ICS 67.060
B 25

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1433—2014
代替 NY/T 1433—2007

水稻品种鉴定技术规程　SSR标记法

Protocol for identification of rice varieties—SSR marker method

2014-03-24 发布　　2014-06-01 实施

中华人民共和国农业部　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　原理 …… 1
5　仪器设备及试剂 …… 1
6　溶液配制 …… 1
7　引物信息 …… 1
8　操作程序 …… 1
9　数据记录与统计 …… 3
10　判定方法 …… 4
附录 A（规范性附录）　仪器设备及试剂 …… 5
附录 B（规范性附录）　溶液配制 …… 7
附录 C（规范性附录）　推荐引物 …… 9
附录 D（资料性附录）　参照品种名单 …… 14

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。

本标准为 NY/T 1433—2007《水稻品种鉴定　DNA 指纹方法》的修订版。本标准代替 NY/T 1433—2007 在品种鉴定中参考使用。本标准与 NY/T 1433—2007 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

——推荐引物增加到 48 对。其中，保留了原来 19 对引物，新增了 29 对引物；

——增加了水稻品种 SSR 标记数据记录与统计条目；

——增加了变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测、毛细管电泳荧光检测方法。

本标准由农业部种子管理局提出。

本标准由全国植物新品种测试标准化技术委员会（SAC/TC 277）归口。

本标准起草单位：中国水稻研究所、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人：徐群、魏兴华、庄杰云、吕波、袁筱萍、刘平、张新明、余汉勇、堵苑苑。

本标准历次版本发布情况为：

——NY/T 1433—2007。

水稻品种鉴定技术规程　SSR标记法

1　范围

本标准规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeats，SSR）标记进行水稻（*Oryza sativa* L.）品种鉴定的操作程序、数据记录与统计、判定方法。

本标准适用于水稻品种的SSR指纹数据采集及品种鉴定。

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 4404.1　粮食作物种子　禾谷类

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

GB/T 19557.7　植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南　水稻

3　术语和定义

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，其检测位点多态性高，检测结果重复性好。

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送检样品的等位变异，校正仪器设备的系统误差。

4　原理

由于不同水稻品种遗传组成不同，基因组DNA中简单重复序列的重复次数有差异。这种差异可通过PCR扩增及电泳方法进行检测，从而能够区分不同品种。

5　仪器设备及试剂

见附录A。

6　溶液配制

见附录B。所用试剂均为分析纯。试剂配制用水应符合GB/T 6682规定的一级水的要求，其中银染溶液的配制只需符合三级水的要求。

7　引物信息

见附录C，分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ4组。其他在本文件中未推荐的非连锁引物也可使用。

8　操作程序

8.1　样品准备

试验样品为种子时，其质量应符合 GB 4404.1 中对水稻种子纯度的要求。

种子样品的分样和保存，应符合 GB/T 3543.2 的规定。

每份样品检测 20 个个体（种子、叶片或其他等效物）的混合样。

8.2 DNA 提取

取水稻叶片 2 cm～3 cm 放入研钵中，加入 DNA 提取液 400 μL，研碎，再加入 DNA 提取液 400 μL；移取 500 μL 混合液至 1.5 mL 离心管。或直接将叶片剪碎放入 2.0 mL 离心管中，每管加入 DNA 提取液 500 μL，研碎。向离心管中加入 500 μL 氯仿—异戊醇（24∶1），振荡混匀。10 000 *g* 离心 5 min。将上清液 400 μL 转入另一只 1.5 mL 离心管，加入 800 μL －20℃预冷乙醇沉淀 DNA。10 000 *g*离心 10 min，弃上清液，再用 70%乙醇溶液洗涤 2 遍，自然条件下干燥后，加入 100 μL TE（pH 8.0）溶液溶解 DNA，检测浓度。－20℃保存留用。

注：以上为推荐的 DNA 提取方法。其他能够达到 PCR 扩增质量要求的 DNA 提取方法都适用于本标准。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 引物选择

首先选择附录 C 中Ⅰ组引物进行扩增，当样品间检测出的差异位点数小于 2 时，再选用附录 C 中Ⅱ组引物进行检测；若样品间检测出的累计差异位点数小于 2 时，再依次选用Ⅲ、Ⅳ组引物。

8.3.2 反应体系

10 μL 的反应体积，包括 1 μL 10×PCR 反应缓冲液、0.6 μL 25 mmol/L $MgCl_2$、0.8 μL 2.5 mmol/L dNTP 溶液、1 μL 5 μmol/L 正向引物，1 μL 5 μmol/L 反向引物，0.25 μL 2U/μL Taq DNA 聚合酶，4.35 μL 超纯水，1 μL 样品 DNA。若缓冲液含有 $MgCl_2$，则不再加 $MgCl_2$溶液，以加等体积无菌水替代。

8.3.3 反应程序

94℃预变性 4 min；94℃变性 45 s，50℃～67℃（根据附表 C 的引物设定退火温度）退火 45 s，72℃延伸 1 min，共 30 个循环；72℃延伸 8 min，4℃保存。

8.4 PCR 产物检测

8.4.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测

8.4.1.1 凝胶制备

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。然后在烧杯中依次加入 5 mL 5×TBE 缓冲液，3.75 mL 丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺混合液，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。

8.4.1.2 电泳

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 μLPCR 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。开始电泳，选用的电压梯度为 1 V/cm～5 V/cm，一般电泳 300 VH～600 VH，具体时间可根据待测片段的预计长度、按二甲苯青迁移的时间来推算。

8.4.1.3 银染显色

电泳完毕后关闭电源，取下玻璃板。小心分开两块玻璃板，取下聚丙烯酰胺凝胶，双蒸水冲洗 30 s～60 s，放入染色液中，轻摇 5 min～10 min 进行染色；然后从染色液中取出，用水快速漂洗，放入显影液中，轻摇至显色出清晰带纹，取出用双蒸水冲洗 2 遍，沥干。扫描或拍摄成像。

8.4.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测

8.4.2.1 清洗玻璃板

将玻璃板清洗干净，用双蒸水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗 2 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。

8.4.2.2 组装电泳板

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。

8.4.2.3 制胶

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。

8.4.2.4 预电泳

将胶板安装于电泳槽上，向上槽中加入约 800 mL 预热至 65℃的 0.5×TBE 缓冲液，使其超过凝胶顶部约 3 cm，向下槽中加入 800 mL 1×TBE 缓冲液。在 60 W 恒功率下，预电泳 10 min～20 min。

8.4.2.5 样品制备

在 10 μL PCR 样品中加入 2 μL 6×加样缓冲液，混匀。在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，迅速置于冰上。

8.4.2.6 电泳

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。除待测样品外，还应同时加入参照品种。以 30 V/cm～40 V/cm 的电压电泳，使凝胶温度保持在约 50℃。电泳 1.5 h～2.5 h（电泳时间取决于扩增片段的大小范围）。

8.4.2.7 银染显色

电泳结束后，将凝胶附着的长玻璃板放入固定液中，使固定液没过凝胶，轻摇 20 min～30 min；取出胶板，用双蒸水漂洗 1 次～2 次，每次 2 min；取出放入染色液中，使染色液没过凝胶，轻摇 20 min～30 min；从染色液中取出胶板，用双蒸水快速漂洗，时间不超过 10 s；将胶板放入预冷的显影液中，轻摇至出现清晰带纹；取出后迅速将凝胶放入固定液中定影 5 min；用双蒸水漂洗 1 min。取出后沥干，扫描或拍摄成像。

8.4.3 毛细管电泳荧光检测

8.4.3.1 PCR 产物样品准备

分别取等体积的稀释后的不同荧光标记扩增产物溶液混合，从混合液中吸取 1 μL 加入到 DNA 分析仪专用 96 孔板孔中。板中各孔分别加入 0.1 μL 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。将样品在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，迅速置于冰上，冷却 10 min 以上。瞬时离心 10 s 后置放到 DNA 分析仪上。

8.4.3.2 电泳检测

按照仪器操作手册，编辑样品表，执行运行程序，保存数据。

9 数据记录与统计

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方法，将每个扩增位点的等位变异与相应的参照品种的等位变异片段大小进行比较，确定送检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间或不同型号 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。

纯合位点的基因型数据记录为 X/X，其中 X 为该位点等位变异的大小；杂合位点的基因型数据记录为 X/Y，其中 X、Y 为该位点上两个不同的等位变异。小片段数据在前，大片段数据在后。缺失位点等位变异数据记录为 0/0。

示例 1：

品种“竹云糯”在 RM21 位点上仅扩增出一条 128 bp 的片段，则该品种在该位点上的基因型记录为 128/128。

示例 2：

品种“特优 420”在 RM21 位点上有两个等位变异，大小分别为 147 bp、168 bp，则该品种在该位点上的基因型记录为 147/168。

10 判定方法

当样品间差异位点数≥2，则判定为“不同品种”；当样品间差异位点数＝1，判定为“近似品种”；当样品间差异位点数＝0，判定为“极近似品种或相同品种”。

对于利用附录 C 中 48 对引物仍未检测到≥2 个差异位点数的样品，可按 GB/T 19557.7 的规定进行田间种植鉴定。

附 录 A
（规范性附录）
仪器设备及试剂

A.1 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 普通电泳仪。
A.1.5 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。
A.1.6 高速冷冻离心机：最大离心力不小于 20 000 g。
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 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL，连续可调。
A.1.11 磁力搅拌器。
A.1.12 核酸浓度测定仪或紫外分光光度计。
A.1.13 微波炉。
A.1.14 高压灭菌锅。
A.1.15 酸度计。
A.1.16 普通冰箱。
A.1.17 低温冰箱。
A.1.18 制冰机。
A.1.19 组织破碎仪。
A.1.20 凝胶成像系统或紫外透射仪或照相机。

A.2 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 乙二胺四乙酸二钠。
A.2.6 三羟甲基氨基甲烷。
A.2.7 浓盐酸。
A.2.8 氢氧化钠。
A.2.9 10×PCR 反应缓冲液。

A.2.10 氯化镁。

A.2.11 氯化钠。

A.2.12 4种脱氧核糖核苷酸。

A.2.13 Taq DNA聚合酶。

A.2.14 SSR引物。引物序列见附录C。

A.2.15 石蜡油。

A.2.16 琼脂糖。

A.2.17 DNA分子量标准：DNA片段分布范围至少在50 bp～500 bp，该范围内DNA片段之间大小最小差异不高于100 bp。

A.2.18 去离子甲酰胺。

A.2.19 溴酚蓝。

A.2.20 二甲苯青。

A.2.21 甲叉双丙烯酰胺。

A.2.22 丙烯酰胺。

A.2.23 硼酸。

A.2.24 尿素。

A.2.25 亲和硅烷。

A.2.26 剥离硅烷。

A.2.27 无水乙醇。

A.2.28 四甲基乙二胺。

A.2.29 过硫酸铵。

A.2.30 冰醋酸。

A.2.31 硝酸银。

A.2.32 甲醛。

A.2.33 DNA分析仪用丙烯酰胺胶液。

A.2.34 DNA分析仪用分子量内标LIZ500。

A.2.35 DNA分析仪用光谱校准基质，包括FAM、NED、VIC和PET 4种荧光标记的DNA片段。

A.2.36 DNA分析仪用电泳缓冲液。

附 录 B
（规范性附录）
溶 液 配 制

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA）（pH 8.0）溶液

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠盐（$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$），加入 800 mL 水，再加入 20 g 固体氢氧化钠（NaOH），搅拌。待 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 完全溶解后，冷却至室温。再用 NaOH 准确调 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa（121 ℃）条件下灭菌 20 min。

B.1.2 0.5 mol/L 盐酸（HCl）溶液

量取 25 mL 浓盐酸（36%～38%），加水定容至 500 mL。

B.1.3 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸（Tris-HCl）（pH 8.0）溶液

量取 25 mL 浓盐酸（36%～38%），加水定容至 500 mL 称取 60.55 g 三羟甲基氨基甲烷（Tris 碱），溶于 400 mL 水中，用 0.5 mol/L 盐酸溶液（B.1.2）调 pH 至 8.0，定容至 500 mL，在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

B.1.4 5 mol/L 氯化钠溶液

称取 146 g 氯化钠（NaCl）溶于水中，搅拌，加水定容至 500 mL，在 103.4 kPa（121 ℃）条件下灭菌 20 min。

B.1.5 DNA 提取液

分别称取 15 g 十二烷基苯磺酸钠（SDS），放入烧杯中，分别加入 40 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液（pH 8.0）（B.1.1）、100 mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（pH 8.0）（B.1.3）和 100 mL 氯化钠溶液（B.1.4），再加入 800 mL 水，搅拌溶解，定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa（121 ℃）条件下灭菌 20 min。于 4℃保存。

B.1.6 氯仿—异戊醇（24∶1）

按 24∶1 的比例（$V∶V$）配制混合液。

B.1.7 70%乙醇溶液

取 700 mL 无水乙醇，用水定容至 1 000 mL。

B.1.8 TE 缓冲液

分别量取 5 mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（pH 8.0）（B.1.3）和 1 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液（pH8.0）（B.1.1），定容至 500 mL，在 103.4 kPa（121 ℃）条件下灭菌 20 min。于 4℃保存。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP

用超纯水分别配制 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 4 种脱氧核糖核苷酸终浓度为 100 mmol/L 的储存液。分别量取 4 种储存液 20 μL 混合，用 120 μL 超纯水定容，配制成每种核苷酸终浓度为 10 mmol/L 的工作液。在 103.4 kPa（121 ℃）条件下灭菌 20 min，于－20 ℃保存。

注：可用购买的满足试验要求的商品试剂。

B.2.2 SSR 引物

用超纯水分别配制正向引物和反向引物至浓度为 5 μmol/L 的工作液。

B.2.3 10×PCR 缓冲液

含 500 mmol/L KCl、100 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3）、0.01 % 明胶。在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min，于−20℃保存。

B.2.4 氯化镁（$MgCl_2$）溶液

称取氯化镁 1.19 g，用超纯水溶解，定容至 500 mL，配制成 25 mmol/L 的工作液。在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min，于−20℃保存。

B.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 40%丙烯酰胺溶液

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 10%过硫酸铵溶液

称取 1.0 g 过硫酸铵，溶于 10 mL 水中，混匀。于 4℃保存。

B.3.3 10×TBE 缓冲液

分别称取三羟甲基氨基甲烷（Tris 碱）108 g 和硼酸 55 g，溶于 800 mL 水中，加入 37 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液（pH 8.0）（B.1.3），定容至 1 000 mL。

B.3.4 1×TBE 缓冲液

量取 10×TBE 缓冲液 500 mL，加水定容至 5 000 mL。

B.3.5 6×加样缓冲液

分别称取 0.25 g 溴酚蓝和 0.25 g 二甲苯青，分别加入 98 mL 去离子甲酰胺和 1 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液（pH 8.0），搅拌溶解。

B.3.6 6%变性聚丙烯酰胺胶溶液

称取尿素 420 g，用水溶解，加入 10×TBE 缓冲液 100 mL、40%丙烯酰胺溶液 150 mL，定容至 1 000 mL。

B.3.7 亲和硅烷缓冲液

分别量取 49.75 mL 无水乙醇和 250 μL 冰醋酸，用水定容至 50 mL。

B.3.8 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.3.9 剥离硅烷工作液

在 98 mL 的三氯甲烷溶液中加 2 mL 二甲基二氯硅烷溶液，混匀。

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 g 硝酸银，加水溶解，定容至 1 000 mL。

B.4.3 显影液

量取 1 000 mL 水，加入 10 g 氢氧化钠和 5 mL 甲醛，混匀。

附 录 C
（规范性附录）
推 荐 引 物

推荐引物见表 C.1。

表 C.1 推荐引物

编号	引物	染色体	引物组别	退火温度 ℃	引物序列（5′→3′）	荧光	常见等位变异，bp	参照品种
A01	RM583	1	I	55	正向：agatccatccctgtggagag 反向：gcgaactcgcgttgtaatc	VIC	180 189 192 195	陆川早 1 号 合江 18 竹云糯 IR 30
A02	RM71	2	I	55	正向：ctagaggcgaaaacgagatg 反向：gggtgggcgaggtaataatg	FAM	122 139 148	合江 18 Dasanbyeo CPY 2199
A03	RM85	3	I	55	正向：ccaaagatgaaacctggattg 反向：gcacaaggtgagcagtcc	FAM	80 95 104	紫香糯 安育早 1 号 齐粒丝苗
A04	RM471	4	I	55	正向：acgcacaagcagatgatgag 反向：gggagaagacgaatgtttgc	VIC	102 104 114	元子占稻 竹云糯 陆川早 1 号
A05	RM274	5	I	55	正向：cctcgcttatgagagcttcg 反向：cttctccatcactcccatgg	VIC	149 162	元子占稻 竹云糯
A06	RM190	6	I	55	正向：ctttgtctatctcaagacac 反向：ttgcagatgttcttcctgatg	VIC	109 120 122	广陆矮 4 号 竹云糯 合江 18
A07	RM336	7	I	55	正向：cttacagagaaacggcatcg 反向：gctggtttgtttcaggttcg	VIC	151 154 160 163 166 193	陆川早 1 号 竹云糯 红壳老来青 元子占稻 CPY 2199 轮回 01
A08	RM72	8	I	55	正向：ccggcgataaaacaatgag 反向：gcatcggtcctaactaaggg	PET	163 175 178 190 193	广陆矮 4 号 红壳老来青 Tsukushiakamochi 合江 18 Koshihikari
A09	RM219	9	I	55	正向：cgtcggatgatgtaaagcct 反向：catatcggcattcgcctg	FAM	194 200 202 215 222	合江 18 Yumetoiro 桂花黄 陆川早 1 号 IR 30
A10	RM311	10	I	55	正向：tggtagtataggtactaaacat 反向：tcctatacacatacaaacatac	VIC	160 166 170 182	桂花黄 元子占稻 陆川早 1 号 Dasanbyeo

表 C.1 （续）

编号	引物	染色体	引物组别	退火温度 ℃	引物序列（5′→3′）	荧光	常见等位变异，bp	参照品种
A11	RM209	11	Ⅰ	55	正向：atatgagttgctgtcgtgcg 反向：caacttgcatcctcccctcc	VIC	125 132 151 153 160	合江 18 矮糯 CPY 2199 竹云糯 川 7 号
A12	RM19	12	Ⅰ	55	正向：caaaaacagagcagatgac 反向：ctcaagatggacgccaaga	PET	216 247 250 253	合江 18 Dasanbyeo 竹云糯 齐粒丝苗
B01	RM1195	1	Ⅱ	55	正向：atggaccacaaacgaccttc 反向：cgactcccttgttcttctgg	FAM	142 144 146 148 150 152	佳辐占 桂花黄 浙场 9 号 丽水糯 合江 18 鄂糯 10 号
B02	RM208	2	Ⅱ	55	正向：tctgcaagccttgtctgatg 反向：taagtcgatcattgtgtggacc	PET	167 172 175 180 182	元子占稻 合江 18 广陆矮 4 号 轮回 01 紫香糯
B03	RM232	3	Ⅱ	55	正向：ccggtatccttcgatattgc 反向：ccgacttttcctcctgacg	PET	141 150 156 159 161	昌米 011 桂花黄 合江 18 轮回 01 陆川早 1 号
B04	RM119	4	Ⅱ	67	正向：catccccctgctgctgctgctg 反向：cgccggatgtgtgggactagcg	PET	166 169	竹云糯 轮回 01
B05	RM267	5	Ⅱ	55	正向：tgcagacatagagaaggaagtg 反向：agcaacagcacaacttgatg	NED	138 154 156	元子占稻 陆川早 1 号 浙场 9 号
B06	RM253	6	Ⅱ	55	正向：tccttcaagagtgcaaaacc 反向：gcattgtcatgtcgaagcc	PET	133 135 142	陆川早 1 号 元子占稻 浙场 9 号
B07	RM481	7	Ⅱ	55	正向：tagctagccgattgaatggc 反向：ctccacctcctatgttgttg	FAM	146 162 165	IR 30 陆川早 1 号 竹云糯
B08	RM339	8	Ⅱ	55	正向：gtaatcgatgctgtgggaag 反向：gagtcatgtgatagccgatatg	VIC	140 146 158	合江 18 竹云糯 陆川早 1 号
B09	RM278	9	Ⅱ	55	正向：gtagtgagcctaacaataatc 反向：tcaactcagcatctctgtcc	NED	128 138 140 142	元子占稻 轮回 01 陆川早 1 号 广籼 2 号
B10	RM258	10	Ⅱ	55	正向：tgctgtatgtagctcgcacc 反向：tggcctttaaagctgtcgc	FAM	128 132 136 146	元子占稻 陆川早 1 号 广陆矮 4 号 轮回 01

表 C.1 （续）

编号	引物	染色体	引物组别	退火温度 ℃	引物序列（5′→3′）	荧光	常见等位变异 bp	参照品种
B11	RM224	11	Ⅱ	55	正向：atcgatcgatcttcacgagg 反向：tgctataaaaggcattcggg	NED	120 128 131 143 153 155 157	合江 18 早籼 276 陆川早 1 号 川 7 号 矮糯 紫香糯 竹云糯
B12	RM17	12	Ⅱ	55	正向：tgccctgttatttttcttctctc 反向：ggtgatcctttcccatttca	NED	159 185	轮回 01 广陆矮 4 号
C01	RM493	1	Ⅲ	55	正向：tagctccaacaggatcgacc 反向：gtacgtaaacgcggaaggtg	VIC	210 237 240 246 264	合江 18 陆川早 1 号 IR 30 轮回 01 竹云糯
C02	RM561	2	Ⅲ	55	正向：gagctgttttggactacggc 反向：gagtagctttctcccaccce	FAM	185 187 191 195	竹云糯 合江 18 Dasanbyeo 桂花黄
C03	RM8277	3	Ⅲ	55	正向：agcacaagtaggtgcatttc 反向：atttgcctgtgatgtaatagc	NED	165 187 190 203 209 212	CPY 2199 陆川早 1 号 轮回 01 丹糯 2 号 元子占稻 合江 18
C04	RM551	4	Ⅲ	55	正向：agcccagactagcatgattg 反向：gaaggcgagaaggatcacag	FAM	184 188 190	竹云糯 合江 18 Daelip 1
C05	RM598	5	Ⅲ	55	正向：gaatcgcacacgtgatgaac 反向：atgcgactgatcggtactcc	FAM	153 156 162	安育早 1 号 陆川早 1 号 三香 628
C06	RM176	6	Ⅲ	67	正向：cggctcccgctacgacgtctcc 反向：agcgatgcgctggaagaggtgc	FAM	133 136	紫香糯 竹云糯
C07	RM432	7	Ⅲ	55	正向：ttctgtctcacgctggattg 反向：agctgcgtacgtgatgaatg	PET	168 172 188	竹云糯 Daelip 1 元子占稻
C08	RM331	8	Ⅲ	55	正向：gaaccagaggacaaaaatgc 反向：catcatacatttgcagccag	NED	151 171	元子占稻 竹云糯
C09	OSR28	9	Ⅲ	55	正向：agcagctatagcttagctgg 反向：actgcacatgagcagagaca	NED	132 135 169 172 178	竹云糯 Dasanbyeo 红壳老来青 旱轮稻 合江 18
C10	RM590	10	Ⅲ	55	正向：catctccgctctccatgc 反向：ggagttggggtcttgttcg	PET	139 143 146	合江 18 中籼 168 陆川早 1 号

表 C.1 （续）

编号	引物	染色体	引物组别	退火温度 ℃	引物序列（5′→3′）	荧光	常见等位变异，bp	参照品种
C11	RM21	11	Ⅲ	55	正向：acagtattccgtaggcacgg 反向：gctccatgagggtggtagag	FAM	128 134 138 145 147 156 160	竹云糯 合江 18 元子占稻 陆川早 1 号 Dasanbyeo 广陆矮 4 号 矮糯
C12	RM3331	12	Ⅲ	50	正向：cctcctccatgagctaatgc 反向：aggaggagcggatttctctc	VIC	110 120 122 126 128 150	竹云糯 龙 S 轮回 01 紫香糯 合江 18 矮糯
D01	RM443	1	Ⅳ	55	正向：gatggttttcatcggctacg 反向：agtcccagaatgtcgtttcg	VIC	119 121 123	竹云糯 科砂 1 号 元子占稻
D02	RM490	1	Ⅳ	55	正向：atctgcacactgcaaacacc 反向：agcaagcagtgctttcagag	FAM	92 97 99	陆川早 1 号 元子占稻 竹云糯
D03	RM424	2	Ⅳ	55	正向：tttgtggctcaccagttgag 反向：tggcgcattcatgtcatc	NED	240 263 277 280	合江 18 Dasanbyeo 竹云糯 浙场 9 号
D04	RM423	2	Ⅳ	55	正向：agcacccatgccttatgttg 反向：ccttttttcagtagccctccc	FAM	268 271 289	Dasanbyeo 元子占稻 陆川早 1 号
D05	RM571	3	Ⅳ	55	正向：ggaggtgaaagcgaatcatg 反向：cctgctgctctttcatcagc	FAM	179 183 185	陆川早 1 号 Dasanbyeo 元子占稻
D06	RM231	3	Ⅳ	55	正向：ccagattatttcctgaggtc 反向：cacttgcatagttctgcattg	PET	186 192 194	陆川早 1 号 合江 18 轮回 01
D07	RM567	4	Ⅳ	55	正向：atcagggaaatcctgaaggg 反向：ggaaggagcaatcaccactg	PET	248 258 260	陆川早 1 号 合江 18 桂花黄
D08	RM289	5	Ⅳ	55	正向：ttccatggcacacaagcc 反向：ctgtgcacgaacttccaaag	PET	87 106	合江 18 陆川早 1 号
D09	RM542	7	Ⅳ	55	正向：tgaatcaagccccctcactac 反向：ctgcaacgagtaaggcagag	VIC	87 89 111	矮糯 竹云糯 桂花黄
D10	RM316	9	Ⅳ	55	正向：ctagttgggcatacgatggc 反向：acgcttatatgttacgtcaac	VIC	196 198 200 202	陆川早 1 号 轮回 01 合江 18 紫香糯
D11	RM332	11	Ⅳ	55	正向：gcgaaggcgaaggtgaag 反向：catgagtgatctcactcaccc	VIC	162 164 167	紫香糯 旱轮稻 陆川早 1 号

表 C.1 （续）

编号	引物	染色体	引物组别	退火温度 ℃	引物序列（5′→3′）	荧光	常见等位变异，bp	参照品种
D12	RM7102	12	Ⅳ	55	正向：taggagtgtttagagtgcca 反向：tcggtttgcttatacatcag	PET	170 173 177 190	元子占稻 合江 18 轮回 01 竹云糯

附 录 D
（资料性附录）
参照品种名单

参照品种名单见表 D.1。

表 D.1 参照品种名单

序号	品种名称	序号	品种名称	序号	品种名称
1	矮糯	13	合江 18	25	浙场 9 号
2	安育早 1 号	14	红壳老来青	26	中籼 168
3	白芒稻	15	佳辐占	27	竹云糯
4	昌米 011	16	科砂 1 号	28	紫香糯
5	川 7 号	17	丽水糯	29	CPY 2199
6	丹糯 2 号	18	龙 S	30	Daelip 1
7	鄂糯 10 号	19	陆川早 1 号	31	Dasanbyeo
8	鄂香 1 号	20	轮回 01	32	IR 30
9	广陆矮 4 号	21	齐粒丝苗	33	Koshihikari
10	广籼 2 号	22	三香 628	34	Tsukushiakamochi
11	桂花黄	23	元子占稻	35	Yumetoiro
12	旱轮稻	24	早籼 276		