



中华人民共和国国家标准

GB/T 39917—2021

主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子 标记检测 稻

Variety genuineness and purity testing of main crops with SSR markers—Rice

2021-04-30 发布

2021-11-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语、定义和缩略语..... 1

 3.1 术语和定义 1

 3.2 缩略语 2

4 总则 2

5 检测方案 2

 5.1 总则 2

 5.2 引物 3

 5.3 检测平台 3

 5.4 样品 3

 5.5 检测条件 4

6 仪器设备、试剂和溶液配制..... 4

 6.1 仪器设备 4

 6.2 试剂 5

 6.3 溶液配制 5

7 真实性检测程序 5

 7.1 引物合成 5

 7.2 DNA 提取 8

 7.3 PCR 扩增 9

 7.4 扩增产物分离 10

 7.5 数据分析 11

8 品种纯度检测程序..... 13

 8.1 DNA 提取 13

 8.2 引物筛选和合成 13

 8.3 PCR 扩增 14

 8.4 扩增产物分离 14

 8.5 数据分析 14

9 结果计算与表示..... 14

 9.1 真实性鉴定 14

 9.2 纯度测定 14

10 结果报告 15

 10.1 真实性鉴定 15

 10.2 纯度测定 15

附录 A (规范性附录) 溶液配制 16

附录 B (资料性附录) 等位基因扩增片段信息 19

表 1 真实性鉴定引物 5

表 2 PCR 扩增反应体系 9

表 3 纯度测定候选引物 13

表 B.1 已知品种主要等位基因扩增片段信息 19



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。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国农作物种子标准化技术委员会(SAC/TC 37) 归口。

本标准起草单位:全国农业技术推广服务中心、中国水稻研究所、农业部农作物种子质量监督检验测试中心(深圳)、中国种子集团有限公司。

本标准主要起草人:徐群、支巨振、魏兴华、刘丰泽、晋芳、邓汉超、董国兴。



主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子 标记检测 稻

1 范围

本标准规定了稻(*Oryza sativa* L.)品种真实性和品种纯度 SSR 分子标记的检测原则、检测方案、检测程序和结果报告。

本标准适用于稻品种真实性验证和真实性身份鉴定,不适用于实质性衍生品种(EDV)和转基因品种的鉴定。

本标准适用于稻常规种、杂交种及其亲本的品种纯度测定。

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 3543.1 农作物种子检验规程 总则

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

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

品种真实性验证 variety verification

与其对应品种名称的标准样品比较,检测证实供检样品品种名称标注是否名副其实。

3.1.2

品种真实性身份鉴定 variety identification

经 SSR 分子标记检测并通过审定品种 SSR 指纹数据比对平台(3.1.4)筛查比较,确定供检样品的真实品种名称。

3.1.3

标准样品 standard sample

国家指定机构保存的经认定代表审定品种特征特性的实物种子样品。

3.1.4

SSR 指纹数据比对平台 SSR fingerprint blast platform

采用 SSR 分子标记的标准化方法对品种标准样品等位基因进行检测,并运用计算机数据库技术和网络信息技术所构建的审定品种分子数据信息的检索比对载体。

3.1.5

参照样品 reference control sample

用于校准检测样品 SSR 等位基因已定义扩增产物片段大小的样品。

3.1.6

引物 primer

一条互补结合在模板 DNA 链上的短单链,能提供 3'-OH 末端作为 DNA 合成的起始点,延伸合成模板 DNA 的互补链。

3.1.7

组合引物 panel

能够组合在一起电泳的,具有不同颜色或相同颜色而扩增产物片段大小不同的荧光标记的一组引物。

3.1.8

等位基因 allele

在一对同源染色体上同一基因座上的一对基因。

注 1: 对于 SSR 检测,等位基因差异以扩增产物片段大小来表示。

注 2: 对于荧光标记引物,扩增产物片段大小是指一个已定义片段大小的区间范围,本标准将之称为 Bin。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: base pair, 碱基对。

CTAB: cetyltrimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵。

DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸。

dNTPs: deoxyribonucleoside triphosphates, 脱氧核苷三磷酸。

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。

SDS: sodium dodecyl sulfate, 十二烷基苯磺酸钠。

SSR: simple sequence repeat, 简单序列重复。

Taq 酶: Taq-DNA polymerase, 耐热 DNA 聚合酶。

4 总则

稻的不同品种,其基因组存在着能够世代稳定遗传的简单序列重复(SSR)的重复次数差异。这种差异可以通过从抽取有代表性的检测样品中提取 DNA,用 SSR 引物进行扩增和电泳,从而通过其扩增产物片段大小不同而加以区分品种。

依据 SSR 检测原理,采用固定数目的 SSR 引物,通过与标准样品比较或与 SSR 指纹数据比对平台比对的方式,对品种真实性进行验证或身份鉴定。真实性验证依据规定数目引物的 SSR 分子标记差异数目而判定,品种真实性身份鉴定依据 SSR 分子标记数目没有差异的原则进行筛查、鉴定而确定。

采用筛选能够准确识别品种异常个体指纹数据或图谱的适宜引物,通过对一定数量检测样品的异常个体数目或百分率的品种纯度估测,从而对其整体的典型一致程度作出评价。

5 检测方案

5.1 总则

对于真实性鉴定和纯度测定,引物、检测平台、样品状况不同,其检测结果准确度、精确度可能有所不同。应依据“适于检测目的”的原则,统筹考虑检测规模和检测能力,择定适宜的引物、检测平台、样品状况,制定相应的检测方案。

在严格控制条件下,合成选择的引物,对检测样品按 DNA 提取、PCR 扩增、电泳、数据分析的程序进行检测。

按规定要求填报检测结果,检验报告应注明检测方案所选择的影响检测结果的关键信息。

5.2 引物

5.2.1 真实性鉴定

5.2.1.1 检测引物数目越多,结果漏检和误判的概率降低,工作量也随之增加,这需要依据检测目的在可接受结果准确率的前提下进行兼顾。经对我国审定通过稻品种进行全面试验后,依据高分辨率、染色体均匀分布等筛选原则,本标准遴选了 48 对作为品种真实性鉴定的检测引物,具体见表 1,并据此构建了已知品种的 SSR 指纹数据比对平台。表 1 引物可分为 I、II 两组,编号 PR01~PR24 为 I 组,编号 PR25~PR48 为 II 组,每组包含 24 对。

5.2.1.2 品种真实性验证强调的是对结果的否定,相对而言对引物数量要求不高,检测允许采用序贯方式。先采用 I 组引物进行检测,若未检测到或检测到可以判定不符结果的差异位点数的,可终止检测。对于采用 I 组引物进行检测,若检测到而未达到可以判定不符结果的差异位点数的,则继续完成 II 组引物的检测。

5.2.1.3 品种真实性身份鉴定强调的是对结果的肯定,在已具备已知审定品种的 SSR 指纹数据比对平台的前提下,通过已知检测信息能够筛查确定至具体品种。为尽量降低误判,检测时会对引物数量要求较高,可采用序贯方式,也可直接采用表 1 的 48 对 SSR 引物进行检测,直至与 SSR 指纹数据比对平台比较后能够确定为止。经比较后仍与已知品种存在没有位点差异而无法得出结论的,允许采用其他能够区分的 SSR 分子标记进行检测。

5.2.2 纯度测定

5.2.2.1 纯度测定要明确所检测的异常个体类型,异常个体的类型不同,所选引物和数目也有所不同,有时还需借助相应父母本的 DNA 指纹数据。杂交种异常个体主要类型为自交、异交、混杂;常规种和杂交亲本种子异常个体为异交、混杂。

5.2.2.2 品种纯度测定所选的引物,应通过检测样品预试验,筛选出能够准确识别该样品品种的异常个体。筛选时还需综合考虑引物的杂合度、DNA 快速提取和多重组合电泳的潜力。筛选结果表明,样品在个别位点存在遗传不稳定状况的可将其剔除,检测样品存在严重遗传不稳定状况的可终止纯度测定。

5.3 检测平台

5.3.1 电泳是检测的关键环节,对于真实性鉴定,可选择采用 PAGE 电泳、毛细管电泳,但应注意 PAGE 电泳检测数据与 SSR 指纹数据比对平台比对困难,难以进行真实性身份鉴定;对于纯度测定,可以采用 PAGE 电泳、毛细管电泳,在选择等位基因扩增片段差异较大的引物前提下也可采用琼脂糖电泳。

5.3.2 对于样品量较大的,可将样品粉碎仪、DNA 自动提取和移液工作站、高通量 PCR 扩增仪、多引物组合的毛细管电泳进行组合,以提高检测的综合效率。

5.3.3 DNA 提取、PCR 扩增、电泳的技术条件要求,在适于检测目的和不影响检测质量的前提下,按照检测平台的要求允许对本标准的规定做适宜的局部改进。

5.4 样品

5.4.1 真实性鉴定

5.4.1.1 送验样品为种子,质量应不低于 30 g 或不少于 1 000 粒。在种子生产基地取样,送验样品可为

稻穗,数量应不低于 10 个(总粒数不少于 1 000 粒)。

注:在种子生产基地取样,送验样品可以为幼苗、叶片等组织或器官,这时注意其检测比对对象。幼苗、叶片的数量至少含有 20 个个体,采用混合样品检测的先单独提取 DNA,再取等量 DNA 混合。

5.4.1.2 从送验样品中分取有代表性的试样,采用混合样或单个个体进行检测。混合样试样来源应至少含有 20 个个体,单个个体试样应至少含有 5 个个体。

5.4.2 纯度测定

5.4.2.1 送验样品为种子,对于常规种、杂交种和亲本种子质量应不低于 30 g 或不少于 1 000 粒。与真实性鉴定同时开展检测的,可以为同一送检样品。

5.4.2.2 从送验样品中分取规定数量的试样,试样采用单个个体进行独立检测。送验样品或试样的抽取、分取应有代表性,符合 GB/T 3543.2 的规定。试样的数量,对于常规种、杂交种,应至少含有 96(适用时可含对照)×2 粒种子;对于杂交亲本种子,应至少含有 96(适用时可含对照)×4 粒种子。

5.5 检测条件

真实性鉴定或纯度测定应在控制的条件下进行,包括但不限于下列条件:

- 种子检验员具备熟悉所使用检测技术的知识和技能;
- 所有仪器与使用的技术相适应,并已经过定期维护、验证和校准;
- 使用适当等级的试剂和灭菌处理的耗材;
- 使用校准影响检测结果评定的适宜参照样品。

6 仪器设备、试剂和溶液配制

6.1 仪器设备

6.1.1 DNA 提取

高速冷冻离心机、水浴锅或金属浴、紫外分光光度计或核酸浓度测定仪、组织研磨仪。

6.1.2 PCR 扩增

PCR 扩增仪。

6.1.3 电泳

6.1.3.1 琼脂糖凝胶电泳

电泳仪、水平电泳槽及制胶附件、凝胶成像系统或紫外透射仪。

6.1.3.2 PAGE 电泳

高压电泳仪、垂直电泳槽及制胶附件、水平摇床、胶片观察灯、凝胶成像系统或数码相机。

6.1.3.3 毛细管电泳

DNA 分析仪。

6.1.4 其他器具

微量移液器、电子天平、高压灭菌锅、磁力搅拌器、微波炉、冰箱、染色盒。

6.2 试剂

6.2.1 DNA 提取

CTAB、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷碱(Tris-base)、盐酸、氢氧化钠、氯化钠。

6.2.2 PCR 扩增

dNTPs、*Taq* 酶、 $10\times$ 缓冲液、矿物油、ddH₂O、引物和 Mg^{2+} 。

6.2.3 电泳

6.2.3.1 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖、核酸染料指示剂(Goldview 或溴化乙锭)。

6.2.3.2 PAGE 电泳

去离子甲酰胺(Formamide)、溴酚蓝(Brph Blue)、二甲苯青 FF、甲叉双丙烯酰胺(Bisacrylamide)、丙烯酰胺(Acrylamide)、硼酸(Boric Acid)、尿素、亲和硅烷(Binding Silane)、疏水硅烷(Repel Silane)、DNA 分子量标准、无水乙醇、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、冰醋酸、乙酸铵、硝酸银、甲醛、氢氧化钠。

6.2.3.3 毛细管电泳

DNA 分析仪专用的丙烯酰胺胶、分子量内标、去离子甲酰胺、电泳缓冲液。

6.3 溶液配制

DNA 提取、PCR 扩增、电泳、银染的溶液按照附录 A 规定的要求进行配制,所用试剂均为分析纯。

试剂配制所用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水的要求,其中银染溶液配制可以使用符合三级要求的水。

7 真实性检测程序

7.1 引物合成

根据真实性验证或身份鉴定的要求,选定表 1 的引物。选用 PAGE 电泳,只需合成普通引物,采用单引物电泳。选用荧光毛细管电泳,需在正向引物的 5' 端标记荧光染料合成引物,采用单引物或组合引物电泳。表 1 标记荧光栏所列的仅作为示例,只适用于某一检测平台使用。

表 1 真实性鉴定引物

编号	引物名称	染色体 (位置 bp)	退火温度 ℃	引物序列(5'—3')	标记 荧光
PR01	RM583	1(8328860)	55	正向:AGATCCATCCCTGTGGAGAG 反向:GCGAACTCGCGTTGTAATC	VIC
PR02	RM424	2(11388913)	55	正向:TTTGTGGCTCACCAGTTGAG 反向:TGGCGCATTTCATGTCATC	NED

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体 (位置 bp)	退火温度 ℃	引物序列(5'—3')	标记 荧光
PR03	RM85	3(36341095)	55	正向:CCAAAGATGAAACCTGGATTG 反向:GCACAAGGTGAGCAGTCC	FAM
PR04	RM471	4(18824828)	55	正向:ACGCACAAGCAGATGATGAG 反向:GGGAGAAGACGAATGTTTGC	VIC
PR05	RM598	5(16751191)	55	正向:GAATCGCACACGTGATGAAC 反向:ATGCGACTGATCGGTACTCC	FAM
PR06	RM190	6(1764740)	55	正向:CTTTGTCTATCTCAAGACAC 反向:TTGCAGATGTTCTTCCTGATG	VIC
PR07	RM336	7(21871337)	55	正向:CTTACAGAGAAACGGCATCG 反向:GCTGGTTTGTTCAGGTTCG	VIC
PR08	RM72	8(6762710)	55	正向:CCGGCGATAAAACAATGAG 反向:GCATCGGTCCTAACTAAGGG	PET
PR09	RM219	9(7887585)	55	正向:CGTCGGATGATGTAAAGCCT 反向:CATATCGGCATTTCGCCTG	FAM
PR10	RM590	10(23043156)	55	正向:CATCTCCGCTCTCCATGC 反向:GGAGTTGGGGTCTTGTTTCG	PET
PR11	RM209	11(17808441)	55	正向:ATATGAGTTGCTGTGCTGCG 反向:CAACTTGCATCCTCCCTCC	VIC
PR12	RM19	12(2432080)	55	正向:CAAAAACAGAGCAGATGAC 反向:CTCAAGATGGACGCCAAGA	PET
PR13	RM1195	1(6153019)	55	正向:ATGGACCACAAACGACCTTC 反向:CGACTCCCTTGTTCTTCTGG	FAM
PR14	RM208	2(35135946)	55	正向:TCTGCAAGCCTTGCTGATG 反向:TAAGTCGATCATTGTGTGGACC	PET
PR15	RM232	3(9754695)	55	正向:CCGGTATCCTTCGATATTGC 反向:CCGACTTTTCCTCCTGACG	PET
PR16	RM119	4(21242569)	67	正向:CATCCCCCTGCTGCTGCTGCTG 反向:CGCCGGATGTGTGGGACTAGCG	PET
PR17	RM267	5(2881434)	55	正向:TGCAGACATAGAGAAGGAAGTG 反向:AGCAACAGCACAACTTGATG	NED
PR18	RM253	6(5425498)	55	正向:TCCTTCAAGAGTGCAAAACC 反向:GCATTGTCATGTCTGAAGCC	PET

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体 (位置 bp)	退火温度 ℃	引物序列(5'—3')	标记 荧光
PR19	RM481	7(2875315)	55	正向:TAGCTAGCCGATTGAATGGC 反向:CTCCACCTCCTATGTTGTTG	FAM
PR20	RM339	8(17942468)	55	正向:GTAATCGATGCTGTGGGAAG 反向:GAGTCATGTGATAGCCGATATG	VIC
PR21	RM316	9(1075107)	55	正向:CTAGTTGGGCATACGATGGC 反向:ACGCTTATATGTTACGTCAAC	VIC
PR22	RM258	10(18014268)	55	正向:TGCTGTATGTAGCTCGCACC 反向:TGGCCTTTAAAGCTGTCTGC	FAM
PR23	RM224	11(27201740)	55	正向:ATCGATCGATCTTCACGAGG 反向:TGCTATAAAAGGCATTCCGG	NED
PR24	RM17	12(26954814)	55	正向:TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC 反向:GGTGATCCTTTCCCATTTC	NED
PR25	RM493	1(12280116)	55	正向:TAGCTCCAACAGGATCGACC 反向:GTACGTAAACGCGGAAGGTG	VIC
PR26	RM561	2(18764122)	55	正向:GAGCTGTTTTGGACTACGGC 反向:GAGTAGCTTTCTCCCACCCC	FAM
PR27	RM8277	3(28805073)	55	正向:AGCACAAGTAGGTGCATTTTC 反向:ATTTGCCTGTGATGTAATAGC	NED
PR28	RM551	4(177078)	55	正向:AGCCCAGACTAGCATGATTG 反向:GAAGGCGAGAAGGATCACAG	FAM
PR29	RM274	5(26848153)	55	正向:CCTCGCTTATGAGAGCTTCG 反向:CTTCTCCATCACTCCCATGG	VIC
PR30	RM176	6(30265439)	67	正向:CGGCTCCCGCTACGACGTCTCC 反向:AGCGATGCGCTGGAAGAGGTGC	FAM
PR31	RM432	7(18958599)	55	正向:TTCTGTCTCACGCTGGATTG 反向:AGCTGCGTACGTGATGAATG	PET
PR32	RM331	8(12294291)	55	正向:GAACCAGAGGACAAAAATGC 反向:CATCATACATTTGCAGCCAG	NED
PR33	OSR28	9(19788251)	55	正向:AGCAGCTATAGCTTAGCTGG 反向:ACTGCACATGAGCAGAGACA	NED
PR34	RM311	10(9747442)	55	正向:TGGTAGTATAGGTACTAAACAT 反向:TCCTATACACATACAAACATAC	VIC

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体 (位置 bp)	退火温度 ℃	引物序列(5'—3')	标记 荧光
PR35	RM21	11(19173027)	55	正向:ACAGTATTCCGTAGGCACGG 反向:GCTCCATGAGGGTGGTAGAG	FAM
PR36	RM3331	12(23460827)	50	正向:CCTCCTCCATGAGCTAATGC 反向:AGGAGGAGCGGATTTCTCTC	VIC
PR37	RM443	1(28339414)	55	正向:GATGGTTTTTCATCGGCTACG 反向:AGTCCCAGAATGTCGTTTCG	VIC
PR38	RM490	1(6676230)	55	正向:ATCTGCACACTGCAAACACC 反向:AGCAAGCAGTGCTTTCAGAG	FAM
PR39	RM71	2(8760537)	55	正向:CTAGAGGCGAAAACGAGATG 反向:GGGTGGGCGAGGTAATAATG	FAM
PR40	RM423	2(3836866)	55	正向:AGCACCCATGCCTTATGTTG 反向:CCTTTTTCAGTAGCCCTCCC	FAM
PR41	RM571	3(33150557)	55	正向:GGAGGTGAAAGCGAATCATG 反向:CCTGCTGCTCTTTCATCAGC	FAM
PR42	RM231	3(2453256)	55	正向:CCAGATTATTTCTGAGGTC 反向:CACTGCATAGTTCTGCATTG	PET
PR43	RM567	4(34533716)	55	正向:ATCAGGGAAATCCTGAAGGG 反向:GGAAGGAGCAATCACCCTG	PET
PR44	RM289	5(7807745)	55	正向:TTCCATGGCACACAAGCC 反向:CTGTGCACGAACTTCCAAAG	PET
PR45	RM542	7(12712074)	55	正向:TGAATCAAGCCCCTCACTAC 反向:CTGCAACGAGTAAGGCAGAG	VIC
PR46	RM278	9(19320020)	55	正向:GTAGTGAGCCTAACAATAATC 反向:TCAACTCAGCATCTCTGTCC	NED
PR47	RM332	11(2840361)	55	正向:GCGAAGGCGAAGGTGAAG 反向:CATGAGTGATCTCACTACCC	VIC
PR48	RM7102	12(13211362)	55	正向:TAGGAGTGTTTAGAGTGCCA 反向:TCGGTTTGCTTATACATCAG	PET

7.2 DNA 提取

7.2.1 总则

DNA 提取方法应保证提取的 DNA 质量符合 PCR 扩增的要求,DNA 无降解,溶液的紫外光吸光度 OD_{260} 与 OD_{280} 的比值宜介于 1.8~2.0 之间。

DNA 提取可任选 7.2.2 至 7.2.4 所列的一种方法。其中:CTAB 和试剂盒法提取量大,质量好,可长期保存;SDS 法快速简单,提取量小,质量较好。

7.2.2 CTAB 法

试样为幼苗或叶片,取 200 mg~300 mg 植物组织置于 2.0 mL 离心管,加液氮充分研磨,或直接将叶片剪碎放入 2.0 mL 离心管,每管加入 700 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液,研碎。试样为种子,将其充分磨碎后移入 2.0 mL 离心管,每管加入 700 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液。65 $^{\circ}$ C 水浴 60 min 并多次颠倒混匀。每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)混合液,充分混合后静置 10 min,12 000 r/min 离心 15 min。吸取上清液转移至一新管,加入 2 倍体积预冷的异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 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 TE 缓冲液,充分溶解,检测浓度后备用。

7.2.3 试剂盒法

选用适宜 SSR 分子标记法的商业试剂盒,并经验证合格后使用。DNA 提取方法,按照提供的使用说明进行操作。

7.2.4 SDS 法

取试样的幼苗或叶片置于 2.0 mL 离心管,加液氮充分研磨,或直接将叶片剪碎放入 2.0 mL 离心管,每管加入 700 μ L 的 SDS 提取液,研碎。每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)混合液,12 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液转移至一新管,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,颠倒混匀,12 000 r/min 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 TE 缓冲液,充分溶解,检测浓度后备用。

7.3 PCR 扩增

7.3.1 反应体系

PCR 扩增反应体系的总体积和组分的终浓度参照表 2 进行配量,可以依据试验条件不同做相应调整。表 2 中的缓冲液若含有 $MgCl_2$,不再加 $MgCl_2$ 溶液,加等体积无菌水替代。

表 2 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	体积/ μ L
ddH ₂ O	—	—	4.35
10 $\times$ 缓冲液	10 $\times$	1 $\times$	1
MgCl ₂	25 mmol/L	1.5 mmol/L	0.6
dNTP	2.5 mmol/L ^a	0.2 mmol/L ^a	0.8
Taq 酶	2 U/L	0.05 U/L	0.25
引物	5 mol/L	0.5 mol/L ^a	1
DNA	25 ng/L	2.5 ng/L	1
^a 每一种类的浓度。			

7.3.2 反应程序

反应程序的反应参数可根据 PCR 扩增仪型号、酶、引物等不同而做适当的调整。通常采用下列反

应程序:

- a) 预变性:94 °C,4 min;
 - b) 扩增:94 °C变性 45 s,50 °C~67 °C(根据表 1 的引物设定退火温度)退火 45 s,72 °C延伸 1 min,进行 30 次循环;
 - c) 终延伸:72 °C,8 min。
- 形成的扩增产物于 4 °C 保存。

7.4 扩增产物分离

7.4.1 非变性 PAGE 电泳

7.4.1.1 制胶

在一对玻璃板间插入 1.0 mm 宽的间隔片,将玻璃板对齐夹紧,在封口处注入琼脂糖溶液,让其在 10 min~15 min 凝固密封。在烧杯中依次加入 5 mL 5×TBE 缓冲液,3.75 mL 40%PAGE 胶,搅拌并用双蒸水定容至 25 mL;加入 200 μL 过硫酸铵和 12 μL TEMED,混匀后倒入凝胶板之间,随即插好样品梳,使其在 50 min~60 min 内聚合凝固,凝胶高度应不小于 10 cm。

7.4.1.2 电泳

7.4.1.2.1 去掉封口的琼脂糖胶,将玻璃板固定于垂直电泳槽上,在电泳槽中加入 1×TBE 缓冲液,小心抽出样品梳。在 10 μL PCR 样品中加入 2 μL 6×溴酚蓝-二甲苯青电泳指示剂,混匀,然后向加样孔中点入 1.5 μL;同时,在一侧样品孔中加入分子量标记。电泳选用的电压梯度为 1 V/cm~5 V/cm,一般选用 300 VH~600 VH 条件电泳。

7.4.1.2.2 电泳的适宜时间,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(参见表 B.1)加以确定。二甲苯青指示带在 6.0%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中,所移动的位置与 120 bp 扩增产物泳动的位置大致相当。扩增产物片段大小在(120±50)bp、(220±50)bp 范围的,指示带从上到下应分别到达胶板 1/2、2/3 处后,才可结束电泳。电泳结束后关闭电源,取下玻璃板并轻轻撬开,通常凝胶附着在无凹槽的玻璃板上。

7.4.1.3 染色

将附着凝胶的玻璃板用双蒸水冲洗 30 s~60 s 后,放入染色液中,轻摇 5 min~10 min 进行染色;从染色液中取出,用水快速漂洗,放入显影液中,轻摇至显色出清晰带纹;取出凝胶用双蒸水冲洗两遍,沥干后进行扫描或拍照。

7.4.2 变性 PAGE 电泳

7.4.2.1 制胶

将玻璃板清洗干净,用双蒸水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗两遍,吸水纸擦干。在长板上涂上 0.5 mL 亲和硅烷工作液,带凹槽的短板上涂 0.5 mL 剥离硅烷工作液。操作过程中防止两块玻璃板互相污染。待玻璃板彻底干燥后组装成电泳装置,并用水平仪调平。垫片厚度为 0.4 mm。在 100 mL 6.0%聚丙烯酰胺凝胶中加入新配制的 10%过硫酸铵溶液 500 μL、TEMED 50 μL,迅速混匀后灌胶。待胶液充满玻璃板夹层,将 0.4 mm 厚鲨鱼齿梳子平齐端向里轻轻插入胶液约 0.4 cm。灌胶过程中防止出现气泡。使胶液聚合至少 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。

7.4.2.2 变性

取 10 μL 扩增产物(见 7.3.2),加入 2 μL 6 $\times$ 加样缓冲液,混匀。在 PCR 扩增仪上运行 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,取出立即置于冰上,冷却 10 min 以上后供备用。

7.4.2.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上,向上槽中加入约 800 mL 预热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.5 $\times$ TBE 缓冲液,使其超过凝胶顶部约 3 cm,向下槽中加入 800 mL 1 $\times$ TBE 缓冲液。在 60W 恒功率下,预电泳 10 min~20 min;用移液器吹吸加样槽,清除气泡和杂质。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 3 μL ~5 μL 样品。除检测样品外,还应同时加入参照样品。以 30 V/cm~40 V/cm 的电压电泳,使凝胶温度保持在约 50 $^{\circ}\text{C}$ 。电泳时间的确定执行 7.4.1.2.2 的规定。

7.4.2.4 染色

将附着凝胶的长玻璃板放入固定液中,轻摇 3 min;用水快速漂洗,再取出放入染色液中轻摇 5 min;从染色液中取出后用水快速漂洗,放入预冷的显影液中轻摇至条带清晰,再迅速放入固定液中定影 5 min,取出后用双蒸水中漂洗 1 min;将胶板沥干后,进行扫描或拍照。

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。

7.4.3 荧光毛细管电泳

7.4.3.1 对于稻,SSR 分子标记扩增片段大小范围较窄,可以依据不同仪器选择采用不多于 4 重的组合引物进行电泳。按照预先确定的组合引物,分别取等体积的同一组合引物的不同荧光标记的扩增产物(见 7.3.2),充分混匀。从混合液中吸取 1 μL ,加入 DNA 分析仪专用 96 孔板孔中。各孔再分别加入 0.1 μL 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺,在 PCR 仪上 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,取出立即置于冰上,冷却 10 min 以上。瞬时离心 10 s 后供备用。

7.4.3.2 打开 DNA 分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。

7.4.3.3 将装有样品的微孔板放置于样品架基座上,打开数据收集软件,按照 DNA 分析仪使用手册进行操作。DNA 分析仪将自动运行参数,并保存电泳原始数据文件。

7.5 数据分析

7.5.1 总则

7.5.1.1 为了获得一致的比对结果,电泳结果特别是毛细管电泳,需要通过规定程序进行数据分析。在引物等位基因片段大小范围内(参见表 B.1),对于毛细管电泳,特异峰呈现为稳定的尖锐峰型,纯合位点显示为单峰,杂合位点显示为双峰;对于 PAGE 电泳,特异谱带呈现明显,纯合位点显示为单条,杂合位点显示为双条。

7.5.1.2 对于毛细管电泳,由于引物扩增表现不同、引物不对称扩增、试验条件干扰等因素,可能出现不同状况的峰型,按照以峰高为主、兼顾峰型的原则依据下列规则进行甄别、过滤处置:

- 对于连带(pull-up)峰,即因某一位置某一颜色荧光的峰值较高而引起同一位置其他颜色荧光峰值升高的,应预先将其干扰消除后再进行分析;
- 对于($n+1$)峰,即同一位置出现两个相距 1 bp 左右的峰,应视为单峰;
- 对于连续多峰,即峰高递增或峰高接近的相差一个重复序列的连续多个峰,应视为单峰,取其最右边的峰,峰高值为连续多个峰的叠加值;
- 对于多个特异峰,峰高值应只采集位于前两位的两个峰,不采集其他峰;

e) 对于高低峰,应通过设定一定阈值不予采集低于阈值的峰。

7.5.1.3 对于 PAGE 电泳,位于其相应的等位基因扩增片段大小范围之外的谱带需要甄别是非特异性扩增带还是新增的稀有等位基因谱带。采用单个个体提取的,出现双带以上的多带则可能为非特异性扩增带;采用混合样提取的,某些位点出现三带、强弱带等状况,则需要通过单个个体提取进行甄别。

7.5.1.4 采用混合样检测,无论是毛细管电泳还是 PAGE 电泳,结果表明在引物位点出现异质性而无法识别特异谱带或特异峰的,应采用单个个体独立检测,试样至少含有 20 个个体的数量。若样品在一半以上的引物位点中呈现明显的异质性,可终止真实性鉴定。

7.5.2 数据分析和读取

7.5.2.1 毛细管电泳

导出电泳原始数据文件,采用数据分析软件按照下列步骤进行数据甄别:

- 设置参数:在数据分析软件中预先设置好 panel、分子量内标、panel 的相应引物的 Bin;
- 导入原始数据文件:将电泳原始数据文件导入分析软件,选择 panel、分子量内标、Bin、质量控制参数等进行分析;
- 甄别过滤处置数据:执行 7.5.1 的规定。

分析软件会对检测质量赋以颜色标志进行评分,绿色表示质量可靠无需干预,红色表示质量不过关或未落入 Bin 范围内,黄色表示有疑问需要查验原始图像进行确认。

数据比对采用 7.5.3.1、7.5.3.2 方式的,应分别通过同时进行试验的标准样品、参照样品的(依据引物选择少量的对照),校准不同电泳板间的数据偏差后再读取扩增片段大小。甄别后的特异峰落入 Bin 范围内,直接读取扩增片段大小;若其峰大多不在 Bin 范围内,可将其整体平移尽量使峰落入 Bin 设置范围内后读取数据。

7.5.2.2 PAGE 电泳

对甄别后的特异谱带(见 7.5.1)进行读取。扩增片段大小的读取,统一采用两段式数据记录方式。纯合位点数据记录为 X/X,杂合位点数据记录为 X/Y(其中 X、Y 分别为该位点两个等位基因扩增片段),小片段数据在前,大片段数据在后,缺失位点数据记录为 0/0。

7.5.3 数据比对

7.5.3.1 采用与标准样品比较的,对甄别后的特异谱带(见 7.5.2.2)或特异峰(见 7.5.2.1),按照在同一电泳板上的检测样品与标准样品逐个位点进行两两比较,确定其位点差异。

7.5.3.2 采用毛细管电泳与 SSR 指纹数据比对平台比对的,按照数据导入模板的要求,将数据及其指纹截图上传到 SSR 指纹数据比对平台,进行逐个位点在线比对,核实确定相互间的指纹数据的异同。

7.5.3.3 采用 PAGE 电泳与 SSR 指纹数据比对平台比对的,按照数据导入模板的要求,将数据上传到 SSR 指纹数据比对平台,进行逐个位点的两两比对,核实确定相互间的指纹数据的异同。

注:采用 PAGE 电泳与 SSR 指纹数据比对平台比对较为困难,建议作为参考使用,比对前采取以下措施:

- 读取扩增产物片段大小数据的,检测样品与参照样品的(附录 B)同时在同一电泳板上电泳;
- 电泳时间足够,符合 7.4.1.2.2 的要求;
- 检测样品存在扩增片段差异较小的,按片段大小顺序重新电泳进行复核确定后读取。

7.5.4 数据记录

数据比对后,按照位点存在差异或完全相同、数据缺失、无法判定等情形,记录每个引物的位点状况。

8 品种纯度检测程序

8.1 DNA 提取

DNA 提取可任选 7.2 所列方法。

8.2 引物筛选和合成

8.2.1 针对杂交种品种纯度不同类型异常个体的引物筛选,可参照下列规则进行确定:

- 对于鉴定自交个体,识别特征为该等位基因具有母本而父本缺失,筛选 1 对能检测杂合位点(通常表现为双亲互补带)的引物;
- 对于鉴定异交个体,识别特征为该等位基因具有母本而父本错误,在具备父母本对照或其 SSR 指纹数据的条件下,筛选 2 对以上的引物;
- 对于鉴定混杂个体,识别特征为该等位基因具有父本而母本错误或不具有父母本,在具备父母本对照或其 SSR 指纹数据的条件下,筛选 2 对以上的引物;
- 对于同时鉴定自交、异交、混杂个体或者其中两者的,应综合考虑筛选 3 对以上的引物。

对于常规种和杂交亲本种子纯度测定,鉴定异交个体、混杂个体的,各需筛选 2 对以上的引物。

8.2.2 本标准推荐了 8 对品种纯度测定引物(见表 3),作为优先筛选的候选引物。筛选时,可用至少含 20 粒的小样品进行试验,依据 5.2.2 的要求,确定适宜的引物或引物组合。推荐 8 对引物仍未达到筛选效果的,可选择表 1 另外 40 对引物或其他引物进行筛选。

表 3 纯度测定候选引物

编号	引物	染色体 (位置 bp)	退火温度 ℃	引物序列(5'—3')	标记 荧光
PR07	RM336	7(21871337)	55	正向:CTTACAGAGAAACGGCATCG 反向:GCTGGTTTGTTCAGGTTTCG	VIC
PR09	RM219	9(7887585)	55	正向:CGTCGGATGATGTAAAGCCT 反向:CATATCGGCATTTCGCGCTG	FAM
PR12	RM19	12(2432080)	55	正向:CAAAAACAGAGCAGATGAC 反向:CTCAAGATGGACGCCAAGA	PET
PR13	RM1195	1(6153019)	55	正向:ATGGACCACAAACGACCTTC 反向:CGACTCCCTTGTTCTTCTGG	FAM
PR14	RM208	2(35135946)	55	正向:TCTGCAAGCCTTGTCTGATG 反向:TAAGTCGATCATTGTGTGGACC	PET
PR18	RM253	6(5425498)	55	正向:TCCTTCAAGAGTGCAAAACC 反向:GCATTGTCATGTCTGAAGCC	PET
PR23	RM224	11(27201740)	55	正向:ATCGATCGATCTTCACGAGG 反向:TGCTATAAAAGGCATTCGGG	NED
PR27	RM8277	3(28805073)	55	正向:AGCACAAGTAGGTGCATTTTC 反向:ATTTGCCTGTGATGTAATAGC	NED

8.2.3 选定引物后,按照电泳方法的不同,依据 7.1 要求合成引物。

8.3 PCR 扩增

反应体系和反应程序执行 7.3 的要求,形成扩增产物。

8.4 扩增产物分离

8.4.1 琼脂糖凝胶电泳

8.4.1.1 制胶

按琼脂糖浓度为 2.0% 比例的要求,称取一定量琼脂糖,加入 $1\times$ TAE 电泳缓冲液,混合煮沸溶解。溶液冷却至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入核酸染色剂混匀,倒入已封好的凝胶灌制平台上,插上样品梳。待凝胶完全凝固后,从制胶平台上除去封带,拔出梳子,置入盛有 $1\times$ TAE 电泳缓冲液的电泳槽中,缓冲液液面高出凝胶表面约 1 mm。

8.4.1.2 电泳

取 10 μL 扩增产物(见 8.3),加入 2 μL 核酸染料指示剂,混匀,用微量移液器加到样品孔中。接通电极,在最高电压不超过 5 V/cm(100 V~150 V 恒压电泳)下进行电泳,使扩增产物从负极向正极移动。当溴酚蓝迁移的位置表明已足够分离 DNA 扩增片段时,关闭电源。

8.4.1.3 鉴定

取下凝胶,在凝胶成像系统或紫外投射仪上观察鉴定,并照相保存。

8.4.2 荧光毛细管电泳

荧光毛细管电泳执行 7.4.3 的要求。

8.5 数据分析

通过电泳后呈现的特异谱带(见 8.4.1.3)或特异峰(见 8.4.2),依据 8.2.1 的规则,准确识别该品种正常个体、异常个体指纹图谱或数据,记录每个检测引物位点的信息。

9 结果计算与表示

9.1 真实性鉴定

统计位点差异记录的结果,计算差异位点数,核实差异位点的引物编号。

检测结果用检测样品和标准样品比较的位点差异数目表示,检测结果的容许差距不能大于 2 个等位点。

9.2 纯度测定

检测结果根据检测目的,可使用检测样品的自交个体、其他异常个体数目表示,也可使用正常个体数目(检测试样总数减去异常个体数目)占检测试样总数的百分率表示。

统计与检测样品正常表现不一致的异常个体数,计数个体数目或计算其百分率,检测结果的容许差距应符合 GB/T 3543.1 的要求。

10 结果报告

10.1 真实性鉴定

10.1.1 按照 GB/T 3543.1 的检验报告要求,对品种真实性验证或身份鉴定的检测结果进行填报。

10.1.2 对于真实性验证,选择下列方式之一进行填报:

- a) 通过_____对引物,使用混合样(或单个个体),采用_____电泳方法进行检测,与标准样品比较未能检测出位点差异。
- b) 通过_____对引物,使用混合样(或单个个体),采用_____电泳方法进行检测,与标准样品比较检测出差异位点数_____个,差异位点的引物编号为_____。

10.1.3 对于真实性身份鉴定,采用下列方式进行填报:

通过_____对引物,采用_____电泳方法进行检测,经与 DNA 指纹数据比对平台筛查并鉴定,检测样品属于×××品种,或者属于×××、××××其中的一个。

10.1.4 属于下列情形之一的,需在检验报告中注明:

- 送验样品低于 5.4.1.1 规定数量的;
- 与 DNA 指纹比对平台进行数据比对的;
- 检测样品遗传不稳定严重的位点(引物编号)清单;
- 检测采用了其他 SSR 引物的名称及序列。

10.2 纯度测定

10.2.1 按照 GB/T 3543.1 的检验报告要求,可以选择下列方式之一进行品种纯度检测结果的填报:

- a) 通过编号为_____的引物,检测了_____个个体,采用_____电泳方法,检测出自交个体_____个,其他类型杂株个体_____个。
- b) 通过编号为_____的引物,检测了_____个个体,采用_____电泳方法,检测出自交个体和其他类型杂株个体_____个,品种纯度为_____%。

10.2.2 属于下列情形之一的,需在检验报告中注明:

- 送验样品低于 5.4.2.1 规定数量的;
- 异常个体仅检测自交个体的;
- 检测样品遗传不稳定严重的位点(引物编号)清单;
- 检测采用了其他 SSR 引物的名称及序列。

附 录 A
(规范性附录)
溶 液 配 制

A.1 DNA 提取

A.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 186.1 g 溶于 800 mL 水中,加固体 NaOH 调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,高压灭菌。

A.1.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

Tris 碱 60.55 g 溶于适量水中,加 HCl 调 pH 至 8.0,加水定容至 500 mL,高压灭菌。

A.1.3 0.5 mol/L HCl 溶液

浓盐酸(36%~38%) 25 mL,加水定容至 500 mL。

A.1.4 5 mol/L NaCl 溶液

固体 NaCl 146.0 g 溶于水中,加水定容至 500 mL。

A.1.5 CTAB 提取液

固体 NaCl 81.7 g、CTAB 20.0 g、1 mol/L Tris-HCl 100 mL 和 0.5 mol/L EDTA 40 mL,加水定容至 1 000 mL,高压灭菌,4 ℃贮存。

A.1.6 SDS 提取液

1 mol/L Tris-HCl 50 mL、0.5 mol/L EDTA 40 mL、5 mol/L NaCl 50 mL 和 SDS 7.5 g,加水定容至 500 mL,高压灭菌,4 ℃贮存。

A.1.7 TE 缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 5 mL 和 0.5 mol/L EDTA 1 mL,加 HCl 调 pH 至 8.0,加水定容至 500 mL,高压灭菌,4 ℃贮存。

A.2 PCR 扩增

A.2.1 dNTP

用 TE 缓冲液分别配制 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 终浓度为 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μL 混合,用 120 μL TE 缓冲液定容,配制成每种核苷酸终浓度为 10 mmol/L 的工作液。高压灭菌,−20 ℃贮存。

A.2.2 SSR 引物

用 TE 缓冲液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。

A.2.3 25 mmol/L 氯化镁(MgCl_2)溶液

固体 MgCl_2 1.19 g,加水定容至 500 mL。高压灭菌, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

A.3 电泳

A.3.1 40%PAGE 胶

丙烯酰胺 190.0 g 和甲叉双丙烯酰胺 10.0 g,加水定容至 500 mL。

A.3.2 6.0% PAGE 胶

尿素 400.0 g、 $10\times$ TBE 缓冲液 100 mL 和 40% PAGE 胶 150 mL,加水定容至 1 000 mL。

A.3.3 亲和硅烷缓冲液

无水乙醇 49.75 mL 和冰醋酸 250 μL ,加水定容至 50 mL。

A.3.4 亲和硅烷工作液

亲和硅烷缓冲液 1 mL 和亲和硅烷原液 5 μL 混合。

A.3.5 疏水硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

A.3.6 25%过硫酸铵溶液

0.25 g 过硫酸铵溶于 1 mL 超纯水中。

A.3.7 $10\times$ TBE 缓冲液

Tris 碱 108.0 g、硼酸 55.0 g 和 0.5 mol/L EDTA 37 mL,加水定容至 1 000 mL。

A.3.8 $1\times$ TBE 缓冲液

$10\times$ TBE 缓冲液 500 mL,加水定容至 5 000 mL。

A.3.9 $6\times$ 溴酚蓝-二甲苯青电泳指示剂

溴酚蓝 0.25 g、二甲苯青 FF 0.25 g 和蔗糖 40.0 g,加水定容至 100 mL。

A.3.10 $6\times$ 加样缓冲液

去离子甲酰胺 49 mL、0.5 mol/L EDTA 1 mL、溴酚蓝 0.125 g 和二甲苯青 FF 0.125 g 混合。

A.3.11 $50\times$ TAE 缓冲液

Tris 碱 242 g、冰醋酸 57.1 mL 和 0.05 mol/L EDTA 100 mL,加水定容至 1 000 mL。

A.3.12 $1\times$ TAE 缓冲液

$50\times$ TAE 缓冲液 100 mL,加水定容至 5 000 mL。

A.4 银染溶液

A.4.1 固定液

冰醋酸 100 mL,加水定容至 1 000 mL。

A.4.2 染色液

硝酸银 1.0 g,加水定容至 1 000 mL。

A.4.3 显影液

固体 NaOH 15 g 和甲醛 5 mL,加水定容至 1 000 mL。



附 录 B
(资料性附录)
等位基因扩增片段信息

表 B.1 列出了 48 对引物在已知稻品种中扩增的片段长度范围、主要等位基因扩增片段大小,以及参照样品对应的扩增片段信息。其中参照样品只是列举,考虑到在某一 SSR 位点多个品种存在相同的扩增片段大小,确认某一品种在该位点扩增片段大小与参照样品是相同的,该品种也可替代相应的参照样品。

表 B.1 已知品种主要等位基因扩增片段信息

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR01	RM583	159~198	159	川 7 号	159/159
			162	白芒稻	162/162
			180	金优 1398	180/195
			183		
			186	元子占稻	186/186
			189	天优华占	189/192
			192	协优 084	192/195
			195	IR30	195/195
			198		
PR02	RM424	239~287	239	合江 18	239/239
			248		
			263	金优 1398	263/278
			269		
			272		
			275		
			278	竹云糯	278/278
			281	浙场 9 号	281/281
			284	广陆矮 4 号	284/284
			287	川 7 号	287/287
PR03	RM85	80~104	80	紫香糯	80/80
			89	川 7 号	89/89
			95	安育早 1 号	95/95
			104	齐粒丝苗	104/104
PR04	RM471	102~120	102	元子占稻	102/102
			104	竹云糯	104/104
			106	川 7 号	106/106

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR04	RM471	102~120	108		
			110		
			114	陆川早 1 号	114/114
			116		
			120		
PR05	RM598	153~165	153	金优 1398	153/156
			156	协优 084	156/162
			159		
			162	三香 628	162/162
			165		
PR06	RM190	103~126	103		
			106	川 7 号	106/106
			108	金优 1398	108/122
			112		
			120	竹云糯	120/120
			122	合江 18	122/122
			124	桂花黄	124/124
			126		
PR07	RM336	127~196	127		
			130		
			136	Daelip1	136/136
			139	宜香 101	139/193
			142		
			145	旱轮稻	145/145
			148	合江 18	148/148
			151	陆川早 1 号	151/151
			154	协优 084	154/193
			157	桂花黄	157/157
			160	红壳老来青	160/160
			163	元子占稻	163/163
			166	CPY2199	166/166
			169		
			172		
			175	天优华占	154/175
			193	轮回 01	193/193
			196		

表 B.1（续）

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR08	RM72	151~214	151		
			154	协优 084	154/163
			160	白芒稻	160/160
			163	金优 1398	163/169
			166	紫香糯	166/166
			169	Yumetoiro	169/169
			172	轮回 01	172/172
			175	红壳老来青	175/175
			178	Tsukushiakamochi	178/178
			181		
			184		
			187	CPY2199	187/187
			190	合江 18	190/190
			193	Koshihikari	193/193
			196		
			199	Dasanbyeo	199/199
			202		
			205		
			214		
PR09	RM219	182~248	182		
			184		
			190	CPY2199	190/190
			192	白芒稻	192/192
			194	天优华占	194/214
			196		
			200	Yumetoiro	200/200
			202	桂花黄	202/202
			208		
			214	金优 1398	214/220
			220	IR30	220/220
			232		
			248		

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR10	RM590	130~148	130		
			136	丽水糯	136/136
			139	金优 1398	139/145
			142	中粳 168	142/142
			145	陆川早 1 号	145/145
			148	Yumetoiro	148/148
PR11	RM209	126~162	126	合江 18	126/126
			128		
			130		
			132	金优 1398	132/152
			134		
			144		
			150	CPY2199	150/150
			152	竹云糯	152/152
			154		
			158	川 7 号	158/158
			162		
PR12	RM19	213~252	213		
			216	合江 18	216/216
			219		
			222	昌米 011	222/222
			228	川 7 号	228/228
			237		
			246	金优 1398	246/252
			249	竹云糯	249/249
			252	齐粒丝苗	252/252
PR13	RM1195	138~152	138		
			140	金优 1398	140/148
			142	天优华占	142/146
			144	桂花黄	144/144
			146	浙场 9 号	146/146
			148	丽水糯	148/148
			150	合江 18	150/150
			152	鄂糯 10 号	152/152

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR14	RM208	159~181	159		
			165	竹云糯	165/165
			167	金优 1398	167/179
			171	合江 18	171/171
			175	广陆矮 4 号	175/175
			177		
			179	轮回 01	179/179
			181	紫香糯	181/181
PR15	RM232	138~168	138	Tsukushiakamochi	138/138
			144	金优 1398	144/160
			146		
			150	浙场 9 号	150/150
			152	桂花黄	152/152
			154	川 7 号	154/154
			158	合江 18	158/158
			160	轮回 01	160/160
			162	陆川早 1 号	162/162
			164	矮糯	164/164
			166		
			168		
PR16	RM119	163~172	163		
			166	宜香 101	166/169
			169	轮回 01	169/169
			172	浙场 9 号	172/172
PR17	RM267	138~168	138	元子占稻	138/138
			150	Dasanbyeo	150/150
			154	金优 1398	154/156
			156	浙场 9 号	156/156
			162	矮糯	162/162
			168	川 7 号	168/168
PR18	RM253	117~149	117		
			119		
			123		

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR18	RM253	117~149	127		
			129		
			131	合江 18	131/131
			133	金优 1398	133/141
			135	元子占稻	135/135
			137		
			141	浙场 9 号	141/141
			143		
			145		
			149	旱轮稻	149/149
PR19	RM481	138~189	138		
			141		
			144		
			147	金优 1398	147/162
			150		
			153		
			156		
			159	轮回 01	159/159
			162	陆川早 1 号	162/162
			165	竹云糯	165/165
			168	合江 18	168/168
			171	元子占稻	171/171
			174	川 7 号	174/174
			177		
			180		
			183	浙场 9 号	183/183
			186	广陆矮 4 号	186/186
			189	广粳 2 号	189/189
PR20	RM339	140~182	140	合江 18	140/140
			143	轮回 01	143/143
			146	天优华占	146/158
			149	紫香糯	149/149
			158	陆川早 1 号	158/158

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR20	RM339	140~182	176		
			179		
			182	白芒稻	182/182
PR21	RM316	196~214	196	金优 1398	196/200
			198	轮回 01	198/198
			200	合江 18	200/200
			202	紫香糯	202/202
			204	Yumetoiro	204/204
			214		
PR22	RM258	128~146	128	金优 1398	128/136
			130		
			132	陆川早 1 号	132/132
			136	广陆矮 4 号	136/136
			146	轮回 01	146/146
PR23	RM224	117~159	117		
			120	合江 18	120/120
			123		
			125	元子占稻	125/125
			128	协优 084	128/143
			131	陆川早 1 号	131/131
			134		
			137		
			139		
			143	川 7 号	143/143
			153	金优 1398	153/155
			155	紫香糯	155/155
			157	竹云糯	157/157
			159		
PR24	RM17	159~189	159	协优 084	159/185
			161	CPY2199	161/161
			169	桂花黄	169/169
			171	川 7 号	171/171
			177		

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR24	RM17	159~189	183		
			185	广陆矮 4 号	185/185
			189		
PR25	RM493	212~266	212	元子占稻	212/212
			224	宜香 101	224/239
			233		
			236	金优 1398	236/245
			239	IR30	239/239
			245	轮回 01	245/245
			248	浙场 9 号	248/248
			254		
			263	竹云糯	263/263
			266		
PR26	RM561	181~195	181		
			185	竹云糯	185/185
			187	合江 18	187/187
			191	Dasanbyeon	191/191
			193		
			195	桂花黄	195/195
PR27	RM8277	167~217	167	CPY2199	167/167
			170		
			179		
			182		
			185	浙场 9 号	185/185
			188	金优 1398	188/191
			191	轮回 01	191/191
			194		
			197		
			200	桂花黄	200/200
			203	丹糯 2 号	203/203
			206		
			209	元子占稻	209/209
			212	合江 18	212/212
			215		
			217	川 7 号	217/217

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR28	RM551	166~210	166	宜香 101	166/184
			178		
			182		
			184	竹云糯	184/184
			186		
			188	合江 18	188/188
			190	Daelip1	190/190
			192	元子占稻	192/192
			194	桂花黄	194/194
			196	CPY2199	196/196
			200		
			210	川 7 号	210/210
PR29	RM274	149~162	149	金优 1398	149/162
			159		
			162	竹云糯	162/162
PR30	RM176	127~142	127	协优 084	127/136
			130	川 7 号	130/130
			133	紫香糯	133/133
			136	竹云糯	136/136
PR31	RM432	168~188	168	金优 1398	168/180
			172	Daelip1	172/172
			180	Dasanbyeon	180/180
			188	元子占稻	188/188
PR32	RM331	146~176	146	协优 084	146/173
			152	元子占稻	152/152
			155		
			173	竹云糯	173/173
			176		
PR33	OSR28	133~184	133	金优 1398	133/136
			136	天优华占	136/172
			145		
			148	科砂 1 号	148/148
			160		

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR33	OSR28	133~184	169	红壳老来青	169/169
			172	旱轮稻	172/172
			175		
			178	合江 18	178/178
			181	元子占稻	181/181
			184		
PR34	RM311	160~186	160	桂花黄	160/160
			162	红壳老来青	162/162
			166	元子占稻	166/166
			170	金优 1398	 170/182
			180	Daelip1	180/180
			182	天优华占	182/186
			184		
			186	Yumetoiro	186/186
PR35	RM21	126~168	126		
			128	宜香 101	128/162
			132		
			134	合江 18	134/134
			136		
			138	元子占稻	138/138
			146	陆川早 1 号	146/146
			148	协优 084	148/156
			150		
			152	Daelip1	152/152
			154		
			156	广陆矮 4 号	156/156
			158		
			160	矮糯	160/160
			162		
			164	CPY2199	164/164
			168		

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR36	RM3331	110~150	110	金优 1398	110/122
			114		
			118	昌米 011	118/118
			120		
			122	轮回 01	122/122
			124		
			126	紫香糯	126/126
			128	合江 18	128/128
			130		
			134		
			150	矮糯	150/150
PR37	RM443	119~123	119	竹云糯	119/119
			121	科砂 1 号	121/121
			123	元子占稻	123/123
PR38	RM490	87~105	87	轮回 01	87/87
			89		
			93	天优华占	93/99
			95		
			97	元子占稻	97/97
			99	竹云糯	99/99
			103		
			105	川 7 号	105/105
PR39	RM71	121~214	121	金优 1398	121/139
			139	天优华占	139/148
			142	川 7 号	142/142
			148	CPY2199	148/148
			151	广陆矮 4 号	151/151
			202		
			214		
PR40	RM423	268~304	268	Dasanbyeo	268/268
			271	元子占稻	271/271
			289	陆川早 1 号	289/289
			292		

表 B.1 (续)

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR40	RM423	268~304	298		
			304		
PR41	RM571	178~192	178		
			180	宜香 101	180/184
			184	Dasanbyeon	184/184
			186	元子占稻	186/186
			188	桂花黄	188/188
			190	旱轮稻	190/190
			192	川 7 号	192/192
PR42	RM231	168~194	168		
			170	竹云糯	170/170
			180		
			182		
			184		
			186	金优 1398	186/194
			190	桂花黄	190/190
			192	合江 18	192/192
			194	轮回 01	194/194
PR43	RM567	248~262	248	宜香 101	248/260
			252	旱轮稻	252/252
			254	红壳老来青	254/254
			256	白芒稻	256/256
			258	合江 18	258/258
			260	桂花黄	260/260
			262		
PR44	RM289	88~112	88	合江 18	88/88
			90		
			104		
			106	陆川早 1 号	106/106
			112		
PR45	RM542	88~116	88	矮糯	88/88
			90	宜香 101	90/94
			94		

表 B.1（续）

引物		等位基因扩增片段		参照样品	
编号	名称	范围/bp	片段定义/bp	名称	扩增片段/bp
PR45	RM542	88~116	100		
			102		
			104		
			108	红壳老来青	108/108
			110		
			112	桂花黄	112/112
			114		
			116		
PR46	RM278	128~148	128	宜香 101	128/142
			130		
			132		
			134		
			136	天优华占	136/140
			138	轮回 01	138/138
			140	陆川早 1 号	140/140
			142	广粳 2 号	142/142
			144		
			146		
			148	旱轮稻	148/148
PR47	RM332	158~179	158		
			161	紫香糯	161/161
			164	旱轮稻	164/164
			167	天优华占	167/176
			173		
			176		
			179		
PR48	RM7102	170~190	170	元子占稻	170/170
			173	金优 1398	173/190
			176	宜香 101	176/190
			184	川 7 号	184/184
			190	竹云糯	190/190