ICS 65.020.20
CCS B 05

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB XX/T XXXX—XXXX

李、杏品种鉴定 SSR 分子标记法

点击此处添加标准名称的英文译名

报批稿

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

辽宁省市场监督管理局 发 布

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。

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专利的责任。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本文件起草单位：辽宁省果树科学研究所。

本文件主要起草人：刘硕、刘宁、刘威生、章秋平、张玉萍、马小雪、张玉君、徐铭、赵海娟、刘家成。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址：辽宁省果树科学研究所（辽宁省营口市鲅鱼圈区熊岳镇铁东街），联系电话：0417-7033462。

李、杏品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeats，SSR）分子标记法进行李（Plum）、杏（Apricot）品种鉴定的主要仪器设备与试剂耗材、试剂配制、参照种质、操作步骤、基因型对比、结果判定等要求。

本文件适用于利用SSR分子标记指纹对比快速鉴定李、杏种质资源。

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 19557.1 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 总则

GB/T 19557.30 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 梨

GB/T 30988 多酚类植物基因组 DNA 提取纯化及测试方法

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 37870 个体鉴定的高通量测序方法

NY/T 2594 植物品种鉴定 DNA 分子标记法 总则

3 术语和定义

NY/T 2594界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对（Base pair）

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵（Cetyltrimethylammonium ammonium bromide）

dd H_2O：重蒸馏水（Distilled and deionized water）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

Hi-Di：去离子甲酰胺（Highly deionized formamide）

nt：碱基（Nucleotide）

PCR：多聚酶链式反应（Polymerase chain reaction）

PVP：聚乙烯吡咯烷酮（Polyvinyl pyrrolidone）

TE：Tris-EDTA 缓冲液（10mM Tris，1mM EDTA，pH8.0）

5 原理

李、杏的不同种质资源，其基因组存在着能够进行稳定遗传的简单重复序列SSR的重复次数差异。这种差异可以通过从抽取具有代表性的检测样品种提取DNA，利用SSR引物进行扩增和电泳，通过检测其扩增产物片段大小加以区分。

6 主要仪器设备与试剂耗材

高速离心机、分光光度计等主要仪器设备，氯仿、异戊醇等试剂，移液枪配套枪头、枪头盒等耗材，具体见附录A。

7 试剂配制

试剂配制方法见附录B。

8 SSR 引物

用于李、杏品种鉴定的优异SSR引物有45对，见附录C。退火温度55℃-57℃。

9 参照品种

参照品种见附录D。

10 操作步骤

10.1 样品准备

受检及参照李、杏品种样品均采集幼嫩叶片，按照 GB/T 30988-2014，8 提取步骤改良。每份待测品种和参照品种选取 3 个单株进行混合分析。于春季分别自每个样株上采集新鲜、幼嫩、健康的叶片两片（约 1g）混合置于离心管，做好标记置于液氮中浸泡后，保存于-80℃冰箱。

10.2 DNA 提取

采用改良CTAB法提取李、杏样品DNA；或利用植物基因组DNA提取试剂盒依照说明书进行提取。在通风环境或通风橱进行提取。改良CTAB法DNA提取步骤如下：

a) 将液氮冷冻后的叶片样品放入研钵中磨成粉末，然后迅速将0.2g左右粉末转入2mL离心管中，加入65℃预热的CTAB提取液600μL，（加入适量PVP粉末或1%的β-巯基乙醇溶液），充分混匀1min后置于65℃水浴锅中50min，每隔5min摇荡1次；
b) 取出离心管置于冰上10min，然后置于4℃高速离心机中，12000rpm离心15min。使用移液枪取上清液至新1.5mL离心管中；
c) 加入20μg/μL RNA消化酶10μL并摇晃均匀，随后置于37℃培养箱消化60min；
d) 取出离心管加入等体积的氯仿/异戊醇（24:1）后，充分混匀，室温下静置10min，离心机12000 rpm离心15min；

e) 取上清液500μL置于新的1.5mL离心管中。加入1.0mL的-20℃冰乙醇溶液，轻轻摇晃，置于-20℃冰箱60min或4℃过夜；
f) 取出离心管并置于4℃高速离心机中，12000rpm离心30min，弃上清，利用75%乙醇洗涤沉淀两次，管口向下置于室温下自然晾干；
g) 加入100μL TE溶液溶解DNA沉淀，待完全溶解后利用核酸测定仪检测DNA浓度和纯度，将DNA浓度稀释至20ng/μL，置于-20℃冰箱保存。
注：其他所获DNA质量能够满足后续PCR扩增需要的DNA提取方法都适用于本文件。

10.3 PCR 扩增

10.3.1 PCR 反应体系

总体积20μL。包括DNA模板5μL(20ngμL)，上游荧光引物1μL(10nM)，下游普通引物1μL(10μM)，2 × Taq DNA聚合酶Mix 10μL，ddH_2O 3μL。

10.3.2 PCR 反应程序

PCR反应程序如下：
a) 95℃变性5min；
b) 95℃变性30s；
c) 依照附录C推荐的引物退火温度退火30s；
d) 72℃延伸45s；
e) 重复b-d步骤35个循环；
f) 72℃延伸10min；
g) PCR产物置于4℃保存。

10.4 PCR 扩增产物检测

10.4.1 PCR 产物纯化

将PCR扩增产物置于96孔PCR板进行纯化操作，步骤如下：
a) 20μLPCR产物加入5μL 5M的NaCl（终浓度0.5M）；
b) 加入25μL 24%的PEG8000溶液（终浓度12%），混匀；
c) 置于室温30min；
d) 置于离心机4500xg，4℃离心30min后，立即将板反扣在厚的吸水纸上，离心至150xg，去除上清；
e) 加入70μL 75%乙醇，4500g，4℃离心15min，立即将板反扣在厚的吸水纸上，离心至150g，去除上清，重复一次；
f) 50℃或室温干燥，加入10μL ddH_2O溶解，即为纯化的PCR产物。

10.4.2 毛细管电泳上机样品制备

毛细管电泳上机样品制备，步骤如下：

a) 每份纯化后的PCR产物取1μL于新的96孔PCR板中，每份样品加入0.5μL内标（GS500LIZ）及50μL的Hi-Di稀释液，剧烈震荡5min，使内标充分混匀；

b) 将96孔平板放入PCR仪中，95℃加热5min，程序结束后迅速放在冰上冷却2min。做好上机表后，在ABI3730 DNA测序仪进行检测。

11 基因型对比

每个样品SSR位点的等位变异以扩增产物峰值大小的形式表示。使用Genemapper4.0软件读取ABI3730检测的等位基因峰图（图1，图2，图3），依照软件说明书整理每对引物在每份品种中扩增产物峰值的保留时间并记录在EXCEL表格中，汇成基因型矩阵。根据待测品种与参照品种的SSR等位基因长度、位点和与杂合特性，确定是否有差异。

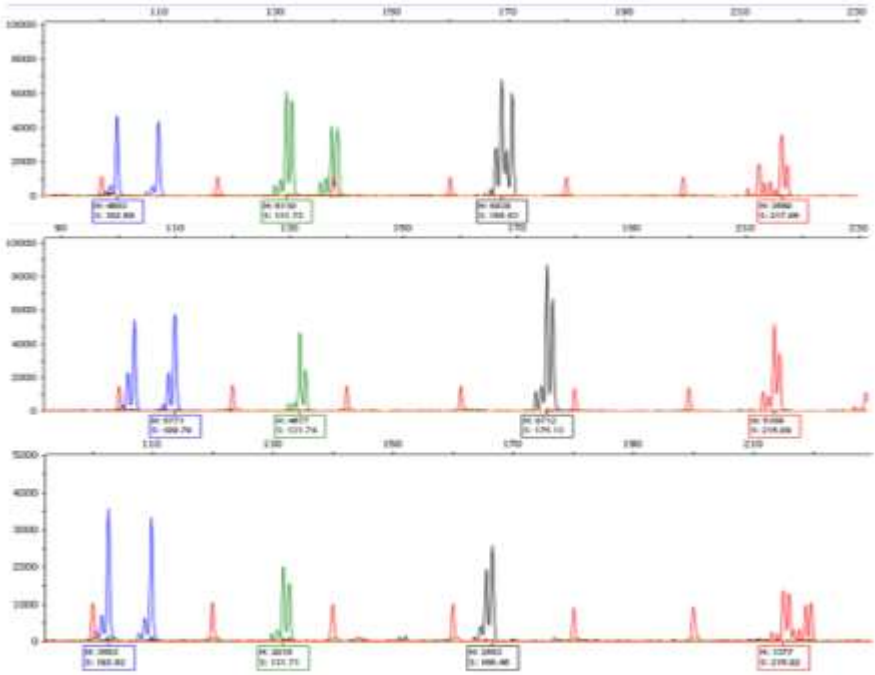

图1 三种杏品种4种荧光SSR引物检测峰图

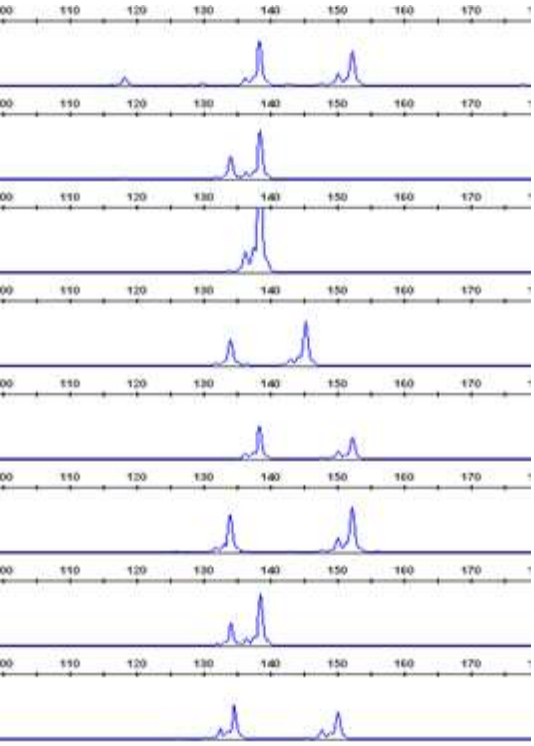

图 2 SSR 引物
‘ampa101’（编号 4）
等位基因峰图

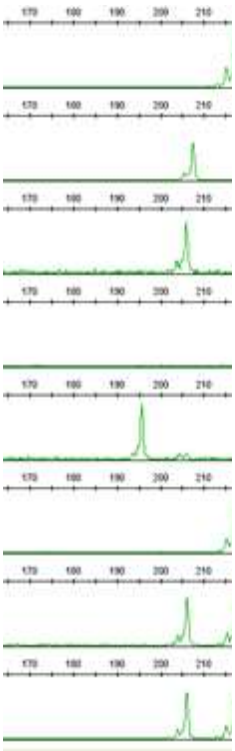

图 3 SSR 引物 ssrpacita5（编号 110）
等位基因峰图

12 结果判定

12.1 判定方法

当品种间差异位点数≥2 时，判定为不同品种；当品种间差异位点数＜2 时，判定为疑同品种。

注：必要时，可按照GB/T 19557.1 和 GB/T 19557.30 给出的原则进行田间测试，确定品种间在形态上是否存在明显差异。

12.2 结果表述

待测样品_____与对照样品_____（或数据库中_____已知品种）利用_____分子标记类型，采用_____检测平台，采用_____位点组合进行检测，结果显示：检测位点数为_____，差异位点数为_____，判定为_____（相同或疑同）。

附　录　A
（规范性）
主要仪器设备与试剂、耗材

主要仪器设备与试剂、耗材见表 A.1。

表 A.1 主要仪器设备与试剂、耗材

步骤/类别	主要仪器设备	主要试剂	主要耗材
DNA 提取	高速离心机、分光光度计、移液器、水浴锅、天平、磁力搅拌器	十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷（Tris 碱）、β-巯基乙醇溶液、RNA 消化酶、氯仿、异戊醇、冰乙酸、冰乙醇、液氮	1.5mL、2mL 离心管、移液枪配套枪头、枪头盒、研钵、乳胶手套
PCR 扩增	PCR 扩增仪器、制冰机	TaqMix 酶(Taq DNA 聚合酶 Mix)、SSR 荧光引物、ddH_2O	96 孔 PCR 板
毛细管凝胶电泳	ABI3730 DNA 分析仪	Hi-Di 高纯甲酰胺、内标（GS500LIZ）	96 孔 PCR 板、移液枪配套枪头、枪头盒

附　录　B
（规范性）
试剂配制方法

B.1　DNA 提取试剂的配置

B.1.1　1.0M Tris-HCL 溶液（pH=8.0）

称量 121.1 g Tris 置于 1 L 烧杯中，加入约 800 ml 的 dd H_2O，充分搅拌溶解，用浓盐酸调节 pH 值至 8.0（约加入 42mL 的浓盐酸）。将溶液定容至 1L，高温高压灭菌后，室温保存。

B.1.2　0.5M EDTA 溶液（pH=8.0）

称取 186.1g$Na_2EDTA•2H_2O$，置于 1 L 烧杯中；加入约 800 mL 的 dd H_2O，充分搅拌；用 NaOH 调节 pH 值至 8.0（约 20g NaOH)；加 dd H_2O 将溶液定容至 1 L；高温高压灭菌，室温保存。

B.1.3　2% CTAB 溶液

分别称取 CTAB 20g，NaCl 81.816g，PVP20g，分别量取 1M Tris-HCl 溶液（pH=8.0）100 mL，0.5M EDTA 溶液（pH=8.0）40mL，定容至 1000 mL。

B.1.4　氯仿—异戊醇（24:1）

分别量取 240mL 氯仿和 10mL 异戊醇，将两者混匀。

B.1.5　75%乙醇溶液

量取 150mL 无水乙醇，50mL ddH$_2$O 置于烧杯中，充分混匀。

附 录 C
（规范性）
SSR 引物

SSR 引物见表 C.1。

表 C.1 SSR 引物

原始编号	引物名称	染色体	正向引物序列（5’-3’）	反向引物序列（3’-5’）
1	ampa101	3	cagtttgatttgtgtgcctctc	gatccacccttttgcataaaatc
2	ampa112	5	caaagtgtcattgttcttgctag	aaggccaaaactccagtagaag
3	cpdct040	-	tgatgaggcctagaaattgga	cacagcaatcagcaaaaagc
4	cppct013	5	gcatttcgagagctgtattt	gtcttacgtgcagcttcatt
5	cpsct005	4	ctgcaagcactgcggatctc	cccatattcccaacccatta
6	cpsct034	2	aggtggacaatagccgtgat	tttccagaccctgagaaagc
7	pchgms5	4	cgcccatgacaaactta	gtcaagaggtacaccag
8	udap-413	2	ccaggacccaaaccctaaaa	tgcaaacacaacacctacctaca
9	udap-418	4	cagaaatagccccagcacat	ttcttgcgccaaaaacaact
10	ssrpacita5	1	gttgtgtttactttttcttaacgg	gtatcacaagtgagaacataagagg
11	udap-410	1	ttgttgacaagaagaaaacaaagc	caacgggttggtttcagaag
12	udap-420	6	ttccttgcttcccttcattg	cccagaacttgattctgacca
13	udp98411	2	aagccatccactcagcactc	ccaaaaaccaaaaccaaagg
14	ampa109	-	gtgtcccgaattccaatatcc	tttgtctcaacactttccctctc
15	ampa116	-	attgaaggccccttatgtgag	caaaaaggcgttacagatgatg
16	aprigms2	1	accacctcttgcaaagaacc	gaaatttcaagcacacgatcc
17	paca18	1	tccaaacctaccgtttctcat	caacagcacaaacagaaccac
18	cpsct042	7	tggctcaaaagctcgtagtg	ccaacctttcgtttcgtctc
19	bppct017	5	ttaagagtttgtgatgggaacc	aagcataatttagcataaccaagc
20	cpdct041	-	tgtttgcacgtttttgaaagc	tggaggggtacaaggaacaa
21	cppct021	6	cggatcccagttgtattaaatg	gaggaactggttatcaccttgg
22	cppct026	1	agacgcagcacccaaactac	cattacatcaccgccaacaa
23	cpsct030	5	caacagcgagtgtcacgttt	aggcaacggacaaaaatctg
24	cpsct039	4	gccgcaactcgtaaggaata	tccaccgttgattacccttc
25	epdcu3117	8	cagagggaacagtgtgagca	tgttgttgtcgaccctgaaa
26	pchgms1	1	gggtaaatatgcccattgtgcaatc	ggatcattgaactacgtcaatcctc
27	uda020	2	tgtgcaccaaacacaactga	gcagtgttgccaatgttgat
28	udap-416	4	ttcagactcgaaaacacacataca	tggaggaggtttatgagcaa
29	udp96-013	2	attcttcactacacgtgcacg	ccccagacatactgtggctt
30	udp97-402	4	tcccataaccaaaaaaaacacc	tggagaagggtgggtacttg

表 C.1　SSR 引物(续)

原始编号	引物名称	染色体	正向引物序列（5’-3’）	反向引物序列（3’-5’）
31	udp98-412	6	agggaaagtttctgctgcac	gctgaagacgacgatgatga
32	ssrpacita10	-	ggtgaggtctgtgctgaatatgcca	cgattaaagaaataagaaaaagagc
33	ssrpacita17	1	cacggggagaattgggtggccttag	ggagtctataaataaatggttgcgc
34	ssrpacita21	5	gattatataagttggtttttgtaag	gtattctataatgtataaatgtacg
35	ssrpacita23	-	gtgaatacaaaattttactacattg	cggtctctgactctctgacttgcgg
36	ssrpacita7	1	cttttgtgcctcagcttcccaacac	cctggcctgaccctaagcaattcg
37	udap-404	4	catgaacagggtcaaaagca	tatatccttacgcggcctca
38	udap-414	1	caagcacaagcgaacaaaat	ggtggtttcttatccgatgc
39	udp96005	1	gtaacgctcgctaccacaaa	cacccagctcatacacctca
40	aprigms24	1	atctgctctttccctcacct	gattatccctcaacccatcc
41	paca33	8	tcagtctcatcctgcatacg	catgtggctcaaggatcaaa
42	pacb26	1	ccaatcatgaaatcataaagcaa	tgggatgtcctattgttttca
43	pacc3	-	tgacttgatcagactcgaca	ttgcatttgcatttacaataga
44	epdcu5100	1	ctcttctcgcctcccaattt	gcttagccctgggtacaag
45	cpsct021	2	gccacttcggctaaaagaga	tccatatctcctcctgcttga

附　录　D
（规范性）
参照品种

李参照品种见表 D.1。

表 D.1　李参照品种

编号	品种名称	分类	原产地
1	奉化李	*P. salicina* Lindl.	浙江奉化
2	毕克齐紫李	*P. salicina* Lindl.	呼和浩特
3	金县紫李	*P. salicina* Lindl.	辽宁金州
4	昌黎玉皇李	*P. salicina* Lindl.	河北昌黎
5	赤峰紫李	*P. salicina* Lindl.	内蒙赤峰
6	法库黄牛心	*P. salicina* Lindl.	辽宁法库
7	巴彦李	*P. salicina* Lindl.	黑龙江巴彦
8	巴黄李	*P. salicina* Lindl.	黑龙江友谊
9	胭脂红李	*P. salicina* Lindl.	湖北枣阳
10	朱砂李	*P. salicina* Lindl.	辽宁海城
11	昌黎大紫李	*P. salicina* Lindl.	河北昌黎
12	红皮红心李	*P. salicina* Lindl.	广东广州
13	黄干核	*P. salicina* Lindl.	辽宁熊岳
14	黄李梅	*P. salicina* Lindl.	黑龙江绥棱
15	李子梅	*P. salicina* Lindl.	吉林长春
16	昌黎大红李	*P. salicina* Lindl.	河北昌黎
17	知一大红李	*P. salicina* Lindl.	黑龙江知一
18	横道河子大红李	*P. salicina* Lindl.	黑龙江横河道
19	蜜李	*P. salicina* Lindl.	浙江桐乡

杏参照品种见表 D.2。

表 D.2　杏参照品种

编号	品种名称	分类	原产地
1	大白玉巴达	*P. armeniaca* L.	北京
2	龙泉务香白杏	*P. armeniaca* L.	北京
3	骆驼黄	*P. armeniaca* L.	北京
4	沙金红	*P. armeniaca* L.	河北昌黎
5	小白玉巴达	*P. armeniaca* L.	河北
6	吨葫芦	*P. armeniaca* L.	河北昌黎
7	串枝红	*P. armeniaca* L.	河北邢台
8	建平香白	*P. armeniaca* L.	天津蓟县
9	巴斗杏	*P. armeniaca* L.	安徽萧县
10	白玉扁	*P. armeniaca* L.	北京
11	龙王帽	*P. armeniaca* L.	河北涿鹿
12	一窝蜂	*P. armeniaca* L.	河北涿鹿
13	国仁	*P. armeniaca* L.	辽宁熊岳
14	平渡海棠红	*P. armeniaca* L.	山东平度
15	曲阜平黄	*P. armeniaca* L.	山东曲阜
16	车头 1 号	*P. armeniaca* L.	山东泰安
17	新世纪	*P. armeniaca* L.	山东泰安
18	关音脸	*P. armeniaca* L.	山东烟台
19	白仁	*P. armeniaca* L.	山东烟台