ICS 65.020.01

B 40/49

团 体 标 准

**T/HXCY XXX-2025**

苜蓿品种真实性鉴定SNP分子标记法

**Authentication of Alfalfa Varieties Using SNP Molecular Markers**

（征求意见稿）

2025-XX-XX发布 2025-XX-XX实施

北京华夏草业产业技术创新战略联盟发布

目 次

[前 言 III](#_Toc206612692)

[1 范围 1](#_Toc206612693)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc206612694)

[3 术语与定义 1](#_Toc206612695)

[4 缩略语 1](#_Toc206612696)

[5 原理和总则 2](#_Toc206612697)

[6 样品 2](#_Toc206612698)

[7 检测程序 2](#_Toc206612699)

[8 结果计算与表示 3](#_Toc206612700)

[9 结果报告 4](#_Toc206612701)

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

注：在不引起混淆的情况下，本文件中“标准化文件”简称为“文件”。

本文件由北京华夏草业产业技术创新战略联盟提出并归口。

本文件起草单位：内蒙古大学、中国科学院青岛生物能源与过程研究所、中国农业科学院生物技术研究所、内蒙古自治区林业和草原种苗总站、内蒙古草业技术创新中心有限公司。

本文件主要起草人：白卓安、任卫波、付春祥、牛丽芳、李京隆、夏红岩、张丽敏、苑峰、刘亚玲、李东明、李俊、李昊峰、刘文文。

本文件为首次发布。

苜蓿品种真实性鉴定SNP分子标记法

1 范围

本文件规定了利用SNP标记进行苜蓿（*Medicago sativa* L.）品种真实性鉴定的术语和定义、原理和总则、试验材料、样品、检测程序、结果计算与表示和结果报告。

本文件适用于苜蓿品种真实性鉴定、品种亲缘关系分析等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 33681.1-2017 高通量基因测序样本预处理方法

NY/T 4022-2021 玉米品种真实性鉴定SNP标记法

NY/T 4021-2021 小麦品种真实性鉴定SNP标记法

NY/T 2745-2021 水稻品种真实性鉴定SNP标记法

3 术语与定义

下列术语和定义适应于本文件。

3.1 单核苷酸多态性single nucleotide polymorphism (SNP）

在基因组水平上单个核苷酸变异所引起的DNA序列多态性。

3.2 品种真实性鉴定 variety identification

通过与标准样品DNA指纹数据比对或筛查，确定送检样品的真实品种名称。

3.3 标准样品 standard sample

国家指定机构保存的具有法定身份的代表品种特征特性的实物种子或DNA样品。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵（Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide）

DNA：脱氧核糖核苷酸（Deoxyribonucleic acid）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction）

KASP：竞争性等位基因特异性PCR（Kompetitive allele specific PCR）

SDS：十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate）

5 原理和总则

5.1 原理

苜蓿不同品种的基因组存在着能够世代稳定遗传的单核苷酸多态性（SNP）差异，利用SNP差异，通过与标准样品DNA指纹数据比对或筛查的方式，进行品种真实性验证和真实性身份鉴定。

5.2 总则

应依据“适于检测目的”的原则，统筹考虑检测规模和检测能力，择定适宜的检测平台、引物或探针、样品数，经过验证，制订相应的检测方案；品种真实性验证依据SNP位点差异数目进行判定，品种真实性身份鉴定依据SNP位点相似度进行判定。品种关系鉴定可采用品种真实性身份鉴定的检测方案。

本文件推荐采用基于SNP芯片分型检测平台。

6 样品

可为种子、幼苗、叶片等组织或器官，需要扦样的样品数量应符合GB/T 3543.2的规定。送验样品如为种子，重量应不低于50 g或不少于500粒；如为幼苗、叶片等组织或器官，样品应至少来自30个植株个体。

试验样品应至少含有30个个体，可以混合检测或单个个体检测。

7 检测程序

7.1 DNA提取

DNA提取采用CTAN法或SDS法。

7.2 DNA质量要求

DNA无降解，溶液的紫外光吸光度OD260与OD280的比值宜介于1.7～2.0。

7.3 SNP芯片扫描检测

7.3.1 DNA扩增、片段化、沉淀

a) 变性：DNA模板8.7 μL，每孔加8.7 μL的变性试剂，室温放置10 min；

b) 中和：每孔加56.6 μL中和试剂；

c) 扩增：每孔加100.1 μL扩增试剂，37℃育（23±1）h；

d) 终止扩增反应：将样品板从37℃杂交取出，放入65℃杂交炉，孵育20 min然后放入37℃杂交炉，育45 min：

e) 片段化：每孔加24.8 μL片段化预混试剂，37℃育30 min；

f) 片段化终止反应：每孔加8.3 μL终止液；

g) 沉淀：每孔加入365.4 μL沉淀混合液，20℃放置16～24 h；

h) 以上试剂用量为选用96制式芯片时的推荐用量，若选用其他制式芯片，试剂用量需调整。

7.3.2 干燥、重悬及质控

a) 干燥：4℃离心，3200g离心40 min，弃上清液，烘干；

b) 重悬：50 μL杂交混合液，振荡溶解15 min；

c) 质控：用琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计进行定性及定量检测，合格后方可进行后续试验。

7.3.3 杂交、扫描

a) 杂交：启动芯片扫描仪及其软件，上传样品信息，待杂交样品变性。变性程序为：95℃ 10 min，48℃ 3 min，48℃保存。变性后将样品转移至杂交板，放入芯片扫描仪指定位置，48℃杂交23.5 h。

b) 清洗、染色：根据芯片扫描仪系统提示，将清洗液与染色试剂放入对应位置，扫描仪自动清洗。

c) 扫描：清洗染色结束后芯片扫描仪自动进行荧光信号扫描。

d) 数据分析：采用软件对扫描出来的数据进行质量控制及基因分型分析。

7.4 数据记录

数据记录方式用SNP位点碱基符号表示基因型，如AA、TT、CC或GG，缺失数据记录为“—”。数据质量需符合对应检测平台的质控要求。

8 结果计算与表示

8.1 品种真实性鉴定

将送验样品与标准样品指纹成对比较，统计比较总位点数和差异位点数。按公式（1）计算2份样品的位点相似度。

LS=(1-D/T)×100%🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄🞄（1）

式中：

LS——位点相似度；

D——差异位点数；

T——比较总位点数。

位点相似度LS值保留两位小数。

9 结果报告

9.1 品种真实性鉴定

鉴定意见可参考以下原则：

a) 送验样品与标准样品比较，位点相似度≥90.00%，疑似两者为同一品种；

b) 送验样品与标准样品比较，位点相似度在85.00%（不含）～90.00%（不含）时，不确定两者为同一品种；

c) 送验样品与标准样品比较，位点相似度≤85.00%，排除两者为同一品种。

9.2 填报方式

对于品种真实性验证，采用下列方式进行填报：

利用SNP标记法，通过 个位点，采用 检测平台进行检测，送验样品与 标准样品比较，位点相似度为 ，鉴定意见为 。

9.3 属于下列情形之一的，应在检验报告中注明：

——送验样品低于规定数量6.1、6.2规定数量；

——与试验样品比较的标准样品的来源。