

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4475—2025

马铃薯品种真实性鉴定
SSR分子标记法

Potato (*Solanum tuberosum* L.) Variety genuineness identification—
SSR based methods

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

| | |
|-------------------------------------|----|
| 前言 | IV |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 缩略语 | 2 |
| 5 原理 | 2 |
| 6 检测方案 | 2 |
| 7 仪器设备、试剂和溶液配制 | 3 |
| 8 检测程序 | 4 |
| 9 鉴定意见 | 7 |
| 10 结果报告 | 7 |
| 附录 A(资料性) 溶液配制 | 9 |
| 附录 B(资料性) 24 对引物标记四色荧光的引物分组方法 | 11 |
| 附录 C(规范性) 等位变异扩增片段信息(毛细管电泳) | 12 |
| 附录 D(资料性) 参照样品及其等位变异信息 | 15 |

前 言

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有可能涉及专利。本文件的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本文件由农业农村部种业管理司提出。

本文件由全国农作物种子标准化技术委员会(SAC/TC 37)归口。

本文件起草单位：全国农业技术推广服务中心、中国农业科学院蔬菜花卉研究所、农业农村部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(黑龙江)、云南师范大学薯类作物研究所、北京市农林科学院、中国农业科学院作物科学研究所、深圳市农业科技促进中心、甘肃省种子总站、山西省农业种子总站、黑龙江省种业技术服务中心

本文件主要起草人：金黎平、晋芳、胡军、卞春松、白艳菊、李灿辉、庞斌双、关荣霞、王学林、孟思远、李巧英、肖长文、任雪贞、刘丰泽、金石桥。



马铃薯品种真实性鉴定 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 repeat, SSR)分子标记法进行马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)品种真实性检测的原则、检测方案、检测程序和结果报告。

本文件适用于马铃薯品种真实性验证和品种真实性身份鉴定,不适用实质性派生品种(Essential derived varieties, EDV)的鉴定。

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 3543.1 农作物种子检验规程 总则
- GB/T 3543.2 农作物种子检验规程 扦样
- GB/T 3543.5 农作物种子检验规程 真实性和品种纯度鉴定
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 7331 马铃薯种薯产地检疫规程
- GB 18133 马铃薯种薯

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

品种真实性验证 variety verification

与其对应品种名称的标准样品比较,检测证实供检样品的品种名称与标注是否相符。

3.2

品种真实性身份鉴定 variety identification

经 SSR 分子标记检测并通过已知品种 SSR 指纹数据比对平台筛查比较,确定供检样品的真实品种名称。

3.3

标准样品 standard sample

国家指定机构保存的代表品种特征特性的实物样品或 DNA 样品。

3.4

SSR 指纹数据比对平台 SSR fingerprint blast platform

采用 SSR 标记的标准化方法对品种标准样品的等位变异进行检测,并运用计算机数据库技术和网络信息技术所构建的品种分子数据信息的检索比对载体。

3.5

参照样品 reference sample

具有 SSR 位点上主要等位变异的品种,用于辅助确定试验样品的等位变异,校正仪器设备的系统误差。

3.6

引物组合 primer panel

用来最大能力区分马铃薯品种的所有引物的集合。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对(base pair)

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

DNA: deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸

dNTPs: deoxy-ribonucleoside triphosphates 脱氧核糖核苷三磷酸

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

PCR: polymerase chain reaction 聚合酶链式反应

SDS: sodium dodecyl sulfate 十二烷基硫酸钠

SSR: simple sequence repeat 简单重复序列

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸

TBE: Tris-Borate-EDTA 三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸二钠

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane 三羟甲基氨基甲烷

PVP: Polyvinyl-pyrrolidone 聚乙烯吡咯烷酮

Taq 酶: Taq-DNA polymerase 耐热 DNA 聚合酶

5 原理

马铃薯不同品种的基因组存在着能够世代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试验样品中提取 DNA, 用 SSR 引物进行扩增和电泳, 从而利用扩增片段大小不同而区分品种。

依据 SSR 标记检测原理, 采用 SSR 引物, 通过与标准样品比较或与 SSR 指纹数据比对平台比对的方式, 对品种真实性进行验证或身份鉴定。真实性验证依据 SSR 位点差异数目而判定, 品种真实性身份鉴定依据被检 SSR 位点无差异原则进行筛查、鉴定。

6 检测方案

6.1 总则

对于真实性鉴定, 引物、检测平台、样品状况不同, 其检测结果的准确度、精确度可能有所不同。应依据“适于检测目的”的原则, 统筹考虑检测规模和检测能力, 择定适宜的引物、检测平台、样品状况, 制订相应的检测方案。

在严格控制条件下, 合成选择的引物, 按照确定的检测平台对供检样品按 DNA 提取、PCR 扩增、电泳、数据分析的程序进行检测。

按规定要求填报检测结果, 检测报告应注明检测方案所选择的影响检测结果的关键信息。

DNA 提取、PCR 扩增和电泳的技术条件要求, 在适于检测目的和不影响检测质量的前提下, 按照检测平台的要求允许对本标准的规定做适宜的调整。

6.2 检测平台

6.2.1 对于马铃薯品种真实性验证或身份鉴定, 可选择采用变性 PAGE 垂直板电泳或毛细管电泳, 如需要利用 SSR 指纹数据比对平台, 则需要利用参照样品确定供检样品的指纹后, 再进行真实性身份鉴定。

6.2.2 对于样品数量较大的, 可将组织研磨仪、DNA 自动提取、自动移液工作站、高通量 PCR 扩增仪、毛细管电泳进行组合, 以提高检测的综合效率。

6.3 引物

遴选了 24 对 SSR 引物作为品种真实性验证和身份鉴定的引物, 具体见表 1, 引物编号为 St01~St24。

表 1 引物信息

| 编号 | 引物名称 | 染色体 | 上游引物序列(5'-3') | 下游引物序列(5'-3') |
|------|-----------------------------------|-----|--------------------------|----------------------------|
| St01 | STM1049 ^b | 1 | CTACCAGTTTGTGATTGTGGTG | AGGGACTTTAATTTGTTGGACG |
| St02 | S7 ^a | 2 | GACTGGCTGACCCTGAACTC | GACAAAATTACAGGAACGCAAA |
| St03 | S192 ^a | 3 | ACTTCTGCATCTGGTGAAGC | GGTCTGGATTCCCAGGTTG |
| St04 | S187 ^a | 4 | CCGTTGATGGGATTGCACA | TGATATTAACCATGGCAGCAGC |
| St05 | STI032 ^c | 5 | TGGGAAGAATCCTGAAATGG | TGCTCTACCAATTAACGGCA |
| St06 | S170 ^a | 7 | CGCAAATCTTCATCCGATTC | TCCGGCGGATAATACTTGTT |
| St07 | 31924 ^d | 8 | CGAAGACACCAAATCGCTCAG | GAAACGCCATTAACATTTTACATCG |
| St08 | S189 ^a | 9 | CCTTGTAGAACAGCAGTGGTC | TCCGCCAAGACTGATGCA |
| St09 | STM0037 ^b | 11 | AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC | ATTTGGTTGGGTATGATA |
| St10 | S118 ^a | 12 | AGAGATCGATGTAAAACACGT | GTGGCATTTTGATGGATT |
| St11 | STM2022 ^b | 2 | GCGTCAGCGATTTTCAGTACTA | TTCAGTCAACTCCTGTTGCG |
| St12 | STI0012 ^c | 4 | GAAGCGACTTCCAAAATCAGA | AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA |
| St13 | SSR08337 ^c | 4 | CGTTAAGGAGGAGGAGGAAAA | CCAAATAACGTGTTGAGCCC |
| St14 | STP _{oAc58} ^b | 5 | TTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG | ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC |
| St15 | S151 ^a | 6 | GCTGCTAAACACTCAAGCAGAA | CAACTACAAGATTCATCCACAG |
| St16 | S182 ^a | 6 | GGAAGTCTCAACTGGCTG | TCAACTATATGCCTACTGCCCAA |
| St17 | STM1106 ^b | 10 | TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG | ATGCGAATCTACTCGTCATGG |
| St18 | STG0026 ^c | 7 | ACTGCCGCAAAAAGTGAAAA | GCCGCTAGGTGGAGTAGATG |
| St19 | STM1104 ^b | 8 | TGATTCTCTTGCTACTGTAATCG | CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA |
| St20 | STM3012 ^b | 9 | CAACTCAAACCAGAAGGCAAA | GAGAAATGGGCACAAAAACA |
| St21 | STG0025 ^c | 10 | TGGAATCCGAATTACGCTCT | AGGTTTTTACCCTCGGGCTT |
| St22 | 43016 ^d | 11 | CAAGCTGCATGAAAGCCATC | TTTGCCTAAAAGTTTGTAGTGTGAGG |
| St23 | STI017 ^c | 11 | TATGGAAATTCGGTGATGG | GACGGTGACAAAGAGGAAGG |
| St24 | STM5121 ^b | 12 | CACCGGAATAAGCGGATCT | TCTTCCCTTCCATTTGTCA |

注:引物来源,a:Yanfeng Duan et al. (2018); b:Ying Wang et al. (2019); c:Shaoguang Duan(2017); d:Masahir Kishine (2017)。

6.3.1 品种真实性验证允许采用序贯方式,可以先采用引物 St01~St24 进行检测,若检测到可以判定不符结果的差异位点数的,可终止检测。也可直接采用表 1 的 24 对 SSR 引物进行检测。

6.3.2 品种真实性身份鉴定是在具备已知品种 SSR 指纹数据比对平台的前提下,通过构建供检样品的指纹,利用 SSR 指纹数据库比对平台能够筛查确定至具体品种。检测时采用表 1 的 24 对 SSR 引物进行检测,与 SSR 指纹数据比对平台比较筛查与试验样品指纹一致的品种。

6.4 样品

6.4.1 按照 GB 18133 与 GB 7331 的要求采集供检样品,供检样品的种苗(薯)数量应不少于 5 株(粒)。需要扦样的样品数量应符合 GB/T 3543.2 的要求。

6.4.2 供检样品可以为马铃薯幼苗、叶片、块茎等组织或器官。供检样品可采用混合样或单个个体,不少于 5 个个体。

7 仪器设备、试剂和溶液配制

7.1 仪器设备

7.1.1 DNA 提取

高速冷冻离心机、水浴锅或金属浴、紫外分光光度计、酸度计、组织研磨仪。

7.1.2 PCR 扩增

PCR 扩增仪。

7.1.3 电泳

7.1.3.1 毛细管电泳检测平台

遗传分析仪。

7.1.3.2 变性 PAGE 垂直板电泳

高压电泳仪、垂直板电泳槽及配套的制胶附件、水平摇床、胶片观察灯、数码相机或凝胶成像系统。

7.1.4 其他器具

微量移液器、电子天平、高压灭菌锅、磁力搅拌器、冰箱、染色盒、制冰机、超纯水仪等。

7.2 试剂

7.2.1 DNA 提取

CTAB、SDS、三氯甲烷、异戊醇、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、无水乙醇。

液氮、聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl-pyrrolidone, PVP)、CTAB、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)、三氯甲烷、异戊醇、氯化钠、乙醇、盐酸、氢氧化钠。聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl-pyrrolidone, PVP)。

7.2.2 PCR 扩增

模板 DNA、dNTPs、*Taq* 酶、 $10\times$ PCR Buffer(含 MgCl_2)、dd H_2O 、引物或者 $2\times$ *Taq* Mix 混合液。

7.2.3 电泳

7.2.3.1 毛细管电泳

与使用的遗传分析仪型号相匹配的分离胶、分子量内标、去离子甲酰胺、电泳缓冲液。

7.2.3.2 变性 PAGE 垂直板电泳

去离子甲酰胺(Formamide)、溴酚蓝(Bromophenol Blue)、二甲苯青(Xylene cyanole FF)、甲叉双丙烯酰胺(Bisacrylamide)、丙烯酰胺(Acrylamide)、硼酸(Boric Acid)、尿素、亲和硅烷(Bind-Silane)、疏水硅烷(Repel Silane)、DNA 分子量标准、无水乙醇、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、冰醋酸、硝酸银、甲醛、氢氧化钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

7.3 溶液配制

DNA 提取、PCR 扩增、电泳、银染的溶液按照附录 A 规定的要求进行配制,所用试剂均为分析纯。

试剂配制所用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水的要求,其中银染溶液的配制可以使用符合三级要求的水。

8 检测程序

8.1 DNA 提取

8.1.1 CTAB 法

选取试验样品的幼苗或叶片 300 mg~400 mg,加入液氮迅速研磨成粉末,转入 2.0 mL 的离心管中。在离心管中加入 65 °C 预热的 CTAB 提取液 700 μL ,按照 CTAB:PVP(V:m)为 100:1 添加适量 PVP,充分混匀,65 °C 水浴 60 min,其间多次轻缓颠倒混匀。待样品冷却至室温后,每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)混合液,充分混合后静置 10 min,在 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液转移至新的离心管中,加入等体积的三氯甲烷,充分混合后静置 10 min,在 12 000 r/min 离心 10 min。离心后再次吸取上清液移至新的离心管中,加入等体积的三氯甲烷,充分混合后静置 10 min,在 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液移至新的离心管中,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,轻轻颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,70%乙醇溶液洗涤 2 遍,自然干燥或在超净工作台上吹干。将干燥的 DNA 加入 50 μL 超纯水充分溶解,检测浓度并稀释至 50 ng/ μL ~100 ng/ μL ,置于 4 °C 备用或 -20 °C 保存。

CTAB 法适宜提取马铃薯幼苗、幼嫩叶片等组织或器官 DNA。

8.1.2 试剂盒法

选用适宜 SSR 标记法的商业试剂盒,并经验证合格后使用。DNA 提取方法,按照试剂盒提供的使用说明进行操作。

马铃薯块茎组织 DNA 适宜用多糖多酚 DNA 提取试剂盒提取,或者达到 8.1.1 或者其他达到 PCR

扩增质量要求的方法。

8.2 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。具体引物分组信息见附录 B。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 反应体系

PCR 扩增反应体系的总体积和组分的终浓度参照表 2 进行配制,可依据试验条件不同做适当调整。

表 2 PCR 扩增反应体系

| 反应组分 | 原浓度 | 终浓度 | 推荐反应体积, μL |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 10×PCR Buffer(含 Mg^{2+}) | 10× | 1× | 2.0 |
| dNTPs | 10 mmol/L | 0.4 mmol/mL | 0.8 |
| Taq 酶 | 5 U/ μL | 0.05U/ μL | 0.2 |
| 上游引物 | 10 $\mu\text{mol/L}$ | 1 $\mu\text{mol/L}$ | 1.0 |
| 下游引物 | 10 $\mu\text{mol/L}$ | 1 $\mu\text{mol/L}$ | 1.0 |
| 模板 DNA | 50 ng/ μL | 5 ng/ μL | 2.0 |
| ddH ₂ O | — | — | 13.0 |

注:使用 2×Taq Mix 混合液进行 PCR 扩增,可直接在反应体系中加入相应的引物和模板 DNA,加入量参照表 2,用 ddH₂O 补齐至反应总体积 20 μL 。

8.3.2 反应程序

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。通常采用下列反应程序:

- 预变性:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,1 个循环;
- 扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,每个循环降 0.8 $^{\circ}\text{C}$,进行 13 次循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,进行 24 次循环;
- 终延伸:72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.4 扩增产物分离

8.4.1 荧光毛细管电泳

8.4.1.1 按照预先确定的引物组合,将各引物的扩增产物等比例充分混匀,稀释 1 倍。吸取稀释后的混合液 1 μL ,加入遗传分析仪专用 96 孔上样板上。每孔再分别加入 0.15 μL 分子量内标和 8.85 μL 去离子甲酰胺,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,取出立即置于冰上,冷却 10 min 以上,离心 10 s 后备用。

8.4.1.2 打开遗传分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。将装有扩增产物的 96 孔上样板放置于样品架基座上,将装有电极缓冲液的 buffer 板放置于 buffer 板架基座上,打开数据收集软件,按照遗传分析仪的使用手册进行操作。遗传分析仪将自动运行参数,并保存电泳原始数据。

8.4.2 变性 PAGE 垂直板电泳

8.4.2.1 制胶

用洗涤灵和清水将玻璃板反复擦洗干净,再用蒸馏水冲洗干净后,竖置晾干。分别蘸取蒸馏水和 75%乙醇水平擦拭玻璃板 2 次,干燥后将亲和硅烷工作液均匀涂满无凹槽的玻璃板表面,疏水硅烷工作液均匀涂在有凹槽的玻璃板表面。

玻璃板干燥后,将 0.4 mm 厚的塑料隔条放在无凹槽的玻璃板两侧,盖上凹槽短玻璃板,用夹子将两侧固定好,用水平仪检测是否水平。量取 80 mL 6%的聚丙烯酰胺变性凝胶溶液、加入 60 μL 的 TEMED、180 μL 10%的过硫酸铵,轻轻摇匀后,沿着灌胶口轻轻灌入,防止气泡出现。胶灌满玻璃胶室,在凹槽处将鲨鱼齿梳子的平端插入胶液 5 mm~6 mm。室温下胶聚合 1 h~1.5 h 后,轻轻拔出梳子,用清水洗干净备用。玻璃板规格宜为 45 cm×35 cm。

8.4.2.2 变性

取 10 μL 扩增产物,加入 2 μL 6 \times 上样缓冲液,混匀。95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,取出立即置于冰上,冷却 10 min 以上备用。

8.4.2.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上,在电泳正极槽(下槽)加入 600 mL 的 1 \times TBE 缓冲液,负极槽(上槽)加入 600 mL 的 1 \times TBE 缓冲液,拔出梳子,在 1 800 V 恒压预电泳 20 min~30 min。

预电泳结束后,用注射器或吸管吹打胶面,以除去尿素和残胶。将鲨鱼齿梳子的锯齿面插入胶中 1 mm~2 mm。每一个样品梳加入 5 μL ~8 μL 变性样品,在 1 800 V 恒压下电泳。电泳的适宜时间参考二甲苯青指示带移动的位置和扩增产物预期片段大小范围(见附录 C)加以确定。扩增产物片段大小在 (100 \pm 30)bp、(150 \pm 30)bp、(200 \pm 30)bp、(250 \pm 30)bp 范围的,电泳参考时间分别为 1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.5 h。电泳结束后关闭电源,取下玻璃板并轻轻撬开,凝胶附着在无凹槽的玻璃板上。

8.4.2.4 银染

将携带有凝胶的长板放入塑料染色盒内,倒入固定液,置于摇床上轻摇 10 min。从固定液中取出凝胶玻璃板,在蒸馏水中漂洗 30 s~60 s。取出胶板移入硝酸银染色液中,轻摇 10 min 进行染色。然后将胶板移入去离子水中漂洗 30 s~60 s。再移入显影液中,轻轻摇动直至条带出现。待条带清晰,将胶放在胶片观察灯上观察记录结果,用数码相机或凝胶成像系统拍照保存。

固定液、染色液和显色液的用量以没过胶面为准。

8.5 数据分析

8.5.1 总则

8.5.1.1 电泳结果需要通过规定程序进行数据分析降低误读率。在引物等位变异片段大小范围内(见附录 C),对于毛细管电泳,特异峰呈现为稳定的单峰型、双峰型或连续峰型;对于变性 PAGE 垂直板电泳,特异谱带呈现稳定的单谱带、双谱带或连续谱带。

栽培马铃薯为高度杂合同源四倍体,当出现杂合位点时,毛细管电泳中会显示为稳定的 2 个或多个峰,在变性 PAGE 垂直板电泳中显示为稳定的两种或多种谱带。

8.5.1.2 对于位于相应等位变异扩增片段大小范围之外的谱带或峰值,需要甄别是非特异扩增还是新增的稀有等位变异。采用单个个体扩增的产物,出现 5 种或 5 种以上的多谱带或峰值则为非特异扩增;采用混合样品扩增的产物,某些位点出现 5 种或 5 种以上的谱带或峰值,或上下有弱带或左右有弱峰等情况出现时,则需要通过单个个体进行甄别。

8.5.1.3 对于毛细管电泳,由于不同引物扩增产物表现不同、引物不对称扩增、试验条件干扰等因素影响,可能出现不同状况的峰型,按照以峰高为主、兼顾峰型的原则依据下列规则进行甄别、过滤处置:

- 对于连带(pull-up)峰,即因某一位置某一颜色荧光的峰值较高而引起同一位置其他颜色荧光峰值升高的,应预先将其干扰消除后再进行分析;
- 对于同一位置出现 2 个相距 1 bp 左右的峰,应视为单峰;
- 对于高低峰,应通过设定一定阈值不予采集低于阈值的峰;

8.5.1.4 对于变性 PAGE 垂直板电泳,位于相应等位变异扩增片段大小范围之外的谱带需要甄别是非特异性扩增还是新增的稀有等位变异。采用单个个体扩增的产物,出现 5 种及 5 种以上的多带则为非特异性扩增;采用混合样检测的,某些位点出现 5 种以上的谱带或上下有弱带等情况出现时,则需要通过单个个体进行甄别。

8.5.1.5 采取混合样检测的,无论是毛细管电泳还是变性 PAGE 垂直板电泳,试验样品存在异质性时,宜采用单个个体独立检测,试样至少含有 5 个个体。

8.5.2 数据分析和读取

8.5.2.1 毛细管电泳

导出电泳原始数据文件,采用数据分析软件对数据进行甄别。

- 设置参数:在数据分析软件中预先设置好 panel、分子量内标、panel 的相应引物的 Bin(等位变异

片段大小范围区间)；

- b) 导入原始数据文件:将电泳原始数据文件导入分析软件,选择 panel、分子量内标、Bin、质量控制参数等进行分析；
- c) 甄别过滤处置数据:按 8.5.1 的规定执行。

数据比对采用 8.5.3.1、8.5.3.2 方式的,应分别通过同时进行试验的标准样品、参照样品种(依据引物选择少量的对照),校准不同电泳板间的数据偏差后再读取扩增片段大小。

8.5.2.2 变性 PAGE 垂直板电泳

对甄别后的特异谱带进行读取,统一采用分段式数据记录方式。根据每对 SSR 引物从供检样品中扩增出的条带大小,按照附录 C 各 SSR 引物等位变异位点信息确认 PCR 扩增位点信息,缺失位点数据记录为 0/0。

8.5.3 数据比对

8.5.3.1 采用与标准样品比较的,对甄别后的特异谱带或特异峰(见 8.5.1),按照在同一电泳板上的试验样品与标准样品逐个位点进行两两比较,确定其位点差异。

8.5.3.2 采用与 SSR 指纹数据比对平台比对的,按照数据导入模板的要求,将数据及其指纹图谱上传到 SSR 指纹数据比对平台,进行逐个位点在线比对,核实确定相互间的指纹数据的异同。

采用 PAGE 垂直板电泳与 SSR 指纹数据库比对平台比对较为困难,建议作为参考使用,比对前采取以下措施:

- a) 读取扩增产物片段大小数据的,供检样品与参照样品种(见附录 C 和附录 D)同时同一电泳板上电泳；
- b) 电泳时间足够,符合 8.4.2.3 的要求；
- c) 供检样品存在扩增片段为一个基序差异的,按片段大小顺序重新电泳进行复核确定后读取。

8.5.4 数据记录

数据比对后,按照位点存在差异或相同、数据缺失、无法判定等情形,记录每个引物的位点状况。

9 鉴定意见

9.1 检验结果用供检样品和标准样品比较的位点差异数表示。根据检验结果进行鉴定意见判断,一般分为 3 类:排除属于同一品种、不确定是否为同一品种和不排除属于同一品种。对于有争议的样品,可以按照 GB/T 3543.5 的规定进行田间小区种植鉴定。

9.2 鉴定意见可参考以下原则:

- a) 供检样品与标准样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数大于 3,排除两者为同一品种；
- b) 供检样品与标准样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数为 1、2 或 3,不确定两者为同一品种；
- c) 供检样品与标准样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数为 0,不排除两者属于同一品种。

10 结果报告

10.1 按照 GB/T 3543.1 的检验报告要求,对品种真实性验证或身份鉴定的检测结果进行填报。

10.2 对于品种真实性验证,采用下列方式进行填报:

通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,与标准样品比较检测出差异位点数_____个,差异位点的引物编号为_____,鉴定意见为:_____。

10.3 对于品种真实性身份鉴定,采用下列方式进行填报:

- a) 通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据比对平台筛查,供检样品与_____品种未检测出位点差异,鉴定意见为:_____。

- b) 通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据比对平台筛查,检测到供检样品与_____品种位点差异_____个,鉴定意见为:_____。
- c) 通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,经与 SSR 指纹数据比对平台筛查,未检测到与供检样品位点一致品种,无法鉴定品种身份。

10.4 属于下列情形之一的,应在检验报告中注明:

- a) 送验样品低于 6.4.1 规定数量;
- b) 与试验样品比较的标准样品的来源;
- c) 与 SSR 指纹数据比对平台进行数据比对;
- d) 试验品种异质性严重的位点(引物编号)清单;
- e) 检测采用其他 SSR 引物的名称及序列。

附 录 A
(资料性)
溶液配制

A.1 DNA 提取

A.1.1 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0)

称取 121.1 g Tris 溶于 800 mL 水中,加入 HCl 调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,高温高压灭菌后,室温保存。

A.1.2 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)

称取 186.1 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 水中,加入固体 NaOH 调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,高温高压灭菌后,室温保存。

A.1.3 5 mol/L NaCl 溶液

称取 146 g 固体 NaCl 溶于适量水中,充分搅拌溶解后,加水定容至 500 mL。

A.1.4 CTAB 提取液

称取 20 g CTAB、81.82 g 氯化钠、2 g PVP 溶于适量水中,量取 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)100 mL、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)40mL,调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,高温高压灭菌后,4 °C 保存。DNA 提取前,按照每 100 mL CTAB 溶液加入 2 mL β -巯基乙醇在 65 °C 水浴锅中预热。

A.1.5 三氯甲烷:异戊醇混合液

三氯甲烷、异戊醇两种有机溶剂按体积比 24 : 1 混匀。

A.1.6 1×TE 缓冲液

取 1 mol/L Tris-HCL 5mL、0.5 mol/L EDTA 1 mL,加 HCl 调 pH 至 8.0,加水定容至 500 mL,高温高压灭菌后,4 °C 保存。

A.1.7 0.1×TE 缓冲液

量取 20 mL 的 10×TE 缓冲液,加水定容至 200 mL,4 °C 保存。

A.2 PCR 扩增

A.2.1 SSR 引物

用超纯水分别配制上游引物、下游引物终浓度均为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的保存液。从 100 $\mu\text{mol/L}$ 的保存液中分别吸取上、下游引物各 10 μL ,再分别加入 90 μL 超纯水配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

A.3 电泳

A.3.1 6×上样缓冲液

去离子甲酰胺 98 mL、0.5 mol/L EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 2 mL、0.25 g 溴酚蓝和 0.25 g 二甲苯青混合摇匀,4 °C 备用。

A.3.2 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 18.61 g 二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于水中,NaOH 调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL,高温高压灭菌后,室温保存。

A.3.3 40% 19 : 1 聚丙烯酰胺溶液的配制

称取 380 g 的丙烯酰胺,20 g 的甲叉双丙烯酰胺溶于适量水中,加去离子水搅拌至完全溶解。加水定容至 1 000 mL 后,用普通滤纸过滤 2 次,于 4 °C 避光干燥处保存备用。

A.3.4 6%变性 PAGE 胶

称取 420 g 尿素、150 mL 的 40% 聚丙烯酰胺溶液、100 mL 的 10×TBE 溶液，加水定容至 1 000 mL，过滤后于常温避光干燥处保存备用。

A.3.5 亲和硅烷缓冲液

无水乙醇 49.75 mL 和 250 μ L 冰醋酸混匀，常温避光干燥处保存备用。

A.3.6 亲和硅烷工作液

取亲和硅烷工作液 1 mL、亲和硅烷原液 10 μ L 混匀，现用现配。

A.3.7 剥离硅烷溶液

量取 5 mL 剥离硅烷原液与 95 mL 的三氯甲烷混匀，于常温避光干燥处保存备用。

A.3.8 10%过硫酸铵溶液

称取 1 g 过硫酸铵溶于 10 mL 水中，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

A.3.9 10×TBE 缓冲液

称取 108 g 三羟甲基氨基甲烷碱、55 g 硼酸溶于水中，加入 0.5 mol/L EDTA 溶液 40 mL，加水定容至 1 000 mL，于常温避光干燥处保存备用。

A.3.10 1×TBE 缓冲液

量取 100 mL 的 10×TBE 缓冲液，加水定容至 1 000 mL，于常温避光干燥处保存备用。

A.4 银染

A.4.1 固定液

200 mL 冰醋酸，加水定容至 2 000 mL。

A.4.2 染色液

2 g 硝酸银，加水定容至 2 000 mL。

A.4.3 显色液

30 g 氢氧化钠和 5 ml 甲醛，加水定容至 1 000 mL。

附录 B

(资料性)

24 对引物标记四色荧光的引物分组方案

24 对引物标记四色荧光的引物分组方案见表 B.1。

表 B.1 24 对引物标记四色荧光的引物分组方案

| 组别 | 荧光标记(FAM) | 荧光标记(HEX) | 荧光标记(ROX) | 荧光标记(TAMRA) |
|----|-----------|-----------|-----------|-------------|
| 1 | STM0037 | S7 | S151 | STI0012 |
| 2 | S189 | STM1106 | STM2022 | STG0026 |
| 3 | S170 | STM1104 | S187 | SSR08337 |
| 4 | STM1049 | STPoAc58 | S192 | STI017 |
| 5 | 31924 | S182 | S118 | STM3012 |
| 6 | STI032 | STG0025 | STM5121 | 43016 |

注 1:每个组别的引物可以组合在一起电泳。
注 2:荧光染料 FAM、HEX、ROX、TAMRA 在此仅为示例。

附录 A

(资料性)

等位变异扩增片段信息(毛细管电泳)

表 C.1 列出了 24 对引物在已知马铃薯品种中扩增片段长度范围、主要等位变异扩增片段大小以及参照样品对应的等位变异信息。其中参照样品只是列举,考虑到在某一 SSR 位点多个品种存在相同的扩增片段大小,确认某一品种在该位点扩增片段大小与参照样品是相同的,该品种也可替代相应的参考样品。数据采用 ABI 3730 毛细管电泳仪器分析获得。

表 C.1 已知品种主要等位变异扩增片段信息

| 引物 | | | 等位变异扩增片段, bp | | 参照品种名称 |
|------|---------|-------------------------------------|--------------|------|----------|
| 编号 | 标记名称 | 重复单元 | 范围 | 片段大小 | |
| St01 | STM1049 | (ATA) ₆ | 179~199 | 179 | 中薯 3 号 |
| | | | | 186 | 高原 7 号 |
| | | | | 189 | 鄂马铃薯 5 号 |
| | | | | 199 | 川芋早 |
| St02 | S7 | (CA) _n (TC) _n | 120~152 | 120 | 中薯 3 号 |
| | | | | 128 | 中薯 3 号 |
| | | | | 132 | 中薯 3 号 |
| | | | | 136 | 鄂马铃薯 5 号 |
| | | | | 138 | 费乌瑞它 |
| | | | | 142 | 米拉 |
| St03 | S192 | (ATA) _n | 157~172 | 157 | 会-2 |
| | | | | 160 | 会-2 |
| | | | | 163 | 克新 1 号 |
| | | | | 172 | 会-2 |
| St04 | S187 | (AAG) _n | 214~240 | 214 | 中薯 3 号 |
| | | | | 217 | 中薯 3 号 |
| | | | | 220 | 春薯 3 号 |
| | | | | 226 | 春薯 3 号 |
| | | | | 240 | 中薯 18 号 |
| St05 | STI032 | (GCA) _n | 107~125 | 107 | 中薯红 1 号 |
| | | | | 110 | 大西洋 |
| | | | | 116 | 高原 7 号 |
| | | | | 119 | 高原 7 号 |
| | | | | 122 | 大西洋 |
| | | | | 125 | 会-2 |
| St06 | S170 | (GAA) _n | 105~144 | 105 | 中薯 3 号 |
| | | | | 111 | 中薯 18 号 |
| | | | | 117 | 中薯 3 号 |
| | | | | 125 | 中薯 18 号 |
| | | | | 128 | 米拉 |
| | | | | 144 | 中薯 18 号 |
| St07 | 31924 | (ATAC) _n | 164~251 | 164 | 中薯 3 号 |
| | | | | 214 | 中薯 3 号 |
| | | | | 219 | 中薯 3 号 |
| | | | | 223 | 中薯 3 号 |
| | | | | 231 | 夏波蒂 |
| | | | | 251 | 早大白 |

表 C.1 (续)

| 引物 | | | 等位变异扩增片段, bp | | 参照品种名称 |
|------|----------|--|--------------|------|-----------|
| 编号 | 标记名称 | 重复单元 | 范围 | 片段大小 | |
| St08 | S189 | (AAG) _n | 176~206 | 176 | 川芋早 |
| | | | | 179 | 蒙薯 10 号 |
| | | | | 182 | 中薯 3 号 |
| | | | | 185 | 中薯 3 号 |
| | | | | 191 | 川芋早 |
| | | | | 194 | 鄂马铃薯 14 号 |
| | | | | 197 | 蒙薯 10 号 |
| | | | | 203 | 中薯 18 号 |
| | | | | 206 | 中薯 3 号 |
| St09 | STM0037 | (TC) ₅ (AC) ₆ (AA(AC) ₇ (AT) ₄ | 69~84 | 69 | 大西洋 |
| | | | | 71 | 大西洋 |
| | | | | 75 | 中薯 3 号 |
| | | | | 77 | 中薯 3 号 |
| | | | | 82 | 中薯 3 号 |
| | | | | 84 | 川芋 10 号 |
| St10 | S118 | Compound(GT/GC)(GT) ₈ | 141~166 | 141 | 中薯 3 号 |
| | | | | 143 | 春薯 3 号 |
| | | | | 149 | 春薯 3 号 |
| | | | | 161 | 川芋 10 号 |
| | | | | 166 | 川芋早 |
| St11 | STM2022 | (CAA) ₃ …(CAA) ₃ | 172~243 | 172 | 大西洋 |
| | | | | 175 | 大西洋 |
| | | | | 181 | 川芋早 |
| | | | | 187 | 大西洋 |
| | | | | 228 | 川芋早 |
| | | | | 243 | 高原 7 号 |
| St12 | STI0012 | (ATT) _n | 167~191 | 167 | 早大白 |
| | | | | 170 | 闽薯 1 号 |
| | | | | 173 | 早大白 |
| | | | | 175 | 闽薯 1 号 |
| | | | | 185 | 早大白 |
| | | | | 188 | 宁薯 4 号 |
| | | | | 191 | 中薯红 1 号 |
| St13 | SSR08337 | (TG) _n | 183~203 | 183 | 闽薯 1 号 |
| | | | | 187 | 中薯 3 号 |
| | | | | 189 | 闽薯 1 号 |
| | | | | 203 | 中薯 3 号 |
| St14 | STPoAc58 | (TA) _n | 228~246 | 228 | 川芋早 |
| | | | | 232 | 中薯 3 号 |
| | | | | 240 | 川芋早 |
| | | | | 246 | 中薯 3 号 |
| St15 | S151 | (AAG) _n | 80~105 | 80 | 中薯 3 号 |
| | | | | 83 | 中薯 3 号 |
| | | | | 91 | 中薯 5 号 |
| | | | | 97 | 中薯 3 号 |
| | | | | 103 | 中薯 3 号 |
| | | | | 105 | 高原 7 号 |

表 C.1 (续)

| 引物 | | | 等位变异扩增片段, bp | | 参照品种名称 |
|------|---------|---------------------------------------|--------------|------|----------|
| 编号 | 标记名称 | 重复单元 | 范围 | 片段大小 | |
| St16 | S182 | (TCTT) _n | 135~157 | 135 | 春薯 3 号 |
| | | | | 139 | 春薯 3 号 |
| | | | | 144 | 中薯红 1 号 |
| | | | | 153 | 中薯 3 号 |
| | | | | 157 | 中薯 3 号 |
| St17 | STM1106 | (ATT) ₁₃ | 122~192 | 122 | 川芋 10 号 |
| | | | | 137 | 鄂马铃薯 5 号 |
| | | | | 140 | 鄂马铃薯 5 号 |
| | | | | 150 | 川芋 10 号 |
| | | | | 153 | 中薯 3 号 |
| | | | | 156 | 大西洋 |
| | | | | 159 | 川芋早 |
| 192 | 高原 7 号 | | | | |
| St18 | STG0026 | (CTCC) _n | 278~290 | 278 | 中薯 3 号 |
| | | | | 282 | 大西洋 |
| | | | | 286 | 德薯 2 号 |
| | | | | 290 | 大西洋 |
| St19 | STM1104 | (TCT) ₅ | 163~177 | 163 | 春薯 3 号 |
| | | | | 165 | 夏波蒂 |
| | | | | 168 | 夏波蒂 |
| | | | | 172 | 川芋 10 号 |
| | | | | 175 | 春薯 3 号 |
| 177 | 米拉 | | | | |
| St20 | STM3012 | (CT) ₄ (CT) ₈ | 166~207 | 166 | 中薯 3 号 |
| | | | | 194 | 大西洋 |
| | | | | 196 | 春薯 3 号 |
| | | | | 200 | 中薯 3 号 |
| | | | | 210 | 会-2 |
| St21 | STG0025 | (AAAC) ₅ | 194~202 | 194 | 川芋 10 号 |
| | | | | 198 | 中薯 3 号 |
| | | | | 202 | 中薯 3 号 |
| St22 | 43016 | (ATCC) _n | 177~233 | 177 | 高原 7 号 |
| | | | | 193 | 川芋 10 号 |
| | | | | 197 | 川芋早 |
| | | | | 205 | 川芋 10 号 |
| | | | | 209 | 中薯红 1 号 |
| | | | | 221 | 中薯红 1 号 |
| 233 | 大西洋 | | | | |
| St23 | STI017 | (CAT) _n (TAG) _n | 163~174 | 163 | 费乌瑞它 |
| | | | | 166 | 费乌瑞它 |
| | | | | 169 | 费乌瑞它 |
| | | | | 174 | 费乌瑞它 |
| St24 | STM5121 | (TGT) _n | 283~292 | 283 | 凉薯 17 |
| | | | | 286 | 大西洋 |
| | | | | 289 | 大西洋 |
| | | | | 292 | 晋薯 7 号 |

附 录 D
(资料性)
参照样品及其等位变异信息

参照样品及其等位变异信息见表 D. 1。

表 D. 1 参照样品及其等位变异信息

| 引物编号 | 中薯 3 号 | 中薯 5 号 | 中薯 18 号 |
|------|-----------------|-------------|-------------|
| St01 | 179/189 | 179/189 | 189 |
| St02 | 120/128/132 | 152 | 142 |
| St03 | 160/172 | 160/172 | 157/160/172 |
| St04 | 214/217 | 217/220/240 | 217/240 |
| St05 | 119/122 | 110/119/122 | 119/122 |
| St06 | 105/117/128 | 125 | 111/125/144 |
| St07 | 164/214/219/223 | 214/223/251 | 164/223 |
| St08 | 182/185/206 | 179/182/185 | 182/191/203 |
| St09 | 75/77/82 | 69/75/78/84 | 69/78/84 |
| St10 | 141/166 | 143/149/166 | 141/143/166 |
| St11 | 187 | 172/187/228 | 172/187 |
| St12 | 173 | 167/170/173 | 173/185 |
| St13 | 187/203 | 203 | 183/203 |
| St14 | 232/246 | 232 | 232 |
| St15 | 80/83/97/103 | 80/91/97 | 80/83/103 |
| St16 | 153/157 | 139/144/157 | 139/157 |
| St17 | 153 | 150/156 | 156 |
| St18 | 278 | 278/282 | 278/290 |
| St19 | 168/175 | 168 | 168/172 |
| St20 | 166/200 | 166 | 166 |
| St21 | 198/202 | 198/202 | 198/202 |
| St22 | 205 | 197/205 | 205 |
| St23 | 166/169/174 | 163/166/174 | 163/166/169 |
| St24 | 289 | 286 | 289 |