ICS 67.080
B 31

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2478—2013

苹果品种鉴定技术规程
SSR分子标记法

Identification of apple 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 …… 2
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 …… 16

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:西北农林科技大学、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人:高华、李硕碧、王立新、杨江龙、赵政阳、陈企村、杜联盟、张丽。

苹果品种鉴定技术规程　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)分子标记进行苹果(*Malus domestica* Borkh.)品种鉴定的试验方法、数据采集及判定方法。

本标准适用于基于 SSR 分子标记的苹果品种 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 19557.1　植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南　总则

GB/T 19557.4　植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南　苹果

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

指人工合成的,多态性、稳定性、重复性等综合特性较好,作为统一用于品种 DNA 指纹鉴定必须选用的一套 SSR 引物。

3.2

参照品种　reference variety

参照品种是指多样性好,核心引物位点扩增片段大小已知的一组品种。参照品种用于比对待测样品在某个 SSR 位点上等位变异扩增片段的大小,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

SSR 广泛分布于苹果基因组中,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特点,设计一对特异引物,利用 PCR(聚合酶链反应,Polymerase chain reaction)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的不同长度的 PCR 扩增片段,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。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苹果品种。

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

参照品种的名单及代码参见附录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，确认无误后使用。

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

9 操作程序

9.1 样品准备

每份样品检测3个单株，进行混合分析。

9.2 DNA提取

a) 称取苹果幼嫩叶片0.25 g，放入－20℃预冷的研钵中，加入液氮迅速研磨多次，至粉末状后，立即装入2 mL离心管中，依次加入1.5 mL预热(70℃)的2% CTAB提取缓冲液、150 μL经预热(70℃)的CTAB / NaCl溶液、45 μL β-巯基乙醇(V∶V)，充分摇匀；

b) 65℃恒温水浴1 h，期间每隔10 min摇动1次。于4℃12 000 *g* 离心15 min；

c) 取上清液，加入等体积的氯仿—异戊醇(24∶1，V∶V)，轻轻颠倒混匀，静置10 min，12 000 *g*，4℃离心15 min；

d) 上清液转入另1个2 mL离心管中，加入2倍体积－20℃预冷的无水乙醇，颠倒混匀，在－20℃下静置30 min；12 000 *g*，4℃离心15 min，弃上清液；

e) 沉淀的DNA用70%乙醇洗涤2次，再用500 μL无水乙醇浸泡清洗1次；弃乙醇，离心管置于超净工作台风干，溶于200 μL双蒸水中，加10 g/L的Rnase 1 μL，37℃温浴30 min；

f) 再加入等体积的氯仿—异戊醇(24∶1，V∶V)，轻轻混匀，12 000 *g* 常温离心15 min；取上清液，加入2倍体积－20℃预冷的无水乙醇，颠倒混匀，－20℃静置30 min；12 000 *g* 常温离心15 min，弃去上清液；

g) 用75 %乙醇浸泡清洗沉淀2次，风干，将沉淀物溶解于200 μL双蒸水中，－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

15 μL的反应体系含每种dNTP 0.20 mmol/ L，正向引物0.27 μmol/ L，反向引物0.27 μmol/ L，Taq DNA聚合酶1.0 U，1×PCR缓冲液(不含Mg^{2+})，$MgCl_2$ 1.5 mmol/ L，样品DNA 6 ng/μL。

利用毛细管电泳荧光检测时使用荧光标记引物。引物的荧光染料种类见附录C。

9.3.2 反应程序

94℃预变性4 min；94℃变性45 s，45℃～60℃(根据附录C推荐的引物退火温度设定)退火45 s，72℃延伸50 s，共35个循环；72℃延伸10 min；4℃保存。

9.4 PCR产物检测

9.4.1 普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)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2块玻璃板互相污染。

9.4.1.2 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。

9.4.1.3 灌胶

在 60 mL 6.0% PAGE 胶液中分别加入 600 μL 10 %的过硫酸铵和 60 μL TEMED，轻轻混匀后，灌胶。灌胶过程中防止出现气泡。待胶液充满玻璃板夹层，将 0.4 mm 厚鲨鱼齿梳齿平齐端向里轻轻插入胶液约 0.4 cm。胶液在室温下聚合 2 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

将玻璃板与电泳槽组装，在正极槽(下槽)中加入 1×TBE 缓冲液 800 mL，在负极槽(上槽)加入 1×TBE 缓冲液 1 000 mL(缓冲液具体用量视电泳槽型号而定)。80 W 恒功率预电泳 30 min。

9.4.1.5 变性

在 PCR 产物中加入 2 μL 6×加样缓冲液，混匀后，在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，迅速置于碎冰上，冷却 10 min。

9.4.1.6 电泳

清除凝胶顶端气泡。将鲨鱼齿梳齿端插入凝胶 2 mm。每一个加样孔点入 2 μL～4 μL 扩增产物，在胶板两侧点入 DNA Marker。除待测样品外，还应同时加入参照品种的扩增产物。在 60 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)。

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：电泳结束后，小心分开 2 块玻璃板，将附着凝胶的玻璃板浸入固定液中，在摇床上 30 *g* 固定 20 min；

b) 漂洗：取出胶板，放入水洗框中，用蒸馏水漂洗 2 次，每次漂洗 30 s；

c) 染色：从水洗框中取出胶板，放入染色液中，在摇床上 30 *g* 染色 20 min；

d) 漂洗：取出胶板，放入水洗框中，用蒸馏水漂洗 1 次，时间不超过 10 s；

e) 显影：将胶板放入显影液中，在摇床上 30 *g* 显影；

f) 定影：待条带清晰后，将胶板放入固定液中定影 5 min；

g) 漂洗：用蒸馏水漂洗胶板 10 s。

9.4.2 毛细管电泳荧光检测

9.4.2.1 样品准备

将 5′FAM 荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍，HEX 荧光标记的 PCR 产物稀释 15 倍，TAMRA 荧光标记的 PCR 产物稀释 10 倍，ROX 荧光标记的 PCR 产物稀释 5 倍。分别取等体积的上述 4 种稀释后 PCR 产物混合，从混合液中吸取 1 μL 加入到 DNA 分析仪专用深孔板孔中。在板中各孔分别加入 0.1 μL LIZ500 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。将样品在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，迅速取出置于碎冰上，冷却 10 min。瞬时离心 10 s 后上机电泳。

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 分析仪自动收集记录毛细管电泳数据。

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 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

将待测样品某一位点扩增片段的带型和移动位置与对应的参照品种进行比较，与待测样品扩增片段带型和移动位置相同的参照品种的片段大小即为待测样品该引物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，读出每个位点每个样品的等位变异大小数据。通过使用参照品种，消除不同型号 DNA 分析仪间可能存在的系统误差。比较参照品种的等位变异大小数据与附录 C 中的相应数据。两者的差数为系统误差的大小。从待测样品的等位变异数据中去除该系统误差，获得的数据即为待测样品的等位变异大小。

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 分别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；无效等位变异的大小记录为 0/0。

示例 1：

一个品种的一个 SSR 位点为纯合位点，等位变异大小为 120 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 120/120。

示例 2：

一个品种的一个 SSR 位点为杂合位点，两个等位变异大小分别为 120 bp 和 126 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 120/126。

11 判定方法

用附录 C 中引物进行检测，将获得的待测品种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 ——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 11 b)和 11 c)情况，按照 GB/T 19557.1 和 GB/T 19557.4 的规定进行田间鉴定。

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 高压灭菌锅。
A.1.2 PCR 扩增仪。
A.1.3 电泳槽及配套的制胶附件。
A.1.4 高压电泳仪。
A.1.5 DNA 分析仪。
A.1.6 台式高速离心机。
A.1.7 凝胶成像系统或紫外透射仪。
A.1.8 水浴锅。
A.1.9 制冰机。
A.1.10 紫外分光光度计。
A.1.11 微量移液器。
A.1.12 水平摇床。
A.1.13 胶片观察灯。
A.1.14 电子天平（精确到 0.01 g）。
A.1.15 酸度计。

A.2 试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯试剂。

A.2.1 乙二胺四乙酸二钠（EDTA）。
A.2.2 三羟甲基氨基甲烷（Tris）。
A.2.3 浓盐酸。
A.2.4 氢氧化钠。
A.2.5 去离子甲酰胺。
A.2.6 溴酚蓝。
A.2.7 二甲苯青。
A.2.8 氯仿。
A.2.9 异戊醇。
A.2.10 甲叉双丙烯酰胺。
A.2.11 丙烯酰胺。
A.2.12 硼酸。
A.2.13 尿素。

A.2.14 亲和硅烷。

A.2.15 剥离硅烷。

A.2.16 二甲基二氯硅烷。

A.2.17 无水乙醇。

A.2.18 四甲基乙二胺(TEMED)。

A.2.19 过硫酸铵(APS)。

A.2.20 冰醋酸。

A.2.21 硝酸银。

A.2.22 甲醛。

A.2.23 十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)。

A.2.24 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

A.2.25 缓冲液(不含 Mg^{2+})。

A.2.26 四种脱氧核苷酸(dNTPs)。

A.2.27 *Taq* DNA 聚合酶。

A.2.28 SSR 引物。

A.2.29 去离子水。

A.2.30 LIZ-500 分子量内标。

A.2.31 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液。

A.2.32 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.2.33 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

DNA 提取溶液的配置使用超纯水。

B.1.1 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取 40.0 g 氢氧化钠，溶于 800 mL 水中，冷却至室温，定容至 1 000 mL。

B.1.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液（pH 8.0）

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠盐，加入 800 mL 水，再加入 20 g 氢氧化钠，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（1 mol/L）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.1.3 0.5 mol/L 盐酸（HCl）溶液

量取 25 mL 浓盐酸置于容量瓶中，加水定容至 500 mL。

B.1.4 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（pH 8.0）

称取 60.55 g Tris 碱溶于约 400 mL 水中，加盐酸溶液（0.5 mol/L）调 pH 至 8.0，加水定容至 500 mL，在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

B.1.5 2%（*W*/*V*）十六烷基三甲基溴化铵（2×CTAB）溶液

分别称取 20 g 十六烷基三甲基溴化铵、81.816 g 氯化钠和 20 g 聚乙烯吡咯烷酮溶于约 700 mL 水中，加入 100 mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（1 mol/L，pH 8.0）和 40 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（0.5 mol/L，pH 8.0），加水定容至 1 000 mL。

B.1.6 5 mol/L NaCl 溶液

称取 292.2 g 氯化钠，加入 750 mL 水中，在磁力搅拌器上搅拌溶解，加水定容至 1 000 mL，在 103.4 kPa 灭菌 20 min。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

PCR 扩增相关溶液的配制使用超纯水。

B.2.1 SSR 引物稀释

开盖前瞬时离心 10 s，按说明书分别配制前引物和后引物终浓度均 100 μmol/L 的储存液，各取 10 μL 混合，加 80 μL 水定容至终浓度各 10 μmol/L 的工作液。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液的配制

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液的配制使用超纯水。

B.3.1 40%（*W*/*V*）丙烯酰胺溶液

分别称取 190 g 丙烯酰胺和 10 g 甲叉双丙烯酰胺溶于约 400 mL 水中，加水定容至 500 mL，置于棕色瓶中 4℃储存。

B.3.2 6.0%变性 PAGE 胶

称取 42 g 尿素溶于约 60 mL 水中，分别加入 10 mL 10×TBE 缓冲液、15 mL 40%丙烯酰胺溶液、

150 μL 10%过硫酸铵(新鲜配制)和 50 μL 四甲基乙二胺,加水定容至 100 mL。

B.3.3 亲和硅烷工作液

吸取 1 mL 无水乙醇,加入 10 μL 亲和硅烷和 10 μL 冰醋酸,混匀。

B.3.4 剥离硅烷工作液

量取 2 mL 的二甲基二氯硅烷,加 8 mL 的三氯甲烷,混匀。

B.3.5 10%过硫酸铵溶液

称取 0.1 g 过硫酸铵溶于 1 mL 水中。

B.3.6 10×TBE 缓冲液

分别称取 108 g 三羟甲基氨基甲烷和 55 g 硼酸溶于约 800 mL 水中,加入 37 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(0.5 mol/L),加水定容至 1 000 mL。

B.3.7 1×TBE 缓冲液

量取 500 mL 的 10×TBE 缓冲液,加水定容至 5 000 mL。

B.3.8 6×加样缓冲液

分别称取 0.125 g 溴酚蓝和 0.125 g 二甲苯青,置于烧杯中,加入 49 mL 去离子甲酰胺和 1 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(0.5 mol/L,pH 8.0),搅拌混匀。

B.4 银染溶液的配制

银染溶液的配置使用蒸馏水。

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,溶于 1 000 mL 水中。

B.4.3 显影液

称取 10 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 水中,用前加 2 mL 甲醛。

附 录 C
(规范性附录)
核 心 引 物

核心引物(35 对)见表 C.1。

表 C.1 核心引物(35 对)

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
CH03d07	6	正向引物： CAAATCAATGCAAAACTGTCA 反向引物： GGCTTCTGGCCATGATTTTA	5′FAM	48	182	6
					184	32
					186	20
					188	3
					198	4
					202	12
					214	6
					220	25
					222	5
					224	35
NZ02b1	15	正向引物： CCGTGATGACAAAGTGCATGA 反向引物： ATGAGTTTGATGCCCTTGGA	5′FAM	53	137	17
					211	13
					215	37
					225	39
					227	20
					233	35
					235	40
CH05c04	13	正向引物： CCTTCGTTATCTTCCTTGCATT 反向引物： GAGCTTAAGAATAAGAGAAGGGG	5′HEX	53	168	17
					178	15
					182	4
					190	10
					196	2
					204	8
					206	36
					212	6
					214	14
					254	38
Hi12c02	1	正向引物： GCAATGGCGTTCTAGGATTC 反向引物： GTTTCACCAACAGCTGGGACAAG	5′TAMRA	57	154	31
					169	27
					178	38
					181	13
					190	8
					214	14

表 C.1（续）

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
CH05c07	9	正向引物： TGATGCATTAGGGCTTGTACTT 反向引物： GGGATGCATTGCTAAATAGGAT	5′ROX	52	112 122 126 134 138 140 148 150 168 178 190	9 5 34 5 3 9 8 5 9 15 15
CH04a12	11	正向引物： CAGCCTGCAACTGCACTTAT 反向引物： ATCCATGGTCCCATAAACCA	5′HEX	53	161 169 173 175 178 181 184 192 194 202	9 6 3 2 4 15 38 34 11 37
CH04c10	17	正向引物： GGGTTAGGTTGTCTTCTCTCCT 反向引物： GCTTCTCGGGTGAGTTTTTC	5′TAMRA	54	121 131 133 135 141 147 155 159 163 167 173 179 185 187	13 7 20 8 26 2 9 4 26 24 9 11 32 4
CH02g09	8	正向引物： TCAGACAGAAGAGGAACTGTATTTG 反向引物： CAAACAAACCAGTACCGCAA	5′ROX	53	108 112 120 136 138 154 168	5 6 6 20 5 14 10
CH01g05	14	正向引物： CATCAGTCTCTTGCACTGGAAA 反向引物： GACAGAGTAAGCTAGGGCTAGGG	5′HEX	58	134 136 140 142 148 154 164	13 12 27 7 13 20 6 7

表 C.1（续）

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
CH04e03	5	正向引物： TTGAAGATGTTTGGCTGTGC 反向引物： TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	5′FAM	54	176 186 194 196 200 202 206 208 220	20 1 4 7 21 26 5 6 10
CH04d08	11	正向引物： AATTCCACATTCACGCATCT 反向引物： TTGAAAGACGGAAACGATCA	5′TAMRA	49	114 116 120 124 130 132 134 136 140	29 10 20 10 40 26 40 23 7
CH04f10	16	正向引物： GTAATGGAAATACAGTTTCACAA 反向引物： TTAAATGCTTGGTGTGTTTTGC	5′FAM	50	185 191 213 221 227 237 239 241 243 245 249	36 32 18 4 1 20 9 28 11 13 7
CH04g07	11	正向引物： CCCTAACCTCAATCCCCAAT 反向引物： ATGAGGCAGGTGAAGAAGGA	5′TAMRA	55	149 151 153 159 165 171 173 175 177 181	20 39 3 13 8 3 40 15 38 9
CH01f03b	9	正向引物： GAGAAGCAAATGCAAAACCC 反向引物： CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	5′HEX	56	136 142 150 158 162 170 176 178 182	8 4 30 3 26 5 17 3 26

表 C.1（续）

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
CH02d08	11	正向引物： TCCAAAATGGCGTACCTCTC 反向引物： GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	5′FAM	57	193 203 209 213 215 221 223 225 227 249 251 253	24 8 1 13 2 19 1 16 19 6 36 7
Hi03c05	17	正向引物： GAAGAGAGAGGCCATGATAC 反向引物： GTTTAACTGAAACTTCAATCTAGG	5′HEX	53	175 187 189 191 195 197 201 205 209 215 217	1 13 34 7 4 36 3 29 30 26 33
CH01f09	8	正向引物： ATGTACATCAAAGTGTGGATTG 反向引物： GGCGCTTTCCAACACATC	5′ROX	54	124 130 132 136 142	19 14 2 20 2
Hi02d04	10	正向引物： TGCTGAGTTGGCTAGAAGAGC 反向引物： GTTTAAGTTCGCCAACATCGTCTC	5′FAM	54	214 220 226 228 230 236 240 242 246 262 266	37 34 20 26 35 36 32 6 40 13 40
CH01d08	15	正向引物： CTCCGCCGCTATAACACTTC 反向引物： TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	5′FAM	53	226 238 248 252 270	7 21 12 2 12

表 C.1（续）

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
Hi04g05	13	正向引物： CTGAAACAGGAAACCAATGC 反向引物： GTTTCGTAGAAGCATCGTTGCAG	5′HEX	54	191 221 223 225 227 233 243 247 253	33 14 36 37 40 4 40 20 37
CH05g03	17	正向引物： GCTTTGAATGGATACAGGAACC 反向引物： CCTGTCTCATGGCATTGTTG	5′TAMRA	54	134 160 162 166 170 184 192 194 226	11 7 11 12 3 26 13 38 15
CH03d12	6	正向引物： GCCCAGAAGCAATAAGTAAACC 反向引物： ATTGCTCCATGCATAAAGGG	5′ROX	53	99 113 115 119 121 129 133 135 145 151	3 40 3 7 38 13 24 32 6 26
Hi03e03	3	正向引物： ACGGGTGAGACTCCTTGTTG 反向引物： GTTTAACAGCGGGAGATCAAGAAC	5′HEX	56	169 173 175 183 185 190 192 194 196	4 1 3 7 5 33 9 32 33
Hi03d06	3	正向引物： TCATGGATCATTTCGGCTAA 反向引物： GTTTGCCAATTTTATCCAGGTTGC	5′ROX	53	114 116 132 145 147 154 169 171	26 30 30 3 9 3 33 10

表 C.1（续）

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
CH04g12		正向引物： CACCGATGGTGTCAACTTGT 反向引物： CAACAAAATGTGATCGCCAC	5′TAMRA	54	141	28
					150	12
					152	15
					154	8
					156	15
					160	10
					162	11
					168	36
					170	26
					178	36
					190	32
					196	32
CH01f07a	10	正向引物： CCCTACACAGTTTCTCAACCC 反向引物： CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	5′HEX	56	169	33
					173	30
					175	3
					185	24
					187	8
					189	32
					192	21
					196	3
					200	24
CH02c02a	2	正向引物： CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA 反向引物： TAGGGCACACTTGCTGGTC	5′TAMRA	56	121	9
					123	14
					129	5
					131	34
					143	34
					146	36
					159	37
					166	3
					169	9
					173	10
					176	4
					178	7
					180	13
					186	30
CH05e06	5	正向引物： ACACGCACAGAGACAGAGACAT 反向引物： GTTGAATAGCATCCCAAATGGT	5′TAMRA	55	126	13
					134	20
					136	32
					143	21
					147	40
					149	35
					153	26
					165	6

表 C.1（续）

位点	连锁群	引物序列(5′→3′)	荧光	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种代码
CH05d03	14	正向引物： TACCTGAAAGAGGAAGCCCT 反向引物： TCATTCCTTCTCACATCCACT	5′FAM	55	153 157 159 161 165 167 169 175 181	5 32 3 3 38 25 2 40 7
Hi22f06	16	正向引物： CAATGGCGTCTGTGTCACTC 反向引物： GTTTACGACGGGTAAGGTGATGTC	5′FAM	55	234 236 240	27 31 10
Hi02c07	1	正向引物： AGAGCTACGGGGATCCAAAT 反向引物： GTTTAAGCATCCCGATTGAAAGG	5′ROX	56	106 108 110 113 115 117 150	33 13 32 22 31 20 13
CH04e02	4	正向引物： GGCGATGACTACCAGGAAAA 反向引物： ATGTAGCCAAGCCAGCGTAT	5′TAMRA	54	142 146 151 153 155 159 167	20 32 6 21 20 5 14
CH04e05	7	正向引物： AGGCTAACAGAAATGTGGTTTG 反向引物： ATGGCTCCTATTGCCATCAT	5′HEX	54	173 196 200 202 206 208 214 220 228	4 11 20 11 14 13 21 26 6
CH02c09	15	正向引物： TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC 反向引物： AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	5′FAM	55	229 235 239 241 245 251 253 256	4 8 10 18 12 9 4 11
CH04d02	12	正向引物： CGTACGCTGCTTCTTTTGCT 反向引物： CTATCCACCACCCGTCAACT	5′ROX	56	112 120 122 133 148	2 13 4 13 22

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

品种代码	参照品种	品种代码	参照品种	品种代码	参照品种
1	乔纳金 Jonagold	15	甜黄魁 Tianhuangkui	29	卡米欧 Cameo
2	金冠 Golden Delicious	16	红盖露 Honggailu	30	红宝石 Hongbaoshi
3	澳洲青苹 Granny Smith	17	北斗 Hokudo	31	摩里士 Mollie's Deli
4	秦阳 Qinyang	18	新红星 Starkrinson	32	泰山早霞 Taishanzaoxia
5	国光 Ralls	19	陆奥 Mutsu	33	萌 Kizashi
6	珊夏 Sansa	20	自由 Liberty	34	秋锦 Qiujin
7	信浓红 Xinnonghong	21	华脆 Huacui	35	倭锦 Ben Davis
8	松本锦 Songbenjin	22	华硕 Huashuo	36	丹霞 Danxia
9	东光 Toko	23	千秋 Senshu	37	南方脆 GS330
10	甘露 Tallman's Sweet	24	夏艳 Xiayan	38	秦星 Qinxing
11	秦艳 Qinyan	25	世界一 Sekaiichi	39	早捷 Geneva Early
12	君袖 Northern Spy	26	迎秋 Yingqiu	40	长富 2 号 Fuji 2
13	华金 Huajin	27	锦红 Jinhong		
14	金世纪 Jinshiji	28	岱绿 Dailv		