

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4523—2025

烟草品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of tobacco 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 引物信息及使用 2

9 参照品种及使用 2

10 操作程序 2

11 结果统计与表述 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 11

附录 E(资料性) 参照品种相关信息 20

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：中国农业科学院烟草研究所、江苏中烟工业有限责任公司。

本文件主要起草人：任民、刘国祥、杨爱国、孙洋洋、田震、李媛、王珂清、程立锐、刘旦、佟英、陈帅、武秀明。



烟草品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)进行烟草(*Nicotiana tabacum* 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、结果判定与表述。

本文件适用于烟草品种的 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/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 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(deoxy-ribonucleoside triphosphates)。
- 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)。
- TBE:三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸(Tris-borate-EDTA)。
- TE:三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-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

烟草品种基因组存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同烟草品种在同一 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。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 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。种子样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的规定。每份样品不少于 30 个个体,等量混合分析,必要时进行个体检测。

10.2 DNA 提取

取混合样本约 200 mg,置于 2.0 mL 圆底离心管,液氮冷冻后充分研磨;每管加入 600 μ L 预热到 65 $^{\circ}$ C 的 CTAB 提取液,充分混合,65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min~60 min,每隔 15 min 轻缓颠倒混匀,水浴后 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液转移至新的离心管中,每管加入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,DNA 沉淀后 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,弃乙醇,室温晾干,加入 100 μ L 双蒸水或 TE 缓冲液充分溶解,检测 DNA 浓度和纯度,-20 $^{\circ}$ C 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标准。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 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	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	1.6
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.2
正向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L)	1.0
反向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L)	1.0
DNA	25 ng/ μ L	2.5 ng/ μ L	2.0
双蒸水	—	—	12.2
总体积			20.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,54 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,产物 4 $^{\circ}$ C 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 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、无水乙醇分别擦洗 2 遍。玻璃板干燥后,将 1.0 mL 亲和硅烷工作液均匀涂在长玻璃板上,将 1.0 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,用水平仪检查玻璃胶室是否水平。取 100 mL 质量分数为 6% 的变性 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。

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 扩增仪上运行 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,4 $^{\circ}$ C 冷却 10 min 以上备用。

10.4.1.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上,在电泳正极槽和负极槽(上槽)各加入 600 mL 的 1 $\times$ TBE 缓冲液,使其没过电极线。1 200 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 PCR 扩增样品。除送检样品外,还宜同时加入参照品种扩增产物。1 200 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,当等位变异碱基对数差异较小时,可适当延长电泳时间。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~10 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,以淹没胶面为准。

10.4.2 毛细管电泳

10.4.2.1 PCR 产物样品准备

根据引物的等位变异范围(见附录 D),分别取等体积不同等位变异范围或不同荧光标记的扩增产物,混匀稀释。吸取 1 μ L 混合液加入 DNA 分析仪配套上样板中。

注:稀释倍数通过毛细管电泳预实验确定。

10.4.2.2 变性

上样板各孔分别加入 0.1 μ L 分子量内标和 8.9 μ L 去离子甲酰胺,在 PCR 扩增仪上 95 $^{\circ}$ C 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。

10.4.2.3 电泳

按照 DNA 分析仪操作手册电泳,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 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两个等位变异，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 结果统计与表述

110.1 判定规则

当差异位点数大于 2，判定为“不同”；当差异位点数小于等于 2，判定为“疑同”。

110.2 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: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 高速冷冻离心机。
- 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 0.1 g 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,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_2 , $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, 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 SSR 引物。

- A. 2. 12 氯化钠(NaCl ,CAS 号:7647-14-5)。
- A. 2. 13 Taq DNA 聚合酶(Taq 酶,CAS 号:9012-90-2)。
- A. 2. 14 DNA Marker:DNA 片段分布范围在 50 bp~500 bp。
- A. 2. 15 甲酰胺(CH_3NO ,CAS 号:75-12-7)。
- A. 2. 16 溴酚蓝($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$,CAS 号:115-39-9)。
- A. 2. 17 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. 18 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. 19 丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$,CAS 号:79-06-1)。
- A. 2. 20 硼酸(H_3BO_3 ,CAS 号:10043-35-3)。
- A. 2. 21 尿素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$,CAS 号:57-13-6)。
- A. 2. 22 亲和硅烷。
- A. 2. 23 二甲基二氯硅烷($\text{C}_2\text{H}_6\text{Cl}_2\text{Si}$,CAS 号:75-78-5)。
- A. 2. 24 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 25 四甲基乙二胺(TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$,CAS 号:110-18-9)。
- A. 2. 26 过硫酸铵[APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$,CAS 号:7727-54-0]。
- A. 2. 27 冰醋酸(CH_3COOH ,CAS 号:64-19-7)。
- A. 2. 28 硝酸银(AgNO_3 ,CAS 号:7761-88-8)。
- A. 2. 29 甲醛(HCHO ,CAS 号:50-00-0)。
- A. 2. 30 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 31 DNA 分析仪用分子量内标。
- A. 2. 32 DNA 分析仪用电泳缓冲液。
- A. 2. 33 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 720 μL TE 缓冲液定容,配制成每种脱氧核糖核苷酸终浓度为 2.5 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。分别取 10 μL 正向引物和反向引物储存液,加 180 μL TE 缓冲液配制成终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 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,于 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℃ 保存(不超过 5 d)。

B.3.7 10×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×TBE 缓冲液

量取 50 mL 10×TBE 缓冲液,加水定容至 500 mL,混匀。

B.3.9 6×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 20.0 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 水中,用前加 1.5 mL 甲醛。

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	连锁群	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
F01	PT50862	LG1	ATGCGCTATGTTGGCTTCTT	TCAAAGTGCAATGTGTTCGC
F02	PT51665	LG1	CCCGTAATACATAAATGGAAGAGC	GCATACCACCTGCCTTACCT
F03	PT55027	LG2	AAATTAACGCTCTTTCGTCTGAA	CGTCACATGAATAATCACAATCAA
F04	PT60122	LG2	GGGAAAGTTACACAGTGCCC	GCCTTCCACTCAAACAAATAGC
F05	PT30202	LG3	TCGAAACCTCGAGGACAGTT	TATCCAAATCTCCAAAGCCC
F06	PT60080	LG3	CTACGCAGAATCCAATTCCA	CATTAGGCCATAGCCATCCA
F07	PT53970	LG4	TCATTGGTTTCCTCGTCCTTT	AAGACAACCTCCTTCACCATTCA
F08	PT53100	LG4	ATACGGGCTTCCCAGGTAAC	AATCCCTTATCCTTTGTGTCAA
F09	PT61414	LG5	AAAGAAAGGAGGCATGCAAA	CAATGACTAATAGAATCGTTACAGG
F10	PT61187	LG5	GCTCAGTCGTGAAGAAACAGAA	AGGGAATCCTTGGTTGGTTT
F11	PT60650	LG6	CGGGAGCACCATTATCAAAT	GTCATCGATCCCGCATAACT
F12	PT61154	LG6	TCGCCTCCTAATTACTCTTCTGA	AAAGGGCCAACCCTGATATT
F13	PT50599	LG7	GCGAACCTTTGAACCAGTCT	AAACGCCTAGGCAGAACTCA
F14	PT30165	LG7	ACCTCTGTGGCCGTAAGCTA	CCTCTACTTCAACAGGGTAAGAAA
F15	PT51206	LG8	CAAGGGAATGGAACGTATGAA	AAGGCGTTCGGTCTGTATTG
F16	PT61279	LG8	CTCACACCCATTTGTTACCG	GGCGACAATGTTGTTGTGTC
F17	PT60917	LG9	CAGGAGACTCCATAAATTCACTCTT	AGCATGGTTGCTATTGGCTG
F18	PT50392	LG9	ATTACAACCACTGCGAAACG	GCTAAGCAAAGAGAGGTGCC
F19	PT51144	LG10	ACCGACAACACACGATTGTA	GCTTGTCGCTTAGCTTAACCAT
F20	PT54061	LG10	CAACGTGTGCCGAAAGACTA	TTGGGAACGTGAGGGATATG
F21	PT30024	LG11	GTAGATGGGAGAGCCACGTC	AAAGGAGGTAAATTGCAGCG
F22	PT53036	LG11	TGCGTTCCAACCTTATCCC	AAATATTTGCGGGACATGGT
F23	PT52958	LG12	TGACACATAGTTCAGCCATCAA	TGGTTCTATATTTCTGACGGGA
F24	PT51896	LG12	CTTCCCTCTGTAACAACGCC	AACAGTTTCAATTATAACACTGCCA
F25	PT55289	LG13	ACTTGAAGCCGTTGTTGCTT	GCACGGCAATACCTTTGTG
F26	PT53829	LG13	CCTCCATTGACATGTGACGA	AATGCCAAGCTGAGGTTTGT
F27	PT60868	LG14	AACTCACGTTCCCTTTGCC	CAATCACCAATGAATGGAACC
F28	PT53953	LG14	CATAATTTATTCGTGAAAATGATGC	AGAATATGCACTTTGCGGGT
F29	PT30272	LG15	GAACCTAACCTCGCTCCACA	AAATGGTAGCTGCGAGGAGA
F30	PT54772	LG15	TCAGCTCCTCCTTTCTCCTG	CTTACAAATTTGCGCTCGGT
F31	PT20275	LG16	GTTCTATTTGATCGCCCC	AACAGCACCAACAGCATT
F32	PT53227	LG16	CCAAATAATCTTCATATTGATCCG	CGAGAAAGGAGGAGTTGCAT
F33	PT51364	LG17	CCTTCTTGAACCTTCGTGCGT	TGCTCTCTAATTTCCATGTTTCTCAGA
F34	PT54169	LG17	CCGTGCGTTACAATCCTTCT	AAGGTTGAAACACAATATCTCCA
F35	PT51415	LG18	AAAGCTTAAGCAAAGAGCTGACA	GAATGTTCAATTTTCAGATATGGC
F36	PT60716	LG18	TTGTAAGCCTATGACACCACCTT	ACTATCGGTGGATTAGCCCG
F37	PT53770	LG19	CAGAATTTCCCTTCCACAGAA	CATCGTAAGCGTCAGTCTGC
F38	PT53519	LG19	GCTTGGCATCATCAGAATTT	TATTTCCATTGGCCGTGTCT
F39	PT52111	LG20	AGGAATTGTCACATGAATCGG	CAACAGTTTGGTTCCCAAGG
F40	PT52821	LG20	GGGCAATGGAGCAATAGAAA	TGCTTAAAGATTTCCACTCGTT
F41	PT51289	LG21	GAGTTGTGGCCAAGTAGCCT	GGCTTTAGCCAAACGCTCTA

表 C. 1（续）

引物编号	引物名称	连锁群	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
F42	PT52133	LG21	AAAGTGTGTTGTGTCTGGCA	CCCGGTTAAACTCCACTAATCA
F43	PT54196	LG22	CCTATGTTTGGAGCAGAGGG	GTCATTGTCTGTGCATGGCT
F44	PT51152	LG22	GCGCAGTATTTAGCCCAACT	CATTCCATCACAAGCTTCCA
F45	PT60152	LG23	CTTGCCAATCGTTCCTTCAT	CGGAACAAACGAGACTGTTAGA
F46	PT53595	LG23	CTTAGGACCCAAGAACCCAA	TCCATTCTTGTCCAAGGAGC
F47	PT53089	LG24	GCATTAGAGAGTGCGACATCA	CCCAACGTGAGGGATTACTT
F48	PT52828	LG24	TGAATTATGCGGTGCACATT	ATATTCCAACGTGGGCTGAA

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	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F01	PT50862	138~188	138	K326
			140	Coker 176
			142	小黄金 1025
			144	Speight G-28
			186	革新三号
			188	中烟 90
F02	PT51665	159~181	159	K326
			161	Speight G-28
			163	MC Nair 373
			165	革新三号
			167	金星 6007
			170	丸叶
			175	T. I. 245
			179	Dixie Bright 101
F03	PT55027	197~381	181	NC89
			197	净叶黄
			215	红花大金元
			225	革新三号
			227	K326
			229	T. I. 245
			231	Speight G-28
			233	Coker 176
			235	小黄金 1025
			255	NC86
F04	PT60122	137~185	381	贵烟 11 号
			137	Coker371Gold
			139	Speight G-28
			141	NC-22-NF
			143	长脖黄
			149	革新三号
			157	K326
			159	金星 6007
			179	Coker 139
F05	PT30202	213~237	185	NC89
			213	净叶黄
			225	K326
			227	Speight G-28
			229	小黄金 1025
			231	NC 矮秆种
			237	T. I. 245

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F06	PT60080	115~217	115	K326
			117	金星 6007
			119	NC-22-NF
			121	Speight G-28
			123	小黄金 1025
			127	NC86
			131	T. I. 245
			141	红花大金元
			143	中烟 103
			145	丸叶
			205	K149
			215	中烟 90
			217	Coker 139
F07	PT53970	213~361	213	NC-22-NF
			215	Coker 176
			217	T. I. 245
			219	革新三号
			221	K326
			223	NC89
			225	Speight G-28
			227	NC 矮秆种
			243	金星 6007
			269	K149
			309	革新五号
			357	MC Nair 373
F08	PT53100	183~201	361	Broad Leaf Orinoco
			183	T. I. 245
			185	小黄金 1025
			187	K326
			199	丸叶
F09	PT61414	247~287	201	金星 6007
			247	K326
			249	金星 6007
			253	贵烟 11 号
			255	净叶黄
			257	Coker 176
			259	NC89
			275	小黄金 1025
F10	PT61187	203~227	287	T. I. 245
			203	T. I. 245
			207	金星 6007
			209	Speight G-28
			211	Coker371Gold
			213	红花大金元
			217	K326
			221	中烟 90
F11	PT60650	220~284	227	净叶黄
			220	红花大金元
			222	革新五号
			224	K326
			226	金星 6007

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F11	PT60650	220～284	229	丸叶
			232	Speight G-140
			238	T. I. 245
			244	贵烟 11 号
			280	NC82
			284	NC27NF
F12	PT61154	212～298	212	Speight G-28
			216	K326
			217	长脖黄
			218	金星 6007
			220	Coker 176
			222	革新三号
			224	革新五号
			238	红花大金元
			270	丸叶
F13	PT50599	161～367	298	NC27NF
			161	Coker 176
			163	K326
			167	Speight G-140
			169	净叶黄
			170	T. I. 245
			173	革新三号
			177	革新五号
			182	小黄金 5209
			205	NC89
			217	NC-22-NF
			223	Coker371Gold
F14	PT30165	224～254	367	革新五号
			224	红花大金元
			227	K326
			230	Speight G-28
			233	Dixie Bright 101
			239	T. I. 245
			248	革新五号
F15	PT51206	143～161	254	金星 6007
			143	小黄金 1025
			145	Speight G-28
			147	K326
			149	净叶黄
F16	PT61279	241～375	161	T. I. 245
			241	K326
			247	金星 6007
			251	Speight G-28
			253	Coker 176
			255	NC27NF
			277	CF965/中烟 100
			291	T. I. 245
F17	PT60917	192～230	297	净叶黄
			375	中烟 103
			192	K326
			200	Coker 176

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F17	PT60917	192~230	202	Speight G-28
			204	净叶黄
			206	红花大金元
			210	金星 6007
			216	T. I. 245
			218	丸叶
			220	革新五号
			230	NC-22-NF
F18	PT50392	105~121	105	革新三号
			107	T. I. 245
			111	红花大金元
			113	丸叶
			117	K326
			119	金星 6007
			121	革新五号
F19	PT51144	122~250	122	长脖黄
			124	T. I. 245
			128	NC-22-NF
			130	Coker 176
			132	K326
			136	金星 6007
			152	K149
			176	革新五号
			178	NC 矮秆种
F20	PT54061	179~349	250	CF965/中烟 100
			179	Speight G-28
			181	净叶黄
			185	K326
			187	Speight G-140
			189	金星 6007
			191	红花大金元
			193	革新三号
			195	Coker 176
			197	NC86
			211	Coker 139
			217	CF965/中烟 100
F21	PT30024	166~222	237	NC82
			349	小黄金 1025
			166	K326
			168	Speight G-28
			170	小黄金 1025
			196	丸叶
			202	贵烟 11 号
			206	Coker 176
			208	NC86
F22	PT53036	182~284	220	金星 6007
			222	T. I. 245
			182	丸叶
			186	小黄金 1025
			188	K326
			190	NC-22-NF

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F22	PT53036	182~284	192	CF965/中烟 100
			204	Speight G-140
			246	金星 6007
			248	革新三号
			284	T. I. 245
F23	PT52958	109~239	109	Coker371Gold
			167	MC Nair 373
			169	NC89
			173	净叶黄
			177	小黄金 1025
			179	CF965/中烟 100
			181	金星 6007
			183	K326
			235	T. I. 245
			239	丸叶
F24	PT51896	195~281	195	CF965/中烟 100
			197	T. I. 245
			199	革新五号
			201	K326
			203	小黄金 1025
			205	中烟 15
			209	革新三号
			215	Speight G-28
			231	NC-22-NF
			243	Coker 139
			281	红花大金元
F25	PT55289	206~296	206	革新三号
			208	小黄金 1025
			210	红花大金元
			212	净叶黄
			214	NC27NF
			216	Speight G-28
			218	Coker371Gold
			220	金星 6007
			230	贵烟 11 号
			236	中烟 103
			296	K326
F26	PT53829	205~277	205	小黄金 1025
			207	K326
			209	长脖黄
			213	T. I. 245
			217	革新五号
			277	丸叶
F27	PT60868	196~310	196	贵烟 11 号
			198	Coker 176
			200	丸叶
			202	K326
			204	NC-22-NF
			206	T. I. 245
			310	贵烟 11 号

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F28	PT53953	202~316	202	小黄金 1025
			206	Speight G-28
			208	NC89
			210	K326
			220	丸叶
			242	革新五号
			260	Coker 176
			264	MC Nair 373
			280	革新三号
			294	T. I. 245
F29	PT30272	122~140	316	NC 矮秆种
			122	净叶黄
			132	小黄金 5209
			134	K326
			136	小黄金 1025
			138	革新三号
F30	PT54772	228~273	140	T. I. 245
			228	金星 6007
			230	Coker 254
			232	Coker 176
			234	小黄金 1025
			238	K326
			240	NC27NF
			242	Speight G-28
			244	丸叶
			248	红花大金元
			254	中烟 103
			270	NC-22-NF
F31	PT20275	215~353	273	NC86
			215	金星 6007
			217	Coker 139
			219	K326
			221	T. I. 245
			223	NC89
			225	革新三号
			231	革新五号
			249	K149
			267	NC86
F32	PT53227	205~213	269	Broad Leaf Orinoco
			353	长脖黄
			205	T. I. 245
			207	K326
			209	红花大金元
F33	PT51364	152~188	211	金星 6007
			213	革新五号
			152	Speight G-28
			154	K326
			162	小黄金 1025
			164	净叶黄
			166	中烟 90
			168	革新三号

表 D. 1 (续)

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F33	PT51364	152~188	172	NC27NF
			174	长脖黄
			180	革新五号
			184	红花大金元
			186	T. I. 245
			188	Speight G-140
F34	PT54169	202~232	202	Dixie Bright 101
			204	Coker 176
			214	净叶黄
			216	K326
			218	NC-22-NF
			220	Speight G-28
			232	T. I. 245
F35	PT51415	147~157	147	净叶黄
			149	K326
			151	T. I. 245
			153	丸叶
			157	Coker371Gold
F36	PT60716	191~205	191	MC Nair 373
			193	Coker 176
			195	K326
			205	净叶黄
F37	PT53770	173~213	173	丸叶
			179	净叶黄
			189	CF965/中烟 100
			199	革新五号
			202	金星 6007
			203	NC-22-NF
			205	Coker 176
			207	Speight G-28
			209	K326
			211	NC 矮秆种
			213	T. I. 245
F38	PT53519	197~203	197	Coker371Gold
			199	金星 6007
			201	K326
			203	Speight G-28
F39	PT52111	170~492	170	NC89
			171	NC-22-NF
			172	革新三号
			173	净叶黄
			175	K326
			176	Speight G-28
			177	中烟 15
			178	革新五号
			180	中烟 90
			207	T. I. 245
			492	金星 6007
F40	PT52821	178~188	178	小黄金 1025
			180	K326
			182	NC89

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F40	PT52821	178~188	184	红花大金元
			188	革新五号
F41	PT51289	179~267	179	NC27NF
			181	金星 6007
			183	T. I. 245
			185	K326
			187	Speight G-28
			191	革新五号
			193	净叶黄
			219	NC 矮秆种
F42	PT52133	160~260	267	Coker 139
			160	中烟 15
			164	NC89
			170	K326
			172	Coker 176
			176	MC Nair 373
			179	K149
			180	丸叶
			182	小黄金 5209
			248	革新三号
F43	PT54196	204~240	260	T. I. 245
			204	K326
			206	中烟 90
			212	红花大金元
			214	中烟 103
			216	贵烟 11 号
			218	金星 6007
			220	净叶黄
			222	小黄金 1025
			224	NC 矮秆种
			232	丸叶
			240	T. I. 245
F44	PT51152	174~230	174	小黄金 1025
			178	Coker 139
			180	Coker 176
			182	Speight G-28
			184	革新三号
			186	K326
			190	革新五号
			200	金星 6007
			202	K149
			222	NC-22-NF
F45	PT60152	121~199	230	丸叶
			121	NC82
			135	NC27NF
			137	NC89
			139	K326
			141	小黄金 1025
			143	中烟 103
			145	K149
			147	NC-22-NF

表 D. 1（续）

引物编号	引物名称	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
F45	PT60152	121~199	157	净叶黄
			165	Coker 176
			199	中烟 90
F46	PT53595	195~229	195	红花大金元
			197	NC89
			199	小黄金 5209
			201	丸叶
			203	K326
			205	中烟 15
			229	T. I. 245
F47	PT53089	186~196	186	Coker 176
			188	Coker371Gold
			190	K326
			192	Speight G-28
			194	小黄金 5209
			196	金星 6007
F48	PT52828	217~381	217	K326
			219	Speight G-28
			225	红花大金元
			227	金星 6007
			229	NC89
			231	NC27NF
			381	Dixie Bright 101
注 1: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。 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,使用前需确认其等位变异。				

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

编号	品种名称	全国统一编号	品种来源
1	NC82	00002290	国家烟草种质资源中期库
2	小黄金 1025	00000485	国家烟草种质资源中期库
3	Speight G-28	00001084	国家烟草种质资源中期库
4	中烟 90	00002490	国家烟草种质资源中期库
5	中烟 15	00001365	国家烟草种质资源中期库
6	Coker 176	00002243	国家烟草种质资源中期库
7	NC89	00002293	国家烟草种质资源中期库
8	K326	00002266	国家烟草种质资源中期库
9	中烟 100	00003660	国家烟草种质资源中期库
10	红花大金元	00000540	国家烟草种质资源中期库
11	革新三号	00000503	国家烟草种质资源中期库
12	净叶黄	00000520	国家烟草种质资源中期库
13	中烟 103	00004820	国家烟草种质资源中期库
14	Speight G-140	00002318	国家烟草种质资源中期库
15	T. L. 245	00001087	国家烟草种质资源中期库
16	Coker 139	00003570	国家烟草种质资源中期库
17	K149	00003765	国家烟草种质资源中期库
18	金星 6007	00000494	国家烟草种质资源中期库
19	长脖黄	00000258	国家烟草种质资源中期库
20	革新五号	00000505	国家烟草种质资源中期库
21	NC-22-NF	00003574	国家烟草种质资源中期库
22	丸叶	00002339	国家烟草种质资源中期库
23	Dixie Bright 101	00001020	国家烟草种质资源中期库
24	NC 矮秆种	00002299	国家烟草种质资源中期库
25	NC27NF	00003780	国家烟草种质资源中期库
26	Coker 254	00002247	国家烟草种质资源中期库
27	NC86	00002291	国家烟草种质资源中期库
28	MC Nair 373	00002282	国家烟草种质资源中期库
29	Broad Leaf Orinoco	00001005	国家烟草种质资源中期库
30	小黄金 5209	00000484	国家烟草种质资源中期库
31	Coker371Gold	00003750	国家烟草种质资源中期库
32	泰国白花烤烟	00002340	国家烟草种质资源中期库
33	贵烟 11 号	00003719	国家烟草种质资源中期库
注:多个品种在某一 SSR 位点上可能具有相同的等位变异。在确认这些品种该位点等位变异与参照品种相同后,这些品种也可以代替附录 E 中的参照品种使用。			