

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2467—2025

代替 NY/T 2467—2013

高粱品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of sorghum varieties—SSR marker method

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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 缩略语..... 1

5 原理 1

6 主要仪器设备及试剂..... 2

7 溶液配制 2

8 引物信息及使用 2

9 参照品种及使用 2

10 操作程序 2

11 结果判定与表述 4

附录 A(规范性) 主要仪器设备及试剂 5

附录 B(规范性) 溶液配制 7

附录 C(规范性) 引物及序列 9

附录 D(资料性) 引物相关信息 10

附录 E(资料性) 参照品种相关信息 15

附录 F(资料性) 引物分组 16

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。

本文件代替 NY/T 2467—2013《高粱品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法》，与 NY/T 2467—2013 相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- a) 增加了“NY/T 2594 植物品种鉴定 DNA 指纹方法 总则”（见第 2 章）、“缩略语”（见第 4 章）、“参照品种及使用”（见第 9 章）、“参照品种相关信息”（见附录 E）；
- b) 删除了“品种”“核心引物”“参照品种”（见第 3 章）；
- c) 修改了“反应体系”（见 10.3.1）、“反应程序”（见 10.3.2）、“引物及序列”（见附录 C）、“引物相关信息”（见附录 D）。

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。

本文件由全国植物新品种测试标准化技术委员会(SAC/TC 277)归口。

本文件起草单位：吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)。

本文件主要起草人：李晓辉、张春宵、吴律、辛贵民、李淑芳、王吉艳、周紫阳、郝彩环、刘学岩、董菁、李继洪、王甯、陈冰孺。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2013 年首次发布为 NY/T 2467—2013；

——本次为第一次修订。



高粱品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行高粱(*Sorghum bicolor* L.)品种鉴定的术语和定义、缩略语、原理、主要仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息及使用、参照品种及使用、操作程序、数据记录、结果判定与表述。

本文件适用于高粱品种 DNA 分子数据采集和品种鉴定。

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 禾谷类

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19557.15 植物品种特异性、一致性和稳定性测试指南 高粱

NY/T 2594 植物品种鉴定 DNA 分子标记法 总则

3 术语和定义

NY/T 2594 界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

APS:过硫酸铵(ammonium persulphate)。

bp:碱基对(base pair)。

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(deoxyribonucleoside triphosphate)。

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)。

PAGE:聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)。

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

SBI:高粱染色体符号[Sorghum bicolor (L.) chromosomes ideogram]。

SSR:简单重复序列(simple sequence repeat)。

Taq 酶:耐热 DNA 聚合酶(Taq-DNA polymerase)。

TE:三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)。

TBE:三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸(Tris-borate-EDTA)。

TEMED:四甲基乙二胺(*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine)。

Tris:三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane THAM]。

5 原理

高粱品种基因组存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同高粱品种在同一 SSR 的重复次数存在差异,这种差异可通过 PCR 扩增及电泳方法进行检测,进而区分不同的高粱品种。

6 主要仪器设备及试剂

主要仪器设备及试剂见附录 A。

7 溶液配制

溶液配制方法见附录 B。

8 引物信息及使用

引物及序列见附录 C,引物相关信息见附录 D。利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测时选择普通引物;利用荧光毛细管电泳检测时选择荧光标记引物,荧光标记位于正向引物 5'端,推荐的荧光标记见附录 D。可利用附录 C 中的引物序贯检测,当检测到的差异位点数能判定送检样品与对照样品不同时,停止检测。

9 参照品种及使用

参照品种用于辅助确定送检样品在某个位点的等位变异,宜与送检样品同时检测,参照品种相关信息见附录 D 和附录 E。

10 操作程序

10.1 样品准备

送检样品材料可为种子、幼嫩叶片等组织或器官。送检样品为种子时,应符合 GB 4401.1 中对高粱种子纯度的要求。

种子样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的要求。每份样品不少于 20 个个体,等量混合分析,必要时进行个体检测。

10.2 DNA 提取

称取样品约 200 mg,置于 2.0 mL 圆底离心管中,经液氮冷冻后充分研磨。每管加入 700 μ L 预热到 65 $^{\circ}$ C 的 CTAB 缓冲液,并使其混匀。65 $^{\circ}$ C 水浴加热 45 min,每隔 15 min 轻缓颠倒混匀。水浴后,取出离心管,冷却至室温。每管加入 700 μ L 的三氯甲烷和异戊醇的混合液(体积比为 24 : 1),轻缓混匀 5 min~10 min。12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转至新 2.0 mL 离心管中。每管加入 10 μ L RNA 酶溶液(10 mg/mL),37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min。加入 700 μ L 的三氯甲烷和异戊醇的混合液(体积比为 24 : 1),轻缓混匀 5 min~10 min。12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转至新 2.0 mL 离心管中。加入-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇(1 倍体积)或无水乙醇(2 倍体积),轻轻混匀。-20 $^{\circ}$ C 静置至 DNA 凝集,室温下钩出 DNA。用体积分数为 70%乙醇溶液洗涤 2 次,晾干。加入 200 mL 的 1 $\times$ TE 缓冲液充分溶解,检测 DNA 浓度和质量,-20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

注 1:以上为推荐的 DNA 提取方法,DNA 质量能够满足 PCR 扩增要求的其他 DNA 提取方法均适用于本文件。DNA 溶液的紫外吸光度 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.7~2.0。

10.3 PCR 扩增

10.3.1 引物选择反应体系

PCR 扩增反应体系的总体积和各组分的终浓度参照表 1 配制,可以依据试验条件调整。

表 1 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	推荐体积, μ L
10 $\times$ 缓冲液(含 Mg ²⁺)	10 $\times$	1 $\times$	2.0
dNTPs	10 mmol/L	0.15 mmol/L	0.3
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.2
正向引物	10 μ mol/L	0.25 (mol/L)	0.5

表 1（续）

反应组分	原浓度	终浓度	推荐体积, μL
反向引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.25 (mol/L	0.5
DNA	20 ng/ μL	2.0 ng/ μL	2.0
双蒸水	—	—	14.5
总体积			20.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序:95℃预变性 5 min,1 个循环;95℃变性 40 s,60℃退火 35 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃延伸 60 min,4℃保存。

反应程序中各反应参数可根据 PCR 扩增仪型号、酶、引物等不同而做适当的调整。

10.4 PCR 产物电泳

10.4.1 垂直板变性 PAGE

10.4.1.1 制胶

用洗涤剂将玻璃板清洗干净,再用双蒸水、无水乙醇依次擦洗 2 遍。玻璃板干燥后,将 2 mL~3 mL 亲和硅烷工作液均匀涂在长玻璃板上,将 2 mL~3 mL 剥离硅烷工作液均匀涂在带凹槽的短玻璃板上。操作过程中应防止两块玻璃板互相污染。玻璃板彻底干燥后,将 0.4 mm 厚的塑料隔条整齐放在长玻璃板两侧,盖上凹槽短玻璃板,用夹子固定,用水平仪调平。

取 50 mL 质量分数为 6%的 PAGE 胶溶液,加入 65 μL 四甲基乙二胺(TEMED)和 250 μL 质量分数为 10%的过硫酸铵(APS),迅速混匀,将胶灌入玻璃胶室,灌胶过程中应防止出现气泡。待胶室灌满后,在凹槽处将 0.4 mm 厚鲨鱼齿梳子平齐端向里轻轻插入胶液约 4 mm,室温聚合 1 h 以上,胶聚合后,清理胶板表面溢出的胶液,轻轻拔出梳子,用水洗净备用。

10.4.1.2 变性

20 μL PCR 扩增样品加入 3 μL 6× 加样缓冲液,混匀。PCR 扩增仪上运行 95℃变性 10 min,4℃冷却 10 min 以上备用。

10.4.1.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上,在正极槽(下槽)中加入 1× TBE 缓冲液 600 mL,在负极槽(上槽)中加入 0.5× TBE 缓冲液 600 mL,使其没过电极线。拔出梳子,80 W 恒功率预电泳 30 min~40 min。用移液器吹吸加样槽,清除气泡和杂质。将样品梳(鲨鱼齿朝下)插入凝胶 1 mm~2 mm。每一个加样孔点入 4 μL 样品。除送检样品外,还宜同时加入参照品种扩增产物和合适的 DNA 分子量标准。70 W 恒功率电泳至上部的指示带(二甲苯青)达到胶板的中部(45 min~50 min)。电泳结束后关闭电源,取下玻璃板并轻轻撬开,凝胶附着在长玻璃板上。

10.4.1.4 染色

将附着凝胶的长玻璃板胶面向上浸入固定液中,轻轻晃动 3 min 后取出,在双蒸水中漂洗 3 min;将胶板放入新配染色液中,轻轻晃动 20 min 后取出,在双蒸水中快速漂洗,时间不超过 10 s;将胶板放入显影液中,轻摇晃动待条带清晰后取出,再迅速放入固定液中定影 2 min 取出,在双蒸水中漂洗 2 min;取出胶板,晾干,放在胶片观察灯上观察,记录结果,拍照保存。

注:固定液、染色液、双蒸水和显影液的用量,以淹没胶面为准。

10.4.2 荧光毛细管电泳

10.4.2.1 PCR 产物样品准备

根据预先确定的引物分组(见附录 F),分别取等体积不同荧光标记的扩增产物,混匀稀释。吸取 1 μL 混合液加入 DNA 分析仪配套上样板中。

注:稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。

10.4.2.2 变性

上样板中各孔分别加入 0.1 μL 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。将样品在 PCR 仪上 95℃变性

5 min,取出并立即置于碎冰上,冷却 10 min 以上。离心 10 s 后备用。

10.4.2.3 荧光检测

按照 DNA 分析仪器操作手册电泳,并保存电泳原始数据文件。

10.5 数据分析

10.5.1 等位变异确定与记录

每个 SSR 位点的等位变异参照扩增片段大小确定,见附录 D。对于变性 PAGE,将送检样品在某一 位点扩增片段的迁移位置与对应的参照品种进行比较,确定送检样品在该位点的等位变异。对于荧光毛 细管电泳,通过参照品种消除不同批次或者不同型号 DNA 分析仪可能存在的系统误差,使用片段分析软 件读取送检样品在该位点的等位变异。

纯合位点的等位变异数据记录为 X/X ,杂合位点的等位变异数据记录为 X/Y ,其中 $X、Y$ 分别为该 位点上的两个等位变异,小片段数据在前,大片段数据在后。缺失位点的等位变异数据记录为 $0/0$ 。

示例 1:样品在某个位点上仅出现一个等位变异,为 231 bp,则该位点的等位变异数据记录为 231/231。

示例 2:样品在某个位点上有两个等位变异,分别为 163 bp、170 bp,则该位点的等位变异数据记录为 163/170。

10.5.2 数据对比与差异位点统计

逐一比对送检样品与对照样品每个位点的等位变异数据,按照位点相同、位点差异、数据缺失、无法判 定情形,记录每个位点的比对结果,统计检测位点数和差异位点数。

11 结果判定与表述

11.1 判定规则

依据附录 D 的表 D.1 中 40 对引物的检测结果进行判定。

- a) 当样品间差异位点数大于 2,则判定为“不同品种”;
- b) 当样品间差异位点数小于等于 2,判定为“疑似品种”。

对利用附录 C 中 40 对引物仍未检测到大于 2 个差异位点数的样品,可按照 GB/T 19557.15 的规定 进行田间种植鉴定。

11.2 结果表述

送检样品_____与对照样品_____ (或对照样品_____ 指纹)采用_____ 检测,检 测位点数为_____,差异位点数为_____,判定为_____。

附 录 A
(规范性)
主要仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 PCR 扩增仪。
- A.1.2 高压电泳仪:规格为 10 V~3 000 V、4 mA~400 mA、4 W~400 W,具有恒电压、恒电流和恒功率功能。
- A.1.3 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
- A.1.4 普通电泳仪。
- A.1.5 水平电泳槽及配套的制胶附件。
- A.1.6 高速冷冻离心机:最大离心力不小于 15 000 r/min。
- A.1.7 水平摇床。
- A.1.8 胶片观察灯。
- A.1.9 电子天平:感应为 0.01 g、0.001 g。
- A.1.10 微量移液器:规格分别为 10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L,连续可调。
- A.1.11 磁力搅拌器。
- A.1.12 核酸浓度测定仪或超微量紫外分光光度计。
- A.1.13 微波炉。
- A.1.14 高压灭菌锅。
- A.1.15 酸度计。
- A.1.16 水浴锅或金属浴。
- A.1.17 低温冰箱。
- A.1.18 制冰机。
- A.1.19 凝胶成像系统或紫外透射仪。
- A.1.20 DNA 分析仪:基于毛细管电泳,有片段分析功能和数据分析软件,能够分辨 1 个核苷酸大小的差异。

A.2 主要试剂

除非另有说明,均使用分析纯试剂。

- A.2.1 十六烷基三乙基溴化铵[CTAB, $C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$,CAS 号:57-09-0]。
- A.2.2 三氯甲烷($CHCl_3$,CAS 号:67-66-3)。
- A.2.3 异丙醇[(CH_3)₂CHOH,CAS 号:67-63-0]。
- A.2.4 异戊醇($C_5H_{12}O$,CAS 号:123-51-3)。
- A.2.5 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$,CAS 号:139-33-3)。
- A.2.6 三羟甲基氨基甲烷(Tris, $C_4H_{11}NO_3$,CAS 号:77-86-1)。
- A.2.7 盐酸(HCl,CAS 号:7647-01-0)。
- A.2.8 氢氧化钠(NaOH,CAS 号:1310-73-2)。

- A. 2. 9 氯化钠(NaCl,CAS 号:7647-14-5)。
- A. 2. 10 $10\times$ PCR 缓冲液。含 Mg^{2+} 25 mmol/L。
- A. 2. 11 四种脱氧核苷三磷酸。dATP、dTTP、dGTP、dCTP(浓度均为 10 mmol/L)。
- A. 2. 12 SSR 引物。
- A. 2. 13 Taq DNA 聚合酶(Taq 酶,CAS 号:9012-90-2)。5 U/(L。
- A. 2. 14 矿物油(mineral oil,CAS 号:8020-83-5)。
- A. 2. 15 琼脂糖(Agarose,CAS 号:9012-36-6)。
- A. 2. 16 DNA 分子量标准。
- A. 2. 17 核酸染色剂。
- A. 2. 18 去离子甲酰胺(CH_3NO ,CAS 号:75-12-7)。
- A. 2. 19 溴酚蓝($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$,CAS 号:115-39-9)。
- A. 2. 20 二甲苯青($C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$,CAS 号:2650-17-1)。
- A. 2. 21 甲叉双丙烯酰胺[($H_2C=CHCONH$) $_2CH_2$,CAS 号:110-26-9]。
- A. 2. 22 丙烯酰胺(C_3H_5NO ,CAS 号:79-06-1)。
- A. 2. 23 硼酸(H_3BO_3 ,CAS 号:10043-35-3)。
- A. 2. 24 尿素(CH_4N_2O ,CAS 号:57-13-6)。
- A. 2. 25 亲和硅烷(Binding Silane)。
- A. 2. 26 二甲基二氯硅烷($C_2H_6Cl_2Si$,CAS 号:75-78-5)。
- A. 2. 27 无水乙醇(C_2H_6O ,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 28 四甲基乙二胺(TEMED, $C_6H_{16}N_2$,CAS 号:110-18-9)。
- A. 2. 29 过硫酸铵[APS,(NH_4) $_2S_2O_8$,CAS 号:7727-54-0]。
- A. 2. 30 冰醋酸(CH_3COOH ,CAS 号:64-19-7)。
- A. 2. 31 硝酸银($AgNO_3$,CAS 号:7761-88-8)。
- A. 2. 32 甲醛溶液($HCHO$,CAS 号:50-00-0)。
- A. 2. 33 DNA 分析仪专用丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 34 DNA 分析仪专用分子量内标 Liz 标记。
- A. 2. 35 DNA 分析仪专用光谱校准基质,荧光标记的 DNA 片段。
- A. 2. 36 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。

附 录 B
(规范性)
溶 液 配 制

试剂配制用水应符合 GB/T 6682 的要求。

B.1 DNA 提取试剂的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 水中,加 NaOH 调 pH 至 8.0,定容至 1 000 mL,在 103.4 kPa 灭菌(121 °C)条件下灭菌 20 min。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 60.55 g Tris-base 溶于 800 mL 水中,加 HCl 调 pH 至 8.0,加水定容至 500 mL,在 103.4 kPa 灭菌(121 °C)条件下灭菌 20 min。

B.1.3 0.5 mol/L HCl 溶液

量取 25 mL 浓盐酸(质量分数为 36 %~38 %),加水定容至 500 mL。

B.1.4 CTAB 缓冲液

称取 20.0 g CTAB、81.7 g NaCl 置于 1 000 mL 烧杯中,量取 100 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液和 40 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液倒入烧杯中,加 700 mL 水,充分搅拌溶解,定容至 1 000 mL,在 103.4 kPa 灭菌(121 °C)条件下灭菌 20 min。

B.1.5 TE 缓冲液

称取 1 mol/L Tris-HCl 溶液 5 mL、0.5 mol/L EDTA 溶液 1 mL,加 HCl 调 pH 至 8.0,定容至 500 mL。

B.2 PCR 扩增试剂的配制

B.2.1 dNTPs 溶液

分别配制 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四种脱氧核糖核苷酸终浓度 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μL 混合,加水 120 μL 定容至每种核苷三磷酸终浓度为 10 mmol/L 的工作液。在 103.4 kPa 灭菌(121 °C)条件下灭菌 20 min,−20 °C 保存。

注:也可使用满足试验要求的商品 dNTP 溶液。

B.2.2 SSR 引物

开盖前瞬时离心 10 s,按照说明书加 TE 缓冲液,分别配制正向引物和反向引物终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液。分别取 10 μL 正向引物和反向引物储存液,加 80 μL TE 缓冲液配制终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂的配制

B.3.1 质量分数为 40% 的丙烯酰胺溶液

称取 190 g 丙烯酰胺和 10 g 甲叉双丙烯酰胺,加水定容至 500 mL,混匀。4 °C 储存备用。

B.3.2 质量分数为 6% 的变性 PAGE 胶溶液

称取尿素 450 g 置于 1 000 mL 烧杯中,加入 10× TBE 缓冲液 100 mL、质量分数为 40% 的 丙烯酰胺溶液 150 mL,定容至 1 000 mL。

B.3.3 亲和硅烷工作液

量取 250 μL 冰醋酸、250 μL 亲和硅烷,加无水乙醇至 50 mL,混匀。分装于 1.5 mL 离心管中。4 °C

储存备用。

B.3.4 剥离硅烷工作液

量取 10mL 二甲基二氯硅烷和 90mL 三氯甲烷,混匀。

B.3.5 质量分数为 25%的过硫酸铵(APS)溶液

称取 0.25 g 过硫酸铵溶于 1 mL 水中。

B.3.6 10×TBE 缓冲液

称取 Tris-base 108 g、硼酸 55 g、EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.44 g,定容至 1 000 mL。

B.3.7 1×TBE 缓冲液

量取 10×TBE 缓冲液 500 mL,加水定容至 5 000 mL。

B.3.8 0.5×TBE 缓冲液

量取 10×TBE 缓冲液 250 mL,加水定容至 5 000 mL。

B.3.9 6×加样缓冲液

称取溴酚蓝 0.125 g、二甲苯青 0.125 g,加入去离子甲酰胺 49 mL、0.5 mmol/L EDTA 溶液 1 mL。

B.4 银染试剂的配制

B.4.1 固定液

量取 200 mL 冰醋酸,加水定容至 2 000 mL。

B.4.2 染色液

称取 3 g 硝酸银,加水定容至 2 000 mL。

B.4.3 显影液

称取 25 g 氢氧化钠,量取 7 mL 甲醛,溶于 2 000 mL 水中。

附 录 C
(规范性)
引物及序列

引物及序列见表 C. 1。

表 C. 1 引物及序列

引物编号	引物名称	染色体位置	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
LC1-01	SBKAFGK1	SBI05	AGCATCTTACAACAACCAAT	CTAGTGCAGTGTGATGAC
LC1-02	Txp168	SBI07	AGTCAAAACCGCCACAT	GAGAAGGGGAGAGGAGAA
LC1-03	Txp426	SBI03	GCGTATGAATCTTCGTTTTATTCA	CCATCATTTTGATGAAATGCAC
LC1-04	SB868	SBI01	CTCATCAGGCTAAAATGATCACCG	ATCGAGCACCTGAAACATGAAACA
LC1-05	Txp015	SBI05	CACAAACACTAGTGCCTTATC	CATAGACACCTAGGCCATC
LC1-06	SB596	SBI01	GTACCAGGAGAGGCTGCTCAACAT	GGCTTGGCTCTTGCACTAGATGAT
LC1-07	SB2507	SBI04	CTTTCTCTCTCCACCTTTTCACGC	GGTGTGGATTCTCTGAGGTTTGCT
LC1-08	Txp021	SBI04	GAGCTGCCATAGATTTGGTTCG	ACCTCGTCCACCTTTGTGTTG
LC1-09	SB5014	SBI09	ATTCCACCGCACAGAATTTGTCTT	AAGAACCGTTCATCTCTGCTGACC
LC1-10	Txp41	SBI04	TCTGGCCATGACTTATCAC	AAATGGCGTAGACTCCCTTG
LC2-01	SB5407	SBI10	GAGTCTGCGCTTATTGTGCCTTTT	TGCCTTTTTTGCCAGATCTTTCTTC
LC2-02	Txp23	SBI05	AATCAACAAGAGCGGGAAAG	TTGAGATTCGCTCCACTCC
LC2-03	SB3811	SBI06	TGCTATGACTGTCTTTGGCTCACA	CTGACTTCGAGCAAGTACAGCAGC
LC2-04	Txp010	SBI09	ATACTATCAAGAGGGGAGC	AGTACTAGCCACACGTCAC
LC2-05	Txp481	SBI07	CCAGGAGATGCCAGAAGTGT	GCATAAAACATTTGGAAACTCAAA
LC2-06	Txp289	SBI09	AAGTGGGGTGAAGAGATA	CTGCCTTTCCGACTC
LC2-07	Txp317	SBI06	CCTCCTTTTCTCCTCCTCCC	TCAGAATCCTAGCCACCGTTG
LC2-08	Txp7	SBI02	ACATCTACTACCCTCTCACC	ACACATCGAGACCAGTTG
LC2-09	SB934	SBI02	CAACCCAAGAGAGGGATTGTGACT	CCTCGCTCTTCCAACCTCTTGAAT
LC2-10	Txp424	SBI03	GCATCTGTAAGTTGCCACCA	ACAGCTGCACTCCAGGATTT
LC3-01	Txp65	SBI05	CACGTCGTCACCAACCAA	GTTAAACGAAAGGGAAATGGC
LC3-02	Txp230	SBI09	GCTACCGCTGCTGCTCT	AGGGGGCATCCAAGAAAT
LC3-03	Txp123	SBI05	TCGGCGAGCATCTTACA	TACGTAGGCGGTTGGATT
LC3-04	Txp159	SBI07	ACCCAAAGCCCAAATCAG	GGGGGAGAAACGGTGAG
LC3-05	SB3683	SBI06	GCGAAAAGGATTTTCAACTATGGG	TTTGTCTTGACGTTTCTTGACGAG
LC3-06	Gpsb089	SBI01	ATCAGGTACAGCAGGTAGG	ATGCATCATGGCTGGT
LC3-07	Txp482	SBI01	ATGTGTCCAGCCATGCATAA	CTCATGTAGGGGCGAGTGTC
LC3-08	Sb1-10	SBI04	ACAGGGCTTTAGGGAAATCG	CCATCACCGTCGGCATCT
LC3-09	Txp436	SBI03	GGGTGACTGGTCCGTTCTC	TTCCAGTCCTTGGTGACCTC
LC3-10	Cup07	SBI10	CTAGAGGATTGCTGGAAGCG	CTGCTCTGCTTGTGCTTGAG
LC4-01	Txp430	SBI02	AGTATTTGCCGCTGGTGAAG	TCTCGATTTGCACAGGCTTT
LC4-02	Txp130	SBI10	TGGGAAGCAGCTCAGG	AGGGTGGTGATGTAGGGA
LC4-03	Txp80	SBI02	GCTGCACTGTCTCCCAACAA	CAGCAGGCGATATGGATGAGC
LC4-04	Txp516	SBI08	TCCGAGACAACAGGGAGAAG	TCCCGCTACTGCATTTCTTT
LC4-05	SB5360	SBI10	ATCGAGGTTTCTGCATATCTCAGC	CTTTCGACGTACCTGTCTCGTCT
LC4-06	Txp17	SBI06	CGGACCAACGACGATTATC	ACTCGTCTCACTGCAATACTG
LC4-07	Txp494	SBI03	CGTCCTCGTCTCCTTCGTC	GCATGTTTCAGGAGAGCATCA
LC4-08	SB4273	SBI08	GCCGGCATACCAAGAACAAAGTTA	TTAAGCTGTCTCACTGCCGAGTTG
LC4-09	Txp321	SBI08	TAACCCAAGCCTGAGCATAAGA	CCCATTCACACATGAGACGAG
LC4-10	Txp99	SBI07	CACAAAGGCACCGAACAAAAC	CAGAGGCCGAGGACGAG

附 录 D
(资料性)
引物相关信息

引物相关信息见表 D. 1。

表 D. 1 引物相关信息

引物编号	引物名称	推荐荧光类型	PIC	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
LC1-01	SBKAFGK1	FAM	0. 706	118~137	118	F4B
					122	康 60
					131	5-27
					137	QL33B
LC1-02	Txp168	FAM	0. 756	176~180	176	F4B
					178	421B
					180	晋梁 5 号
LC1-03	Txp426	FAM	0. 499	240~252	240	晋梁 5 号
					245	TX430
					247	白平
					250	TX622B
					252	F4B
LC1-04	SB868	VIC	0. 651	124~152	124	晋梁 5 号
					135	0-30
					138	吉恢 7384
					143	QL33B
					146	V4B
					148	吉 R105
					150	421B
					152	F4B
LC1-05	Txp015	VIC	0. 634	200~228	200	5-27
					212	晋梁 5 号
					216	F4B
					222	白平
					228	黔高 8 号
LC1-06	SB596	NED	0. 711	173~184	173	晋梁 5 号
					179	QL33B
					184	TX622B
LC1-07	SB2507	NED	0. 756	224~283	244	铁恢 157
					252	白平
					255	7050B
					259	晋梁 5 号
					266	TX622B
					283	F4B
LC1-08	Txp021	PET	0. 638	172~191	172	晋梁 5 号
					174	克皮西瓦西
					176	齐 22
					178	吉恢 7384
					182	F4B
					187	和姪
					191	5-27

表 D.1 (续)

引物编号	引物名称	推荐荧光类型	PIC	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
LC1-09	SB5014	PET	0.670	227~243	227	7501B
					231	晋梁 5 号
					237	QL33B
					243	V4B
LC1-10	Txp41	PET	0.763	265~300	265	永 59
					268	辽恢 115
					275	吉恢 7384
					280	F4B
					284	晋梁 5 号
					298	QL33B
					300	421B
LC2-01	SB5407	FAM	0.719	123~152	123	晋梁 5 号
					133	QL33B
					139	V4B
					141	TX622B
					148	铁恢 157
					152	铁恢 6 号
LC2-02	Txp23	FAM	0.720	176~200	176	QL33B
					178	铁恢 6 号
					182	7501B
					184	晋梁 5 号
					186	三尺三
					196	铁恢 208
LC2-03	SB3811	FAM	0.743	242~248	242	铁恢 157
					244	晋梁 5 号
					246	TX622B
					248	QL33B
LC2-04	Txp010	VIC	0.790	133~150	133	三尺三
					142	晋梁 5 号
					144	TX622B
					146	F4B
					148	QL33B
					150	5-27
LC2-05	Txp481	VIC	0.759	205~225	205	晋梁 5 号
					209	0-30
					211	TX622B
					213	吉恢 7384
					215	QL33B
					217	铁恢 208
					220	铁恢 157
					225	F4B
LC2-06	Txp289	VIC	0.689	263~320	263	LTR108
					269	QL33B
					272	晋梁 5 号
					276	铁恢 157
					288	TX622B
					294	康 60
					300	克皮西瓦西
					320	永 59
LC2-07	Txp317	NED	0.499	259~265	159	TX622B
					162	F4B
					165	克皮西瓦西

表 D.1 (续)

引物编号	引物名称	推荐荧光类型	PIC	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
LC2-08	T _{xp} 7	NED	0.535	213~239	213	F4B
					222	铁恢 157
					231	QL33B
					235	鄂荆四不像
					239	齐 22
LC2-09	SB934	PET	0.623	168~187	168	7501B
					181	QL33B
					185	晋梁 5 号
					187	0-30
LC2-10	T _{xp} 424	PET	0.713	226~240	226	F4B
					234	TX622B
					236	421B
					238	矮四
					240	晋梁 5 号
LC3-01	T _{xp} 65	FAM	0.580	121~136	121	矮四
					126	TX622B
					129	铁恢 157
					131	QL33B
					133	TX430
					136	新高梁 2 号
LC3-02	T _{xp} 230	FAM	0.822	164~201	164	鄂荆四不像
					170	F4B
					178	QL33B
					182	永 59
					187	白平
					195	铁恢 208
					197	0-30
					201	康 60
LC3-03	T _{xp} 123	FAM	0.596	256~273	256	晋梁 5 号
					259	7501B
					267	5-27
					273	TX622B
LC3-04	T _{xp} 159	VIC	0.807	155~196	155	314B
					165	晋梁 5 号
					170	永 59
					173	F4B
					179	QL33B
					184	吉恢 7384
					196	黔高 8 号
LC3-05	SB3683	VIC	0.711	231~245	231	晋梁 5 号
					236	QL33B
					242	F4B
					245	5-27
LC3-06	G _{psb} 089	NED	0.651	166~174	166	晋梁 5 号
					168	421B
					170	F4B
					174	白平
LC3-07	T _{xp} 482	NED	0.572	225~235	225	晋梁 5 号
					229	铁恢 157
					231	F4B
					235	TX622B

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	推荐荧光类型	PIC	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
LC3-08	Sb1-10	NED	0.634	285~312	285	F4B
					298	晋梁 5 号
					304	5-27
					312	康 60
LC3-09	Txp436	PET	0.314	138~158	138	铁恢 157
					141	晋梁 5 号
					149	TX622B
					155	吉恢 7384
					158	421B
LC3-10	Cup07	PET	0.706	194~273	194	晋梁 5 号
					197	LR9198
					258	F4B
					270	TX622B
					273	V4B
LC4-01	Txp430	FAM	0.529	155~167	155	7501B
					158	晋梁 5 号
					167	铁恢 157
LC4-02	Txp130	FAM	0.626	247~257	247	铁恢 157
					250	晋梁 5 号
					253	F4B
					255	QL33B
					257	永 59
LC4-03	Txp80	FAM	0.709	282~317	282	晋辐 1 号
					284	F4B
					294	晋梁 5 号
					298	吉恢 7384
					300	QL33B
					317	永 59
LC4-04	Txp516	VIC	0.580	161~172	161	晋梁 5 号
					163	吉恢 7384
					163/170	鄂荆三不像
					172	QL33B
LC4-05	SB5360	VIC	0.772	237~266	237	F4B
					239	QL33B
					241	晋梁 5 号
					250	康 60
					252	铁恢 157
					250/266	吉杂 124
LC4-06	Txp17	NED	0.766	162~188	162	铁恢 157
					164	QL33B
					168	铁恢 208
					184	白平
					186	晋梁 5 号
					188	三尺三
LC4-07	Txp494	NED	0.744	197~224	197	QL33B
					206	F4B
					209	421B
					212	铁恢 157
					215	TX622B
					218	吉恢 7384
					224	康 60

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	推荐荧光类型	PIC	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
LC4-08	SB4273	NED	0. 268	257~268	257	吉 4190A
					260	三尺三
					268	晋梁 5 号
LC4-09	Txp321	PET	0. 806	192~235	192	永 59
					202	TX430
					205	F4B
					209	TX622B
					212	吉恢 7384
					221/235	川糯梁 1 号
					235	晋梁 5 号
LC4-10	Txp99	PET	0. 400	272~289	272	421B
					275	V4B
					277	齐 22
					287	晋梁 5 号
					289	白平
注 1:附录 D 中采用的荧光标记仅为示例,采用其他类型荧光标记时,应使用参照品种校正数据。 注 2:附录 D 中未包括的等位变异,应按本文件方法,确定其大小和相应参照品种。 注 3:附录 D 中所列参照品种仅为示例,与参照品种具有相同等位变异的其他品种也可用作该等位变异的参照品种。 注 4:同一名称不同来源的参照品种,在某些位点上的等位变异可能不相同,使用前应确认其等位变异。						

附 录 E
(资料性)
参照品种相关信息

参照品种相关信息见表 E. 1。

表 E. 1 参照品种相关信息

序号	参照品种名称	来源
1	5-27	国家农作物种质资源保存中心
2	0-30	国家农作物种质资源保存中心
3	314B	国家农作物种质资源保存中心
4	421B	国家农作物种质资源保存中心
5	7050B	国家农作物种质资源保存中心
6	7501B	国家农作物种质资源保存中心
7	F4B	国家农作物种质资源保存中心
8	LR9198	国家农作物种质资源保存中心
9	LTR108	国家农作物种质资源保存中心
10	QL33B	国家农作物种质资源保存中心
11	TX430	国家农作物种质资源保存中心
12	TX622B	国家农作物种质资源保存中心
13	V4B	国家农作物种质资源保存中心
14	矮四	国家农作物种质资源保存中心
15	白平	国家农作物种质资源保存中心
16	川糯梁 1 号	国家农作物种质资源保存中心
17	鄂荆三不像	国家农作物种质资源保存中心
18	鄂荆四不像	国家农作物种质资源保存中心
19	和姓	国家农作物种质资源保存中心
20	吉 4190A	国家农作物种质资源保存中心
21	吉 R105	国家农作物种质资源保存中心
22	吉恢 7384	国家农作物种质资源保存中心
23	吉杂 124	国家农作物种质资源保存中心
24	晋辐 1 号	国家农作物种质资源保存中心
25	晋梁 5 号	国家农作物种质资源保存中心
26	康 60	国家农作物种质资源保存中心
27	克皮西瓦西	国家农作物种质资源保存中心
28	辽恢 115	国家农作物种质资源保存中心
29	齐 22	国家农作物种质资源保存中心
30	黔高 8 号	国家农作物种质资源保存中心
31	三尺三	国家农作物种质资源保存中心
32	铁恢 157	国家农作物种质资源保存中心
33	铁恢 208	国家农作物种质资源保存中心
34	铁恢 6 号	国家农作物种质资源保存中心
35	新高粱 2 号	国家农作物种质资源保存中心
36	永 59	国家农作物种质资源保存中心

附 录 F
(资料性)
引 物 分 组

引物分组见表 F.1。

表 F.1 引物分组

组别	FAM 标记引物	VIC 标记引物	NED 标记引物	PET 标记引物
1	LC1-01(118~137)	LC1-04(124~152) LC1-05(200~228)	LC1-06(173~184)	LC1-08(172~191)
	LC1-07(224~283)		LC1-09(227~243)	
			LC1-10(265~300)	
2	LC2-01(123~152)	LC2-04(133~150) LC2-05(205~225) LC2-06(263~320)	LC2-07(259~265)	LC2-09(168~187)
	LC2-08(213~239)		LC2-10(226~240)	
3	LC3-01(121~136)	LC3-04(155~196) LC3-05(231~245)	LC3-06(166~174)	LC3-09(138~158)
	LC3-07(225~235)		LC3-10(194~273)	
	LC3-08(285~312)			
4	LC4-01(155~167)	LC4-04(161~172) LC4-05(237~266)	LC4-06(162~188)	LC4-09(192~235)
	LC4-07(197~224)		LC4-10(272~289)	
	LC4-08(257~268)			
注 1:括号内是各引物的等位变异范围。				
注 2:同组别内引物的扩增产物可以多重电泳。				
注 3:可结合引物等位变异范围,更换荧光标记,调整分组。				