

ICS 65.020.01

CCS B 05

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202X

荔枝品种鉴定 SSR 分子标记法

Identification of litchi varieties—SSR marker method

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

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	2
6 主要仪器设备及试剂	2
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	5
附录 A（规范性）主要仪器设备及试剂	6
附录 B（规范性）溶液配制	8
附录 C（规范性）引物及序列	10
附录 D（资料性）引物相关信息	12
附录 E（资料性）参照品种相关信息	16
附录 F（资料性）引物分组	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。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：华南农业大学、农业农村部科技发展中心、广东省农业科学院果树研究所。

本文件主要起草人：徐振江、张秀杰、赵艳、刘洪、方超、严倩、刘海伦、赵杰堂、韩瑞玺、荆若男、闫多子、丁小惠、王京

荔枝品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列（SSR）进行荔枝（*Litchi chinensis* Sonn.）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。

本文件适用于荔枝品种的 DNA 分子数据采集、数据库构建和品种鉴定。

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 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

荔枝基因组存在着大量能够稳定遗传的SSR，不同品种间的同一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，进而区分不同的荔枝品种。

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。构建数据库时，应使用全部引物；品种鉴定时，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

送检样品可为幼苗、叶片、枝条、果皮等组织或器官，每份样品至少随机抽取3个单株，混合分析。当一致性结果较差时，进行单独取样分析。

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700 μ L预热到65 $^{\circ}$ C的CTAB提取液及10 μ L的 β -巯基乙醇，充分混合，65 $^{\circ}$ C水浴45 min~60 min，每隔15 min轻缓颠倒混匀，水浴后每管加入700 μ L的三氯甲烷和异戊醇混合液，轻缓混匀后静置10 min，12 000 g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 g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，通风橱风干，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标准。DNA溶液的紫外吸光度OD₂₆₀与OD₂₈₀的比值宜介于1.7~2.0之间。

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 μL
10 \times 缓冲液(含 MgCl_2)	10 \times	1 \times	1.0
dNTPs	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	0.8
<i>Taq</i> 酶	5 U/ μL	0.05 U/ μL	0.1
正向引物	5 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5
反向引物	5 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5
DNA	25 ng/ μL	2.5 ng/ μL	1.0
双蒸水	-	-	6.1
总体积			10.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，45 ~62 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s，共35个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min，产物4 $^{\circ}\text{C}$ 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、无水乙醇依次擦洗两遍。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，用水平仪检查玻璃胶室是否水平。取100 mL质量分数为6%的变性PAGE胶溶液，加入50 μL 四甲基乙二胺（TEMED）和500 μL 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

NY/T XXXX-202X

在10 μL PCR产物中加入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 $^{\circ}\text{C}$ 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 800V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 μL ~5 μL 样品。除送检样品外，还宜同时加入参照品种扩增产物。1 800V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 μL 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 μL 分子量内标和8.9 μL 去离子甲酰胺，在PCR扩增仪上95 $^{\circ}\text{C}$ 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--。

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

当差异位点数大于等于 2，判定为“不同”；当差异位点数小于 2，判定为“疑同”。

11.2 结果表述

送检样品_____与对照样品_____（或数据库中_____品种）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0.1g和0.01 g。
- A.1.8 微量移液器：规格分别为10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL，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×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 ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, CAS号：115-39-9)。

- A. 2. 17 二甲苯青 ($C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$, CAS号: 2650-17-1)。
- A. 2. 18 甲叉双丙烯酰胺[($H_2C=CHCONH$) $_2$ CH $_2$, CAS号: 110-26-9]。
- A. 2. 19 丙烯酰胺 (C_3H_5NO , CAS号: 79-06-1)。
- A. 2. 20 硼酸 (H_3BO_3 , CAS号: 10043-35-3)。
- A. 2. 21 尿素 (CH_4N_2O , CAS号: 57-13-6)。
- A. 2. 22 亲和硅烷。
- A. 2. 23 二甲基二氯硅烷 ($C_2H_6Cl_2Si$, CAS号: 75-78-5)。
- A. 2. 24 无水乙醇 (C_2H_6O , CAS号: 64-17-5)。
- A. 2. 25 四甲基乙二胺 (TEMED, $C_6H_{16}N_2$, CAS号: 110-18-9)。
- A. 2. 26 过硫酸铵[APS, (NH_4) $_2$ S $_2$ 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标准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 Na₂EDTA·2H₂O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 μmol/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 μmol/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1000 mL烧杯中，加入100 mL 10×TBE缓冲液和150 mL质量分数为40%的丙烯酰胺溶液，定容至1000 mL。

B.3.3 亲和硅烷缓冲液

分别量取99.5 mL无水乙醇和500 μL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 μL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 °C保存（不超过5天）。

B.3.7 10×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×TBE缓冲液

量取50 mL 10 × TBE缓冲液，加水定容至500 mL，混匀。

B.3.9 6×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

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	GLE125	1	AGGAGGACTGAGACGAAGA	CGTAATTCCTCCTTCAACAG
2	stv-lic -07417 -a	1	ACCATTTTCAGTAAACTATGGGTGGTC	CCACACATCAATTCTAAGAAACATATC G
3	GLE186	2	CAATGTCCTACCAACACCTT	GGCAAGAAGTCAAACAAGTC
4	LZ43	2	CACCAATACCACCCCACTAA	GGTGATTCTTGTTCTGCTTC
5	GLE144	3	TCATAACCCCTTGGTTGTAG	AATCTTCAGCAGAGCAAGAG
6	GLE136	4	TTCTATGACCTTGAACCCAC	GATTGTTGTTGTGGCTGTAG
7	stv-lic -04081 -b	4	TCGAAATATGCCAGCCTTATAACC	TGGTCATATTCATGATGTGTCTGC
8	LMLY9	7	CATTATCTTCTTTATTACCA	CACAAGTATTTTCTCTGC
9	LZ49	8	TCATGTACCTGAAAGAAGGC	CTGCAACCACAATCACACAA
10	LMLY7	8	ACCTTCTTGAATAGGATAAAG	TCAGATGAGATAGATTAGAAAGA
11	LZ50	9	GTCAGGTTGGTTCGATGTGTAG	AGCCGCTAGGTCTTTTCTTAGCTG
12	LZ52	9	GCTTGTTAAGGAAAATTGTGGC	GCCTTTTTTTTGGGTCAGCAAC
13	stv-lic -06873 -a	10	TGGTTCATGGAGAATAATAACGAG	GTAGCGCAATGAAACCAAAGAATC
14	stv-lic -07889 -a	10	AGTAGAACCCACCATCTTGGTCTG	CCAAGGTCTGTCTTTCGGATTAG
15	LZ42	11	TAGGGAATGCTGGATACCCT	CATTTTGACTACACCCCACT
16	LCT6	12	CAAACTTACCCGTAATTAGAG	CAAAATAGGGTCCACCTTG
17	LZ-65	13	CAGTGCATTCCAGAAAATCT	GGACTGATCATGAGGAAGAA

表C.1 引物及序列 (续)

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')
18	GLE193	14	GGGTTGACTGTTTCTGGTAA	TCTTCTTGTGGAGGTTCACT
19	LZ-17	14	GCTCTCTTCCTCTTCCAAGG	CGTTTGTGGGCACTTAGAAT
20	stv-lic -00007 -a	15	TCGTCTTAGGGTTTTCTTCTGCTG	CGAACCACCGTATTATTCCATTTC

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

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	参照品种
1	GLE125	HEX	113-125	113	妃子笑
				119	增城挂绿
				123	妃子笑
				125	增城挂绿
2	stv-lic-07417-a	TAMRA	141-165	141	鸭姆笼
				148	妃子笑
				151	胭脂红
				154	妃子笑
				156	鸭姆笼
				162	增城挂绿
				165	巨海1号
3	GLE186	FAM	221-245	221	妃子笑
				230	六月雪
				233	Koloke
				236	红丽人
				239	红丽人
				242	三月红
				245	六月雪
4	LZ43	HEX	177-195	177	义桥蜜荔
				180	糖驳
				183	义桥蜜荔
				186	越州红
				192	增城挂绿
				195	增城挂绿
5	GLE144	HEX	196-224	196	Koloke
				199	Koloke
				202	妃子笑
				208	凤鸡头
				211	青龙荔
				221	妃子笑
				224	青龙荔

表 D.1 引物相关信息 (续)

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	参照品种
6	GLE136	HEX	136-167	136	鸡脆肉
				146	鸡脆肉
				149	红丽人
				155	三月红
				167	红丽人
7	stv-lic-04081 -b	FAM	102-108	102	红丽人
				105	红丽人
				108	禾虾串
8	LMLY9	FAM	87-93	87	三月红
				89	越州红
				91	Koloke
				93	Koloke
9	LZ49	TAMRA	213-233	213	增城挂绿
				216	Koloke
				218	胭脂红
				220	厚叶
				222	妃子笑
				226	厚叶
				228	凤鸡头
				230	三月红
				233	三月红
10	LMLY7	TAMRA	218-242	218	三月红
				220	Koloke
				222	三月红
				224	义桥蜜荔
				226	新兴香荔
				230	凤鸡头
				232	增城挂绿
				234	白皮荔
				236	乒乓球
				238	白皮荔
				240	乒乓球
				242	凤鸡头
11	LZ50	ROX	79-103	79	离娘香
				92	莞香荔
				98	离娘香
				103	三月红

表 D.1 引物相关信息 (续)

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	参照品种
12	LZ52	ROX	127-156	127	妃子笑
				129	南岛无核荔
				133	妃子笑
				135	禾虾串
				137	越州红
				139	新兴香荔
				141	巨海 1 号
				143	南岛无核荔
				146	乒乓球
				152	安良
				154	义桥蜜荔
				156	Koloke
13	stv-lic-06873 -a	FAM	108-115	108	三月红
				111	增城挂绿
				115	三月红
14	stv-lic-07889 -a	TAMRA	120-132	120	三月红
				123	禾虾串
				129	鸡脆肉
				132	鸡脆肉
15	LZ42	HEX	122-127	122	越州红
				126	禾虾串
				127	越州红
16	LCT6	ROX	222-247	222	越州红
				224	越州红
				233	三月红
				239	三月红
				247	中山状元红
17	LZ-65	TAMRA	290-328	290	增城挂绿
				303	三月红
				305	三月红
				307	Koloke
				309	鸡脆肉
				311	Koloke
				328	鸡脆肉

表 D.1 引物相关信息 (续)

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	参照品种
18	GLE193	ROX	157-188	157	妃子笑
				160	东龙蜜荔
				163	红丽人
				165	莞香荔
				168	越州红
				171	Koloke
				174	妃子笑
				177	增城挂绿
				188	莞香荔
19	LZ-17	HEX	142-151	142	莞香荔
				145	越州红
				147	红丽人
				149	越州红
				151	禾虾串
20	stv-lic-00007 -a	FAM	155-165	155	莞香荔
				158	三月红
				160	离娘香
				164	离娘香
				165	增城挂绿
<p>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, 需要用参照品种校正数据。</p> <p>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。</p> <p>注 3: 附录 D 中所列参照品种仅为示例, 与参照品种具有相等等位变异的其他品种也可用作该等位变异的参照品种。</p> <p>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, 使用前需确认其等位变异。</p>					

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	三月红	广东省农业科学院 果树研究所	14	义桥蜜荔	广东省农业科学院 果树研究所
2	新兴香荔	广东省农业科学院 果树研究所	15	胭脂红	广东省农业科学院 果树研究所
3	凤鸡头	广东省农业科学院 果树研究所	16	白皮荔	广东省农业科学院 果树研究所
4	禾虾串	广东省农业科学院 果树研究所	17	巨海1号	广东省农业科学院 果树研究所
5	离娘香	广东省农业科学院 果树研究所	18	厚叶	广东省农业科学院 果树研究所
6	增城挂绿	广东省农业科学院 果树研究所	19	中山状元红	广东省农业科学院 果树研究所
7	六月雪	广东省农业科学院 果树研究所	20	糖驳	广东省农业科学院 果树研究所
8	妃子笑	广东省农业科学院 果树研究所	21	鸭姆笼	广东省农业科学院 果树研究所
9	安良	广东省农业科学院 果树研究所	22	Koloke	广东省农业科学院 果树研究所
10	鸡脆肉	广东省农业科学院 果树研究所	23	莞香荔	农业农村部植物新品种 保藏中心
11	南岛无核荔	广东省农业科学院 果树研究所	24	青龙荔	农业农村部植物新品种 保藏中心
12	东龙蜜荔	广东省农业科学院 果树研究所	25	越州红	农业农村部植物新品种 保藏中心
13	乒乓球	广东省农业科学院 果树研究所	26	红丽人	农业农村部植物新品种 保藏中心

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	HEX 标记引物	ROX 标记引物	FAM 标记引物	TAMRA 标记引物
1	GLE144(196-224) LZ-17(142-151)	GLE193(157-188) LCT6(223-247)	LMLY9(87-94)	LZ-65(290-328)
2	GLE125(113-125)	LZ50(79-103)		stv-lic-07417-a (141-165)
3	LZ42(122-127) LZ43(177-195)	LZ52(127-156)	GLE186(221-245) stv-lic-00007-a (154-165) stv-lic-06873-a (108-115)	LZ49(213-233)
4	GLE136(136-167)		stv-lic-04081-b (102-108)	stv-lic-07889-a (120-132) LMLY7(218-242)
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。				