



中华人民共和国国家标准

GB/T 39914—2021

主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子 标记检测 玉米

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

2021-04-30 发布

2021-11-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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 8

 7.4 扩增产物分离 9

 7.5 数据分析 10

8 品种纯度检测程序..... 11

 8.1 DNA 提取 11

 8.2 引物筛选和合成 11

 8.3 PCR 扩增 12

 8.4 扩增产物分离 12

 8.5 数据分析 13

9 结果计算与表示..... 13

 9.1 真实性鉴定 13

 9.2 纯度测定 13

10 结果报告 13

10.1 真实性鉴定 13

10.2 纯度测定 14

附录 A（规范性附录） 溶液配制 15

附录 B（资料性附录） 等位基因扩增片段信息 18

表 1 真实性鉴定引物 5

表 2 PCR 扩增反应体系 8

表 3 纯度测定候选引物 12

表 B.1 已知品种主要等位基因扩增片段信息 18



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、北京市农林科学院玉米研究中心、北京市种子管理站。

本标准主要起草人:王风格、支巨振、易红梅、赵建宗、张力科、田红丽、律宝春。



主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子 标记检测 玉米

1 范围

本标准规定了玉米(*Zea mays* 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。

本标准适用于玉米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。

本标准适用于玉米单交种品种纯度测定,自交系、双交种、三交种品种纯度测定可参照执行。

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

玉米的不同品种,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,按照确定的检测平台对检测样品按 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。经对我国审定通过玉米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 40 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 PM01~PM20 为 I 组,编号 PM21~PM40 为 II 组,每组包含 20 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 40 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;自交系异常个体为异交、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,可选择采用变性 PAGE 电泳、毛细管电泳,但应注意变性 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 200 g 或不少于 500 粒。在种子生产基地取样,送验样品可为

果穗,数量应不低于5个(总粒数不少于500粒)。

注:在种子生产基地取样,送验样品可以为幼苗、叶片、苞叶等组织或器官,这时注意其检测比对象。幼苗、叶片或苞叶的数量至少含有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,对于杂交种质量应不低于200 g或不少于500粒;对于自交系质量应不低于400 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,对于杂交种,应至少含有96(适用时可含对照)×2粒种子;对于自交系,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有利于检测正确实施的控制条件下进行,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 毛细管电泳

DNA分析仪。

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 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。

6.1.4 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、 ddH_2O 、引物和 Mg^{2+} 。

6.2.3 电泳

6.2.3.1 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。

6.2.3.2 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 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖、溴酚蓝(Brph Blue)、核酸染色剂(Goldview 或溴化乙锭)。

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。选用变性 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	引物序列(5'—3')	标记荧光
PM01	bnlg439w1	1.03	正向:AGTTGACATCGCCATCTTGGTGAC 反向:GAACAAGCCCTTAGCGGGTTGTC	NED
PM02	umc1335y5	1.06	正向:CCTCGTTACGGTTACGCTGCTG 反向:GATGACCCCGCTTACTTCGTTTATG	PET

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体位置	引物序列(5'—3')	标记荧光
PM03	umc2007y4	2.04	正向:TTACACAACGCAACACGAGGC 反向:GCTATAGGCCGTAGCTTGGTAGACAC	FAM
PM04	bnlg1940k7	2.08	正向:CGTTTAAGAACGGTTGATTGCATTCC 反向:GCCTTTATTTCTCCCTTGCTTGCC	PET
PM05	umc2105k3	3.00	正向:GAAGGGCAATGAATAGAGCCATGAG 反向:ATGGACTCTGTGCGACTTGTACCG	PET
PM06	phi053k2	3.05	正向:CCCTGCCTCTCAGATTCAGAGATTG 反向:TAGGCTGGCTGGAAGTTTGTTC	NED
PM07	phi072k4	4.01	正向:GCTCGTCTCCTCCAGGTCAGG 反向:CGTTGCCCATACATCATGCCTC	VIC
PM08	bnlg2291k4	4.06	正向:GCACACCCGTAGTAGCTGAGACTTG 反向:CATAACCTTGCTCCCAAACCC	VIC
PM09	umc1705w1	5.03	正向:GGAGGTCGTCAGATGGAGTTCG 反向:CACGTACGGCAATGCAGACAAG	VIC
PM10	bnlg2305k4	5.07	正向:CCCCTCTTCCTCAGCACCTTG 反向:CGTCTTGTCTCCGTCCGTGTG	NED
PM11	bnlg161k8	6.00	正向:TCTCAGCTCCTGCTTATTGCTTTTCG 反向:GATGGATGGAGCATGAGCTTGC	VIC
PM12	bnlg1702k1	6.05	正向:GATCCGCATTGTCAAATGACCAC 反向:AGGACACGCCATCGTCATCA	VIC
PM13	umc1545y2	7.00	正向:AATGCCGTTATCATGCGATGC 反向:GCTTGCTGCTTCTTGAATTGCGT	NED
PM14	umc1125y3	7.04	正向:GGATGATGGCGAGGATGATGTC 反向:CCACCAACCCATACCCATACCAG	VIC
PM15	bnlg240k1	8.06	正向:GCAGGTGTCGGGGATTTTCTC 反向:GGAAGTGAAGAACAGAAGGCATTGATAC	PET
PM16	phi080k15	8.08	正向:TGAACCACCCGATGCAACTTG 反向:TTGATGGGCACGATCTCGTAGTC	PET
PM17	phi065k9	9.03	正向:CGCCTTCAAGAATATCCTTGTGCC 反向:GGACCCAGACCAGGTTCCACC	NED
PM18	umc1492y13	9.04	正向:GCGGAAGAGTAGTCGTAGGGCTAGTGTAG 反向:AACCAAGTTCTTCAGACGCTTCAGG	PET
PM19	umc1432y6	10.02	正向:GAGAAATCAAGAGGTGCGAGCATC 反向:GGCCATGATACAGCAAGAAATGATAAGC	PET
PM20	umc1506k12	10.05	正向:GAGGAATGATGTCCGCGAAGAAG 反向:TTCAGTCGAGCGCCCAACAC	FAM
PM21	umc1147y4	1.07	正向:AAGAACAGGACTACATGAGGTGCGATAC 反向:GTTTCCTATGGTACAGTTCTCCCTCGC	NED

表 1 (续)

编号	引物名称	染色体位置	引物序列(5'—3')	标记荧光
PM22	bnlg1671y17	1.10	正向:CCCGACACCTGAGTTGACCTG 反向:CTGGAGGGTGAACAAGAGCAATG	FAM
PM23	phi96100y1	2.00	正向:TTTTGCACGAGCCATCGTATAACG 反向:CCATCTGCTGATCCGAATACCC	FAM
PM24	umc1536k9	2.07	正向:TGATAGGTAGTTAGCATATCCCTGGTATCG 反向:GAGCATAGAAAAAGTTGAGTTAATATGGAGC	NED
PM25	bnlg1520k1	2.09	正向:CACTCTCCCTCTAAAATATCAGACAACACC 反向:GCTTCTGCTGCTGTTTTGTTCTTG	FAM
PM26	umc1489y3	3.07	正向:GCTACCCGCAACCAAGAACTCTTC 反向:GCCTACTCTTGCCGTTTTACTCCTGT	NED
PM27	bnlg490y4	4.04	正向:GGTGTTGGAGTCGCTGGGAAAG 反向:TTCTCAGCCAGTGCCAGCTCTTATTA	NED
PM28	umc1999y3	4.09	正向:GGCCACGTTATTGCTCATTTCG 反向:GCAACAACAAATGGGATCTCCG	FAM
PM29	umc2115k3	5.02	正向:GCACTGGCAACTGTACCCATCG 反向:GGGTTTCACCAACGGGATAGG	VIC
PM30	umc1429y7	5.03	正向:CTTCTCCTCGGCATCATCCAAAC 反向:GGTGGCCCTGTTAATCCTCATCTG	VIC
PM31	bnlg249k2	6.01	正向:GGCAACGGCAATAATCCACAAG 反向:CATCGGCGTTGATTTTCGTCAG	VIC
PM32	phi299852y2	6.07	正向:AGCAAGCAGTAGGTGGAGGAAGG 反向:AGCTGTTGTGGCTCTTTGCCTGT	VIC
PM33	umc2160k3	7.01	正向:TCATTCCCAGAGTGCCTTAACACTG 反向:CTGTGCTCGTGCTTCTCTCTGAGTATT	VIC
PM34	umc1936k4	7.03	正向:GCTTGAGGCGGTTGAGGTATGAG 反向:TGCACAGAATAAACATAGGTAGGTCAGGTC	PET
PM35	bnlg2235y5	8.02	正向:CGCACGGCACGATAGAGGTG 反向:AACTGCTTGCCACTGGTACGGTCT	VIC
PM36	phi233376y1	8.09	正向:CCGGCAGTCGATTACTCCACG 反向:CAGTAGCCCCTCAAGCAAAACATTC	PET
PM37	umc2084w2	9.01	正向:ACTGATCGCGACGAGTTAATTCAAAC 反向:TACCGAAGAACAACGTCATTTACAGC	NED
PM38	umc1231k4	9.05	正向:ACAGAGGAACGACGGGACCAAT 反向:GGCACTCAGCAAAGAGCCAAATTC	FAM
PM39	phi041y6	10.00	正向:CAGCGCCGCAAACTTGTTT 反向:TGGACGCGAACCAGAAACAGAC	PET
PM40	umc2163w3	10.04	正向:CAAGCGGGAATCTGAATCTTTGTTC 反向:CTTCGTACCATCTTCCCTACTTCATTGC	NED

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 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.8~2.0 之间。

DNA 提取可任选 7.2.2 至 7.2.5 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;碱煮法简单快速,提取量小,质量一般,不宜保存。

7.2.2 CTAB 法

取试样的幼苗或叶片 200 mg~300 mg 置于 2.0 mL 离心管,加液氮充分研磨,或取种子充分磨碎后移入 2.0 mL 离心管。每管加入 700 μL 经 65 ℃预热的 CTAB 提取液,充分混合,65 ℃水浴 60 min。期间不时多次轻缓颠倒混匀。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,在 12 000 r/min 离心 15 min 至分相。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 ℃放置 30 min 后在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,加入 70%乙醇,旋转数次后弃去乙醇溶液,并倒立于垫有滤纸的实验台上,室温放置 10 min 以上。加入 100 μL 超纯水或 TE 缓冲液 1,充分溶解后供备用。

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,或切取干种子的胚,置于 1.5 mL 离心管,加入 100 μL 氯仿后研磨,再加入 300 μL SDS 提取液,混匀后在 10 000 r/min 离心 2 min。吸取上清液,转移至预先装有 300 μL 异丙醇和 300 μL 5 mol/L 氯化钠溶液的 1.5 mL 离心管中。待成团后,挑出 DNA,经 70%乙醇洗涤后,加入 200 μL TE 缓冲液 1,充分溶解后供备用。

7.2.5 碱煮法

切取试样干种子的胚,或将种子发芽至幼苗长度达到 3 cm 左右时剪取 1.5 cm 长的幼苗,放入 96 孔深孔板中。每孔加入 150 μL 氢氧化钠提取液,沸水加热 5 min,然后加入 150 μL TE 缓冲液 2,充分溶解后供备用。

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 MgCl₂,不再加 MgCl₂ 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/μL
ddH ₂ O	—	—	12.35
10×缓冲液	10×	1×	2

表 2 (续)

反应组分	原浓度	终浓度	体积/ μL
MgCl_2	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2
dNTP	2.5 mmol/L ^a	0.15 mmol/L ^a	1.2
Taq 酶	5 U/ μL	0.05 U/ μL	0.2
引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$ ^a	0.25
DNA	25 ng/ μL	2.5 ng/ μL	2
^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 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min；
 - b) 扩增：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s，进行 35 次循环；
 - c) 终延伸：72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。
- 形成的扩增产物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。



7.4 扩增产物分离

7.4.1 荧光毛细管电泳

7.4.1.1 对于玉米，SSR 分子标记扩增片段大小范围较广，可以依据不同仪器选择采用不多于 10 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。

7.4.1.2 打开 DNA 分析仪，检查仪器工作状态和试剂状态。

7.4.1.3 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。

7.4.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

7.4.2.1 制胶

沾洗涤灵用清水将玻璃板反复擦洗干净，再用双蒸水、95%乙醇分别擦洗两遍。玻璃板干燥后，将 0.5 mL 亲和硅烷工作液，均匀涂在无凹槽的玻璃板上；将 0.5 mL 疏水硅烷工作液，均匀涂在带凹槽的玻璃板上。操作过程中两块玻璃板分别处理，防止相互污染；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，夹子固定后，用水平仪检测玻璃胶室是否水平；取 100 mL 4.5% PAGE 胶，加入各 100 μL 的 TEMED、25%过硫酸铵，迅速混匀，将胶灌入玻璃胶室，灌胶过程应防止气泡的出现。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。

7.4.2.2 变性

取 20 μL 扩增产物（见 7.3.2），加入 4 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, 4 ℃冷却 10 min 后供备用。

7.4.2.3 电泳

7.4.2.3.1 在电泳正极槽(下槽)加入 $1\times$ TBE 缓冲液 600 mL, 负极槽(上槽)加入经 65 ℃预热的 $1\times$ TBE 缓冲液 600 mL, 拔出样品梳, 在 90 W 恒功率下预电泳 10 min~20 min, 用移液器吹或吸清除加样槽孔气泡和杂质, 插入样品梳(鲨鱼齿朝下)。每一个加样孔点入 5 μ L 样品(见 7.4.2.2), 在 80 W 恒功率下进行电泳。

7.4.2.3.2 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 4.5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 所移动的位置与 150 bp 扩增产物泳动的位置大致相当。扩增产物片段大小在 (150 ± 50) bp、 (250 ± 50) bp、 (350 ± 50) bp 范围的, 指示带从上到下应分别到达胶板 1/2、2/3、3/4 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。

7.4.2.4 染色

将附着凝胶的玻璃板浸入固定液中, 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 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, 轻轻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, 可依据胶板数量和大小调整, 以淹没胶面为准。

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:

- a) 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;
- b) 对于 $(n+1)$ 峰, 即同一位置出现两个相距 1bp 左右的峰, 应视为单峰;
- c) 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;
- d) 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:

- a) 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;
- b) 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;
- c) 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(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 变性 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:

- a) 读取扩增产物片段大小数据的,检测样品与参照样品(附录 B)同时在同一电泳板上电泳;
- b) 电泳时间足够,符合 7.4.2.3.2 的要求;
- c) 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,优先推荐 7.2.5 碱煮法。

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。

对于自交系品种纯度测定,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 32 对引物或其他引物进行筛选。

表 3 纯度测定候选引物

编号	引物名称	染色体位置	引物序列(5'—3')	标记荧光	扩增片段范围/bp	杂合度
PM01	bnlg439w1	1.03	正向:AGTTGACATCGCCATCTTGGTGAC 反向:GAACAAGCCCTTAGCGGGTTGTC	NED	320~368	0.83
PM23	phi96100y1	2.00	正向:TTTTGCACGAGCCATCGTATAACG 反向:CCATCTGCTGATCCGAATACCC	FAM	245~277	0.62
PM08	bnlg2291k4	4.06	正向:GCACACCCGTAGTAGCTGAGACTTG 反向:CATAACCTTGCCCTCCCAAACCC	VIC	261~301	0.81
PM13	umc1545y2	7.00	正向:AATGCCGTTATCATGCGATGC 反向:GCTTGCTGCTTCTTGAATTGCGT	NED	364~404	0.82
PM15	bnlg240k1	8.06	正向:GCAGGTGTCGGGGATTTTCTC 反向:GGAAGTGAAGAACAGAAGGCATTGATAC	PET	190~246	0.83
PM17	phi065k9	9.03	正向:CGCCTTCAAGAATATCCTTGTGCC 反向:GGACCCAGACCAGGTTCACC	NED	166~190	0.78
PM20	umc1506k12	10.05	正向:GAGGAATGATGTCCGCGAAGAAG 反向:TTCAGTCGAGCGCCCAACAC	FAM	221~239	0.74
PM31	bnlg249k2	6.01	正向:GGCAACGGCAATAATCCACAAG 反向:CATCGGCGTTGATTTCGTCAG	VIC	393~413	0.63
注:本表标记荧光栏所列的仅作为示例,只适用于某一检测平台的使用,8 个引物可以进行 8 重组合电泳。						

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×TAE 电泳缓冲液,混合煮沸溶解。

溶液冷却至 60℃,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×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 溴酚蓝,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 DNA 扩增片段已足够分离时,才可结束电泳。

8.4.1.3 鉴定

电泳结束后关闭电源,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 7.4.1 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 的规定,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 个等位位点。

9.2 纯度测定

检测结果根据检测目的,选择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,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,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 XXX 品种,或者属于 XXX、XXXX 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 指纹数据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;
- 检测样品因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

Na₂EDTA · 2H₂O 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 CTAB 提取液

固体 NaOH 81.7 g、CTAB 20 g、1 mol/L Tris-HCl 100 mL 和 0.5 mol/L EDTA 40 mL,加水定容至 1 000 mL,4 ℃贮存。

A.1.5 SDS 提取液

1 mol/L Tris-HCl 50 mL、0.5 mol/L EDTA 50 mL、5 mol/L NaCl 50 mL 和 SDS 7.5 g 混合,加水定容至 500 mL。

A.1.6 NaOH 提取液

固体 NaOH 2 g,加水定容至 500 mL。

A.1.7 TE 缓冲液 1

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。

A.1.8 TE 缓冲液 2

1 mol/L Tris-HCl 5 mL、0.5 mol/L EDTA 1 mL 和 0.5 mol/L HCl 100 mL,加水定容至 500 mL。

A.1.9 5 mol/L NaCl 溶液

固体 NaCl 146g,加水定容至 500 mL。

A.2 PCR 扩增

A.2.1 dNTP

用 TE 缓冲液 1 分别配制 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 终浓度 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μL

混合,用 720 μL TE 缓冲液 1 定容至每种核苷酸终浓度为 2.5 mmol/L 的工作液。

A.2.2 SSR 引物

用 TE 缓冲液 1 分别配制正向引物、反向引物终浓度均为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液,等体积混合成 20 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

A.2.3 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 0.125 g 混合。

A.3 电泳

A.3.1 40%PAGE 胶

丙烯酰胺 190 g 和甲叉双丙烯酰胺 10 g,加水定容至 500 mL。

A.3.2 4.5% PAGE 胶

尿素 450 g、10 $\times$ TBE 缓冲液 100 mL 和 40% PAGE 胶 112.5 mL,加水定容至 1 000 mL。

A.3.3 Bind 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

Bind 缓冲液 1 mL 和 Bind 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 g、硼酸 55 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 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.3.10 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

A.4.1 固定液

100 mL 冰醋酸,加水定容至 1 000 mL。

A.4.2 染色液

硝酸银 2 g,加水定容至 1 000 mL。

A.4.3 显影液

固体 NaOH 30 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 40 对引物在已知玉米品种中扩增的片段长度范围、主要等位基因扩增片段大小与频率,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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM01	bnlg439w1	320~368	320	0.007	绵单 1 号	320/350
			322	0.115	郑单 958	322/354
			325	0.085	农大 108	325/350
			331	0.004		
			335	0.027	桂青贮 1 号	335/350
			339	0.009		
			344	0.078	农华 101	344/350
			346	0.034	辽单 527	322/346
			348	0.028		
			350	0.348	先玉 335	350/350
			352	0.035		
			354	0.14	郑单 958	322/354
			356	0.027		
			358	0.023	蠡玉 16	350/358
			362	0.014	遵糯 1 号	325/362
			366	0.019		
			368	0.009	金玉甜 1 号	344/368
PM02	umc1335y5	234~254	234	0.076	绵单 1 号	234/234
			238	0.074	京玉 7 号	238/238
			240	0.681	浚单 20	240/240
			252	0.161	郑单 958	252/252
			254	0.009	本玉 9 号	254/254

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM03	umc2007y4	238~292	238	0.025	正大 619	238/282
			246	0.085	川单 14	246/250
			248	0.157	郑单 958	248/255
			250	0.094	先玉 335	250/255
			252	0.041		
			255	0.435	郑单 958	248/255
			257	0.009		
			260	0.03	遵糯 1 号	238/260
			264	0.046	蠡玉 16	255/264
			266	0.007		
			271	0.002	屯玉 27	255/270
			273	0.021		
			279	0.005	金玉甜 1 号	252/279
			282	0.005	正大 619	238/282
			284	0.032	兴垦 10	246/284
			288	0.005		
			292	0.002	奥玉 28	284/292
PM04	bnlg1940k7	344~386	344	0.018	正大 619	344/362
			346	0.11	中科 4 号	346/360
			348	0.247	郑单 958	348/362
			350	0.021		
			352	0.051	成单 22	352/362
			354	0.035		
			360	0.269	先玉 335	360/360
			362	0.159	郑单 958	348/362
			364	0.007		
			366	0.004	奥玉 28	360/366
			368	0.004	金海 5 号	360/368
			370	0.002		
			378	0.057	本玉 9 号	352/378
			386	0.018	京科 968	386/386

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM05	umc2105k3	288~335	288	0.018	本玉 9 号	288/317
			290	0.376	郑单 958	290/335
			292	0.233	中科 4 号	292/335
			294	0.049	农华 101	294/317
			300	0.002		
			302	0.019	绵单 1 号	292/302
			305	0.044	万糯 1 号	305/323
			309	0.005		
			317	0.115	先玉 335	290/317
			323	0.085	浚单 20	323/335
			335	0.053	郑单 958	290/335
PM06	phi053k2	333~362	333	0.032	万糯 1 号	333/336
			336	0.39	郑单 958	336/362
			341	0.053	奥玉 28	341/362
			343	0.329	浚单 20	343/362
			357	0.023	正大 619	343/357
			362	0.173	郑单 958	336/362
PM07	phi072k4	410~430	410	0.622	郑单 958	410/410
			416	0.018	正大 619	416/421
			421	0.088	正大 619	416/421
			424	0.049	蠡玉 16	424/430
			427	0.035		
			430	0.187	蠡玉 16	424/430
PM08	bnlg2291k4	364~404	364	0.314	郑单 958	364/380
			374	0.014	金玉甜 1 号	374/376
			376	0.009	金玉甜 1 号	374/376
			378	0.012		
			380	0.175	郑单 958	364/380
			382	0.26	农华 101	382/404
			386	0.012	蠡玉 6 号	386/404
			388	0.002		
			390	0.005	川单 14	390/404
			396	0.021		
			404	0.175	农华 101	382/404

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM09	umc1705w1	269~319	269	0.035	万糯 1 号	269/275
			271	0.016		
			273	0.269	郑单 958	273/275
			275	0.14	郑单 958	273/275
			279	0.034	川单 14	279/301
			289	0.011		
			291	0.021	中科 4 号	273/291
			293	0.005		
			297	0.004	郑加甜 5039	275/297
			299	0.004		
			301	0.228	浚单 20	275/301
			303	0.005		
			311	0.012	京科甜 126	273/311
			319	0.217	先玉 335	319/319
PM10	bnlg2305k4	244~290	244	0.039	中科 4 号	244/268
			248	0.15	郑单 958	248/252
			252	0.283	郑单 958	248/252
			254	0.009	正大 619	248/254
			260	0.06	绵单 1 号	252/260
			262	0.141	成单 22	252/262
			268	0.186	农华 101	252/268
			274	0.027	本玉 9 号	262/274
			281	0.002		
			290	0.104	先玉 335	252/290
PM11	bnlg161k8	154~219	154	0.004	成单 22	154/183
			158	0.064	中科 10	158/181
			165	0.177	农华 101	165/173
			170	0.002		
			173	0.196	郑单 958	173/197
			175	0.018		
			177	0.069	浚单 20	177/197
			179	0.002		
			181	0.064	辽单 527	173/181
			183	0.125	先玉 335	173/183
			185	0.083	成单 19	165/185
			187	0.009		
			189	0.014	金海 5 号	177/189

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM11	bnlg161k8	154~219	191	0.037		
			193	0.002	遵糯 1 号	183/193
			195	0.012		
			197	0.085	郑单 958	173/197
			199	0.012		
			201	0.016	金玉甜 1 号	158/201
			211	0.005	雅玉青贮 04889	158/211
			213	0.002		
			219	0.004	资玉 3 号	219/219
PM12	bnlg1702k1	265~321	265	0.267	先玉 335	265/265
			267	0.099	成单 19	267/305
			269	0.007		
			271	0.012	雅玉青贮 04889	265/271
			273	0.152	浚单 20	273/275
			275	0.147	郑单 958	275/299
			277	0.005	正大 619	277/277
			279	0.046	川单 14	273/279
			281	0.005	兴垦 10	265/281
			283	0.021	金玉甜 1 号	283/289
			287	0.004		
			289	0.002	金玉甜 1 号	283/289
			291	0.065	农华 101	265/291
			299	0.102	郑单 958	275/299
			305	0.06	中科 4 号	275/305
			315	0.002		
			321	0.004	农乐 988	275/321
PM13	umc1545y2	190~246	190	0.148	先玉 335	190/206
			202	0.226	郑单 958	202/212
			206	0.375	先玉 335	190/206
			213	0.177	郑单 958	202/212
			230	0.011		
			246	0.064	农大 108	206/246

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM14	umc1125y3	150~173	150	0.027	川单 14	150/173
			152	0.155	先玉 335	152/173
			154	0.253	郑单 958	154/173
			169	0.168	农大 108	169/173
			173	0.398	郑单 958	154/173
PM15	bnlg240k1	221~239	221	0.216	郑单 958	221/237
			229	0.069	农大 108	229/233
			231	0.08	正大 619	231/237
			233	0.147	农大 108	229/233
			235	0.074	成单 22	231/235
			237	0.376	郑单 958	221/237
			239	0.037	金玉甜 1 号	233/239
PM16	phi080k15	202~228	202	0.032	郑单 958	202/222
			207	0.012		
			212	0.092	中科 4 号	212/212
			217	0.495	先玉 335	217/217
			222	0.217	郑单 958	202/222
			228	0.152	农华 101	217/228
PM17	phi065k9	393~413	393	0.362	郑单 958	393/413
			403	0.005		
			408	0.15	先玉 335	408/413
			413	0.482	郑单 958	393/413
PM18	umc1492y13	273~284	273	0.014	正大 619	273/284
			278	0.843	农华 101	278/284
			284	0.143	农华 101	278/284
PM19	umc1432y6	220~257	220	0.041	农华 101	220/224
			224	0.726	郑单 958	224/240
			226	0.023	遵糯 1 号	220/226
			230	0.062	本玉 9 号	224/230
			240	0.136	郑单 958	224/240
			257	0.012	奥玉 28	224/257

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM20	umc1506k12	166~190	166	0.014	遵糯 1 号	166/166
			169	0.092	川单 14	169/176
			173	0.037	金海 5 号	173/176
			176	0.164	金海 5 号	173/176
			179	0.2	成单 19	179/185
			185	0.373	先玉 335	185/190
			190	0.12	先玉 335	185/190
PM21	umc1147y4	154~168	154	0.804	先玉 335	154/168
			168	0.196	先玉 335	154/168
PM22	bnlg1671y17	175~230	175	0.133	中科 4 号	175/184
			180	0.034		
			184	0.23	郑单 958	184/194
			186	0.041		
			194	0.322	郑单 958	184/194
			207	0.005		
			209	0.009	金海 5 号	194/209
			211	0.081	本玉 9 号	184/211
			213	0.051	中科 10	213/123
			215	0.072	蠡玉 6 号	184/215
			219	0.007		
			230	0.016	金甜 678	230/230
PM23	phi96100y1	245~277	245	0.034	桂青贮 1 号	245/257
			253	0.373	先玉 335	253/266
			257	0.064	蠡玉 16	257/266
			259	0.002		
			262	0.049	农华 101	253/262
			266	0.42	先玉 335	253/266
			273	0.041	金海 5 号	266/273
			277	0.018	鲜玉糯 2 号	253/277
PM24	umc1536k9	216~238	216	0.014	成单 22	216/224
			222	0.398	先玉 335	222/222
			224	0.053	成单 22	216/224
			233	0.38	郑单 958	233/238
			238	0.155	郑单 958	233/238

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM25	bnlg1520k1	160~195	160	0.011	铁单 20	160/173
			165	0.329	郑单 958	165/173
			171	0.012		
			173	0.426	郑单 958	165/173
			175	0.004		
			179	0.041	先玉 335	165/179
			183	0.009		
			187	0.012	正大 619	173/187
			189	0.005		
			191	0.104	农大 108	173/191
			193	0.046		
			195	0.002	川单 14	173/195
PM26	umc1489y3	231~266	231	0.673	农华 101	231/254
			246	0.122	辽单 527	231/246
			254	0.189	农华 101	231/254
			266	0.016	遵糯 1 号	231/266
PM27	bnlg490y4	271~330	271	0.406	先玉 335	271/294
			294	0.203	先玉 335	271/294
			297	0.095	成单 22	297/328
			301	0.018	辽单 527	294/301
			308	0.014		
			328	0.214	郑单 958	328/328
			330	0.049	兴垦 10	294/330
PM28	umc1999y3	176~200	176	0.521	先玉 335	176/197
			182	0.03		
			185	0.007	金玉甜 1 号	185/191
			188	0.004		
			191	0.101	中科 4 号	176/191
			197	0.336	先玉 335	176/197
			200	0.002	郑青贮 1 号	176/200
PM29	umc2115k3	270~293	270	0.222	郑单 958	270/275
			275	0.362	郑单 958	270/275
			279	0.163	农华 101	275/279
			284	0.149	中科 4 号	284/287
			287	0.098	中科 4 号	284/287
			289	0.002		
			293	0.005	成单 19	270/293

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM30	umc1429y7	126~144	126	0.571	先玉 335	126/144
			134	0.115	郑单 958	134/144
			136	0.037		
			144	0.277	郑单 958	134/144
PM31	bnlg249k2	261~301	261	0.005	鄂玉 25	261/265
			263	0.373	先玉 335	263/275
			265	0.129	郑单 958	265/269
			269	0.053	郑单 958	265/269
			275	0.072	先玉 335	263/275
			278	0.078	蠡玉 16	278/297
			280	0.074	川单 14	263/280
			282	0.088	京科 968	275/282
			284	0.016		
			290	0.002	济单 94—2	278/290
			293	0.002		
			297	0.104	浚单 20	269/297
PM32	phi299852y2	210~255	301	0.004	兴垦 10	263/301
			210	0.002	桂青贮 1 号	210/225
			222	0.284	郑单 958	222/228
			225	0.256	农大 108	225/228
			228	0.071	郑单 958	222/228
			234	0.235	先玉 335	234/234
			239	0.055	万糯 1 号	239/239
			246	0.004		
			251	0.048	辽单 527	234/251
PM33	umc2160k3	199~244	255	0.046		
			199	0.009	绵单 1 号	199/205
			205	0.163	郑单 958	205/207
			207	0.277	郑单 958	205/207
			213	0.016		
			215	0.194	先玉 335	207/215
			224	0.011	金玉甜 1 号	224/244
			230	0.011		
			232	0.044	蠡玉 16	232/244

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM33	umc2160k3	199~244	234	0.004		
			236	0.002	京科甜 126	207/236
			242	0.004		
			244	0.267	浚单 20	205/244
PM34	umc1936k4	156~184	156	0.239	先玉 335	156/170
			170	0.606	先玉 335	156/170
			172	0.012		
			174	0.094	正大 619	174/174
			176	0.025		
			178	0.016	济单 94—2	170/178
			180	0.002		
			184	0.005	兴垦 10	170/184
PM35	bnlg2235y5	175~193	175	0.226	农大 108	175/183
			178	0.011		
			180	0.072	先玉 335	180/183
			183	0.431	先玉 335	180/183
			186	0.021		
			188	0.159	郑单 958	188/193
			193	0.08	郑单 958	188/193
PM36	phi233376y1	204~218	204	0.284	郑单 958	204/215
			207	0.228	蠡玉 6 号	204/207
			215	0.353	郑单 958	204/215
			218	0.134	正大 619	215/218
PM37	umc2084w2	185~214	185	0.364	郑单 958	185/206
			193	0.004		
			197	0.3	先玉 335	197/199
			199	0.044	先玉 335	197/199
			206	0.21	郑单 958	185/206
			214	0.078	成单 22	206/214
PM38	umc1231k4	229~275	229	0.004	苏玉糯 8 号	229/261
			261	0.528	郑单 958	261/275
			273	0.004		
			275	0.465	郑单 958	261/275

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	片段频率	名称	扩增片段/bp
PM39	phi041y6	297~324	297	0.011	苏玉糯 8 号	297/305
			305	0.332	郑单 958	305/309
			309	0.349	郑单 958	305/309
			312	0.206	先玉 335	309/312
			316	0.002		
			319	0.005	屯玉 27	312/319
			321	0.051	农大 108	309/321
			324	0.044	蠡玉 6 号	305/324
PM40	umc2163w3	283~332	283	0.406	郑单 958	283/319
			299	0.152	中科 4 号	299/299
			310	0.261	先玉 335	310/332
			319	0.037	郑单 958	283/319
			332	0.144	先玉 335	310/332