



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5130—2019

疣粒稻鉴定方法

Identification of *Oryza granulata* Nees et Arn. ex Hook. f.

行业标准信息平台

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院，中华人民共和国合肥海关，中华人民共和国重庆海关。

本标准主要起草人：宋云、徐晗、宗凯、许瑾、孙涛、陈乃中。

行业标准信息平台

疣粒稻鉴定方法

1 范围

本标准规定了疣粒稻种质资源的检验鉴定方法。
本标准适用于疣粒稻和其遗传材料的检测鉴定。

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,仅所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/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

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

小穗 spikelet

小穗是一个穗状花序,含 1 至多数小花,花生于颖状苞片内,成熟后又称谷粒。小花花被退化为鳞片状、刚毛状、鳞被状。小穗再排成穗状、指状、总状或圆锥状花序。

3.1.2

稃 husk

又称谷壳,麸糠。小穗的一部分,由排列整齐、具有乳头状突起的表皮细胞,又分为:内稃,外稃。

3.1.3

叶舌 ligule

叶片与叶鞘交界处内侧的膜状突起。禾本科植物水稻等具有叶舌。它可使叶片向外倾斜伸出,有利于接受阳光,同时由于它的生长部位,能防止昆虫、病菌、雨水等进入叶鞘筒内。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。

3.1.4

磷酸丙糖异构酶 Triose phosphate isomerase, TPI

磷酸丙糖异构酶是糖酵解过程中催化二羟丙酮磷酸与 3-磷酸甘油醛之间可逆反应的一种异构酶,其催化功能高度保守,其基因分子结构在生物的长期进化中未发生大的改变,在水稻中是单拷贝、直系同源基因,可作为生物遗传分化和分子进化研究中的重要指标。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB:cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵。

PCR:polymerase chain reaction,聚合酶链式反应。

DNA:deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸。

dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷酸三磷酸。

Taq 酶:栖热水生菌 DNA 聚合酶。

4 疣粒稻基本信息

学名:*Oryza granulata* Nees et Arn.ex Hook.f.

分类地位:植物界(Plantae),被子植物门(Angiospermae),单子叶植物纲(Monocotyledoneae),禾本科(Gramineae),稻属(*Oryza*)。

稻属内有 20 余种(参见附录 A)。

5 方法原理

疣粒稻可能以植株、谷粒、核酸等形式出入境。对于植株、谷粒样品,可通过显微镜观察疑似物种的植株、小穗、外稃,根据形态特征(见附录 A、附录 B)进行初步鉴定;对于核酸等无形态特征的样品,根据疣粒稻的 TPI 基因序列特异位点设计引物开展 PCR 检测,进行准确鉴定。

6 仪器设备和试剂

6.1 仪器和设备

液氮罐、纯水机、电子天平、水浴锅、高压灭菌器、高温干燥箱、离心机、电泳仪、PCR 仪、电泳槽、显微镜、扫描电镜、凝胶成像系统、高通量研磨机、涡旋震荡器、可调移液器(1 000 μ L,200 μ L,100 μ L,20 μ L,10 μ L,2.5 μ L)、可调移液器枪头、离心管。

6.2 试剂

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

7 鉴定方法

7.1 形态鉴定

7.1.1 稻属植株形态特征

一年生或多年生草本。秆直立,丛生。

7.1.1.1 叶

叶鞘无毛;叶舌长膜质或具叶耳;叶片线形扁平,宽大。

7.1.1.2 花

顶生圆锥花序疏松开展,常下垂。

7.1.1.3 小穗

小穗含一两性小花,其下附有 2 枚退化外稃,两侧甚压扁;颖退化,仅在小穗柄顶端呈二半月形之痕迹;孕性外稃硬纸质,具小疣点或细毛,有 5 脉,顶端有长芒或尖头;内稃与外稃同质,有 3 脉,侧脉接近边缘而为外稃之 2 边脉所紧握;鳞被 2;雄蕊 6 枚;柱头 2,帚刷状,自小穗两侧伸出。

7.1.2 疣粒稻形态特征(参见附录 A 和附录 B)

多年生草本。有时具短根状茎。秆高 30—70 厘米,压扁,具 5—9 节。

7.1.2.1 叶

叶鞘无毛,长 5—8 厘米,短于其节间;叶舌长 1—2 毫米,无毛,具明显叶耳;叶片线状披针形,长 5—20 厘米,宽 6—20 毫米,上面沿脉有锯齿状粗糙,下面平滑,干时内卷,顶端尖,基部圆形。

7.1.2.2 花

圆锥花序简单,直立,长 3—12 厘米,分枝 2—5 枚,上升,疏生小穗,棱粗糙。

7.1.2.3 小穗

小穗长圆形,长约 6 毫米,约为宽的 3 倍,浅绿色或灰色;颖退化仅留痕迹;内、外稃表面具钩状乳突且周围具疣粒。

7.2 分子生物学鉴定

7.2.1 DNA 提取

按 CTAB 法提取 DNA(详见附录 C)。

7.2.2 PCR 检测

对样品提取的 DNA 进行 PCR 检测(详见附录 D)。防污染措施应符合 SN/T 1193 的规定。

8 结果判定

符合 7.1.1 和 7.1.2 内与样品物态对应的相关描述可初步判定为疣粒稻;样品经符合附录 D 描述的 PCR 检测为阳性,可判定为疣粒稻。

9 样品保存与复核

9.1 样品保存

物种资源的样品保存方法见 GB/T 14072 的规定。

9.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的名称与编号、来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。检测需有最终的实验数据、电泳结果照片等。原始数据应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

9.3 复核

由中华人民共和国海关总署指定的单位或人员负责。主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。

行业标准信息平台

附 录 A
(资料性附录)
稻属主要植物分种检索表

| | |
|--|-------------------------------|
| 1a.小穗短于 2 mm,茎节具毛 | 短粒野稻 <i>O.schlechteri</i> |
| 1b.小穗长长于 2 mm,茎节通常无毛 | 2 |
| 2a.外稃无芒,内、外稃表面具疣粒或钩状乳突 | 3 |
| 2b.外稃具芒或小尖头,无疣粒或钩状乳突 | 4 |
| 3a.内、外稃表面具钩状乳突 | 新喀里多野稻 <i>O.neocaledonic</i> |
| 3b.内、外稃表面具钩状乳突且周围具疣粒 | 疣粒野稻 <i>O.granulata</i> |
| 4a.不孕外稃针状或刚毛状 | 5 |
| 4b.不孕外稃线形或线状披针形 | 7 |
| 5a.一年生,植株矮小,小穗窄于 1.6 mm | 短花药野稻 <i>O.brachyantha</i> |
| 5b.多年生,植株高大,小穗宽于 1.8 mm | 6 |
| 6a.小穗 7.6—12.7 mm 长,不孕外稃是小穗长度的 0.3—0.8 倍 | 马来野稻 <i>O.ridley</i> |
| 6b.小穗 7—8.2 mm 长,不孕外稃是小穗长度的 0.8—1.3 倍 | 长颖野稻 <i>O.longiglumis</i> |
| 7a.小穗具弯型的小穗轴,小穗与枝梗连接处斜形,外稃与芒之间具关节 | 8 |
| 7b.小穗具直型的小穗轴,小穗与枝梗连接处平形,外稃与芒之间不具关节 | 15 |
| 8a.基部叶的叶舌通常短于 10 mm,先端圆形或截平,花序很少具有二次分枝 | 9 |
| 8b.基部叶的叶舌通常长于 10 mm,先端尖形或二裂,花序通常具有二次分枝 | 10 |
| 9a.栽培种,小穗于成熟时宿存,通常无芒 | 非洲栽培稻 <i>O.glaberrim</i> |
| 9b.野生种,小穗成熟时脱落,通常具长芒 | 短舌野稻 <i>O.barthi</i> |
| 10a.一年生或二年生,花药通常短于 2.5 mm | 11 |
| 10b.多年生,花药通常长于 3 mm | 13 |
| 11a.栽培种,小穗于成熟时宿存,通常无芒 | 亚洲栽培稻 <i>O.sativa</i> |
| 11b.野生种,小穗于成熟时脱落,通常具长芒 | 12 |
| 12a.小穗细长,宽度通常小于 2 mm,芒的基部较粗 | 南方野稻 <i>O.meridionalis</i> |
| 12b.小穗较宽,宽度通常大于 2 mm,芒的基部不粗 | 一年生野稻 <i>O.nivara</i> |
| 13a.植株明显具有根茎 | 长雄蕊野稻 <i>O.longistaminata</i> |
| 13b.植株通常不具根茎 | 14 |
| 14a.植株基部的茎易脆断,小穗 6.6—11 mm 长,花药占据小花内 2/3—3/4 的空间 | 展颖野稻 <i>O.glumaeapatula</i> |
| 14b.植株具高位分蘖,小穗 4.5—10.6 mm 长,花药占据小花内的全部空间 | 普通野稻 <i>O.rufipogon</i> |
| 15a.具根茎,花序轴从基部至顶端具刚毛或粗糙 | 澳洲野稻 <i>O.australiensis</i> |
| 15b.有时具根茎,花序轴平滑或具纤毛 | 16 |
| 16a.植株高大,叶片通常宽于 2 cm | 17 |
| 16b.植株相对较小,叶片窄于 2 cm | 19 |
| 17a.不孕外稃几乎等长于可孕花之内外稃 | 大颖野稻 <i>O.grandiglumis</i> |
| 17b.不孕外稃远远短于可孕花之内外稃 | 18 |
| 18a.叶片窄于 5 cm,小穗短于 7 mm | 阔叶野稻 <i>O.latifolia</i> |
| 18b.叶片宽于 5 cm,小穗长于 7 mm | 高秆野稻 <i>O.alta</i> |
| 19a.花序的基部通常具 2 或更多(3—5)长度相近的分枝 | 20 |

19b.花序的基部通常不具轮生的分枝,一般为 1—2 分枝 22

20a.植株通常具短的根茎,芒短于 2 cm 或无 药用野稻 *O.officinalis*

20b.植株丛生,芒通常长于 2 cm 21

21a.一年生,二倍体,植株较高,小穗相对较大 斑点野稻 *O.punctata*

21b.多年生,四倍体,植株较矮,小穗相对较小 非洲野稻 *O.schweinfurthiana*

22a.植株具根茎,花序开展,小穗通常长于 6 mm 根茎野稻 *O.rhizomatis*

22b.植株不具根茎,花序部分开展,小穗通常短于 6 mm 23

23a.植株蔓生或散丛生,小穗通常短于 5 mm 小粒野稻 *O.minuta*

23b.植株丛生,小穗通常长于 5 mm 24

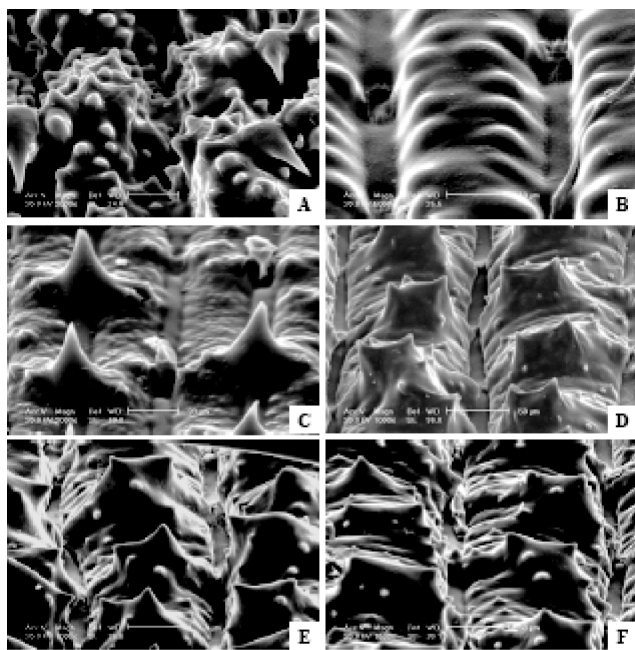
24a.花序较大,小穗长圆形,表面毛较多 紧穗野稻 *O.eichingeri*

24b.花序较小,小穗扁圆形,表面毛较少 马蓝普野稻 *O.malampuzhaensis*

行业标准信息平台

附 录 B
(资料性附录)

稻属主要种类的外稃乳突特征



A:疣粒稻 *O.granulata* ;B:短花药野稻 *O.brachyantha* ;C:马来野稻 *O.ridley* ;
D:斑点野稻 *O.punctata* ;E:紧穗野稻 *O.eichingeri* ;F:小粒野稻 *O.minuta*

注：图片来自《稻属植物微形态特征的比较分析》第 17 页

附 录 C
(规范性附录)
DNA 提取方法

C.1 试剂

C.1.1 CTAB 缓冲液

20 mmol/L 的 EDTA, 100 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0), 1.4 mol/L 的 NaCl, 0.1% β -巯基乙醇, 2%CTAB。

C.1.2 TE 缓冲液(PH 8.0)

10 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L 的 EDTA。

C.1.3 其他试剂

氯仿 : 异戊醇(24 : 1), 异丙醇, 70%乙醇。

C.2 提取步骤

C.2.1 取 0.1 g 粉样, 加入 300 μ L CTAB 缓冲液, 在高通量研磨机研磨至匀浆状, 再加入 300 μ L CTAB 缓冲液, 上下颠倒混匀转入 1.5 mL 离心管中; 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中冷至 15 $^{\circ}$ C 以下。

C.2.2 加入 250 μ L 氯仿 : 异戊醇(24 : 1), 上下混匀 5 分钟, 充分混匀, 12 000 rpm 室温离心 10 min, 取上清 300 μ L 转至另一预先装有 200 μ L 异丙醇的离心管中, 轻轻上下颠倒混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃上清。

C.2.3 沉淀用 70%乙醇洗涤后, 再次离心, 倒出乙醇, 干燥 DNA, 加入 100 μ L TE 缓冲液溶解 DNA, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 或室温 1 h。

附 录 D
(规范性附录)
PCR 检测方法

D.1 引物合成

- Primer 1 5'-TCAGCCCACCTTATGTGTTC-3'
- Primer 2 5'-TGTGCAGCAACAACATCCAT-3'
- Primer 3 5'-CAGTGGTGGAGCCAGAAATT-3'
- Primer 4 5'-GCTTAATCAGGGGCAGAGGC-3'

以基因组 DNA 为模板,Primer1/ Primer2 为引物进行第一轮进行扩增,扩增产物稀释 30 倍后作为模板,以 Primer3/ Primer4 为引物进行第二轮扩增,PCR 产物大小为 163 bp,为疣粒野生稻特异性扩增引物。

D.2 PCR 反应

本方法中,PCR 反应的总体积为 25μL,反应体系见表 D.1。

表 D.1

| 组分 | 原浓度 | 25μL 反应体系加样体积(μL) |
|---------------|--------------|-------------------|
| 超纯水 | | 17.4 |
| 10×PCR buffer | | 2.0 |
| dNTPs | 2.5 mmol/L | 1.6 |
| 正向引物 | 10 μm ol / L | 0.8 |
| 反向引物 | 10 μm ol / L | 0.8 |
| Taq 酶 | 2.5 U/μL | 0.4 |
| DNA | 25 ng/μL | 2.0 |

Primer1/ Primer2 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃终延伸 10 min,4 ℃保存。

Primer3/ Primer4 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,24 个循环,72 ℃延伸 10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检查结果。

以疣粒稻叶片 DNA 为阳性对照,假稻叶片 DNA 为阴性对照,灭菌双蒸水为空白对照。

D.3 琼脂糖电泳

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 2%配好,加入 SYBRGREEN 核酸染料终浓度为 0.5 μg/mL,混匀,制胶。用适量的 6×加样缓冲液分别与 10 μL 样品混合,然后将其和适合的 DNA 分子量标准物分别加入到样品孔中,电泳。结束时将整个胶置于凝胶成像仪上观察。

D.4 结果观察

通过成像观察,若在 163 bp 处有相应大小的产物带出现,即可判定为阳性(检测样品为疣粒稻);若无任何扩增带出现,判定为阴性。

检测时应做平行实验,两份平行测试样品的结果应该保持一致。如果一个测试样品的结果为阳性而另一个为阴性时,应重新进行检测。可通过增加 PCR 反应中 DNA 的模板量,使两份平行测试样品的结果一致。所检测目标片段出现扩增,且 PCR 产物经过确证,所有对照结果正常,结果判定为阳性;所检测目标片段未出现扩增,所有对照结果正常,结果判定为阴性。

行业标准信息平台

参 考 文 献

- [1] 范树国,张再军,刘林,等.稻属植物分类研究的历史及现状.武汉植物究,2000,18(18):328-337.
- [2] 卢宝荣,葛颂,桑涛,等.稻属分类的现状存在的问题.植物分类学报,2001,39(4):373-388.
- [3] 张文绪,裴鑫德.水稻稃面双峰乳突的研究.作物学报,1998,24(6):691-697.
- [4] 张文绪,汤圣祥.稻属 20 个种外稃乳突的扫描电镜观察.作物学报,1997,3(3):280-289.
- [5] 汤圣祥,张文绪.中国三种野生稻谷粒外稃结构的电镜观察.植物遗传资源学报,2003,4(2):134-136.
- [6] 宋云,陈岩,徐晗,等.稻属单拷贝核基因 TPI 序列分析及其在疣粒野生稻鉴定中的应用.生物技术通报,2012,22(12):76-81.
- [7] 徐中根.稻属植物微形态特征的比较分析.扬州大学,2010.
-

行业标准信息平台