

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4497—2025

苦瓜品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of bitter gourd 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 结果判定与表述 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 10

附录 E(资料性) 参照品种相关信息 12

附录 F(资料性) 引物分组 13

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、华南农业大学、福建省农业科学院、北京市农林科学院蔬菜研究所、中国农业科学院蔬菜花卉研究所、福建田美种业科技有限公司、广东省良种引进服务公司、广东和利农生物种业股份有限公司。

本文件主要起草人：邓超、苏国钊、李媛媛、张凯浙、刘中华、陈宇华、徐振江、张秀杰、马莹雪、庞雪兵、王雨、韩贝贝、武星廷、温常龙、张建、宋江萍、李洪龙、杨光堂、陈木溪。



苦瓜品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)进行苦瓜(*Momordica charantia* 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。

本文件适用于苦瓜品种的 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

苦瓜品种基因组存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同苦瓜品种在同一 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,进而区分不同的苦瓜品种。

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,推荐的荧光标记见附录 D。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 圆底离心管中,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文件。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 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 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 产物电泳

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、无水乙醇依次擦洗 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。操作过程中应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,用水平仪调平。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,灌胶过程中应防止出现气泡。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,用水洗净备用。

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各加入 600 mL 的 1 $\times$ TBE 缓冲液,使其没过电极线。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,还宜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 胶电泳的泳动位置与 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 荧光毛细管电泳

10.4.2.1 PCR 产物样品准备

根据预先确定的引物分组(见附录 F),分别取等体积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:稀释倍数通过荧光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。对于荧光毛细管电泳,通过参照品种消除不同批次或者不同型号 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录为 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 结果判定与表述

11.1 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”。

11.2 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 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,最低分辨率 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, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, 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,(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

试剂配制用水应符合 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 dNTPs 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,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 $\times$ 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 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

序号	引物编号	引物名称	染色体	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
1	KG4	N9	1	ATCCATCCCCACAAGTTGAA	CCATAAGGATATGTTTGCATGG
2	KG51	Bdes_SSr-0097	2	AATGCCAGATGTAATTGCTATGGTG	TACACATCCATACCGCTAGAAGAAG
3	KG2	N5	3	CGTCGCTCTCACAAGAGATAAG	TTTGGTGGAAATCCCCTATT
4	KG41	Bdes_SSr-0064	4	GACTTTTGTCCGATCGAACATAACT	TGGCATCCATTTTGTTCCTTTCA
5	KG20	AVRDC-BG48	4	GCAAAAACACTGTCACCCAC	TTCGCTTCTTCCCTCTTCAT
6	KG16	McSSR20	4	GGAATTCAGGTGAACCTGACG	CCAGGAGGAAGAGGAACGTC
7	KG49	Bdes_SSr-0080	5	TGCTACTTGAACCAATGAGAAGAAAC	TGATTTGTTCTTTCTATGAAAATGTTGT
8	KG23	AVRDC-BG136	6	TCGCAGTCTCATTTCTCAAG	AGTGGCAGAGCGTTTTACCT
9	KG33	Bdes_SSr-0038	6	TCTCGAGGTGGGAGATTTAATCTTC	TTATTTGGTTTCTGATGCGTCTGTC
10	KG30	MC07_92319	7	GCAAATCAAAGAAGCCAAGC	GTAGGGGTTGGGTTGATCCT
11	KG26	MC07_95456	7	TTCTTGAGAGACGGTTGGCT	GATACAAAGAAACGGTGGCG
12	KG18	AVRDC-BG2	8	GAGCACACAGAAAAATTGGGT	TGATCCACTCCCAATCTTAGC
13	KG43	Bdes_SSr-0098	8	TATTTGTATTTGTCCGTCGGAGGG	CGCCATTTCCTGTTTGATTCAATAT
14	KG42	Bdes_SSr-0085	8	ATGGACTCAGAATGAAGTGAAGG	ACTTTGTCTCATAAGAGGGGAGTT
15	KG8	S15	8	GGGTAGTGGAATGATGGGTT	TAGTGTTCCTGAGGGAGG
16	KG22	AVRDC-BG85	8	TGCAACCACTGGGTTCTAA	CACGCCAGTAGCTTCAACAT
17	KG50	Bdes_SSr-0088	9	AAGAAGGTGTACTAGTAGCTCCTCT	CCAAGTGGCATCTTATCAACACATT
18	KG24	MC10_147313	10	CGGCATGAAGAAATGGCTAAT	GGGGTTTTCCCTAATTGAA
19	KG39	Bdes_SSr-0094	11	ACATATTACTTGGTAATTGCTAGACAA	TGAACATTGTTGAGGCACCTAAAAA
20	KG45	Bdes_SSr-0025	11	CCAACAATTATCCACTTGTGCTTCT	GACTTTATTGTGTGGGGACATGAAC

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

序号	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
1	KG4	N9	HEX	91~103	91	碧珠 5 号
					101	广良 900
					103	奇胜小玲珑
2	KG51	Bdcs_Ssr-0097	TAMRA	276~278	276	桂农科 5 号
					278	广良 900
3	KG2	N5	TAMRA	158~166	158	奇胜小玲珑
					162	碧珠 3 号
					164	广良 995
					166	长滑苦瓜
4	KG41	Bdcs_Ssr-0064	HEX	187~196	187	碧珠 5 号
					189	田美 115
					196	奇胜小玲珑
5	KG20	AVRDC-BG48	FAM	97~101	97	奇胜小玲珑
					99	碧珠 5 号
					101	长白苦瓜
6	KG16	McSSR20	HEX	206~215	206	槟城苦瓜
					215	碧珠 5 号
7	KG49	Bdcs_Ssr-0080	ROX	211~214	211	碧珠 5 号
					214	广良 995
8	KG23	AVRDC-BG136	HEX	107~118	107	槟城苦瓜
					118	广良 900
9	KG33	Bdcs_Ssr-0038	HEX	103~105	103	碧珠 5 号
					105	广良 900
10	KG30	MC07_92319	FAM	228~250	228	广良 995
					240	槟城苦瓜
					244	碧珠 5 号
					250	奇胜小玲珑
11	KG26	MC07_95456	ROX	244~258	244	碧珠 5 号
					246	广良 995
					248	利农 9 号
					253	奇胜小玲珑
					258	桂农科 5 号
12	KG18	AVRDC-BG2	HEX	139~158	139	田美 115
					153	碧珠 5 号
					155	广良 900
					158	奇胜小玲珑
13	KG43	Bdcs_Ssr-0098	TAMRA	297~300	297	广良 900
					300	碧珠 3 号
14	KG42	Bdcs_Ssr-0085	ROX	255~257	255	碧珠 5 号
					257	桂农科 5 号

表 D.1 (续)

序号	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
15	KG8	S15	FAM	229~233	229	广良 900
					231	碧珠 3 号
					233	槟城苦瓜
16	KG22	AVRDC-BG85	TAMRA	245~273	245	长滑苦瓜
					256	碧珠 8 号
					265	广良 995
					270	碧珠 5 号
					273	槟城苦瓜
17	KG50	Bdcs_SSr-0088	TAMRA	259~262	259	碧珠 5 号
					262	广良 900
18	KG24	MC10_147313	FAM	230~248	230	碧珠 5 号
					232	广良 900
					234	碧珠 5 号
					238	奇胜小玲珑
					240	长滑苦瓜
					242	利农 9 号
					248	碧珠 3 号
19	KG39	Bdcs_SSr-0094	ROX	273~276	273	广良 900
					276	槟城苦瓜
20	KG45	Bdcs_SSr-0025	FAM	97~99	97	广良 900
					99	碧珠 3 号
注 1:附录 D 中采用的荧光标记仅为示例,采用其他类型荧光标记时,应使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,使用前应确认其等位变异。						

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	品种来源	编号	品种名称	品种来源
1	广良 995	广东省良种引进服务公司	7	奇胜小玲珑	福建省农业科学院
2	碧珠 3 号	广东省良种引进服务公司	8	桂农科 5 号	福建省农业科学院
3	碧珠 5 号	广东省良种引进服务公司	9	槟城苦瓜	农业农村部植物新品种保藏中心
4	碧珠 8 号	广东省良种引进服务公司	10	田美 115	农业农村部植物新品种保藏中心
5	广良 900	广东省良种引进服务公司	11	长滑苦瓜	国家园艺种质资源库
6	利农 9 号	广东和利农生物种业股份有限公司	12	长白苦瓜	国家园艺种质资源库

附 录 F
(资料性)
引 物 分 组

引物分组见表 F. 1。

表 F. 1 引物分组

组别	FAM 标记引物	TAMRA 标记引物	ROX 标记引物	HEX 标记引物
1	KG20(97~101) KG8(229~233)	KG51(276~278)	KG26(244~258)	KG18(139~158)
2	KG45(97~99)	KG43(297~300) KG22(245~273)	KG49(211~214)	KG23(107~118)
3	KG24(230~248)	KG2(158~166)	KG42(255~257)	KG33(103~105) KG16(206~215)
4	KG30(228~250)	KG50(259~262)	KG39(273~276)	KG41(187~196) KG4(91~103)
注 1:括号内是各引物的等位变异范围。 注 2:同组别内引物的扩增产物可以多重电泳。 注 3:可结合引物等位变异范围,更换荧光标记,调整分组。				