|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 点击此处添加ICS号 |
| CCS  |

|  |
| --- |
|  |

点击此处添加CCS号 |

团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

燕麦品种真实性检验规程——SSR标记法

Specification for authenticity testing of oat varieties - SSR labeling method

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

内蒙古标准化协会  发布

1. 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。

本文件由蒙草生态环境（集团）股份有限公司、内蒙古草业技术创新中心有限公司提出。

本文件由内蒙古标准化协会归口。

本文件起草单位：蒙草生态环境（集团）股份有限公司、内蒙古草业技术创新中心有限公司。

本文件主要起草人：米翔宇、田振东、王菽、于立霞、贾振宇、刘长涛、陈丽荣、戴鑫宇、杨英英、李隐哲、王艳霞。

燕麦品种真实性检验规程——SSR标记法

* 1. 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行燕麦(*Avena sativa* L.)品种鉴定的术语和定义、缩略语、原理、试验样品、仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息、操作步骤、数据记录及统计、结果判定与表述。

本文件适用于基于SSR标记的燕麦品种DNA分子数据采集及品种真实性鉴定。

* 1. 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。

NY/T 2594 植物品种鉴定 DNA 分子标记法 总则

NY/T 4498 大葱品种鉴定 SSR分子标记法

DB 62/T 4094 草品种真实性检验规程 SSR标记法

* 1. 术语和定义

NY/T 2594界定的术语和定义适用于本文件。

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对(base pair)。

DNA：脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。

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

TBE:三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸(Tris-borate-EDTA)。

TEMED:四甲基乙二胺(N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine)。

PAGE：聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)。

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

SSR：简单重复序列(simple sequence repeat)。

TE:三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)。

* 1. 原理

燕麦品种基因组存在着大量能够稳定遗传的SSR标记，不同燕麦品种在同一SSR的重复次数存在差异，这种差异可通过PCR扩增及电泳方法进行检测，进而区分不同的燕麦品种。

* 1. 试验样品
		1. 样品种类

送检样品为种子或叶片组织。

* + 1. 样品要求

每份样品检测20个个体，种子、叶片混合提取DNA或先单独提取DNA后取等量DNA混合。

* 1. 仪器设备及试剂

见附录A。

* 1. 溶液配制

见附录B，所用试剂均为分析纯试剂。

* 1. 引物信息

引物及序列见附录C，引物相关信息见附录D。利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测和Labchip GX Touch大分子分析系统检测时选择普通引物，利用荧光毛细管电泳检测时选择荧光标记引物，荧光标记位于正向引物5'端。可利用附录C中的引物序贯检测,当检测到的差异位点数能判定送检样品与对照样品不同时，停止检测。

* 1. 操作步骤
		1. DNA提取

称取幼嫩组织混合样本约200 mg，经液氮充分研磨后置于2.0 ml圆底离心管中；每管加人600 μL预热至65℃的CTAB提取液，充分混合65℃水浴45 min～60 min，每隔15 min轻缓颠倒混匀1次。每管加入与CTAB提取液等体积的三氯甲烷和异戊醇混合液，轻缓混匀后静置10 min，4℃,12000 r/min离心10 min。吸取上清液转移至新的离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀，-20℃放置30 min，4℃,12000 r/min离心10 min，弃上清液，用体积分数为70%的乙醇溶液洗涤2遍，晾干，加入100 μL双蒸水或TE缓冲液充分溶解，检测DNA浓度和质量，-20℃保存备用。

注:以上为推荐的DNA提取方法，满足PCR扩增要求的其他DNA提取方法均适用于本文件。DNA溶液的紫外吸光度OD260与OD280的比值宜介于1.7～2.0。

* + 1. PCR扩增
			1. 反应体系

PCR扩增反应体系的总体积和各组分的终浓度参照行业标准NY/T 4498。

* + - 1. 反应程序

反应条件：94℃预变性5 min，1个循环，94℃变性30 s，60℃退火（退火温度依引物而定）30 s，72℃延伸30 s，35个循环；72℃延伸10 min，4℃保存。

反应程序中各反应参数可根据PCR扩增仪型号、酶、引物等不同而做适当的调整。

* + 1. 扩增产物分离
			1. 非变性PAGE垂直板电泳
				1. 制胶

用洗涤剂清洗长玻璃板和凹玻璃板，再用双蒸水、无水乙醇依次擦拭两遍，晾干后，用纱布均匀将亲水硅烷和疏水硅烷擦于玻璃板上，长板涂亲和硅烷，短板涂剥离硅烷，待玻璃板彻底干燥后，将其组装成电泳胶板，取100 m1质量分数为6%的PAGE胶溶液，加入50 μL四甲基乙二胺(TEMED)和500 μL质量分数为10%的过硫酸铵(APS)，迅速混匀后将其加入两玻璃板之间，直到液体出溢出为止，灌胶时避免产生气泡，立即插入梳子，插入梳子时应检查梳子下是否有气泡，聚合至少1小时以上，胶聚合后，清理胶板表面溢出的胶液，轻轻拔出梳子，用水清洗干净备用。

* + - * 1. 预电泳

将胶板安装于电泳槽上，盖上电泳槽电极盖，在正极槽和负极槽（上下）加入1×TBE缓冲液，使其超出凝胶顶部2 cm～3 cm，在200 V电压下，使其预电泳20 min～30 min，使凝胶预热。

* + - * 1. 电泳

用注射器吸取缓冲液冲洗凝胶顶端几次，清除气泡和凝胶碎片，同时将胶条拨正。每个加样孔点2 μl～4 μl样品，除待测样品外同时加入参照品种扩增产物。在200 V恒压下电泳1.5 h～2.5 h(电泳时间取决于扩增片段的大小范围），电泳结束后小心分开两块玻璃板，准备银染。

* + - * 1. 银染

将凝胶板置于装有固定液的塑料盒内，轻轻摇荡5 min后取出，再用双蒸水漂洗3 min；将凝胶板放置新配银染液中，避光轻轻摇荡10 min后取出，再用双蒸水快速漂洗，时间不超过10 s；将凝胶板放置于显影液中，轻轻摇荡，直至出现带纹。待带纹清晰后取出，迅速置于固定液中定影2 min，然后在双蒸水中漂洗2 min；取出凝胶板室温下自然晾干，放在胶片观察灯上观察，记录结果，拍照保存。

固定液、染色液、双蒸水和显影液用量，可依据胶板数量和大小调整，以没过胶面为准。

* + - * 1. 拍照或扫描保存凝胶数据

拍照将凝胶呈现出的结果保存。

* + - 1. 荧光毛细管电泳
				1. PCR产物样品准备

根据预先确定的引物分组，分别取等体积不同荧光标记引物的扩增产物，混匀稀释。吸取1 μL混合液，加入DNA分析仪配套上样板中。

注:稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。

* + - * 1. 变性

上样板各孔分别加人0.1 µL分子量内标和8.9 µL去离子甲酰胺，在PCR扩增仪上95℃变性5 min，取出后立即置于冰上，冷却10 min以上，瞬时离心10 s后备用。

* + - * 1. 电泳

按照DNA分析仪操作手册进行电泳并保留电泳原始数据。

* + - * 1. Labchip GX Touch大分子分析系统

制备凝胶

向1管（1100 μL）凝胶基质中加入13 μL染料浓缩物，漩涡混匀后将混合物分别转移至两个旋转过滤器中，在室温下以9200 rcf 离心10 min，确保所有凝胶都已通过过滤器后将过滤器丢弃。

 芯片制备

用双蒸水冲洗活性孔两次，最后一次要把孔里的液体吸干净，使用反向移液技术将凝胶染料、DNA HiSens Marker添加到芯片孔中，用布子清洁芯片圆形窗的两侧，将芯片放入槽中。

 电泳

吸取PCR产物30 µL～40 µL于96孔板中，编辑样品表，运行程序。

清洗

将芯片从舱中拿出，用双蒸水冲洗活性孔两次，添加100 μL Storage Buffer到活性孔中，将芯片放回舱中，确保缓冲管具有750 μL双蒸水，点击清洗按钮，清洗10 min。

* 1. 数据记录与统计

每个SSR位点的等位变异参照扩增片段大小确定，见附录D。对于变性PAGE和Labchip GX Touch大分子分析系统，将送检样品在某一位点扩增片段的迁移位置与对应的参照品种进行比较，确定送检样品在该位点的等位变异。对于荧光毛细管电泳，通过参照品种消除不同批次或者不同型号DNA分析仪可能存在的系统误差，使用片段分析软件读取送检样品在该位点的等位变异。

纯合位点的等位变异数据记录为X/X，杂合位点的等位变异数据记录为X/Y，其中X、Y 分别为该位点上的两个等位变异，小片段数据在前，大片段数据在后。缺失位点的等位变异数据记录为0/0。

示例1:样品在某个位点上仅出现一个等位变异，为160 bp，则该位点的等位变异数据记录为160/160。

示例2:样品在某个位点上有两个等位变异，分别为，160 bp、165 bp,则该位点的等位变异数据记录为160/165。

* 1. 结果判定与表示

结果判定标准参照DB 62/T 4094-2020 草品种真实性检验规程SSR标记法执行。

1. （规范性）
主要仪器设备及试剂
	1. 主要仪器设备
2. PCR扩增仪。
3. 高压电泳仪：电压大于200 V，具有恒电压、恒电流和恒功率功能。
4. 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
5. 水平电泳槽及配套的制胶附件。
6. 高速冷冻离心机。
7. 水浴锅或干式恒温金属浴。
8. 紫外分光光度计或核酸浓度测定仪。
9. 微量移液器：规格分别为10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 、1000 μL 。
10. 织研研磨仪。
11. 电子天平。
12. Labchip GX Touch大分子分析系统。
13. 多通道移液器。
14. 高压灭菌锅。
15. 电热恒温鼓风干燥箱。
16. 加热磁力搅拌器。
17. 冰箱。
18. 微波炉。
19. 胶片观察灯。
20. 水平摇床。
21. 数码相机或凝胶成像系统。
22. 制冰机。
	1. 主要试剂
23. 液氮。
24. 乙二胺四乙酸（Ethylenediamine-tetraacetic acid，EDTA）。
25. 亲和硅烷。
26. 疏水硅烷。
27. 过硫酸胺（(NH3)2S2O3）。
28. 冰醋酸。
29. 硝酸银。
30. 甲醛溶液。
31. 无水乙醇。
32. 氢氧化钠。
33. 去离子水。
34. 10×TBE缓存液。
35. 10%丙烯酰胺溶液。
36. 凝胶基质(DNA HiSens Gel Matrix)。
37. 染料浓缩物（DNA Dye Concentrate)。
38. （规范性）
溶液配置
	1. 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制
		1. 亲和硅烷缓冲液

49.75 mL无水乙醇250 μL冰醋酸，用去离子水定容至50 mL，常温避光干燥处保存备用。

* + 1. 剥离硅烷溶液

将5 μL亲和硅烷原液和1 mL亲和硅烷缓冲液混合，常温避光干燥处保存备用。

* + 1. 10×TBE 缓冲液

称取 108.00 g 三羧甲基氨基甲烷和 55.00 g 硼酸溶于水中，加入37 mL 0.5 mol/L的EDTA溶液，用蒸馏水定容至1000 mL，常温避光干燥处保存备用。

* + 1. 1×TBE 缓冲液

量取500 mL10×TBE 缓冲液，用去离子水定容至5000 mL，常温避光干燥处保存备用。

* + 1. 10%过硫酸铵溶液

称取10.00 g过硫酸铵溶于100 mL水中。分装后保存于冰箱冷冻室中备用。

* 1. 银染溶液的配制
		1. 固定液

量取100 mL冰醋酸，加入1000 mL去离子水。

* + 1. 染色液

称取2.00 g硝酸银，溶于1000 mL去离子水中。

* + 1. 显影液

称取15.00 g氢氧化钠，溶于1000 mL的蒸馏水中，使用之前加入6 mL的甲醛。

1. （规范性）
引物相关信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 引物编号 | 引物名称 | 染色体 | 正向引物序列(５′→３′) | 反向引物序列(５′→３′) |
| P01 | YM-1 | 3 | CTCATGATGACGATGACGACG | GGCTTCGTTCTCTTCCTTGG |
| P02 | YM-2 | 3 | AGTTCTAGCTTGCACAGTTAGG | TAGATGCTAGTACTGACCCAGG |
| P03 | YM-3 | 3 | AGGGGAATTTCTAAGGTTCATGG | TCACAGAACCGTTCTTACAACC |
| P04 | YM-4 | 5 | GCAGATGATGACTACTTTCATGC | CCACCATGGGATTAGTAGTTCC |
| P05 | YM-5 | 6 | CATTGTCCTGGTTTTAGGGTCC | AGTGGCCCAATATCTCCTAGC |
| P06 | YM-6 | 7 | TTCAATTGTTGCATGGTAACGG | CGAAACATCTGATAATCTGCCG |
| P07 | YM-7 | 2 |  CATCACCCATCTTCTCTCTCG | TGGAATACCAATAGCATGACGG |
| P08 | YM-8 | 2 | AGCAGTACATACACATACACGC | GGTAAAGCCTCTCACCAACC |
| P09 | YM-9 | 3 | AGTTCTAGCTTGCACAGTTAGG | TAGATGCTAGTACTGACCCAGG |
| P10 | YM-10 | 2 | TTCAATTGTTGCATGGTAACGG | CGAAACATCTGATAATCTGCCG |
| P11 | YM-11 | 6 | CATTGTCCTGGTTTTAGGGTCC | AGTGGCCCAATATCTCCTAGC |
| P12 | YM-12 | 2 | TTAACGTGTTCCTTCTCGTCC | AATTATGTACCTGACGTCGAGG |
| P13 | YM-13 | 4 | ACCTCCGTCGAAAACCAGG | TAGGGGCAGTTTTTCAATTCGG |
| P14 | YM-14 | 3 | CAGTCGGGTACACATACATTGG | AGAGCCTGAGGAAGAACCC |
| P15 | YM-15 | 6 | CTGATTTGAACTGCATCCATCC | GAGAAGTTATCCCTGCCTGC |
| P16 | YM-16 | 2 | GTACACCTGCTTGTCTAGTCC | CATATGGACCATCATGAACTTGC |
| P17 | YM-17 | 5 | CAAACGACAATAGTCCAGAACC | CACCACCATTGATGTAGGAGG |
| P18 | YM-18 | 1 | GAGAAGCTCACGGAATCAGC | CGATTTTGACTACAAAGCAGGG |

1. （规范性）
数据统计记录表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 引物编号 | 引物名称 | 荧光标记 | 等位变异范围，bp | 主要等位变异，bp | 参照品种 |
| P01 | YM-1 | / | 119-154 | 119121123125154 | **美达****百世****蒙饲燕1号****青引1号****白燕17号** |
| P02 | YM-2 | / | 148-178 | 148150152154163165167169171173175177 | **261****ZX-1129****陇燕3号****白燕17号****陇燕4号****青引2号****楷模****坝莜****ZX-4502****青海444****领袖****太阳神** |
| P03 | YM-3 | / | 134-165 | 134136138140142144146148150152157161165 | **白燕19号****甜燕2号****福瑞至****白燕7号****穆思特****福星****陇燕1号****坝莜20号****阿尔山****青引2号****美达****领袖****燕麦10号** |
| P04 | YM-4 | / | 112-124 | 112118124 | **牧丰****林纳****甜燕麦** |
| P05 | YM-5 | / | 102-124 | 102106116120124 | **艾博****ZX-3067****ZX-5046****花早2号****青引2号** |
| P06 | YM-6 | / | 200-226 | 200202204206208210212214216218220225 | **陇燕1号****奥塔****ZX-1790****燕麦2号****燕麦9号****ZX-3067****坝燕8号****小金红****坝燕4号****中天4号****ZX-8522****ZX-1197** |
| P07 | YM-7 | / | 98-138 | 98105108114122127134138 | **爱沃****P-4239-2212201709****蒙农大3号****蒙农大燕1号****丹8****贝勒2****蒙饲燕6号****坝莜18号** |
| P08 | YM-8 |  |  |  |  |
| P09 | YM-9 |  |  |  |  |
| P10 | YM-10 |  |  |  |  |
| P11 | YM-11 |  |  |  |  |
| P12 | YM-12 |  |  |  |  |
| P13 | YM-13 |  |  |  |  |
| P14 | YM-14 |  |  |  |  |
| P15 | YM-15 |  |  |  |  |
| P16 | YM-16 |  |  |  |  |
| P17 | YM-17 |  |  |  |  |
| P18 | YM-18 |  |  |  |  |

附 录 E

（规范性）
参照品种相关信息

参照品种相关信息见表E.1

表E.1 参照品种相关信息

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **序号** | **品种名称** | **品种来源** |
|
| 1 | **坝莜** | **内蒙古农业大学** |
| 2 | **林纳** | **北京正道种业有限公司** |
| 3 | **甜燕麦** | **内蒙古农业大学** |
| 4 | **美达** | **北京正道种业有限公司** |
| 5 | **楷模** | **北京正道种业有限公司** |
| 6 | **爱沃** | **北京正道种业有限公司** |
| 7 | **百世** | **北京正道种业有限公司** |
| 8 | **艾博** | **北京正道种业有限公司** |
| 9 | **福瑞至** | **北京正道种业有限公司** |
| 10 | **福星** | **北京正道种业有限公司** |
| 11 | **太阳神** | **北京正道种业有限公司** |
| 12 | **领袖** | **北京正道种业有限公司** |
| 13 | **青海444** | **内蒙古自治区农牧科学院** |
| 14 | **蒙饲燕1号** | **内蒙 古农业大学** |
| 15 | **青引2号** | **内蒙古自治区农牧科学院** |
| 16 | **蒙饲燕6号** | **内蒙古农业大学** |
| 17 | **白燕7号** | **内蒙古农业大学** |
| 18 | **阿尔山** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 19 | **青引1号** | **内蒙古自治区农牧科学院** |
| 20 | **燕麦10号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 21 | **穆思特** | **北京正道种业有限公司** |
| 22 | **蒙农大燕1号** | **内蒙古农业大学** |
| 23 | **陇燕1号** | **甘肃农业大学** |
| 24 | **坝莜18号** | **内蒙古农业大学** |
| 25 | **ZX-1129** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 26 | **坝燕7号** | **内蒙古农业大学** |
| 27 | **ZX-4502** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 28 | **陇燕4号** | **甘肃农业大学** |
| 29 | **甜燕2号** | **内蒙古农业大学** |
| 30 | **五寨三分三** | **内蒙古农业大学** |
| 31 | **坝莜14号** | **内蒙古农业大学** |
| 32 | **贝勒** | **北京正道种业有限公司** |
| 33 | **陇燕3号** | **甘肃农业大学** |
| 34 | **大莜麦** | **内蒙古农业大学** |
| 35 | **261** | **内蒙古农业大学** |
| 36 | **白燕17号** | **吉林省白城市农科院** |
| 37 | **白燕19号** | **吉林省白城市农科院** |
| 38 | **白燕21号** | **吉林省白城市农科院** |
| 39 | **乌燕3号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 40 | **ZX-8242** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 41 | **皮燕麦P-4239-2212201709** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 42 | **牧丰** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 43 | **坝莜20号** | **内蒙古农业大学** |
| 44 | **坝燕8号** | **内蒙古农业大学** |
| 45 | **加燕2号** | **内蒙古农业大学** |
| 46 | **草莜1号** | **内蒙古农业大学** |
| 47 | **蒙燕3号** | **内蒙古农业大学** |
| 48 | **ZX-1187** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 49 | **ZX-5046** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 50 | **丹8** | **内蒙古农业大学** |
| 51 | **贝勒2** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 52 | **蒙农大3号** | **内蒙古农业大学** |
| 53 | **坝燕4号** | **内蒙古农业大学** |
| 54 | **蒙燕1号** | **内蒙古农业大学** |
| 55 | **陇燕2号** | **甘肃农业大学** |
| 56 | **花早2号** | **内蒙古农业大学** |
| 57 | **黑玫克** | **北京正道种业有限公司** |
| 58 | **小金红** | **内蒙古农业大学** |
| 59 | **ZX-8522** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 60 | **内燕5号** | **内蒙古农业大学** |
| 61 | **ZX-1197** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 62 | **中天4号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 63 | **坝莜1号** | **内蒙古农业大学** |
| 64 | **科纳** | **内蒙古农业大学** |
| 65 | **ZX-8156** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 66 | **ZX-3067** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 67 | **蒙农大1号** | **内蒙古农业大学** |
| 68 | **燕麦9号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 69 | **白燕23号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 70 | **ZX-8555** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 71 | **白燕25号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 72 | **坝莜7-1** | **内蒙古农业大学** |
| 73 | **燕麦5号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 74 | **ZX-1127** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 75 | **品5** | **内蒙古农业大学** |
| 76 | **坝莜19号** | **内蒙古农业大学** |
| 77 | **燕科2号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 78 | **定莜8号** | **内蒙古农业大学** |
| 79 | **贝勒2** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 80 | **ZX-1106** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 81 | **坝莜15号** | **内蒙古农业大学** |
| 82 | **坝莜12号** | **内蒙古农业大学** |
| 83 | **枳机莜麦** | **内蒙古农业大学** |
| 84 | **奥塔** | **内蒙古农业大学** |
| 85 | **坝燕6号** | **内蒙古农业大学** |
| 86 | **ZX-1790** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 87 | **燕麦2号** | **蒙草生态环境（集团）股份有限公司** |
| 88 | **蒙燕2号** | **内蒙古农业大学** |
| 89 | **甜燕1号** | **内蒙古农业大学** |

