ICS 65.020.01
B 30

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2477—2013

百合品种鉴定技术规程
SSR分子标记法

Identification of lily varieties—SSR marker method

2013-12-13 发布　　2014-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

目　　次

前言 …… Ⅱ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　原理 …… 1
5　仪器设备及试剂 …… 1
6　溶液配制 …… 1
7　引物 …… 1
8　参照品种及其使用 …… 1
9　操作程序 …… 2
10　等位变异数据采集 …… 4
11　判定标准 …… 4
附录 A(规范性附录)　仪器设备及试剂 …… 6
附录 B(规范性附录)　溶液配制 …… 8
附录 C(规范性附录)　核心引物 …… 10
附录 D(资料性附录)　参照品种名单 …… 12

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。

本标准由农业部种子管理局提出。

本标准由全国植物新品种测试标准化技术委员会(SAC/TC 277)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院蔬菜花卉研究所、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人:明军、葛亮、袁素霞、刘春、徐雷锋。

百合品种鉴定技术规程　SSR 分子标记法

1　范围

本标准规定了利用简单重复序列(Simple sequence repeats)分子标记进行百合属(*Lilium* L.)品种鉴定的试验方法、数据记录及判定标准。

本标准适用于百合品种 DNA 分子标记 SSR 数据采集和品种鉴定。

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。

NY/T 1656.6—2008　花卉检验技术规范

GB/T 19557.1　植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南　总则

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核心引物　core primers

指人工合成的，多态性、稳定性、重复性等综合特性较好，作为 DNA 指纹鉴定必须选用的一组引物。

3.2

参照品种　reference samples

参照品种是指多样性好，核心引物位点扩增片段大小已知的一组品种。参照品种用于比对待测样品在某个 SSR 位点上等位变异扩增片段的大小，校正不同仪器设备和不同实验室间检测数据的系统误差。参照品种以无性繁殖方式进行繁殖，专人保管。

4　原理

SSR 广泛分布于百合基因组中，不同品种间每个 SSR 位点重复单位的数量可能不同。针对两侧序列高度保守的特点，设计一对特异引物，利用 PCR 技术(聚合酶链反应，Polymerase chain reaction)对重复序列进行扩增。在电泳过程中，由于 SSR 位点重复单位的数量不同引起的不同长度的 PCR 扩增片段在电场作用下得到分离，经硝酸银染色或者荧光染料标记加以区分。因此，根据 SSR 位点的多态性，利用 PCR 扩增和电泳技术可以鉴定百合品种。

5　仪器设备及试剂

仪器设备及试剂见附录 A。

6　溶液配制

溶液配制方法见附录 B。

7　引物

引物相关信息见附录 C。

8 参照品种及其使用

参照品种的名单参见附录 D。

在进行等位变异检测时，应同时包括相应参照品种的 PCR 扩增产物。

注 1：同一名称不同来源的参照品种的某一位点上的等位变异可能不相同，在使用其他来源的参照品种时，应与原参照品种核对，确认无误后使用。

注 2：对于附录 C 中未包括的等位变异，应按本标准方法，确定其大小和对应参照品种。

9 操作程序

9.1 样品准备

9.1.1 按照 NY/T 1656.6—2008 的规定进行样品的准备。

9.1.2 从每份样品中随机抽取 5 株以上的个体，混合分析。

9.2 DNA 提取

从幼叶提取 DNA 可采用以下方法：

a) 选取 0.2 g 植株幼叶置于 1.5 mL 离心管中，加液氮研磨至粉末；

b) 离心管中加入 700 μL 预热(65℃)2% CTAB 提取液，轻摇混匀；

c) 65℃水浴 1 h，每隔 15 min 轻摇 1 次；

d) 冷却后加入 700 μL 氯仿—异戊醇(24∶1)，混匀 5 min；

e) 10 000 *g* 离心 10 min；

f) 吸取上清液到 1.5 mL 的离心管中，加入 700 μL 预冷异丙醇，混匀后置于 4℃沉淀 1 h 或 −20℃30 min；

g) 10 000 *g* 离心 10 min；

h) 弃上清液，用 75%乙醇洗涤后晾干；

i) 加入 100 μL ddH_2O，1 μL RNAase，37℃水浴 1 h；

j) 待充分溶解后，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度；

k) 稀释成工作液或−20℃保存备用；

注：以上为推荐的一种 DNA 提取方法。所获 DNA 质量能够符合 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法都适用于本标准。

9.3 PCR 扩增

9.3.1 反应体系

反应体系总体积为 20 μL，反应组分配制见表 1。DNA 分析仪检测时，使用荧光标记引物，引物的荧光染料种类见附录 C。

表 1 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	加样体积，μL	终浓度
ddH_2O	—	12	—
DNA	20 ng/μL	3.0	3 ng/μL
正向引物	10 μmol/L	0.6	0.3 μmol/L
反向引物	10 μmol/L	0.6	0.3 μmol/L
10×Taq Buffer(含 Mg^{2+})	10×	2	1×
dNTPs	2.5 mmol/L	1.6	0.2 mmol/L
Taq DNA 聚合酶	5.0 U/μL	0.2	1 U

9.3.2 反应程序

反应程序可根据引物不同选下列程序中的一种，退火温度可根据附录 C 推荐的引物退火温度设定。

程序 1：94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，推荐的退火温度退火 30 s，72℃延伸 30 s，35 个循环；72℃

延伸 7 min;4℃保存。

程序 2:降落(Touch down)PCR 扩增程序:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,65℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,10 个循环,每个循环降低 1℃;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 7 min;4℃保存。

9.4 等位变异检测

9.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

9.4.1.1 清洗玻璃板

将长、短玻璃板清洗干净,用去离子水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗两遍,吸水纸擦干。在长板上涂 0.5 mL 亲和硅烷工作液,带凹槽的短板上涂 0.5 mL 剥离硅烷工作液。操作过程中防止两块玻璃板互相污染。

9.4.1.2 组装电泳板

待玻璃板彻底干燥后组装电泳板,并用水平仪调平。

9.4.1.3 灌胶

取 60 mL 6%的变性聚丙烯酰胺胶(根据不同型号的电泳槽确定胶的用量和合适的灌胶方式),300 μL APS 和 60 μL TEMED 轻轻混匀,把板的一边抬起将胶缓缓的灌入。当胶到底部后将板放置水平,将梳子平端插入适当的位置,聚合 1 h 后用于电泳。灌胶过程中应防止出现气泡。

9.4.1.4 预电泳

将梳子小心拔出,并把碎胶清理干净,然后擦干净玻璃板。将电泳槽装配好后,在电泳槽中加入1×TBE。在恒功率 80 W 条件下预电泳 30 min。

9.4.1.5 变性

在 PCR 产物中加入 10 μL 6×加样缓冲液,混匀后,在 PCR 仪上 95℃变性 5 min,取出,迅速置于碎冰上,冷却 10 min 以上。

9.4.1.6 电泳

预电泳结束后,清除胶面的气泡及杂质,将鲨鱼齿梳齿端插入凝胶 2 mm。每一个加样孔点入 5 μL 样品。80 W 恒功率电泳至上部的指示带(二甲苯青)到达胶板的中、下部。电泳结束后,小心分开两块玻璃板。

注:具体功率大小根据电泳槽的规格型号和实验室室温设定。

9.4.1.7 银染

a) 固定:带凝胶长板在固定液中轻轻晃动 6 min;
b) 染色:染色液中轻轻摇晃 6 min;
c) 漂洗:蒸馏水快速漂洗 30 s;
d) 显影:显影液中轻轻晃动至带纹出现;
e) 定影:固定液定影 2 min;
f) 漂洗:蒸馏水漂洗 1 min。

9.4.2 毛细管电泳荧光检测

9.4.2.1 样品准备

将带有荧光标记的 PCR 产物稀释到合适的检测浓度,6-FAM 和 HEX 荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍,TAMRA 和 ROX 荧光标记的 PCR 产物稀释 10 倍。

分别取等体积的上述 4 种稀释液混合,从中吸取 1 μL 加入到 DNA 分析仪深孔板孔中。板中各孔分别加入 0.1 μL LIZ 500 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。除待测样品外,还应同时包括参照品种的扩增产物。将样品在 PCR 仪上 95℃变性 5 min,立即取出置于冰浴中,冷却 10 min 以上。瞬时离心后,上机电泳。

注:不同荧光标记的扩增产物的适宜稀释倍数通过预试验确定。

9.4.2.2 开机准备

打开 DNA 分析仪，检查仪器工作状态，更换缓冲液，灌胶。将装有样品的深孔板置放于样品架基座上。打开数据收集软件。

9.4.2.3 编板

按照仪器操作程序，创建电泳板，输入电泳板名称，选择适合的程序和电泳板类型，输入样品编号或名称。

9.4.2.4 运行程序

启动运行程序，DNA 分析仪自动收集记录毛细管电泳数据。

10 等位变异数据采集

10.1 数据格式

样品每个 SSR 位点的等位变异采用扩增片段大小的形式表示。

10.2 变性聚丙烯凝胶电泳与银染检测方法

将待测样品和相应的参照品种某一位点扩增片段的带型和移动位置进行比较，根据参照品种的移动位置和扩增片段大小，确定待测样品该位点的等位变异大小。

10.3 毛细管电泳荧光检测

使用 DNA 分析仪的片段分析软件，读出待测品种与对应参照品种的等位变异数据。比较参照品种的等位变异大小数据与附录 C 中参照品种相应的数据，两者之间的差值为系统误差。从待测样品的等位变异数据中去除该系统误差，得到的数据即为待测样品该位点的等位变异大小。

10.4 结果记录

纯合位点的等位变异扩增片段数据记录为 X/X，其中 X 为该位点等位变异扩增片段大小；杂合位点的等位变异扩增片段数据记录为 X/Y，其中 X、Y 分别为该位点上 2 个不同的等位变异，小片段数据在前，大片段数据在后；无效位点的等位变异数据记录为 0/0。

示例 1：

一个品种的一个 SSR 位点为纯合位点，等位变异扩增片段大小为 120 bp，则该品种在该位点上的等位变异扩增片段数据记录为 120/120；

示例 2：

一个品种的一个 SSR 位点为杂合位点，2 个等位变异扩增片段大小分别为 120 bp、126 bp，则该品种在该位点上的等位变异扩增片段数据记录为 120/126。

11 判定标准

品种鉴定包括对 2 个或 2 个以上的品种同时进行检测（“直接比较”）和对待测品种进行检测后利用其检测数据和数据库中品种的数据进行比对（“数据库比较”）两种情况。后者也适用于新品种测试中利用 SSR 标记选择近似品种的情况。

11.1 直接比较

用附录 C 中 20 对核心引物检测，获得待测品种在这些引物位点的等位变异数据，利用这些数据进行品种间比较：

a) 品种间差异位点数≥3，判定为不同品种；

b) 品种间差异位点数＝2 或 1，判定为相近品种；

c) 品种间差异位点数＝0，判定为疑同品种。

对于 11.1 b)和 11.1 c) 的情况，应按照 GB/T 19557.1 给出的原则进行田间试验，确定品种间在形态性状上是否存在明显差异。

11.2 数据库比较

先用附录C中20对核心引物检测，获得待测品种在上述引物位点的等位变异数据，利用这些数据和数据库中品种进行比较：

a) 品种间差异位点数≥3，判定为不同品种；

b) 品种间差异位点数=2或1，判定为相近品种；

c) 品种间差异位点数=0，判定为疑同品种。

对于11.2 b)和11.2 c)的情况，应按照GB/T 19557.1的规定进行田间试验，确定品种间在形态性状上是否存在明显差异。

附 录 A
（规范性附录）
仪器设备及试剂

A.1 仪器设备

A.1.1 PCR 扩增仪。

A.1.2 测序电泳槽及配套的制胶附件。

A.1.3 高压电泳仪。

A.1.4 水平摇床。

A.1.5 胶片观察灯箱。

A.1.6 电子天平。

A.1.7 微量移液器。

A.1.8 磁力搅拌器。

A.1.9 电磁炉。

A.1.10 微波炉。

A.1.11 高压灭菌锅。

A.1.12 pH 酸度计。

A.1.13 台式高速离心机。

A.1.14 制冰机。

A.1.15 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.1.16 DNA 分析仪：基于毛细管电泳，有 DNA 片段分析功能和数据分析软件，能够分辨 1 个核苷酸的差异。

A.1.17 水浴锅或金属浴。

A.1.18 冰箱。

A.1.19 紫外分光光度计。

A.2 试剂

A.2.1 乙二胺四乙酸二钠。

A.2.2 Tris 碱。

A.2.3 浓盐酸。

A.2.4 氢氧化钠。

A.2.5 Taq DNA 聚合酶 Buffer：含 Mg^{2+}。

A.2.6 四种脱氧核苷酸（dNTPs）。

A.2.7 Taq DNA 聚合酶。

A.2.8 SSR 引物。

A.2.9 去离子甲酰胺。

A.2.10 溴酚蓝。

A.2.11 二甲苯青。

A.2.12 蔗糖。

A.2.13 甲叉双丙烯酰胺。

A.2.14 丙烯酰胺。

A.2.15 硼酸。

A.2.16 尿素。

A.2.17 亲和硅烷:97%。

A.2.18 剥离硅烷:2%二甲基二氯硅烷。

A.2.19 无水乙醇。

A.2.20 四甲基乙二胺(TEMED)。

A.2.21 过硫酸铵。

A.2.22 冰醋酸。

A.2.23 硝酸银。

A.2.24 甲醛溶液。

A.2.25 十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)。

A.2.26 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

A.2.27 氯仿。

A.2.28 异戊醇。

A.2.29 异丙醇。

A.2.30 RNA 酶。

A.2.31 琼脂糖。

A.2.32 液氮。

A.2.33 LIZ-500 分子量内标。

A.2.34 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液(POP-4 胶)。

A.2.35 DNA 分析仪用光谱校准基质,包括 6-FAM、TAMRA、HEX 和 ROX 4 种荧光标记的 DNA 片段。

A.2.36 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。

附 录 B
（规范性附录）
溶 液 配 制

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 溶于 800 mL 水中，用固体 NaOH 调 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL，高压灭菌。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 60.55 g Tris 碱溶于适量水中，加 HCl 调 pH 至 8.0，定容至 500 mL，高压灭菌。

B.1.3 0.5 mol/L HCl 溶液

量取 25 mL 浓盐酸，加水定容至 500 mL。

B.1.4 2%CTAB

分别称取 CTAB 20 g，NaCl 81.816 g，PVP 20 g，分别量取 1 mol/L Tris-HCl 溶液（pH8.0）100 mL，0.5 mol/L EDTA 溶液（pH8.0）40 mL，定容至 1 000 mL。

B.1.5 5 mol/L NaCl 溶液

称取 146 g 固体 NaCl 溶于水中，加水定容至 500 mL。

B.1.6 氯仿—异戊醇（24∶1）

分别量取 240 mL 氯仿和 10 mL 异戊醇，将两者混匀。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 SSR 引物

用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均为 10 μmol/L 的储存液，各量取 10 μL 混合。

注：干粉配制前应首先快速离心。

B.2.2 6×加样缓冲液

分别量取去离子甲酰胺 49 mL，0.5 mol/L 的 EDTA 溶液（pH8.0）1 mL，分别称取溴酚兰 0.125 g，二甲苯青 0.125 g，蔗糖 40 g，将各组分混匀。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 40%PAGE 胶

分别称取 190 g 丙烯酰胺和 10 g 甲叉双丙烯酰胺，加水定容至 500 mL。

B.3.2 6.0% PAGE 胶

称取 420 g 尿素，分别量取 10×TBE 缓冲液 100 mL 和 40% PAGE 胶 150 mL，定容至 1 000 mL。

B.3.3 亲和硅烷缓冲液

分别量取 49.75 mL 无水乙醇和 250 μL 冰醋酸，加水定容至 50 mL。

B.3.4 亲和硅烷工作液

在 1 mL 亲和硅烷缓冲液中加入 5 μL Binding 原液，混匀。

B.3.5 剥离硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

B.3.6 10%过硫酸铵溶液

称取10 g过硫酸铵加水定容至100 mL，分装到2 mL离心管中，在4℃最多保存2周～3周，若需长期保存应置于−20℃。

B.3.7 10×TBE缓冲液

分别称取Tris碱108 g，硼酸55 g，量取0.5 mol/L EDTA溶液37 mL，定容至1 000 mL。

B.3.8 1×TBE缓冲液

量取10×TBE缓冲液500 mL，加水定容至5 000 mL。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液

量取200 mL无水乙醇，10 mL冰醋酸，加水定容至1 000 mL。

B.4.2 染色液

称取3 g硝酸银，量取3 mL甲醛，加水定容至2 000 mL。

B.4.3 显影液

称取30 g氢氧化钠，量取4 mL甲醛，加水定容至2 000 mL。

附 录 C
（规范性附录）
核 心 引 物

核心引物（20 对）见表 C.1。

表 C.1 核心引物（20 对）

引物名称	引物序列（5′→3′）	荧光标记	退火温度 ℃	SSR 扩增片段 bp	参照品种
ivflmre125	F:GCTTGTCTTTCTCTGCTGTCT R:GAGATCCGACGTTATTTATGC	5′6-FAM	55	172 199	‘Siberia’ ‘Brunello’
ivflmre141	F:AAAACTCAACACGGATCACA R:GCCATCCAATTCTTCTCCTA	5′HEX	61	140 147 173	‘Brunello’ *Lilium davidi* var. *unicolor L. regale*
ivflmre407	F:GCATAAGTACCCACAACACA R:TCGTGTGAATCTTGCCAAT	5′TAMRA	59	140 142 145 215	‘Red Latin’ ‘Ceb Dazzle’ ‘Brunello’ ‘Yelloween’
ivflmre422	F:GAAATAAATCCCACCCAA R:CTGACAACTCCAGCCAAC	5′ROX	56	112 118 124	*L. pumilum* ‘Val di sole’ ‘White Heaven’
ivflmre79	F:CAAAGCCTATGATAAACGCA R:GCTCGTTCTCAAGTTATCCAT	5′6 - FAM	51	379 423 471	‘Siberia’ ‘Royal Sunset’ ‘Sorbonne’
ivflmre100	F:CTCCTTCCCCAGAAAACCA R:TGACTAAAATGAAGAGGACGG	5′HEX	56	178 184 190 195 201	‘White Triumph’ ‘Serano’ ‘Sorbonne’ *L. regale* ‘White Heaven’
ivflmre136	F:TCTCTTCGTCTTCCATTGTG R:ATCCTTGCTCACCTCCTCTG	5′TAMRA	59	174 180 186 192	‘Siberia’ ‘Serano’ ‘White Triumph’ ‘Royal Sunset’
ivflmre138	F:ATCCCTGGTCTTCTTCATTG R:GACTGTCTGGAGAGGGATGT	5′ROX	52	199 205 211	‘Ceb Dazzle’ ‘Pink Perfection’ ‘Robina’
ivflmre179	F:GCGAGCGTGTCAATAATAAC R:CATCCCTACATCAAGACCGT	5′6 - FAM	55	185 188 191	‘White Heaven’ *L. regale* *L. henryii*
ivflmre302	F:GATCCGAAGGACCCGTTAAG R:AACAACTACAGGGCGAGGGT	5′HEX	64	208 216 233	‘Red Latin’ ‘Mombasa’ ‘Triumphator’
ivflmre342	F:GAAGAGCTCCGCCAGTTG R:TTCCGATCCCCATCATTGC	5′TAMRA	63	158 161	‘Siberia’ *L. regale*
ivflmre381	F:GCGGGATCTCGCAGTTCT R:GTCGCAGTCTTCAAAGTCGT	5′ROX	59	244 250 253	‘Black Bird’ *L. pumilum* *L. davidi* var. *unicolor*

表 C.1（续）

引物名称	引物序列(5′→3′)	荧光标记	退火温度 ℃	SSR 扩增片段 bp	参照品种
ivflmre486	F:GCCCAACCCACTCTTCCT R:GCTGCTGAATATGCCCTC	5′6-FAM	56	101 105 110	'Ceb Dazzle' 'Sorbonne' *L. henryii*
ivflmre588	F:GCTGCTCACCGCCTCTATC R:ATCCACAGCCACCGCAAC	5′HEX	59	108 111 116	'Mestre' 'Siberia' *L. concolor*
ivflmre725	F:TCTCCGGCATACCAAATC R:GCGTACCTGCTCCTGTTC	5′TAMRA	54	135 156 162 174	'Ceb Dazzle' 'Black Bird' 'Robina' *L. henryii*
ivflmre738	F:CATACATCCATCCGATTACA R:TGGTTTCATGACGTTCGT	5′ROX	51	195 197 206 209 214 216	'Brunello' 'Brunello' *L. davidi* var. *unicdor* *L. davidi* var. *unicdor* 'Siberia' 'Robina'
ivflmre768	F:CACTGGTGCTGTCAGAAACT R:ATCTAAGCCCATCTTGTTCA	5′6-FAM	52	168 174 180 185	'Pink Perfection' 'Black Bird' 'White Heaven' 'Val di sole'
ivflmre771	F:AAATGAACCACGCCTGCA R:CCATAGTTTCAACCACATCATC	5′HEX	52	227 230 233	'Yelloween' 'White Heaven' 'Yelloween'
ivflmre1014	F:CCAGTGACTCCCTGTTCG R:TTTGTGGCAGTGAGACCTT	5′TAMRA	64	218 239	'Pink Perfection' 'Triumphator'
ivflmre1024	F:AACAAACATCGGCAATCA R:ATGCGATGGGAGTAGGAG	5′ROX	56	261 264 273 280	*L. regale* 'Robina' 'Black Bird' 'Val di sole'

附 录 D
（资料性附录）
参照品种名单

参照品种名单见表 D.1。

表 D.1 参照品种名单

序号	参照品种名称	序号	参照品种名称
1	'Ceb Dazzle'	13	'Mestre'
2	'Royal Sunset'	14	'Mombasa'
3	'Brunello	15	'Triumphator'
4	'Yelloween'	16	'White Triumph'
5	'Siberia'	17	'Gold City'
6	'Sorbonne'	18	'Serano'
7	'Robina'	19	*LiLium regale*
8	'White heaven'	20	*L. henryii*
9	'Black Bird'	21	*L. davidi* var *unicdor cotton*
10	'Navona'	22	*L. concolor*
11	'Red Latin'	23	*L. pumilum*
12	'Val di sole'	24	'Pink perfection'