ICS 65.020.01
B 04

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2474—2013

黄瓜品种鉴定技术规程 SSR分子标记法

Protocol for the identification of cucumber varieties—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　试剂和溶液配制 …… 1
7　引物 …… 1
8　操作程序 …… 2
9　等位基因数据采集 …… 3
10　结果记录 …… 4
11　判定标准 …… 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 …… 11

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:中国农业科学院蔬菜花卉研究所、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人:苗晗、张圣平、顾兴芳、王烨、莫青。

黄瓜品种鉴定技术规程　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)分子标记进行黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种鉴定的试验方法、数据记录格式及判定标准。

本标准适用于黄瓜 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 3543.2　农作物种子检验规程

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 Primers

核心引物指分布于黄瓜每条染色体上,多态性、稳定性、重复性等综合特性好、作为 DNA 指纹鉴定优先选用的一套引物。

3.2

参照品种　Reference variety

参照品种指对应于 SSR 位点不同等位基因的一组品种。参照品种用于确定待测样品在某个 SSR 位点上等位基因扩增片段的大小,校正不同仪器设备和不同实验室间检测数据的系统误差。

4　原理

简单重复序列(SSR)分布于黄瓜整个基因组的不同位置上,不同品种每个位点上重复单位的数目及序列可能不同,因而形成片段长度多态性。由于每个简单重复序列两端的序列是高度保守和单拷贝的,因而可根据其两端的序列设计一对特异引物,利用 PCR 技术对重复序列进行扩增,在电泳过程中,PCR 产物在电场作用下得到分离,经硝酸银染色或者荧光染料标记加以区分。根据 PCR 产物的带型差异鉴定黄瓜品种。

5　仪器设备及试剂

仪器设备及试剂名单见附录 A。

6　试剂和溶液配制

相关溶液配制方法见附录 B。

7　引物

核心引物名单见附录 C。

8 操作程序

8.1 样品准备

8.1.1 对于种子样品的分样和保存，按 GB/T 3543.2 的规定进行。

8.1.2 每份样品至少检测 5 个个体，每个个体单独分析。对一致性差的样品应增加检测个体至 10 个以上，每个个体单独分析。

8.2 DNA 提取

提供两种 DNA 提取方法。

方法一：选取植株下胚轴或幼叶 30 mg～40 mg 置于 2.0 mL 离心管中，用液氮研磨至粉状，加入 700 μL 2%CTAB 预热缓冲液，65℃水浴 1 h，加入 700 μL 氯仿—异戊醇(24∶1)，上下混匀 10 min，16 200 *g* 离心 10 min；吸取上清液加入预先装有 700 μL 异丙醇的 1.5 mL 的离心管中，上下混匀后放—20℃冰箱 30 min，16 200 *g* 离心 10 min；弃上清，经 70%乙醇洗涤后加入 100 μL 超纯水，待充分溶解后备用。适用于需要大量提取 DNA 和长期贮存的情况。

方法二：选取植株下胚轴或幼叶 30 mg～40 mg 置于 2.0 mL 离心管中，用液氮研磨至粉状，加 350 μL 0.1 mol/L NaOH，沸水加热 10 min，加入等体积超纯水，直接取 2.0 μL 进行 SSR 扩增，于 4℃保存。适用于高通量快速提取 DNA，但 DNA 浓度较低且不适于长期贮存。

注：以上为推荐的两种 DNA 提取方法。所获 DNA 质量能够符合 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法都适用于本标准。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 标准样品的使用

在进行 PCR 扩增和等位基因检测时，应同时包括相应的标准样品。不同位点的标准样品的名称见附录 C。某一位点上具有相同的等位基因的标准样品可能不止一个，在确认这些样品在某一位点上的等位基因大小后，也可将这些样品代替附录 C 中的标准样品。对于附录 C 中未包括的等位基因，应按本标准的方法，通过使用 DNA 分析仪与标准样品同时进行检测确定其大小。

同一名称不同来源的标准样品在某一位点上的等位基因可能不相同，在使用前应与原标准样品进行核对。

注：多个品种在某一位点上可能都具有相同的等位基因。在确认这些品种某一位点上等位基因大小后，这些品种也可以代替附录 C 中的标准样品使用。

8.3.2 反应体系

SSR 反应体系，包括基因组 DNA 20.0 ng，1×Buffer 缓冲液(含 Mg^{2+})，dNTPs 2.5 mmol/L，正、反向引物各 30 ng，Taq 酶 0.5 U，其余以超纯水补足。推荐使用 15 μL～20 μL 反应体积。

8.3.3 反应程序

94℃预变性 4 min，94℃变性 15 s，55℃退火 15 s，72℃延伸 30 s；共 35 个循环，72℃延伸 5 min，4℃保存。

8.4 等位基因检测

8.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测

8.4.1.1 清洗玻璃板

将玻璃板反复擦洗干净，双蒸水擦洗两遍，95%乙醇擦洗两遍，干燥。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。

8.4.1.2 组装电泳板

待玻璃板彻底干燥后组装电泳板，并用水平仪调平。

8.4.1.3 灌胶

取 60 mL 6%的聚丙烯酰胺胶(根据不同型号的电泳槽确定胶的用量和合适的灌胶方式),300 μL 过硫酸铵(APS)和 60 μL 四甲基乙二胺(TEMED)轻轻混匀,将胶缓缓的灌入。当胶到底部后将板放置水平,将梳子插入适当位置,并用夹子夹紧,以防点样时漏样。聚合 2 h 以上用于电泳。过程中防止出现气泡。

8.4.1.4 预电泳

将梳子小心拔出,用洗瓶清洗干净,然后擦干净玻璃板,将电泳槽装配好后,在电泳槽中加入 1× TBE。在恒功率 70 W 条件下预电泳 30 min。

8.4.1.5 变性

在 PCR 产物中加入 3 μL 6×加样缓冲液,混匀后,在 PCR 仪上运行变性程序:95℃变性 5 min,然后立即置于冰上冷却,使 DNA 保持单链状态。

8.4.1.6 电泳

预电泳结束后,将胶面的气泡及杂质吹打干净,将梳子轻轻插入,其深度为刚进入胶面 1 mm。每一个加样孔点入 5 μL 样品。70 W 恒功率电泳至上部的指示带到达胶板的中部。电泳结束后,小心分开两块玻璃板,凝胶会紧贴在长板上。

8.4.1.7 银染(快速银染法)

a) 固定:固定液中轻轻晃动 3 min,需要固定 2 次,第 2 次固定液回收待用;
b) 染色:染色液中染色 12 min;
c) 漂洗:水加硫代硫酸钠漂洗一次 30 s,第 2 次用双蒸水快速漂洗,30 s;
d) 显影:显影液中轻轻晃动至带纹出现;
e) 定影:用回收的固定液定影 2 min;
f) 漂洗:双蒸水漂洗 1 min。

8.4.2 DNA 分析仪检测

8.4.2.1 样品准备

首先根据不同的荧光基团将 PCR 产物稀释一定的倍数。一般 6-FAM 荧光基团 PCR 产物稀释 80 倍,HEX、ROX、TAMRA 荧光基团 PCR 产物稀释 30 倍;

然后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 1.0 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。除待测样品外,还应同时包括标准样品的扩增产物。将样品在 PCR 仪上 95℃变性 5 min,立即取出置于碎冰上,冷却 10 min 以上。瞬时离心 10 s 后上机电泳。

8.4.2.2 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。将装有样品的微孔板置放于样品架基座上。打开数据收集软件。

8.4.2.3 编辑电泳板

点击菜单中的"plate manager"按钮,然后在右侧窗口点击"New"按钮创建一个新的电泳板,在"Name"和"ID"栏中输入电泳板的名称,在"application"选项中,选"Genemapper-Genetic",在"Plate Type"选项中选择"96-well",在"owner"和"operator"项中分别输入板所有者和操作者的名字,点击"OK"按钮。

8.4.2.4 电泳

在"Run scheduler"工具栏中,点击"Search"按钮,选中已编辑好的电泳板,点击样品板,使电泳板和样品板关联,然后点击工具条中左上角的绿色三角按钮,开始电泳。

9 等位基因数据采集

9.1 数据格式

样品每个 SSR 位点的等位基因采用扩增片段大小的形式表示。

9.2 变性聚丙烯凝胶电泳银染检测

将待测样品扩增片段的带型和泳动位置与对应的标准样品进行比较，与待测样品相同的标准样品的片段大小即为待测样品该引物位点的等位基因扩增片段大小。

9.3 DNA 分析仪检测

使用 DNA 分析仪的片段分析软件，读出每个位点每个样品的等位基因扩增片段大小数据。通过使用标准样品，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。比较标准样品的等位基因扩增片段大小数据与表 C.1 中的数据。如两者不一致，其差数即是系统误差的大小。从待测样品的等位基因扩增片段数据中去除该系统误差，获得的数据即为待测样品的等位基因扩增片段大小。

10 结果记录

纯合位点的等位基因扩增片段数据记录为 XXX/XXX，其中 XXX 为该位点等位基因扩增片段大小；杂合位点的等位基因扩增片段数据记录为 XXX/YYY，其中 XXX、YYY 分别为该位点上两个不同的等位基因，小片段数据在前，大片段数据在后；缺失位点的等位基因数据记录为 0/0。

示例 1：

一个品种的一个 SSR 位点为纯合位点，等位基因扩增片段大小为 120 bp，则该品种在该位点上的等位基因扩增片段数据记录为 120/120。

示例 2：

一个品种的一个 SSR 位点为杂合位点，两个等位基因扩增片段大小分别为 120 bp、126 bp，则该品种在该位点上的等位基因扩增片段数据记录为 120/126。

11 判定标准

品种鉴定包括对两个或两个以上的品种同时进行检测（“直接比较”）和对待测品种进行检测后利用其检测数据和数据库中品种的数据进行比对（“数据库比较”）两种情况。

11.1 直接比较

对待测品种和对照同时进行检测（“直接比较”）时，用附录 C 中核心引物检测，获得待测品种在这些引物位点的等位基因数据，利用这些数据进行品种间比较：

a) 品种间差异位点数≥2，判定为不同品种；

b) 品种间差异位点数=1，判定为近似品种；

c) 品种间差异位点数=0，判定为疑同品种。

对于 b)和 c)的两种情况，应按照 GB/T 19557.1 给出的原则进行田间测试，确定品种间在形态性状上是否存在明显差异。

11.2 数据库比较

对待测品种进行检测后利用其检测数据和数据库中品种的数据进行比对（“数据库比较”）时，用附录 C 中核心引物检测，获得待测品种在上述引物位点的等位基因数据，利用这些数据和数据库中品种进行比较：

a) 品种间差异位点数≥2，判定为不同品种；

b) 品种间差异位点数=1，判定为近似品种；

c) 品种间差异位点数=0，判定为疑同品种。

对于 b)和 c)的两种情况，将这些相近品种或疑同品种与待测品种按照 11.1 的方法进行鉴定。

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 电泳槽及配套的制胶附件。
A.1.3 高压电泳仪。
A.1.4 水平摇床。
A.1.5 胶片观察灯。
A.1.6 电子天平。
A.1.7 微量移液器。
A.1.8 磁力搅拌器。
A.1.9 电磁炉。
A.1.10 微波炉。
A.1.11 高压灭菌锅。
A.1.12 酸度计。
A.1.13 台式高速离心机。
A.1.14 制冰机。
A.1.15 凝胶成像系统或紫外透射仪。
A.1.16 DNA 分析仪：基于毛细管电泳，有 DNA 片段分析功能和数据分析软件，能够分辨 1 个核苷酸的差异。
A.1.17 水浴锅或金属浴：控温精度±1℃。
A.1.18 冰箱：最低温度－20℃。
A.1.19 紫外分光光度计。

A.2 试剂

A.2.1 十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)。
A.2.2 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。
A.2.3 乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na_2)。
A.2.4 三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)。
A.2.5 浓盐酸。
A.2.6 氢氧化钠(NaOH)。
A.2.7 10×Buffer 缓冲液(含 Mg^{2-})。
A.2.8 四种脱氧核苷酸：4×dNTP。
A.2.9 Taq DNA 聚合酶。

A.2.10 去离子甲酰胺。

A.2.11 溴酚蓝。

A.2.12 二甲苯青 FF。

A.2.13 甲叉双丙烯酰胺。

A.2.14 丙烯酰胺。

A.2.15 硼酸。

A.2.16 尿素。

A.2.17 亲和硅烷:97%。

A.2.18 剥离硅烷:2%二甲基二氯硅烷。

A.2.19 无水乙醇。

A.2.20 四甲基乙二胺(TEMED)。

A.2.21 过硫酸铵(APS)。

A.2.22 冰醋酸。

A.2.23 硝酸银。

A.2.24 甲醛。

A.2.25 氯仿。

A.2.26 异戊醇。

A.2.27 异丙醇。

A.2.28 DNA 分析仪用分子量内标,LIZ-500 分子量内标。

A.2.29 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液(POP-4 胶)。

A.2.30 DNA 分析仪用光谱校准基质,包括 6-FAM、TAMRA、HEX 和 ROX 4 种荧光标记的 DNA 片段。

A.2.31 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。

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(EDTA - Na_2)(pH=8.0)溶液

称取 186.1 g EDTA - Na_2 溶于 800 mL 蒸馏水中，用固体 NaOH 调 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL，高压灭菌。

B.1.2 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris - HCl)(pH=8.0)溶液

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

B.1.3 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.1.4 DNA 提取液

称取 CTAB 20 g，NaCl 81.816 g，PVP 20 g，量取 1 mol/L Tris - HCl 溶液(pH 8.0)100 mL，0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)40 mL，定容至 1 000 mL。

B.1.5 5 mol/L 氯化钠(NaCl)溶液

称取 146 g 固体 NaCl 溶于水中，加水定容至 500 mL。

B.1.6 氯仿—异戊醇(24∶1)

按 24∶1 的比例(体积比)配制混合液。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP

用超纯水分别配制 A、G、C、T 终浓度 100 mmol/L 的储存液。各取 20 μL 混合，用超纯水 720 μL 定容至终浓度 2.5 mmol/L 的工作液。

B.2.2 SSR 引物

根据合成后引物浓度，用超纯水分别配制正向引物和反向引物终浓度均 100 μmol/L 的储存液，各取 10 μL 混合，用超纯水 80 μL 定容至终浓度 10 μmol/L 的工作液。引物干粉配制前应首先快速离心。

B.2.3 6×加样缓冲液

称取溴酚蓝 0.125 g、二甲苯青 0.125 g，量取去离子甲酰胺 49 mL、0.5 mol/L 的 EDTA 溶液(pH 8.0)1 mL。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 40%PAGE 胶

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 6.0% PAGE 胶

称取尿素 420 g，量取 10×TBE 缓冲液 100 mL，40% PAGE 胶 150 mL，定容至 1 000 mL。

B.3.3 亲和硅烷

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

B.3.4 亲和硅烷工作液

在1 mL Bind缓冲液中加入5 μL Bind原液，混匀。

B.3.5 剥离硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

B.3.6 10%过硫酸铵溶液

称取0.1 g过硫酸铵溶于1 mL超纯水中。

B.3.7 10×TBE缓冲液

称取Tris碱108 g、硼酸55 g，量取0.5 mol/L EDTA溶液37 mL，定容至1 000 mL。

B.3.8 1×TBE缓冲液

量取10×TBE缓冲液500 mL，加水定容至5 000 mL。

B.4 银染溶液的配制

B.4.1 固定液

量取5 mL冰醋酸、100 mL乙醇，加水定容至1 000 mL。

B.4.2 染色液

称取1 g硝酸银，加水定容至1 000 mL。

B.4.3 显影液

量取1 000 mL蒸馏水，加入10 g氢氧化钠和2 mL甲醛。

附 录 C
（规范性附录）
核 心 引 物

核心引物及参照品种见表 C.1。

表 C.1 核心引物及参照品种

位点	染色体	引物序列(5′→3′)	荧光染料	退火温度 ℃	等位基因 bp	参照品种
SSR00262	1	F:CCGTTGGTCTTGGACTCTCA R:TGTAAAAGTGATCAGGAGGGTCT	5′6-FAM	55	205 215	中农 19 号 津研 4 号
SSR16695	1	F:CACAATCCCACGAAGAACAA R:TGCAATTATGGCAAATCAAAA	5′HEX	55	140 152 159	中农 29 号 津研 4 号 早青 2 号
SSR10839	1	F:TTGAATTCCTCTGCCCAATC R:TGGAATTTTGTTAGGGGGAA	5′HEX	55	156 171	中农 8 号 中农 9 号
SSR05723	1	F:TGGCTTTTCTGTCACGTCC R:TCCATGGTACAACAAGAATCACA	5′6-FAM	55	124 128 203	中农 19 号 绿衣天使 鲁黄瓜 8 号
SSR17922	1	F:CATTCTAGGTCAATGAATCGCA R:GCAAAGTTGCCACATTGAAG	5′ROX	55	181 196	长春密刺 北京小刺
SSR03070	2	F:GCTAACACTACCCGCTGCTT R:AACAGAAAGAGAATCGGGGG	5′HEX	55	135 145	津研 4 号 中农 19 号
SSR05748	2	F:TGTGGCCTGTGCTAAAATGA R:TTTGGAAAAGCTAAAGCCCA	5′6-FAM	55	184 202	津研 4 号 中农 19 号
SSR23220	2	F:GTTTGCATGAAAATGGGGAT R:CATCATCTTCTTGGTGGTTCC	5′TAMRA	55	183 195	津美 2 号 北京小刺
SSR20079	2	F:ATCAGCATGTGGTGTGGTGT R:GGGATATGCGTTTGCATTTA	5′HEX	55	138 152	长春密刺 津研 4 号
SSR10518	2	F:TCTAATTCGCTCCGGATGAT R:TTGCAGCGAACAATCCTGTA	5′6-FAM	55	195 207	津研 4 号 中农 6 号
SSR04530	3	F:CCTCTAGACTGAAAAAGAGGGACA R:ATTATTTGGGCCTTTGGGAA	5′TAMRA	55	172 177	中农 19 号 中农 12 号
SSR07131	3	F:TTCTCATGCTTCCTACCGCT R:TTCTATTGGAGGGCTGGTTG	5′TAMRA	55	185 188 205	中农 20 号 中农 19 号 中农 12 号
SSR02771	3	F:AAGTACACCAGCACTTGGGC R:CACACTCTTATGGCTTTCGTCA	5′TAMRA	55	161 166 178	中农 19 号 菏泽线瓜 津研 4 号
SSR06210	3	F:TTGGAAAAGTCGCCAAACTT R:TCCATGTCTGCTTTTGATTCC	5′ROX	55	153 174 187	中农 9 号 春华 1 号 鲁黄瓜 9 号
SSR03820	4	F:AGAGGGCAAATTGGTGAATG R:TCCATCCTGTATGATTTGAGTTG	5′ROX	55	148 160 181	吉杂 16 号 鲁蔬 551 津研 4 号

表 C.1（续）

位点	染色体	引物序列(5′→3′)	荧光染料	退火温度 ℃	等位基因 bp	参照品种
SSR17406	4	F:GAGCCATCCATCAGAGAGAGA R:ACCCACAAGCTTCAGAGGTC	5′HEX	55	130 137 143	津研 4 号 中农 29 号 唐山秋瓜
SSR11043	4	F:AGGTACGAAACAACGGCAAT R:TCGCACTCACTCTTTACCGA	5′ROX	55	165 175 190	春华 1 号 绿衣天使 津研 4 号
SSR22706	4	F:CATAAGCCTTTCAAGCTGGG R:CTGAGGTCTCCTGATGGAGG	5′ROX	55	167 183	吉杂 9 号 长春密刺
SSR07100	5	F:CACACCATTTACGGTTATGGG R:CATTTGGTTCAGAAAGGGGA	5′TAMRA	55	183 194	蔬研 2 号 津研 4 号
SSR21164	5	F:ATCCAAGAGGTTTCCAACGA R:TGGTCAATGAGCTTAGCTTTCTC	5′HEX	55	138 143 161	中农 9 号 中农 12 号 中农 19 号
SSR10348	5	F:TCAATTCCGATTCCATTTCC R:AATTTGGTCCAACCCAACCT	5′TAMRA	55	190 202	津研 4 号 鲁黄瓜 9 号
SSR02118	5	F:GCAGGTCAGCACCTTCAACT R:TCAGGAGGCTTTTTAAGCGA	5′6-FAM	55	192 198	北京小刺 长春密刺
SSR19998	5	F:GGCAAATTCCACAGAGCTTC R:TACGCCCGATATTCTTCGTC	5′ROX	55	165 174	东方明珠 吉杂 9 号
SSR02309	6	F:TGAAATGCCTCTGCAATGAC R:TCATGACTAGACACGCCAGC	5′TAMRA	55	175 184	中农 19 号 津研 4 号
SSR01012	6	F:TCCAAAAATCGCGACCTAAA R:GTGAGCCGTTGATTTCTCGT	5′6-FAM	55	136 147	中农 12 号 中农 19 号
SSR20218	6	F:CTGGTGGGTTTTCTGAAACG R:TCGCCCACGTCCTCTATATC	5′6-FAM	55	183 206	长春密刺 津美 3 号
SSR12994	6	F:AAGTTTATATTACAGTTGCAACAACCA R:TGCACATGTTTAATGGTCCAA	5′ROX	55	177 192	东方明珠 翠绿
SSR16096	6	F:GCGTGCCCTTCTACTGTTTC R:TCAAGCCGATTTCTCTTCGT	5′ROX	55	177 183	绿衣天使 鲁黄瓜 8 号
SSR31399	6	F:CCGAGGATACCCATCTCTGA R:AGAAGAACACCTGGAACAGACA	5′TAMRA	55	160 180	绿衣天使 鲁黄瓜 8 号
SSR30495	6	F:ACCAACTTGTGAAAGGGCAT R:CACATGATTCACTTCCTTTCATTT	5′6-FAM	55	209 218	长春密刺 津研 4 号
SSR15955	6	F:TTTGAGCCTTGAGGCAAAGT R:GCAATTCAACGTAATGGGCT	5′TAMRA	55	189 203	津研 4 号 长春密刺
SSR19918	7	F:CACATGACACAAACACAATTCTT R:GAGTCCCCAAAAGCAATTCA	5′6-FAM	55	193 208 216	长春密刺 北京小刺 迷你 2 号
SSR14861	7	F:ATTTCTTCCCCCACCAAAAC R:ATGAATCCTCCTCCCAGAGC	5′HEX	55	114 156 172	瑞光 2 号 迷你 2 号 唐山秋瓜
SSR03917	7	F:CCCTGCAGCTCTTCTTTGTC R:TGGTTACAGAAGCAAAAGGGA	5′6-FAM	55	174 185	绿衣天使 津研 4 号
SSR20286	7	F:AAACGTCGATCGAGAGAGGA R:AAAGAACCGCCATGTCTTTG	5′6-FAM	55	150 161	绿衣天使 鲁黄瓜 8 号

附 录 D
（资料性附录）
参 照 品 种

参照品种名单见表 D.1。

表 D.1 参照品种名单

序号	参照品种编号	参照品种名称	序号	参照品种编号	参照品种名称
1	D1	中农 6 号	15	D41	吉杂 9 号
2	D2	中农 8 号	16	D42	吉杂 16 号
3	D3	中农 9 号	17	D46	早青 2 号
4	D5	中农 12 号	18	D48	蔬研 2 号
5	D7	中农 19 号	19	D51	迷你 2 号
6	D8	中农 20 号	20	D52	瑞光 2 号
7	D13	中农 29 号	21	D54	唐山秋瓜
8	D28	鲁蔬 551	22	D77	津美 2 号
9	D30	绿衣天使	23	D78	津美 3 号
10	D31	鲁黄瓜 8 号	24	D88	津研 4 号
11	D32	鲁黄瓜 9 号	25	D89	长春密刺
12	D34	春华 1 号	26	D90	北京小刺
13	D36	翠绿	27	D96	菏泽线瓜
14	D38	东方明珠			