果在较短的时间内获得了大量的形态参数，使其能够用于品种的鉴别与鉴定。应用计算机模拟形态分析鉴别品种，在国内还少见有报道，但它具有精确、可重复性和自动化等优点，将来无疑会成为品种鉴别与鉴定中有力的辅助手段。

2. 蛋白质指纹图谱技术

由于不同品种的遗传基础物质 DNA 不同，形成的模板 RNA 也有差异，使合成的蛋白质或同工酶等生化特性表现出差异，应用生化技术以电泳图谱的形式将品种之间的这些差异显现出来，就可以鉴别不同的品种。这种电泳图谱多态性丰富，且具有高度的个体特异性和环境稳定性，就像人的指纹一样，因而被称为“指纹图谱”。指纹图谱技术对于种子质量标准化、品种审定、假种辨别、产权纠纷的解决都具有重要的作用。蛋白质指纹图谱技术主要包括同工酶电泳、蛋白质电泳、高效液相色谱和抗体反应等技术，其中同工酶和



蛋白质电泳最经济方便，简单快速。

(1) 同工酶

自 1959 年 Market 和 Moller 首次提出同工酶的概念以来，同工酶研究得到了迅猛发展，被广泛应用于生物种及品种的鉴定和分类研究中。同工酶是基因表达的直接产物，生物进化及发育过程中形成的 DNA 序列上的差异反映在同工酶谱上，由此构成同工酶的种属专一性，在不同的种及品种间具有丰富的变异类型，可以用于构建品种的指纹图谱，这一技术已广泛应用于农作物及果树的品种鉴定中。

同工酶谱差异主要是由决定酶蛋白本身的等位基因或非等位基因的差异造成的。大量的研究工作表明同工酶有较丰富的变异类型，不同同工酶酶谱带型的差异，一般表现为同一基因位点上的等位基因差异，在分离群体中能区分所有可能的基因型。因此，同工酶图谱被国际种子检测协会（ISTA）推荐作为鉴别农作物品种的重要依据之一，该方法相对于形态学鉴定而言，有着快速、简便、可靠以及费用低等优点。国外从 20 世纪 70 年代就开始应用同工酶技术鉴定种子纯度，国内的研究起步稍晚。Schwatz（1960）在玉米胚乳中发现同工酶杂种谱带和 Beckman（1964）在玉米中发现亮氨酸胺酶互补酶带，为玉米自交系及杂交种鉴别提供了依据。Hamrick（1978）提出自交系和杂交种等玉米群体中许多位点具有多态性。Goodman（1980）利用同工酶电泳技术鉴定了 42 个自交系，其中 86% 的自交系谱带具有差异。Smith（1986）通过同工酶电泳与种植鉴定在测定玉米杂交种中自交率方面比较后认为：同工酶鉴定比种植鉴定更为可靠。目前，在作物种子真实性和纯度鉴定中，最常用的、多态性较强的是酯酶和过氧化物酶，所鉴定的作物有水稻、玉米、小麦、马铃薯、甘蓝、番茄等 20 多种的多个品种。有研究认为，在玉米自交系和杂交种纯度鉴定中，酯酶同工酶谱比过氧化物酶谱差异更大。赵久然等（1996）的研究表明，酯酶比过氧化物酶受环境条件和发育时期的影响较小，较适于玉米品种纯度鉴定，并做出数十个玉米自交系和杂交种的酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦标准酶谱。刘国奇等（1998）指出，种胚酯酶电泳与田间成熟期鉴定的准确度相同。贾希海等（1997）通过对同工酶谱纯度和田间种植品种纯度进行相关分析，指出可用测定出的酶谱计算品种纯度。

同工酶电泳法鉴别作物品种，是目前应用较多的一种方法，该方法经济有效，主要有垂直板电泳和等电聚焦电泳等。许多实验表明，同工酶具有双重性：一方面具有相对稳定性，这是由遗传基因表达的相对稳定性决定的。另一方面，又具有可变性，在细胞分化、器官形成及个体发育过程中酶谱又具有器官特异性和阶段特异性。在可变性中寻找较多的稳定性是利用同工酶进行品种鉴定的关键之处。但同工酶也有不足之处：实验结果随发育时期、取样部位和环境条件而变化，而且能够利用的同工酶位点有限；由于翻译后的修饰、酶和酶谱的特异性及相对较低的多态性等，研究所选酶的所有基因未必都能表达在酶谱上；此外，技术上有一定难度，从酶提取到电泳整个过程，都要严格控制操作条件，电泳条件的差异都可能产生额外的酶谱差异。因此，应用同工酶分析鉴别品种受到一定限制。

(2) 种子贮藏蛋白

种子贮藏蛋白可用于品种鉴别工作，已在小麦、大麦、玉米、水稻和豌豆等许多作物上得到应用。应用较多的是醇溶蛋白（禾谷类）和球蛋白（豆类），所用电泳技术包括聚



丙烯酰胺凝胶电泳、淀粉胶电泳及等电聚焦电泳等。目前的研究认为,玉米可用种子储藏蛋白或过氧化物酶鉴定,水稻可用酯酶或盐溶蛋白鉴定,小麦、大麦可用醇溶蛋白鉴定,1986 年国际种子检验协会 (ISTA) 已将大麦、小麦品种醇溶蛋白电泳技术列入国际种子检验规程。Cross (1983) 利用 SDS 法分析玉米种子球蛋白并成功地将供试自交系和杂交种区分开。Wall (1984) 利用 IEF-PAGE 法对玉米进行品种鉴定,证明玉米醇溶蛋白有很大的变异,杂交种蛋白包含有双亲的蛋白,这表明此法用于品种鉴定具有一定的优势。Koranyi (1989) 利用 SDS-PAGE 法对玉米可溶蛋白单体研究发现 44 个材料中大部分有特异带。Brink (1989) 利用 IEF-PAGE 法研究发现,不同玉米的醇溶蛋白可以通过 IEF 分开,且用醇溶蛋白的第 10 带能鉴别出同工酶很难鉴别的 4 个组合。周展明等 (1989) 建立的 PAGE 技术获得国家专利保护,目前国内有所应用。张春庆等 (1995) 用 NAU-PAGE 技术分析了玉米种子纯度,结果显示自交系间、杂交种间、自交系与杂交种间有明显的差异,并发现玉米种子储藏蛋白在杂交种内呈共显性。此后又改进一种醋酸尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳 (AU-PAGE) 技术,更适合于快速鉴定玉米种子纯度 (张春庆等, 1997)。陈叶平等 (1997) 利用玉米种子盐溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳技术和过氧化物酶电泳技术对玉米杂交种和自交系的真实性和纯度进行了鉴定。陈景堂 (1998) 进行了利用玉米种子清蛋白鉴定品种纯度的研究,构建了 20 个自交系和 13 个杂交种的标准指纹图谱。

美国等国家以及我国北京、山东、河南等地已采用这些技术检验玉米杂交种的纯度。但由于蛋白质是基因表达的产物,对于亲缘关系相近的材料,采用蛋白质电泳技术不能鉴别 (赵久然等, 1999)。而且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。

(3) 单克隆抗体

单克隆抗体即根据蛋白质 (抗原) 与其抗体之间免疫反应专一性来鉴别不同遗传特性的种子。其基本方法是利用电泳分析种子蛋白,纯化某一品种的专一的蛋白组分,制备其单克隆抗体;用其单克隆抗体处理硝酸纤维素膜。此后即可将待鉴定种子蛋白提取液直接点在这种硝酸纤维素膜上,经酶标二抗处理,酶染色即能显示专一蛋白带。单克隆抗体的主要不足是含单克隆抗体的细胞株的筛选特别繁琐,不易成功,但一旦筛选成功,将能非常快速和方便地鉴定种子。

3. DNA 指纹图谱技术

品种间形态、生理、生化特征的区别,归根到底是 DNA 分子水平上的差异。品种的真实性鉴定,归根到底是鉴定品种的基因型。DNA 指纹图谱技术是通过直接分析遗传物质的多态性来诊断生物内在基因的排布规律及其外在性状的表现规律,比较品种基因组 DNA 的结构与组成,通过鉴定品种 DNA 水平上的差异来鉴别品种。一个纯合的品种,其基因型是一致的,这种基因型可以用某种分子标记加以确定,即基因型与分子标记组合具有对应关系,利用这一标记就可将这一品种与其他品种区别开来。DNA 指纹图谱技术使品种纯度的检验由大田形态检验、生化鉴定进入了分子水平的检验,为品种真实性鉴定提供了准确、可靠、快速、方便的方法。

利用 DNA 指纹图谱鉴别品种真伪的优越性在于 (方宣钧等, 2000): ① DNA 分子标记数量大,多态性水平高,可鉴定表型难于鉴别的品种; ② DNA 分子标记不受任何环境



因素的影响,可在生长发育的任何阶段取材鉴定;③分离出的样品 DNA 可长期保存,这对于进行追溯性或仲裁性鉴定非常有利;④利用 DNA 分子标记鉴定品种真伪,不仅准确可靠,而且还便于实现自动化。常用的鉴定品种的 DNA 分子标记根据其来源可分成三大类:即通过限制性酶切割结合分子杂交技术获得的标记,如 RFLP 标记 (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性);通过 PCR 扩增获得的标记,如 RAPD 标记 (Randomly Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 和 SSR 标记 (Simple sequence Repeats 或 microsatellite DNA, 微卫星 DNA);通过限制性酶切割和 PCR 扩增获得的分子标记,如 AFLP 标记 (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性) 等。

其主要流程包括:从植株提取和分离 DNA,用酶切或者通过 PCR 扩增 DNA,然后走凝胶电泳,使 DNA 片段按长度分开排列,成为可以检测的特定谱带。比较不同植株的带型,就可以确定植株的异同。

(1) RFLP 标记

RFLP 是 Grodzicker 等于 1974 年发明的分子标记技术 (Timothy Helentjaris 等, 1989),它常利用放射性同位素标记探针,与经限制性内切酶消化的总基因组 DNA 杂交,不同品种的 DNA 产生的限制酶切片段的数目和大小不同,故通过杂交分析便能区别不同品种的种子。由于同一作物不同品种间能找到很多 RFLP 标记,利用某品种特定的 RFLP 可以准确地标记该品种,而且其多态性稳定,重复性好,准确性高,具有共显性,因而该技术是较早应用于品种真实性鉴定的分子标记,也是一种最可靠的方法。自 20 世纪 80 年代起 RFLP 标记应用于植物以来,目前已广泛应用于玉米、小麦、大麦、水稻、辣椒等作物的品种鉴别 (Timothy Helentjaris 等, 1989; Smith 等, 1990; Bunce 等, 1986; 郭军等, 2000)。Smith 利用 RFLP 技术用 38 个探针酶组合准确鉴别了 78 个玉米杂交种,而且其中许多是用同工酶和蛋白质电泳技术难于区分的品种,但仍有少数杂交种间带型一样或差异太小。Livnek 等 (1990) 的研究也认为, RFLP 技术可用于鉴别用种子和幼苗形态、同工酶不能鉴别的辣椒杂交种及其亲本。Bunce (1986) 等用 RFLP 方法分析了大麦 *Hor1*, *Hor2* 和 *Hor3* 三个位点,结果表明 RFLP 在大麦品种的真实性鉴定方面有很大潜力。袁力行等 (2001) 利用 56 个探针酶组合在 29 个玉米自交系中检测到了 187 个等位基因变异。Weber (1991) 研究指出, RFLP 可用于鉴定不同的玉米品种,但该方法操作繁琐、技术复杂、费时费力、检测中需要的放射性同位素对人体有害。虽然现在已有一些非放射性同位素标记方法问世,但它们的高价格和繁琐的实验操作步骤影响着它在实际使用中的推广,因而 RFLP 标记在品种真实性鉴定中的应用受到一定限制。

(2) RAPD 标记

RAPD 是由美国杜邦公司的 Williams 和加利福尼亚生物研究所的 Welsh 等 (Williams, 1990) 发明的分子标记技术,它利用随机引物 (通常为十聚体) 对不同品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产生不连续的 DNA 产物,再通过电泳分离检测 DNA 序列的多态性,由得到多态性的 DNA 谱带,从而鉴别不同的品种。每种随机引物扩增的一条谱带代表了被扩增基因组中的一个遗传位点,其多态性通常是某一单一一位点扩增产物有无的记录。

RAPD 可以在对物种没有任何分子生物学研究基础的情况下,进行指纹图谱的构建及遗传多样性分析。该技术快速简便,无放射性污染且成本较低、分辨率高、灵敏度强,所