

ICS 65.020.01
CCS B 05

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4493—2025

番茄品种鉴定 SNP分子标记法

Identification of tomato varieties—SNP marker method

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部发布



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 缩略语	1
5 原理	1
6 主要仪器设备及试剂	1
7 溶液配制	1
8 引物信息及使用	2
9 参照品种及使用	2
10 操作程序	2
11 结果判定与表述	3
附录 A(规范性) 主要仪器设备及试剂	4
附录 B(规范性) 溶液配制	5
附录 C(资料性) 引物序列及分型等信息	6

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有可能涉及专利。本文件的发布机构不应承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部种业管理司提出。

本文件由全国植物新品种测试标准化技术委员会(SAC/TC 277)归口。

本文件起草单位：农业农村部科技发展中心、北京通州国际种业科技有限公司、北京市农林科学院蔬菜研究所。

本文件主要起草人：韩瑞玺、王均帅、霍秀爱、张建、马莹雪、刘迎春、刘宝安、张凯淅、张秀杰、王晨宇、温常龙、唐浩、冯艳芳、李媛媛、黄芳、王铭堂、刘雪景、庞雪兵。



番茄品种鉴定 SNP 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用单核苷酸多态性(SNP)标记进行番茄(*Solanum lycopersicum L.*)品种鉴定的术语和定义、缩略语、原理、主要仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息及使用、参照品种及使用、操作程序、结果判定与表述。

本文件适用于番茄品种 DNA 分子数据采集和品种鉴定。

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 3543.2 农作物种子检验规程 扦样
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- 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。
- CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)。
- DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。
- EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)。
- KASP:竞争性等位基因特异性 PCR(kompetitive allele specific PCR)。
- PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)。
- SNP:单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism)。
- Taq 酶:耐热 DNA 聚合酶(Taq-DNA polymerase)。
- TE:三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)。
- Tris:三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane THAM]。

5 原理

番茄品种的基因组中存在着能够世代稳定遗传的 SNP 位点。不同番茄品种在同一 SNP 位点的序列可能存在差异,这种差异可通过 PCR 扩增、测序、高分辨率熔解曲线法、基因芯片等方法进行检测,进而区分不同的品种。本文件推荐了基于 KASP 技术的荧光原位扫描检测方法。

6 主要仪器设备及试剂

主要仪器设备及试剂见附录 A。

7 溶液配制

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。溶液配制方法见附录 B。

8 引物信息及使用

引物序列及分型等信息见附录 C。可利用附录 C 中的引物序贯检测,当检测到的差异位点数能判定送检样品与对照样品不同时,停止检测。

9 参照品种及使用

参照品种用于辅助确定送检样品在某个位点的等位变异,宜与送检样品同时检测。

10 操作程序

10.1 样品准备

送检样品可为种子、幼苗、叶片等组织或器官。种子样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的规定。每份样品不少于 30 个个体,等量混合分析,必要时进行个体检测。

10.2 DNA 提取

取混合样本约 200 mg,置于 2.0 mL 圆底离心管中,经液氮冷冻后充分研磨;每管加入 600 μ L 预热到 65 °C 的 CTAB 提取液,充分混合;65 °C 水浴 45 min~60 min,每隔 15 min 轻缓颠倒混匀 1 次。每管加入与 CTAB 提取液等体积的三氯甲烷和异戊醇混合液,轻缓混匀后静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液转移至新的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,轻轻颠倒混匀,−20 °C 放置 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,用体积分数为 70% 的乙醇溶液洗涤 2 遍,晾干,加入 100 μ L 双蒸水或 TE 缓冲液充分溶解,检测 DNA 浓度和质量,4 °C 备用。

注 1:以上为推荐的 DNA 提取方法,DNA 质量能够满足 PCR 扩增要求的其他 DNA 提取方法均适用于本文件。DNA 溶液的紫外吸光度 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.7~2.0。

注 2:三氯甲烷和异戊醇混合液中三氯甲烷与异戊醇的体积比为 24:1。

10.3 SNP 基因分型

10.3.1 PCR 扩增

10.3.1.1 反应体系

PCR 反应可以在不同规格的 PCR 板或膜上进行,反应体系的总体积和各组分体积按照表 1 进行配制,设置 1 个空白对照和 2 个参照样品。

表 1 基于微孔板或微量反应孔膜平台的 PCR 反应体系

微孔板类型	96 微孔板, μ L	384 微孔板, μ L	微量反应孔膜, μ L
DNA 模板(30 ng/ μ L)	1.5	1	0.8
2×PCR MIX	5	2.5	0.78
引物工作液	0.14	0.07	0.02
双蒸水	3.36	1.43	—
总反应体积	10	5	1.6

注:微量反应孔膜为 Douglas Array Tape 平台的反应体系,1536 微孔板的反应体系参照微量反应孔膜配制。

10.3.1.2 反应程序

- 95 °C 10 min;
- 95 °C 15 s,57 °C 60 s,45 次循环;
- 若初始反应结束检测不到荧光信号,可继续 95 °C 15 s,57 °C 60 s,10 次~20 次循环。

10.3.2 荧光原位扫描

利用荧光原位扫描系统对 PCR 扩增产物进行基因分型,空白对照没有扩增信号或者扩增信号较弱,且参照品种等位变异与附录 C 的等位变异一致时,采集基因分型数据。

10.4 数据分析

10.4.1 数据记录

数据记录方式用 SNP 位点碱基符号表示基因型,如 AA、TT、CC 或 GG,缺失数据记录为“—”。数据质量需符合对应检测平台的质控要求。

10.4.2 数据比对及差异位点统计

逐一比对送检样品与对照样品每个位点的等位变异数据,按照位点相同、位点差异、数据缺失、无法判定情形记录每个位点的比对结果,统计检测位点数和差异位点数。

11 结果判定与表述

11.1 判定规则

当差异位点数大于 2,判定为“不同”;当差异位点数小于等于 2,判定为“疑同”。

11.2 结果表述

送检样品 _____ 与对照样品 _____(或对照样品 _____ 指纹)采用荧光原位扫描检测,检测位点数为 _____,差异位点数为 _____,判定为 _____。

附录 A
(规范性)
主要仪器设备及试剂

A. 1 主要仪器设备

- A. 1. 1 高速冷冻离心机;转速不低于 12 000 r/min。
- A. 1. 2 微量移液工作站或微量移液器。
- A. 1. 3 水浴锅或干式恒温金属浴:20 ℃~100 ℃。
- A. 1. 4 紫外分光光度计;波长定点扫描 230 nm、260 nm 和 280 nm。
- A. 1. 5 组织研磨仪。
- A. 1. 6 分析天平;感量为 0.01 g。
- A. 1. 7 pH 计。
- A. 1. 8 涡旋混合器。
- A. 1. 9 高压灭菌锅。
- A. 1. 10 PCR 扩增仪或水浴 PCR 扩增装置。
- A. 1. 11 荧光原位扫描系统:3 色及以上荧光。
- A. 1. 12 低温冰箱。

A. 2 主要试剂

- A. 2. 1 十六烷基三甲基溴化铵[C₁₆H₃₃(CH₃)₃NBr,CAS 号:57-09-0]。
- A. 2. 2 三氯甲烷(CHCl₃,CAS 号:67-66-3)。
- A. 2. 3 异戊醇(C₅H₁₂O,CAS 号:123-51-3)。
- A. 2. 4 异丙醇(C₃H₈O,CAS 号:67-63-0)。
- A. 2. 5 乙二胺四乙酸二钠(C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈,CAS 号:139-33-3)。
- A. 2. 6 三羟甲基氨基甲烷[NH₂C(CH₂OH)₃,CAS 号:77-86-1]。
- A. 2. 7 氢氧化钠(NaOH,CAS 号:1310-73-2)。
- A. 2. 8 氯化钠(NaCl,CAS 号:7647-14-5)。
- A. 2. 9 无水乙醇(CH₃CH₂OH,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 10 盐酸(HCl,CAS 号:7647-01-0)。
- A. 2. 11 β-巯基乙醇(C₂H₆OS,CAS 号:60-24-2)。
- A. 2. 12 聚乙烯吡咯烷酮[(C₆H₉NO)_n,CAS 号:9003-39-8]。

附录 B
(规范性)
溶液配制

B. 1 DNA 提取

B. 1. 1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠溶于 800 mL 水中, 加 NaOH 调 pH 至 8.0, 加水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

B. 1. 2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 60.55 g 三羟甲基氨基甲烷溶于 400 mL 水中, 加 HCl 调 pH 至 8.0, 加水定容至 500 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

B. 1. 3 CTAB 提取液

分别称取 20.0 g CTAB、81.7 g 氯化钠和 20.0 g 聚乙烯吡咯烷酮溶于约 700 mL 水中, 加入 100 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液、40 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液, 加水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却后加入 20 mL β-巯基乙醇, 摆匀备用。

B. 1. 4 TE 缓冲液

分别量取 5 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液和 1 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液, 加水定容至 500 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

B. 2 KASP 引物工作液

将附录 C 所示每个位点的三管引物干粉分别用水溶解至 100 μmol/L, 2 条上游引物和 1 条下游通用引物分别取 12 μL、12 μL、30 μL 混合, 再补 46 μL 水; 最终 2 条上游引物、1 条下游通用引物终浓度分别为 12 μmol/L、12 μmol/L、30 μmol/L。

附录 C
(规范性)
引物序列及分型等信息

表 C. 1 列出了 36 个 SNP 引物序列及分型等信息。

表 C. 1 引物序列及分型等信息

位点 编号	引物名称	染色体	等位 变异 1	等位 变异 2	参照品种 吉丽 601 千禧	引物序列 (5'-3')	侧翼序列
1	SNP73	3	G	A	GA	GG FAM;GGGATTTCAGAGAGATCAAAACTTATHEX;GGGATTTCAGAGAGATCAAAACTTAC Common:GAACCTTTATGCCCTCTGTGC	TCTCTTTTAAGAACGCTCCATGGAACCTTATGCCTCTTGAAATCCCTGA TTGCGCATCT[A/G]TAAGTTTGTATCTCTGTACAGATCTCACATACGTATC
2	SNP113	5	T	C	TC	TT FAM:TTGAAAGGTGATTGAGGAACG HEX:TTTGAAGGTGATTGAGGAACA Common:CATTTTACTCTCTATTTCGCTGA	CTCCAAACACCCATTACTCTCTCTATTTCGCTGAATCACCTTCAACCCATCGG CCAGCAGC[T/C]GTTCTCAATCACCTTCAAAACCCATCGG AGAAAACAACCAACTCACAAAC
3	SNP148	6	A	G	AA	AG FAM:AGATAAGGTCTCTCAAGGAAGC HEX:CAGATCAAGGTCTCTCAAGGAAGT Common:CTTGACCCACCAAAAGGAGG	TGTTAGGGAAAGAGGTACTTGACCCACCAAAGGAGGGA CTCTTGACT[A/G]CTTCCTTGAGAGACCTTGATCTGAAGC TCAGGAAGAATCATTTGCTTCG
4	SNP222	9	A	G	AG	GG FAM:CATAGGAGGGACACCATAGC HEX:CCATAGGAGGGACACCATAGT Common:TCTCTCGGTGGTAAAACCAT	ACAGAACCAAAATTAACCGTTCTCTCGGTGGTAAACCAT ACTCTGTCAT[A/G]CTATGGGTGTCCCCCTATAGTCCTGGTAGTT ATAAAGGGTGGACATTACTTTG
5	SNP338	11	G	A	GA	GG FAM:CCACCAAGGACTATAAGCAAAAGT HEX:CACCAAGGACTATAAGCAAAAGC Common:TGGCGAGGAATCAGTGCA	ACCATTAACAAACACAATTGCTGGCAGGAATCAGTGACAA ACTGGGCTTC[A/G]CTTTTGCTTATAGTCCTGGTAGTT ATATCATCTGTTCTTGAGAGGCAGC
6	SNP545	2	T	C	TC	TC FAM:GAGGCAGAGGAGTGGAAACGC HEX:GAGGCAGAGGAGTGGAAACGT Common:GAGCATTCTTGCTCCCTGGCA	GCCAAAGAGCAAGCTGAATCTGCTCAAGAGGAGGCAGAGGA GTGGAACAG[T/T/C]AAGTACGGCATTGCTGCCAAGGAAGCAA AGAATGCTCTTGAGAGGCAGC
7	SNP581	4	T	C	TT	CC FAM:GATTGTTGAGATTAAGGAATTGGTGC HEX:GATTGTTGAGATTAAGGAATTGGTGT Common:CCAATTATCCCCATCCATTCAACT	ATCGAAGGCCAGAAATTGTGATTATTGATTGTGGATTAAAGG AATTGGTTG[T/T/C]GGAGGTTGAAATGGATGGGAATAATTG GAGGGCCGCTCAGGCTCAGGCTC

表 C. 1 (续)

位点 编号	引物名称	染色体 等位 变异 1	等位 变异 2	参照品种 吉丽 601	参照品种 千禧	引物序列(5'-3')		侧翼序列
						等位 变异 1	等位 变异 2	
8	SNP654	10	T	C	TC	TT	HEX: CAGCCGAGGGTAGTAGTTCC	FAM: AGCCGCAGAGGTAGTAGTTCC
9	SNP697	12	A	G	AG	AA	Common: GTTGCCTCTCATCTCC	Common: TTCAACACCGAACCTAGTAATAGTCATC
10	SNP907	1	A	G	GG	AA	HEX: TCAGCTTGAGGTGAAGGAAACCTCTA	FAM: CAGCAGATGCTCATCGACT
11	SNP959	7	C	G	CG	CC	Common: TCAGCTTGAGGTGAAGGAAACCTCTA	FAM: CGTGAGGTGAAGGAAACCTCTG
12	SNP979	8	A	T	AA	AA	Common: CTTAAAGATGTTACAAAGACTAAATGG	Common: TCTTAACCTCATCACATTATA
13	SNP30	1	G	A	GG	GG	Common: TCTAAACTCTGTGCTCATTT	FAM: GGATCCATTCAATTCACTCACATTATA
14	SNP92	4	T	C	TT	CC	Common: ACCTCTGAGTGACACTCCAATT	Common: ACCTCTGACTGACACTCCAATC
15	SNP153	4	T	C	TC	TC	Common: AGAACATATATCTAAAGAGGAATGTTGC	FAM: CACAGCTTCTGTCACTCTCCG
16	SNP277	6	T	G	TG	TT	Common: GGGCTATCAAGTGTATTACAGAG	Common: ATCGCTGGATTAAGGCTAAGG
17	SNP348	9	C	G	GG	CG	Common: AGGCCATGTCAATTATCCTTA	FAM: ATGCCGAATATACTCTCTTACG

表 C.1 (续)

位点 编号	引物名称	染色体 等位 变异1	等位 变异2	参照品 种	引物序列(5'-3')	侧翼序列	
18	SNP366	9	A	G	AA	FAM: TGAGTAAAACATCGACTTTGCG HEX: TGAGTAAAACATCGACTTTGCA Common: GCAGCAATGCTAAAGGAAATC	
19	SNP382	10	T	C	TC	FAM: TCGCAATTAGCACTTGGTAAG HEX: TCGCAATTAGCACTTGGTAAA Common: CTTGGGTATGCACCTTTCG	
20	SNP386	11	A	G	GG	FAM: GTGGAGAAATCTTGTGACCC HEX: TGTGGAGAAATCTTGTGACCT Common: TACTCCCCCTCCCACGTT	
21	SNP425	12	A	G	GG	AA	FAM: TGTAGGGATTACTCTCTGTATGGAAC HEX: TGTAGGGATTACTCTCTGTATGGAAAT Common: CCCTGGGAAGTCTTCAATGTC
22	SNP519	1	A	G	AG	AA	FAM: TTTCCTCATAAAGTTCAATCTC HEX: TTTCCTCATAAAGTTCAATCTT Common: TGAATTAAGCTCAGAGTCAAAGAA
23	SNP527	2	T	C	TC	CC	FAM: AACGTCAAATGGGTCCCG HEX: AACGTCAAATGGGTCCCA Common: TTCTTACTTCTCAATAAACCTCAGGA
24	SNP554	2	T	G	TT	TG	FAM: CCTTCAAGATTTCATTCCTCTG HEX: TCCTTCAAGATTTCATTCCTCTT Common: TCATTATGTAAGAATCCTCAGCAC
25	SNP556	3	A	C	AC	CC	FAM: ACATATTCCACAGTCCAAATTGCTTG HEX: ACATATTCCACAGTCCAAATTGCTTT Common: AAATAAAGCTTGCATTGTAAGAGA
26	SNP574	3	T	C	CC	CC	FAM: TTCTTGAATGACTAAATGCAACC HEX: AATTCTTGAATCACTAAATGCACT Common: AGTTACAGATTCTCTACTTTCTTATTC
27	SNP612	7	T	C	TC	TT	FAM: GTTACTGAGTGCATTAGAAGATATIG HEX: TGTAACTGAGTGCATATGAAGATATTA Common: AACAAACAGGGTTGCTAACATTT

表 C.1 (续)

位点 编号	引物名称	染色体 等位 变异 1	等位 变异 2	参照品 种	引物序列(5'-3')	侧翼序列
28	SNP660	10	A	G	AG AA	FAM:TTTCCTCATTCGATCTCCG HEX:GTTCCTCATTCGATCTCCA Common:ATGGACGAAAGAAAAGAAAAAAGA
29	SNP676	11	A	G	AG GG	FAM:TATCAGGCCCTGGCTAGATGG HEX:TTATCAGGCCCTGGCTAGATGA Common:TAACTCGCCAATTGCAACACT
30	SNP690	12	A	T	AT AA	FAM:GCAGGCACCTGACTTCAAAAAA HEX:GCAGGCACCTGACTTCAAAAAA Common:GTTATCCCCAGATCTAGCTATAGT FAM:TGATGGTTCAAGTTCCAATCAC
31	SNP712	6	T	C	TC TT	HEX:TTGATGGTTCAAGTTCCAATCAT Common:ATAATTGTTGGTCTTTCATGATG FAM:AAATGCTAGGCCAATAAAATCAAAC
32	SNP860	12	A	C	AA AA	HEX:AATGCTAGGCCAATAAAATCAAAC Common:CATATGGTAACCTGCAGGGAGC
33	SNP895	1	C	A	CC CC	FAM:TTCTTTAACAAAGGTAACACTATGAGGA HEX:TCTTTAACAAAGGTAACACTATGAGGC Common:TCCATTGTTCAAGTTCCCTAA
34	SNP932	7	A	C	AA AA	FAM:CCACAACTCAATAACAAATCTAGCG HEX:GCCACAACTCAATAACAAATCTAGCT Common:CAAAATTGTTGTTAGTTATCGAG
35	SNP947	7	G	A	GG GG	FAM:CAGCTAACCAACCCCTATGTCA HEX:AGCTAACCAACCCCTATGTCA Common:AGTTTTAACCGTATTCCTATGTGA
36	SNP1022	8	A	G	GG AG	FAM:TTCCACAAAACCACCATCAAC HEX:TTCCACAAAACCACCATCAAT Common:CTACAAAGACTATTATCATGTTTCCT

注 1:吉丽 601 和干禧在 36 个 SNP 位点的等位变异信息,作为核对每批基因分型数据质量的参照样品。

注 2:等位变异 1 为与 HEX 荧光对应的变异,等位变异 2 为与 FAM 荧光对应的变异,每个点对应 3 条引物,分别为与 FAM 荧光、HEX 荧光对应的引物以及共用引物。采用其他荧光标记类型时,需使用参照品种校正数据。

注 3:所有位点及引物组合均由起草单位自主筛选和研发,参考基因组版本序号为 Tomato WGS chromosome v SL2.40。