

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4477—2025

小豆品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi]
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..... 1

7 溶液配制 2

8 引物相关信息 2

9 参照品种 2

10 操作程序 2

11 结果统计 4

12 结果判定 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) 引物名单及序列 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 14

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这些专利的责任。

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：农业农村部科技发展中心、湖南农业大学、山西农业大学(山西省农业科学院)玉米研究所、中国农业科学院作物科学研究所。

本文件主要起草人：邓超、颜军、焦雄飞、陈红霖、杨旭红、韩瑞玺、马莹雪、张凯浙、李媛媛、冯艳芳、雷东阳、唐浩、陈红、张秀杰。



小豆品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行小豆[*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi] 品种鉴定的操作程序、数据处理和结果判定。

本文件适用于小豆品种 SSR 指纹数据采集、数据库构建和品种鉴定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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 规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(cetyltrimethyl ammonium bromide)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside 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)

SSR:简单重复序列(simple sequence repeat)

Taq 酶:耐热 DNA 聚合酶(*Taq*-DNA polymerase)

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

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)

5 原理

不同小豆品种基因组中 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,进而区分不同的小豆品种。

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 引物相关信息

引物名单及序列见附录 C,引物相关信息见附录 D。

9 参照品种

参照品种相关信息见附录 E。

10 操作程序

10.1

样品准备

送检样品可为种子、幼苗、叶片等组织或器官。样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的要求。每份样品取不少于 30 个个体的叶片或其他等效物,混合分析,必要时进行个体检测。

10.2

DNA 提取

取幼苗或叶片 200 mg~300 mg,置于 2.0 mL 离心管,加液氮充分研磨;每管加入 600 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液,充分混合,65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min~60 min,其间多次轻缓颠倒混匀。每管加入与 CTAB 提取液等体积的三氯甲烷和异戊醇混合液,轻缓混匀后静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液转移至新的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,用体积分数为 70%的乙醇溶液洗涤 2 遍,晾干,加入 100 μ L 双蒸水或 TE 缓冲液充分溶解,检测 DNA 浓度后 4 $^{\circ}$ C 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。DNA 溶液的外吸光度 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.7~2.0。

注 2:三氯甲烷和异戊醇混合液中三氯甲烷与异戊醇的体积比为 24:1。

10.3

PCR 扩增

10.3.1 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 中的缓冲液若含有氯化镁(MgCl₂),不再加 MgCl₂ 溶液,加等体积双蒸水替代。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,荧光标记位于上游引物 5' 端,推荐的荧光标记见附录 D。

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 MgCl ₂)	10 $\times$	1 $\times$	2.0
dNTPs	10 mmol/L	0.1 mmol/L	0.2
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.2
上游引物	10 μ mol/L	0.2 μ mol/L	0.4
下游引物	10 μ mol/L	0.2 μ mol/L	0.4
DNA	25 ng/ μ L	2.5ng/ μ L	2.0
双蒸水	—	—	14.8
总体积			20.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s,共33个循环;72℃延伸5 min,产物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产物检测

10.4.1 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、无水乙醇分别擦洗2遍。玻璃板干燥后,将0.5 mL亲和硅烷工作液均匀涂在长玻璃板上,将0.5 mL剥离硅烷工作液均匀涂在带凹槽的短玻璃板上。操作过程中防止2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,用水平仪检查玻璃胶室是否水平。取100 mL质量分数为6%的PAGE胶溶液,加入50 μ L四甲基乙二胺(TEMED)和500 μ L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,用水清洗干净备用。

注:为保证检测结果的准确性,建议玻璃板的规格为45 cm×35 cm。

10.4.1.2 变性

在20 μ L PCR产物(见10.3.2)中加入4 μ L 6×加样缓冲液,混匀。在PCR仪上运行95℃变性5 min,取出立即置于冰上,冷却10 min以上备用。

10.4.1.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上,在电泳正极槽(下槽)加入600 mL的1×TBE缓冲液,负极槽(上槽)加入600 mL 1×TBE缓冲液,使其超过凝胶顶部约3 cm。1 800 V恒压预电泳10 min~20 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3 μ L~5 μ L样品。除送检样品外,还应同时加入参照品种扩增产物。1 800 V恒压电泳,电泳时间参考二甲苯青指示带移动的位置和扩增产物预期片段大小范围(见附录D)加以确定。二甲苯青指示带在质量分数为6%PAGE胶电泳的移动位置与230 bp扩增产物泳动的位置大致相当。扩增产物片段大小在(100±30) bp、(150±30) bp、(200±30) bp、(250±30) bp范围的,电泳参考时间分别为1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.5 h。电泳结束后关闭电源,取下玻璃板并轻轻撬开,通常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,在双蒸水中快速漂洗,时间不超过10 s;将胶板放入染色液中,轻轻晃动5 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5 min取出,在双蒸水中漂洗1 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,可依据胶板数量和大小调整,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

按照预先确定的引物分组,分别取等体积的同一组中不同荧光引物的扩增产物,混匀稀释。从混合液中吸取1 μ L,加入DNA分析仪专用96孔板中。板中各孔分别加入0.1 μ L分子量内标和8.9 μ L去离子甲酰胺,在PCR仪上95℃变性5 min,取出后立即置于冰上,冷却10 min以上,瞬时离心10 s后备用。

注:引物分组和稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。

10.4.2.2 等位变异检测

打开DNA分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。将装有样品的96孔上样板放置于样品架基座上,打开数据收集软件,按照仪器使用手册,编辑样品表,执行运行程序,DNA分析仪将自动运行,并保存

电泳原始数据。

10.5

数据分析

10.5.1 数据读取

每个 SSR 位点的等位变异参照扩增片段大小命名,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间或者不同型号 DNA 分析仪间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 2 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 1 个等位变异,为 160 bp,则该位点的等位变异数据记录为 160/160。

示例 2:样品在某个位点上有 2 个等位变异,分别为 160 bp、165 bp,则该位点的等位变异数据记录为 160/165。

10.5.2 数据比对

将送检样品每个位点的等位变异数据逐一比对,按照位点相同、差异、数据缺失、无法判定等情形,记录每个位点的结果。

11 结果统计

统计比对结果为位点差异的情况,计算差异位点数。

12 结果判定

12.1

判定规则

当品种间差异位点数 >2 ,判定为“不同”;当品种间差异位点数 ≤ 2 ,判定为“疑同”;当品种间差异位点数 ≤ 2 ,但存在位点数据缺失或无法判定情形时,不做判定。

12.2

结果表述

送检样品_____与对照样品_____(或数据库中_____品种)采用_____检测平台,检测位点数为_____,差异位点数为_____,判定为_____。当存在位点数据缺失或无法判定情形时,应表述具体情况。

示例 1:送检样品 A 与对照样品 B 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测平台,检测位点数为 28,差异位点数为 2,判定为疑同。

示例 2:送检样品 A 与对照样品 B 采用荧光毛细管电泳检测平台,检测位点数为 28,差异位点数为 1,送检样品在 X26 位点数据缺失。

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:最高电压不低于 2 000 V,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 离心机。
- A.1.5 水平摇床。
- A.1.6 胶片观察灯。
- A.1.7 电子天平:感量为 0.1g 和 0.01 g。
- A.1.8 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.1.9 磁力搅拌器。
- A.1.10 核酸浓度测定仪或超微量紫外分光光度计。
- A.1.11 微波炉。
- A.1.12 高压灭菌锅。
- A.1.13 酸度计。
- A.1.14 水浴锅。
- A.1.15 低温冰箱。
- A.1.16 制冰机。
- A.1.17 凝胶成像系统或紫外透射仪。
- A.1.18 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,最低区分力 1 bp。
- A.1.19 其他相关仪器和设备。

A.2 主要试剂

除非另有说明,在分析中均使用分析纯试剂。

- A.2.1 十六烷基三甲基溴化铵[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 异戊醇($C_5H_{12}O$, CAS 号:123-51-3)。
- A.2.4 异丙醇[(CH_3)₂CHOH, CAS 号:67-63-0]。
- A.2.5 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, 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 浓盐酸(HCl, CAS 号:7647-01-0)。
- A.2.8 氢氧化钠(NaOH, CAS 号:1310-73-2)。
- A.2.9 10 $\times$ PCR 缓冲液:含 Mg^{2+} 25 mmol/L。
- A.2.10 4 种脱氧核糖核苷酸:dATP、dTTP、dGTP、dCTP。
- A.2.11 氯化钠(NaCl, CAS 号:7647-14-5)。

- A. 2. 12 *Taq* DNA 聚合酶(*Taq* 酶,CAS 号:9012-90-2)。
- A. 2. 13 DNA Marker;DNA 片段分布范围在 50 bp ~ 500 bp。
- A. 2. 14 甲酰胺(CH_3NO ,CAS 号:75-12-7)。
- A. 2. 15 溴酚蓝($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$,CAS 号:115-39-9)。
- A. 2. 16 二甲苯青($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$,CAS 号:2650-17-1)。
- A. 2. 17 甲叉双丙烯酰胺 $[(\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONH})_2\text{CH}_2]$,CAS 号:110-26-9]。
- A. 2. 18 丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$,CAS 号:79-06-1)。
- A. 2. 19 硼酸(H_3BO_3 ,CAS 号:10043-35-3)。
- A. 2. 20 尿素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$,CAS 号:57-13-6)。
- A. 2. 21 亲和硅烷。
- A. 2. 22 剥离硅烷。
- A. 2. 23 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 24 四甲基乙二胺(TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$,CAS 号:110-18-9)。
- A. 2. 25 过硫酸铵[APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$,CAS 号:7727-54-0]。
- A. 2. 26 冰醋酸(CH_3COOH ,CAS 号:64-19-7)。
- A. 2. 27 硝酸银(AgNO_3 ,CAS 号:7761-88-8)。
- A. 2. 28 甲醛(HCHO ,CAS 号:50-00-0)。
- A. 2. 29 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 30 DNA 分析仪用分子量内标。
- A. 2. 31 DNA 分析仪用电泳缓冲液。
- A. 2. 32 DNA 分析仪用光谱校准基质。

附 录 B

(规范性)

溶液配制

试剂配制用水需符合 GB/T 6682 的要求。

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 溶于 800 mL 水中, 充分搅拌溶解, 加 NaOH 调 pH 至 8.0, 加水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

B.1.2 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.1.3 1 mol/L NaOH 溶液

称取 40.0 g NaOH, 溶于 800 mL 水中, 充分搅拌溶解, 加水定容至 1 000 mL。

B.1.4 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 121.1 g Tris 碱, 溶于 800 mL 水中, 充分搅拌溶解, 加 HCl 调 pH 至 8.0, 加水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

B.1.5 CTAB 提取液

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, 加水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

B.1.6 TE 缓冲液

量取 5 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液和 1 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液, 加水定容至 500 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 保存。

B.2 PCR 扩增试剂的配制

B.2.1 dNTP 溶液

分别配制 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 终浓度为 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μL 混合, 加 120 μL TE 缓冲液定容, 配制成每种脱氧核糖核苷酸终浓度为 10 mmol/L 的工作液, 121 °C 高压灭菌 20 min, -20 °C 保存。

B.2.2 SSR 引物溶液

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, 取 10 μL 储存液, 加 90 μL TE 缓冲液配制成终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

B.3 变性 PAGE 试剂的配制

B.3.1 质量分数为 40% 的丙烯酰胺溶液

称取 190.0 g 丙烯酰胺和 10.0 g 甲叉双丙烯酰胺, 溶于 400 mL 水中, 充分搅拌溶解, 加水定容至 500 mL, 置于棕色瓶中, 4 °C 储存。

B.3.2 质量分数为 6% 的变性 PAGE 胶溶液

称取 420.0 g 尿素置于 1 000 mL 烧杯中, 加入 100 mL 10×TBE 缓冲液和 150 mL 质量分数为 40% 的丙烯酰胺溶液, 定容至 1 000 mL。

B.3.3 亲和硅烷缓冲液

分别量取 99.5 mL 无水乙醇和 500 μ L 冰醋酸,加水定容至 100 mL。

B.3.4 亲和硅烷工作液

分别量取 1 mL 亲和硅烷缓冲液和 5 μ L 亲和硅烷原液,混匀。

B.3.5 剥离硅烷工作液

分别量取 25 mL 二甲基二氯硅烷和 75 mL 三氯甲烷,混匀。

B.3.6 质量分数为 10% 的 APS 溶液

称取 1.0 g APS,溶于 10 mL 水中,混匀,于 4 $^{\circ}$ C 保存(不超过 5 d)。

B.3.7 10 $\times$ TBE 缓冲液

称取 Tris 108.0 g、硼酸 55.0 g,溶于 800 mL 水中,加入 37 mL EDTA 溶液(0.5 mol/L,pH 8.0),定容至 1 000 mL。

B.3.8 1 $\times$ TBE 缓冲液

量取 50 mL 10 $\times$ TBE 缓冲液,加水定容至 500 mL,混匀。

B.3.9 6 $\times$ 加样缓冲液

分别称取 0.25 g 溴酚蓝和 0.25 g 二甲苯青,加入 98 mL 去离子甲酰胺和 2 mL EDTA 溶液(0.5 mol/L,pH 8.0),搅拌溶解。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液

量取 100 mL 冰醋酸,加水定容至 1 000 mL。

B.4.2 染色液

称取 1.0 g 硝酸银,加水定容至 1 000 mL。

B.4.3 显影液

称取 10.0 g 氢氧化钠,溶于 1 000 mL 水中,用前加 2 mL 甲醛。

附 录 C
(规范性)
引物名单及序列

引物名单及序列见表 C.1。

表 C.1 引物名单及序列

引物编号	引物名称	染色体	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
XD1	X26	1	GCCAAGGTGAACGGTGGTG	GAGCGAGAATGGCGGAAGG
XD2	X28	1	GCATACATAATGTGGTGAGATG	GTCTCGTGCCTTTTCACAC
XD3	X41	2	GCAGCAACGCACAGTTTCATGG	GCAAAACTTTTCACCGGTACGACC
XD4	CEDG011	4	CCCAACCAAAGCGTTTTTG	CTTCTAGACTCTGAGCACTG
XD5	E4852	3	GCAGTTCTTCTCGTTCTTCTCTG	AAAGTCCTCTAAAGCACAAATCCC
XD6	XD6	3	TGGTTGGTGGAAGATGCT	CCTCTTTCGTCACGCTTT
XD7	E507-299	4	CTGTTCTTGCTTCTGTAACTGT	GAAGTGAGTTGGTTGCAGTAGGT
XD8	E497	4	CCGAGAACTAAGTTTTGACATGG	GTGCACATTCTTTTAGAAAACGG
XD9	CEDG020	5	TATCCATACCCAGCTCAAGG	GCCATACCAAGAAAGAGG
XD10	X95	5	GCTTGCATCACCCATGATTC	AAGTGATACGGTCTGGTTCC
XD11	X105	5	CTTGAGAACCAACTCGAACTTC	GGGAAATCGAAGAGGGACAG
XD12	X113	6	GAAGAAGAACCCTACCACAG	CACCAAAAACGTTCCCTCAG
XD13	X111	6	GAAAAAGTAAGGCTGAGGAAGG	CAAACCTCGTCATTCCACCATG
XD14	L62	7	ACCTGCAAGTTGGCAAGA	TATGTGCACGCATGGAAG
XD15	X129	7	GAGGGATCTCCAAAGTTCAACGG	GAAGGCTCCGAAGTTGAAGGTTG
XD16	CEDG041	7	GCTGCATCTCTATTCTCTGG	GCCAACTAGCCTAATCAG
XD17	X149	8	GTGTGAAACATGTAGCACGGTG	GGTTCTCTCTCTCCCTCTC
XD18	X147	8	GTAGAACAGTTATGACACATG	TGTTAACTTCGTTGGGTACAC
XD19	CEDG056	9	TTCCATCTATAGGGGAAGGGAG	GCTATGATGGAAGAGGGCATGG
XD20	L52	9	GAGGCCAATCCCATAACTTT	AGCACCACATCAGAGATTCC
XD21	CEDG021	10	GCAGAATTTTAGCCACCGAG	AAAGGATGOGAGAGTGTAGC
XD22	X180	10	GAAGGGAATGAAAATGAAACCC	GTTCAATCCATTCAGTCTCC
XD23	XD23	10	TTGAAGAGGTGGAAAGGATG	ATAGTTCCCCAACGCCAT
XD24	G155	11	AGGTGAATGTGAATCGGAGC	AATCCCACAAGATTTGCCAG
XD25	CEDG048	1	TCTCTTCCTCTATGGCTTGG	GCTCCTCTTTTTGCTGCATC
XD26	X3	6	CCCATGAACGCTAATGCTG	CGCCAAAGGAAACGCAGAAC
XD27	X1	1	GTGCAGCCACTACATGAATG	GAAGTTGACACTCATCCACC
XD28	E5057-180	5	AGTTCCGAAATTGGGTATTTGTT	ACACCCACAATAACTATTTCGAG

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	荧光标记	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
XD1	X26	TAMRA	169~201	169	中红 15
				171	中农黑小豆 1 号
				173	龙小豆 4 号
				177	辽农红 10 号
				179	保 M908-15
				181	苏 058
				183	苏红 1 号
				187	渝红 2 号
				197	山西隰县小豆
				201	晋红小豆 2 号
XD2	X28	HEX	214~218	214	保 M908-15
				216	中农黑小豆 1 号
				218	苏红 1 号
XD3	X41	6-FAM	150~161	150	苏 058
				156	中农黑小豆 1 号
				159	中红 15
				161	保 M908-15
XD4	CEDG011	ROX	154~170	154	山西隰县小豆
				156	渝红 2 号
				160	茶壳早生
				162	山西临县小豆
				164	苏红 5 号
				166	中农黑小豆 1 号
				168	辽农红 10 号
				170	中红 15
XD5	E4852	6-FAM	142~149	142	保 M908-15
				149	中农黑小豆 1 号
XD6	XD6	6-FAM	194~202	194	辽红小豆 2 号
				198	渝红 2 号
				200	保 M908-15
				202	中红 15
XD7	E507-299	ROX	156~164	156	保 M908-15
				158	中农黑小豆 1 号
				160	200013
				162	龙小豆 4 号
				164	晋红小豆 3 号
XD8	E497	6-FAM	145~154	145	保 M908-15
				152	龙小豆 4 号
				154	中农黑小豆 1 号

表 D.1 （续）

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围,bp	主要等位变异,bp	参照品种
XD9	CEDG020	TAMRA	193~223	193	晋红小豆 2 号
				195	保 M908-15
				207	中红 16
				209	辽农红 9 号
				211	苏红 1 号
				213	辽农红 10 号
				215	苏红 5 号
				217	中红 15
				219	山西隰县小豆
				223	白红 12 号
XD10	X95	6-FAM	135~146	135	中红 15
				137	苏红 1 号
				139	保 M908-15
				141	苏红 5 号
				143	苏红 3 号
				146	晋红小豆 2 号
XD11	X105	HEX	193~207	193	苏红 1 号
				199	茶壳早生
				201	中农黑小豆 1 号
				203	中红 15
				205	保 M908-15
				207	京小 71
XD12	X113	TAMRA	150~162	150	晋红小豆 2 号
				152	中农黑小豆 1 号
				156	苏红 1 号
				158	晋红小豆 3 号
				160	保 M908-15
				162	山西隰县小豆
XD13	X111	6-FAM	111~117	111	苏红 3 号
				114	保 M908-15
				117	山西隰县小豆
XD14	L62	HEX	145~149	145	保 M908-15
				147	苏红 5 号
				149	渝红 2 号
XD15	X129	ROX	220~232	220	苏红 3 号
				222	保 M908-15
				224	苏红 1 号
				226	中农黑小豆 1 号
				230	苏 058
				232	苏红 5 号
XD16	CEDG041	TAMRA	103~118	103	苏红 3 号
				110	晋红小豆 2 号
				112	苏 058
				114	保 M908-15
				116	中农黑小豆 1 号
				118	龙小豆 4 号

表 D.1 （续）

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围,bp	主要等位变异,bp	参照品种
XD17	X149	6-FAM	96~108	96	中红 16
				100	龙小豆 4 号
				102	保 M908-15
				104	吉红 8 号
				106	苏红 1 号
				108	茶壳早生
XD18	X147	HEX	172~188	172	辽农红 10 号
				174	苏 058
				178	山西隰县小豆
				180	保 M908-15
				182	龙小豆 4 号
				186	200013
XD19	CEDG056	HEX	171~173	171	中农黑小豆 1 号
				173	保 M908-15
XD20	L52	TAMRA	161~187	161	中红 16
				167	200013
				171	苏红 5 号
				173	保 M908-15
				175	山西隰县小豆
				177	中农白小豆 1 号
				179	白红 12 号
				181	山西临县小豆
				183	中农黑小豆 1 号
				185	晋红小豆 3 号
XD21	CEDG021	ROX	150~172	187	品红 2014-166
				150	200013
				152	中红 16
				156	中农黑小豆 1 号
				158	河南汝阳黑小豆
				160	渝红 2 号
				168	晋红小豆 3 号
				170	苏红 5 号
XD22	X180	HEX	164~185	172	中红 15
				164	中红 15
				170	晋红小豆 3 号
				172	保 M908-15
				174	中农黑小豆 1 号
				176	中红 16
				178	200013
XD23	XD23	6-FAM	156~162	185	苏红 5 号
				156	保 M908-15
				159	中农黑小豆 1 号
XD24	G155	HEX	118~124	162	山西临县小豆
				118	保 M908-15
				120	苏红 5 号
				124	中红 15

表 D.1 （续）

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围,bp	主要等位变异,bp	参照品种
XD25	CEDG048	6-FAM	220~259	220	苏红 5 号
				228	山西隰县小豆
				230	辽农红 10 号
				241	渝红 2 号
				243	保 M908-15
				245	苏红 1 号
				247	中红 15
				251	中农黑小豆 1 号
				253	山西临县小豆
				259	中红 16
XD26	X3	6-FAM	195~247	195	200013
				206	吉红 8 号
				208	中红 16
				210	苏 058
				212	龙小豆 4 号
				214	中红 16
				216	保 M908-15
				218	辽红小豆 2 号
				220	山西临县小豆
				222	中农黑小豆 1 号
XD27	X1	ROX	124~132	247	苏红 1 号
				124	辽农红 10 号
				128	晋红小豆 3 号
				130	山西隰县小豆
XD28	E5057-1800	ROX	138~144	132	中农黑小豆 1 号
				138	保 M908-15
				144	中农黑小豆 1 号
注 1:附录 D 中采用的荧光标记仅为示例,采用其他荧光标记类型时,需要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。					

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

编号	品种名称	品种来源	保藏编号	编号	品种名称	品种来源	保藏编号
1	200013	国家作物种质库中期库	B004806	14	龙小豆 4 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN31709
2	白红 12	国家作物种质库中期库	—	15	品红 2014-166	国家作物种质库中期库	—
3	保 M908-15	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN25985	16	山西临县小豆	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28973
4	茶壳早生	国家作物种质库中期库	B0001662	17	山西隰县小豆	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28978
5	河南汝阳黑小豆	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28976	18	苏 058	国家作物种质库中期库	—
6	吉红 8 号	国家作物种质库中期库	—	19	苏红 1 号	国家作物种质库中期库	—
7	冀红 0217	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN24690	20	苏红 3 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28495
8	晋红小豆 2 号	山西农业大学 (山西省农业科学院)	—	21	苏红 5 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28545
9	晋红小豆 3 号	山西农业大学 (山西省农业科学院)	—	22	渝红 2 号	江苏省农业科学院	—
10	京小 71	国家作物种质库中期库	B0000080	23	中红 15	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN32588
11	辽红小豆 2 号	国家作物种质库中期库	B0005257	24	中红 16	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN32587
12	辽农红 10 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN40050	25	中农白小豆 1 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28972
13	辽农红 9 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN40051	26	中农黑小豆 1 号	农业农村部植物新品种保藏中心	XIN28975