



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3297—2012

植物种质资源鉴定方法 玉米的鉴定

Detection and identification of *Zea mays* L.

2012-10-23 发布

2013-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国安徽出入境检验检疫局、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：魏春艳、刘金华、刘阳、徐涛、姚剑、孟庆峰、王伟利、王振华、许瑾、曾宪东。

植物种质资源鉴定方法 玉米的鉴定

1 范围

本标准规定了进出境玉米种质资源鉴定的方法。

本标准适用于进出境玉米种质资源的检测和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 1353 玉米

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14072 林木种质资源保存原则与方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1584 出境玉米检疫操作规程

ASTM E1342 用冷冻、冷冻干燥和低温养护法保存细菌、真菌、原生生物、病毒、遗传要素以及动物和植物组织的保存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

种质 germplasm

亲代通过有性生殖过程或体细胞直接传递给子代并决定固有特性的遗传物质。

3.2

种质资源 germplasm resources

农作物、畜、禽、鱼、草、花卉等栽培植物和驯化动物的人工培育品种资源及其野生近缘种。

3.3

稃 husk

禾本科小穗上的小花,其外面具有两片苞片,在外一片称为外稃,包着的内部一片称为内稃。

3.4

胚 embryo

由卵细胞和一个精子受精后发育而成,是种子内未发育的幼小植物体,包括胚芽、胚轴、胚根和子叶四部分。

3.5

颖果 caryopsis

单粒种子形成的果实,成熟时果皮、种皮不易分离,此为禾本科植物特有的果实。

3.6

叶舌 *ligule*

叶片与叶鞘交界处内侧的膜状突起。叶舌是叶鞘的延长,其大小、形状和毛茸的有无,可作分类依据之一。禾本科的叶舌,常见的有撕裂状叶舌、二深裂叶舌、短叶舌、具睫毛叶舌和长叶舌等。

3.7

叶耳 *falcate*

叶鞘与叶片接连处叶缘两侧的伸延物。常将茎秆卷抱着,末端分离,有时弯曲,多呈耳状或镰刀状。单子叶植物中,部分的禾本科植物具有叶耳,如大麦、小麦、水稻、竹等。在分类上,常根据是否有叶耳,作为区分物种的依据之一。

4 方法原理

玉蜀黍族共有 7 个属,包括荻属(*Coix*)、硬颖草属(*Selerachne*)、多裔黍属(*Polytoca*)、葫芦草属(*Chionachne*)、三裂草属(*Trilobachne*)、玉蜀黍属(*Zea*)、摩擦禾属(*Tripsacum*),其中玉蜀黍属是玉蜀黍族最重要的种属,除栽培玉米亚种外,其他玉米野生近缘材料统称为大刍草。玉米与大刍草在植株和果穗的形态上存在显著的区别(参见附录 A 和附录 B)。玉米进出境时,可能存在的形态有:种子、植株、叶片、花、花粉、胚、组培苗、原生质体、组织、细胞、核酸(基因组 DNA、RNA)等,以形态学方法为主,并借助分子生物学手段作为其分类鉴定的依据,因 IVR 为玉米内源基因,故将其作为分子鉴定的靶标基因。

5 仪器、用具和试剂

5.1 仪器和用具

生物显微镜、体视显微镜、光照培养箱、天平、高压灭菌器、台式高速离心机、pH 计、水浴锅、PCR 扩增仪、电泳仪、生物安全柜、制冰机、组织粉碎机、凝胶成像系统、紫外分光光度计、低温冰箱、研钵、微量加样器(2 μL 、10 μL 、20 μL 、200 μL 、1 000 μL)、离心管、液氮罐等。

5.2 试剂

PCR 反应常用试剂、电泳试剂和核酸分子量标准等,除另有规定外,均为分析纯或生化纯,水按照 GB/T 6682 规定的执行。

6 现场查验

现场查验按照 SN/T 1584 执行。

7 实验室鉴定

7.1 形态学鉴定方法(参见附录 C)

7.1.1 禾本科 *Gramineae* 形态特征

一年生或多年生草本,少数为木本。植株散生或丛生,有地下茎。地上茎特称为“秆”,常为圆形,有明显的节和节间,节间多中空,很少实心。单叶互生,排成 2 列,由叶片和叶鞘组成,在叶片和叶鞘的连接处有时有叶舌和叶耳,叶鞘包围茎秆,常一侧开裂。叶片与叶鞘连接处增厚的部分是叶颈。花小,两

性,稀单性,组成小穗。小穗由一至数朵小花、内颖和外颖组成。由小穗组成穗状花序或圆锥花序。小花由外稃、内稃、浆片、雄蕊、雌蕊组成。雄蕊1~6枚,常为3枚,花丝细长,花药丁字着生。雌蕊由2~3心皮组成,胚珠1枚,柱头羽毛状。果实多为颖果,稀为浆果或坚果。种子具丰富的胚乳,胚乳粉状,占种子的比例大。

7.1.2 禾亚科 Agrostidoideae 形态特征

一年生或多年生草本,秆草质。叶片大多数狭长,披针形或线形,有中脉,通常无叶柄,叶鞘和叶片之间无明显关节,不易从叶鞘脱落。

7.1.3 玉蜀黍属 *Zea* 形态特征

一年生、高大草本。茎实心,叶大,阔而扁平。花单性同株,雄花序生于秆顶,为总状花序式排列的穗状花序。小穗成对,有2小花,一具柄,一无柄。颖有睫毛,内外稃均极薄。雄蕊3,雌花序单生于叶腋内,为粗厚、具叶状苞片的穗状花序,总轴厚,海绵质。小穗有1小花,无柄,密排于圆柱状的总轴上而成多数的纵列。花柱丝状,长突出花序外,顶端短2裂。

7.1.4 玉米形态特征

7.1.4.1 概述

一年生高大草本,秆实心。花单性,雌雄同株。雄花序圆锥状,顶生,每一小穗有2朵小花。雌花序肉穗状,单生叶腋,外有数层苞片,每一小穗有2朵小花,1花结实。雌蕊1枚。颖果。玉米籽粒的颜色有黄白、红紫、黄褐、黑色等,以黄白两色最多,多呈圆形或长方形,有光泽。其籽粒的形态,不同类型和品种之间差异很大,即使来自同一果穗的种子,亦因着生部位的不同,其粒型和大小也很不一致。但其基本构造则是相同的,都包括种皮、胚乳和胚三部分。

7.1.4.2 根的形态特征

玉米根系可分初生根(胚根)、次生根(节根)、气生根(支柱根)。

7.1.4.3 茎的形态特征

玉米茎有明显的节和节间,茎粗自下而上逐渐变细,节间长度逐渐增长,至果位附近为最长,后又递减。茎由表皮、机械组织、基本组织和维管束组成。表皮外有明显的角质层,维管束在茎中星散排列。

7.1.4.4 叶的形态特征

着生在茎的节上,呈不规则的互生排列,分叶鞘、叶枕、叶片、叶舌四部分。

7.1.4.5 花的形态特征

玉米是雌雄同株异花作物,雄穗着生在植株顶端,雌穗着生在叶腋内,又有雄花先熟现象,天然杂交率高达95%以上,是典型的异花授粉作物。雄穗(雄花序)为圆锥花序,由主轴和多行成对小穗组成;雌穗(果穗)为肉穗花序。

7.1.4.6 种子的形态特征

颖果,由种皮、胚乳和胚构成。种皮由外果皮、中果皮、海绵状薄壁组织和管细胞(内表皮)组成。胚乳位于籽实皮以内,占籽实质量的80%~85%,胚乳的外围为糊粉层,其内侧由角质和粉质胚乳组成。胚位于颖果基部的一侧,由胚芽、胚轴、胚根和子叶组成,约占整个籽粒的1/4~1/3,占籽实总质量的

SN/T 3297—2012

10%~15%。

7.1.5 玉米的九种类型

按照玉米籽粒形状、胚乳性质与有无稃壳,将玉米分为九种类型,具体参照 GB 1353。

马齿型(*Zea mays* L. *indentata* Sturt)、半马齿型(*Zea mays* L. *semindentata* Kulesh)、硬粒型(*Zea mays* L. *indurata* Sturt)、粉质型(*Zea mays* L. *amylacea* Sturt)又名软粒型、甜质型(*Zea mays* L. *seccharata* Sturt)又名甜玉米、糯质型又名蜡型(*Zea mays* L. *sinesis* Kulesh)、爆裂型又名麦玉米(*Zea mays* L. *everta* Sturt)、甜粉型(*Zea mays* L. *amylacea-saccharata* Sturt)、有稃型(*Zea mays* L. *tunicata* Sturt)。

7.2 分子鉴定方法

玉米的 PCR 鉴定方法见附录 D,防污染措施应符合 SN/T 1193 的规定。

8 结果判定

以形态特征为主要依据,符合 7.1.1~7.1.4 时可判定为玉米;形态特征不确定时,以常规 PCR 检测结果为依据,若检测结果在 226 bp 处有条带,阴性对照和空白对照无条带出现,可判定为玉米。

9 样品保存和复核

9.1 样品保存

物种资源的样品保存方法按 GB/T 14072 和 ASTM E1342 执行。

9.2 结果记录与资料保存

记录好样品的来源、种类、编号、取样时间、实验的时间、地点、方法和结果等;同时,原始数据应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

9.3 复核

由国家质量监督检验检疫总局植物检疫主管部门指定的单位或人员复核,必要时进行复核实验。

附 录 A
(资料性附录)
玉米及其野生近缘种

A.1 玉米及其野生近缘种的分类

A.1.1 玉米分类地位

英文名: corn, maize

学名: *Zea mays* L.

分类地位: 玉米(*Zea mays* L.)属于禾本科(Grassineae)禾亚科(Agrostidoideae)玉蜀黍族(Maydeae)玉蜀黍属(*Zea* L.),俗称玉蜀黍、苞米、苞谷、玉茭、棒子、玉麦、珍珠米。

A.1.2 玉蜀黍属分类地位

玉蜀黍属内的分类一直变动较大,目前得到公认的是埃特斯(Iltis)和德埃布雷(Doebley)的分类系统。埃特斯和德埃布雷依雄穗分枝和雄小穗外颖的10个数量性状、7个质量性状和雌小穗壳斗的形状将玉蜀黍属分为玉蜀黍亚属和繁茂亚属。

Genus *Zea* (玉蜀黍属)

Section *Zea* (玉蜀黍亚属)

Zea mays (玉米种)

ssp. *huehuetenangensis* (委委特南戈类玉米亚种, $2n=20$)

ssp. *mexicana* (墨西哥类玉米亚种, $2n=20$)

ssp. *parviglumis* (小颖类玉米亚种, $2n=20$)

ssp. *mays* (栽培玉米亚种, $2n=20$)

Section *Luxuriantes* (繁茂亚属)

Zea luxurians (繁茂类玉米种, $2n=20$)

Zea perennis (四倍体多年生类玉米种, $2n=40$)

Zea diploperennis (二倍体多年生类玉米种, $2n=20$)

Zea nicaraguensis (尼加拉瓜类玉米种, $2n=20$)

A.2 玉米及其野生近缘种的分类特征及特性

A.2.1 墨西哥类玉米亚种 [*Zea mays* L. ssp. *mexicana* (Schrader) Iltis]: 又称墨西哥一年生大刍草, 主要分布在墨西哥中部和北部海平面高度大约 1 700 m~2 600 m。墨西哥一年生大刍草为一年生, 自然环境下从种子发芽到成熟大约 4~6 个月, 植株一般 1.5 m~4 m 高, 雄花分枝 10~20 个以上, 雄花序和种子相对玉米种中的其他大刍草较大, 种子呈三角形。

A.2.2 小颖类玉米亚种 (*Zea mays* L. ssp. *Parviglumis* Iltis and Doebley): 也称为墨西哥一年生大刍草, 主要分布在墨西哥西部海平面高度大约 400 m~1 800 m。它为一年生特性, 自然环境下从种子发芽到成熟大约 6~7 个月, 植物具有典型的微红渐绿色特征, 鞘无毛, 植株一般 2 m~5 m 高。其雄花颖苞较小, 但雄花分枝数多, 通常超过 20 个分枝。种子相对较小, 呈三角形。

A.2.3 委委特南戈类玉米亚种 [*Zea mays* L. ssp. *Huehuetenangensis* (Iltis and Doebley) Doebley]: 又

称为委委特南戈大刍草,主要分布在危地马拉西部海平面高度 900 m~1 650 m。它为一年生特性,具有较长的生命周期,区别于玉米种中的其他大刍草,自然环境下从种子发芽到成熟大约需要 7~8 个月。由于生命周期相对较长,该材料比其他大刍草植株要高,植株一般高 5 m,其雄花形态与小颖类玉米亚种极其相似,两者的种子和雄花序相对较小,种子均呈三角形。

A. 2. 4 栽培玉米亚种(*Zea mays* L. ssp. *Mays*)即玉米;又称印地安玉米。起源于墨西哥,现在成为世界第二大粮食作物。栽培玉米与同一亚属的其他 3 个大刍草雄花极其相似,因此把它与小颖类玉米亚种、墨西哥类玉米亚种和委委特南戈类玉米亚种归为同一亚属。但是,玉米与大刍草在植株和果穗的形态上存在显著的区别。

A. 2. 5 繁茂类玉米种[*Zea luxurians* (Durieu and Ascherson) Bird]:又称危地马拉或佛罗里达大刍草,主要分布在危地马拉东南、洪都拉斯和尼加拉瓜海平面高度 1 100 m 以下。为一年生特性,无根状茎,植株一般是 3 m~4 m 高,雄花分枝相对较少(4~20)而直,雄小穗外颖具有许多区别于其他玉蜀黍属材料的细纹,其种子外部呈梯形。它与四倍体和二倍体多年生类玉米种特性具有许多相似的特征和特性。

A. 2. 6 四倍体多年生类玉米种[*Zea perennis* (Hitchcock) Reeves and Mangelsdorf]:又称为多年生大刍草,于 1910 年在墨西哥的哈利斯科洲发现。它主要分布在海平面高度 1 500 m~2 000 m 的狭窄地带,是玉蜀黍属唯一的一个四倍体($n=2x=20$),具有多年生特性,可忍耐重霜冻,在寒冷、潮湿等不利条件下生存多年,具有发达的形似竹鞭的根状茎,植株一般 1.5 m~2 m 高。四倍体多年生大刍草与同属的二倍体多年生大刍草植株与特征、特性及其相似。

A. 2. 7 二倍体多年生类玉米种(*Zea diploperennis* Iltis, Doebley and Guzman):于 1978 年在墨西哥南部哈利斯科洲一个山谷中发现的,分布在海平面高度 1 400 m~2 400 m。二倍体多年生大刍草是该属中唯一的一个二倍体($n=10$)多年生植物,具有发达的根系,根似竹鞭,根茎有很多节,植株一般 2 m~5 m 高。其植物学特征、特性与四倍体多年生大刍草十分相近。

A. 2. 8 尼加拉瓜类玉米种(*Zea nicaraguensis*):是最近发现的一个大刍草种质,生长在地理相对隔离的尼加拉瓜 Fonseca 海湾、海岸线或者出海口。它为一年生特性,植株 2.5 m~4 m 高,叶鞘表面无毛,雄花分枝相对较长而多,并且每个分枝有较多数量的小穗,小穗的外颖具明显的长横细纹,其种子外部呈梯形。尼加拉瓜类玉米种与繁茂玉米种、四倍体和二倍体多年生类玉米种特性具有许多相似的特征特性,它的染色体数目只是最近才得以确认,分类归属还存在争论。

附录 B
(资料性附录)

玉米及其野生近缘种种子形态特征图



图 B.1 玉米(7×)

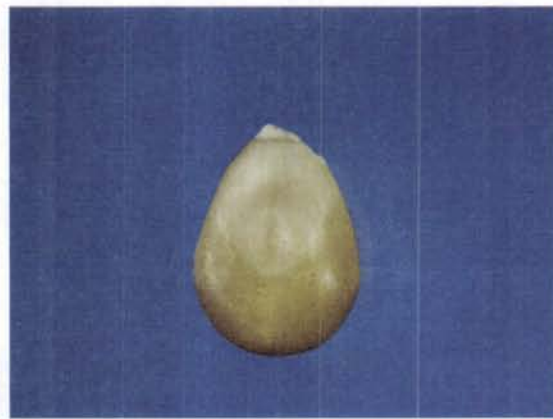


图 B.2 爆玉米(7×)



图 B.3 花粘玉米(7×)



图 B.4 垦粘玉米(7×)



图 B.5 墨西哥类玉米亚种(8×)



图 B.6 四倍体多年生类玉米种(8×)



图 B.7 二倍体多年生类玉米种(8×)



图 B.8 繁茂类玉米种(7×)



图 B.9 摩擦禾(7×)

附录 C
(资料性附录)

玉米及其野生近缘种外部形态特征图



说明：

- 1——玉米秆叶与腋生雌花序；
- 2——顶生雄性圆锥花序；
- 3——雄小穗孪生；
- 4——摩擦草花序分枝，雌花序位于雄花序的下部；
- 5——类蜀黍雌花序为苞鞘所包藏。

图 C.1 玉米及其野生近缘种外部形态特征图(仿张泰利)

附 录 D

(规范性附录)

分子鉴定

D.1 玉米基因组 DNA 提取

称取 2 g 粉样于 10 mL 离心管中,加入 5 mL CTAB 裂解液(含适量 RNA 酶),混匀,65 ℃ 水浴振荡保温 1 h;2 000 r/min 离心 5 min;取上清液,加等体积三氯甲烷/异戊醇(体积比:24/1)混匀,静置 5 min,8 000 r/min,离心 5 min;取上清液,加 0.65 倍体积的异丙醇,混匀,12 000 r/min 4 ℃ 离心 10 min;弃上清液,加 500 μL 70% 冰乙醇洗涤一次,12 000 r/min 4 ℃ 离心 5 min;弃上清液,将沉淀室温晾干,加入 50 μL TE 溶解沉淀,备用(可放于 4 ℃ 冰箱中),此即为总 DNA 提取液。

也可用相应市售 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

D.2 常规 PCR 扩增反应

D.2.1 引物

玉米常规 PCR 扩增引物序列见表 D.1。

表 D.1 引物序列

类 型	名 称	序 列	扩增片段长度/bp
正向引物	IVR1	5'-ccgctgtatcacaaggctggtaac-3'	226
反向引物	IVR2	5'-ggagcccgctgtagagcattgacgac-3'	

D.2.2 反应体系

反应体系见表 D.2。

表 D.2 常规 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	加样体积/μL
样品 DNA	10 ng~50 ng	1
水	—	14.75
5×PCR 缓冲液(含 MgCl ₂)	5×	5.0
dNTP 溶液,10 mmol/L	0.2 mmol/L	2.0
正向引物,10 μmol/L	0.4 μmol/L	1
反向引物,10 μmol/L	0.4 μmol/L	1
Taq DNA 聚合酶,5 U/μL	1.5 U	0.25
注:反应体系中各试剂的量可根据反应体系的总体积进行适当调整。		

D.2.3 反应体系

94 ℃/3 min, 94 ℃/30 s, 62 ℃/30 s, 72 ℃/30 s, 35 个循环, 72 ℃延伸 2 min。

D.2.4 琼脂糖电泳检测

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5% (质量浓度) 配好, 加入 SYBR[®] Green I 核酸染料终浓度为 0.5 μg/mL, 混匀, 制胶。取 PCR 产物 5 uL, 加入上样缓冲液 1 uL, 并用 DL2000Ladder DNA Marker 作相对分子质量标记, 在琼脂糖凝胶上电泳 40 min (100 V), 凝胶成像系统上检查是否扩增出预期大小的目标片段, 拍摄并记录结果。
