ICS 65.020.01
B 04

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2469—2013

陆地棉品种鉴定技术规程
SSR分子标记法

Protocol for identification of cotton variety—SSR marker method

2013-12-13 发布　　2014-04-01 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 …… 1
8　参照品种及其使用 …… 1
9　操作程序 …… 2
10　等位变异数据采集 …… 4
11　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)　核心引物 …… 9
附录 D(资料性附录)　参照品种名单 …… 12

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。

本标准由农业部科技教育司提出。

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:江苏省农业科学院、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人:戴剑、王显生、丁奎敏、王艳平、徐鹏、冯继宏、陈二龙。

陆地棉品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法

1 范围

本标准规定了利用简单重复序列（simple sequence repeats，SSR）分子标记进行陆地棉（*Gossypium hirsutum* L.）品种鉴定的试验方法、数据记录和判定标准。

本标准适用于基于 SSR 分子标记法的陆地棉 DNA 分子数据采集和品种鉴定。

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。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 19557.1 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 总则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核心引物 core primer

指品种 DNA 指纹鉴定优先选用的一套 SSR 引物，具有多态性高、重复性好等综合特性，可用于品种 DNA 指纹数据采集和品种鉴定。

3.2

参照品种 reference variety

是对应于特定位点不同等位变异的一组品种，用于辅助确定待测样品在某个位点上等位变异扩增片段的大小，校正仪器设备的系统误差，以保证不同实验室数据具有可比性。

4 原理

SSR 广泛分布于基因组中，不同品种间每个 SSR 位点重复单位的数量可能不同。针对两侧序列高度保守的简单重复序列，根据其两侧的序列设计一对特异引物，利用聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）技术对重复序列进行扩增。在电泳过程中，由于 SSR 位点重复单位的数量不同引起不同长度的 PCR 扩增片段在电场作用下分离，经硝酸银染色或者荧光染料标记加以区分。因此，根据 SSR 位点的多态性，利用 PCR 扩增和电泳技术可以鉴定陆地棉品种。

5 仪器设备及试剂

仪器设备及试剂见附录 A。

6 溶液配制

溶液配制方法见附录 B。

7 引物

引物相关信息见附录 C。

8 参照品种及其使用

参照品种的名称见附录 C，参照品种来源参见附录 D。

在进行等位变异检测时，应同时包括相应参照品种的 PCR 扩增产物。

注 1：同一名称不同来源的参照品种的某一位点上的等位变异可能不相同，在使用其他来源的参照品种时，应与原参照品种核对，确认无误后再使用。

注 2：对于附录 C 中未包括的等位变异，应按本标准方法，确定其大小和对应的参照品种。

9 操作程序

9.1 样品准备

每份样品检测 8 个单株，进行个体分析。

9.2 DNA 提取

9.2.1 将种子发芽，取两片真叶期的真叶 0.2 g，放入 1.5 mL 离心管中。

9.2.2 置冷冻干燥仪中－50℃冷冻干燥 2 d，取出，每个试管中放入 1 个 3 mm 直径的小钢珠，置研磨仪上设定每秒钟 30 次，研磨约 5 min。

9.2.3 加入预冷的新鲜配制的提取缓冲液 600 μL，冰浴 10 min。10 000 *g*，4℃，离心 10 min，弃上清液。

9.2.4 于沉淀中加入 600 μL 65℃预热的裂解缓冲液，搅拌均匀，65℃水浴 40 min，期间翻转混匀 3 次。

9.2.5 加入 800 μL 氯仿—异戊醇（*V*∶*V*=24∶1）混合液，翻转 50 次以上，10 000 *g* 离心 20 min，将上清液转入一新的 1.5 mL 离心管中。

9.2.6 加 0.6 倍体积预冷的异丙醇（－20 ℃），缓慢翻转 30 次，混匀，静置 10 min，12 000 *g* 离心 15 min，弃上清液。

9.2.7 于沉淀中加入 1 mL 70%的乙醇洗涤，12 000 *g* 离心 2 min。

9.2.8 弃上清液，通风干燥沉淀。

9.2.9 加入 200 μL TE 缓冲液，溶解 DNA，检测 DNA 浓度，－20℃保存备用。

注：其他所获 DNA 质量能够满足 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法都适用于本标准。

9.3 PCR 扩增

9.3.1 反应体系

20 μL 的反应体积：DNA 5 μL（10 ng/μL），10×Buffer 2 μL，dNTP 0.4 μL（10 mmol/L），正向引物 0.8 μL（10 μmol/L），反向引物 0.8 μL（10 μmol/L），$MgCl_2$ 1.2 μL（25 mmol/L），Taq 酶 0.4 μL（5 U/μL），双蒸水 9.4 μL，在 PCR 扩增仪上进行扩增。

利用毛细管电泳荧光检测时使用荧光标记的引物。引物的荧光染料种类见附录 C。

注：反应体系的体积可以根据具体情况进行调整。

9.3.2 反应程序

95℃预变性 5 min；95℃变性 30 s，根据表 C.1 推荐的退火温度退火 30 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；72℃下延伸 10 min，4℃保存。

9.4 PCR 产物检测

9.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

9.4.1.1 清洗玻璃板

将玻璃板清洗干净，用去离子水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗 2 遍，吸水纸擦干。在长板上涂 0.5 mL的亲和硅烷工作液，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。

9.4.1.2 组装玻璃板

玻璃板彻底干燥后，将其组装成电泳胶板，用水平仪调平，垫片厚度为 0.4 mm。

9.4.1.3 制胶

在 60 mL 6.0% PAGE 胶中分别加入 TEMED 50 μL 和新配制的 10%过硫酸铵溶液 500 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。

9.4.1.4 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 1×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 30 min。

9.4.1.5 变性

在 20 μL PCR 样品中加入 8 μL 6×加样缓冲液，混匀。在水浴锅或 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，迅速置于碎冰上，冷却 10 min 以上。

9.4.1.6 电泳

清除气泡和聚丙烯酰胺碎片。将鲨鱼齿梳齿端插入凝胶 1 mm～2 mm。每一个加样孔点入 2 μL～3 μL 样品。除待测样品外，还应同时加入参照品种扩增产物。在 50 W～80 W 恒功率下电泳，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)。电泳结束后，小心分开两块玻璃板，取下凝胶附着的长玻璃板准备固定。

注：具体功率大小根据电泳槽的规格型号和实验室室温设定。

9.4.1.7 银染

a) 固定：将凝胶附着的长玻璃板置于塑料盒中，加入约 1 000 mL 固定液，使固定液没过凝胶，在摇床上轻轻晃动约 15 min。

b) 漂洗：取出玻璃板，用去离子水漂洗 30 s。

c) 染色：将玻璃板置放入 1 500 mL 染色液中，使染色液没过凝胶，在摇床上轻轻晃动 30 min。

d) 漂洗：用去离子水快速漂洗，时间不超过 30 s。

e) 显影：将玻璃板在 1 500 mL 显影液中轻轻晃动至出现清晰带纹。

f) 定影：将凝胶在固定液中定影 5 min。

g) 漂洗：在去离子水中漂洗 1 min。

9.4.2 毛细管电泳荧光检测

9.4.2.1 PCR 产物样品准备

将 6-FAM 和 HEX 荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍，TAMRA 和 ROX 荧光标记的 PCR 产物稀释 10 倍。分别取等体积的上述 4 种稀释后溶液混合，从混合液中吸取 1 μL 加入到 DNA 分析仪专用深孔板孔中。板中各孔分别加入 0.1 μL LIZ500 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。混匀离心后置 PCR 仪上 95 ℃变性 5 min，取出，立即置于碎冰上，冷却约 10 min，离心，待上机电泳。

除待测样品外，每个 SSR 位点还应同时包括 2 个～3 个参照品种的扩增产物。

注：不同荧光标记的扩增产物的最适稀释倍数最好通过毛细管电泳荧光检测预试验确定。

9.4.2.2 开机准备

打开 DNA 分析仪，检查仪器工作状态。更换缓冲液，灌胶。将装有样品的深孔板置放于样品架基座上，打开数据收集软件。

9.4.2.3 编辑电泳板

按照仪器操作程序，创建电泳板，输入电泳板名称，选择适合的程序和电泳板类型，输入样品编号或名称。

9.4.2.4 运行程序

启动运行程序，DNA 分析仪自动将毛细管电泳数据、运行参数等存放于仪器中。

10 等位变异数据采集

10.1 数据表示

样品每个 SSR 位点的等位变异采用扩增片段大小的形式表示。

10.2 变性聚丙烯凝胶电泳与银染检测

将某一位点待测样品和相应的参照品种扩增片段的带型和移动位置进行比较，根据参照品种的移动位置和扩增片段大小，确定待测样品该位点的等位变异大小。

10.3 毛细管电泳荧光检测

使用 DNA 分析仪的片段分析软件，读出待测品种与对应参照品种的等位变异数据。比较参照品种的等位变异大小数据与表 C.1 中参照品种相应的数据，两者之间的差值为系统误差。从待测样品的等位变异数据中去除该系统误差，得到的数据即为待测样品该位点的等位变异大小。

10.4 结果记录

纯合位点的等位变异大小数据记录为 X/X，其中 X 为该位点等位变异的大小；杂合位点的等位变异数据记录为 X/Y，其中 X、Y 为该位点上两个不同的等位变异，小片段在前，大片段在后。无效等位变异的大小记录为 0/0。

示例 1：

一个品种在 BNL3140 位点上有一个等位变异，大小为 103 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 103/103。

示例 2：

一个品种在 NAU1190 位点上有两个等位变异，大小分别为 210 bp、231 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 210/231。

11 判定方法

用表 C.1 中引物进行检测，将获得的待测样品等位变异数据进行品种间比较，或与数据库中品种比较，判定方法如下：

a) 品种间相似度≤90%，判定为不同品种；

b) 品种间相似度为 90%<S<100%时，判定为近似品种；

c) 品种间相似度=100%，判定为疑同品种。

品种相似度(S)按式(1)计算：

$$S = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

S ——品种相似度，单位为百分率(%)；

N_{ij}——品种 i 和 j 之间共同的等位变异数目；

N_i ——品种 i 中出现的等位变异数目；

N_j ——品种 j 中出现的等位变异数目。

对于 b)和 c)的两种情况，按照 GB/T 19557.1 的规定进行田间鉴定，或增加多态性引物进一步对群体鉴定。

附 录 A
（规范性附录）
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。

A.1.3 电泳槽及配套的制胶附件。

A.1.4 水平电泳槽及配套的制胶附件。

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，能够分辨最少 1 个核苷酸的差异。

A.1.6 高速离心机。

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 紫外分光光度计。

A.1.12 高压灭菌锅。

A.1.13 酸度计。

A.1.14 水浴锅或金属浴。

A.1.15 制冰机。

A.1.16 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.1.17 冷冻干燥仪。

A.1.18 冰箱。

A.1.19 其他相关仪器和设备。

A.2 试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯的试剂。

A.2.1 β-巯基乙醇。

A.2.2 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。

A.2.3 乙二胺四乙酸(EDTA)。

A.2.4 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

A.2.5 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。

A.2.6 异戊醇。

A.2.7 氯仿。

A.2.8 浓盐酸。

A.2.9 氢氧化钠。

A.2.10 氯化钠。

A.2.11 葡萄糖。

A.2.12 Taq DNA 聚合酶。

A.2.13 10×PCR 缓冲液。

A.2.14 氯化镁。

A.2.15 四种脱氧核糖核苷酸(dNTP)。

A.2.16 无水乙醇。

A.2.17 SSR 引物。

A.2.18 琼脂糖。

A.2.19 溴酚蓝。

A.2.20 二甲苯青 FF。

A.2.21 蔗糖。

A.2.22 核酸染色剂。

A.2.23 去离子甲酰胺。

A.2.24 硼酸。

A.2.25 甲叉双丙烯酰胺。

A.2.26 丙烯酰胺。

A.2.27 尿素。

A.2.28 四甲基乙二胺(TEMED)。

A.2.29 亲和硅烷。

A.2.30 剥离硅烷。

A.2.31 过硫酸铵。

A.2.32 冰醋酸。

A.2.33 硝酸银。

A.2.34 甲醛。

A.2.35 DNA 分析仪用聚丙烯酰胺胶液。

A.2.36 DNA 分析仪用分子量内标:最大分子量 500 bp,Liz 标记。

A.2.37 DNA 分析仪用光谱校准基质。包括 6-FAM、TAMRA、HEX 和 ROX 4 种荧光染料标记的 DNA 片段[FAM,即 6-羧基荧光素,6-carboxy-fluorescein;TAMRA,即 5(6)-羧基四甲基罗丹明,tetramethyl-6 carboxyrhodamine;HEX,即 6-HEX 亚磷酰胺单体,5-hexachloro-fluorescein;ROX,即 6-羧基-X-罗丹明(单一化合物),6-carboxy-x-rhodamine]。

A.2.38 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 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取 40.0 g 氢氧化钠，先溶于 800 mL 去离子水中，再加水定容至 1 000 mL。

B.1.2 0.5 mol/L 盐酸溶液

量取 25 mL 37%浓盐酸，加去离子水定容至 500 mL。

B.1.3 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)(pH8.0)溶液

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠盐，加入 800 mL 去离子水，再加入 20 g 氢氧化钠，加热，搅拌。待乙二胺四乙酸二钠盐完全溶解后，冷却至室温。再用氢氧化钠溶液(B.1.1)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.1.4 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)(pH8.0)溶液

称取 121.14 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)，加双蒸水 800 mL，加 HCl 约 30 mL 调节 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL，在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

B.1.5 氯仿—异戊醇混合液

氯仿和异戊醇按照 24∶1 体积配制。

B.1.6 10%十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)

称取 100 g 十六烷基三甲基溴化铵加双蒸水定容至 1 000 mL。

B.1.7 DNA 提取缓冲液

分别称取葡萄糖和 PVP 69.36 g 和 20 g，分别加入 100 mL 1.0 mol/L Tris-HCl(pH8.0)，10 mL 0.5 mol/L Na·EDTA(pH 8.0)，10 mLβ-巯基乙醇，加双蒸水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa (121 ℃)条件下灭菌 20 min，于 4℃保存。

B.1.8 裂解缓冲液

分别称取 NaCl 和 PVP 81.816 g 和 20 g，分别加入 100 mL 1.0 mol/L Tris-HCl(pH8.0)，40 mL 0.5 mol/L Na·EDTA(pH8.0)，200 mL 10% CTAB，10 mLβ-巯基乙醇，加双蒸水定容至 1 000 mL 体积。在 103.4 kPa (121℃)条件下灭菌 20 min，于 4℃保存。

B.1.9 TE 缓冲液

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

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP 溶液

用超纯水分别配制 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四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：也可使用满足试验要求的商品 dNTP 溶液。

B.2.2 SSR 引物溶液

用超纯水分别配制正向引物和反向引物浓度为 10 μmol/L 的工作液。

B.2.3 氯化镁溶液

称取 1.190 g 氯化镁，用去离子水溶解，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，−20℃保存。

注：也可使用满足试验要求的商品氯化镁溶液。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 10×TBE 缓冲液

分别称取 108.0 g 三羟甲基氨基甲烷和 55.0 g 硼酸，溶于 800 mL 去离子水中，加入 40 mL 0.5 mol/L乙二胺四乙酸二钠盐溶液(pH8.0)，定容至 1 000 mL。

B.3.2 40%丙烯酰胺溶液

分别称取 380.0 g 丙烯酰胺和 20.0 g 甲叉双丙烯酰胺，溶于 800 mL 去离子水中，定容至 1 000 mL。

B.3.3 6%变性聚丙烯酰胺胶溶液

称取 420.0 g 尿素，用去离子水溶解，分别加入 100 mL 10×TBE 缓冲液和 150 mL 40% 丙烯酰胺溶液，定容至 1 000 mL。

B.3.4 亲和硅烷缓冲液

分别量取 49.75 mL 无水乙醇和 250 μL 冰醋酸，用去离子水定容至 50 mL。

B.3.5 亲和硅烷工作液

分别量取 5 μL 亲和硅烷和 1 mL 亲和硅烷缓冲液，混匀。

B.3.6 剥离硅烷工作液

分别量取 98 mL 氯仿溶液和 2 mL 二甲基二氯硅烷溶液，混匀。

B.3.7 10%过硫酸铵溶液

称取 1.0 g 过硫酸铵，溶于 10 mL 去离子水中，混匀，于−4 ℃保存。

B.3.8 1×TBE 缓冲液

量取 500 mL 10×TBE 缓冲液(B.3.1)，加去离子水 4 500 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，分别加入 98 mL 去离子甲酰胺和 2 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(pH8.0)溶液搅拌溶解。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液

量取 200 mL 冰醋酸，加入 1 800 mL 去离子水。

B.4.2 染色液

称取 3.0 g 硝酸银，溶于 1 500 mL 去离子水中。

B.4.3 显影液

称取 30 g 氢氧化钠，溶于 1 000 mL 去离子水中，再加入 5 mL 甲醛。

附 录 C
（规范性附录）
核 心 引 物

核心引物见表 C.1。

表 C.1 核心引物目录

位点	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度,℃	等位变异,bp	参照品种
BNL946	F:GCTGTTGCTCCACATCTCCT R:GGGCAAACAGATAGGCAGAA	5′-6-FAM	58	326 344 358	冀棉 10 号 湘棉 10 号 晋棉 25 号
BNL2449	F:ATCTTTCAAACAACGGCAGC R:CGATTCCGGACTCTTGATGT	5′-HEX	58	140 156 188	中棉所 37 新陆早 11 号 国抗棉 1 号
BNL2646	F:CCCCTTTGATAGATACACATTTTTA R:AAAATAAACTACGAAAGAGAAAGAGAA	5′-TAMRA	58	123 145	中棉所 41 晋棉 10 号
BNL3140	F:CACCATTGTGGCAACTGAGT R:GGAAAAGGGAAAGCCATTGT	5′-ROX	58	103 107	中棉所 19 鲁棉 14
BNL3474	F:AAGGTAATGCAGTGCGGTTC R:ATAATGGCATTGATTATAGAGTGTG	5′-6-FAM	58	169 187	鄂棉 21 号 晋棉 12 号
BNL3502	F:AATTTCTAAGATAACACACAAACACA R:TACAATCAAATAGCAGTTTAGAGTATCG	5′-HEX	58	153 187	湘棉 10 号 鄂棉 18 号
BNL4030	F:CCTCCCTCACTTAAGGTGCA R:ATGTTGTAAGGGTGCAAGGC	ROX	55	115 119	冀棉 10 号 鄂棉 16 号
CIR246	F:TTAGGGTTTAGTTGAATGG R:ATGAACACACGCACG	5′-TAMRA	58	153 170 187	冀棉 15 号 鄂抗棉 3 号 冀棉 10 号
DPL135	F:GCCTCTGAACATGTAGAAATGAATG R:CTACAACCCTTGAAGCAAATTACC	6-FAM	55	177 195	冀棉 10 号 豫棉 10 号
DPL209	F:GAAGGAACCTCGTGATTATTTGAG R:GACCGGTAGACAGAGATGAGAAAT	TAMRA	55	207 216	国欣棉 1 号 冀棉 11 号
DPL249	F:ACAGAGCTATGGGAAATCATGGTA R:TGTACTGCAAATTGCTGCTAAGAC	5′-6-FAM	58	114 118 190 202	晋棉 17 号 豫棉 14 号 晋棉 10 号 晋棉 20 号
DPL431	F:CTATCACCCTTCTCTAGTTGCGTT R:ATCGGGCTCACAAACATCA	5′-HEX	58	190 202	新陆早 10 号 鲁棉研 16
DPL442	F:TTACGGTGGCTAATGTAATATCCC R:ATTCTTGAGAGTTCACCAGGAAAG	TAMRA	55	147 184	中棉所 40 新陆早 12 号
DPL513	F:AGACCCGGCTACTACATGTTATCTT R:ACATACAGATGCTTCACACAAACAC	5′-TAMRA	58	201 205 209	冀棉 13 号 湘棉 12 号 湘棉 10 号
DPL532	F:CATACATCCATGCATACATACATCC R:TGAGGTATAGGTAGGTCTCTGGTGA	HEX	55	228 236	湘棉 12 号 鄂棉 20 号
DPL910	F:AAACAAAGCAGCCAATGCT R:ATACTCGACACGGTCAAGGG	5′-ROX	58	219 243	中棉所 42 中棉所 43

表 C.1（续）

位点	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度,℃	等位变异,bp	参照品种
Gh111	F:GTTGCAACCTTGGAAACCA R:GGGTTGCCGTTAGACCAG	5′-6-FAM	58	170 173 185	国抗棉 1 号 晋棉 38 号 晋棉 16 号
Gh112	F:GGTTGGGTTTCCACAATAGC R:TGTTGCAACCTTGGAAACC	5′-HEX	58	143 157 183	冀棉 15 号 中植 3 号 鄂抗棉 3 号
Gh243	F:CAGAAGGTTATGCAAACAACATGCA R:CTAAACTCTCTCTGCTGTGTTCC	5′-TAMRA	58	62 88,123 126	晋棉 17 号 豫棉 14 号 鄂抗棉 1 号
Gh273	F:TTGCTTCGTTTTCTTCCCTGGTG R:AAGCAAAGACCAGCTTCTCTTCC	5′-ROX	58	86 88 95 99	鄂抗棉 1 号 中棉所 45 豫棉 14 号 鄂抗棉 1 号
MUSS138	F:TCTCCAGATCTCTCTGTCTCCC R:CGTGTCCGAAACTTCCTAGC	5′-HEX	58	205 214	冀棉 11 号 冀棉 10 号
MUSS440	F:CAACCGAAACAAGCTAACACC R:CAAGAATCCATTTCTTCCCG	5′-TAMRA	58	153 188 266 272	皖 C222 邯棉 885 鄂抗棉 8 号 豫棉 17 号
NAU943	F:ATCTGTTCAATTTCTCGTCA R:CAGTTGTTGGTTGATCTGGA	TAMRA	55	163 180	冀棉 13 号 豫棉 10 号
NAU1043	F:GTATCCGCCCACAAATAAAG R:GCATCGTGAGAGAAAGTGAA	5′-ROX	58	223 226 229	晋棉 10 号 鄂抗棉 1 号 苏棉 20 号
NAU1070	F:CCCTCCATAACCAAAAGTTG R:ACCAACAATGGTGACCTCTT	5′-6-FAM	58	155 170	冀棉 15 号 中植 3 号
NAU1093	F:TGTGATGAAGAACCCTCTCA R:AAATGGCGTGCTTGAAATAC	5′-HEX	58	223 232 241	中棉所 40 鄂抗棉 10 号 鄂抗棉 8 号
NAU1102	F:ATCTCTCTGTCTCCCCCTTC R:GCATATCTGGCGGGTATAAT	5′-TAMRA	58	232 241	鄂抗棉 10 号 鄂抗棉 8 号
NAU1167	F:CTGACTTGGACCGAGAACTT R:AAGAGCCCTGGACAATGATA	5′-ROX	58	223 232 241	中棉所 40 鄂棉 19 号 湘棉 13 号
NAU1190	F:CCATGTCCGTATCCATGTTA R:TAAGGCAAGATAGGGTCAGG	5′-6-FAM	58	210 231	鄂棉 17 号 中棉所 34
NAU1200	F:CAACAGCAACAACCACAA R:CTGCCTCGAGGACAAATAGT	5′-HEX	58	202 218 230	冀棉 21 号 鄂棉 11 号 鄂棉 10 号
NAU1225	F:CAGCAAATTCGCAAGAGTTA R:CTAACAGGGGTGACATAGGG	5′-TAMRA	58	219 243	冀棉 10 号 鄂棉 11 号
NAU2173	F:GCCAAATAGGTCACACACAA R:AGCGAGAAGGAGACAGAAAA	5′-ROX	58	201 205 209 219 225 245 251	冀棉 17 号 湘棉 12 号 湘棉 10 号 冀棉 15 号 新陆早 11 号 中棉所 34 晋棉 21 号

表 C.1（续）

位点	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度,℃	等位变异,bp	参照品种
NAU3225	F:CAGGAGCCAAGAAGGAATTA R:TTGAGTTGCATCCTTTCTGA	5′-6-FAM	58	182 194 197	鄂抗棉 3 号 鄂棉 20 号 中棉所 19
NAU3468	F:ATAGCACGATTGGGAAGAAC R:AGGAAATGAGTCCTCAGCAG	5′-HEX	58	196 214 223 229	晋棉 10 号 冀棉 17 号 鄂抗棉 1 号 冀棉 20 号
NAU3519	F:CAAGCTTGAGCTTCTCATCA R:AAAACAGTGATGGGTTCGTT	HEX	55	195,206 195,212	冀棉 20 号 鄂抗棉 3 号
NAU3901	F:AAGACAAAAGGCAAGGACAC R:CTTGGAAAAAGGAAGAGCAG	TAMRA	55	229,233 229,241	鄂棉 12 号 冀棉 10 号
NAU5433	F:CTTAGGATGGCCGAATAAAA R:CAAGTGCTCCACCACAAAT	5′-TAMRA	58	215 220 243 248	中植 3 号 冀棉 17 号 中棉所 33 豫棉 17 号
NAU5434	F:AAAAGAACTTACGGCACAGG R:AAATCACTGGCACTGGAATC	5′-ROX	58	248 272	鲁棉 14 中植 3 号
TMB312	F:AGCTTTTCCATTCCAGAGCA R:GGTTGTTGCAAGAGTTCACG	5′-6-FAM	58	139 153 156 158,188 168,201	中棉所 50 新陆早 37 号 新陆早 31 号 酒棉 2 号 银硕 116

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	名 称	编号	序号	名 称	编号
1	鄂抗棉 1 号	112088	31	晋棉 38 号	113355
2	鄂抗棉 3 号	111630	32	酒棉 2 号	114003
3	鄂抗棉 8 号	112704	33	鲁棉 14	B25
4	鄂抗棉 10 号	112706	34	鲁棉研 16	112772
5	鄂棉 10 号	110281	35	苏棉 20 号	112755
6	鄂棉 11 号	110273	36	皖 C222	114666
7	鄂棉 12 号	110864	37	湘棉 10 号	111163
8	鄂棉 16 号	111698	38	湘棉 12 号	111162
9	鄂棉 17 号	111283	39	湘棉 13 号	111159
10	鄂棉 18 号	111722	40	新陆早 10 号	112778
11	鄂棉 19 号	111604	41	新陆早 11 号	112894
12	鄂棉 20 号	111671	42	新陆早 12 号	112803
13	鄂棉 21 号	112516	43	新陆早 31 号	113694
14	国抗棉 1 号	B4	44	新陆早 37 号	114696
15	国欣棉 1 号	112708	45	银硕 116	114513
16	邯棉 885	114658	46	豫棉 10 号	112204
17	冀棉 10 号	110504	47	豫棉 14 号	111969
18	冀棉 11 号	110861	48	豫棉 17 号	112691
19	冀棉 13 号	110863	49	中棉所 19	B23
20	冀棉 15 号	111032	50	中棉所 33	111450
21	冀棉 17 号	111005	51	中棉所 34	111437
22	冀棉 20 号	112249	52	中棉所 37	112956
23	冀棉 21 号	112242	53	中棉所 40	112790
24	晋棉 10 号	112277	54	中棉所 41	112686
25	晋棉 12 号	112560	55	中棉所 42	113239
26	晋棉 16 号	113418	56	中棉所 43	113274
27	晋棉 17 号	111941	57	中棉所 45	112758
28	晋棉 20 号	112291	58	中棉所 50	113693
29	晋棉 21 号	112913	59	中植 3 号	111039
30	晋棉 25 号	112295			

注：编号为国家种质库的统一编号；B4、B18、B23、B25 为农业部植物新品种测试总中心标准品种编号。