

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4492—2025

番茄品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) 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 12

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、北京通州国际种业科技有限公司、北京市农林科学院蔬菜研究所。

本文件主要起草人：韩瑞玺、王均帅、马莹雪、靳凤、张建、邓超、王晨宇、霍秀爱、温常龙、冯艳芳、李媛媛、王铭堂、李常保、唐浩、陈红、张秀杰。



番茄品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行番茄(*Solanum Lycopersicum* L.)品种鉴定的操作程序、结果统计与结果判定。

本文件适用于番茄品种 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(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)
- 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

不同番茄品种基因组中 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,进而区分不同的番茄品种。

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 溶液的紫外吸光度 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	推荐反应体积, 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	2.5 ng/ 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:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C

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 $\times$ 35 cm。

10.4.1.2 变性

在 20 μ L PCR 产物中加入 4 μ L 6 $\times$ 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 $\times$ TBE 缓冲液,负极槽(上槽)加入 600 mL 经 65 ℃ 预热的 1 $\times$ 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 $\pm$ 30)bp、(150 $\pm$ 30)bp、(200 $\pm$ 30)bp、(250 $\pm$ 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置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 24,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 24,差异位点数为 1,送检样品在 SSR405 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, (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')
P01	SSR405	1	CACCCCCACACTTTTATTTTCGTAA	GGTACCCCAATAGAAACGTTTAAAA
P02	SOL_SSR120	1	TCGTGGGAATTTGTTAACCC	TCTTCATCGTCCTCCTCCTG
P03	SSR422	2	GCAATTTTCAGTTCTTCAAAGGCAAG	CCTCCAGAAAATACCATTTGTTCCATG
P04	SOL_SSR18	2	CGCCTATCGATACCACCACT	ATTGATCCGTTTGGTTCTGC
P05	SOL_SSR3	3	TTCTTCCCTTCCATCAGTTCT	TTTGCTGCTATACTGCTGACA
P06	SOL_SSR145	3	AGGGCAACAAATCCCTCTTT	GGAGACGAGGCTGCTTACAC
P07	SSR412	4	AAACTTAGGCACCTTCTCAAATTG	TGGTTTGATATTGTTGTTGTTGGCA
P08	SOL_SSR154	4	GCACTAAGTGTTTATTAAGCTCATG	CATACATATCACTTTCCTCATACTTTG
P09	SOL_SSR23	4	ACATGAGCCCAATGAACCTC	AACCATTCCGCACGTACATA
P10	SSR106	5	TTGATAACACATGTCACATGATTGG	CTTGATGATGTACTTGTGATTGCGA
P11	SOL_SSR117	5	TGTGAATACAATTTGCACCC	GGGTTACTAATGCACAAGCGA
P12	SOL_SSR101	6	TGTGTTGCGTCATTACCACTAAAC	CCCAACCACCAATACTTTCC
P13	SSR456	6	AATTTCCCAATCAAATAATCTTCAATTT	GGCAGCTTACGACTGGATAATCTAA
P14	SOL_SSR225	7	GTTAGTGGCTTACGTATCGTAATC	GGTTACAACCTTACAAGAGCTGCAG
P15	SOL_SSR224	7	GCTAACTTGAAATATTGCGTGTGATGC	GGTGGAATAAGTGGTAGAGC
P16	SSR435	8	TTTCGCCAACTCTATGAGCTAAATC	TTCTCACTCATTTTGTAGTGACAA
P17	SOL_SSR184	9	GAGCGAGCAGAAAGGTGAAT	GAGCCTGAAAACATAGAAGT
P18	SOL_SSR128	9	GTTCCCGCTTGAGAAACAAC	CCAATGCTGGGACAGAAGAT
P19	SOL_SSR272	10	GAGTATGGCATCATCATAGCAC	CCGATTAATTTTATAACCAAATTG
P20	SSR465	11	TGAAAATATCTTTAAAGTTCGTGTGCA	CCTGCCCCAGGTGATTCA
P21	SSR441	11	AAAGAGACTTACTTGGAACAGCAG	TGGAATTGAAGACAAGTTTAGCCC
P22	SOL_SSR13	12	GAGGACGACAACAACAACGA	GACATGCCACTTAGATCCACAA
P23	SOL_SSR300	12	GGTCTTTAACAAGTTGTTGTATG	CTCAAGCAAATTGCAAGGTTGG
P24	SOL_SSR96	12	ACTGCATTTTCAGGTACATACTCTC	ATAAACTCGTAGACCATACCCTC

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
P01	SSR405	TAMRA	120~126	120	飞天
				122	寿研黄樱
				124	苏粉 12 号
				126	浙杂 204
P02	SOL_SSR120	6-FAM	269~275	269	金陵佳玉
				275	苏粉 12 号
P03	SSR422	6-FAM	181~184	181	飞天
				184	寿研黄樱
P04	SOL_SSR18	HEX	172~176	172	寿研橙樱
				178	冠群五号
P05	SOL_SSR3	TAMRA	180~188	180	浙杂 204
				184	飞天
				188	金陵佳玉
P06	SOL_SSR145	ROX	204~212	204	皖红 16
				208	杭杂 503
				210	飞天
				212	寿研黄樱
P07	SSR412	6-FAM	217~220	205	陆兴
				208	乾德番砧
				217	苏粉 12 号
				220	乾德番砧
P08	SOL_SSR154	HEX	116~137	116	寿研黄樱
				119	寿研橙樱
				125	安第斯
				128	乾德粉如意
				131	小汤姆
				134	浙杂 204
P09	SOL_SSR23	6-FAM	259~277	259	冠群五号
				262	寿研橙樱
				275	金陵佳玉
				277	爱吉佳丽
P10	SSR106	ROX	244~250	244	寿研黄樱
				250	浙杂 204
P11	SOL_SSR117	TAMRA	236~269	236	小汤姆
				245	寿研黄樱
				251	乾德 M725
				254	苏粉 12 号
				257	宁番 1 号
				263	金星 1371
				266	浙杂 204
				269	寿研 6 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
P12	SOL_SSR101	6-FAM	201~229	201	寿研 550
				207	冠群五号
				209	乾德红如意
				211	金粉 1515
				213	PT1108
				229	寿研黄樱
P13	SSR456	6-FAM	83~89	83	皖红 16
				85	寿研黄樱
				87	苏粉 12 号
				89	寿研 6 号
P14	SOL_SSR225	6-FAM	148~154	148	冠群五号
				151	寿研橙樱
				154	中樱 6 号
P15	SOL_SSR224	TAMRA	116~134	116	爱吉茱丽
				122	寿研矮生红樱
				131	金陵佳玉
				134	寿研 550
P16	SSR435	HEX	208~226	208	宝禄
				211	寿研黄樱
				214	寿研 6 号
				221	京鲁 8 号
				223	金陵佳玉
				226	飞天
P17	SOL_SSR184	TAMRA	201~213	201	乾德番砧
				203	宝禄
				211	中樱 6 号
				213	乾德红如意
P18	SOL_SSR128	6-FAM	198~204	198	金粉 1515
				200	寿研矮生红樱
				202	金陵佳玉
				204	苏粉 12 号
P19	SOL_SSR272	TAMRA	149~158	149	浙杂 204
				152	寿研 6 号
				155	乾德番砧
				158	皖红 6415
P20	SSR465	HEX	128~132	128	宝禄
				132	中樱 6 号
P21	SSR441	HEX	131~134	131	中樱 6 号
				134	宝禄
P22	SOL_SSR13	HEX	145~154	145	乾德番砧
				148	寿研 6 号
				154	冠群五号
P23	SOL_SSR300	ROX	119~125	119	中樱 6 号
				123	天正红珠
				125	乾德 M725
P24	SOL_SSR96	TAMRA	199~203	199	京鲁 8 号
				203	宝禄

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	浙杂 204	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN02973	16	金星 1371	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN31894
2	飞天	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN12490	17	PT1108	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN32001
3	苏粉 12 号	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN13878	18	陆兴	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN32087
4	金陵佳玉	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN16958	19	爱吉佳丽	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN33292
5	皖红 16	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN20634	20	安第斯	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN34016
6	中樱 6 号	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN21140	21	金粉 1515	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN34344
7	寿研矮生红樱	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN26141	22	绽红 6415	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN35513
8	小汤姆	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN26142	23	天正红珠	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN35729
9	寿研黄樱	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN26143	24	京鲁 8 号	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN40316
10	寿研橙樱	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN26146	25	爱吉茱丽	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN41110
11	冠群五号	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN29324	26	宁番 1 号	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN41668
12	宝禄	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN29909	27	乾德粉如意	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN41964
13	乾德番砧	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN30167	28	乾德红如意	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN41965
14	寿研 6 号	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN31074	29	乾德 M725	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN41967
15	寿研 550	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN31341	30	杭杂 503	农业农村部植物 新品种保藏中心	XIN42287