|  |  |
| --- | --- |
| ICS  |   |
| CCS  | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
|  43 |

湖南省地方标准

DB XX/T XXXX—XXXX

油茶品种分子身份证构建技术规程

Technical regulations for the construction of molecular identity cards of camellia varieties

（本草案完成时间：2025.4.15）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

湖南省市场监督管理局  发布

目次

[前言 III](#_Toc198308568)

[1 范围 4](#_Toc198308569)

[2 规范性引用文件 4](#_Toc198308570)

[3 术语和定义 4](#_Toc198308571)

[4 原理 4](#_Toc198308572)

[5 主要仪器和设备 4](#_Toc198308573)

[6 试剂与溶液 4](#_Toc198308574)

[7 操作程序 5](#_Toc198308575)

[8 待检样品检测的一般程序 7](#_Toc198308579)

[附录A（资料性） 主要仪器设备 8](#_Toc198308580)

[附录B（资料性） 主要试剂与溶液配制 9](#_Toc198308582)

[附录C（资料性） 本标准选用的油茶品种 10](#_Toc198308594)

[附录D（规范性） 油茶品种分子身份证构建的SSR引物 11](#_Toc198308595)

[附录E（规范性） 油茶品种分子身份证标准编码 12](#_Toc198308596)

1. 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。

本文件由湖南省林业局提出。

本文件由湖南省林业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中南林业科技大学，湖南省国有林和种苗工作站。

本文件主要起草人：韩志强、邓红达、肖婉庆、童海浪、张琳、袁德义、邹锋、黄菁、周根苗、徐媛、李琪媛、张威、赵明。

油茶品种分子身份证构建技术规程

* 1. 范围

本标准规定了以油茶（*Camellia* spp.）幼嫩组织（叶片、花芽、叶芽等）为材料，利用SSR分子标记法对油茶品种进行分子鉴定的术语、原理、主要仪器和设备、试剂与溶液、操作程序和鉴定。

本标准适用于附录A中所列油茶品种的鉴别。

* 1. 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

微卫星 microsatellite

简单重复序列 simple sequencerepeats;SSR

又称为短串联重复（Short tandem repeats，STR），是由几个（多为1~6个）碱基组成的基序（motif）串联重复而成的DNA序列。

指纹图谱SSR fingerprint

按照 LY/T 2745 标准的定义。

* 1. 原理

微卫星广泛分布于植物基因组的不同位置，微卫星位点具有高度的遗传多态性，微卫星标记因其共显性遗传、兼容性好、高多态性、高重复性或具有高通量自动化等优点，被国际植物新品种保护联盟、国际种子联合会等国际组织推荐为品种身份鉴定的首选标记。本标准基于基因组测序开发SSR引物，进一步通过M13-SSR-PCR产物毛细管凝胶电泳检测从中筛选出多态性好、稳定性高的8个不同重复类型SSR位点，并将其用于湖南省14个油茶品种的鉴定。在检验过程中，采用真实品种的DNA模板做为标准样本，从待检苗木中抽样做为待测样本。利用微卫星引物进行扩增，将待测品种与对照品种的SSR指纹进行对比，若待检样本与标准样本在任一引物扩增位点上基因型不同，则可判定待检样本与标准样本不是同一品种。当不同引物扩增位点上基因型都相同时，则可判定待检样本与标准样本是同一品种。

* 1. 主要仪器和设备

仪器设备见附录A

* 1. 试剂与溶液

试剂与溶液配制见附录B

* 1. 操作程序
		1. 取样

选用油茶幼嫩叶片或其他幼嫩器官和组织提取DNA。本标准选用已通过湖南省审定的油茶优良品种，见附录C。

* + 1. DNA的提取、纯化及定量
			1. CTAB法提取DNA

待检样本与标准样本的DNA提取，按照以下步骤：

1. 取油茶新鲜幼嫩叶片2~3片或顶芽0.5g~1.0g，在液氮中迅速研磨成粉末，将其转入预冷的2 mL离心管中。
2. 向离心管中加入600 µL CTAB提取液（同时加入6 µL巯基乙醇，巯基乙醇需要在实验过程中加入），充分混匀，65℃水浴40 min，期间需轻柔摇动几次（每10 min上下颠倒1次）。
3. 加入500 µL氯仿-异戊醇（24:1），轻微上下混匀，12000 rpm·min-1离心10 min，将上清液转至新的1.5 mL离心管中。
4. 重复上步骤一次。
5. 将上清液转移至新的离心管中，加入280 µL预冷异丙醇，轻微混匀，-20℃放置1 h，12000 rpm·min-1离心10 min，或许可看见白色DNA沉淀物。
6. 弃上清，用1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀，12000 rpm·min-1离心4 min，倒掉乙醇。
7. 重复上步骤一次。
8. 此时白色DNA沉淀更加明显，将离心管倒置于吸水纸数分钟上将残余乙醇彻底晾干。
9. 沉淀用50~100 µL TE缓冲液溶解。
10. 在DNA样品溶液中加入170 µL灭菌ddH2O和2µL 10 mg·mL-1 RNase，37℃中放置30 min，去除RNA。
11. 取出后加入1/10体积的NaAc和2/3体积的预冷异丙醇，-20℃放置1 h。
12. 加入1/10体积的NaAc和2/3体积的预冷异丙醇，-20℃放置1 h，12000 rpm·min-1离心10 min收集沉淀用75%乙醇洗涤2次，将离心管倒置于吸水纸数分钟上将残余乙醇彻底晾干。
13. 沉淀用50~100 µL TE缓冲液溶解，溶解后涡旋混匀。
14. 保存于-20℃冰箱备用。
	* + 1. DNA定量与质量检测
15. 取2µL DNA用微量核酸蛋白检测仪检测，可以直接读出DNA浓度和A260/280的比值，比值在1.8~2.0之间符合检测要求。
16. 另取3μL DNA加3μL溴酚蓝，在通过1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量，稳压100V，电泳缓冲液为1🞨TBE，电泳结束后用凝胶成像系统记录拍照。
17. 植物总DNA样品只呈现一条相对分子质量较大而迁移速率很小的整齐清晰条带。
18. 对照微量核酸蛋白检测仪定量结果，将条带清晰、符合要求的样品稀释成浓度为50 ng·µL-1，在-80℃下保存。
	* 1. SSR分析步骤
			1. SSR引物是根据油茶基因组测序所获得的数据库自行设计并经过筛选的多态性引物，具体引物及序列见附录D。
			2. PCR反应体系为10uL，具体见表1。
19. PCR反应体系

| 试剂 | 母液浓度 | 体积（μL） |
| --- | --- | --- |
| dNTP | 2.5 mmol·L-1 | 0.6 |
| Mg2+ | 25 mmol·L-1 | 0.6 |
| Taq聚合酶 | 2.5 U·μL-1 | 0.3 |
| 引物 | 10 μmol·L-1 | 0.8 |
| DNA模板 | 50 ng·μL-1 | 0.6 |
| buffer | 10×Taq | 1 |
| ddH2O |  | 6.1 |

* + - 1. PCR反应程序

反应液加入到PCR板后，在3000r/min下离心5s，将PCR板用乳胶盖盖好后放人PCR仪中，PCR仪的程序具体见表2。

1. SSR-PCR降落反应扩增程序

| 程序 | 温度 | 时间 | 循环 |
| --- | --- | --- | --- |
| 程序1 | 95℃ | 2min | 1 |
| 程序2 | 95℃ | 20s | 11 cycle（每循环降0.5℃） |
| 64℃-59℃ | 40s |
| 72℃ | 1min |
| 程序3 | 95℃ | 30s | 24 cycle |
| 65℃ | 30s |
| 72℃ | 1min |
| 程序4 | 72℃ | 2min | 1 |
| 程序5 | 4℃ | 保存 |  |

1. 95℃预变性2 min，95℃变性20 s。
2. 退火温度64~59℃ 40 s，72℃延伸1 min，共11循环（每次循环退火温度降低0.5℃）。
3. 95℃变性20 s，65℃退火30s，72℃延伸1 min，24个循环。
4. 72℃延伸2 min，4℃保存。
	* + 1. PCR产物变性
5. PCR产物用双蒸水稀释10～15倍。
6. 取1μl稀释产物加入到9μL的loading buffer（91%超纯甲酰胺，9%内标 Genescan 500 Rox），混匀。
7. 在PCR仪上运行变性程序：95℃变性5min，放冰上迅速冷却。
	* + 1. PCR扩增产物检测
8. PCR产物检测采用ABI PRISM 3130xl分析系统。采用美国ABI公司生产的50cm 16道毛细管。
9. 毛细管的空间校正（新安装的毛细管只要进行一次校正即可）：选择空间校正程序，根据毛细管是否已经灌胶，选择相应的程序，然后点击开始。空间校正后每个毛细管会有一个峰图，如果每个毛细管峰值大小基本一致，且每个峰上都有一个“十”，则代表校正通过。
10. 仪器的光谱校正（新安装的毛细管只要进行一次校正即可）。取5μL Multi-Capillary DS-30，加人195μl高纯度甲酰胺，混匀后分装到96孔板A1-H1和A2-H2孔，95℃ 变性 5 min，放冰上迅速冷却。利用光谱校正程序进行光谱校正，选择校正所用的样品型号，然后点击开始，校正结束后通过校正文件图来判断校正是否通过。根据DS-30中的标样，如果峰图颜色的顺序是蓝、绿、黄、红，并且峰图清晰、峰型一致则代表光谱校正通过。
11. 采用片段分析程序，选择片段分析模式以及光谱校正所用试剂盒的类型。创建一个自动分析模板，填写分析样品的名称，选择样品的类型、内标类别、分析方法等。将产物变性好的PCR板盖上仪器自带的PCR板盖，放人仪器中。在软件中将PCR板链接到仪器，点击开始进行基因型分型。
	1. 待检样品检测的一般程序

对待检品种和对照品种以附录B中的引物进行检测，获得待检品种和对照品种在这些位点的等位变异数据，利用这些数据进行待测品种的鉴别，待检样品检测的一般程序为：

1. 选取附录B中的引物，对待检样品进行PCR扩增。
2. 对待测样本PCR扩增产物进行检测
3. 使用Genemarker软件分析检测数据，按照不同的等位位点依次读取等位基因片段长度值，记录待测品种对应位点上不同的等位变异。
4. 记录等位变异的方法如下：在同一等位位点上，短片段在前，长片段在后，中间用“/”隔开。
5. 按照位点Chr03g224、Chr05g617、Chr06g062、Chr08g320、Chr08g089、Chr10g016、Chr03g161、Chr10g241的顺序记录，不同位点的记录结果中间用空格隔开，即得到了待测品种“分子身份证”编码。
6. 将待测品种分子身份证编码和附录E中的分子身份证标准编码相比较，若待检品种与对照品种在任一引物扩增位点上基因型不同，则可判定待检样品与标准样品不是同一品种;当待检样品与标准样在不同引物扩增位点基因型都相同时，即可认定该待检样品和标准样品为同一品种。
7. （资料性）
主要仪器设备
	1. 主要仪器设备

PCR 扩增仪、离心机 12 000 r/min、微量可调移液器(2μL、10μL、100μL、1000 μL)、数显式稳压稳流电泳仪（电压：10V-300V，电流：10mA-400mA）、全自动数码凝胶图像分析系统（透射紫外波长：302nm，透射紫外面积：20cm20cm）、微量核酸蛋白检测仪（波长范围:190nm-840nm，波长精度1nm，检测范围2ng/uL-15 000ng/uL）、毛细管电泳仪（电压电流范围：0-30kv,0-300uA；响应时间：0.1-20s；压力调整范围：0-55,000mbar.s）。

1. （资料性）
主要试剂与溶液配制
	1. 除非另有说明，在分析中所使用的所有试剂均为分析纯。试验中所使用的水均为无菌超纯水。
	2. 1 mol/L Tris base

称取12.11g三羟基甲烷（Tris）溶解于80ml超纯水中，用30%（体积分数）的盐酸将pH值调到8.0，定容到100mL，高压灭菌，室温保存。

* 1. 0.5mol/L EDTA

称取18.61g乙二胺四乙酸（EDTA），溶解到80mL超纯水中，用20%的NaOH调节pH值至8.0，定容到100ml，分装后高压灭菌，室温保存。

* 1. 5 mol/L NaCl

称取29.22g氯化钠，用75ml超纯水溶解，定容到100ml后高温灭菌，室温保存。

* 1. 10% CTAB

称取10g十六烷基三甲基溴化胺（CTAB），超纯水溶解，定容到100ml后高压灭菌，室温保存。

* 1. 5 mol/L醋酸钾

称取49.08g醋酸钾，用80 mL超纯水溶解，定容到100ml后高压灭菌，室温保存。

* 1. 三氯甲烷:异戊醇

240mL三氯甲烷和10 ml异戊醇混匀，置于棕色瓶中室温保存。

* 1. 2% SDS

称取2g十二烷基磺酸钠（SDS）粉末双蒸水溶解，定容到100mL后高压灭菌，室温保存。

* 1. CTAB提取缓冲液

CTAB提取液的主要成分为：100 mmol/L Tris-HCl（1mol/L pH=8.0）、20mmol/L EDTA（0.5 mol/L pH=8.0）、1.4 mol/L NaCI（5 mol/L）、2%（质量浓度）CATB、5% PVP、300 mmol/L 巯基乙醇。在50ml的超纯水中加人2g CTAB，溶解后加入10ml 1mol/L 的Tris-HCl（pH=8.0）、4 ml 0.5 mol/L 的EDTA（pH=8.0），28 ml 5mol/L的NaCl，5g PVP-40粉末、2ml β-巯基乙醇，定容到100mL，室温保存。

* 1. TE缓冲液

取0.2ml的0.5mol/L EDTA，1ml的1mol/L Tris-HCl（PH=8.0），用双蒸水定容到100mL，高压灭菌，4℃保存。

* 1. TBE缓冲液（10🞨）

称取108g Tris碱和55g硼酸，加人40mL的0.5 mol/L EDTA溶液（pH=8.0），用800mL双蒸水溶解后定容到1L，高温灭菌。

1.
2. （资料性）
本标准选用的油茶品种

本标准选用的油茶品种见表C.1。

表C.1 本标准选用的油茶品种表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 品种名称 | 拉丁名 | 良种 |
| 华硕 | *Camellia oleifera* ‘Huashuo’ | 国S-SC-CO-011-2009 |
| 华金 | *Camellia oleifera* ‘Huajin’ | 国S-SC-CO-010-2009 |
| 华鑫 | *Camellia oleifera* ‘Huaxin’ | 国S-SC-CO-009-2009 |
| 湘林1号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 1’ | 国S-SC-CO-013-2006 |
| 湘林27号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 27’ | 国S-SC-CO-013-2009 |
| 湘林63号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 63’ | 国S-SC-CO-034-2011 |
| 湘林67号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 67’ | 湘S-SC-CO-015-2009 |
| 湘林78号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 78’ | 国S-SC-CO-035-2011 |
| 湘林97号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 97’ | 国S-SC-CO-019-2009 |
| 湘林117号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 117’ | 国S-SC-CO-055-2010 |
| 湘林124号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 124’ | 湘S-SC-CO-057-2010 |
| 湘林210号 | *Camellia oleifera* ‘Xianglin 210’ | 国S-SC-CO-015-2006 |
| 常德铁城1号 | *Camellia oleifera* ‘Ticheng 1’ | 湘S0801-Co2 |
| 衡东大桃2号 | *Camellia oleifera* ‘Hengdong Datao 2’ | 湘S-SC-CO-003-2012 |

1. （规范性）
油茶品种分子身份证构建的SSR引物

油茶品种分子身份证构建的SSR引物见表D.1。

表D.1 油茶品种分子身份证构建的SSR引物表

| 序号 | 引物名称 | 引物正向序列（5′→3′） | 引物反向序列（5′→3′） | 重复单元 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Chr03g224 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTGCCAACGGTTTCTTCTCACC-3′ | 5′-GCAGCCACTAGGTTGCTTCG-3′ | GAA |
| 2 | Chr05g617 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTGTGGCGTAGGGAGTAGGTCG-3′ | 5′-GAACAACAAGAAATCCGGAGG-3′ | ACC |
| 3 | Chr06g062 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTAGTGAGTGTGAGGGGTTCGG-3′ | 5′-GTCACCTCCATGGCAGAGC-3′ | GGA |
| 4 | Chr08g320 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTAAATGAAACTAAGAAGACGGGGC-3′ | 5′-TTCCTGATTCCGATCTGCG-3′ | GGA |
| 5 | Chr08g089 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTGCACTCGCAGAAGGATAGGG-3′ | 5′-CCACCACATTTCCAGTCACC-3′ | GAA |
| 6 | Chr10g016 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTCTACCCGGCTCCCTTTACG-3′ | 5′-TTCCCCACCAAACAAGAACC-3′ | CAA |
| 7 | Chr03g161 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTCCCACCACCAGTATTCAAGG-3′ | 5′-AGATGGGACTGGTTTTGGTG-3′ | ACCAAA |
| 8 | Chr10g241 | 5′-TGTAAAACGACGGCCAGTCCTGTTGCAGCCTCTGATTT-3′ | 5′-AGATGCCTGCCTTAAACCCT-3′ | AAAG |

1. （规范性）
油茶品种分子身份证标准编码

油茶品种分子身份证标准编码见表E.1。

表E.1 油茶品种分子身份证标准编码表

| 品种 | 分子身份证标准编码 |
| --- | --- |
| 华硕 | 203/215 146/149 122/125/128 144/147 155/161 233/242/245/254 181/193/199 229/237/249 |
| 华金 | 203/209 146/149/152 116/122/125/128 135/144/147/150 155/158/167 233/239/242/251 181/187/193/199 233/237/239 |
| 华鑫 | 203/206/209/212 146/149 122/125/128 135/141/144/147 149/155/158/164 233/242/245/254 193 229/233 |
| 湘林1号 | 203/209 146/149 119/122/125/128/134 141/144/147 149/158/167/170 236/239/242/248/257 193/199 229/233/241/245 |
| 湘林27号 | 203/206/209 146 119/122/125/131 135/141/144/147 155/158/161/167/170 233/236/239 193 229/233/237/241 |
| 湘林63号 | 203/206/218 143/146/149 119/122/125 135/141/144/147 155/161/164 236/242/245/248/254 193/199 225/229/233/237 |
| 湘林67号 | 203/209/215 146/149 119/122/125/128/134 141/144 152/158/176 236/239/242/248/251/254 187/193/199 225/229/233/237 |
| 湘林78号 | 203/218 146/149 119/122/125/131 135/144 155/158/164/167 236/239/242/245/251 193/199/205 233/237 |
| 湘林97号 | 203/209 146 122/125/131 135/144 155/158/161/167/170 233/236/239 193 229/233/237/241 |
| 湘林117号 | 203/209/212 146/149 119/122/128 135/144 155/158/161/170 233/236/242/245/248/251/254 193/199 229/233 |
| 湘林124号 | 203 146/149 122/125/131 141/144 155/158/161/164 230/233/242/248 193/199/205 225/229/233/249 |
| 湘林210号 | 203/206/209 146/149 119/122/125/128 141/144/147 149/158/167/173 233/239/245/254 193/199 229/233/241/245 |
| 常德铁城1号 | 203/206/218 146/149/152 122/125/134 135/141/144/147 158/161/170/173 233/236/248/254 193 229/233/237 |
| 衡东大桃2号 | 203/209 146 122/125 135/144 149/155/158/167/170 233/239/248/251 181/187193 225/233/237/249 |