# 《青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法》
# 编制说明

**标 准 名 称：青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法**

**项 目 编 号：DB63JH-045-2022**

**制、修订类型：制定**

**主要起草单位：中国科学院西北高原生物研究所**

**归 口 单 位：青海省农业农村厅**

**起 草 时 间：2022 年 8 月---2023 年 10 月**

# 《青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法》地方标准编制说明

## 一、工作简况

### （一）任务来源

2022 年 2 月 18 日，由中国科学院西北高原生物研究所申请地方标准的立项，根据青海省市场监督管理局下达的《关于印发 2022 年青海省地方标准制修订项目计划的通知》（青市监函〔2022〕119 号），批准《青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法》地方标准的制定(项目编号：DB63JH-045-2022)。

### （二）起草单位

起草单位：中国科学院西北高原生物研究所、青海省农作物种子站、海南州农牧业综合服务中心、青海省乡村产业发展指导中心。

### （三）主要起草人

| 姓 名 | 性别 | 职务/职称 | 工作单位 | 任务分工 |
|---|---|---|---|---|
| 王寒冬 | 男 | 工程师 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 主持、文本起草 |
| 沈裕虎 | 男 | 研究员 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 标准总体设计 |
| 王蕾 | 女 | 副研究员 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 标准技术内容的修改 |
| 徐金青 | 女 | 副研究员 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 数据分析和筛选标记 |
| 边海燕 | 女 | 无 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 标记筛选及验证 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 韩文婷 | 女 | 高级农艺师 | 青海省农作物种子站 | 标准技术内容的修改 |
| 李春桥 | 男 | 农艺师 | 海南州农牧业综合服务中心 | 编制说明的修改 |
| 薛明珍 | 女 | 农艺师 | 青海省农作物种子站 | 标准技术内容的修改 |
| 王焕强 | 男 | 推广研究员 | 青海省农作物种子站 | 品种确定 |
| 李俊仁 | 男 | 推广研究员 | 青海省农作物种子站 | 编制说明的修改 |
| 包天忠 | 男 | 高级农艺师 | 青海省农作物种子站 | 编制说明的修改 |
| 赵璨 | 女 | 助理农艺师 | 青海省乡村产业发展指导中心 | 开展试验 |
| 王健斌 | 男 | 农艺师 | 青海省乡村产业发展指导中心 | 编制说明的修改 |
| 陈同睿 | 女 | 无 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 标记验证 |
| 尤恩 | 女 | 无 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 标记验证 |
| 邓超 | 女 | 无 | 中国科学院西北高原生物研究所 | 标记验证 |

## 二、制定标准的必要性和意义

“粮安天下，种铸基石”。党的十九届五中全会审议通过的《中共中央关于制定国民经济和社会发展第十四个五年规划和二〇三五年远景目标的建议》提出瞄准生物育种在内的八大前沿领域，实施一批具有前瞻性、战略性的国家重大科技项目。在“十三五”收官、“十四五”开局的关键节点，2020 年中央经济工作会议提出“解决好种子和耕地问题”，要“立志打一场种业翻身仗”。从党的十八大以来，在中央经济工作会议层面将解决好种子问题作为年度经济工作重点任务，尚属首次，引人注目。农业农村部青海省人民政府关于印发《农业农村部 青海省人民政府共同打造青海绿色有机农畜产品输出地行动方案》（农质发

〔2021〕10 号）提出推动全程标准化生产，建立健全特色农畜产品地方标准体系；制定青稞、牦牛、枸杞等特农畜产品种质资源、种植、养殖、农业技术服务等方面技术标准。因此，迫切需要建立适用于青海青稞品种鉴定的技术规程。

目前，SNP 检测作为最新的分子标记检测方法，已被众多国际组织，如国际种子检验协会（ISTA）、国际植物新品种保护联盟（UPOV）、国际种子联盟（ISF）等推荐为 DNA 水平上品种鉴定的方法。杜邦先锋、孟山都和先正达等国际一流农业公司也都采用了 SNP 标记对内部的育种材料和不同品种进行分类鉴定。农业部 2015 年 4 月印发的《农作物品种 DNA 身份鉴定体系构建实施方案》也要求 DNA 水平上的品种鉴定将采用 SNP 技术。

青稞是青海省重要的粮食作物、饲料作物和工业原料作物，目前市场上销售品种不同程度存在品种混杂、种子纯度底等现象，直接影响到其产量和后期加工的产品品质。尽管也可利用形态学、蛋白质、同工酶标记和 RFLP、SSR 等分子标记开展种子纯度鉴定，但是在实践中存在费工耗时、成本高、检测技术繁琐等难题。

目前，我们已经通过 GBS 重测序，基于 204 份青稞（165 份青稞地方品种和 39 份育成品种）获得了 28 个 SNP 位点集合，这些核心 SNP 位点能够用于青稞品种的区分和鉴定，同时初步建立了 SNP 位点的荧光定量 PCR 仪可视化检测方法，对其检验程序稍作优化即可形成青稞品种鉴定技术规程，服务于种子生产推广和育种科研单位。

青稞品种的精准鉴定直接影响青稞行业的种质管理，及其产量和后期加工的产品品质。在《GB/T 3543.5-1995 农作物种子检验规程 真实性和品种纯度鉴定》专门对种子真实性的检验规程做出了强制性规定。同时，青稞作为青海省最具特色的作物类型之一，目前市场上销售品种也不同程度存在品种混杂、套牌侵权等现象，农业种子生产和推广部门品种身份鉴定和育种科研部门的种质资源评价、育种材料确权等存在诸多困难。因此，采用国际最新的 SNP 标记及最新的检测技术建立青稞品种鉴定技术规程，对其农业生产和后续产业发展具有重要影响。

## 三、主要起草过程

### （一）成立标准起草小组

2022 年 7 月 20 日，青海省市场监督管理局下达《关于印发 2022 年青海省地方标准制修订项目计划的通知》（青市监函〔2022〕119 号），批准《青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法》地方标准的制定。任务下达后，中国科学院西北高原生物研究所作为第一起草单位联合青海省农作物种子站、海南州农牧业综合服务中心、青海省乡村产业发展指导中心等单位成立了标准起草工作小组，制定实施方案，并按照项目要求，明确了任务分工、确定了工作重点和时间进度。

### （二）调研、试验论证、起草文本

2022 年 8 月至 12 月，在拟订标准编制工作进度后，工作小组积极收集、分析我国相关法律、法规及国家标准、行业标准，

开展相关类型地方标准的调研，结合前期开展的系列试验研究工作，严格遵循GB/T 1.1《标准化工作导则第1 部分：标准的结构和编写》所规定的标准编写要求起草了《青稞品种鉴定技术规程 SNP分子标记法》的文本初稿。

### （三）征求意见

初稿编写完成后，于2023年1月至2023年9月，起草工作小组成员内部先后多次对标准文本草案进行的讨论和修改，形成工作组讨论稿，将工作组讨论稿先后发青海大学、青海省农林科学院和中国科学院西北高原生物研究所的同行专家进行函审，征集了相关专家的意见和建议，完成了征求意见工作，对征集到的建议通过反复讨论，在对标准进行了认真修改后形成了标准征求意见稿。

## 四、制定标准的原则和依据，与现行法律、法规、标准的关系

### （一）制定标准的原则

标准的整个起草过程严格按照工作计划进行，并遵循“统一性、协调性、适用性、一致性、规范性”的原则，注重标准的可行性和可操作性。

### （二）制定标准的依据

本标准严格按照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》和DB63/T 1789—2020《地方标准制定工作规范》的要求和规定编写标准内容。

### （三）与现行法律、法规、标准的关系

本标准是在国家相关的法规和强制性标准的基础上结合相关试验资料和数据制定出来的，与现行有关法律、法规、标准没有矛盾。

## 五、主要条款的说明

### （一）区分青藏高原地区青稞品种所需的最少 SNP 标记

1. 实验材料

本研究选取青藏高原地区青稞 204 份，其中地方品种 165 份（甘肃 47 份，青海 51 份，四川 17 份，西藏 46 份，云南 4 份），育成品种 39 份。

2. DNA 提取

每个青稞材料取 5 粒种子于培养皿中，两周后取新鲜叶片采用改进的 CTAB 法进行基因组 DNA 的提取，详细步骤如下：

（1） 取幼嫩植株叶片置于研钵，液氮冷冻研磨至粉末，转移至 2 ml EP 管中（粉末的量大约为 EP 管的 1/4-1/3）；

（2） EP 管中加入 980 μL 65 ℃ 预热的 2× CTAB 缓冲液及 20μL β-巯基乙醇，充分混匀；

（3） EP 管置于水浴锅 65℃水浴 60 min（根据情况可适当调整），每隔 15 min 轻轻混匀一下；

（4） 水浴结束后，取出 EP 管，10,000 rpm 离心 10 min；

（5） 将上清液转移至 2 ml 干净 EP 管中（大约 1000 ul）。加入 500μL Tris-饱和酚与 500μL 氯仿，充分混匀，轻摇 20 min。

静置至分层，10,000 rpm，离心 15 min；

（6） 取上清于另一干净 1.5 ml EP 管中，加入等体积的氯仿，混匀，轻摇 10 min。静置至分层，10,000 rpm，离心 10 min；

（7） 取上清，加入等体积的-20 ℃预冷的异丙醇，混匀。-20 ℃下放置 30 min；

（8） 10,000 rpm，离心 10 min。倒掉上清，留沉淀；

（9） 70% 乙醇清洗沉淀两遍，无水乙醇洗一遍；

（10） 沉淀自然晾干，加入 200μL ddH20 溶解沉淀；

（11） 至沉淀充分溶解，加入适量 RnaseA，37℃水浴中降解 1h；

（12） 加入 300μL 水，补充体积至 500μL；

（13） 重复步骤 5、6；

（14） 加入 10% 体积的 5M 醋酸钠，2 倍体积的预冷无水乙醇，混匀至出现絮状沉淀。15-20℃下放置 30 min，10,000 rpm，离心 10 min。倒掉上清，留沉淀；

（15） 重复步骤 9；

（16） 沉淀晾干，加入 100μL 1×TE，溶解沉淀；

（17） 用 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，紫外分光光度计进行 DNA 浓度测定。

3. SNP 基因分型

基于重测序技术和芯片技术，利用分布于 7 条染色体上的

28068 个 SNP 标位点进行分析。SNP 分型由华大基因完成。

4. 选择所要分析的 SNP 数据集

为减少数据计算的工作量，首先要选择一个合适数量的简化 SNP 数据集。从总的 SNP 数据（28068）中，从 1/2 开始（每隔一个 SNP 保留一个 SNP），然后是 1/4，1/8，1/16，1/32，以及更小的 SNP 数据集。然后利用 Arlequin 3.5 计算每个不同 SNP 数据集中青稞品种的遗传相似系数矩阵。利用 GenAlex 6.5 中的 Mantel test 计算简化 SNP 数据集与总 SNP 数据集遗传相似系数矩阵之间的相关系数（r），r>0.99 作为选择简化 SNP 数据集的标准。

5. 区分 204 份青藏高原地区青稞材料所需的最少 SNP 标记

为获取区分 204 份青藏高原地区青稞材料所需要的最少 SNP，利用 Arlequin 3.5 软件查看不同 SNP 子集中共享的单倍型，直到 SNP 到不能将 204 份青稞材料两两区分开。

6. 结果

最终选取了 28 个 SNP 标记可以将青藏高原地区 204 份青稞（165 份地方品种和 39 份育成品种）两两区分开。根据 SNP 标记所在的位置，在大麦基因组相应的位置上下分别截取 300bp。根据序列信息设计 KASP 引物（表 1），SNP 分子标记部分序列见表 2。在今后的工作中，这 28 个标记有助于青稞品种资源的有效管理，特别是青稞品种的鉴定和种质纯度的鉴定。

表 1 KASP 标记引物序列

| 标记名称 | 染色体 | Primer_Allele FAM | Primer_Allele HEX | Primer_Common | Allele FAM | Allele HEX |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1H_1 | 1H | CTGAGTTTGTGGAAGGAGCTATTTTT | CTGAGTTTGTGGAAGGAGCTATTTTA | TCAGTAAGAGTGAAATGACCTGCAACAAA | A | T |
| 1H_2 | 1H | GCGACGCAGCACGACCGA | GCGACGCAGCACGACCGG | CTGATTCGACGCAGCGCTGGAA | A | G |
| 1H_3 | 1H | GCCACCCAACCGTAGCAGC | CGCCACCCAACCGTAGCAGT | GGTGCCCTAGGGTTTCCCCTTA | C | T |
| 1H_4 | 1H | CAAATCTATGTTTGCCGTGTACATTGT | AAATCTATGTTTGCCGTGTACATTGC | GCTCCTATCACCACAACTGCAAGTA | T | C |
| 2H_1 | 2H | TGTTGCTCCTTCTGCTGCCC | GTTGTTGCTCCTTCTGCTGCCA | CCACACAAACCTCACTGCTAGTAGTA | C | A |
| 2H_2 | 2H | GACAAGGCCAGCGGTGCAGT | ACAAGGCCAGCGGTGCAGC | TCGTGCACGCCAAGACCTCCAA | A | G |
| 2H_3 | 2H | GGTGGTCTGATCCTCAAAGGC | GGGTGGTCTGATCCTCAAAGGA | CCTTCCGTCACAGCCATGAAGTTTA | G | T |
| 2H_4 | 2H | GCGTTTCGCCAGCGCACAG | GCGTTTCGCCAGCGCACAC | ATCGACCAATAGATTTGGGGAAACGTTTA | C | G |
| 2H_5 | 2H | GCGCACCGGTGCGTGCTT | GCGCACCGGTGCGTGCTC | CCGAAGAGCTCGGCGTCGAA | T | C |
| 3H_1 | 3H | CGCAACACCTGGATTCGGTCG | CGCAACACCTGGATTCGGTCA | CGCTGGCAGCTCCAGGGCAA | G | A |
| 3H_2 | 3H | CCTCCGGTGGCCGGCG | GCCTCCGGTGGCCGGCA | GGCCGGATCCAGGCTCCCTT | G | A |
| 3H_3 | 3H | CATGCCTTGCATAATTTACAAGTTATGC | ACATGCCTTGCATAATTTACAAGTTATGT | CTCCGAACCAAACACTCTAATCATAACTT | C | T |
| 3H_4 | 3H | CAATACCTACCAATGGTATATAGCAAG | AACAATACCTACCAATGGTATATAGCAAA | GACCTGAAAGCAGTACTAACGATATCTTA | C | T |
| 4H_1 | 4H | GCGTCAGGTTGAGGAGATTCTG | GGCGTCAGGTTGAGGAGATTCTT | AAGGTTGCCAAGCTCAAAAAGGAGAAATT | G | T |
| 4H_2 | 4H | CCACCTCCTTCTCCAGCCGT | CACCTCCTTCTCCAGCCGC | GGCGGGCCCAAGATGGGCTT | T | C |
| 4H_3 | 4H | GTAGCGCCACTTGCGTGCTC | AGTAGCGCCACTTGCGTGCTA | CTTCCTCCTCCCACACCCGTAT | C | A |
| 4H_4 | 4H | CGCTCCGCCATCATCGGC | GCGCTCCGCCATCATCGGT | CAGGAAGGCGCACCGACACTTA | G | A |
| 5H_1 | 5H | CGTCAGCACTGACTGTCCC | CTCGTCAGCACTGACTGTCCT | CTTGCCTGCATCCATTCATTCAAATACAA | G | A |
| 6H_1 | 6H | CCAATTCGCCTGATTAAACCAACC | CTCCAATTCGCCTGATTAAACCAACT | ACAGATCTGGCGGACAGTTATGGAA | G | A |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 6H_2 | 6H | ATTGGACTAATGGAGGAGTCACTTC | AATTGGACTAATGGAGGAGTCACTTA | TCCAAACTGTTTTGGGGAAATTACTCCTT | C | A |
| 6H_3 | 6H | GCACTAAACATCGCACTCGGG | GTGCACTAAACATCGCACTCGGA | TTAGGCGATTCGTGATCGCAGCTAA | G | A |
| 6H_4 | 6H | GGCATTGGCAGCTTCAACACGA | GCATTGGCAGCTTCAACACGG | TGCTGTCCAGTTTTCAGCTCCTGTT | T | C |
| 6H_5 | 6H | AGGTAACAACAATGAAGCGAACGAC | AAGGTAACAACAATGAAGCGAACGAT | CGTCCTCCGCCTCATCGTCAT | C | T |
| 6H_6 | 6H | TCTTGATGGCGTCGTCCA | GCTTCTTGATGGCGTCGTCCG | GAAGAAGCGGCCCAAGCAGCTA | A | G |
| 7H_1 | 7H | AGAAATATTCCAGCCGGCCGAG | AGAAATATTCCAGCCGGCCGAA | CGGTACTACCGCCAGAGTTCAAAAT | G | A |
| 7H_2 | 7H | GGCGGCACCGACGCCG | CTGGCGGCACCGACGCCA | GCTAAGCCCCGCCGGCCAT | G | A |
| 7H_3 | 7H | GCCTCAGCCTCCGCCTCA | GCCTCAGCCTCCGCCTCC | CGGAGGCTGAGGCGGAGCAT | T | G |
| 7H_4 | 7H | GTACCGTCATCCTTGCGGTTGT | GTACCGTCATCCTTGCGGTTGA | GAAAGTCTTCGCAAAAAGTCCGACGAA | T | A |

表 2 SNP 分子标记部分序列

| 标记名称 | 部分序列（5′-3′） |
|---|---|
| 1H_1 | AGAGTGAAATGACCTGCAACAAAATTGTAAG[A/T]AAAATAGCTCCTTCCACAAACTCAGAGGATT |
| 1H_2 | AATCGCGAACTGGTGCGACGCAGCACGACCG[A/G]CGTGTTCCAGCGCTGCGTCGAATCAGAAAAA |
| 1H_3 | CCAAGTGGGATGCGCCACCCAACCGTAGCAG[C/T]CGCCCCTCTCCTCCCTTGGCTGCCGACCCCT |
| 1H_4 | AAGAGCAAATCTATGTTTGCCGTGTACATTG[T/C]TGTCCCAATACTTGCAGTTGTGGTGATAGGA |
| 2H_1 | GAATTGTGGTGTTGTTGCTCCTTCTGCTGCC[C/A]CTACTACTAGCAGTGAGGTTTGTGTGGCTGA |
| 2H_2 | GCCAAGACCTCCAAGGCCGGCCTCCTGCCCT[A/G]CTGCACCGCTGGCCTTGTCGCTGTGCCTGCC |
| 2H_3 | TCCGTCACAGCCATGAAGTTTAAAATGGGTC[G/T]CCTTTGAGGATCAGACCACCCATCGGTTGCA |
| 2H_4 | CGACCAATAGATTTGGGGAAACGTTTACCAC[C/G]TGTGCGCTGGCGAAACGCTTGAGCCGGTTGC |
| 2H_5 | GCCGGGCGTTCCGCGCGCACCGGTGCGTGCT[T/C]GCCGCGCGGTCGCCGGTCTTCGACGCCGAGC |
| 3H_1 | CGCCCCGACCGCGCAACACCTGGATTCGGTC[G/A]GCCCCTCGCCGGAGCACCACCCCGTTGCCCT |
| 3H_2 | GGGCTCCAGATCGGCGCCTCCGGTGGCCGGC[G/A]CGGGCGCAAGGGAGCCTGGATCCGGCCAGTC |
| 3H_3 | TCTACATGCCTTGCATAATTTACAAGTTATG[C/T]AAAAGTTATGATTAGAGTGTTTGGTTCGGAG |
| 3H_4 | AAAGCAGTACTAACGATATCTTAACTCCCCA[C/T]TTGCTATATACCATTGGTAGGTATTGTTCTT |
| 4H_1 | AGGGCATCAGGCGTCAGGTTGAGGAGATTCT[G/T]CGTGAGGAATTTCTCCTTTTTGAGCTTGGCA |
| 4H_2 | CGCAGCCTCCTCCCACCTCCTTCTCCAGCCG[T/C]CGGGTCCGTGAAGCCCATCTTGGGCCCGCCC |
| 4H_3 | TCGTGCACCAGAGTAGCGCCACTTGCGTGCT[C/A]ACCCGCTCGATACGGGTGTGGGAGGAGGAAG |
| 4H_4 | CGCACCGACACTTAGGAGGCCGAGGGCAGCA[G/A]CCGATGATGGCGGAGCGCATCGATGAGCTCC |
| 5H_1 | ATCCATTCATTCAAATACAAGCAGGCAGGAC[G/A]GGACAGTCAGTGCTGACGAGAAAACCACGTG |
| 6H_1 | GGACAGTTATGGAAGGGAGGGAAGCCCTCAC[G/A]GTTGGTTTAATCAGGCGAATTGGAGATGGCA |
| 6H_2 | AAAACTAATTGGACTAATGGAGGAGTCACTT[C/A]CCAAGGAGTAATTTCCCCAAAACAGTTTGGA |
| 6H_3 | TCTCCGAGTGTGCACTAAACATCGCACTCGG[G/A]GACTTAGCTGCGATCACGAATCGCCTAACTA |
| 6H_4 | TGCGTTGCTGTCCAGTTTTCAGCTCCTGTTG[T/C]CGTGTTGAAGCTGCCAATGCCGCTGCCTGCA |
| 6H_5 | AAGCCGAAGGTAACAACAATGAAGCGAACGA[C/T]GCCGGCGGTCGCGTGTGATGACGATGAGGCG |
| 6H_6 | CTTACAAGGCGGCTTCTTGATGGCGTCGTCC[A/G]GCGCCGGCGGGGGTAGCTGCTTGGGCCGCTT |
| 7H_1 | TCGAAACCTTAGAAATATTCCAGCCGGCCGA[G/A]TTAGATTTTGAACTCTGGCGGTAGTACCGCT |
| 7H_2 | CGAGCAGATGGGTGCTGGCGGCACCGACGCC[G/A]GCCTGCTGCAGCATGGCCGGCGGGGCTTAGC |
| 7H_3 | GGGCTGAGGCGGAGGCTGAGGCGGAGCATGC[T/G]GAGGCGGAGGCTGAGGCGGAGCGGGCTGAGG |
| 7H_4 | CAGGACTTTAGTACCGTCATCCTTGCGGTTG[T/A]ACTTCGTCGGACTTTTTGCGAAGACTTTCTT |

## （二）利用基因组 SNP 分子标记对青稞品种鉴别

### 1. 实验材料

供试材料及产地见表 3。

表 3. 供试材料及产地

| 编号 | 品种名 | 产地 |
|---|---|---|
| 41 | 福 8-4 | 青海省农林科学院 |
| 48 | 莫多吉 1 号 | 青海湟源 |
| 49 | 门农 1 号 | 青海门源农科所 |
| 50 | 东青 1 号 | 青海互助 |
| 51 | 同德系选 8 号 | 青海同德牧场 |
| 52 | 互青 2 号 | 青海互助 |
| 54 | 北青 1 号 | 青海省海北州农科所 |
| 57 | 北青 4 号 | 青海省海北州农科所 |
| 58 | 北青 5 号 | 青海省海北州农科所 |
| 59 | 北青 6 号 | 青海省海北州农科所 |
| 60 | 北青 7 号 | 青海省海北州农科所 |
| 61 | 北青 8 号 | 青海省海北州农科所 |
| 62 | 昆仑 1 号 | 青海省农林科学院 |
| 63 | 昆仑 2 号 | 青海省农林科学院 |
| 64 | 昆仑 3 号 | 青海省农林科学院 |
| 65 | 昆仑 8 号 | 青海省农林科学院 |
| 66 | 昆仑 10 号 | 青海省农林科学院 |
| 67 | 昆仑 12 号 | 青海省农林科学院 |
| 68 | 昆仑 164 | 青海省农林科学院 |
| 345 | 昆仑 13 号 | 青海省农林科学院 |
| 346 | 巴青 1 号 | 青海牧草良种繁殖场 |
| 856 | 昆仑 14 | 青海省农林科学院 |
| 857 | 昆仑 15 | 青海省农林科学院 |

2. DNA 提取

每个青稞材料取 5 粒种子于培养皿中，两周后取新鲜叶片采用 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit 试剂盒进行基因组 DNA 的提取，详细步骤如下：

1） 准备好 2.0 ml 离心管，每管装入 1 个钢珠并高压灭菌。

2） 剪取长度为 5 cm 幼苗迅速加入带有钢珠的 2.0 ml 离心管，立即将离心管转入液氮中，在液氮冷却下用高通量组织研磨仪以频率为 30 次每秒研磨 90 s。

3） 离心管中加入 980μl 65℃预热的 DNA 提取液及 20μl β-巯基乙醇，充分混匀，置于 65℃水浴锅中 60 min，每隔 15 min 颠倒混匀一下。水浴后置于室温下冷却，10000 rpm，离心 10 min。

4） 将上清液转移到另一个 2.0 ml 离心管中。加入 500 μl Tris-饱和酚与 500 μl 三氯甲烷，充分混匀，轻摇 20 min。静置至分层，10000 rpm，离心 15 min。

5） 取上清，置于一个新的 1.5 ml 离心管中，加入等体积的-20℃预冷的异丙醇，轻轻混匀。-20℃冰箱中放置 30min。10000 rpm，离心 10 min。倒掉上清，保留白色沉淀。

6） 加入 500 ml 70%乙醇上下颠倒混匀 5 min，静置 1 min，吸取乙醇弃之，重复此操作 1 次；再加入无水乙醇重复此操作一次。

7） 自然风干白色沉淀，加入 50 μl 1 倍 DNA 溶解液，至其充分溶解。

8） 用 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计测定 DNA 溶液浓度、A260 值及 A280 值，A260/ A280 的比值应在 1.8-2.0 之间。取 20 μl DNA 原液将其稀释到 20 ng/μl-50 ng/μl 备用，其

余 DNA 原液置于-20℃冰箱中保存。

3. 实时荧光定量 PCR 仪 SNP 分型实验操作流程

1) DNA 样品分装：将 2 μL DNA 样品编号后分别加到 96 孔 PCR 板上对应编号的反应孔中，每块 PCR 板均需加 2 个及以上的阴性对照（NTC，即除由等量的超纯水替代 DNA 样品外，余所加试剂完全一致）。DNA 样品尽量往 PCR 板中部摆放，避免放在 PCR 板的四个角上，每块 PCR 板尽量只检测一个待检品种。。

2) 配置 KASP 基因分型混合液：依待检样品量按照表 4，配制一定体积的 KASP 基因分型混合液。配制前所有试剂均应短暂地涡旋振荡，补足损失的体积；引物原液稀释至 10 μmol/L。

表 4. KASP 基因分型混合液

| 试剂 | 体积（μL） |
|---|---|
| 2×KASP Master mix | 5 |
| Primer_Allele [FAM] | 0.5 |
| Primer_Allele [HEX] | 0.5 |
| Primer_Common | 1 |
| 超纯水 | 1 |
| 总体积 | 8 |

3) 使用微量移液器将步骤 2）中的 KASP 基因分型混合液分别加入到步骤 1）已加入 DNA 样品的 PCR 板上的反应孔中，每孔加 8 μL。

4) 用荧光透视的膜将 PCR 板密封，然后离心（转速 3000 rpm，时间 30 sec）。

5) KASP 反应在实时荧光定量 PCR 仪上进行，程序设置见

表 5。

表 5. 实时荧光定量 PCR 反应程序

| 步骤 | 说明 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 预变性 | 94℃ | 15 min | 1 |
| 2 | 变性 | 94℃ | 20 sec | 10 |
| | 复性/延伸 | 61-55℃ | 60 sec（每循环降低 0.6℃） | |
| 3 | 变性 | 94℃ | 20 sec | 26 |
| | 复性/延伸 | 55℃ | 60 sec | |

6） PCR 反应结束后，在该仪器上进行荧光数据的读取，读取时程序设置为：温度 30℃，时间 60 sec，循环数 1。

7） 当数据对应的荧光信号较低，分群较散时，可以增加循环后进行荧光读取，同时保证 NTC 没有被扩增。程序设置如下：94℃变性 20 sec，57℃复性/延伸 60 sec，此步骤进行 3 个循环。再按照步骤 6）进行荧光数据的读取。

4. 结果

利用 28 对 KASP 标记引物对 23 份青稞材料基因组 DNA 进行基因分型检测，在所有 28 对 KASP 标记引物中，1H_1、1H_4、2H_1、2H_4、3H_4、4H_3、6H_4、6H_6 呈现多态性高且稳定性好，且检测到的荧光信号（图 1）与高通量测序得到的 SNP 碱基类型（表 6）相一致，可判定为真实性青稞品种种子。

当样品间差异位点数≥2，则判定为“不同品种”；当样品间差异位点数=1，判定为“近似品种”；当样品间差异位点数=0，判定为“极近似品种或相同品种”。

对于利用表 1 中 28 对引物仍未检测到≥2 个差异位点的样品，可按 NY/T 2466-2013 的规定进行田间种植鉴定。

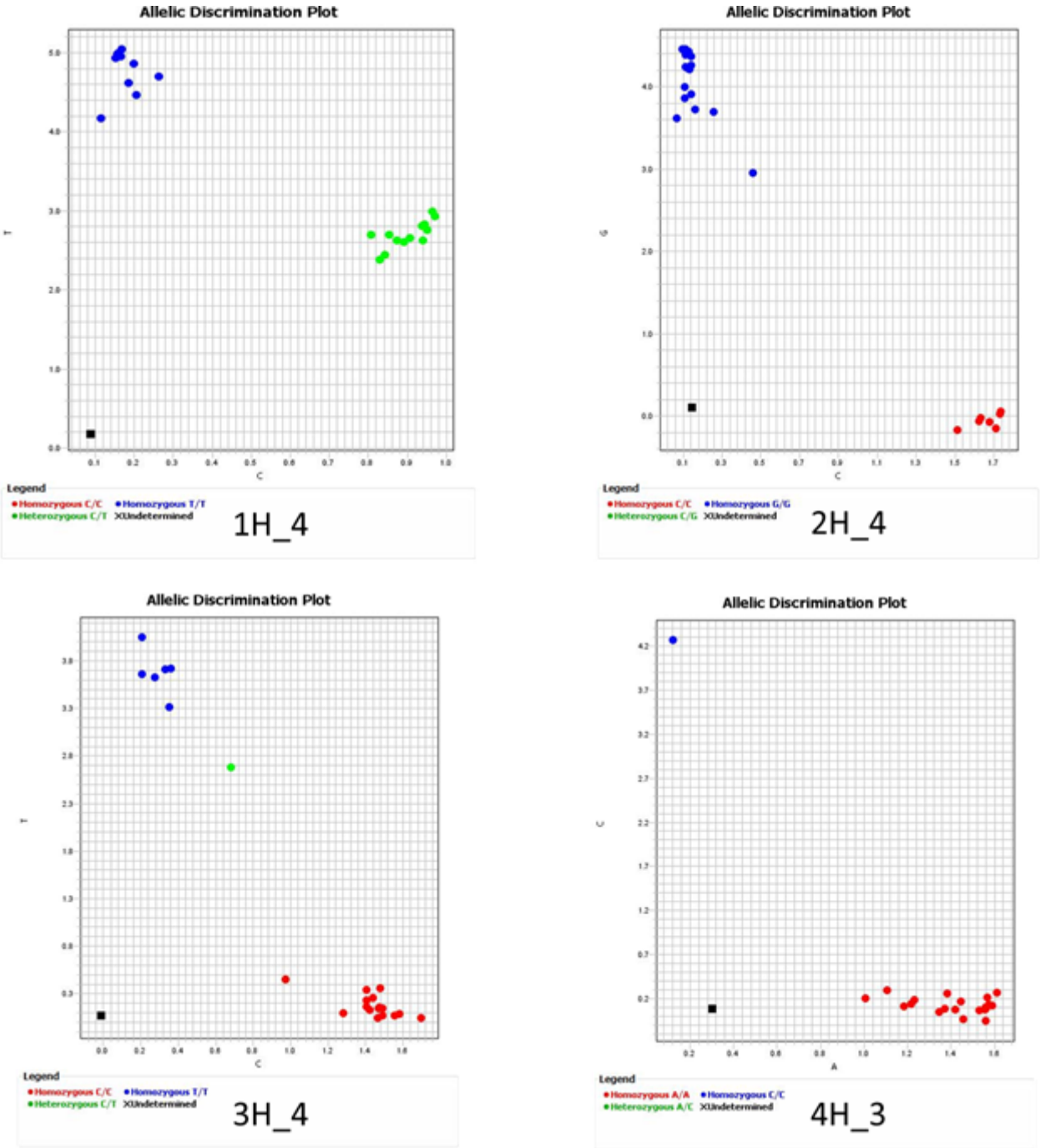


图 1. 23 份青稞品种 SNP 标记基因分型图（部分）

表 6. 23 份青稞品种 SNP 碱基类型

| 品种名称 | 1H_1 | 1H_2 | 1H_3 | 1H_4 | 2H_1 | 2H_2 | 2H_3 | 2H_4 | 2H_5 | 3H_1 | 3H_2 | 3H_3 | 3H_4 | 4H_1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 福 8-4 | T | R | C | T | M | A | K | C | T | G | G | T | T | G |
| 莫多吉 1 号 | A | R | C | Y | C | A | K | G | T | G | G | T | T | K |
| 门农 1 号 | A | R | C | Y | C | A | K | G | T | G | G | T | T | K |
| 东青 1 号 | T | R | C | Y | C | A | K | G | T | G | R | T | C | G |
| 同德系选 8 号 | A | R | C | Y | C | A | K | C | T | G | G | T | T | K |
| 互青 2 号 | A | R | C | T | C | A | K | G | T | G | R | T | T | G |
| 北青 1 号 | T | R | C | Y | C | A | K | S | Y | G | G | T | T | G |
| 北青 4 号 | T | R | C | Y | M | A | K | C | C | G | R | T | T | G |
| 北青 5 号 | T | R | C | Y | M | A | K | S | T | G | G | T | T | K |
| 北青 6 号 | T | R | Y | Y | C | A | K | C | C | G | G | T | T | G |
| 北青 7 号 | T | R | C | Y | C | A | K | G | T | G | G | T | C | G |
| 北青 8 号 | A | R | C | Y | M | A | K | G | T | G | G | T | T | K |
| 昆仑 1 号 | T | R | C | Y | C | A | K | C | C | G | G | Y | C | G |
| 昆仑 2 号 | T | R | C | T | M | A | G | C | C | G | G | C | C | G |
| 昆仑 3 号 | T | R | C | Y | C | A | K | C | C | G | R | C | C | G |
| 昆仑 8 号 | T | R | C | T | C | A | K | C | C | G | G | T | C | K |
| 昆仑 10 号 | T | R | C | T | C | A | K | C | C | G | G | T | C | G |
| 昆仑 12 号 | T | A | C | T | M | A | K | C | T | G | G | T | T | G |
| 昆仑 164 | T | R | C | Y | M | A | K | C | C | G | R | T | T | G |
| 昆仑 13 号 | T | R | C | T | C | A | K | C | T | G | G | T | T | G |
| 巴青 1 号 | A | R | C | Y | M | A | K | C | T | G | R | Y | T | G |
| 昆仑 14 | T | A | C | T | C | A | G | C | T | G | R | C | T | G |
| 昆仑 15 | T | A | C | T | C | A | K | C | T | G | G | T | T | G |

注：M:A/C; K:T/G; Y:T/C; R:A/G; W:A/T; S:G/C

## 表 6. 23 份青稞品种 SNP 碱基类型（续）

| 品种名称 | 4H_2 | 4H_3 | 4H_4 | 5H_1 | 6H_1 | 6H_2 | 6H_3 | 6H_4 | 6H_5 | 6H_6 | 7H_1 | 7H_2 | 7H_3 | 7H_4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 福 8-4 | C | A | R | G | G | A | G | C | Y | G | G | G | K | T |
| 莫多吉 1 号 | C | A | G | G | R | A | R | C | Y | G | R | R | G | T |
| 门农 1 号 | C | A | G | G | R | A | G | C | Y | G | R | G | T | T |
| 东青 1 号 | C | A | G | G | G | A | G | C | C | G | G | G | G | T |
| 同德系选 8 号 | C | A | G | G | G | A | R | C | Y | G | R | G | T | T |
| 互青 2 号 | C | A | R | G | G | A | R | C | Y | G | R | G | K | T |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 北青 1 号 | C | A | G | G | G | A | G | Y | Y | R | G | G | T | T |
| 北青 4 号 | C | A | G | G | G | A | G | C | C | G | G | R | T | T |
| 北青 5 号 | C | A | G | G | G | A | G | C | Y | G | G | G | K | T |
| 北青 6 号 | C | A | G | G | G | A | G | C | Y | G | R | G | K | T |
| 北青 7 号 | C | A | G | G | G | A | G | C | Y | G | R | G | T | T |
| 北青 8 号 | C | A | G | G | R | A | G | Y | Y | G | G | R | G | T |
| 昆仑 1 号 | C | A | R | G | R | A | G | C | Y | G | G | G | K | T |
| 昆仑 2 号 | C | A | R | G | G | A | G | C | Y | G | R | G | G | T |
| 昆仑 3 号 | C | A | R | G | R | A | R | C | Y | G | G | G | K | T |
| 昆仑 8 号 | C | M | G | G | G | A | G | C | Y | G | G | G | G | T |
| 昆仑 10 号 | C | A | G | G | G | A | G | C | Y | G | R | G | K | T |
| 昆仑 12 号 | C | A | G | G | G | A | R | T | Y | G | G | G | K | T |
| 昆仑 164 | C | A | G | G | G | A | G | C | Y | G | R | G | K | T |
| 昆仑 13 号 | C | A | G | G | G | A | R | T | Y | G | G | G | K | T |
| 巴青 1 号 | C | A | G | G | R | M | G | Y | Y | G | R | R | K | T |
| 昆仑 14 | C | A | G | G | G | A | G | C | Y | G | G | G | G | T |
| 昆仑 15 | C | A | A | G | G | A | G | Y | Y | G | R | G | K | T |

注：M:A/C; K:T/G; Y:T/C; R:A/G; W:A/T; S:G/C

## 六、重大意见分歧的处理依据和结果

标准初稿完成后，征求了青海大学、青海省农作物种子站、中科院西北高原生物研究所、青海省农林科学院等专家的建议和意见，共提出 8 条意见和建议，针对这些意见和建议，经双方讨论研究，采纳 7 个，未采纳 1 个，并形成了工作组讨论稿征求意见汇总处理表（见附件 1）。未能采纳的建议主要是专家提出“对青稞来说“样品间差异位点数≥2”的要求是否太严格”，由于此判定方法是根据“区分青藏高原地区青稞品种所需的最少 SNP 标记”试验结果得出的结论，有相应的依据，因此未采纳相关建议。

2023 年 11 月 10 日，由青海省农牧业标准化技术委员会组

织 5 名专家召开了预审会，共征求到 38 条建议，全部采纳。并根据专家预审查意见，修改后形成“征求意见稿”，预审意见汇总处理表见附件 2。

征求专家意见，无重大意见分歧。

**七、贯彻实施标准的要求、措施等建议**

实施该标准要求熟练掌握分子生物学实验操作，熟悉相关术语，操作准确。该标准可为相关种子管理部门、种子生产等单位对青稞品种鉴定等工作提供规范的技术操作规程。对《青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法》地方标准执行情况进行跟踪调查，及时发现标准执行中的问题，不断修改完善，提高标准的科学性、合理性，协调性和可操作性。

《青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法》标准起草小组

二〇二三年十月九日

附件 1：

# 工作组讨论稿征求意见汇总处理表

标准名称：青稞品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法　　承办人：　王寒冬　　联系电话：15597178855
标准起草单位：中国科学院西北高原生物研究所　　填写日期：　2023 年 10 月 30 日　　共 1 页

| 序号 | 标准的章、条编号 | 意见内容 | 提出单位（人员） | 处理意见及理由 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9.1.2 | 发芽籽粒（种子）数需≥50 个改为 100 个，也为 9.2.1 铺垫 | 青海大学（李宗仁） | 采纳 |
| 2 | 9.2.1 | 将“注”段，妥善处理 | 青海大学（李宗仁）、标准起草小组 | 采纳，已删除“注” |
| 3 | 11 | 将“判定方法”改为“结果应用” | 青海大学（李宗仁） | 采纳 |
| 4 | 7 | 分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ4 组。其他在本文件中未推荐的的非连锁引物也可使用。去掉 1 个“的”字 | 青海省农林科学院(赵志刚) | 采纳 |
| 5 | 11 | 当样品间差异位点数≥2（应确定附录 C 中 28 对引物范围内），则判定为“不同品种”; | 青海省农林科学院(赵志刚) | 采纳 |
| 6 | 8 | “当样品间检测出的差异位点数＜2 时，再选用附录 C 中Ⅱ组引物进行扩增若样品间检测出的累计差异位点数＜2 时，再依次选用Ⅲ、Ⅳ组引物”描述不明确，引物建议分为核心引物和扩展引物 | 青海省农林科学院（姚有华）、标准起草小组 | 采纳 |
| 7 | 9.1 | 增加种子纯度要求，SNP 检测对品种的纯度要求较高 | 青海省农林科学院(姚有华) | 采纳 |
| 8 | 11 | 对青稞来说“样品间差异位点数≥2”的要求是否太严格 | 青海省农林科学院(姚有华) | 未采纳，此判定方法是根据“区分青藏高原地区青稞品种所需的最少 SNP 标记”试验结果得出的结论，有相应的依据，因此未采纳相关建议 |

附件 2：

# 预审意见汇总处理表

**负责起草单位：** 中国科学院西北高原生物研究所

| 序号 | 标准条款 | 意见内容 | 提出意见专家 | 处理意见和理由 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 前言 | 增加可能涉及专利方面的说明 | 李毅 | 采纳 |
| 2 | 2 | 引用文件有两个标注了年份，年份删掉，保证现行有效 | 李毅 | 采纳 |
| 3 | 2 | 引用文件的排列顺序，强国标-推国标-行标 | 李毅 | 采纳 |
| 4 | 2 | 检索查找并确认有没有青稞等植物核酸提取的国标，或者在引用文件 GB/T 19495.3 和 GB/T 30988 二选一，建议删除 GB/T 30988 | 姚晓华、侯万伟 | 采纳 |
| 5 | 3 | 删除“其检测位点多态性高，检测结果重复性好” | 李毅 | 采纳 |
| 6 | 3 | 增加“送检样品”、“试验样品”的术语和定义 | 李毅 | 采纳 |
| 7 | 4 | 删除 4 原理 | 李毅、李宗仁 | 采纳 |
| 8 | 5 | 分别说明仪器设备见附录 A.1，试剂见附录 A.2 | 李宗仁、李毅 | 采纳 |
| 9 | 5 | 删除“除非另有说明，在分析中仅使用分析纯试剂” | 李毅、张剑 | 采纳 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 10 | 5 | 删除“一级水” | 张剑、姚晓华 | 采纳 |
| 11 | 7 | 删除“其他在本文件中未推荐的非连锁引物也可使用” | 姚晓华、侯万伟、张剑 | 采纳 |
| 12 | 8 | 将进行扩增后面的逗号改成句号 | 李毅 | 采纳 |
| 13 | 8 | 删除“直接选用”中的“直接”2 字 | 李毅 | 采纳 |
| 14 | 9.1 | 将“试验样品为种子时，其”改为“送检样品” | 张剑 | 采纳 |
| 15 | 9.1.1 | 删除“扦样”，仔细斟酌改写这一部分 | 李毅、李宗仁 | 采纳 |
| 16 | 9.1.2 | 删除“进行”后面的“发芽”二字 | 李宗仁 | 采纳 |
| 17 | 9.1.2 | 删除“（种子）” | 姚晓华 | 采纳 |
| 18 | 9.1.2 | 将“需”改为“须” | 李毅 | 采纳 |
| 19 | 9.1.3 | 将“真叶”改为“叶片” | 李宗仁 | 采纳 |
| 20 | 9.2 | 增加“DNA”2 字 | 李毅 | 采纳 |
| 21 | 9.2.1 | 将“具有相同效果”改为“商用” | 李毅 | 采纳 |
| 22 | 9.2.1 | 同样将“需”改为“须” | 侯万伟 | 采纳 |
| 23 | 9.3 | 删除“及以上的”和括号里的“NTC,” | 李毅 | 采纳 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 24 | 9.3 | 将“除由等量的”改为“用 2μL”，增加“其”字 | 李毅、李宗仁 | 采纳 |
| 25 | 9.3 | 删除“尽量” | 张剑 | 采纳 |
| 26 | 9.3 | 删除“一定体积的” | 侯万伟 | 采纳 |
| 27 | 9.3 | 删除“引物原液稀释至 10 μmol/L”，标在表格中 | 侯万伟、姚晓华 | 采纳 |
| 28 | 10 | 删除“通过使用参照品种，消除同型号不同批次间或不同型号荧光定量 PCR 仪间可能存在的系统误差。” | 李毅 | 采纳 |
| 29 | 11 | 删除“根据送检样品在 28 个 SNP 位点基因型的差异进行品种鉴定，” | 李毅、姚晓华 | 采纳 |
| 30 | 11 | 删除“对于利用附录 C 中 28 对引物仍未检测到≥2 个差异位点的样品，可按 NY/T 2466-2013 的规定进行田间种植鉴定。” | 李毅 | 采纳 |
| 31 | 11 | 增加“另外，可将试验样品数据结果直接与附录 D 参照品种 SNP 碱基类型进行比对，当与参照品种一致时，可以鉴定为某一品种。” | 李毅 | 采纳 |
| 32 | 附录 A | “资料性”改为“规范性”，删除“主要耗材” | 李毅 | 采纳 |
| 33 | 附录 B | “资料性”改为“规范性” | 李毅 | 采纳 |
| 34 | B1.1、B1.2 | 将“混合均匀”改为“充分溶解” | 李毅、张剑 | 采纳 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 35 | B1.2 | 删除“准确” | 张剑 | 采纳 |
| 36 | B1.3 | 依次加入…，再加入…，充分溶解后，用超纯水定容 | 李毅 | 采纳 |
| 37 | B1.4 | 删除 B1.4 | 李毅、李宗仁 | 采纳 |
| 38 | B1.5 | 增加“分装后灭菌” | 李毅 | 采纳 |