

分子标记技术在农作物种子检测中的应用

王玉杰^{1,2} 冷春旭^{1,2} 孙中义^{1,2} 王 珣^{1,2} 赵 曦^{1,2} 李晓娟^{1,2} 赵 伟^{1,2} 吴立成^{1,2}

(¹ 黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 哈尔滨 150028; ² 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 哈尔滨 150028)

摘要:种子质量对国家农业经济的发展至关重要,随着生物技术的发展,分子标记技术在农作物种子质量检测中扮演着越来越重要的角色。对分子标记技术的发展历程,分子标记在种子纯度和真实性检测的应用进行论述,为分子标记在作物种子质量检测中的应用提供参考。

关键词:分子标记;农作物;种子检测

种子是现代农业发展的“芯片”,是国家粮食安全和农业高质量发展的“源头”。2020年中央经济工作会议将解决好种子和耕地问题作为年度经济工作重点任务,鉴定种子质量是保障农业安全生产的重要工作之一,而种子纯度和真实性是种子质量控制中最难解决的问题。种子的纯度和真实性鉴定本质上就是品种基因型的鉴定,DNA分子标记技术通过比较不同个体基因组DNA序列差异来鉴定品种。

基金项目:黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”(HNK2019CX22-11)

通信作者:冷春旭

DNA分子标记多态性的产生是由于DNA分子出现插入、缺失、倒位、异位、重排和置换等排列造成的核苷酸差异。与传统形态标记、生化标记相比,具有分布广、多态性高、准确性高、操作快速简便、不受外界环境影响等优点。目前分子标记技术已成为作物纯度和真实性鉴定应用最广泛的技术。

1 分子标记技术的发展历程

分子标记技术是以DNA多态性为基础的一种遗传标记,为农作物种子质量分析提供了更为准确、可靠、方便、快捷的方法。分子标记的发展经历了从以Southern杂交为基础的第1代限制性

广西种植生产的鲜食玉米速冻果穗或是加工产品,还是以品种推广、育种研究的交流合作,与东南亚各国的合作意向以及实现难易程度来说,阻力都是较少的。在地理位置上广西具备先天优势,在经贸合作基础上广西与东南亚各国贸易历史悠久,广西鲜食玉米生产种植产业,需要在“一带一路”建设当中寻找契机,打造品牌,把握出口良机,挖掘市场潜力,争取成为西南地区甚至是全国最具影响力的鲜食玉米种植基地。

参考文献

- [1] 徐丽,赵久然,卢柏山,史亚兴,樊艳丽.我国鲜食玉米种业现状及发展趋势.中国种业,2020(10):14-18
- [2] Bandeira C M, Evangelista W P, Gloria M B A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1355-1359
- [3] 史亚兴,张保民.鲜食玉米的发展与前景——探索我国甜玉米的北方市场.蔬菜,2016(12):1-6
- [4] 严一民.“一带一路”重点布局18省(区、市)15港口.港口经济,2015(4):62-62
- [5] 时成俏.广西玉米生产发展历程、存在问题及对策.中国种业,2019(4):24-29
- [6] 钟昌松,唐照磊,黄梅燕,侯青光,黄春东,韦德斌,劳赏业,陈辉云,张述宽.广西鲜食玉米产业现状和发展前景探讨.广西农学报,2019,34(3):63-67
- [7] 时成俏,黄安霞,王兵伟,覃永媛,覃嘉明.广西鲜食玉米产业发展现状及对策.广西农业科学,2010,41(9):1011-1013
- [8] 佟屏亚.世界蔬果玉米生产概况.世界农业,2001(11):23-24
- [9] 赵久然,卢柏山,史亚兴.“京科糯2000”等系列糯玉米品种选育及种质创新.中国科技成果,2011(11):72-73
- [10] 史亚兴,徐丽,赵久然,卢柏山,樊艳丽.中国糯玉米产业优势及在“一带一路”发展中的机遇.作物杂志,2019(2):15-19
- [11] 郑加兴,覃嘉明,覃永媛,王兵伟,黄安霞,时成俏.鲜食甜糯玉米桂甜糯525越南鉴定表现.中国种业,2019(6):87-89
- [12] 黄安霞,时成俏,王兵伟,覃永媛,覃嘉明,郑加兴.国审优质高产加甜糯玉米品种桂甜糯525选育研究.种子,2019,38(2):112-115

(收稿日期:2022-01-05)

片段长度多态性(RFLP, Restriction fragment length polymorphism)标记到以PCR反应为基础的2代随机扩增多态性(RAPD, Random amplified polymorphic DNA)、扩增片段长度多态性(AFLP, Amplified fragment length polymorphism)、简单重复序列(SSR, Simple sequence repeat)和以测序为基础的第3代单核苷酸标记(SNP, Single nucleotide polymorphism)。

1.1 RFLP 技术 RFLP作为第1代分子标记于1980年被Bostein等^[1]发现,其原理是限制性内切酶识别并切割基因组DNA,经PAGE电泳后,应用特定探针进行Southern杂交,最后通过放射自显影获得RFLP图谱。RFLP标记具有稳定性高和共线性强等优点,但是随着PCR技术的诞生和发展,RFLP逐渐被淘汰,目前已不再应用该技术。

1.2 RAPD 技术 RAPD技术是以PCR为基础发展起来的第2代分子标记技术,于1990年被Welsh等^[2]发现,其原理是利用单一随机引物将基因组中存在的重复序列之间的片段进行PCR扩增,产物经凝胶电泳及染色即可显示多态性。与第1代RFLP标记相比具有通用性强、成本低和检测方便等优点,而RAPD的缺点是反应条件敏感,稳定性和重复性差,无法用于基因分型。

1.3 AFLP 技术 AFLP标记是在RFLP和RAPD标记技术基础上发展起来的技术,于1993年被Zabeau等^[3]发明,其原理是利用限制性内切酶切割基因组DNA后,酶切片段在T4连接酶的作用下与特定的接头连接,最后进行预扩增和选择性扩增,产物经电泳及染色显示多态性。AFLP标记综合了RFLP和RAPD两种标记技术的优点,具有样品需求少、稳定性高、可靠性好且多态性高等特点,缺点是试验费用高、对DNA的质量要求较高。

1.4 SSR 技术 SSR也称为微卫星序列,是以1~6个碱基为基序,经过串联重组而组成的DNA序列,广泛存在于植物基因组^[4]。其原理是利用SSR两侧的保守序列为模板,设计特异引物,当SSR重复的次数不同或者不完全重复时,经PCR扩增及电泳分离,即可获得该位点的多态性。SSR标记的优点是多态性丰富,稳定性和重复性好,且为共显性标记,可用于基因分型,缺点是开发成本高、费时费力。

1.5 SNP 技术 SNP是在SSR标记基础上发展的第3代分子标记,于1996年由Eric S. Lander等发明,

SNP是指不同生物个体DNA序列中单碱基差异,包括单个碱基的插入、缺失、转换和颠换等类型^[5]。其原理是利用特异性的引物对某一基因进行PCR扩增,检测SNP位点信息,进行基因分型。SNP分子标记技术具有遗传稳定性高、分布均匀、数量多、通量高、检测快和可实现自动化等优点,缺点是易出现假阳性、成本高,且必须在全基因组测序的基础上进行分析。

2 分子标记在农作物种子检测中的应用

分子标记技术直接以种子DNA作为研究对象,弥补和克服了传统农作物种子鉴定方法的不足,具有不受环境条件影响、操作简便快捷、数据稳定可靠等优点。近年来,在农作物种子质量检测中越来越受到重视。RFLP标记因为DNA用量大,技术复杂且检测过程中需要放射性同位素不便操作,所以不适合快速检测种子纯度和品种的真实性;RAPD标记由于引物筛选工作量大,多态性不足,对品种的鉴定难度大,导致该标记很少应用到大规模的种子鉴定中;AFLP标记兼具PCR的高效性与RFLP的可靠性,多态性强,可分析较大基因组作物,非常适合鉴定作物品种的真实性和纯度,但是操作程序复杂,需要很高的实验技能和精密的仪器,因此很难在作物种子质量鉴定中普及推广;SSR标记既有RFLP的遗传学优点,又比RAPD的可信度高,还比AFLP标记操作简单、稳定性好,已成为可高效准确检测种子纯度和真实性的热点技术。2014年我国颁布了水稻、玉米、大豆3个作物的品种鉴定技术规程—SSR分子标记法的农业行业标准。SNP标记具有重复性好、覆盖面广、遗传稳定性强等优点,特别适合亲缘关系较近和遗传背景复杂的品种鉴定,尤其适合大量样本检测,在种子质量检测中越来越受到重视,拥有广阔的应用前景。

2.1 分子标记应用于种子真实性检测 种子的真实性是指一批种子所属品种、种或属与该品种审定时所描述的内容是否一致,是衡量种子质量的指标之一。品种真实性鉴定包括真实性验证和真实身份鉴定,真实性验证是把待测样品与对应的标准样品比较,检验两者是否相同;真实性身份鉴定是将待测样品与DNA指纹数据库比对,确定样品的品种名称。传统鉴定种子真实性的方法主要是田间种植鉴定和蛋白质电泳等,而分子标记以DNA多态性为基

础,比传统鉴定方法更加快速高效,已广泛应用于种子真实性检测。

李雪等^[6]利用40对SSR引物和3072个SNP位点对11套玉米杂交种和亲本进行鉴定,结果表明SSR和SNP在种子真实性鉴定方面具有较好的一致性;陈广凤等^[7]利用SNP分子标记对205份小麦进行基因分型,结果表明SNP标记在检测种子真实性、位点稳定性、品种区分能力以及遗传关系分析等方面准确可靠、快捷有效。进行真实性身份鉴定须建立DNA指纹数据库,2010年农业部启动玉米、水稻、小麦、棉花、大豆等主要农作物标准样品的征集工作,为标准样品DNA指纹库的构建提供了可靠的样品^[4]。王风格等^[8]利用40对SSR核心引物对3998份玉米审定品种标准样品构建了DNA指纹图库,建立了玉米品种标准指纹比对服务平台。

2.2 分子标记技术应用于种子纯度检测 种子纯度是衡量种子质量的另一个重要指标,也是影响作物品质和产量的关键因素。据统计,玉米种子纯度合格率每下降1%,产量下降3%^[9]。种子纯度鉴定包括田间鉴定法、生化标记法以及DNA分子标记法,其中分子标记法因其具有准确性高、稳定性好和重复性强等优点而广泛应用于作物自交系和杂交种纯度鉴定。

Smith等^[10]利用RFLP鉴定了78个玉米杂交种的纯度,Shimomura等^[11]研究发现2对SSR引物可区分10个日本主栽草莓品种,Tommasini等^[12]利用3组SSR引物区分10个油菜品种。吴明生等^[13]发现1个SNP多态性位点可将2个杂交玉米品种中混杂的亲本区分出来,匡猛等^[14]从63K的棉花全基因组芯片中应用KASP技术选出26个杂合率高且分型效果理想的SNP核心位点,进行棉花杂交种纯度检测。研究表明,SNP检测种子纯度灵敏度更高,能将亲缘关系较近和遗传关系复杂的品种明确区分出来,特别适用大量样品检测。

3 展望

分子标记技术与传统检测方法相比具有快速、准确,不受环境影响等优点,目前已广泛应用于作物种子检测,大大提高了鉴定的效率,有效保障了种子的真实性和纯度,为实现农业安全生产,促进种业市场规范发展,推动农民增收贡献了力量。随着分子

标记技术的发展,更多高效的新型分子标记将逐步被挖掘,种子检测体系也将不断地完善和成熟,为打击非法套牌及制售假劣种子提供了科技支撑,保障了我国的粮食安全。

参考文献

- [1] Botstein D R, White R L, Skolnick M H, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3): 314-331
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213-7218
- [3] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA finger printing: *Europeau*, No. 05344858A1. 1993
- [4] 沈仁飞. SSR分子标记及其在玉米真实性鉴定上的应用. *云南农业科技*, 2018 (5): 36-38
- [5] 李巧英, 郑戈文. SNP分子标记技术在农作物种子检测中的应用. *中国种业*, 2019 (11): 16-17
- [6] 李雪, 田红丽, 王风格, 赵久然, 李云伏, 王蕊, 杨扬, 易红梅. SSR和SNP两种标记技术在玉米品种真实性鉴定中的比较分析. *分子植物育种*, 2014, 12 (5): 1000-1004
- [7] 陈广凤, 田纪春. 基于SNP标记小麦自然群体遗传多样性及复合图谱的构建. *分子植物育种*, 2015 (7): 1441-1449
- [8] 王风格, 赵久然, 田红丽, 杨扬, 易红梅. 农作物品种DNA指纹库构建研究进展. *分子植物育种*, 2015 (9): 2118-2126
- [9] 李晶, 王雅琳, 尹祥佳. 分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用. *现代农业研究*, 2021 (8): 106-110
- [10] Smith O S, Smith J S, Bowen S L, Tenborg R A, Wall S J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F_1 grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80 (6): 833-840
- [11] Shimomura K, Hirashima K. Development and Characterization of simple sequence repeat (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Dnch.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2006, 75 (5): 399-402
- [12] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, Cooke R, Donini P, Lee D, Law J, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards K. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106 (6): 1091-1101
- [13] 吴明生, 赵海艳, 宋歌, 律宝春. 利用TaqMan-SNP基因分型技术快速鉴别玉米杂交种与其亲本. *种子*, 2015, 34 (1): 117-119
- [14] 匡猛, 王延琴, 周大云, 马磊, 方丹, 徐双娇, 杨伟华, 魏守军, 马峙英. 基于单拷贝SNP标记的棉花杂交种纯度高通量检测技术. *棉花学报*, 2016, 28 (3): 227-233

(收稿日期: 2021-12-16)