

ICS 65.020.01  
B 05

# DB 37

## 山东省地方标准

DB 37/T 3801—2019

---

### 花生品种纯度鉴定技术规程—SSR 标记法

Protocol of purity identification for peanut variety using

SSR markers

2019 - 12 - 24 发布

2020 - 01 - 24 实施

---

山东省市场监督管理局 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 原理 .....	2
5 仪器设备 .....	2
6 试剂 .....	2
7 溶液配制 .....	2
8 引物信息 .....	2
9 操作步骤 .....	2
9.1 样品准备 .....	2
9.2 单粒种子的 DNA 提取 .....	2
9.3 PCR 扩增 .....	3
9.4 PCR 产物检测 .....	3
10 判定方法与原则 .....	4
10.1 判定方法 .....	4
10.2 判定原则 .....	4
附录 A (规范性附录) 溶液配制 .....	5
附录 B (资料性附录) 推荐引物 .....	7
附录 C (资料性附录) 参照品种名单 .....	9

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由山东省农业农村厅提出并组织实施。

本标准由山东省农业标准化委员会归口。

本标准起草单位：山东省花生研究所。

本标准主要起草人：单世华、闫彩霞、赵小波、李春娟、王娟、苑翠玲、孙全喜、宋秀霞。

# 花生品种纯度鉴定技术规程—SSR 标记法

## 1 范围

本标准规定了利用简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)标记法进行花生(*Arachis hypogaea* L.) 品种鉴定的原理、仪器设备及试剂、操作步骤、判定方法与原则。

本标准适用于试验样品为种子的花生品种的纯度鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**品种纯度** Variety purity

品种在SSR标记带型上典型一致的程度,反映鉴定品种的特征特性。

### 3.2

**简单重复序列** Simple sequence repeat (SSR)

由几个核苷酸(1~6个)为重复单位聚集而成的长达几十个至几百个bp(一般为100~200)的串联重复序列,又称微卫星序列或短串联重复序列,其多态性主要来源于串联数目的不同。

### 3.3

**推荐引物** Recommended primer

根据最少引物区分最多品种的原则,筛选出多态性高,条带清晰、重复性好的一套SSR引物。

### 3.4

**参照品种** Reference variety

具有推荐SSR位点上不同等位变异的花生品种,用于辅助确定送检样品的等位变异,校正仪器设备的系统误差。

## 4 原理

不同花生品种由于遗传组成不同，基因组中重复单位的数目存在差异，造成了品种间的多态性。可根据其两端的高度保守序列设计特异引物，通过PCR扩增及电泳检测，从而鉴定花生品种的纯度。

## 5 仪器设备

高压灭菌锅（105 ℃~136 ℃，最大工作压力0.22 MPa）；凝胶自动扫描仪（400百万像素）；高速冷冻离心机（最大离心力不小于15000 g）；PCR扩增仪（0 ℃~100 ℃）；紫外分光光度计（波长190 nm~1100 nm）；恒温水浴锅（室温~99 ℃）；水平摇床（0 rpm~230 rpm）；微波炉（耐温120 ℃）；电子天平（最小显示0.01 g）；电泳槽（样品通量1.0 mm厚）；磁力搅拌器（0 r/min~2500 r/min，室温~100 ℃）；酸度计（-2.00~20.000 pH）；微量移液器（2 μl、10 μl、100 μl、200 μl、500 μl和1000 μl）。

## 6 试剂

乙二胺四乙酸钠（EDTA-Na<sub>2</sub>）；三羟基甲基氨基甲烷（Tris）；盐酸（HCl，36 %）；十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）；氯化钠（NaCl）；硼酸（Borate）；丙烯酰胺；甲叉双丙烯酰胺；四甲基乙二胺（TEMED）；无水乙醇；过硫酸铵（APS）；硝酸银（AgNO<sub>3</sub>）；琼脂糖；6×loading buffer；Gold View染料；RNAase（10 ug·μL<sup>-1</sup>）；酚:氯仿:异戊醇（体积比25:24:1）；异丙醇；四硼酸钠；甲醛；2×Fremonts Mix；SSR引物（10 μmol·L<sup>-1</sup>）；20 bp DNA Ladder；重蒸水或符合GB/T 6682规定的一级水。除特殊说明外，所用试剂均为分析纯试剂。

## 7 溶液配制

相关溶液配制方法见附录A。

## 8 引物信息

推荐引物的序列信息与等位变异见附录B。

## 9 操作步骤

### 9.1 样品准备

鉴定样品的分样和保存，应符合GB/T 3543.2的规定。随机取100粒花生种子，取其父母本材料各10份，另取参照品种（见附录C）各2粒。水培法种植，至第三片真叶长出后备用。

### 9.2 单粒种子的DNA提取

#### 9.2.1 DNA提取

取单株幼苗的根、茎、叶等器官50 mg，放入1.5 mL离心管中，液氮研磨。CTAB法提取基因组DNA，加入100 μl 1×TE（pH 8.0）溶液溶解DNA。完全溶解后每管加入5 μl RNAase，37 ℃温育1 h，-20 ℃保存备用。

## 9.2.2 DNA 浓度和质量检测

测定DNA溶液的 $OD_{260}/OD_{280}$ 值，确保在1.7~2.0范围内。测定其 $OD_{260}$ 的吸光度，以1个 $OD_{260}$ 值相当于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DNA浓度来计算纯化DNA的浓度。用0.8 %琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性，Gold View染料进行染色。稀释至工作浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，置于4 °C备用。

## 9.3 PCR 扩增

### 9.3.1 反应体系

总体系为10  $\mu\text{L}$ ，包括1.5  $\mu\text{L}$  DNA，1.9  $\mu\text{L}$ 水，5  $\mu\text{L}$  2×Fremonts Mix，0.8  $\mu\text{L}$  F/R引物，混匀。

### 9.3.2 反应程序

95 °C预变性3 min；95 °C变性45 s，55 °C退火45 s，72 °C延伸45 s，进行35个循环；72 °C延伸5 min；4 °C保存备用。

## 9.4 PCR 产物检测

### 9.4.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶制备

#### 9.4.1.1 玻璃板组装

清洗玻璃板和52齿梳，晾干；用95 %乙醇擦凹板和平板，两板间插入1.0 mm厚的边条，对齐，夹紧，凹板朝上，水平放置，用水平仪调平。

#### 9.4.1.2 灌胶

在小烧杯中加入7.5 mL 6 %聚丙烯酰胺凝胶溶液、37 mL水，然后加500  $\mu\text{L}$  10 %APS及20  $\mu\text{L}$  TEMED，轻轻摇匀，防止产生气泡；迅速灌胶，将梳子齿朝外，轻轻插入胶中，至凹板玻璃面约0.8 cm处，静置1 h。

### 9.4.2 电泳检测

#### 9.4.2.1 玻璃板组装

将制好的胶板固定于垂直电泳槽上，凹板向内。上下槽中各加入1×TBE缓冲液，至下槽液面约为槽高的1/3，上槽液面高于凹板玻璃面约1 cm。

#### 9.4.2.2 清洗胶孔

拔去梳子，冲洗胶孔，赶走底层气泡和杂质。

#### 9.4.2.3 上样

在10  $\mu\text{L}$  PCR产物中加入2  $\mu\text{L}$  6×loading buffer，用微量移液器上样，每孔加入2  $\mu\text{L}$  PCR扩增产物；同时，在两侧样品孔中加入20 bp DNA Ladder分子量标记。

#### 9.4.2.4 电泳

电压为200 V，根据指示剂位置调整时间，至青蓝色的二甲苯青指示剂到达胶板的2/3处，停止电泳，电泳时间约2 h。

### 9.4.3 银染显色

#### 9.4.3.1 水洗

电泳结束后，分开两块玻璃板取出凝胶，用水漂洗10 s~20 s，重复2次。

#### 9.4.3.2 银染

转移至400 mL 0.1 % AgNO<sub>3</sub>溶液中，在摇床上轻摇10 min。

#### 9.4.3.3 水洗

从染色液中取出，在水中快速漂洗2次，时长8 s~10 s。

#### 9.4.3.4 显影

转移至400 mL显色液中，在摇床上轻摇至带纹清晰，用水冲洗至溶液澄清。

#### 9.4.3.5 成像

将凝胶置于凝胶成像工作台，选用透射UV光，调节focus至图像最清晰，保存。

### 10 判定方法与原则

#### 10.1 判定方法

每个SSR位点的等位变异采用扩增片段长度的形式表示，利用凝胶分析软件Quantity one读取条带。比较每份样品在每个位点的等位变异，统计带型。用具有本品种特异带型的种子粒数占检测样品种子粒数的百分率表示纯度，计算公式如式1：

$$\text{纯度}\% = \frac{\text{具有本品种特异带型的种子粒数}}{\text{检测样品种子粒数}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

#### 10.2 判定原则

如差异位点数=0，则说明该品种纯度为100%，判定为“单一品种”；如差异位点数=1，判定为“姊妹系”或“基本稳定品种”；如差异位点数≥2，则判定为“混合样品”。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

A.1 DNA提取试剂

A.1.1  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH

4 g NaOH, 加水定容至100 mL。

A.1.2  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-Cl (pH 8.0) 溶液

称取121.1 g Tris, 加水定容至1 L, 浓盐酸调至pH 8.0, 高压灭菌备用。

A.1.3  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8.0) 溶液

称取186.1 g EDTA- $\text{Na}_2$ , 800 mL水, 加热定容至1 L,  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH调至pH 8.0, 高压灭菌备用。

A.1.4 1×TE

1 mL  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mL  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8.0), 加水定容至100 mL。

A.1.5 DNA提取液

4 g CTAB, 16.364 g NaCl, 20 mL  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-Cl (pH 8.0), 8 mL  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8.0), 加水定容至200 mL, 4 °C条件下保存。使用前加入2 %的巯基乙醇, 实验前预热至65 °C。

A.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂

A.2.1 70 %乙醇

700 mL无水乙醇, 加水定容至1 L。

A.2.2 10×TBE缓冲液

分别称取108 g三羟基氨基甲烷, 55 g硼酸, 加入800 mL水加热溶解, 再加入 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8.0) 溶液37 mL, 加水定容至1 L。

A.2.3 1×TBE缓冲液

100 mL 10×TBE, 加水定容至1 L。

A.2.4 10 %APS

0.5 g APS溶于5 mL水中。

A.2.5 6 %聚丙烯酰胺凝胶溶液 (29:1)

分别称取58 g丙烯酰胺, 2 g甲叉双丙烯酰胺, 100 mL 10×TBE, 加水定容至1 L, 4 °C条件下保存。



A.2.6 染色液

称取1 g硝酸银，加水定容至1 L。

A.2.7 显色液

6 g NaOH，0.2 g四硼酸钠，1.6 mL甲醛，加水定容至400 mL。

## BB

附 录 B  
(资料性附录)  
推荐引物

B.1 推荐引物见表B.1。

表B.1 推荐引物

序号	引物	连锁群	引物序列 (5' →3' )	常见等位变异 bp	参照品种
8	GM1996	B03	F-catcccatcattttccctctt R-tacagtgaaggtgggatcctg	77 77/92 85 87 89 92	zh. h5034 zh. h2477 zh. h5327 zh. h1395 zh. h2764 zh. h2405
9	GM2638	A04	F-atgctctcagttcttgctga R-cagacataacagtcagtttcacc	45 55 57 63 65 69 69/73 73	zh. h1689 zh. h2702 zh. h2384 zh. h4749 zh. h5327 zh. h2250 zh. h1843 zh. h0949
10	GNB317	未定位	F-gaaaagcttgcaaaatcgaga R-tccttccatgttggtgaatg	188 194 197 200 203 212 224 227 230	zh. h2550 zh. h0540 zh. h2561 zh. h2405 zh. h2764 zh. h5034 zh. h2462 zh. h0537 zh. h4749
11	GNB357	未定位	F-aggtttgctttgggatgatg R-ccgataaaaccaggcaagaa	191 191/203 194 197 203 215 218	zh. h5034 zh. h0436 zh. h1602 zh. h2406 zh. h0537 zh. h0861 zh. h1331

表B.1 推荐引物 (续)

序号	引物	连锁群	引物序列 (5' → 3' )	常见等位变异 bp	参照品种
12	GNB556	A01	F-tcagggtagggttaccaacat R-taatccacattgaaccgacg	56 56/71 62 68 71 77 80 86	zh. h0525 zh. h5327 zh. h0934 zh. h2413 zh. h2410 zh. h0868 zh. h2231 zh. h1331
13	PM308	未定位	F-ccttcttctttctctcctca R-caattcgtgatagtattttattggaca	64 74 78 80 82 86 92	zh. h5034 zh. h4749 zh. h0977 zh. h2764 zh. h2464 zh. h2405 zh. h0680
14	pPGPseq2C11	A03	F-tgacctcaatTTTgggaag R-gccactattcatcgcggta	385 403 418 439 450 461	zh. h2456 zh. h2764 zh. h4749 zh. h2405 zh. h2406 zh. h0436
15	pPGSseq19D6	B05	F-tttgttatgetcacaccca R-aaaatgaagcaatattttgtttag	180 180/192 192 192/204 200 204 210	zh. h4779 zh. h5327 zh. h2406 zh. h2152 zh. h2508 zh. h0537 zh. h5034

CC

附 录 C  
(资料性附录)  
参照品种名单

## C.1 参照品种名单见表C.1

表C.1 参照品种名单

序号	种质库统一编号	品种名称	序号	种质库统一编号	品种名称
1	zh. h0099	赣榆小站秧	38	zh. h2292	沂山半旱种
2	zh. h0102	启东赤豆花生	39	zh. h2330	全州凤凰花生
3	zh. h0125	涡阳站秧	40	zh. h2384	英德白沙鸡豆仔
4	zh. h0436	蒲庙花生	41	zh. h2405	试花1号
5	zh. h0477	睦屋拔豆	42	zh. h2406	试花3号
6	zh. h0525	锦交1号	43	zh. h2410	博山站秧子
7	zh. h0531	滕县滕子花生	44	zh. h2413	沂南小麻叶
8	zh. h0537	巨野小花生	45	zh. h2425	嘉祥长秧
9	zh. h0540	栖霞爬蔓小花生	46	zh. h2426	沂南大铺秧
10	zh. h0678	托克逊小花生	47	zh. h2456	郑72-5
11	zh. h0680	北京大粒墩	48	zh. h2461	长垣一把抓
12	zh. h0764	昆崙大粒墩	49	zh. h2462	濮阳837
13	zh. h0861	反修1号	50	zh. h2464	濮阳二糙
14	zh. h0868	栖霞半糠皮	51	zh. h2466	王屋花生
15	zh. h0930	莱芜蔓	52	zh. h2477	开封大拖秧
16	zh. h0934	夏津小二秧	53	zh. h2499	南江大花生
17	zh. h0949	牟平大粒蔓	54	zh. h2508	南溪二郎子
18	zh. h0977	汶上蔓生	55	zh. h2550	霸王鞭
19	zh. h1315	发财生	56	zh. h2561	潜山大果
20	zh. h1331	柳城筛豆	57	zh. h2562	宿松土花生
21	zh. h1377	北镇大花生	58	zh. h2591	邵东中扯子
22	zh. h1395	花33	59	zh. h2608	大埔种
23	zh. h1585	洪洞花生	60	zh. h2682	岑巩藤花生
24	zh. h1602	辽中四粒红	61	zh. h2702	锦交四号
25	zh. h1672	临县花生	62	zh. h2764	早熟红粒
26	zh. h1689	青川小花生	63	zh. h4673	秭归磨坪红皮花生
27	zh. h1797	鄂花5号	64	zh. h4749	赣花2326
28	zh. h1816	金寨蔓生-80选	65	zh. h4779	汕油523
29	zh. h1843	茶陵打子	66	zh. h4923	桑植C
30	zh. h1961	狮油红4号	67	zh. h5030	小河大花生

表C.1 参照品种名单(续)

序号	种质库统一编号	品种名称	序号	种质库统一编号	品种名称
31	zh. h2069	狮头企	68	zh. h5034	沙洋3527
32	zh. h2076	西农3号	69	zh. h5060	岳西大花生
33	zh. h2152	惠水花生	70	zh. h5075	檀头六月籽
34	zh. h2177	永宁小花生	71	zh. h5098	三号仔
35	zh. h2208	沂南四粒糙	72	zh. h5327	群育161
36	zh. h2231	大伏抚罗1号	73	zh. h5365	经花14号
37	zh. h2250	抚沟罗油6号	74	zh. h5399	经花48号

---