

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3933—2021

---

## 水稻品种籼粳鉴定技术规程 SNP分子标记法

Technical code of practice for xian-geng identification in  
rice(*Oryza sativa* L.)SNP marker method

2021-11-09 发布

2022-05-01 实施

---



中华人民共和国农业农村部 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：中国水稻研究所。

本文件主要起草人：魏兴华、杨窑龙、徐群、章孟臣、王珊、冯跃、袁筱萍、余汉勇、王一平。

# 水稻品种籼粳鉴定技术规程 SNP 分子标记法

## 1 范围

本文件规定了利用 SNP 分子标记法对水稻(*Oryza sativa* L.)品种籼粳鉴定的术语和定义、缩略语、原理、试剂和材料、仪器和设备、试样制备、操作步骤、数据记录与统计及判定方法。

本文件适用于水稻品种的籼粳鉴定。

## 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 4404.1 粮食作物种子 第1部分:禾谷类
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**籼稻** *Oryza sativa* subsp. *xian*

水稻的两个亚种之一,主要分布于低纬度、低海拔的热带、亚热带的湿热地区,通常具有分蘖性较强、颖壳稃毛稀而短、第1穗节间长度较短、耐寒性弱的特点,与粳亚种间存在一定的生殖障碍。

### 3.2

**粳稻** *Oryza sativa* subsp. *geng*

水稻的两个亚种之一,主要分布于较高纬度的温带以及热带、亚热带的高海拔地区,通常具有分蘖性较弱、颖壳稃毛密而长或无、第1穗节间长度较长、耐寒性较强的特点,与籼亚种间存在一定的生殖障碍。

### 3.3

**单核苷酸多态性** single nucleotide polymorphism, SNP

基因组序列之间单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性。

### 3.4

**参照基因组** reference genome

序列分析过程中,以一个已知的样本,序列信息较为清楚的基因组序列为模板对照,该基因组即为参照基因组,本文件中参照基因组是粳稻品种日本晴基因组序列(版本号:IRGSP1.0)。

### 3.5

**籼型等位变异** *xian*-specific allele

在籼稻品种中分布概率极高并在粳稻品种中分布概率极低的等位变异。

### 3.6

**粳型等位变异** *geng*-specific allele

在粳稻品种中分布概率极高并在籼稻品种中分布概率极低的等位变异。

### 3.7

**籼型指数** *xian* index

籼型等位变异个数与所有等位变异个数的比值。

3.8

**粳型指数** *geng index*

粳型等位变异个数与所有等位变异个数的比值。

3.9

**籼粳特异位点** *xian-geng specific locus*

针对品种籼粳鉴定而提供的,能够将籼稻品种与粳稻品种区分开的位点。

3.10

**参照品种** *reference sample*

代表籼粳特异位点主要等位变异的一组样品。用于辅助确定待测样品在某个位点上的等位变异类型,校正仪器设备的系统误差。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

SNP:单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism)

KASP:竞争性等位基因特异性 PCR(competitive allele specific PCR)

FAM:羧基荧光素(carboxyfluorescein)

HEX:六氯荧光素(hexachloro fluorescein)

5 原理

由于水稻籼稻与粳稻亚种间遗传组成不同,基因组 DNA 序列存在大量特异单个核苷酸的差异。这种差异可以通过从供检样品中抽取有代表性的试样进行 DNA 提取,用籼粳特异性 SNP 位点引物进行扩增和分型,从而利用单核苷酸碱基不同而加以区分品种籼粳特性。

6 试剂和材料

以下所用试剂,除特殊注明外,均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.1 氯仿( $\text{CHCl}_3$ ,CAS 号:67-66-3)。

6.2 异戊醇( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ,CAS 号:123-51-3)。

6.3 异丙醇( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ,CAS 号:67-63-0)。

6.4 无水乙醇( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ,CAS 号:64-17-5)。

6.5 十六烷基三甲基溴化铵 $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{NBr}$ ,CAS 号:57-09-0]。

6.6 乙二胺四乙酸二钠( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$ ,CAS 号:6381-92-6)。

6.7 三羟甲基氨基甲烷 $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ,CAS 号:77-86-1]。

6.8 氯化钠( $\text{NaCl}$ ,CAS 号:7647-14-5)。

6.9 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ ,CAS 号:1310-73-2)。

6.10 2×PCR MIX。

6.11 70%乙醇:量取 350 mL 无水乙醇(6.4),用水定容至 500 mL,摇匀,备用。

6.12 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4 g 氢氧化钠(6.9)溶于水中,用水定容至 100 mL。

6.13 氯仿/异戊醇混合液:氯仿(6.1)和异戊醇(6.2)按体积比 24+1 混合配置而成。

6.14 DNA 提取液:分别称取 20 g 十六烷基三甲基溴化铵(6.5)、7.45 g 乙二胺四乙酸二钠(6.6)、6.05 g 三羟甲基氨基甲烷(6.7)、81.9 g 氯化钠(6.8)溶解于约 900 mL 水中,用氢氧化钠溶液(6.12)调节 pH 至

8.0,加水稀释到1 L。摇匀,备用。

6.15 引物混合液(9.2.1)。

## 7 仪器和设备

7.1 离心机:转速 $\geq 10\,000$  r/min。

7.2 分析天平:感量为0.01 g。

7.3 恒温水浴锅:温度范围室温~100 ℃。

7.4 pH计。

7.5 涡旋混合器。

7.6 普通PCR仪。

7.7 分子荧光扫描仪:荧光定量PCR仪、荧光酶标仪等具有检测FAM和HEX荧光的相关仪器。

## 8 试样制备

供检样品为种子时,其质量应符合GB 4404.1中对水稻种子纯度的要求。种子样品的分样,应符合GB/T 3543.2的规定。采用混合样或单株进行检测样品制备,混合样试样来源应至少含有30粒种子或30个单株的等量新鲜叶片,单株检测应不少于30粒种子样品或30个单株新鲜叶片样品。

## 9 操作步骤

### 9.1 DNA提取

对种子样品进行发芽取样,叶片样品可直接进行DNA提取。取种子发芽后的幼苗或成株叶片约500 mg置于研钵中,加液氮充分研磨,转移约200 mg样品至2.0 mL离心管。每管加入700  $\mu$ L经65 ℃预热的DNA提取液(6.14),充分混合,65 ℃水浴30 min,期间多次颠倒混匀。每管加入500  $\mu$ L的氯仿/异戊醇混合液(6.13),充分混合后静置10 min,10 000 r/min离心10 min。吸取上清液转移至一新离心管,加入2/3倍体积预冷的异丙醇(6.3),颠倒混匀,10 000 r/min离心10 min,弃上清液,用70%乙醇溶液(6.11)洗涤2遍,室温自然晾干后,加入100  $\mu$ L水,充分溶解,检测浓度后备用。要求浓度大于20 ng/ $\mu$ L,且DNA样品无降解、无污染。

注:以上为推荐的DNA提取方法。其他能够达到上述要求的DNA提取方法都适用于本文件。

### 9.2 SNP检测

采用KASP检测技术对样品在籼粳特异SNP位点(见附录A)进行分型。其中,粳稻参照品种为日本晴,籼稻参照品种为93-11。

#### 9.2.1 KASP引物制备

根据附录B中的引物序列信息合成引物,将每个位点的三管引物干粉用水溶解至100  $\mu$ mol/L,2条上游引物和1条下游通用引物分别取12  $\mu$ L、12  $\mu$ L、30  $\mu$ L混合,再补46  $\mu$ L水;最终2条上游引物、1条下游通用引物终浓度分别为12  $\mu$ mol/L、12  $\mu$ mol/L、30  $\mu$ mol/L。

#### 9.2.2 PCR反应体系

PCR反应可以选择在96孔板、384孔板或1536孔板进行,反应体系的总体积和各组分体积按照表1进行配制,每板应设空白对照与籼、粳参照品种对照。

#### 9.2.3 PCR扩增程序

反应程序中各反应参数可根据PCR扩增仪型号、酶、引物等不同而做出适当调整。通常采用下列反应程序:

- a) 94 ℃ 15 min;
- b) 94 ℃ 20 s,61 ℃ 60 s,以0.6 ℃/循环的速度下降,10次循环;
- c) 94 ℃ 20 s,55 ℃ 60 s,26次循环。

若初始反应结束荧光信号弱或分型不理想,可增加d)步骤:

d) 94 °C 20 s, 57 °C 60 s, 3 次循环。

表 1 KASP 检测中 PCR 反应体系

组分	96 孔板 μL/孔	384 孔板 μL/孔	1536 孔板 μL/孔	384 孔膜 μL/孔
DNA	1.5	1.5(烘干)	1.5(烘干)	0.8
2×PCR MIX(6.10)	5	1.5	0.5	0.8
引物混合液(6.15)	0.14	0.042	0.014	
ddH <sub>2</sub> O	3.36	1.5	0.5	—
总体积	10	3	1	1.6

9.2.4 SNP 分型

将 PCR 扩增产物利用分子荧光扫描仪(7.7)收集不同荧光信号(FAM: 492 nm; HEX: 535 nm), 根据荧光信号比值得出检测样品的 SNP 分型结果。

注: 以上为推荐的 SNP 分型方法, 其他能够准确区分籼粳特异 SNP 位点的分型方法均可用于本文件。

10 数据记录与统计

对每个 SNP 分型信息进行记录, 根据附录 A 进行籼型、粳型及杂合型归类, 若 SNP 分型结果出现附录 A 以外的 SNP 等位变异, 则将其归类为缺失。统计籼型 SNP、粳型 SNP、杂合型 SNP 以及缺失的数目。

注: 缺失值不能超过 8 个, 否则需重新检测或更换 SNP 分型方法。

11 判定方法

采用籼型指数或粳型指数进行籼粳鉴定。 $I_x$  按公式(1)计算,  $I_g$  按公式(2)计算。

$$I_x = \frac{SNP_x \times 2 + SNP_{xg}}{(SNP_x + SNP_{xg} + SNP_g) \times 2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $I_x$  —— 籼型指数;
- $SNP_x$  —— 籼型 SNP 的数目, 单位为个;
- $SNP_g$  —— 粳型 SNP 的数目, 单位为个;
- $SNP_{xg}$  —— 杂合型 SNP 的数目, 单位为个。

计算结果保留 2 位有效数字。

$$I_g = 1 - I_x \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$I_g$  —— 粳型指数。

计算结果保留 2 位有效数字。

当供检样品籼型指数为 0.50 时, 该样品鉴定为中间型; 当供检样品籼型指数大于 0.50 时, 该样品鉴定为籼稻; 当供检样品籼型指数小于 0.50 时, 该样品鉴定为粳稻。

当供检样品粳型指数为 0.50 时, 该样品鉴定为中间型; 当供检样品粳型指数大于 0.50 时, 该样品鉴定为粳稻; 当供检样品粳型指数小于 0.50 时, 该样品鉴定为籼稻。

附 录 A  
(规范性)  
籼粳特异 SNP 位点信息

40 个籼粳特异 SNP 位点信息见表 A.1。

表 A.1 40 个籼粳特异 SNP 位点信息

位点编号	染色体	位置	FAM/HEX	粳型 SNP	籼型 SNP	杂合型 SNP
IG1	Chr. 1	12556378	A/T	A	T	A/T
IG2	Chr. 1	17768964	C/A	C	A	C/A
IG3	Chr. 1	22381235	T/G	T	G	T/G
IG4	Chr. 1	28913384	C/T	C	T	C/T
IG5	Chr. 2	12079928	A/G	A	G	A/G
IG6	Chr. 2	20225356	T/G	T	G	T/G
IG7	Chr. 2	29516322	C/G	C	G	C/G
IG8	Chr. 2	33038088	C/A	C	A	C/A
IG9	Chr. 3	2936058	G/A	G	A	G/A
IG10	Chr. 3	3461333	G/T	G	T	G/T
IG11	Chr. 3	4109581	C/T	C	T	C/T
IG12	Chr. 3	32716455	T/C	T	C	T/C
IG13	Chr. 4	12290320	A/G	A	G	A/G
IG14	Chr. 4	20612989	C/T	C	T	C/T
IG15	Chr. 4	24973823	T/C	T	C	T/C
IG16	Chr. 5	21148417	A/C	A	C	A/C
IG17	Chr. 5	25953822	C/G	C	G	C/G
IG18	Chr. 6	12025192	A/G	A	G	A/G
IG19	Chr. 6	20626254	G/A	G	A	G/A
IG20	Chr. 6	31235380	C/T	C	T	C/T
IG21	Chr. 7	8962741	C/A	C	A	C/A
IG22	Chr. 7	14923259	A/G	A	G	A/G
IG23	Chr. 7	17136369	T/C	T	C	T/C
IG24	Chr. 7	28782595	C/T	C	T	C/T
IG25	Chr. 8	14427488	C/A	C	A	C/A
IG26	Chr. 8	18903527	A/G	A	G	A/G
IG27	Chr. 8	21801474	G/A	G	A	G/A
IG28	Chr. 8	28268656	T/C	T	C	T/C
IG29	Chr. 9	3099717	T/C	T	C	T/C
IG30	Chr. 9	4396038	C/T	C	T	C/T
IG31	Chr. 9	14812651	T/C	T	C	T/C
IG32	Chr. 9	16775838	G/A	G	A	G/A
IG33	Chr. 10	14820587	T/C	T	C	T/C
IG34	Chr. 10	20325921	G/A	G	A	G/A
IG35	Chr. 10	21759092	G/A	G	A	G/A
IG36	Chr. 11	808969	A/G	A	G	A/G
IG37	Chr. 11	5533977	G/A	G	A	G/A
IG38	Chr. 12	18352099	C/G	C	G	C/G
IG39	Chr. 12	24494788	A/C	A	C	A/C
IG40	Chr. 12	27263526	G/T	G	T	G/T

注:物理位置参照日本晴参照基因组序列(版本号:IRGSP1.0)。

**附 录 B**  
**(规范性)**  
**推荐 KASP 引物信息**

推荐 KASP 引物信息见表 B.1。

**表 B.1 推荐 KASP 引物信息**

位点 编号	引物 编号	Primer_FAM	Primer_HEX	Primer_Common
IG1	kasp1	AGCTTCGCCAACAAAGTCGCTCA	AGCTTCGCCAACAAAGTCGCTCT	GCGCCGGAGAGGACGACCAT
IG2	kasp2	ATAGCGGTACCGGATCTCTACC	ATAGCGGTACCGGATCTCTACA	TAAGTTCCAAATACGCATATCCGCTACTT
IG3	kasp3	CGAATATGTGGCCACAAGTCATAA	CGAATATGTGGCCACAAGTCATAC	CTAATAACATGCAGCTACTTCACTGATTA
IG4	kasp4	GTAAAGTGGGAAGACATGGCATTTT	AGTAAAGTGGGAAGACATGGCATTTT	GTTTCTGTGAAACCAGGCCACTAA
IG5	kasp5	GCTTCTCCCGTGGTGT	CTGCTTCTCCCGTGGTGC	GACAAGCACGTGGTGGCTT
IG6	kasp6	GGCGATGATTTGGTGCATCGAACT	GCGATGATTTGGTGCATCGAAACG	TAATGGCTACTAAAAACAGCCAAAGTCTAA
IG7	kasp7	GACGGCTCGAGGATGCG	GACGGCTCGAGGATGCGG	CTTGTGGAGTGGTCTGGAA
IG8	kasp8	CGTGGCCAGCAGGCGTC	CGTGGCCAGCAGGCGTA	GCATGATACTGCTGCAGCCACTT
IG9	kasp9	CTGCATCCAAAGCCAAATCGGC	CTTGCATCCAAAGCCAAATCGGT	CTACACACTCCAGGCCGTGCTT
IG10	kasp10	GAAAAAGCCCCACGAAGACTTT	AAAAGCCCCACGAAGACTTTC	TTCCCTCCCATTTACATATGGTAAAAA
IG11	kasp11	CCGCCCTGCCATCTTCAATC	CCGCCCTGCCATCTTCAATF	GAGATCGAGGAGGTCCGGTTA
IG12	kasp12	CATGAATCAACTTATTTTGGGACAGCAT	ATGAATCAACTTATTTTGGGACAGCAG	CCCTTCTTATTAAGTAGGAGCTTCAATTT
IG13	kasp13	CCACCGCTCCACCCCGT	CACCGCTCCACCCCGC	GCGGGACGGAGGGGAGGAA
IG14	kasp14	ATAAGTAAATTTTATGTTCTATCATCTAACAAC	ATAAGTAAATTTTATGTTCTATCATCTAACAAT	CAACGCTTCAATGTTTATCTTTCGAAA
IG15	kasp15	ATTTCTTTGAAGATGGTTCCCGCA	CTTGAAGATGGTTCCCGCG	CACCATCCACACTACGCCAA
IG16	kasp16	AAAAAATATTTTCTCGAAAATCACACGACAT	AAAAAATATTTTCTCGAAAATCACACGACAG	TACTGCTTATTTGGGACTGCTFAGACAT
IG17	kasp17	GGATTCGCTTGCACCTGGACGC	GCTTCTGCACCTGGACGG	ACCGCATCTTGCAAATCTGAACCTTCTAAT
IG18	kasp18	GGAGATCGAATTTGGATTTGCTGCTA	GAGATCGAATTTGGATTTGCTGCTG	CGCAGCATCCATGTAATTAGTTGATCAAT
IG19	kasp19	AGTGGGTCAGAGTCTTTCC	AGTGGGTCAGAGTCTTTCT	TTGCAGGAAACTATCTGATATAGACCCAT
IG20	kasp20	ATGAAGCTGTACTGAACAAGTCTG	GATGAAGCTGTACTGAACAAGTCTA	TCTCTTAAATGGACTGAGTGGGTT
IG21	kasp21	CACATTCACCAGTTTGTATATCTTAAAC	AATCACATTCACCAGTTTGTATATCTTAAA	CAACCTAATCAGGCTAACCAITCAATCAT
IG22	kasp22	TGCTCTGGAAGAAGGGCTCCA	GCTCTGGAAGAAGGGCTCCG	CCGATCTAGCAACGCTGGCGAA
IG23	kasp23	CCGACCTTACTACGACTGGT	CCGACCTTACTACGACTGGC	CGAGCTGTAGCGGATCAGGTT
IG24	kasp24	AGTAAAAATTATATATGCAGTTTCATCACATAC	AGTAAAAATTATATATGCAGTTTCATCACATAT	CCACATCTCTTCTCTCTCAACAGTATT
IG25	kasp25	GCGTGGCGCCGACCAG	CGCGTGGCGCCGACCAT	GCGCGCCCTCTCTGTCTA
IG26	kasp26	AACTAAAAGAAAATTTTGTTCATGATAGGATAA	AACTAAAAGAAAATTTTGTTCATGATAGGATAG	CACTAGTGAGAATGGGACAAATTTTCACAA
IG27	kasp27	CATGCACAGGTGCGGTGCG	CCATGCACAGGTGCGGTGCA	GTCGGCATATGTGGCACGGCAT
IG28	kasp28	GGGTCCGAGCGGAAGATCGT	GGTCCGAGCGGAAGATCGC	CCGCCAGGTTGGCTTCGAA
IG29	kasp29	CTTGTTTTTCGGATGAAATTTTATGTATATAA	CTTGTTTTTCGGATGAAATTTTATGTATATAA	CCTGGAAGAAAATATTATGGAAAGAGTTGTT
IG30	kasp30	TTTGTAGATAATGGAAAATGGTTTACATCTCC	TTTGTAGATAATGGAAAATGGTTTACATCTCT	GGGAGAACAGATTTATCCCTTTATAATCTAA
IG31	kasp31	GCGCCGCGCCACCA	CCGCCGCGCCACCG	GGCGACGATGCTCCGTTCTCTT
IG32	kasp32	AAATTTGTCTTAACCTTCCATCCATTTT	TAATTTGTCTTAACCTTCCATCCATTTT	GGATTTGGGAAAAAATGGATGGAAATGGAA
IG33	kasp33	GTTTCTAGAAGTCCAGTTAAGCGTCA	TCTAGAAGTCCAGTTAAGCGTCA	GGTTGAAGGCAGGCCATAAAAAGAGTA
IG34	kasp34	TCCAGCGCACTATAGCAC	CTGCTTCCAGCGCACTATAGCAT	ATCTTTACGTCTGTCTTACTTGTATTA
IG35	kasp35	AGCCTCCACTTGGTGGCG	CAGCCTCCACTTGGTGGCA	TCTGGACCATGGCGGATCAT
IG36	kasp36	ATTCTTATGGACAATTTGGACATGGTAA	CCTATGGACAATTTGGACATGGTAG	GTGACCAAGAAGAGAACAAGGAGCAA
IG37	kasp37	GCCGCTGGCTTGGCG	CGCGCTGGCTTGGCCA	GCGGCAACTGTTGACGGAAAT
IG38	kasp38	CTTCTTTGTAAAATCAGAAAACCTTCAACAG	CTTCTTTGTAAAATCAGAAAACCTTCAACAC	GCGGCTGATTTCTTGTGGACATTT
IG39	kasp39	ATCATAATTTGCATAGCTTACAAAACAATGTT	CATATTTGCATAGCTTACAAAACAATGTG	GGTCAGTTCAACCAAGCCATGCTAA
IG40	kasp40	GGGCTAATGGAAGCCCATTT	ATGGGCTAATGGAAGCCCATTT	CTATCTTGTGAAGGCCAACAGATGTT



中华人民共和国  
农业行业标准  
水稻品种籼粳鉴定技术规程  
SNP 分子标记法  
NY/T 3933—2021

\* \* \*

中国农业出版社出版  
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)  
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷  
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

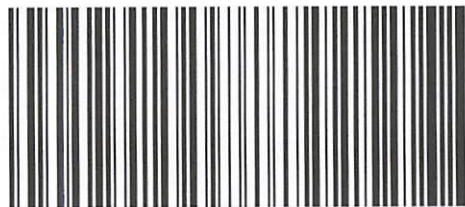
开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字  
2022 年 3 月第 1 版 2022 年 3 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8883

定价: 24.00 元

---

版权专有 侵权必究  
举报电话: (010) 59194261



NY/T 3933—2021