

玉米杂交种、自交系鉴定技术的 研究进展(综述)^①

余建华^② 廖树华 宋同明 刘 岩
(植物遗传育种系)

摘 要 系统阐述了玉米品种鉴定技术的产生、发展及研究现状。由于种子科学技术的发展及相关学科的渗透,玉米品种鉴定技术在近期内已由传统的形态学和化学方法发展到了现代的各种电泳技术,包括醇溶蛋白的等电聚焦电泳(zein-IEF)、同工酶电泳(isozyme electrophoresis)、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、酸性系统下聚丙烯酰胺凝胶电泳(acidic-PAGE)等。此外,许多学者还进行了分子标记技术(如RFLP与RAPD等)、色谱分析及映像分析等方面的探讨。

关键词 玉米; 研究进展; 品种鉴定; 电泳技术

中图分类号 S330; S513

Advance in Identification Technology of Maize Hybrids and Inbreds (Review)

Yu Jianhua Liao Shuhua Song Tongming Liu Yan
(Dept. of Plant Genetics & Breeding)

Abstract This paper systematically reviewed the history and current status of seed identification technology of maize cultivars. Following the rapid development of seed science and the continuing introduction of biochemical means, the technology had been developed from traditionally morphological and chemical procedures to different kinds of modern electrophoretic techniques, such as zein-IEF, isozyme electrophoresis, SDS-PAGE, acidic PAGE etc. The molecular marker (RFLP and RAPD etc.), the chromatography, and the image analysis had also been exploited by some researchers.

Key words maize; research advance; varietal identification; electrophoresis

种子不仅是农业生产的源泉,也是世界贸易的重要组成部分。近年来,种子经营部门片面追求利润,但管理与立法工作不完善,每年都有大量伪劣种子冲击市场,给国家与农户造成了极大损失。玉米种子纯度在国家标准附近每下降1%,将造成减产 $241 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,即3%左右^[1]。若以我国2 000万 hm^2 玉米种植面积计,如所有种子纯度下降1%,则每年玉米将

收稿日期: 1997-06-14

①国家自然科学基金资助项目 39470470

②余建华,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

减产约 50 亿 kg。玉米品种的鉴定和纯度控制,对于杂交种生产、自交系保纯、种子贸易以及品种保护等都具有十分重要的意义。

1 种子检验技术的产生

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)建立了世界第一个种子试验室。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 年改名为国际种子检验协会(ISTA)。

2 玉米品种鉴定技术的发展

2.1 形态学鉴定

2.1.1 幼苗及成株形态检验 这种方法常在材料典型性表现最明显的时期进行,一般包括苗期、花期和成熟期。其依据是不同材料因其遗传组成不同,在生长发育的不同时期,材料之间在植株性状、穗部性状和果实性状等方面存在差异。具体可分为两种,一是指在种子收获之前,直接到种子繁殖田根据形态学特征对生产种子的材料和未来种子的质量进行鉴定。另一种是在种子收获后将取样种子种下,观察株间性状的一致性。我国北方各种子公司一般是秋季将种子收获,冬季到海南岛种植进行检验。幼苗及成株形态检验方法虽然应用较多,但存在以下缺点:①耗费大量人力、物力和财力,到海南岛种植检验 200 粒种子大约要花 300 元人民币^[2];②受环境因素影响大,主要因观察的性状一般受数量基因所控制,环境胁迫可能会掩盖特别的形态性状而导致田间检验通常不准确^[3];③与观察者经验有很大关系,结果往往不可靠,误差率常在 20%左右;④现代种子贸易常常是快节奏和高效率的,但这种方法花费时间长(约半年),因此对农业生产及种子贸易指导性不大;⑤不能鉴定不能发芽的种子。

2.1.2 室内种子形态学鉴定 这种方法指的是根据种子的形状、大小、颜色、光泽、花粉直感、质地、种皮等形态特征,并以标准样品作参照对品种进行鉴定。如果从外部形态无法区分,可将种子解剖以观察内部结构。其缺点仍然是可靠性差,特别是难以鉴别外来花粉引起的生物学污染。

2.2 化学方法鉴定

这种方法在玉米中报道较少,在其他作物中较多。如麦类、水稻种子的石碳酸(苯酚)法。其主要原理是种子表皮上有酚酶的存在,经石碳酸处理后,其果(种)皮或稃壳被氧化成不同程度的褐色。据此,可按颜色的差异来鉴定品种。此外,还有大豆种皮过氧化物酶显色法,高粱种子氢氧化钾—漂白剂测定法,以及一些牧草种子特有的染色法。Brink^[4]报道用单克隆抗体与玉米醇溶蛋白作用的化学免疫技术很有潜力替代 Zein-IEF 技术;如果需要的专一性抗体能制备,这种技术将降低遗传纯度检验的成本,增加检测量。

2.3 电泳技术鉴定

2.3.1 电泳技术的产生 1959 年德国生化所的 Raymand 引入了电泳技术。1961 年该所的

H. Stegemann 博士开始利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对马铃薯块茎组织蛋白质谱带类型进行了研究,不仅发展了马铃薯块茎组织蛋白质电泳技术,而且分析了欧洲全部马铃薯品种的蛋白质谱带类型,发现在马铃薯地方品种基因库里有 10 000 个不同的特征图谱,并编写了马铃薯品种蛋白质谱带鉴定的检索表和手册。以后,美国先锋种子公司的 Smith 与农业部的 Willson,以及我国的颜启传等在运用电泳技术鉴定玉米杂交种和自交系方面做了大量工作。目前,全世界已用电泳技术对 20 多种作物进行了探讨。

2.3.2 玉米杂交种、自交系鉴定的主要电泳技术

2.3.2.1 醇溶蛋白的等电聚焦电泳(Zein-IEF) 玉米醇溶蛋白(Zein)是玉米种子的主要贮藏蛋白。它是由分子量相似但等电点不同的许多蛋白质组成^[5]。SDS-PAGE 可将 Zein 分离出了四条带,其中有两条主带 Z19 和 Z22,分子量分别为 19 000 道尔顿和 22 000 道尔顿^[6]。Zein 分子的中间部分氨基酸是重复的,由第 4 和第 7 条染色体上的重复基因编码^[7]。由于 Zein 的遗传控制简单,故多态性有限。但因其等电点不同,所以 IEF 是分离 Zein 最好的电泳方法^[8]。国外已有用 IEF 来鉴定玉米品种的不少报道。Turner^[9]首次用淀粉凝胶得出 Zein 在 IEF 下会显示出差异性;Hagen^[10]用 IEF 将 Zein 分离成了 15 种成分;Wilson^[11]用双向 IEF 将 Zein1 与 Zein2 分离出了 22 条带;Brink^[12]发现:Zein 的 IEF 与同工酶在玉米种子鉴定方面结果差不多,但用 Zein 的 IEF 第 10 带却能鉴别出同工酶很难鉴别出的四个组合。而且第 10 带可鉴别出 397 个组合的 37%;孔径大的琼脂糖凝胶 IEF 方法来分离 Zein 比 PAGE 安全而且效果好^[13,14];Wall^[15]用双向 IEF-PAGE 研究发现:Zein 的分析对鉴定玉米自交系很有用,可是难免出错,建议用其他种子蛋白成分来提高电泳鉴别玉米自交系的能力;Wang^[16]指出:Zein-IEF 谱带不能充分鉴别杂交种与母本系间的差异,因为有时父本的带型是母本带型的一部分,杂交种是父母本带型的累加,这样母本与杂交种带型就没有差别,在这种情况下,Zein-IEF 不能用于鉴别纯度。除此之外,Zein-IEF 使用的两性电解质十分昂贵,测 104 粒种子需 20 美元的化学药品^[4]。许多研究者还用 SDS 分析 Zein,由于 SDS-PAGE 无法将电荷不同而分子量相同的蛋白质分开,而 Zein 的多态性在于电荷的不同,所以大家得出的结果相似:只能将 Zein 分离出两条主要带及几条小带^[10,17,18],至今未见将此方法用于品种鉴定方面的报道。

2.3.2.2 同工酶电泳 同工酶(isoenzyme),即酶的多分子形式,是指那些催化性质相同而分子结构有差异的酶蛋白分子,在高等植物中普遍存在。同工酶与一般蛋白质一样,是基因表达的直接产物。因此,不同种属或不同品种的基因组成差异有时会反映在同工酶谱带上。用同工酶来鉴定品种,研究起源、进化与分类,已有相当长的历史。同工酶鉴定玉米自交系和杂交种是目前应用最多的室内方法。自交系和杂交种等玉米群体中,许多同工酶位点具有多态性^[19];Goodman 与 Stuber^[20]利用同工酶电泳鉴定出了 42 个自交系的 86%;Cardy 等^[21]用淀粉凝胶电泳分析了几种同工酶的 22 个基因座位,发现 110 个自交系的 80%,155 个商品杂交种的 94%具有独特的特征或“指纹”;Orman 等^[22]在三个不同实验室中比较了淀粉凝胶同工酶电泳鉴定与形态学鉴定,发现在鉴别生物学混杂(outcross)时,同工酶凝胶电泳鉴定的准确程度是形态学观察的 1.6 倍。在检测机械混杂(off-type)时,同工酶的准确性是形态学观察的 4 倍;不用传统方法即提取胚芽鞘中的酶,而提取授粉 2,4,6 周后胚中的酶进行电泳,也可用于玉米品种鉴定^[23];Smith 改进了 Cardy 等人创立的同工酶电泳技术^[24],并

发现利用同工酶电泳和反向液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography)技术各自只能鉴别出 85% 的玉米自交系,对一些亲缘关系很近的材料,它们都无能为力,所以建议将两者结合起来^[25]。他还用几种方法检测纯的杂交种中人为掺杂的自交系种子,结果发现:苗期形态学鉴定最不准确,成熟期形态学鉴定次之,同工酶电泳最接近真实^[26];Turgut^[27]用淀粉凝胶分析玉米单交种的 5 种同工酶,证明只有 4 种同工酶具有多态性,而且有两个杂交种带型完全一样。总之,同工酶电泳技术推动了玉米品种鉴定的发展,但还存在一些问题。第一、它只能鉴别出亲缘关系较远的自交系或杂交种,鉴定出自交系的概率只有 80%~85%。第二、同工酶存在着组织或器官的特异性。在不同发育时期或不同组织,同工酶数目和类型不一样。所以,必须采用相同的发育时期,位于相同部位的材料,结果才可靠。可是杂交种或自交系要得到同步发芽的材料是非常困难甚至是不可能的^[16]。第三、染色是检测与底物生成的产物,方法繁琐,药品昂贵。第四、酶属活性蛋白质,为防止其失活,在操作过程中需在低温下进行,否则会得出错误的结论。

2.3.2.3 SDS 电泳技术及谷蛋白分离 SDS 是一种很强的阴离子表面活性剂。它可将蛋白质变性,引入净电荷以降低或消除蛋白质所带电荷对迁移率的影响,并使蛋白质变成椭圆或棒状结构,从而也消除了蛋白质天然形状不同对迁移率的影响。SDS-PAGE 可用于分析玉米种子蛋白,不同系间存在不同带型^[16];Schnick 与 Stegemann^[28]发现,无论用单向或双向 PAGE,他们实验所用的所有自交系和杂交种的清蛋白和球蛋白都存在着差异性;Koranyi^[29]用 SDS-PAGE(SDS 梯度凝胶电泳)来分离种子盾片蛋白(scutellar protein),发现该方法速度快、重复性好、易操作,有的材料分离出了 60 多条带,能鉴别一些同工酶无法鉴别出的材料;但 Wang^[16]使用 SDS-PAGE,只观察到杂交种和其亲本的种子蛋白间几条带量上的差异。玉米种子中存在的盐溶蛋白和谷蛋白只有少数带型是共同的^[11]。谷蛋白很难操作,主要因提取谷蛋白的碱溶液容易使之降解,也很难提取,可能因有些谷蛋白本身不易溶解,另一些谷蛋白在玉米成熟的最后阶段或在研磨与提取过程中变成了不易溶解物质的缘故^[11]。如果提取谷蛋白时加入尿素,SDS-PAGE 就会分离出较多蛋白质^[11,16]。SDS 电泳的缺点是反映不出蛋白质等电点和分子天然形状的不同。

2.3.2.4 酸性系统下凝胶电泳 酸性系统的凝胶电泳已广泛应用于小麦等其他作物。1986 年国际种子检验协会(ISTA)正式批准了英国人创立的小麦、大麦聚丙烯酰胺凝胶电泳标准参照方法^[30],并在世界范围内推广。在玉米上,pH3.1 的 $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度尿素-乳酸铝 PAGE 可将 α Zeins 分成 9 个组分^[31],而且用该系统可分离醇溶谷蛋白(alcohol-soluble glutalin)^[32]。第一个成功报道在酸性系统下鉴定玉米杂交种纯度的是 Wang 用酸性乳酸钙凝胶聚丙烯酰胺梯度电泳(acidic calcium lactate Poro-PAGE)来分离 $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度尿素提取的蛋白(主要是清蛋白和球蛋白),他还将该方法和 SDS-PAGE 及 IEF 等进行了比较,认为这种方法是最好鉴定玉米杂交种纯度的方法^[16]。张春庆等^[33]对十几种条件和 34 种提取液进行了分析,提出一种高效、快速、准确的不连续醋酸尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳(NAU-PAGE)技术,用于品种纯度分析。宋同明等^[34]与 Wang Chun 等^[35]提出用聚丙烯酰胺凝胶电泳在酸性条件下来分离清蛋白和球蛋白(盐溶蛋白),从而简化了电泳程序。经过多年的实践,他们一致认为,这种方法具有分辨率高、重复性好、操作简便、快速和经济等特点。Zein-IEF 分析 104 粒种子需 20 美元的化学药品^[4],而该技术分析 400 粒种子只需 3 美元^[35],而且用的是

种子活性蛋白与贮藏蛋白两种成分,并克服了同工酶等各种技术的缺点,是当前最好鉴定玉米品种的方法之一。

2.4 分子标记技术

无论形态性状、化学或生理生化性状,均为个体基因表达的产物。利用这些性状鉴定与区分品种,只是分析品种间遗传物质表达方面的差异。其次,这些性状通常只表现在植物生活周期某一阶段,根据它们来鉴定品种也只能局限在这一阶段。再次,有些亲缘关系密切的品种难以通过种子贮藏蛋白或同工酶电泳加以区别。分子生物学的发展,使人们能够用分子标记技术直接探讨DNA的差异来鉴定玉米品种。分子标记技术主要有RFLP(restriction fragment length polymorphism,限制性片段长度多态性)技术和RAPD(random amplified polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)技术。

玉米中存在丰富的限制性片段长度多态性,这种多态性具有高度的品种特异性,即使在亲缘关系很近的杂交种和自交系间也如此。因此,RFLP可以作为玉米杂交种和自交系的DNA“指纹”,用于品种鉴定。它比形态学和生化鉴定更加可靠。Bunce等^[36]用RFLP方法分析了大麦Hor1,Hor2和Hor3三个位点,结果表明RFLP在大麦品种真实性和纯度鉴定方面具有很大潜力。Smith^[37]用38个探针来区分美国78个主要玉米杂交种,其中有许多是通过Zein电泳和同工酶电泳无法区分的,结果表明这些杂交种显示出288个RFLP变异体(variant),但仍有少数杂交种间带型一样或差异太小。1990年,在聚合酶链式反应(PCR)的基础上,产生了一种新的分析DNA多态性的方法,即RAPD技术^[38]。RAPD具有设备简单、分析快速、不需放射性标记等优点。用RAPD技术分析玉米等作物干种子中的DNA,能够揭示品种多态性,而且可避免提取营养体组织中DNA的繁琐^[39]。然而,分子标记技术也具有不少缺点。首先,它需要熟练的技术^[4];其次,这种技术比较费时;再次,它需要特殊的设备。因此,目前难以在种子贸易检测中大量推广使用,还需进一步简化和流水化克服其缺点^[4]。

2.5 其他方法

用于玉米品种真实性和纯度鉴定的报道还有:色谱分析(气相色谱、液相色谱^[25]、薄层色谱)、荧光扫描、种子籽粒形状机器识别^[40]、映像分析等。这些技术因结果不可靠或仪器设备昂贵,所以应用有限。

3 结语

玉米品种鉴定技术在近几十年内已由直观的形态学鉴定发展到了分子水平的分子标记技术。其根据都是各个杂交种或自交系间基因型呈现多态性,只是在不同水平上反映而已。形态学是在表型水平上,电泳技术是在蛋白或酶水平上,分子标记技术是直接在DNA水平上。形态学鉴定时间长、准确性差、浪费大量人力、物力和财力。电泳技术现已广泛应用,主要用Zein-IEF电泳和同工酶电泳。Zein-IEF提供谱带信息量少,两性电解质太贵,而同工酶也存在诸多缺点。分子标记技术最直接、最准确反映品种或自交系间遗传差异,但目前还处于探索阶段,而且存在技术复杂,成本高等不利因素,暂时难以在种子贸易中推广,经简化或流水化后可能会有广阔的发展前景。尽管到现在为止ISTA在玉米上还未提出一种标准参

照技术,我们认为,酸性系统下聚丙烯酰胺凝胶电泳分离盐溶蛋白电泳技术^[34,35]是目前较好的鉴定玉米杂交种和自交系的方法。它适合种子贸易快节奏的特点,集准确、快速、有效、经济、简单等优点为一体,是当前最好的鉴定玉米品种的方法之一。

参 考 文 献

- 1 王景升,赵增煜. 种子纯度对作物产量的影响. 种子世界,1986,(10):12~16
- 2 杨太兴,贾希海,李仁凤. 同工酶电泳技术在品种纯度检验中的应用研究. 种子,1991,(6):1~5
- 3 McDonald M B. Challenges in seed technology. In: Burriss J S ed. Proc 10th Ann Seed Technol Conf, Iowa State Univ, Ames, IA. 1988, 11~32
- 4 Brink D E, Price S C, Martinez C. Monoclonal antibodies against zeins. Seed Sci and Technol, 1989, 17: 1~6
- 5 Righetti P G, Bosisio A B. Applications of isoelectric focusing to the analysis of plant and food proteins. Electrophoresis, 1981, 2: 65~75
6. Righetti P G, Gianazza E, Viotti A, Soave C. Heterogeneity of storage proteins in maize. Planta, 1977, 136: 115~123
- 7 Argos P, Pedersen K, Marks M D, Larkins B A. A structural model for maize zein proteins. Journal of Biological Chemistry, 1982,257(17):9 984~9 990
- 8 Cook R J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. Electrophoresis, 1984, 5: 59~72
- 9 Turner J E, Boundy J A, Dimler R J. Zein, a heterogeneous protein containing disulfide-linked aggregates. Cereal Chem, 1965, 42:452
- 10 Hagen G, Rubenstein I. Two-dimensional gel analysis of the zein proteins in maize. Plant Science Letters, 1980, 19:217
- 11 Wilson C M. Maize endosperm proteins compared by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and isoelectric focusing. Cereal Chem, 1981, 58(4):275~281
- 12 Brink D E, Price S C, Nguyen H, Fuerst G, Martinez C. Genetic purity assessment of commercial single cross maize hybrids: isoelectric focusing of zeins. Seed Sci and Technol, 1989, 17(1): 91~98
- 13 Wilson C M. Isoelectric focusing of zein in agarose. Cereal Chem, 1984, 61(2): 198~200
- 14 Wilson C M. A nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Cereal Chem, 1985, 62(5): 361~365
- 15 Wall J S, Fey D A, Paulis J W. Improved two-dimensional electrophoretic separation of zein proteins: application to study of zein inheritance in corn genotypes. Cereal Chem, 1984, 61(2):141~146
- 16 Wang Hongxin, Niu Zhanqi, Hu Zhi'ang. Electrophoretic study on seed proteins of maize hybrids and inbreds. J Chinese Bot, 1989, 1(2): 139~144
- 17 Lee K H, Johns R A, Dalby A, Tsai C Y. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. Biochem & Genet, 1976, 14: 641~650
- 18 Soave C, Righetti P G, Lorenzoni C, Gentinetta E, Salamini F. Expressivity of the opaque-2 gene at the level of zein molecular components. Maydica, 1976, 21:61~75
- 19 Hamrick J L. Genetic Variation and Longevity. New York: Columbia Univ Press, 1978, 84~107
- 20 Goodman M M, Stuber C W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. Annu Corn and Sorghum Conf Proc. Washington D C: America Seed Trade Assosiation, 1980, 35: 10~31

- 21 Cardy B J, Kannenberg L W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids; applications for cultivar identification. *Crop Science*, 1982, 22: 1 016~1 020
- 22 Orman B A, Lawrance G D, Downes P M, Phillips D S, Ripberger C J. Assessment of maize inbred genetic purity by isozyme electrophoresis. *Seed Sci and Technol*, 1991, 19: 527~535
- 23 Smith J S C. Isozyme electrophoresis in developing embryos of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 1984, 29: 175~184
- 24 Smith J S C, Weissinger H. Rapid monitoring of purity in seed lots of hybrid maize; modifications of current technologies. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1984, 2: 103~105
- 25 Smith J S C. Biochemical fingerprints of cultivars using reversed-phase high performance liquid chromatography and isozyme electrophoresis; a review. *Seed Sci and Technol*, 1986, 14: 753~768
- 26 Smith J S C, Wych R D. The identification of female selfs in hybrid maize; a comparison using electrophoresis and morphology. *Seed Sci and Tech*, 1986, 14(1):1~8
- 27 Turgut I. Study of the possibilities for identification of Turkish single-cross maize hybrids by starch gel electrophoresis. *Seed Abstract*, 1994, 3245
- 28 Schnick D, Stegeman H. Identification of inbreds and mutants of maize by one and two-dimensional electrophoresis. In: Abstracts of 2nd Internat Symposium; Cultivar Identification and Evaluation. D-3300 Braunschweig, F R Germany, 1985, 5~9
- 29 Koranyi P. Characterization of maize (*Zea mays* L.) seed samples by the electrophoretic patterns of their protein monomers. *Seed Sci and Technol*, 1989, 17: 153~159
- 30 Draper S R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983~1986. *Seed Sci and Technol*, 1987, 15: 431~434
- 31 Paulis J W. Disulfide structure of zein proteins from corn endosperm. *Cereal Chem*, 1981, 58: 542~546
- 32 Paulis J W. Recent developments in corn protein research. *J Agric Food Chem*, 1982, 30(1): 14~20
- 33 张春庆, 金锡奎, 郑成超, 邓郁金. NAU-PAGE 技术与玉米种子纯度测定. *中国农业科学*, 1995, 28(6):20~24
- 34 Song T M, Zheng D H, Yang Q S, Song G H. Separation of corn albumins and globulins by improved lactate-PAGE procedure. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1993, 67: 12~13
- 35 Wang Chun, Bian Ke, Zhang Huaxiao, Zhou Zhanming, Wang Jiang. Polyacrylamide gel electrophoresis of salt-soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment. *Seed Sci and Technol*, 1994, 22: 51~57
- 36 Bunce N A C, Forde B G, Kreis M, Shewry P R. DNA restriction fragment length polymorphism at hordein loci: application to identifying and fingerprinting barley cultivars. *Seed Sci & Technol*, 1986, 14: 419~429
- 37 Smith J S C, Smith O S. Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among U. S. maize hybrids. *Crop Sci*, 1991, 31: 893~899
- 38 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7 213~7 218
- 39 McDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Sci and Technol*, 1994, 22(1):171~176
- 40 Liao K. Corn kernel shape identification by machine vision using a neural network classifier paper-American society of agri engineer, No. 92-7017. *Maize Abstract*, 1994, 336