

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2472—2013

西瓜品种鉴定技术规程 SSR分子标记法

Identification of watermelon varieties—SSR marker method

2013-12-13 发布

2014-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 原理 1

4 仪器设备及试剂 1

5 溶液配制 1

6 引物 1

7 参照品种 1

8 操作程序 1

9 等位变异数据采集 3

10 判定标准 4

附录 A(规范性附录) 仪器设备及试剂 5

附录 B(规范性附录) 溶液配制 7

附录 C(规范性附录) 核心引物 9

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本标准由农业部种子管理局提出。

本标准由全国植物新品种测试标准化技术委员会(SAC/TC 277)归口。

本标准起草单位:新疆农业科学院农作物品种资源研究所、北京市农林科学院蔬菜研究中心、新疆农业科学院核技术生物技术研究所、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人:马艳明、许勇、张海英、陈勋基、陈果、郭绍贵、宫国义、刘志勇、足木热木·吐尔逊、肖菁、颜国荣。

西瓜品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法

1 范围

本标准规定了利用简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR) 分子标记进行普通西瓜 (*Citrullus lanatus* subsp. *Vularis* 和 *Citrullus lanatus* subsp. *Lanatus*) 品种鉴定的试验方法、数据记录格式和判定标准。

本标准适用于普通西瓜 DNA 分子数据的采集和品种鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

3 原理

SSR 广泛分布于西瓜基因组中, 不同品种间单个 SSR 位点重复单位的数量可能不同。针对两侧序列高度保守和单拷贝的简单重复序列, 根据其两侧的序列设计一对特异引物, 利用 PCR 技术对重复序列进行扩增, 得到的 PCR 产物在电泳过程中的电场作用下由于分子量大小不同得到分离, 经硝酸银染色或者荧光染料标记检测区分开。由于不同普通西瓜品种遗传组成不同, 所以, 根据引物 DNA 序列存在差异或引物结合部位之间的 DNA 片段大小存在差异, 即可鉴定普通西瓜品种。

4 仪器设备及试剂

仪器设备及试剂见附录 A。

5 溶液配制

溶液配制方法见附录 B。

6 引物

引物相关信息见附录 C。

7 参照品种

参照品种的名称见附录 C。

在进行等位变异检测时, 应同时包括相应参照品种的 PCR 扩增产物。

8 操作程序

8.1 重复设置

设定 2 次生物学重复。

8.2 样品准备

种子样品的扦样和保存, 应符合 GB/T 3543.2 的规定。

每个品种分取 2 个样品, 每个样品检测 30 个个体(种子、叶片或其他器官组织), 混合分析。对一致性差的样品每个个体单独分析。

8.3 DNA 提取

采用 CTAB 法。选取植株下胚轴或幼嫩组织 30 mg~40 mg 置于 2.0 ml 离心管中,用液氮研磨至粉状,加入 700 μL 2% CTAB 预热缓冲液,65℃水浴 1 h,加入 700 μL 24:1 氯仿—异戊醇,混匀,11 200 g 离心 10 min;吸取上清液加入预先装有 700 μL 异丙醇的 1.5 mL 的离心管中,混匀后放-20℃冰箱 30 min,11 200 g 离心 10 min;弃上清液,用 70%乙醇溶液洗涤 2 遍,自然条件下干燥后,加入 100 μL ddH₂O,待充分溶解后检测浓度。-20℃保存备用。

注:以上为推荐的一种 DNA 提取方法。其他所获 DNA 质量能够满足 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法都适用于本标准。

8.4 PCR 扩增

8.4.1 反应体系

SSR 反应体系,包括每种 dNTP 0.25 mmol/L,正向引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$,反向引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$,Taq DNA 聚合酶 1.0 U,10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺),样品 DNA 60 ng,其余以超纯水补足。推荐使用 15 μL 或 20 μL 反应体积。

利用 DNA 分析仪检测时使用荧光标记的引物。每种引物的荧光染料种类见附录 C。

注:反应体系的体积可以根据具体情况进行调整。

8.4.2 反应程序

94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,循环 34 次;最后 72℃延伸 10 min。4℃保温待用。

8.5 PCR 产物检测

8.5.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

8.5.1.1 清洗玻璃板

用自来水将玻璃板洗净,晾干,再用 95%的酒精擦洗 1 遍,干燥。在 2 mL 离心管中加入 1 mL 无水乙醇,4 μL 亲和硅烷原液,摇匀,均匀涂在无凹槽玻璃板上。在通风橱中用 0.5 mL 疏水硅烷工作液均匀涂布凹槽玻璃板,操作过程中两块玻璃板分别处理,防止互相污染。

8.5.1.2 组装玻璃板

待玻璃板彻底干燥后,将塑料隔条整齐放在无凹槽玻璃板两侧,盖上凹槽玻璃板,夹子固定,用水平仪检测玻璃胶室是否水平。

8.5.1.3 制胶

取 6%的丙烯酰胺凝胶 50 mL,加入 50 μL TEMED 和 200 μL 10%APS 溶液。轻轻摇匀,将胶缓缓灌入玻璃胶室。待胶室灌满后,在凹槽处将鲨鱼齿朝外轻轻插入样品梳,在室温下聚合 1 h 以上。胶聚合后,轻轻拔出梳子,用水冲洗凹槽处残余的胶,清洗干净备用。

8.5.1.4 预电泳

将胶板安装于电泳槽上,向上槽加入约 800 mL 预热至 65℃的 1×TBE 缓冲液,使其超出凝胶顶部约 3 cm;向下槽中加入 800 mL 1×TBE 缓冲液,60 W 恒功率预电泳 20 min,使凝胶预热。

8.5.1.5 样品制备

在 12.5 μL PCR 产物中加 5 μL 加样缓冲液,混匀后,在水浴锅或 PCR 仪上 95℃变性 5 min,取出,立即置于碎冰中冷却。

8.5.1.6 电泳

用注射器吸取缓冲液冲洗凝胶顶端几次,清除气泡和聚丙烯酰胺碎片。将鲨鱼齿梳子梳齿端插入凝胶 1 mm~2 mm。每一个加样孔点入 2 μL ~3 μL 样品。除待测样品外,还应同时加入参照品种扩增产物。在 50 W~80 W 恒功率下电泳,使凝胶温度保持在约 50℃。电泳 1.5 h~2.5 h(电泳时间取决于扩增片段的大小范围)。电泳结束后,小心分开两块玻璃板,取下凝胶附着的长玻璃板准备固定。

注：具体功率大小根据电泳槽的规格型号和实验室室温设定。

8.5.1.7 银染

- a) 固定：将附着凝胶的玻璃板浸入加有 1 000 mL 10%冰醋酸固定液的塑料盒中，在摇床上轻轻晃动 15 min；
- b) 漂洗：取出胶板，在去离子水中漂洗 1 次~2 次，每次 2 min；
- c) 染色：将胶板放入约 1 000 mL 染色液中，使染色液没过凝胶，在摇床上轻摇 30 min；
- d) 漂洗：取出胶板，用蒸馏水快速漂洗，时间不超过 10 s；
- e) 显影：将胶板放入预冷的 1 000 mL 3%碳酸钠显影溶液中，轻轻晃动至清晰条带显出；
- f) 定影：迅速将胶板放入固定液中定影 5 min；
- g) 漂洗：在去离子水中漂洗胶板 5 min，取出晾干。将玻璃板放在观片灯上，记录结果，拍照保存。

8.5.2 毛细管电泳荧光检测

8.5.2.1 PCR 产物样品准备

将 6-FAM 和 HEX 荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍，TAMRA 和 ROX 荧光标记的 PCR 产物稀释 10 倍。分别取等体积的上述 4 种稀释后溶液混合，从混合液中吸取 1 μ L 加入到 DNA 分析仪专用深孔板孔中。板中各孔分别加入 0.1 μ L LIZ500 分子量内标和 8.9 μ L 去离子甲酰胺。将样品在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，立即置于碎冰上，冷却 10 min 以上。瞬时离心 10 s 后置放到 DNA 分析仪上。

除待测样品外，每个 SSR 位点还应同时包括 2 个~3 个参照品种的扩增产物。

注：不同荧光标记的扩增产物的最适稀释倍数最好通过毛细管电泳荧光检测预试验确定。

8.5.2.2 开机准备

打开 DNA 分析仪，检查仪器工作状态。更换缓冲液，灌胶。将装有样品的深孔板置放于样品架基座上。打开数据收集软件。

8.5.2.3 编板

按照仪器操作程序，创建电泳板，输入电泳板名称，选择适合的程序和电泳板类型，输入样品编号或名称。

8.5.2.4 运行程序

DNA 分析仪自动将毛细管电泳数据、运行参数等存放在仪器中。

9 等位变异数据采集

9.1 数据表示

样品每个 SSR 位点的等位变异采用扩增片段大小的形式表示。

9.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

将某一位点待测样品和相应的参照品种扩增片段的带型和移动位置进行比较，根据参照品种的移动位置和扩增片段大小，确定待测样品该位点的等位变异大小。

9.3 毛细管电泳荧光检测

使用 DNA 分析仪的片段分析软件，读出每个位点每个样品的等位变异大小数据。比较参照品种的等位变异大小数据与附录 C 中参照品种相应的数据，两者之间的差值为系统误差。从待测样品的等位变异数据中去除该系统误差，得到的数据即为待测样品该位点的等位变异大小。

示例 1：参照品种“红 1 号”、“早花”在 BVWS00441 位点上的等位变异大小分别为 163 bp 和 178 bp，附录 C 中“红 1 号”、“早花”相应的数据分别为 163 bp 和 178 bp，系统误差为 2 bp。一个待测样品的等位变异大小原始数据为 175 bp 则待测样品在该位点上的等位变异数据应为 173 bp。

示例 2：参照品种“早花”、“K7”在 BVWS00948 位点上的等位变异大小分别为 259 bp 和 267 bp，附录 C 中“早花”、“K7”相应的数据分别为 259 bp 和 267 bp，系统误差为 0 bp。一个待测样品的等位变异大小原始数据为 261 bp 则待测样

品在该位点上的等位变异数据应为 261 bp。

9.4 结果记录

纯合位点的等位变异大小数据记录为 X/X ，杂合位点的等位变异数据记录为 X/Y 。其中 $X、Y$ 为该位点上两个不同的等位变异片段大小，小片段在前，大片段在后。无效等位变异的大小记录为 $0/0$ 。

示例 1：一个品种在 BVWS00658 位点上有 1 个等位变异，大小为 270 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 270/270。

示例 2：一个品种在 BVWS01734 位点上有 2 个等位变异，大小分别为 217 bp、230 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 217/230。

9.5 数据处理

一个位点 2 次重复检测数据相同时，该数据即为该位点的等位变异数据；2 次重复不一致时，增加第三个重复，以其中 2 个重复相同的检测数据为该位点的等位变异数据；当 3 次重复都不相同时，该位点视为无效位点。

10 判定标准

依据附录 C 中的 28 个位点的核心引物检测结果进行判断：

- a) 品种间差异位点数 ≥ 3 ，判定为不同品种；
- b) 品种间差异位点数 < 3 ，判定为近似品种。

附 录 A
(规范性附录)
仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 PCR 核酸扩增仪。
- A.1.2 高压电泳仪。
- A.1.3 序列分析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 水平摇床。
- A.1.7 电子天平。
- A.1.8 微量移液器。
- A.1.9 胶片观察灯。
- A.1.10 紫外分光光度计。
- A.1.11 高压灭菌器。
- A.1.12 酸度计。
- A.1.13 水浴锅。
- A.1.14 制冰机。
- A.1.15 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.2 试剂

- A.2.1 十六烷基三乙基溴化铵。
- A.2.2 聚乙烯吡咯烷酮。
- A.2.3 氯仿。
- A.2.4 异戊醇。
- A.2.5 乙二胺四乙酸二钠。
- A.2.6 三羟甲基氨基甲烷。
- A.2.7 浓盐酸。
- A.2.8 氢氧化钠。
- A.2.9 10×Taq DNA 聚合酶 Buffer 缓冲液(含 Mg^{2+})。
- A.2.10 4 种脱氧核苷酸。
- A.2.11 Taq DNA 聚合酶。
- A.2.12 核酸染料。
- A.2.13 去离子甲酰胺。
- A.2.14 溴酚蓝。

- A. 2. 15 二甲苯青。
- A. 2. 16 甲叉双丙烯酰胺。
- A. 2. 17 丙烯酰胺。
- A. 2. 18 硼酸。
- A. 2. 19 尿素。
- A. 2. 20 亲和硅烷。
- A. 2. 21 剥离硅烷。
- A. 2. 22 无水乙醇。
- A. 2. 23 四甲基乙二胺。
- A. 2. 24 过硫酸铵。
- A. 2. 25 冰醋酸。
- A. 2. 26 硝酸银。
- A. 2. 27 甲醛。
- A. 2. 28 DNA 分析仪用聚丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 29 DNA 分析仪用分子量内标,最大分子量 500 bp,Liz 标记。
- A. 2. 30 DNA 分析仪用光谱校准基质:包括 6 - FAM、TAMRA、HEX 和 ROX 4 种荧光染料标记的 DNA 片段。
- A. 2. 31 DNA 分析仪用电泳缓冲液。

附 录 B
(规范性附录)
溶 液 配 制

B.1 DNA 提取溶液的配制**B.1.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)(pH 8.0)溶液**

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

B.1.2 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)(pH 8.0)溶液

称取 60.55 g Tris 碱, 溶于适量去离子水中, 加 HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 500 mL, 在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

B.1.3 0.5 mol/L 盐酸(HCl)溶液

量取 25 mL 浓盐酸(36%~38%), 加水定容至 500 mL。

B.1.4 DNA 提取液

称取 20 g CTAB, 81.82 g NaCl, 分别加入 100 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0)、40 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)和 10 g PVP, 加入 800 mL 去离子水, 65 °C 水浴搅拌、溶解, 定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。4 °C 保存。

B.1.5 24:1 氯仿-异戊醇

按 24:1 的比例(V:V)配制混合液。

B.1.6 乙醇-乙醇胺溶液

称取 0.154 6 g 乙酸铵置入烧杯中, 加入 140 mL 无水乙醇, 用去离子水定容至 200 mL。

B.1.7 1×TE 缓冲液

分别量取 5 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0), 定容至 500 mL, 在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。4 °C 保存。

B.2 PCR 扩增溶液的配制**B.2.1 10 mmol/L dNTP 溶液**

用超纯水分别配制 A、G、C、T 终浓度 100 mmol/L 的储存液, 各取 20 μL 混合, 用 120 μL 超纯水定容至每种核苷酸终浓度为 10 mmol/L 的工作液。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。-20 °C 保存。

注:也可使用购买的满足实验要求的商品试剂。

B.2.2 SSR 引物溶液

用超纯水分别配制正向引物和反向引物至浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

B.2.3 10×Taq DNA 聚合酶 PCR 缓冲液

分别量取 500 mmol/L KCl、100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.01% 明胶。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。-20 °C 保存。

B.2.4 25 mmol/L 氯化镁(MgCl_2)溶液

称取 MgCl_2 1.190 g, 用去离子水溶解, 定容至 500 mL, 配制成 25 mmol/L 的工作液, 在 103.4 kPa

(121℃)条件下灭菌 20 min。—20℃保存。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 10×TBE 缓冲液

分别称取 Tris 碱 108 g、硼酸 55 g,量取 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)溶液 37 mL,加去离子水溶解,定容至 1 000 mL。

B.3.2 40%丙烯酰胺溶液

分别称取丙烯酰胺 190 g 和甲叉双丙烯酰胺 10 g,置入烧杯中,加水溶解,定容至 500 mL。

B.3.3 6%变性聚丙烯酰胺凝胶溶液

称取尿素 420 g,用去离子水溶解,加入 10×TBE 缓冲液 100 mL,40%丙烯酰胺胶溶液 150 mL,定容至 1 000 mL。

B.3.4 亲和硅烷缓冲液

分别量取 49.75 mL 无水乙醇和 250 μL 冰醋酸,加去离子水定容至 50 mL。

B.3.5 亲和硅烷工作液

在 1 mL 亲和硅烷缓冲液中加入 5 μL 亲和硅烷原液,混匀。

B.3.6 剥离硅烷工作液

在 98 mL 的三氯甲烷溶液中加入 2 μL 二甲基二氯硅烷溶液,混匀。

B.3.7 10%过硫酸铵溶液

称取 0.10 g 过硫酸铵,溶于 1 mL 去离子水中,混匀。4℃保存。

B.3.8 1×TBE 缓冲液

量取 10×TBE 缓冲液 500 mL,加去离子水定容至 5 000 mL。

B.3.9 6×加样缓冲液

量取 49 mL 98%的去离子甲酰胺(用于 DNA 变性)、0.5 mol/L 的 EDTA 溶液(pH8.0)1 mL,加入 0.125 g 溴酚蓝、0.125 g 二甲苯青,混匀。4℃保存。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液

量取 100 mL 冰醋酸,加去离子水定容至 1 000 mL。

B.4.2 染色液

称取 1 g 硝酸银,加去离子水溶解,定容至 1 000 mL。

B.4.3 显影液

量取 100 mL 去离子水,加入 10 g 氢氧化钠和 5 mL 甲醛,混匀。

注:除非另有说明,仅适用分析纯试剂。

附 录 C
(规范性附录)
核心引物

核心引物见表 C.1。

表 C.1 核心引物

序号	引物	连锁群	引物序列(5'-3')	荧光	退火温度 ℃	等位 变异 bp	参照品种
1	BVWS00948	1	正向引物: TCAAACCGACTGCCATATCA 反向引物: AGCTTGCTCTTCCTGGCCTTT	5'-FAM	55	246 259 267	PI296341 - FR 早花、无杈早 K7、三白
2	BVWS00155	1	正向引物: TGGATCATTGACAGATTTAGCGA 反向引物: CATCACAGTTAACGATCACAAGGC	5'-FAM	55	156 160 162 164	PI296341 - FR 长灰、克仑生 早花、卡红 红1号、都1号
3	BVWS00297	2	正向引物: ACAACTTTGATTGATTGCACGATG 反向引物: AAGTGAAAGACCCTTTTCCCAAAC	5'-TAMRA	55	140 150	乙女 长灰、卡红
4	BVWS00314	2	正向引物: GAGGAGAATCGGTTCTTGGACATA 反向引物: TTGAGCATCCTTGGGACTATCATT	5'-FAM	55	134 140	红1号、无杈早 卡红、2000 - S52
5	BVWS00048	3	正向引物: TCAAAAGGTTTGCCCTAAATGAAA 反向引物: TGCTGATCTCCATTCTTAACCTC	5'-FAM	55	157 166	红1号、无杈早 三白、信白 91 - 2
6	BVWS00208	4	正向引物: GCAAAGATTGTCTATGAAGCAGCA 反向引物: GCTCATTGGCTTCTTGAATCTGTT	5'-FAM	55	133 170	中育 10 号 红1号、无杈早
7	BVWS01734	4	正向引物: AAAATTACATCTTAAATGCGCC 反向引物: GGAACATTGACTTCAATCAGCA	5'-HEX	55	221 229	早花、K7 黑蹦筋、都1号
8	BVWS00441	5	正向引物: TGGTTGAAATCAATAAAAAGTGAA 反向引物: TGGATGTTTTTGGCATTGTA	5'-FAM	55	163 178	红1号、无杈早 早花、K7
9	BVWS00658	5	正向引物: TTAGCCTAAGCAAGGGTTTTT 反向引物: AAGTACACATTTTAAACAATCAATCCA	5'-HEX	55	269 279	早花、K7 三白、卡红
10	BVWS00106	5	正向引物: TGGCCTAGAAGATTATTGAGCTGC 反向引物: CATTATCACATGGCAGATAATGGAAA	5'-HEX	55	187 195 245	K7 红1号、无杈早 黑蹦筋、都1号
11	BVWS01686	5	正向引物: TGGATAGAATGGAAAGCTCTGA 反向引物: TCCCACACATCATTCCAAAA	5'-FAM (FITC)	55	168 268 275	红1号、无杈早 早花、K7 红1号、无杈早
12	BVWS01897	6	正向引物: TTCTTGAAACTCAACCCCTCAA 反向引物: AAAGCGTGTGAGTGTGAGA	5'-HEX	55	209 240	K7、三白 红1号、黑蹦筋
13	BVWS02433	6	正向引物: ATTTCTGGCCCCAGTGTAAG 反向引物: GAACAACGCAACCACGTATG	6'-ROX	55	189 210	早花、都1号 红1号、无杈早
14	BVWS00818	6	正向引物: CAACCGGTCTTCGTGAATTT 反向引物: CGGCCACCACTTCTCATATT	6'-ROX	55	172 180	红1号、无杈早 K7、三白
15	BVWS01358	6	正向引物: CCCTATTGCCTATTTTCTCAA 反向引物: AAATTTGTGCTCTTCGTGGG	6'-ROX	55	195 225	黑蹦筋、都1号 红1号、无杈早
16	BVWS00433	7	正向引物: TCTTTTAAAGTTTGAGGGAGAGC 反向引物: TTCCCAAGCTAGCCTTTTCA	5'-TAMRA	55	245 278 299	早花、K7 红1号、无杈早 早花、蜜宝

表 C.1 (续)

序号	引物	连锁群	引物序列(5'-3')	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种
17	BVWI00170	7	正向引物: AACGCACGATAGTTAGAAGG 反向引物: TGAATAATTAACACTACACTCAGACT	5'TAMRA	55	125 130	早花、黑蹦筋 红1号、无杈早
18	BVWS00358	7	正向引物: CATTTCCGTTTCCATTTTCTTCAC 反向引物: AAGTAACATCAAGCAGTTCGCCAT	5'TAMRA	55	145 165 175	长灰、卡红 无杈早、都1号 PI296341 - FR
19	BVWS00369	8	正向引物: TGAGAAAATGGAAGATGCAAATGA 反向引物: TTCTTCTCACTCTCTCCTAAGATTTTGC	5'TAMRA	55	129 160 190 210	红1号、无杈早 长灰、卡红 乙女、克仑生 早花、K7
20	BVWS00826	8	正向引物: ATGGTTCATTTTTCACGTTTCG 反向引物: AAAAATCAAGCAAAGAACAACAT	5'HEX	55	158 210	红1号、早花 无杈早、黑蹦筋
21	BVWS00209	9	正向引物: TGCTTCAAAATCTATTACAATTTGC 反向引物: TTCTTGGTTTCGGGTTTCTTTACA	5'TAMRA	55	252 279 300	长灰、卡红 黑蹦筋、都1号 无杈早、三白
22	BVWS01843	9	正向引物: CCCCCGCCAAAATTAATAA 反向引物: CACCCGTGTAAAGGTGGTAAA	5'TAMRA	55	165 190	早花、都1号 红1号、无杈早
23	BVWS00333	9	正向引物: TGTGAGATTCTTTGATTCAACTGT 反向引物: TGGGTCAAAGTATTTTGTCTTTT	5'TAMRA	55	120 128	K7、三白 早花、长灰
24	BVWS00177	9	正向引物: TTCAACCAAGCAGTCTTAACACAA 反向引物: GATGCATTAAGATTTTCGTTTCGC	5'6 - FAM (FITC)	55	170 184	卡红、克仑生 乙女、长灰
25	BVWS02048	10	正向引物: TCTGTGTGGATGCAAATGGT 反向引物: GCTAATCGAGCCAGTTACG	5'ROX	55	249 258	长灰、乙女 黑蹦筋、都1号
26	BVWS00236	10	正向引物: CTTGAGCATTTGGCTTCTAGTGT 反向引物: GTCAAAATGTCCTTTGATTCCCAA	5'ROX	55	168 174	红1号、无杈早 长灰、卡红
27	BVWS00839	11	正向引物: TTCCACACCAAGGAGGTAGG 反向引物: CATGTCATTGATAAAGCAGAAA	5'ROX	55	237 249	红1号、无杈早 卡红、克仑生
28	BVWS00228	11	正向引物: GGAAGAGTGAGGTGATAAATCAATATGT 反向引物: AATTGGCCCAAATATCCATATGAC	5'ROX	55	143 152	红1号、无杈早 黑蹦筋、长灰
注1: 多个品种在某一 SSR 位点上可能都具有相同的等位变异。在确认这些品种该位点等位变异大小与参照品种相同后, 这些品种也可以代替附录 C 中的参照品种使用。 注2: 同一名称不同来源的参照品种的某一位点上的等位变异可能不相同, 在使用其他来源的参照品种时, 应与原参照品种核对, 确认无误后使用。 注3: 对于附录 C 中未包括的等位变异, 应按本标准方法, 确定其大小和对应参照品种。							