

# DB52

## 贵 州 省 地 方 标 准

DB52/T 1528—2020

---

### 紫苏品种鉴定技术规程 SSR 标记法

Protocol for the identification of perilla varieties—SSR marker method

2020 – 11 – 13 发布

2021 – 03 – 01 实施

贵州省市场监督管理局

发 布



目 次

前言 ..... II

1 范围 ..... 1

2 规范性引用文件 ..... 1

3 术语与定义 ..... 1

4 原理 ..... 1

5 仪器设备及试剂 ..... 2

6 溶液配制 ..... 2

7 引物信息 ..... 2

8 参照品种准备 ..... 2

9 操作步骤 ..... 2

10 数据记录与统计 ..... 3

11 结果判定 ..... 4

附录 A（资料性） 主要仪器设备及试剂..... 5

附录 B（资料性） 溶液配制..... 7

附录 C（资料性） 推荐引物名单及序列..... 9

附录 D（资料性） 参照品种等位变异位点..... 11

附录 E（资料性） 参照品种名单..... 15



## 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。

本文件由贵州省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：贵州省油菜研究所。

本文件主要起草人：沈奇、温贺、王仙萍、徐静、商志伟、杨森、杜才富、陈俊琨、田飞、汤勇。



# 紫苏品种鉴定技术规程 SSR 标记法

## 1 范围

本文件规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeat, SSR）标记法进行紫苏资源材料及品系品种鉴定的原理、仪器设备及试剂、溶液配制、引物信息、参照品种准备、操作步骤、数据记录与统计、结果判定等。

本文件适用于紫苏种质资源、品系品种的SSR标记鉴定。

## 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。

NY/T 2494 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 紫苏

## 3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**推荐引物** Recommended Primer

品种鉴定中优先选用的一套SSR引物，具有多态性高，重复性好等综合特性。

### 3.2

**参照品种** Reference Variety

具有所用SSR位点上不同等位变异的品种。参照品种用于辅助确定待测样品的等位变异，校正仪器设备的系统误差。

### 3.3

**SSR 指纹图谱** SSR Finger Print

品种或材料特征性的SSR变异位点集合，代表着以品种特有的基因组DNA中简单重复序列特征。

## 4 原理

由于不同紫苏品种遗传组成不同，基因组DNA中简单重复序列的重复次数存在差异，这种差异可通过DNA提取、PCR扩增以及聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）或毛细管电泳荧光检测进行检测，从而能够区分紫苏资源材料及品系品种。

## 5 仪器设备及试剂

详见附录A。

## 6 溶液配制

参照附录B的要求执行。

## 7 引物信息

推荐引物名单及序列参见附录C，推荐引物等位变异等相关信息参见附录D。

## 8 参照品种准备

参见附录E。

## 9 操作步骤

### 9.1 材料准备

随机取5个单株的组织或器官（种子，幼苗，叶片，苞叶，花，果穗等）。

### 9.2 DNA 提取

CTAB提取法：幼苗或叶片500 mg，置于研钵，加液氮充分研磨，或取种子充分磨碎，称取100 mg移入2 mL离心管；每管加入600  $\mu\text{L}$ ，65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 CTAB提取液，充分混合，65  $^{\circ}\text{C}$  保温60 min，期间多次颠倒混匀；每管加入等体积的三氯甲烷 / 异戊醇混合液，充分混匀，静置10 min；12000 r离心15 min后，吸取上清液至一新离心管，再加入等体积的三氯甲烷 / 异戊醇混合液，充分混匀，静置10 min，12000 r离心15 min。吸取上清液至一新离心管，加入2倍体积的预冷乙醇，置于-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜放置后12000 r离心15 min，弃上清液；加入70%乙醇，旋转离心管数次，弃去乙醇，室内干燥沉淀6 h以上；加入100  $\mu\text{L}$  超纯水或TE缓冲液，充分溶解后备用。

注：以上为推荐的DNA提取方法，其他达到PCR扩增质量要求的DNA提取方法均适用。

### 9.3 PCR 扩增

#### 9.3.1 引物选择

选择附录C中引物进行检测。

#### 9.3.2 反应体系

各试验材料的DNA浓度稀释至50 ng/ $\mu\text{L}$ 使用。10  $\mu\text{L}$ 反应体系各组分推荐含量如下：10 $\times$ Buffer 1.0  $\mu\text{L}$ ， $\text{Mg}^{2+}$  0.8  $\mu\text{L}$  (1.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )，dNTPs 0.2  $\mu\text{L}$  (0.225 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )，Taq DNA聚合酶0.1  $\mu\text{L}$ ，模板DNA 1.0  $\mu\text{L}$ ，引物各0.5  $\mu\text{L}$  (0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，ddH<sub>2</sub>O 5.9  $\mu\text{L}$ 。

### 9.3.3 反应程序

94 ℃预变性3 min, 每个循环94 ℃变性30 s, 57 ℃退火30 s, 72 ℃延伸40 s, 共36个循环, 72 ℃, 10 min, 10 ℃保持。

## 9.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 (PAGE)

### 9.4.1 PAGE 胶制备

电泳胶板洗净, 用蒸馏水和无水乙醇分别淋洗并晾干。在长胶板上均匀涂抹1.5 mL硅化液, 短胶板上均匀涂抹1 mL反硅化液, 5 min后用95%乙醇擦除多余的硅化液和反硅化液。将玻璃胶板装配好并以0.4 mm边条隔开。配制80 mL变性凝胶液, 从制胶夹底部小孔缓慢注入, 插入梳子并加夹子保护, 凝聚2 h后即可电泳。

### 9.4.2 电泳分离

将电泳槽底部的制胶夹板取下, 擦净电泳槽玻璃外侧并将其垂直固定于底座上, 上槽加1×TBE缓冲液1000 mL, 下槽加同样浓度的电泳缓冲液500 mL, 将梳子拔出后立即冲洗点样孔。接通电源后, 120 W电泳预热30 min。在选择性扩增产物中加入等体积的上样缓冲液, 95 ℃变性3 min~5 min后立即冰浴冷却, 上样2 μL, 70 W~90 W电泳2 h左右, 当二甲苯青跑到2/3胶板时中止电泳。

### 9.4.3 染色与显影

电泳完毕, 剥离下胶板, 将其浸入2 L固定液, 摇床在速度20 r/min下摇动20 min 或至指示剂消失为止, 然后用去离子水漂洗胶板2次, 每次不少于10 min。然后转至2 L染色液中染色, 置于摇床速度20 r/min下摇动30 min。取出胶板, 在双蒸水中迅速漂洗10 s, 马上转入到2 L的显影液中, 置于摇床速度20 r/min下摇动至带型清晰可见后取出放回固定液中停止显影, 然后用自来水漂洗5 min, 室温下自然晾干, 拍照保存。

## 9.5 毛细管电泳荧光检测

分别取等体积稀释后的不同荧光标记扩增产物混合液1 μL加入DNA分析仪96孔板中, 各孔中分别加入0.1 μL内标及8.9 μL去离子甲酰胺。样品变性5 min取出置于冰上冷却10 min, 转速11000 r/min离心10 s放置分析仪上。电泳检测按照仪器操作手册, 编辑样品表, 执行运行程序。

## 10 数据记录与统计

### 10.1 结果记录

纯合位点的基因型数据记录为X/X, 杂合位点的基因型数据记录为X/Y, 其中X、Y分别为该位点上两个等位变异, 小片段数据在前, 大片段数据在后; 缺失位点基因型数据记录为0/0。

示例1: 扩增样品在某个位点上仅出现一个等位变异, 大小为250 bp, 在该位点的基因型记录为250/250。

示例2: 扩增样品在某个位点上有两个等位变异, 大小分别为245 bp、250 bp, 在该位点的基因型记录为245/250。

## 10.2 统计比较

样品每个SSR位点的等位变异采用扩增片段长度的形式表示。对于普通聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测法，每个扩增位点的等位变异与参照品种的等位变异片段大小进行比较，确定样品在该位点的等位变异。对于毛细管电泳荧光检测方法，通过使用参照品种，消除同型号不同批次或不同型号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。

## 11 结果判定

当样品间差异位点数大于2，判定为“不同”；当样品间差异位点数等于1，判定为“近似”；当样品间差异位点数等于0，判定为“极近似或相同”。

对利用附录C中30对引物仍未检测到2个差异位点数的样品，可进行田间种植鉴定。田间种植鉴定参照NY/T 2494进行判定。

附 录 A  
(资料性)  
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2000V，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 DNA分析仪。
- A.1.6 高速冷冻离心机：最大离心力不小于20000g。
- A.1.7 水平摇床。
- A.1.8 胶片观察灯。
- A.1.9 电子天平。
- A.1.10 微量移液器：规格分别为 10 $\mu$ L、20 $\mu$ L、100 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L，连续可调。
- A.1.11 磁力搅拌器。
- A.1.12 核酸浓度测定仪及紫外分光光度计。
- 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：控温精度  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.17 冰箱。
- A.1.18 制冰机。
- A.1.19 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.2 主要试剂

- A.2.1 十二烷基苯磺酸钠。
- A.2.2 聚乙烯吡咯烷酮。
- A.2.3 氯仿。
- A.2.4 异戊醇。
- A.2.5 乙二醇四乙酸二钠。
- A.2.6 三羟甲基氨基甲烷。
- A.2.7 盐酸。
- A.2.8 氢氧化钠。
- A.2.9 氯化钠。
- A.2.10 10 $\times$ Buffer 缓冲液。
- A.2.11 dNTP。
- A.2.12 Taq DNA 聚合酶。
- A.2.13 矿物油。

- A. 2. 14 琼脂糖。
- A. 2. 15 DNA分子量标准。
- A. 2. 16 核酸染色剂。
- A. 2. 17 去离子甲酰胺。
- A. 2. 18 溴酚蓝。
- A. 2. 19 二甲苯青。
- A. 2. 20 甲叉双丙烯酰胺。
- A. 2. 21 丙烯酰胺。
- A. 2. 22 硼酸。
- A. 2. 23 尿素。
- A. 2. 24 亲和硅烷。
- A. 2. 25 剥离硅烷。
- A. 2. 26 无水乙醇。
- A. 2. 27 四甲基乙二胺。
- A. 2. 28 过硫酸胺。
- A. 2. 29 冰醋酸。
- A. 2. 30 冰醋酸。
- A. 2. 31 硝酸银 。
- A. 2. 32 甲醛。
- 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分析仪用光谱校准基质。
- A. 2. 36 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。

## 附 录 B

### (资料性)

### 溶液配制

#### B.1 DNA提取溶液的配制

- B.1.1 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 溶液: 186.1 g Na<sub>2</sub>EDTA · 2 H<sub>2</sub>O 800 mL 水中, 用固体 NaOH 调 pH 至 8.0, 定容至 1000 mL, 高压灭菌。
- B.1.2 1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 溶液: 60.55 g Tris 碱溶于适量水中, 加 HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 500 mL, 高压灭菌。
- B.1.3 0.5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液: 25 mL 浓盐酸 (36% - 38%), 加水定容至 500 mL。
- B.1.4 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液: 146g NaCl 加水定容至 500 mL。
- B.1.5 2% (w/v) CTAB 提取液: 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 溶液 40 mL, 1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 溶液 100 mL, 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液 40 mL, CTAB 20 g 定容至 1000 mL。
- B.1.6 TE 缓冲液: 1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 5 mL, 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 1 mL, 加 HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 500 mL。
- B.1.7 氯仿/异戊醇溶液: 按 24: 1 (V/V) 的比例配置。

#### B.2 PCR扩增溶液的配制

- B.2.1 dNTP: 用超纯水分别配制 A、G、C、T 终浓度 100 mmol·L<sup>-1</sup> 的储存液。各取 20 μl 混合, 用超纯水 720 μl 定容至终浓度 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的工作液。
- B.2.2 SSR 引物: 用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均 40 μmol·L<sup>-1</sup> 的储存液, 等体积混合成 20 μmol·L<sup>-1</sup> 的工作液。
- 注: 干粉配制前应首先快速离心。
- B.2.3 10 ×PCR缓冲液: 500 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.01% 明胶, 高压灭菌保存。

#### B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

- B.3.1 40 % PAGE 胶: 分别称取丙烯酰胺 190 g 和甲叉双丙烯酰胺 10 g, 定容至 500 mL。
- B.3.2 6% 变性聚丙烯酰胺胶溶液: 称取尿素 450 g, 10 ×TBE 缓冲液 100 mL, 40 % PAGE 胶 112.5 mL, 定容至 1000 mL。
- B.3.3 亲和硅烷缓冲液: 49.75 mL 无水乙醇和 250 μL 冰醋酸, 加水定容至 50 mL。
- B.3.4 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.3.5 剥离硅烷工作液: 在 98 mL 三氯甲烷溶液中加入 2% 二甲基二氯硅烷溶液, 混匀。
- B.3.6 10 % 过硫酸铵溶液: 1 g 过硫酸铵溶于 10 mL 超纯水中, 混匀。
- B.3.7 10 ×TBE 缓冲液: 三羟甲基氨基甲烷 (Tris 碱) 108 g, 硼酸 55 g, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH=8.0) 溶液 37 mL, 定容至 1000 mL。
- B.3.8 1 ×TBE 缓冲液: 取 10×TBE 缓冲液 500 mL, 加水定容至 5000 mL。
- B.3.9 6×加样缓冲液: 0.25 g 溴酚蓝, 0.25 g 二甲苯青, 分别加入 98 mL 去离子甲酰胺, 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 EDTA 溶液 (pH 8.0) 1 mL, 搅拌溶解。

#### B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液：100 mL 冰醋酸，加水定容至 1000 mL。

B.4.2 染色液：称取 2 g 硝酸银，加水定容至 1000 mL。

B.4.3 显影液：取 1000 mL 蒸馏水中，加入30 g氢氧化钠和 5 mL 甲醛，混匀。

注：除银染溶液的配制可使用符合 GB/ T 6682 规定的三级水外，试验中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/ T 6682 规定的一级水。

附 录 C  
(资料性)  
推荐引物名单及序列

表C.1 推荐引物名单及序列

| 引物<br>编号 | 上游引物                    |        |            | 下游引物                    |            |            |
|----------|-------------------------|--------|------------|-------------------------|------------|------------|
|          | 序列信息(5'-3')             | 温度(°C) | 长度<br>(bp) | 序列信息(5'-3')             | 温度<br>(°C) | 长度<br>(bp) |
| P14      | CGAGGCAATGCAATAGGAT     | 60.06  | 20         | GTCGCTACGAGAACCAGGAG    | 60.01      | 20         |
| P16      | GCTCCTCCTCTCGCTTATT     | 59.95  | 20         | CACCACCTCCATCCCTCTAA    | 59.92      | 20         |
| P19      | CGCTCTCCAAAGTTGAAACC    | 59.85  | 20         | GCTCCTGCTTTCTTCAAAGG    | 59.20      | 20         |
| P25      | TAAATAACCCATGCAGCCCT    | 59.43  | 20         | CGATCGATTATTCAACAACATGA | 59.85      | 23         |
| P26      | GCCTTTAACGCCAGAGAGTG    | 60.02  | 20         | TTCCTTTTCCGAGCTTCTG     | 59.56      | 20         |
| P31      | GCTCTTTCAACGATTGGCTC    | 59.96  | 20         | CAGGGTTTTGGTGATTAAAGC   | 58.62      | 21         |
| P32      | TGAAAATCTGTGCTCCCTT     | 59.67  | 20         | GACTGGATCTGCTCTCTGGG    | 59.95      | 20         |
| P33      | AACAATTCGGAACCCAAAAC    | 58.79  | 20         | GCTAGTGGAACTCCGCTCTG    | 59.87      | 20         |
| P40      | GCGTTCCTTCCTTTGTCGTA    | 60.25  | 20         | CAAAAACCTCCTCAATTCTCACA | 60.50      | 23         |
| P51      | CCATTGCTATAGAAACATCAGAA | 57.57  | 24         | TTGGGGTAATCAGCACACCT    | 60.38      | 20         |
| P52      | GCACCACAGGAAGACCAGAT    | 60.12  | 20         | CCAAACCCACTGTGAACCTT    | 59.86      | 20         |
| P57      | CGCGTCTCCCTCTTTCTTT     | 60.87  | 20         | TGCTGAGCACGTTTCAATTC    | 60.00      | 20         |
| P58      | GTTTCCCTCCATTCCCAT      | 60.00  | 20         | ATCGATCATCGGAAGAAACG    | 60.04      | 20         |
| P62      | GACCCGAACGGTTACGATTA    | 59.82  | 20         | ACCGAAAAGTCAGAAAACG     | 60.15      | 20         |
| P78      | CGCCACTTGATCTATAATCGC   | 59.72  | 21         | GTGCGTTTGTCAAAGGGTTT    | 60.02      | 20         |
| P89      | CAGTTTCACTCTTCTCCGGC    | 59.99  | 20         | CAAAACCACCACCAACTTCT    | 58.99      | 21         |
| P92      | TCTCCACACCGAATACCTC     | 59.93  | 20         | CTTTGCAGCCATTGACGAC     | 60.41      | 19         |
| P95      | GTCCTTCACTGTCCCTTGGA    | 60.09  | 20         | GAACGTGCCAGACGAAGAAT    | 60.26      | 20         |
| P103     | AAACCGGTTCTGTTTACAGC    | 58.30  | 21         | GAATTAGGACGGCCACTTCA    | 60.07      | 20         |
| P108     | TGAGCAGTAGGGGCAAAAGT    | 59.88  | 20         | AACAACCTACCACGGCAGGAG   | 60.17      | 20         |
| P120     | GTGTGCCTATGTGTCTGCGT    | 59.78  | 20         | TTTCTGGGAATTTTGGCTG     | 60.05      | 20         |
| P122     | GGAGATCAACGGCTGCTTTA    | 60.35  | 20         | CCTGTAAAGTTTCCCCACCT    | 58.03      | 20         |
| P125     | GCTTCGAGAACTTCAACCG     | 59.99  | 20         | CGAACTTCGGAATTATTAGCG   | 58.90      | 21         |
| P134     | AAAGCCATAAGCTAAGCTGGC   | 60.02  | 21         | TCTCTTTTCAGCCTTGAGGG    | 59.55      | 20         |
| P151     | CCAAATACACACGCGCATA     | 59.15  | 19         | GTGTTGTTGTCCGATGATGC    | 59.98      | 20         |
| P158     | GGGCTTCTATAAAACCCAA     | 59.02  | 20         | TTTCTAGCCGGGAGAGATGA    | 59.91      | 20         |
| P162     | GGAGGCCATACAGTGGGATA    | 59.77  | 20         | TTTCCCTGATAAAACCTCG     | 59.02      | 20         |
| P163     | AACTTCTCGTTGTGGGATGG    | 59.97  | 20         | TACCCTGCAAATTAGCTGCC    | 60.23      | 20         |

表C.1 推荐引物名单及序列（续）

| 引物<br>编号 | 上游引物                 |         |            | 下游引物                 |             |            |
|----------|----------------------|---------|------------|----------------------|-------------|------------|
|          | 序列信息(5'-3')          | 温度(° C) | 长度<br>(bp) | 序列信息(5'-3')          | 温度<br>(° C) | 长度<br>(bp) |
| P165     | AGGTTTGGATTAGGATCGGC | 60.29   | 20         | GCCTTCAGTCCCTCACTCAA | 60.39       | 20         |
| P181     | CTTCCAATCCGCATTGACTT | 60.07   | 20         | CTGAAACCCAACCTCGTCAT | 59.97       | 20         |

附 录 D  
(资料性)  
参照品种等位变异位点

表D.1 参照品种等位变异位点

| 引物编号 | 等位变异范围 (bp) | 等位变异 (bp)                        | 参照品种名称  | 参照品种基因型数据 |
|------|-------------|----------------------------------|---|-----------|
| P14  | 140-150     | 140bp                            | M2, M8, M9, M20, M78, M120, M124, M127, M178, M183, M189, M221, M267, M478, M899, M908                              | 150/150   |
|      |             | 150bp                            | 奇苏 3 号, 奇苏 2 号, M21, M40, M88, M95, M97   | 140/140   |
| P16  | 110-145     | 145bp                            | M40   | 145/160   |
|      |             | 155bp                            | 奇苏 3 号, M2, M8, M9, M127, M178, M183, M189, M221, M478, M899, M908  | 155/160   |
|      |             | 160bp                            | 奇苏 2 号, M20, M21, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M267  | 160/160   |
| P19  | 110-120     | 110bp                            | 奇苏 2 号, M2, M8, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M127, M178, M221, M899                           | 110/115   |
|      |             | 112bp                            | M183  | 115/115   |
|      |             | 115bp                            | 奇苏 3 号  | 112/115   |
|      |             | 120bp                            | M189, M478, M908  | 115/120   |
| P25  | 195-222     | 195bp                            | 奇苏 3 号, 奇苏 2 号, M9, M20, M21, M40, M88, M95, M97, M127, M221, M267  | 195/200   |
|      |             | 200bp                            |   |           |
|      |             | 220bp                            | M8, M178, M183, M478, M899  | 200/220   |
|      |             | 222bp                            | M2, M78, M124, M189, M908   | 200/222   |
| P26  | 275-280     | 275bp                            | 奇苏 3 号, 奇苏号, M20, M21, M40, M88, M95, M97, M120, M127, M267   | 275/280   |
|      |             | 280bp                            | M2, M8, M9, M78, M124, M178, M183, M189, M221, M478, M899, M908   | 280/280   |
| P31  | 280-300     | 280bp<br>285bp<br>290bp<br>300bp | 奇苏 2 号, M2, M21, M40, M78, M88, M97, M120, M183, M267   | 280/285   |
|      |             |                                  | M9, M890  | 280/300   |
|      |             |                                  | M189  | 280/290   |
|      |             |                                  | M124, M221  | 285/285   |
|      |             |                                  | 奇苏 3 号, M20, M95  | 285/290   |
|      |             |                                  | M8, M478, M899  | 285/300   |
|      |             |                                  | M127, M128  | 290/300   |
| P32  | 270-275     | 270bp                            | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M2, M8, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M178, M189, M221, M267, M478, M899, M908 | 270/270   |
|      |             | 275bp                            | M127, M183  | 275/275   |

表D.1 参照品种等位变异位点（续）

| 引物编号 | 等位变异范围 (bp) | 等位变异 (bp) | 参照品种名称  | 参照品种基因型数据 |
|------|-------------|-----------|---|-----------|
| P33  | 250-260     | 250bp     | M2, M8, M178, M183, M189, M478, M899, M908  | 250/260   |
|      |             | 255bp     | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M12, M124, M127, M221                        | 255/260   |
|      |             | 260bp     |   |           |
| P40  | 170-185     | 170bp     | 奇苏 2 号, M2, M9, M21, M78, M124, M221  | 170/175   |
|      |             | 175bp     | 奇苏 3 号, M8, M20, M40, M88, M95, M97, M178, M183, M189, M267, M478, M899, M908                       | 170/185   |
|      |             | 185bp     | M127  | 175/175   |
| P51  | 105-115     | 105bp     | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M127, M183, M189                     | 105/110   |
|      |             | 110bp     |   |           |
|      |             | 112bp     | M2, M8, M9, M178, M221, M267, M478, M899, M908  | 112/115   |
| P52  | 150-190     | 115bp     |   |           |
|      |             | 150bp     | M2  | 150/173   |
|      |             | 173bp     | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M8, M9, M20, M21, M95, M127, M183, M189   | 150/175   |
| P57  | 150-170     | 175bp     | M40, M88, M97, M120, M178, M221, M899, M908   | 150/180   |
|      |             | 180bp     |   |           |
|      |             | 190bp     | M124, M267, M478  | 150/190   |
| P58  | 135-170     | 135bp     | 奇苏 2 号, M2, M21, M78, M124, M189  | 150/160   |
|      |             |           | M9, M20, M88, M97, M120, M127, M221   | 160/160   |
|      |             |           | M183, M267  | 150/170   |
|      |             |           | M8, M95, M178, M478, M899, M908   | 160/170   |
|      |             |           | 奇苏 3 号  | 170/170   |
| P62  | 120-130     | 160bp     | M127  | 135/135   |
|      |             | 165bp     | M2, M124, M183, M478  | 135/165   |
|      |             | 170bp     | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M8, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M178, M189, M221, M267, M899, M908 | 135/170   |
| P62  | 120-130     | 120bp     | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M2, M8, M9, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M178, M189, M221, M899, M908  | 120/130   |
|      |             | 125bp     |   |           |
|      |             | 127bp     | M127, M183, M267, M478  | 120/127   |
|      |             | 130bp     | M20   | 125/127   |
| P78  | 290-325     | 290bp     | M8, M178, M478, M899  | 290/295   |
|      |             | 295bp     | M2, M9, M21, M40, M88, M97, M120, M127, M183, M189, M908  | 290/320   |
|      |             | 300bp     | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M20, M95, M267  | 290/325   |
|      |             | 320bp     |   |           |
| P89  | 265-280     | 325bp     | M178, M224, M221  | 290/300   |
|      |             | 265bp     | M8, M124, M178, M183, M189  | 265/270   |
|      |             | 270bp     | M9, M127, M267  | 265/280   |
| P89  | 265-280     | 280bp     | 奇苏 2 号, M2, M88, M95, M97, M120, M221   | 280/280   |
|      |             |           |   |           |

表D.1 参照品种等位变异位点（续）

| 引物编号 | 等位变异范围(bp) | 等位变异(bp)   | 参照品种名称   | 参照品种基因型数据 |
|------|------------|--|--|-----------|
| P92  | 245-255    | 245bp  | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M20, M178, M899                                  | 245/250   |
|      |            | 250bp  | M2, M8, M9, M95, M127, M189, M221, M908                          | 250/250   |
|      |            | 255bp  | M21, M40, M78, M88, M97, M120, M124, M183, M267                  | 250/255   |
| P103 | 245-255    | 245bp  | 奇苏 2 号, M2, M8, M9, M178, M899                                   | 245/250   |
|      |            | 250bp  | 奇苏 3 号, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M12,      | 245/255   |
|      |            | 255bp  | M183, M189, M221, M267, M478, M908                               |           |
| P108 | 245-255    | 245bp  | 奇苏 3 号, M2, M8, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97,           | 245/250   |
|      |            | 250bp  | M120, M124, M189, M221, M899, M908                               | 245/255   |
|      |            | 255bp  | 奇苏 2 号, M183, M267, M478   |           |
| P120 | 250-275    | M127   |  | 250/250   |
|      |            | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M2, M9, M21, M95, M120, M127, M567 |  | 250/265   |
|      |            | 250bp  | M20, M124, M478, M899  | 265/270   |
|      |            | 265bp  | M8, M178   | 265/275   |
|      |            | 270bp  | M40  | 265/265   |
|      |            | 275bp  | M183   | 270/270   |
| P122 | 275-300    | M908   |  | 275/275   |
|      |            | 275bp  | M2, M78, M189  | 275/275   |
|      |            | 290bp  | 奇苏 3 号, 奇苏 2 号, M95, M221  | 290/290   |
|      |            | 295bp  | 奇苏 3 号, M9, M21, M40, M97, M120, M124, M127, M178, M183, M267,   | 295/295   |
|      |            | 300bp  | M478, M899, M908   |           |
| P125 | 345-350    | M20  |  | 300/300   |
|      |            | 345bp  | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M20, M21, M78, M95, M127, M221                   | 345/345   |
|      |            | 350bp  | M2, M8, M9, M120, M124, M178, M183, M189, M267, M478, M899, M908 | 345/350   |
| P134 | 260-280    | M40, M88, M97                                      |  | 350/350   |
|      |            | 260bp  | 奇苏 3 号 M2, M9, M21, M40, , M88, M95, M97, M120, M127, M221       | 260/270   |
|      |            | 270bp  | M78, M478  | 260/275   |
|      |            | 275bp  | 奇苏 2 号, M20, M124, M178, M183, M189, M899, M908                  | 260/280   |
|      |            | 280bp  |  |           |

表D.1 参照品种等位变异位点（续）

| 引物编号 | 等位变异范围 (bp) | 等位变异 (bp)   | 参照品种名称   | 参照品种基因型数据 |
|------|-------------|---|--|-----------|
| P151 | 115-135     | 115bp<br>117bp<br>120bp<br>125bp<br>128bp<br>130bp<br>135bp | M124   | 115/115   |
|      |             |   | 奇苏 2 号, M9, M21  | 115/120   |
|      |             |   | M95, M127, M189  | 115/125   |
|      |             |   | 奇苏 2 号   | 120/120   |
|      |             |   | 奇苏 3 号   | 120/128   |
|      |             |   | M40, M88, M97  | 117/125   |
|      |             |   | M20  | 125/128   |
|      |             |   | M221, M478, M908   | 125/130   |
|      |             |   | M178   | 128/128   |
|      |             |   | M2, M78, M120, M267  | 128/130   |
|      |             |   | M899   | 128/135   |
|      |             |   | M183   | 130/135   |
| P158 | 150-185     | 150bp   | M8, M9, M40, M88, M97, M120, M178, M189, M478, M899, M908  | 150/165   |
|      |             | 165bp   | M95, M127, M183  | 150/170   |
|      |             | 170bp   | M21  | 150/175   |
|      |             | 175bp   | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M20, M267  | 150/180   |
|      |             | 180bp   | M2, M78, M124, M221  | 150/185   |
|      |             | 185bp   |  |           |
| P162 | 130-145     | 130bp   | 奇苏 2 号, M2, M20, M21, M40, M88, M97, M120, M221  | 130/132   |
|      |             | 132bp   | M9, M95, M127, M183  | 132/132   |
|      |             | 135bp   | 奇苏 3 号, M124, M267, M908   | 135/135   |
|      |             | 138bp   | M78, M189  | 138/138   |
|      |             | 140bp   | M478   | 140/140   |
|      |             | 145bp   | M178, M899   | 145/145   |
| P163 | 245-260     | 245bp   | M2, M178, M189, M221, M478, M899   | 245/255   |
|      |             | 255bp   | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M95, M97, M120, M124, M127, M183, M267, M908                      | 245/260   |
|      |             | 260bp   |  |           |
| P165 | 190-220     | 190bp<br>200bp<br>210bp<br>220bp                            | M9, M908   | 190/210   |
|      |             |   | M2, M8, M178, M899   | 200/210   |
|      |             |   | 奇苏 3 号, M20, M40, M97, M124, M127, M189, M478  | 200/200   |
|      |             |   | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M21, M78, M95, M120, M221  | 210/210   |
|      |             |   | M183, M267   | 220/220   |
| P181 | 240-245     | 240bp   | M95, M124, M127  | 240/240   |
|      |             | 245bp   | 奇苏 2 号, 奇苏 3 号, M2, M8, M9, M20, M21, M40, M78, M88, M97, M120, M178, M183, M189, M221, M267, M478, M899, M908 | 240/245   |

附 录 E  
(资料性)  
参照品种名单

表E.1 参照品种名单

| 名称      | 种属分类               | 品种类型 | 来源地点  |
|---------|--------------------|------|-------|
| 奇苏 2 号  | Pf var. frutescens | 审定品种 | 中国 贵州 |
| 奇苏 3 号  | Pf var. frutescens | 审定品种 | 中国 贵州 |
| M2 品系   | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 北京 |
| M8 品系   | Pf var. crispa     | 资源   | 韩国    |
| M9 品系   | Pf var. crispa     | 资源   | 中国 贵州 |
| M20 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M21 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M40 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M78 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 河北 |
| M88 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M95 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M97 品系  | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M120 品系 | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 贵州 |
| M124 品系 | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 吉林 |
| M127 品系 | Pf var. frutescens | 资源   | 中国 吉林 |
| M178 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 日本    |
| M183 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 中国 贵州 |
| M189 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 中国 河北 |
| M221 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 日本    |
| M267 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 中国 贵州 |
| M478 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 中国 浙江 |
| M899 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 中国 河北 |
| M908 品系 | Pf var. crispa     | 资源   | 日本    |

