农业行业标准

《木薯品种鉴定 SSR分子标记法》

（征求意见稿）

编

制

说

明

《木薯品种鉴定 SSR分子标记法》起草组

2022年1月

# 一、工作简况

## （一）任务来源

根据《农业农村部办公厅关于下达2018年农业国家标准、行业标准制修订项目任务的通知》（农办质〔2018〕20号，2018年6月7日发），第429项，由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所承担《木薯品种鉴定 SSR分子标记法》的制定工作。

## （二）主要起草单位

本文件由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所起草。

## （三）编写人员与分工

标准制定过程主要中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所的人员参与资料收集、实验分析、文本完成、实验室比对、数据处理等工作。

**表1. 主要起草人员信息及任务分工**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **姓 名** | **工作单位** | **职务/职称** | **专业特长及分工** |
| 王明 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 副研究员 | 项目的组织实施、质量控制、文本起草 |
| 肖鑫辉 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 助理研究员 | 引物筛选、体系建立、文本撰写 |
| 叶剑秋 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 研究员 | 项目实施、品种收集 |
| 王琴飞 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 副研究员 | 项目实施、文本起草 |
| 张洁 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 助理研究员 | 引物筛选 |
| 薛茂富 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 助理研究员 | 引物验证 |
| 应东山 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 副研究员 | 品种收集 |
| 张如莲 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 研究员 | 品种收集 |
| 韦卓文 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 助理研究员 | 表型验证 |
| 高玲 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 副研究员 | 文本修改 |
| 刘迪发 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 助理研究员 | 引物筛选 |
| 徐丽 | 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 | 助理研究员 | 数据统计 |

## （四）主要工作过程

### 1. 标准起草

1.1 前期准备

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所前期查阅文献、合成了267对木薯SSR引物。2018年6月收集271份木薯资源（包括目前审定品种），由木薯国家种质资源圃提供。

1.2 技术确定

2018年7月至10月，选取6个来源于不同产地、植物学性状差异大的木薯资源用于引物的初步筛选。利用267对引物对这6个资源进行PCR扩增，扩增产物通过6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，对引物的扩增稳定性及多态性进行分析，筛选出150对条带清晰，多态性高和扩增稳定的引物。2018年11月至2019年2月，将初步筛选得到的150对引物根据其扩增片段长度选取6-FAM、ROX、TAMRA、HEX中的一种荧光染料在上游引物的5’端进行标记，利用合成的荧光引物对271个品种进行扩增，扩增产物稀释后在ABI 3730基因分析仪上进行片段分析，根据峰图简单易读取、多态性高、扩增稳定性高、染色体上分布均匀的原则，最终确定了28对核心引物用于木薯品种鉴定。

1.3验证阶段

2021年12月委托北京市农林科学院玉米种子检测中心、农业农村部植物新品种测试（杭州）中心、农业农村部植物新品种测试（济南）中心三家单位，对标准的可操作性和检测数据的可重现性进行了验证。三家单位分别对来自我国木薯主产区的43个代表性品种的28对SSR位点的指纹信息进行了毛细管荧光电泳检测平台验证。经验证，《木薯品种鉴定 SSR分子标记法》标准中的DNA提取、PCR扩增及产物检测方法具备可操作性，按照标准中的毛细管电泳检测平台技术方法，扩增的PCR产物均能获得清晰、稳定的主峰，且易于识别。

### 2. 征求意见

2018年12月，成立了由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究组成的标准起草小组。在完成标准讨论稿和进行验证结果期间，标准编写小组经研讨修改，形成标准“征求意见稿”，书面征求了行业主管部门、科研教学、种子管理、新品种管理、种子检验机构、教学、科研、企业、推广应用等方面的20位专家意见。

# 二、标准编制原则和确定标准主要内容的论据

## （一） 标准编制原则

根据木薯品种的特点，按照农业农村部制定的《植物品种鉴定 DNA分子标记法 总则》标准编写要求，采用以下原则编写《木薯品种鉴定 SSR分子标记法》：

规范性原则：本标准的制定符合法律法规，符合有关标准要求，包括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》、NY/T 2594 《植物品种鉴定 DNA分子标记法 总则》、NY/T 1943-2010 《木薯种质资源描述规范》、GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》。

适用性原则：本规程的全部内容具有可操作性。

统一性原则：本规程与现行相关标准协调统一，不发生冲突。

先进性原则：本规程采用目前国际国内外品种鉴定领域均认可的、成熟的SSR标记技术，以毛细管电泳检测平台为主兼顾变性聚丙烯酰胺凝胶电泳平台的木薯品种鉴定技术，与田间小区鉴定方法对比，该方法的先进性在于不受环境影响和季节约束，检验周期短。

## （二）标准主要内容

1. 改良的CTAB法提取DNA

DNA提取方法应保证提取的DNA数量与质量符合PCR扩增的要求，DNA无降解，紫外光吸光度OD260/OD280宜介于1.7~2.0。方法如下：

取叶片约200～300 mg，置于2.0 mL离心管，加液氮充分研磨，取粉末100~200 mg移入2.0 mL离心管；每管加入600 µL 65℃预热的CTAB提取液充分混匀，65℃恒温水浴45～60 min，每间隔10 min颠倒混匀一次；每管加入等体积的氯仿-异戊醇（24:1，V:V），轻缓混匀后，静置10 min；12 000 rpm离心15 min后，吸取上清液至一新离心管，再加入等体积预冷的异丙醇，颠倒离心管数次，在-20℃放置30 min；4℃，12,000 rpm离心10 min，弃上清液；用70%乙醇洗涤DNA沉淀2次，风干，加入100 µL无菌水或TE缓冲液。通过紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和质量，-20℃保存。

1. 引物收集

查阅前人文献，合成267对SSR引物用于筛选（Sraphet et al., 2011）。

1. 引物合成

选用变性PAGE垂直板电泳，只需合成普通引物。选用荧光毛细管电泳，需要在上游引物的5’端标记与毛细管电泳仪发射和吸收波长相匹配的荧光染料。

1. 多态性引物筛选

引物的筛选原则是扩增产物稳定、重复性好、多态性高。选取6个来源于不同产地、植物学性状差异大的木薯用于引物的初步筛选。利用267对引物对这12个资源进行PCR扩增，扩增产物通过6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，对引物的扩增稳定性及多态性进行分析，筛选出120对条带清晰，多态性高和扩增稳定的引物。图1为引物C79和C24在12个资源中的扩增产物电泳检测结果。

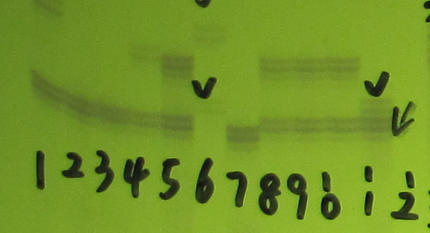
 

图1 12个木薯品种变性PAGE垂直板电泳检测图

将初步筛选得到的120对引物根据其扩增片段长度选取6-FAM、ROX、TAMRA、HEX中的一种荧光染料在上游引物的5’端进行标记，利用合成的荧光引物对96个品种或资源进行扩增，扩增产物稀释后在ABI 3730基因分析仪上进行片段分析，根据峰图简单易读取、多态性高、扩增稳定性高、染色体上分布均匀的原则，最终确定了28对核心引物用于建立木薯高通量品种鉴定体系。28对引物序列如表2所示。

表2 28对引物序列

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 原编号 | 引物名称 | Sequence (5' -> 3') |
| 1 | CB18 | CB18F | AGGATTGTGGTTGACAGGCT |
| CB18R | GAGACAACGGGGACAAAAGA |
| 2 | CB26 | CB26F | CGGGTCGCAGCTTCAATAAG |
| CB26R | TCTGGGTTGCTCTCATCTTG |
| 3 | C91 | C91F | TTACAGGTGCCCGATGTGTA |
| C91R | CGTTCGAGTTGCATTCATTC |
| 4 | CB33 | CB33F | GGAAGCATGTTTCTTTGATAATTC |
| CB33R | ATCTGGTTCTCGTGGGAGTG |
| 5 | CB39 | CB39F | GCGCTTGCAGTTGCTCTATC |
| CB39R | GCCACAACACACGCATATCT |
| 6 | CB41 | CB41F | AATGGAGCCAAAATCACCAC |
| CB41R | CAAATGCTATCAAGCACAAGG |
| 7 | C516 | C516F | ATCTCAGGGTGGTCGACAGA |
| C516R | TGCCAAAGGAGGAGAAAATG |
| 8 | C24 | C24F | GTCTGCGCTGAGCAGTCTC |
| C24R | GAGTGAGACGACGAAACGTG |
| 9 | C524 | C524F | TAACCTTTCGCCGTCTTCTG |
| C524R | GAAGGAAGGGGGAATTTGAG |
| 10 | CB192 | CB192F | AGTTCAAGTGGGTGGTCAGG |
| CB192R | ACCCCAGACATGTTGCATTT |
| 11 | CB82 | CB82F | TGAGAATGCTGAGACGGATG |
| CB82R | AAAAGGGCAAGAAAACAAGAAA |
| 12 | CB93 | CB93F | GATCGGATGTCTGAGGAGGA |
| CB93R | TGCTAGTCCTTTTTGGCAGG |
| 13 | C109 | C109F | GCAAATTGGGGGAATGTTTT |
| C109R | AAGACACGAAGACGGTTGCT |
| 14 | CB220 | CB220F | CCCACGCTTCTGCTCTTTTA |
| CB220R | AGGCATACCGCCATGATTAG |
| 15 | CB226 | CB226F | AAATTGGACAGGAGAGGTTGG |
| CB226R | ACGGAGGAGAGTTGGATTTACA |
| 16 | C49 | C49F | GATTGAGCGGTTGGATTTGT |
| C49R | CCTGCACCTTGTGGAGAGAT |
| 17 | CB232 | CB232F | TCCTCTCAATCCCTACCTCT |
| CB232R | TTATCGGGCCATATGTTATC |
| 18 | CB235 | CB235F | CCAACTCACCTTTCAACCAGA |
| CB235R | GAAGCCAACCCATCATCTTC |
| 19 | CB238 | CB238F | TCACAATGAAGCCCAGTGAA |
| CB238R | TTGTATCTGAGCCTTGCGTG |
| 20 | CB149 | CB149F | GGACGAGTCCCTGTCCATAA |
| CB149R | GGGACCATGTCGCTAGAAAA |
| 21 | CB157 | CB157F | AAACCACCAATCAGTCCAGC |
| CB157R | ATGTCTAATTGAAGGAGAGGATTC |
| 22 | CB161 | CB161F | ACCACAAACATAGGCACGAG |
| CB161R | CACCCAATTCACCAATTACCA |
| 23 | CB164 | CB164F | ATGCTCTCTGCCAAAAGGAA |
| CB164R | CTGCCATGGAAGAAGCTACC |
| 24 | CB244 | CB244F | TCCTAGTGTCCTGTTTGCCC |
| CB244R | TGAGACGACCATCCAAATCA |
| 25 | CB166 | CB166F | CCATGCAGTAGTGCCATCTTT |
| CB166R | ATTTTCACCAACCGCAACTC |
| 26 | CB246 | CB246F | CTGTCTTGATTCCGGCAACT |
| CB246R | GCAAGTCGTTGCCTACCTTG |
| 27 | C79 | C79F | CATCTCTCTGCAGTCCGTCA |
| C79R | GGTCGATGAGAGGGAAATCA |
| 28 | CB248 | CB248F | GGACTGCTTGGATCCATTAAA |
| CB248R | CACCATTCCCTCTGGAGAAA |

1. 荧光引物合成与分组

合成28对SSR荧光引物，通过将28对引物的上游引物的5’端标记不同颜色的荧光染料进行分组，由于标记同一种染料的几个位点的等位变异扩增片断大小区间相差15 bp以上，因此能够将这28对SSR引物分成4组（表3）提高电泳效率。

表3 引物荧光标记及分组

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 荧光标记（FAM） | 荧光标记（HEX） | 荧光标记（TAMRA） | 荧光标记（ROX） |
| 1 | CB166(139-160）C24(191-213)  CB161(252-286)  CB82(315-322)  CB26(376-397) | CB226(140-158)  CB164(195-211)  C49(271-289)  CB238(332-347) | CB192(218-230) | CB235(223-239) |
| 2 | C79(150-156)  CB248(207-215)  CB244(283-297) | CB33(174-190)  CB18(221-238)  CB39(304-316) | CB93(218-241) | CB157(224-261) |
| 3 | C91(180-190)  CB246(221-245)  CB232(307-323) | C109(211-225) | CB149(220-232) | CB41(231-288) |
| 4 | C516(235-248) | CB220(237-245) | C524(239-255) | / |

1. 品种指纹数据库的建立

利用28对多态性引物（表4）对271个木薯品种通过毛细管电泳检测，获得271个品种的指纹数据库。28对引物在271个品种中共检测出157个等位基因位点，平均每对引物5.6个，其中CB41标记检测到的等位变异数最多，为14个。这些引物的PIC值在0.309~0.844之间，平均为0.60。按照PIC值在0.25~0.50之间为中度多态性，大于0.50为高多态性的标准，28对核心引物中有23对PIC大于0.5，表明核心引物的多态性较高。其中引物CB41的PIC值最高，为0.844。

表4 28对核心引物信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 引物名称 | 所在染色体 | 等位变异数 | PIC |
| 1 | CB18 | 1 | 5 | 0.602 |
| 2 | CB26 | 2 | 5 | 0.512 |
| 3 | C91 | 2 | 5 | 0.512 |
| 4 | CB33 | 2 | 8 | 0.792 |
| 5 | CB39 | 3 | 5 | 0.611 |
| 6 | CB41 | 3 | 14 | 0.844 |
| 7 | C516 | 3 | 4 | 0.708 |
| 8 | C24 | 4 | 7 | 0.687 |
| 9 | C524 | 5 | 7 | 0.535 |
| 10 | CB192 | 6 | 6 | 0.768 |
| 11 | CB82 | 7 | 4 | 0.309 |
| 12 | CB93 | 8 | 6 | 0.662 |
| 13 | C109 | 8 | 5 | 0.521 |
| 14 | CB220 | 9 | 3 | 0.341 |
| 15 | CB226 | 9 | 6 | 0.57 |
| 16 | C49 | 10 | 5 | 0.576 |
| 17 | CB232 | 10 | 3 | 0.495 |
| 18 | CB235 | 11 | 3 | 0.498 |
| 19 | CB238 | 11 | 5 | 0.688 |
| 20 | CB149 | 12 | 4 | 0.614 |
| 21 | CB157 | 14 | 8 | 0.745 |
| 22 | CB161 | 15 | 8 | 0.654 |
| 23 | CB164 | 15 | 4 | 0.564 |
| 24 | CB244 | 15 | 6 | 0.705 |
| 25 | CB166 | 16 | 4 | 0.492 |
| 26 | CB246 | 17 | 7 | 0.708 |
| 27 | C79 | 17 | 6 | 0.667 |
| 28 | CB248 | 18 | 4 | 0.516 |
| 合计 | | / | 157 | 16.87 |
| 平均 | | / | 5.6 | 0.60 |

1. 聚丙烯酰胺电泳检测与毛细管电泳检测的一致性验证

以271份木薯品种为材料，采用28对引物进行毛细管和垂直板平台进行试验。采用毛细管电泳技术获得了各个材料等位变异的峰图和大小，利用垂直板电泳技术对带型进行编号。两者对比，各种等位变异的片段长度数据与带型编号吻合，证明采用两种技术能够获得一致的检测结果，保证了毛细管电泳技术与垂直板电泳平台的适用。

**参考文献**

Sraphet S, Boonchanawiwat A, Thanyasiriwat T, et al. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (Manihot esculenta Crantz) [J]. Theor Appl Genet. 2011, 122(6):1161-1170.

# 三、主要试验（或验证）的分析、综合报告，技术经济论证，预期的经济效果

## 1、主要实验（验证）结果分析

标准研制单位联合国内多家具有丰富经验的科研院所、第三方检测机构对标准进行重现性、稳定性、一致性的验证工作，北京市农林科学院玉米种子检测中心、农业农村部植物新品种测试（杭州）中心、农业农村部植物新品种测试（济南）中心等均完成了标准验证。

## 2、技术经济论证

SSR标记因其具有共显性强、稳定性好、易于自动化，另外不同实验室容易操作，不需要复杂的仪器设备，对DNA质量要求也不高，且检测成本低而被普遍使用。尽管SNP标记比较流行，但其对仪器设备要求较高，且芯片制备复杂，成本较高，对DNA样品要求较高，对实验者要求也较高，需专门的技术人员。与SNP标记相比，SSR标记具有明显的优势。所以本文件能够满足区试质控、市场监管、新品种保护等品种管理的需求，是我国木薯种业安全的重要技术支撑。

## 3、预期经济增长效果

本文件及基于本文件构建的SSR指纹数据库将在我国木薯新品种保护、市场监管、行政执法、司法、企业质控等相关领域中推广应用，为我国木薯育种和生产安全保驾护航，将产生一定的间接或直接的经济效益和社会效益。

# 四、采用国际标准和国外先进标准的程度

目前国内外尚无类似标准。

# 五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

文本内容与现行法律、法规和强制性标准不发生冲突，符合我国有关法律、法规和经济发展、科学技术发展的方针、政策的要求。目前国内暂无与本文件内容相关的强制性标准。

# 六、重大分歧意见的处理经过和依据

该标准在编制、研讨和征求意见过程中无重大分歧意见。

# 七、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

### 本标准为公益类标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一，因此建议作为推荐性农业行业标准发布实施。

# 八、贯彻标准的要求和措施建议

本文件拟规范各级种子种苗质量检验机构在利用SSR标记法检测木薯品种时所采用的标记引物、样本量、仪器设备和检测方法。为了使检测人员理解标准中的要求，应由本文件的起草单位对检测人员进行理论和实操的培训。

# 九、废止现行有关标准的建议；

无。

# 十、其他应予说明的事项。

无。