

DB 63

青 海 省 地 方 标 准

DB 63/T 2549—2026

燕麦品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法

2026 - 05 - 07 发布

2026 - 06 - 01 实施

青海省市场监督管理局 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。

本文件由青海省农牧业标准化技术委员会提出。

本文件由青海省农业农村厅归口。

本文件起草单位：中国科学院西北高原生物研究所、青海省农作物种子站、青海省饲草料技术推广站、青海省乡村产业发展指导中心、海南州农牧业综合服务中心、青海天兴草业有限公司、青海省农业农村能源与资源保护技术指导服务中心。

本文件主要起草人：王寒冬、徐金青、沈裕虎、王蕾、边海燕、杨彩凤、侯留飞、王健斌、陈同睿、李春桥、唐有林、陈永祥、曹占英、张国军、汪忠善、任阳阳。

本文件由青海省农业农村厅监督实施。

燕麦品种鉴定技术规程 SNP 分子标记法

1 范围

本文件规定了燕麦品种鉴定SNP分子标记法的相关术语和定义、缩略语、技术流程、主要仪器设备
及试剂、溶液配制、推荐引物、操作程序、数据记录、结果判定等技术要求。

本文件适用于燕麦品种（系）和种质资源的鉴定。

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 3543.2 农作物种子检验规程 第2部分：扦样
- GB/T 3543.4 农作物种子检验规程 第4部分：播种质量 发芽试验
- 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
- GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法
- GB/T 30988 多酚类植物基因组DNA提取纯化及测试方法
- GB/T 34265 Sanger法测序技术指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

SNP 标记

基于单核苷酸多态性的分子标记。

3.2

推荐引物

用本文件进行品种（系）和种质资源鉴定时选用的一套SNP引物。

3.3

等位变异

同源染色体同一基因位点上存在的不同等位基因形式。

3.4

参照品种

具有所用SNP位点上不同等位变异的品种。

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)
- dNTPs: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphates)
- EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid)
- 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)
- TBE: 三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸 (Tris-borate-EDTA)
- 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 技术流程

燕麦品种鉴定SNP分子标记法技术流程如图1所示。

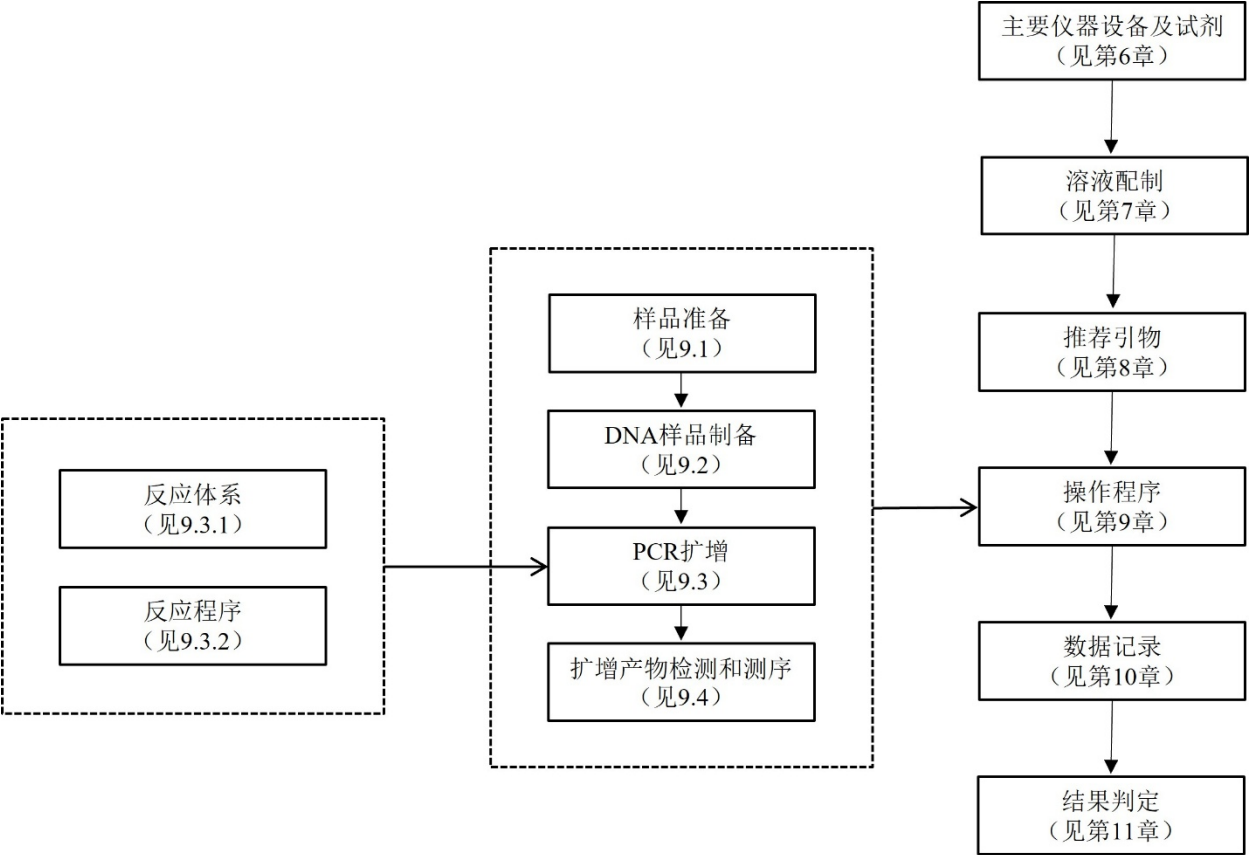


图1 燕麦品种鉴定技术流程图

6 主要仪器设备及试剂

主要仪器设备及试剂见附录A，所用试剂均为分析纯。本文件使用的超纯水须符合GB/T 6682的规定。

7 溶液配制

见附录B。

8 推荐引物

见附录C。

9 操作程序

9.1 样品准备

种子质量应符合GB 4404.1的规定。各待检品种的分样应符合GB/T 3543.2的规定。按照GB/T 3543.4的规定进行发芽，发芽的籽粒数须大于等于50粒。植株长至三叶一心时，随机抽取10株，采取叶片混样进行样品制备。

9.2 DNA 样品制备

按照GB/T 19495.3的方法或采用商用的植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA的提取。试验样品DNA纯度、浓度测试应符合GB/T 30988的规定。

9.3 PCR 扩增

9.3.1 反应体系

将附录C中各组推荐引物分别稀释至10 $\mu\text{mol/L}$ ，DNA浓度稀释至100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。各组反应体系为25 μL ，包含10 $\times$ PCR反应缓冲液2 μL ，2.5 mmol/L dNTPs溶液1.6 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物0.5 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物0.5 μL ，Taq酶0.2 μL ，超纯水18.2 μL ，样品DNA 2 μL 。

9.3.2 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，53 $^{\circ}\text{C}$ ~61 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s，不同引物退火温度见附录C；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min，共30个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

9.4 扩增产物检测和测序

按照GB/T 30988中的琼脂糖凝胶电泳法进行电泳检测。将扩增产物送样至生物公司按照GB/T 34265中的方法进行测序，获得扩增产物的相应序列。

10 数据记录

将测序序列与附录D中各标记的参考序列进行比对，记录待检样品在各标记中的变异情况。

11 结果判定

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

另外，可将待检品种数据结果直接与附录E参照品种SNP碱基类型的数据进行比对，当与参照品种一致时，可以鉴定为某一品种。

附 录 A
(规范性)
主要仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

PCR扩增仪、电子恒温不锈钢水浴锅、电子天平、磁力搅拌机、高速台式离心机、高通量组织研磨仪、微量分光光度计、高压灭菌锅、酸度计、微量移液器、电泳仪、凝胶成像系统、冰箱。

A.2 主要试剂

乙二醇四乙酸二钠、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、十六烷基三甲基溴化铵、 β -巯基乙醇、Tris-饱和酚、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、Taq酶、琼脂糖、溴酚蓝、硼酸、二甲苯青FF、甘油、核酸染料。

附录 B

(规范性)

溶液配制

B.1 DNA提取试剂

B.1.1 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 溶液

称取186.1 g的EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加800 mL超纯水，充分溶解，用NaOH固体调节pH至8.0，定容至1000 mL。在103.4 kPa (121℃) 条件下灭菌20 min，室温保存。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液

称取121.1 g的Tris，加800 mL的超纯水，充分溶解。用浓HCl (质量分数为36%~38%) 调节pH至8.0，定容至1000 mL。灭菌温度和时间同B.1.1，室温保存。

B.1.3 CTAB提取液

依次加入CTAB 20.0 g、氯化钠81.7 g、100 mL Tris-HCl溶液 (pH 8.0) (见B.1.2) 和40 mL EDTA溶液 (pH 8.0) (见B.1.1)，再加入超纯水，充分溶解后，用超纯水定容至1000 mL。灭菌温度和时间同B.1.1，4℃保存。

B.1.4 TE缓冲液

取10 mL 1 mol/L Tris-HCl溶液 (pH 8.0) (见B.1.2) 和2 mL 0.5 mol/L EDTA溶液 (pH 8.0) (见B.1.1)，加入超纯水，混合均匀，定容至1000 mL。分装后灭菌，灭菌温度和时间同B.1.1，室温保存。

B.2 琼脂糖凝胶电泳试剂

B.2.1 5×TBE缓冲液

依次加入Tris 54.0 g，硼酸27.5 g，20 mL 0.5 mol/L EDTA溶液 (见B.1.1)，再加入超纯水，充分溶解后，用超纯水定容至1000 mL。用时稀释为1×TBE电泳缓冲液。室温保存。

B.2.2 6×上样缓冲液

称取EDTA 8.8 g，二甲苯青FF 0.5 g，溴酚蓝0.5 g，加入360 mL甘油，调节PH至7.0，磁力搅拌充分溶解后，定容至1000 mL，4℃保存。

附 录 C
(规范性)
推荐引物

推荐引物见表C.1

表C.1 推荐引物

引物	标记	退火温度 (°C)	引物序列 (5'-3')	扩增产物长度 (bp)
GM1	GMI_ES17_c899_571	55	Forward: TCAGGTGCTTGACGACGATT Reverse: CCCCTGCACCGAATCAATCA	185
GM2	GMI_ES22_c10988_296	53	Forward: GAGGTGGAAGGTTGGAGCTGAAC Reverse: ACAGCAAGGCATGGCATGACAG	231
GM3	GMI_ES14_c6176_603	55	Forward: AGGCACCTTGAATGGGACTG Reverse: TTGAAAAGGCAGGGGTAGGG	569
GM4	GMI_ES_CC7903_312	55	Forward: CTTTCCGAACAACACGCAACTCAG Reverse: TGCCTCCAACCTCACAGCCATTG	201
GM5	GMI_ES01_c12759_163	55	Forward: CCAGCAGCCACAGCAATTTTCATTC Reverse: GAAGCATCATCGGAGCACTGACC	206
GM6	GMI_ES_CC3511_395	58	Forward: GTCTTGTACCCCTGCTGGAAAAG Reverse: GCGAGGAGACTCTCACTTTGCTTG	310
GM7	GMI_ES01_c677_223	58	Forward: CTGGCATCAAGGTGGACAAGGG Reverse: TCACATAGGCACAGCGGTCAATG	303
GM8	GMI_ES05_c15526_511	61	Forward: CATGATAGCTGGTGGAGCCG Reverse: CCCTGTCAGCTCTTTGACCAT	288

附 录 D
(规范性)
SNP 标记参考序列

各SNP标记参考序列见表D.1

表D. 1 SNP 标记参考序列

标记	SNP	参考序列
GMI_ES17_c899_571	[T/C]	TGATAGCAACGTGATTGTGCGAAGCATCAT[T/C]GGGCAGTTGTGTGCGAAGCATGTGTGTGTG
GMI_ES22_c10988_296	[T/G]	GTGTTAAGGTTTCAGAACGAAGAAATTACTA[T/G]GATGGGAGTAAGTAGGTTTATGTTTGGGG
GMI_ES14_c6176_603	[A/G]	AGCAATGGGTTTGATACGATTCTTTTGTTG[A/G]AGCCTATCTTGAATTGTTGCTGGTTGGTT
GMI_ES_CC7903_312	[T/C]	TGCTATCCCACCCCAATACCTTCTCGGATA[T/C]GATGCAGCAAGACTCGCTAGGGCGGCTCCA
GMI_ES01_c12759_163	[T/C]	CTACAGCACTGTTTATGGAAGCCCTCCCAA[T/C]AACGCTGCTACTTTTGTTGCTGTCCTTCCT
GMI_ES_CC3511_395	[T/C]	TGTGAAGCTGTTATGCAATTCTAGTTAAGG[T/C]GACATGGCGCGGTGTTTGTATCTGGTCCAA
GMI_ES01_c677_223	[T/C]	GGACAAGGGCACCATCGAGCTCGCTGGAAC[T/C]GACAAGGAGACCACCACCCAGGGCCATGAT
GMI_ES05_c15526_511	[T/G]	TTACAATGACTTAATGGAGCTTACTGAAGA[T/G]ATGATATCTGGTATGGTCAAAGAGCTGACA

附 录 E
(资料性)
参照品种 SNP 碱基类型

参照品种推荐引物变异位点SNP碱基类型见表E.1

表E.1 参照品种推荐引物变异位点 SNP 碱基类型

品种名称	GM1	GM2	GM3	GM4	GM5	GM6	GM7	GM8
加燕 2 号	TT	TT	AA	TT	TT	TT	TC	TG
林纳	CC	GG	GG	CC	CC	TT	CC	TG
青海 444	TT	GG	GG	TT	TT	CC	CC	TG
青引 1 号	TT	TT	AA	CC	CC	TT	CC	GG
青引 2 号	TT	GG	GG	TT	CC	CC	CC	GG
青引 3 号	TT	GG	GG	CC	TT	CC	CC	GG
蒙燕 1 号	CC	GG	AA	CC	TT	TT	TC	TG
青海甜燕麦	CC	GG	AA	CC	TT	CC	CC	GG
白燕 2 号	TT	TT	GG	TT	CC	TT	CC	GG
巴燕 5 号	TT	GG	GG	TT	CC	CC	CC	TG
燕科 2 号	TT	TT	AA	CC	TT	TT	CC	GG
坝燕 6 号	TT	TT	AA	CC	TT	CC	CC	GG
冀张燕 3 号	TT	TT	AA	TT	CC	CC	TC	GG
白燕 14 号	CC	GG	GG	CC	CC	TT	CC	GG
冀张燕 4 号	TT	GG	AA	CC	CC	TT	TC	GG
白燕 7 号	CC	GG	AA	TT	CC	TT	CC	TG
冀张燕 5 号	CC	GG	AA	CC	CC	TT	TC	TG
定引 1 号	CC	TT	AA	CC	TT	CC	CC	TG
内燕 5 号	CC	TT	GG	CC	CC	TT	CC	TG
定燕 2 号	CC	TT	GG	TT	TT	CC	CC	TG
蒙农大 2 号	CC	GG	GG	TT	CC	TT	CC	GG
定莜 9 号	TC	TT	AA	CC	CC	TT	CC	TG
蒙农大 1 号	CC	GG	AA	TT	CC	TT	TC	TG
白燕 15 号	CC	TT	AA	CC	TT	CC	TC	GG
草莜 1 号	CC	TT	GG	CC	TT	CC	TC	GG