

《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》

（公开征求意见稿）

编制说明

起草单位：XXXX、XXXX、XXXX

2025 年 5 月

农业行业标准《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》

（公开征求意见稿）

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

2015 年起,农业农村部畜牧兽医局委托全国畜牧总站农业农村部全国草业产品质量监督检验测试中心(以下简称草业产品质检中心)开展国家饲用燕麦品种区域试验 DNA 指纹检测工作,以筛选参试品种的对照品种,此外,不断有种子管理、工商管理、法院、种子经营部门希望中心为其提供饲用燕麦品种真实性鉴定服务,为规范相关工作全国畜牧总站草业产品质检中心建议并申报了饲用燕麦品种鉴别标准制定项目。2022 年《农业农村部农产品质量安全监管局关于下达 2022 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》(农质标函〔2022〕66 号)下达《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》标准制定任务,项目编号是(农质标函〔2022〕66 号) NYB-22032。由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出,全国畜牧业标准化技术委员会归口,XXXX 会同 XXXX 联合起草,XXXX 任标准起草组首席专家。

（二）标准制定背景

种子是农业的“芯片”,种业是国家战略性、基础性产业。优良牧草品种是草牧业发展和畜产品安全的基本保障,是农业种植结构调整和现代畜牧业发展的重要物质基础。种子是具有生命活力的特殊农业生产资料,伪劣种子造成的经济损失,即使采取先进的栽培管理措施也无法弥补。因此,控制良种种源、提升良种数量、加大良种检验力度、完善良种检验标准,才能发挥良种在农业生产中的优势,才能为争取高产、稳产、优质农产品奠定坚实的基础,使种子质量对农业生产的威胁控制在源头。种及品种鉴定是种子质量检测工作中的一项重要内容,其主要目的是确定送验样品与所声明的种或品种的符合程度。自 2006 年,农业农村部连续组织开展饲草种子质量监测工作,发现一些不法商家在利益驱动下,更换种子名称,假冒国内优良品种,或用国产草种假冒进口草种,扰乱了饲草种子市场秩序,损害了育种家的权益和农牧民的利益。由于缺少饲草种子真实性快速鉴定技术标准,质量监测过程中无法出具科学鉴定结果,不法商贩得不到应有的惩罚,饲草品种拥有者的权益得不到保护,打假工作难见成效。因此,迫切需要研究制定准确可靠、快速简便的饲草品种真实性鉴定技术标准。

近年来分子标记技术发展较快，以 DNA 分子多态性为基础，利用 DNA 物质能稳定遗传的特性，可反映生物个体和群体特征，直接体现不同物种 DNA 水平上的差异，使不同物种或不同品种所测得的 DNA 指纹各异，具有高度的专一性和特异性，适合品种的真实性和纯度鉴定工作。目前 SSR 和 SNP 等分子标记技术已经广泛应用于玉米、大豆、小麦、水稻等主要农作物的种及品种鉴定中。鉴于 DNA 指纹图谱技术在饲草品种真实性鉴定中的巨大应用潜力，迅速开展饲草指纹图谱的研究工作，制定饲草品种真实性分子检测技术体系，对加强种子质量标准体系建设，监测良种质量（真伪、纯度），防止伪劣种子流入市场，推广我国名、优、特饲草品种，保护育种家们权益和广大农民的利益，保障草原生态牧场建设项目工程质量具有重大意义。

燕麦主要包含皮燕麦 (*Avena sativa* L.)、裸燕麦 (*A. nuda* L.) 和野燕麦 (*A. fatua* L.) 等，为一年生禾本科早熟禾亚科燕麦属植物，是重要的牧草、饲料和粮食作物，广泛分布于全世界五大洲 40 多个国家，我国燕麦每年实际种植面积在 100 万 hm^2 左右，主要分布在华北北部的冀、晋、蒙的高寒山区、西北的六盘山麓和云贵川的高纬度、高海拔的高寒山区，它是人类和动物可直接利用的优质粮食及饲料作物之一。皮燕麦主要用于生产籽实精饲料和饲草，通常称为饲用燕麦。截止 2022 年通过全国草品种审定委员会审定的饲用燕麦品种有 16 个，市场上推广利用的还有很多地方品种和国外引进品种。鉴于 SSR 引物的种间特异性，迫切需要开发用于检测饲用燕麦国审品种的专用引物和建立相应的检测流程，从而规范燕麦产业的良性发展，维护育种家和企业家的利益。

（三）起草过程

1. 试验数据储备：2015-2021 年，全国畜牧总站草业产品质检中心受农业农村部畜牧兽医局委托开展了国家饲用燕麦品种“三性”测试 DNA 指纹图谱辅助鉴定体系构建和品种指纹图谱采集工作。根据草业产品质检中心引物开发工作以及其他学者发表文章中所用的引物，合成了 125 对 SSR 引物作为候选引物，通过扩增带多态性、带型清晰度和产物稳定性综合筛选，得到 18 对检测饲用燕麦品种真实性的核心 SSR 引物，建立了饲用燕麦品种真实性鉴别的 SSR 标记试验体系。

2. 成立标准起草小组：2022 年 5 月，成立标准起草小组，落实人员分工（见表 1）。根据起草技术规范的要求，广泛开展调查、搜集、整理国内外相关资料等工作。明确由全国畜牧总站负责标准撰写的组织、协调、技术指标确定以及补充试验等工作，青海大学负责资料的收集、整理和意见汇总工作，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所负责标准方法的验证和预审等工作。

表 1 起草组成员一览表

姓名	单位	职务/职称	项目任务分工
XXX	XXXX	副主任/高级畜牧师	主持标准制定、协调样品采集和检测
XXX	XXXX	主任/推广研究员	协调样品采集
XXX	XXXX	副研究员	参与起草标准、协调田间验证
XXX	XXXX	副研究员	参与起草标准、标准文献收集
XXX	XXXX	副研究员	参与起草标准、田间验证
XXX	XXXX	正高级畜牧师	标准文献收集
XXX	XXXX	高级畜牧师	样品采集和检测
XXX	XXXX	正高级畜牧师	样品采集和检测
XXX	XXXX	畜牧师	样品采集和检测
XXX	XXXX	畜牧师	样品采集和检测
XXX	XXXX	所长/副研究员	试验室试验统筹
XXX	XXXX	副研究员	引物收集与测试
XXX	XXXX	副研究员	引物收集与测试
XXX	XXXX	副院长/研究员	参与起草标准、田间验证
XXX	XXXX	研究员	方法验证

3. 资料收集及分析：2022 年 6-12 月标准起草小组完成了国内外有关文献资料的搜集整理工作，重点收集了植物品种鉴定 DNA 分子检测方法相关技术资料 and 标准资料，并对过去开展的试验研究成果、经验等进行总结归纳，作为本规范制定的原始资料。并于 9 月线上召开了标准起草小组第一次会议，对标准起草所需的文献资料、试验研究成果及调研结果进行了讨论，探讨需要补充的试验研究和文献资料，提出了标准编写的目标和原则，即以快速准确检测饲用燕麦品种的真实性为目标，标准制定力求做到规范性、适用性和科学性。

4. 方法确立：2023 年 1-6 月，草业产品质检中心使用现有的技术路线对市场上常见的饲用燕麦品种进行了检测和鉴别工作，确立了标准检测流程和方法；青海大学通过开展田间鉴定实验，对利用 SSR 检测方法得到的结果进一步进行了验证，最终确立了饲用燕麦品种真实性鉴别的 SSR 标记标准方法。

5. 撰写编制说明和标准文稿：2023 年 7-9 月，线上召开标准起草小组第二次会议，对全国畜牧总站完成的初稿和编制说明进行了讨论。

6. 方法验证：2023 年 10 月，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所委托北京玉米种子检测中心、北京市杂交小麦工程中心和北京市种子检测站等三具备植物品种真实性分子检测资质的质检中心使用标准方法对已检样品进行了复检验证，三家验证实验室对同样 10 个样品进行检测，试验均获得一致性结果。验证结果表明，本标准建立的检测方法具有很

好的再现性，符合科学性、实用性、规范性和可操作性的原则，能够实现饲用燕麦品种的真实性鉴别。验证报告见附件。

7. 标准函审：2023 年 11 月，标准起草小组向 20 家高等院校、科研单位、推广单位和企业发送了《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》标准文本和编制说明（定向征求意见稿），共发函 20 份，收回 20 份，提出意见 45 条。其中采纳 21 条，部分采纳 2 条，不采纳 22 条。意见征求统计情况见表 2，定向征求意见汇总表见附件 2。

表 2 征求意见单位名称、属性和数量

序号	单位属性	发函数量/返回数量	单位名称
1	高校	7/7	中国农业大学、北京林业大学、西南民族大学、甘肃农业大学、扬州大学、四川农业大学、西北农林科技大学
2	科研院所	4/4	中国农业科学院作物研究所、中国农业科学院草原研究所、中国科学院西北高原生物研究所、青海省农林科学院
3	推广单位	2/2	贵州省草地技术试验推广站、四川省草业技术推广研究中心
4	质检机构	4/4	农业农村部牧草及草坪草种子质量检验检测中心（北京）、农业农村部牧草及草坪草种子质量检验检测中心（兰州）、农业农村部牧草及草坪草种子质量检验检测中心（乌鲁木齐）、北京市蔬菜种子质量检验检测中心
5	企业单位	3/3	克劳沃草业技术开发中心、北京正道农业股份有限公司、蒙草生态环境（集团）股份有限公司

8. 提交预审：2024 年起草小组针对定向征求得到的修改意见，对标准涉及技术参数反复进行确定，对标准文稿进行逐字逐句的推敲和修改，形成《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》（预审稿），提交全国畜牧业标准化技术委员会秘书处。2025 年 1 月 20 日，根据标委会的要求，组织召开了标准预审会，专家组由武玉花（组长）、刘伟、谢家建、王雅春、田红丽、庞斌双、李曼莉等 9 人组成，会上，专家组听取了标准制定项目首席专家高秋对标准编制说明及主要技术内容的汇报，对标准预审稿进行了认真的讨论，提出修改意见，专家组一致同意审查通过，建议进一步修改后形成公开征求意见稿报标委会。具体意见见预审专家意见汇总表。

9. 公开征求意见：2025 年 5 月，标准起草单位根据预审意见修改了标准材料，并提交至全国畜牧业标准化技术委员会秘书处进行公开挂网征求意见。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）遵循的原则

1. 规范性原则

本标准的制定符合法律法规，符合有关标准要求，包括《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草工作规则》（GB/T 1.1-2020）、《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》（GB/T 20001.4-2015）、《草种子检验规程 扦样》（GB/T 2930.1-2017）、《草种子检验规程 净度分析》（GB/T 2930.2-2017）、《草种子检验规程 发芽试验》（GB/T 2930.4-2017）、《分析实验室用水规格和试验方法》（GB/T 6682-2016）等。

2. 科学性原则

本标准在制定过程中参考了相关国际及国内先进标准，力争将我国 DNA 指纹在品种鉴定中的最新应用反映到饲草品种鉴定中，方法制定过程严格规范，实验数据真实可靠，体现了科学性的原则。

3. 适用性原则

目前植物品种真实性检测的 DNA 分子标记方法有 RFLP、RAPD、SSR 和 SNP 等多种方法。SSR 分子标记方法检测植物品种真实性已在玉米、水稻、小麦等农作物以及苏丹草和高丹草等饲草品种真实性鉴定中得到广泛应用，其检测稳定性好、普及率高，因此，本标准选用 SSR 分子标记方法进行饲用燕麦品种真实性的检测具有较好的适用性。

（二）主要内容及确定依据

1. 标题

依据《农业农村部农产品质量安全监管局关于下达 2022 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函[2022]66 号），标准的题目确定为《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》。

2. 范围

截至 2022 年通过国家草品种审定委员会审定的饲用燕麦品种有马匹牙等 16 个，详细信息见表 3。其中马匹牙和哈尔满审定时间太长，审定时未提交标准样品，目前市场上不再流通，未列入本规程范围。通过在其余 14 个国审饲用燕麦品种标准样品以及市场上常见的蒙农 1 号、海威、富翁、青燕 1 号、加燕 2 号、白燕 7 号、林纳等其他 7 个饲用燕麦品种的检测分析，最终将检测适用范围确定为以国审饲用燕麦品种为主，其他饲用燕麦品种参照执行，标准对象抓住了重点，适当扩大了适用范围。

表 3 国审饲用燕麦品种信息

编号	品种名称	登记年份	品种登记号	育种单位	备注
1	马匹牙	1988	28	中国农业科学院草原研究所	不再流通
2	哈尔满	1988	29	中国农业科学院草原研究所	不再流通
3	苏联	1992	108	青海省畜牧兽医科学院草原研究所	
4	丹麦 444	1992	109	青海省畜牧兽医科学院草原研究所	
5	青早 1 号	1999	203	青海大学农牧学院草原系	
6	青引 1 号	2004	281	青海省畜牧兽医科学院草原研究所	
7	青引 2 号	2004	282	青海省畜牧兽医科学院草原研究所	
8	锋利	2006	332	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、百绿（天津）国际草业有限公司	
9	陇燕 3 号	2010	400	甘肃农业大学	
10	阿坝	2010	401	四川省草原科学研究院、四川省红原县畜牧兽医局	
11	英迪米特	2019	573	四川农业大学/北京猛犸种业有限公司/西南民族大学/四川省草业技术研究推广中心	
12	爱沃	2019	574	北京正道种业有限公司/北京正道农业股份有限公司	
13	苏特	2020	589	四川省草原科学研究院/四川农业大学/北京正道农业股份有限公司	
14	陇燕 5 号	2020	602	甘肃农业大学	
15	黑攻克	2021	606	山西农业大学/北京正道农业股份有限公司/河北君稷饲料有限公司	
16	青燕 2 号	2022	630	青海省畜牧兽医科学院	

3.方法

目前用于品种真实性检测的分子标记技术主要有：限制性片段长度多态性（RFLP）、随机扩增多态性 DNA（RAPD）、扩增片段长度多态性（AFLP）、单核苷酸多态性（SNP）和简单重复序列（SSR）等方法^[1-2]。近年来随着测序技术的不断完善，SSR 分子标记方法因具有符合孟德尔遗传定律、多态性高、全基因组覆盖等特点，得到了快速发展^[3]，被广泛应用于植物真实性检测等领域^[4-9]。在小麦、玉米、大豆、水稻、高粱等主要农作物以及西瓜、辣椒等水果蔬菜中已经建立起利用 SSR 标记方法进行品种真实性检测的标准方法^[10-19]。鉴于以上原因，本标准选用 SSR 分子标记方法进行饲用燕麦品种真实性的检测。

4.引物

4.1 引物确定

从本标准起草小组成员和其他从事燕麦研究的学者已发表文献中收集整理 125 对 SSR 引物（见表 4），之前的研究表明这些引物均能在饲用燕麦及其近缘类群中扩增得到稳定和多态性高的谱带，使用 14 个饲用燕麦的标准样品对这 125 对引物进行了进一步的筛选和验证，得到了 18 对谱带清晰、扩增稳定、多态性较好、适于进行品种真实性检测的核心 SSR 引物，在 14 个标准饲用燕麦品种中共检出 157 个等位变异，平均每个位点上检测到 9.3 个等位变异，对饲用燕麦品种间的基因型具有较高的分辨率（见表 5）。

表 4 125 对引物名称及来源文献

引物名称	文献
M8 ^Δ 、M70 ^Δ 、M161、M197 ^Δ 、M202 ^Δ 、M236 ^Δ 、M237 ^Δ	高秋等 ^[20] 2022
AM1、AM2、AM3、AM4、AM6、AM7、AM24、AM27、AM30、AM31 ^Δ 、AM35、AM42、AM49、AM54、AM102、AM112、AM115、AM121、AM124	周凡 ^[21] 2018
AM1、AM2、AM3、AM4、AM5、AM6、AM7 ^Δ 、AM8、AM9、AM10、AM11、AM12、AM13、AM14 ^Δ 、AM15、AM16、AM17 ^Δ 、AM18、AM19、AM20 ^Δ 、AM21、AM22、AM23、AM24、AM25、AM26、AM27、AM28、AM29、AM30、AM31、AM32、AM33 ^Δ 、AM34、AM35、AM36、AM37、AM38 ^Δ 、AM39、AM40	郭红媛等 ^[22] 2014
AM63、AM262 ^Δ 、AM269、AM338、AM447 ^Δ 、AM466、AM548、AM610、AM736、AM740、AM749、AM759 ^Δ 、AM860、AM1000 ^Δ 、AM1130、AM1188、AM1206、AM1266、AM1403、AM1605、AM1657、AM1672、AM1686、AM1784、AM1789、AM1840	刘伟 ^[23] 2012
CWM204、CWM214、CWM340、HVMWG、KSUM37、KSUM69、KSUM176、AM1-1、AM3-1、AM4-1、AM5-1、AM19-1、AM22-1、AM25-1、AM42、GWM3、GWM6、GWM247	邵秀玲等 ^[24] 2009
AF033096 ^Δ 、AM3-2、AM7-1、AM87、AM102、AM112、HVM4、HVM20、HVM62、L39777、M83381、Xgwm88、Xgwm99、Xgwm471、Z48431	张恩来 ^[25] 2008

注：Δ代表选用引物

表 5 18 个引物主要等位变异扩增片段信息

引物编号	引物原编号	染色体	退火温度 °C	引物序列（5'-3'）	条带数	常见等位变异 bp	重复基元
P01	AM14	Chr1D	60	F-CTCGCCTTTCCAA CCCAT R-CCTTGAACCTCC GCTCACC	3	101 104 107	(GGA)n
P02	AM759	Chr1D	60	F-GAGCAAGGTCTG GATGGA R-CACGTTTATGTGG TTGTTAGC	3	147 153 163	(GT)n
P03	AM447	Chr2D	60	F-TCGCCATTAATAA	3	255	(TG)n

				GAGCGAAGG R-GCTGCTGTTGCG TGGTTAGTG		257 341	
P04	AM1000	Chr2D	60	F-AGCAGTGTAGGG GAAAGAGT R-TTATAGGTTTAGA TGGGAGGA	4	231 245 247 255	(CA) _n
P05	AM31	Chr3D	60	F-CAAACAGCAACT CGTCAA R-TTTACATGCATCG GGTAC	5	239 243 247 251 295	(GTAT) _n
P06	M70	Chr3A	60	F-CTGATGCTGCTTC CTTTATTCT R-TACTACGAGACG CGCGAC	9	160 164 172 174 176 198 200 204 208	(AC) _n
P07	M236	Chr3D	60	F-GCTCACCGTCGTC TACAAAT R-GAGCAAGACCTA ATCCCAGC	5	127 129 131 133 143	(AC) _n
P08	AM17	Chr4C	60	F-CGTGCCCAAGTC GTGATT R-ACTCGTCCTGCTC GTCCCT	3	236 263 266	(AAG) _n
P09	AM33	Chr4A	60	F-GGAAACCCAACT ACTGAT R-AGCATACCAACT CGAAAC	5	399 411 415 423 463	(TATG) _n
P10	AM38	Chr4C	60	F-CCACTCCGATCCA GCACA R-GCAATCTCCAAG CGTCCC	3	193 199 202	(CAC) _n
P11	M197	Chr4A	60	F-CTCCCGAGTCTCT TCTCACG R-GAGTCCTCTCAC TCTGTCTCTGTT	8	117 123 127 129 131 133 135 137	(GT) _n
P12	AF033096	Chr5A	60	F-TGCATGTTTTTGT TTGTTGTTG R-CACGATCCAAAT ACACGCAG	2	124 130	(TTG) _n
P13	AM262	Chr5D	60	F-TGGTCAGTAAGC ATCACAAT R-TGTGCATGCATCT GTGCATA	3	201 217 219	(CT) _n
P14	M8	Chr6C	60	F-TGTTACACATTTT GGATAGGATTGA R-GTCCGTGTAGGC	5	187 193 195	(AC) _n

				CATATATTCTG		197 199	
P15	M202	Chr6D	60	F-GCCTGACCTTTT CCGCA R-CTATGCAAGGGT TCAGCCG	13	89 93 95 103 107 109 117 119 123 125 127 129 131 135	(AG)n
P16	M237	Chr6A	60	F-TAAATTAGAAGC GCGCACAA R-CGATCAAGTTGT ACAATTCCACA	9	95 97 115 117 119 123 125 143 157	(GA)n
P17	AM7	Chr7D	60	F-GTGAGCGCCGAA TACATA R-TTGGCTAGCTGCT TGAAACT	9	150 152 154 156 158 162 168 184 188	(TC)n
P18	AM20	Chr7D	60	F-TTCATCGTTGCTC ATGGGTT R-CGAAGTAGGACT CGCCGTAG	4	228 234 240 246	(GTG)n
合计	合计				168	-	
平均	平均				9.3	-	

4.2 引物的评价

利用 18 个 SSR 标记分析包含 14 个品种标样在内的共计 21 个饲用燕麦品种材料的基因型，建立的聚类树状结构图显示它们够很好的区分 21 个饲用燕麦品种（图 1）。

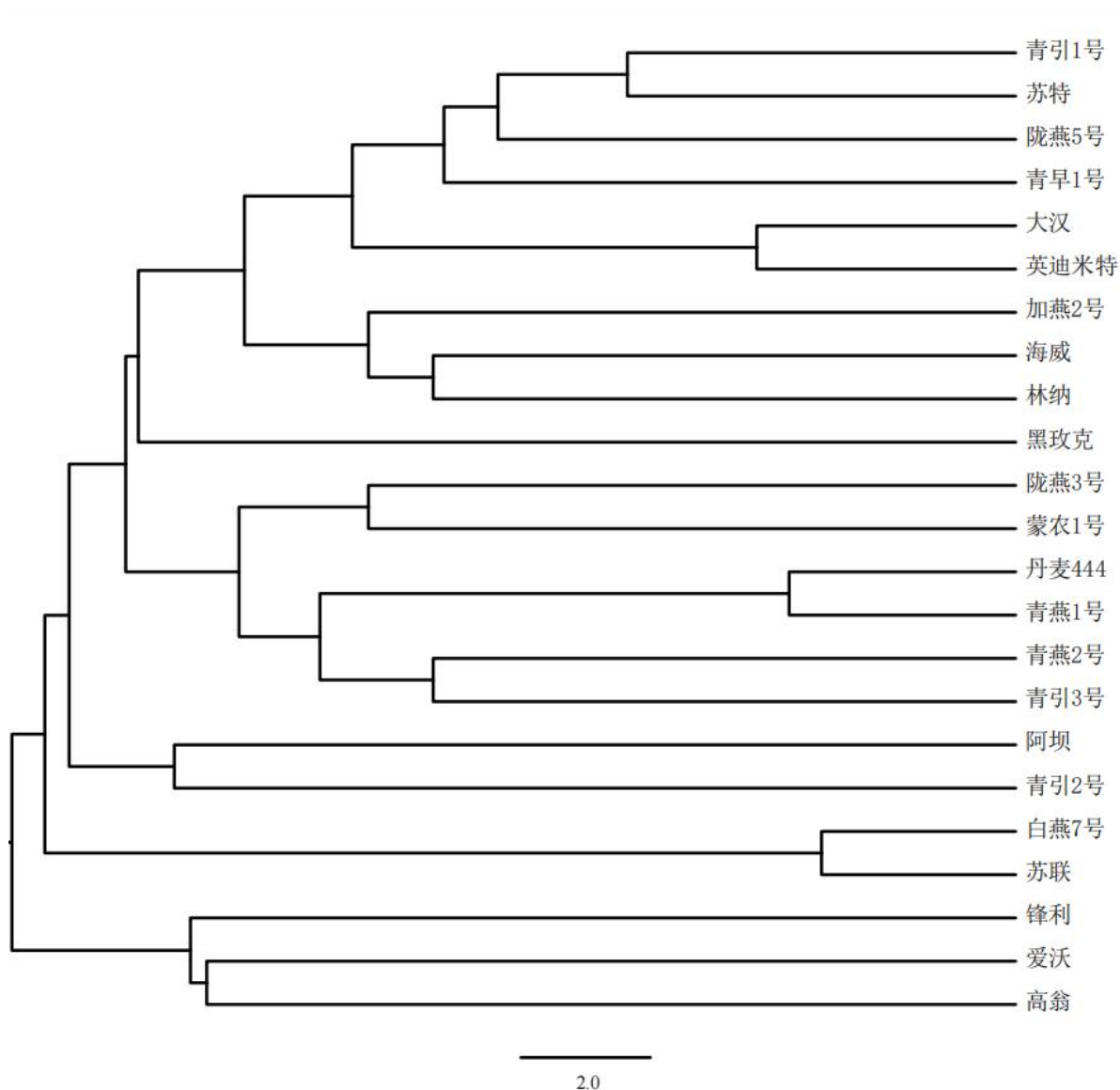


图 1 18 对引物用于 21 个饲用燕麦品种扩增 SSR 谱带分析的聚类图

5.样本

使用筛选出来的 18 对引物对包括 14 个品种标样在内的 21 个品种共计 30 份材料(见表 6)进行取样代表性分析,从而确定检测的最适样本量。每份样品分别取 5、10、20、30 单株等量 DNA 的混样进行 PCR 扩增,电泳结果表明当取样量达到 10 株时,所有材料的扩增条带均达到稳定,部分结果见图 2-图 5。罗永聪^[26]等提到当分析数量众多的种质库材料或者大规模地鉴定品种或种子的纯度时,经常要采用混合取样策略,混合样本可去除一些个体所具有的稀有等位基因,进而获得该品种大多数个体都具有的诊断性标记,从而可有效鉴定不同的品种。基于以往的研究经验,每个品种群体取 20 个个体的样本混合量适合绝大多数异花授粉牧草品种,如苜蓿。张栋^[27]等的研究表明,随着淮阴苜蓿(*Medicago sativa* Huaiyin)取样数的增加,遗传多样性指数变化幅度逐渐减小,说明取样数越大越能代表淮阴苜蓿群体,当取样数为 40、50、60 时,Stoddart 指数、

Simpson 指数差异不显著，确定 40 株是最佳取样策略。实验结果显示取样数达到 5 株时绝大部分材料带型已经稳定，当取样数达到 10 株时所有材料带型均稳定，这与饲用燕麦为自交繁殖的特性有关，本试验最终确定随机选取 30 个单株混样进行品种指纹图谱构建。

表 6 30 份材料及来源

编号	品种名	来源	编号	品种名	来源
1a	苏联	标样	9b	英迪米特	公司
1b	苏联	科研单位	10	爱沃	标样
2a	丹麦 444	标样	11	苏特	标样
2b	丹麦 444	科研单位	12	陇燕 5 号	标样
2c	丹麦 444	公司	13	黑玫克	标样
3	青早 1 号	标样	14	青燕 2 号	标样
4a	青引 1 号	标样	15	白燕 7 号	科研单位
4b	青引 1 号	科研单位	16a	加燕 2 号	科研单位
4c	青引 1 号	公司	16b	加燕 2 号	公司
5a	青引 2 号	标样	17a	林纳	科研单位
5b	青引 2 号	科研单位	17b	林纳	公司
6	锋利	标样	18	青燕 1 号	科研单位
7	陇燕 3 号	标样	19	蒙农 1 号	区试
8	阿坝	标样	20	海威	区试
9a	英迪米特	标样	21	富翁	区试

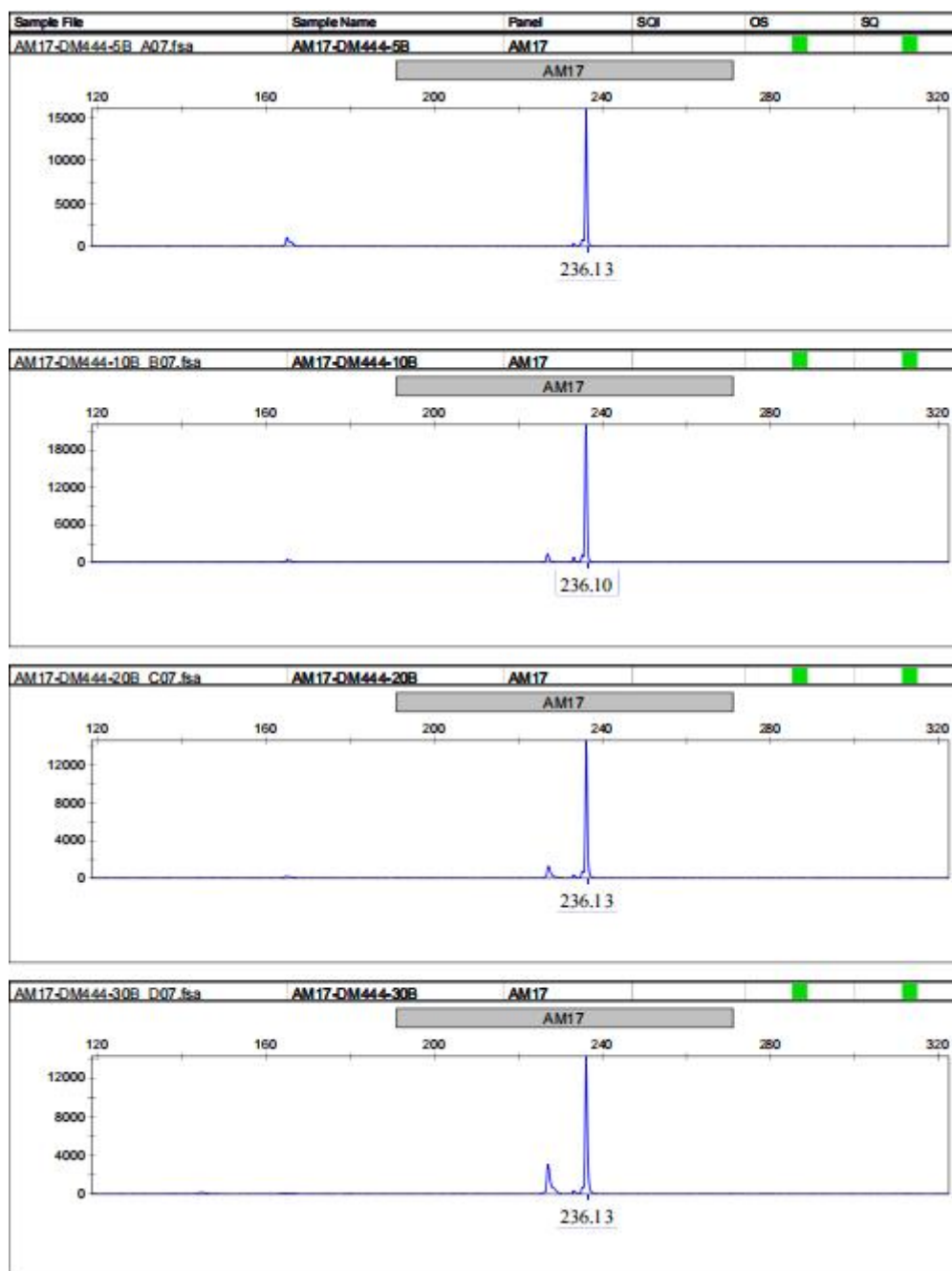


图 2 使用引物 AM17 扩增丹麦 444 5 株、10 株、20 株、30 株混样材料峰图

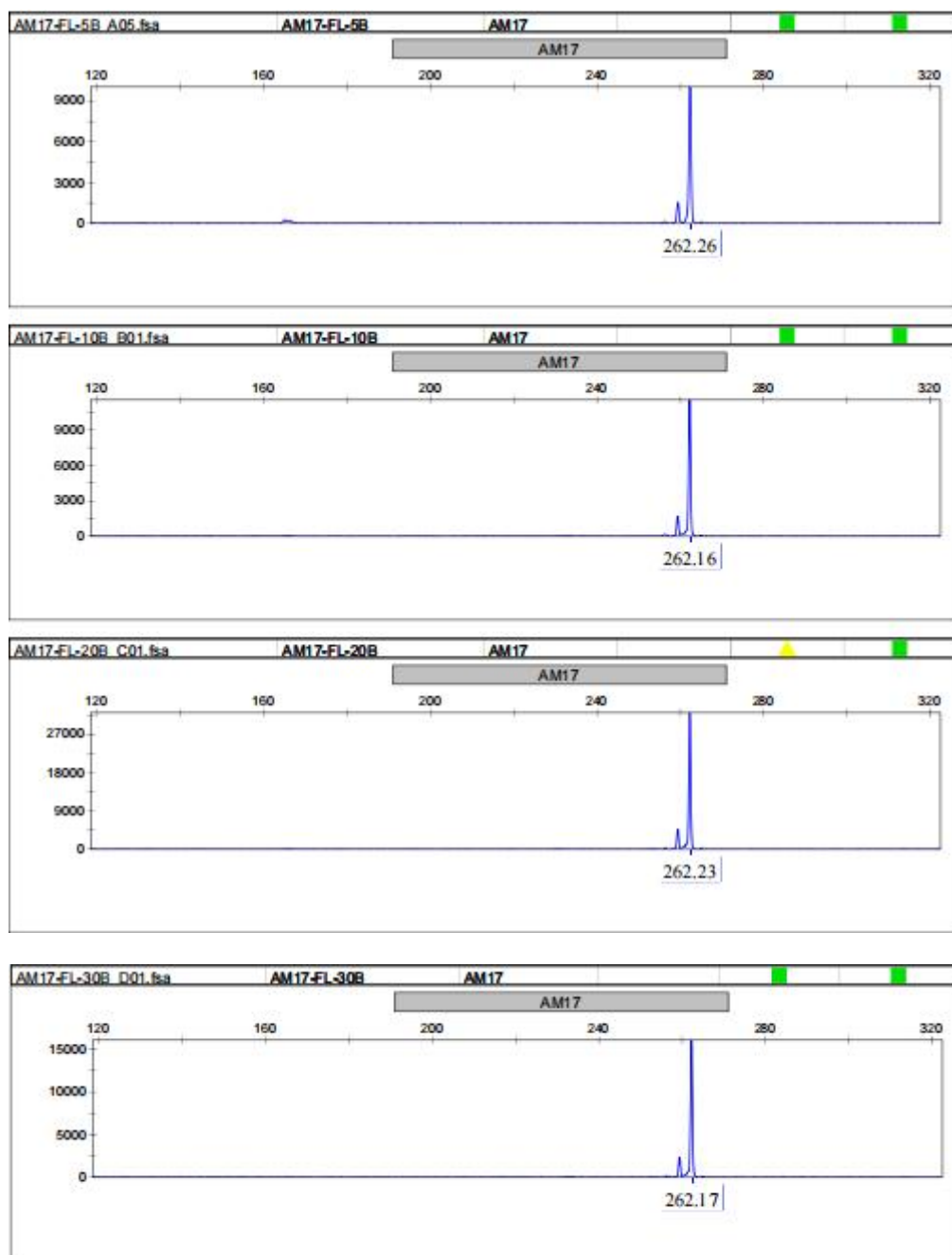


图3 使用引物 AM17 扩增锋利 5 株、10 株、20 株、30 株混样材料峰图

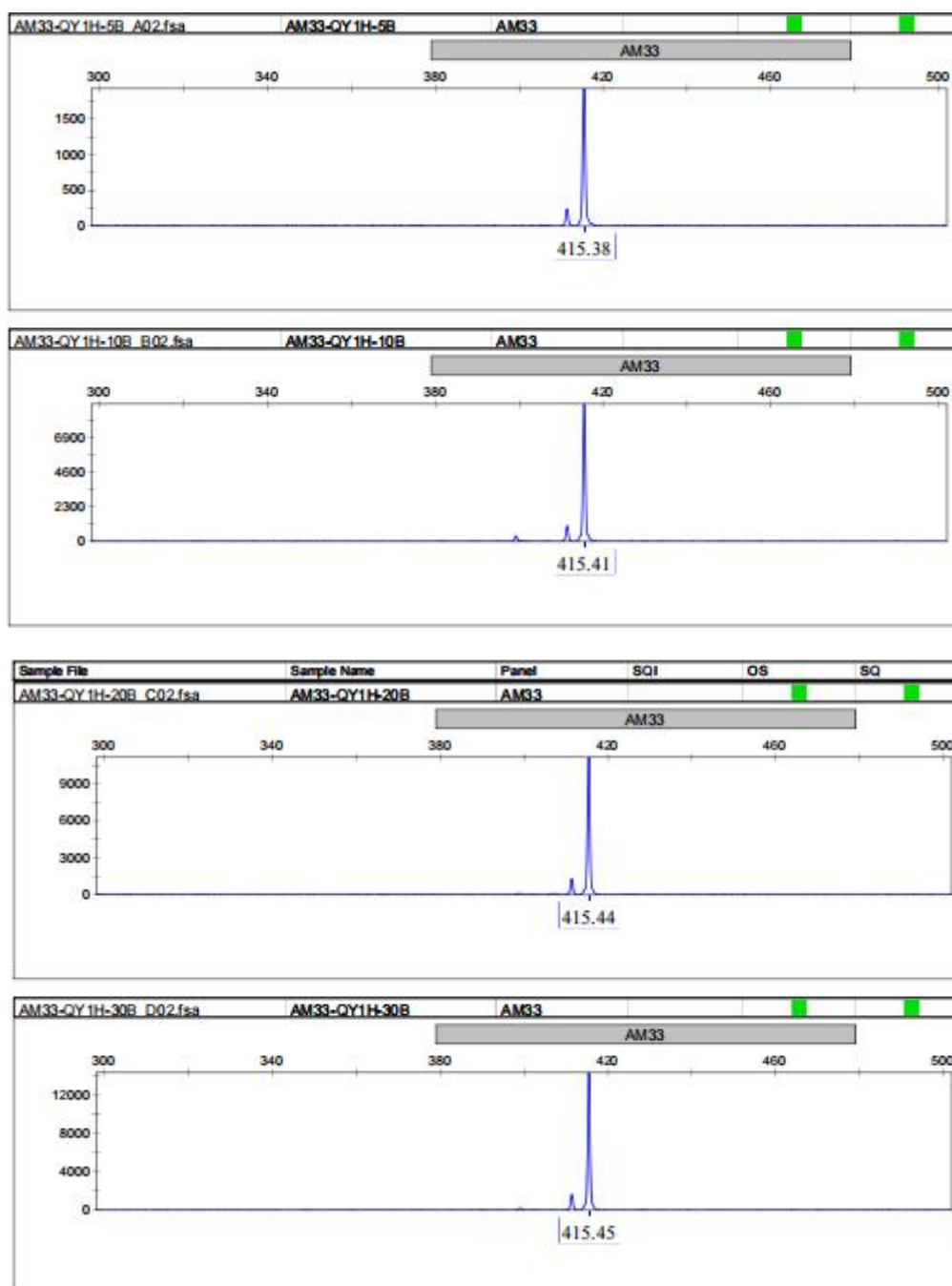


图 4 使用引物 AM33 扩增青引 1 号 5 株、10 株、20 株、30 株混样材料峰图

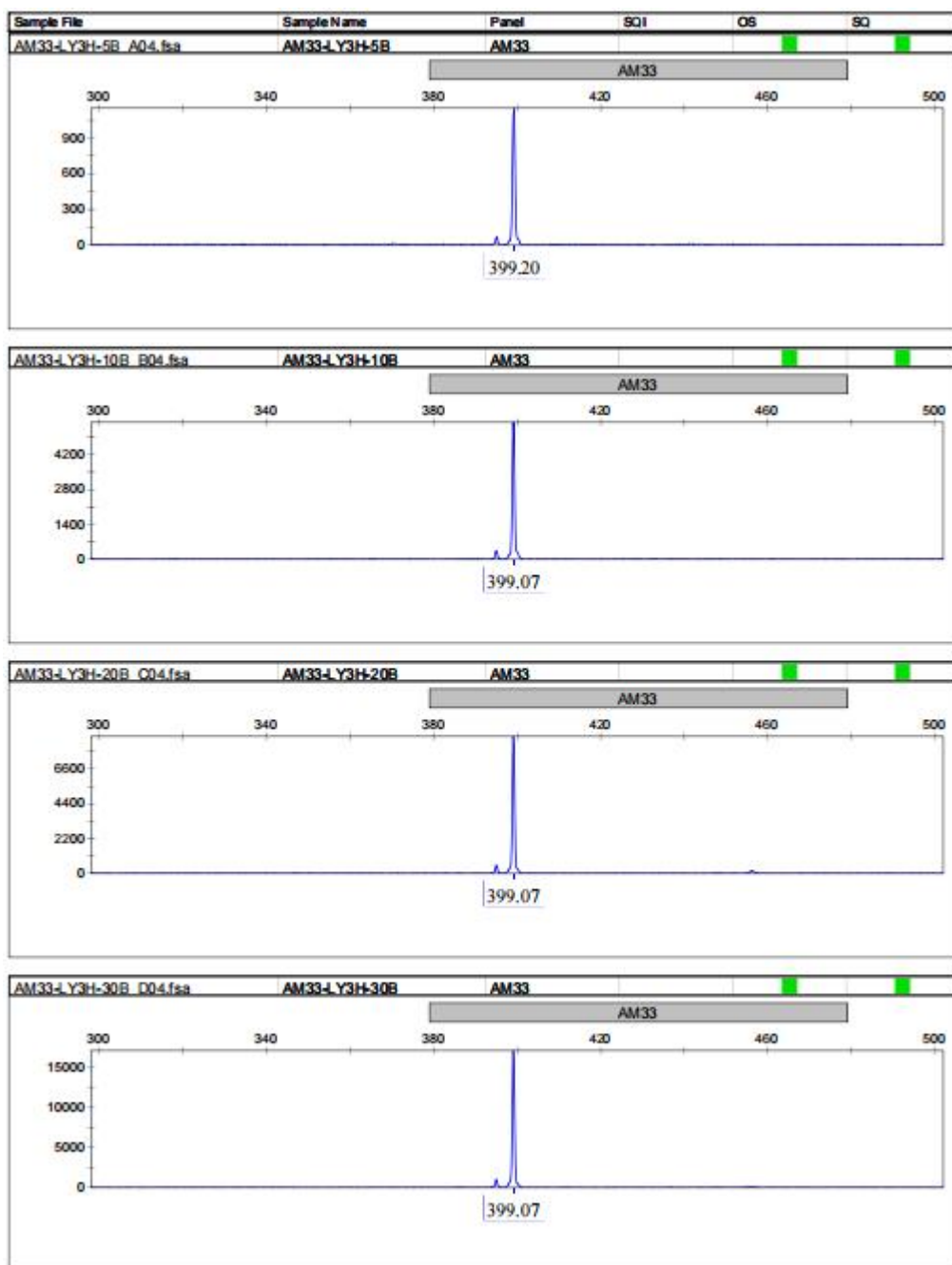


图 5 使用引物 AM33 扩增陇燕 3 号 5 株、10 株、20 株、30 株混样材料峰图

6.判定标准

分别利用 18 对 SSR 引物对 21 个品种样品进行扩增和片段长度测序，通过对指纹数据两两相比，得到了 21 个样品之间位点差异数（见表 7），不同品种的差异位点数最小为 4，同一品种的差异位点数最大为 2，等于普遍接受的阈值 $2^{[10-16]}$ ，因此确定此标准同样接受 2 为品种真实性鉴定的阈值。

表 7 30 个品种样品间差异位点数统计表

材料编号	1a	1b	2a	2b	2c	3	4a	4b	4c	5a	5b	6	7	8	9a	9b	10	11	12	13	14	15	16a	16b	17a	17b	18	19	20
1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1b	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2a	12	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2b	12	11	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2c	13	13	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	12	13	12	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4a	6	7	12	12	12	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4b	6	7	12	12	12	9	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4c	6	7	12	12	12	9	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5a	12	13	12	12	12	14	13	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5b	13	12	12	12	12	13	12	12	12	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	15	16	14	14	13	15	14	14	14	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	11	12	11	11	10	12	11	11	11	9	8	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8	14	15	14	14	14	13	12	12	12	14	13	16	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9a	12	12	12	12	12	11	11	11	11	12	12	15	14	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9b	12	12	11	11	11	10	11	11	11	12	12	16	14	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	15	16	16	16	16	13	11	11	11	14	14	10	15	15	16	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	12	13	14	14	14	9	9	9	9	13	12	14	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	12	13	11	11	12	10	8	8	8	12	11	14	9	12	10	10	15	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	12	13	15	15	15	12	11	11	11	12	12	13	13	13	15	14	11	12	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	12	12	9	9	10	14	12	12	12	14	14	11	11	13	15	14	14	15	13	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	13	13	16	16	16	14	15	15	15	16	16	15	15	15	14	13	14	14	16	13	9	-	-	-	-	-	-	-	-
16a	7	7	14	14	14	12	6	6	6	13	12	14	11	13	13	13	14	13	11	11	13	16	-	-	-	-	-	-	-
16b	6	6	14	14	14	12	6	6	6	13	12	14	11	13	13	13	14	13	11	11	13	16	1	-	-	-	-	-	-
17a	11	12	12	12	13	10	8	8	8	11	10	13	8	10	13	13	12	10	8	11	12	15	9	9	-	-	-	-	-
17b	11	12	12	12	13	10	8	8	8	11	10	13	8	10	13	13	12	10	8	11	12	15	9	9	0	-	-	-	-
18	13	14	4	4	5	13	13	13	13	12	12	15	11	15	13	12	16	14	12	15	10	15	15	15	13	13	-	-	-
19	14	15	10	10	11	11	13	13	13	13	13	14	9	14	14	13	16	11	9	14	12	16	14	14	11	11	12	-	-
20	9	10	14	14	14	10	7	7	7	12	11	14	10	12	14	14	12	10	10	11	14	16	9	9	7	7	15	12	-
21	14	15	16	16	16	15	13	13	13	12	12	11	13	15	15	16	11	14	15	12	16	16	13	13	12	12	15	13	12

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

(一) 试验验证分析、综述报告

1. 不同方法验证:分别利用标准中规定的两种方法对表 5 所列的 21 份饲用燕麦品种材料进行了电泳检测，变性 PAGE 垂直板电泳与毛细管电泳检测数据一致，部分结果见图 6-图 15。使用 SSR 分子标记方法对 6 份供试样品材料（见表 6）进行了真实性检测，结果汇总见表 7。进一步把 SSR 标记方法检测结果与田间观察鉴定结果进行了比对，田间鉴定情况见表 8，比对结果显示 SSR 分子标记判断为不同品种的供试材料在田间鉴定中也得到了同样的结论。

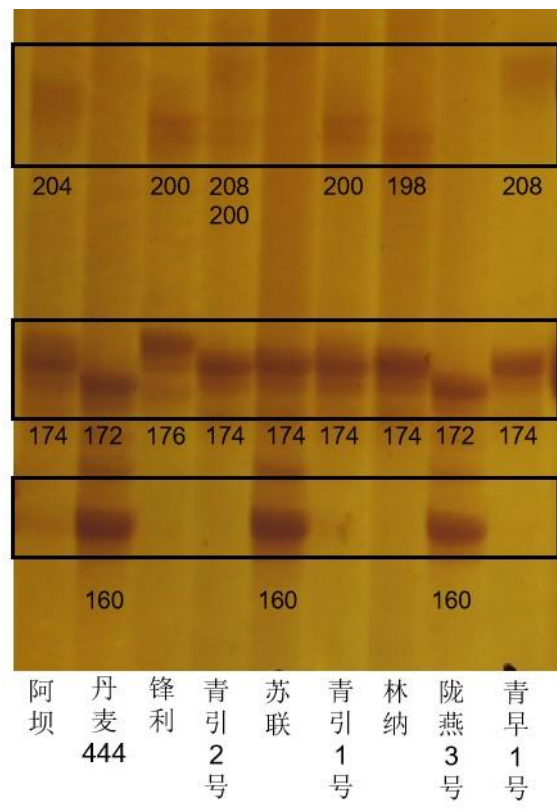


图 6 引物 M70 变性 PAGE 垂直板电泳结果

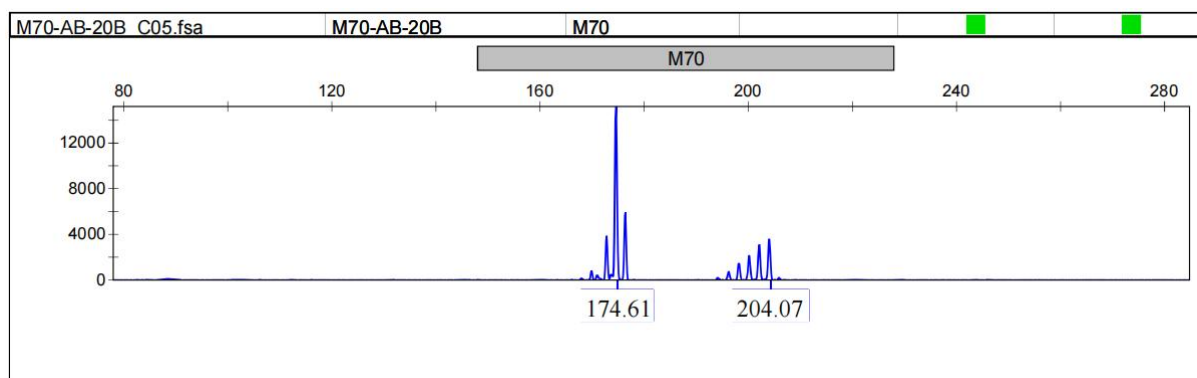


图 7 引物 M70 毛细管电泳结果（阿坝）

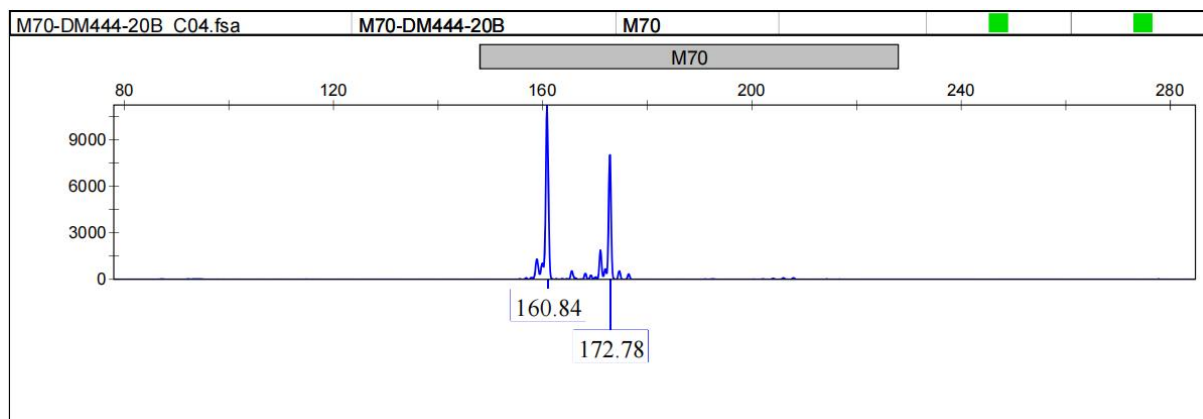


图 8 引物 M70 毛细管电泳结果（丹麦 444）

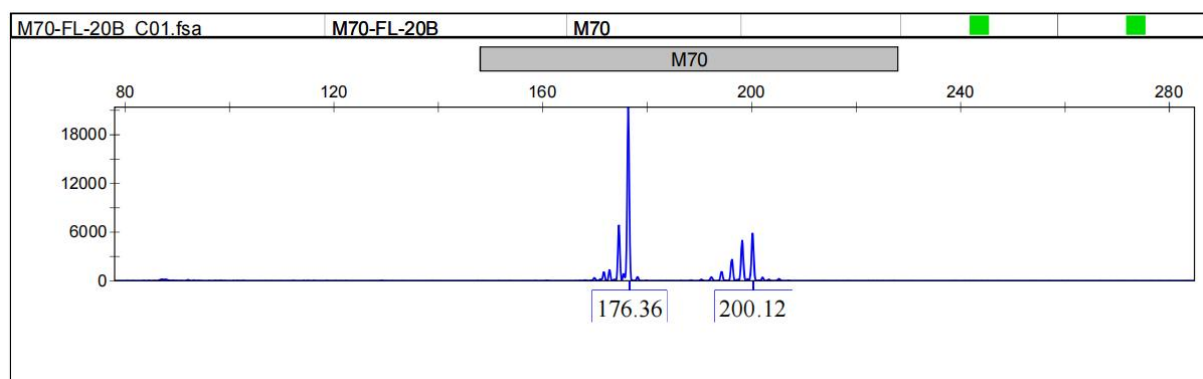


图 9 引物 M70 毛细管电泳结果（锋利）

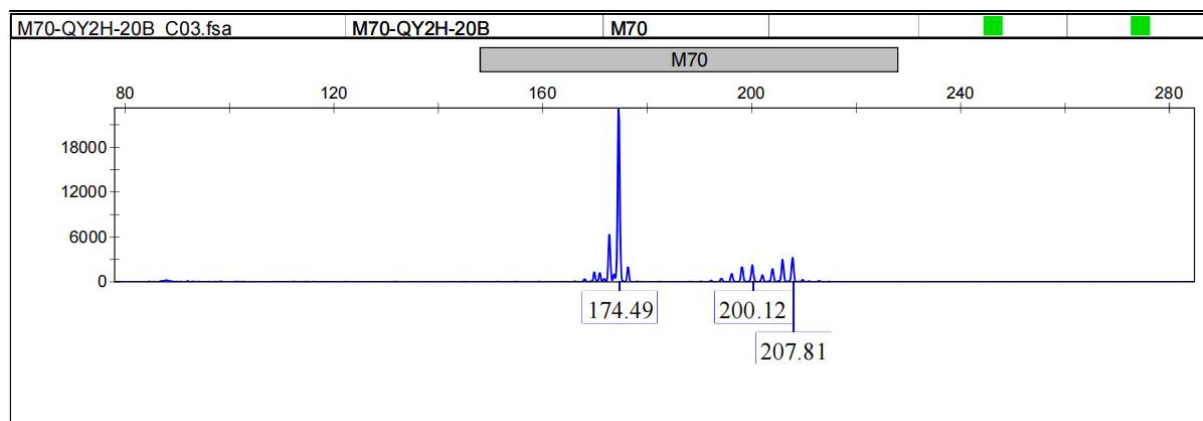


图 10 引物 M70 毛细管电泳结果（青引 2 号）

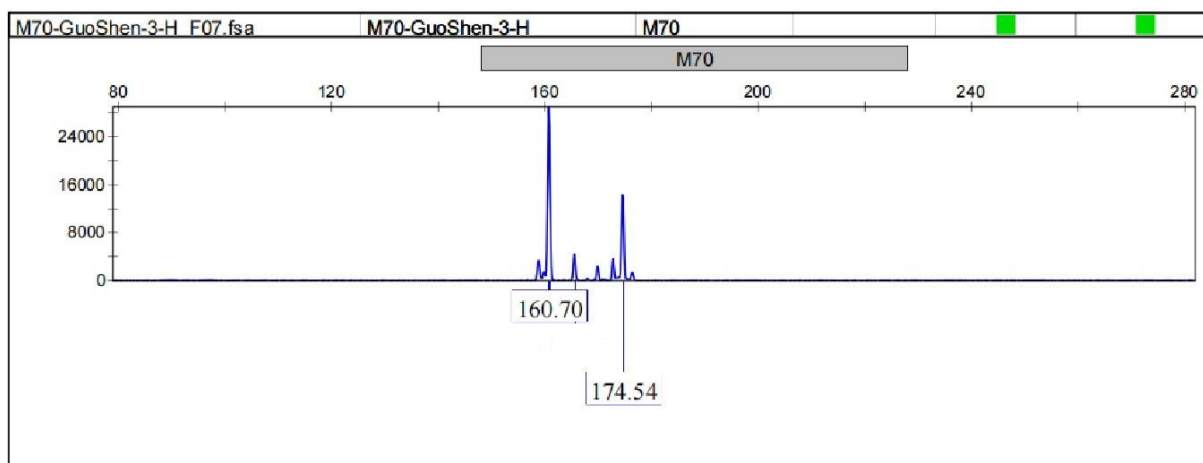


图 11 引物 M70 毛细管电泳结果（苏联）

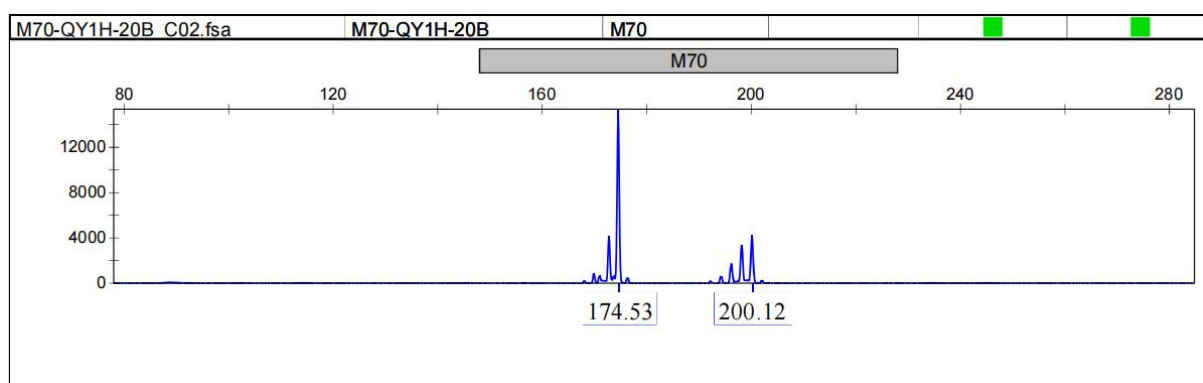


图 12 引物 M70 毛细管电泳结果（青引 1 号）

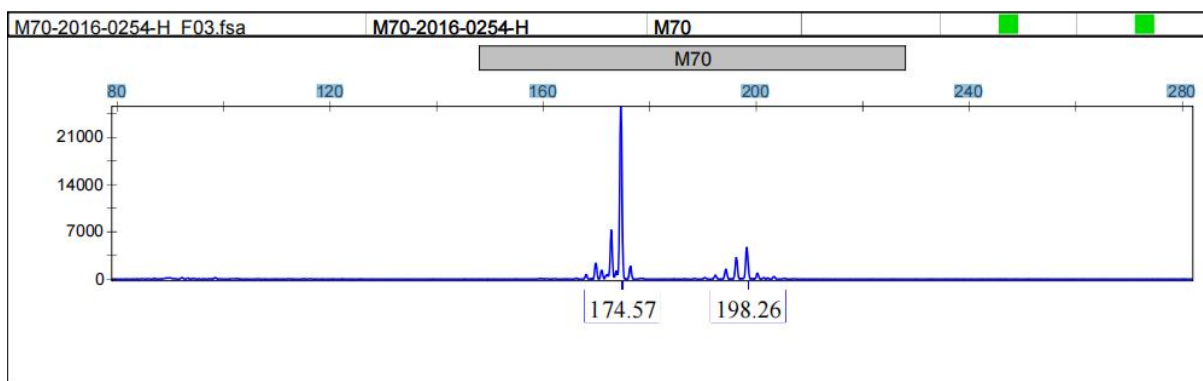


图 13 引物 M70 毛细管电泳结果（林纳）

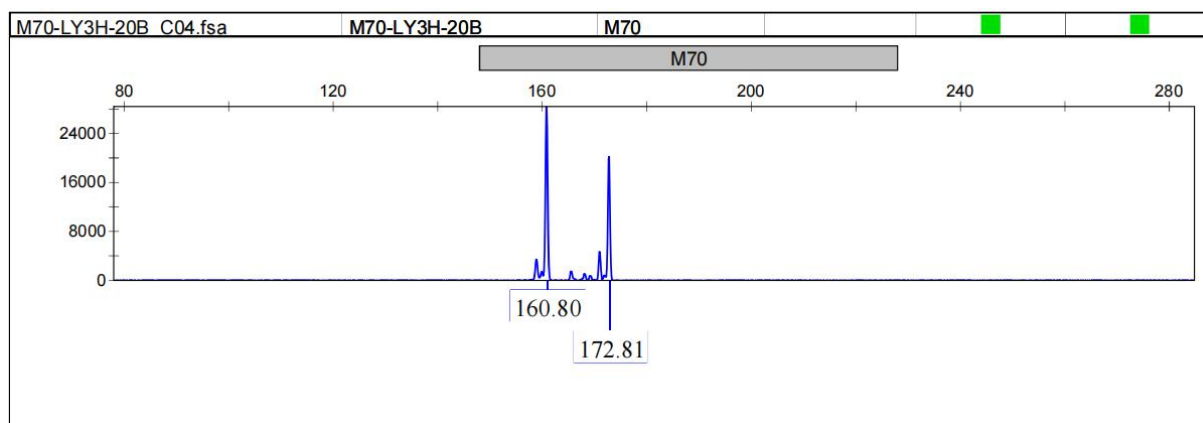


图 14 引物 M70 毛细管电泳结果（陇燕 3 号）

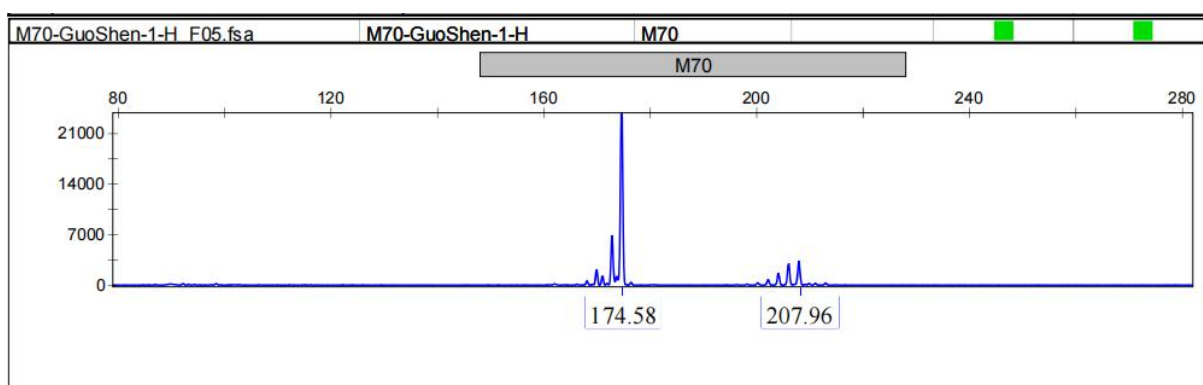


图 15 引物 M70 毛细管电泳结果（青早 1 号）

表 6 供试材料

样品编号		材料号	品种名	来源	样品编号		材料号	品种名	来源
1	送检品种	11	青引 1 号	公司	4	送检品种	27	丹麦 444	科研单位
	对照品种	3	青引 1 号	标样		对照品种	1	丹麦 444	标样
2	送检品种	24	青引 1 号	科研单位	5	送检品种	26	苏联	公司
	对照品种	3	青引 1 号	标样		对照品种	17	苏联	标样
3	送检品种	12	丹麦 444	公司	6	送检品种	25	青引 2 号	科研单位
	对照品种	1	丹麦 444	标样		对照品种	4	青引 2 号	标样

表 7 SSR 检测方法结果

样品 编号		P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	结论
1	送检 品种	101 104	153 163	257 341	231	247 251	160 172	131	236	415	199	129	124 130	201 217	197	95 123	97 119	152 158	246	差异位点数 6, 不同品种
	对照 品种	101 104	147 153	341	231	247 251	174 200	131	236	415	199	129	124	217	197	95 127	97 119	152 158	246	
2	送检 品种	104	147	257 341	231	243 247	174 200	133	236	399	199	129	124	217	197	95 127	97 119	152 158	246	差异位点数 6, 不同品种
	对照 品种	101 104	147 153	341	231	247 251	174 200	131	236	415	199	129	124	217	197	95 127	97 119	152 158	246	
3	送检 品种	101 104	147	257	231	247 251	160 172	-	236	399	199	127	124 130	217	193	93 127	95	152 158	228	差异位点数 2, 疑同品种
	对照 品种	101 104	147	257 341	231	247 251	160 172	131	236	399	199	127	124 130	217	193	93 127	95	152 158	228	
4	送检 品种	101 104	147	257	231	247 251	160 172	131	236	399	199	127	124 130	217	193	89 119	95	152 158	228	差异位点数 2, 疑同品种
	对照 品种	101 104	147	257 341	231	247 251	160 172	131	236	399	199	127	124 130	217	193	93 127	95	152 158	228	
5	送检 品种	101 104	147 153	257	255	247	176 200	131	236	415	199	117 129	124 124	217	187	89 119	97 117	152 158	246	差异位点数 10, 不同品种
	对照 品种	101 104	163	257	245	243 247	160 176	131	266	415	202	131	124 124	201	197	93 123	97	154 168	228	
6	送检 品种	101 104 107	147	257	232	247 251	176 200	131	236	-	199	137	124 130	201 217	199	95 135	95 143	150 152	246	差异位点数 1, 疑同品种
	对照 品种	101 104 107	147	257	232	247 251	176 200	131	236	-	199	137	124 130	217 217	199	95 135	95 143	150 152	246	

表 8 田间观察结果记录及统计

样品 编号		幼苗：生 长习性	幼苗：绿 色程度	抽穗 期	旗叶： 长度	旗叶：着 生姿态	植株： 高度	外稃： 颜色	内稃： 颜色	籽实：基部 茸毛大小	籽实：基部 茸毛长度	籽粒： 形状	籽粒： 颜色	结论（判定不同品 种性状差异数阈 值为 2）
1	送检 品种	匍匐	中	极早 到早	长	水平	中	白色	白色	弱	中	长筒形	浅黄色	差异性状数 3，不 同品种
	对照 品种	半匍匐	深绿	极早 到早	长	向上	中	白色	白色	中	中	长筒形	浅黄色	
2	送检 品种	匍匐	深绿	极早 到早	长	向上	中	白色	白色	弱	短	长筒形	浅黄色	差异性状数 3，疑 同品种
	对照 品种	半匍匐	深绿	极早 到早	长	向上	中	白色	白色	中	中	长筒形	浅黄色	
3	送检 品种	半匍匐	深绿	早	长	水平	中	褐色	褐色	少	短	长筒形	浅黄色	差异性状数 0，疑 同品种
	对照 品种	半匍匐	深绿	早	长	水平	中	褐色	褐色	少	短	长筒形	浅黄色	
4	送检 品种	半匍匐	深绿	早	长	水平	中	褐色	褐色	少	短	长筒形	浅黄色	差异性状数 0，疑 同品种
	对照 品种	半匍匐	深绿	早	长	水平	中	褐色	褐色	少	短	长筒形	浅黄色	
5	送检 品种	半匍匐	深绿	早到 中	长	下垂	矮	白色	白色	弱	短	纺锤形	中等黄 色	差异性状数 7，不 同品种
	对照 品种	半匍匐	深绿	中晚	长	下垂	高	黄色	黄色	少	短	长筒形	浅黄色	
6	送检 品种	直立	中	极早	长	水平	矮	黄色	黄色	弱	短	长筒形	浅黄色	差异性状数 0，疑 同品种
	对照 品种	直立	中	极早	长	水平	矮	黄色	黄色	弱	短	长筒形	浅黄色	

2. 不同实验室验证：本标准由北京市玉米检测中心、北京小麦工程技术中心和北京市种子检测站进行复核验证。三家验证单位采用符合《饲用燕麦品种真实性鉴别 SSR 标记法》标准规定的方法，使用 18 个 SSR 引物对委托单位提供的 10 份饲用燕麦品种样品进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行检测，最后依据标准对检测结果进行了校准，验证报告见附件 1。综合三家单位的验证报告，得出的结论是：使用该标准方法，可以稳定扩增出目的片段，实验室之间比对得到了一致的结果，表明该方法方法可行、结果可靠，满足饲用燕麦品种真实性检测的技术要求。

（二）技术经济论证

SSR 标记法在品种鉴定应用广泛，只要筛选出合适的多态性引物，建立高效的扩增检测体系，就能够以较低的经济成本获得准确的检测结果。本标准筛选出 18 对分布染色体分布均匀、扩增稳定、多态性高的饲用燕麦专用 SSR 引物，建立起稳定高效的扩增体系以及变性聚丙烯凝胶电泳和荧光标记毛细管电泳两种检测方法，为饲用燕麦品种真实性鉴别提供了一种较为经济和准确的检测方法。

（三）预期的经济效益、社会效益和生态效益

本标准可以应用于草种质量监管，为市场打假工作提供技术支持，挽回消费者的损失，保障育种者的权益；可以应用于草品种审定区域实验对照品种的筛选和新品种的确定，为推进种业发展提供助力。该技术的推广和应用预计将取得较好的经济效益、社会效益和生态效益。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

经查询，目前还没有与本标准技术内容相类似的国际、国外标准。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

经查询，目前还没有与本标准相关的国际标准，因此本标准未采用国际标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准符合《种子法》和《草种管理办法》等法律法规的要求，目前国内无相关强制性标准。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准编写过程中不存在重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

经查询，本标准中所采用的引物涉及专利“燕麦 DNA 分子指纹图谱的构建方法及应用”，专利号为：CN201710854252.4，于 2019 年 12 月 6 日授权，2021 年 12 月 3 日专利权终止。

九、实施标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本标准 of 农业行业类标准，依据《中华人民共和国标准化法》标准包括国家标准、行业标准、地方标准和团体标准、企业标准。国家标准分为强制性标准和推荐性标准，行业标准、地方标准是推荐性标准。强制性标准必须执行，国家鼓励采用推荐性标准。因此，建议《饲用玉米真实性鉴别 SSR 标记法》作为推荐性农业行业标准发布，半年后实施。

本标准拟用于规范各级草种质量监督检验机构在检测饲用燕麦种子品种真实性时所采用的仪器设备和检测方法。为了使检测人员理解标准中的要求，应由本规程的起草单位对检测人员进行理论和实际操作培训。

十、其他应当说明的事项

目前编制标准过程中无其他应予说明的事项。

参考文献

- [1] Hamada H, Petrino M G, Kakunaga T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 6465~6469.
- [2] Tautz D, Schlotterer C. Simple sequences[J]. Curr opin genet develop, 1994, 4: 832~837.
- [3] 武海, 蹇黎, 朱利泉. 中国兰花资源分子标记鉴定研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, (9): 56-60.
- [4] 徐艳芳, 向珣朝, 张艳丽等. SSR技术对杂交稻种冈优188的纯度鉴定[J]. 种子, 2012, 31(7): 126-128.
- [5] 郭民华, 王志红, 黎东亮等. 利用SSR标记快速检测玉米品种纯度[J]. 农学学报, 2013, 3(5): 4-7.
- [6] 匡猛, 杨伟华, 许红霞等. 中国棉花主栽品种DNA指纹图谱构建及SSR标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 20-27.
- [7] 张玉翠. 我国棉花品种SSR指纹数据库的初步构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [8] 李莉, 王俊峰, 颜廷进等. 基于SSR标记的山东省小麦DNA指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 537-541.
- [9] 朱正梅, 赵军华, 胡贤女. SSR指纹图谱技术在玉米种子鉴定中的应用[J]. 农业科技通讯, 2008(10): 93-95.
- [10] NY/T 2467-2013 高粱品种鉴定技术规程 SSR分子标记法.
- [11] NY/T 2466-2013 大麦品种鉴定技术规程 SSR分子标记法.
- [12] NY/T 2470-2013 小麦品种鉴定技术规程 SSR分子标记法.
- [13] NY/T 1432-2014 玉米品种鉴定技术规程 SSR标记法.
- [14] NY/T 1433-2014 水稻品种鉴定技术规程 SSR法.
- [15] NY/T 2595-2014 大豆品种鉴定技术规程 SSR分子标记法.
- [16] NY/T 3310-2018 苏丹草和高丹草品种真实性鉴别 SSR标记法.
- [17] DB/62T 4094-2020 草品种真实性检验规程 SSR标记法.
- [18] GB/T 9914-2021 主要农作物品种真实性和纯度SSR分子标记检测 玉米.
- [19] GB/T 39917-2021 主要农作物品种真实性和纯度SSR分子标记检测 稻.
- [20] 高秋, 马金星, 王芳等. 燕麦 SSR 标记开发及其在品种指纹图谱构建中的应用[J]. 分子植物育种, 2022, 20(9): 2957-2964.

- [21]周凡. 燕麦遗传多样性分析及耐盐性筛选[D]. 贵州大学, 2018.
- [22]郭红媛. 燕麦EST-SSR标记的开发和利用[J]. 植物科学学报, 2014, 32(3):240-250.
- [23]刘伟. 利用SSR分子标记对燕麦种质资源进行遗传多样性研究[J].北京:中国农业科学, 2012.
- [24]邵秀玲, 原永兰, 尼秀媚等. 燕麦属进境检疫性杂草种子的SSR标记检测[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2009, 40(4):517-520.
- [25]张恩来. 燕麦核心种质构建及其遗传多样性分析[D]. 北京:中国农业科学, 2008.
- [26]罗永聪, 马啸, 张新全. 利用SSR技术构建多花黑麦草品种指纹图谱[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(7):799-810.
- [27]张栋, 魏臻武, 武自念等. 淮阴苜蓿SSR指纹图谱的构建[J]. 草业科学, 2012, 29(6):924-930.