|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 65.020.01 |
| CCS  | B 05 |

|  |
| --- |
| NY |

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—2024

芒果品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of mango varieties－SSR markers method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

 (征求意见稿)

（本草案完成时间：2024年4月20日）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

       发布

1. 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：中国热带农业科学院南亚热带作物研究所、中国热带农业科学院三亚研究院。

本文件主要起草人：武红霞、郑斌、马小卫、许文天、闫锦源、王松标、詹儒林、何小龙、李颖。

芒果品种鉴定 SSR分子标记法

* 1. 范围

本文件规定了利用简单重复序列（SSR）进行芒果(*Mangifera indica* L.)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。

本文件适用于芒果品种DNA分子数据采集、数据库构建和品种鉴定。

* 1. 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

* 1. 术语和定义

NY/T 2594界定的术语和定义适用于本文件。

* 1. 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）。

* 1. 原理

芒果品种基因组存在大量能够稳定遗传的SSR标记，不同芒果品种在同一SSR位点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，进而区分不同的品种。

* 1. 主要仪器设备及试剂

主要仪器设备及试剂见附录A。

* 1. 溶液配制

溶液配制方法见附录B。

* 1. 引物信息及使用

引物序列见附录C，引物相关信息见附录D。利用变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板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。

* 1. 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。

* 1. 操作程序
		1. 样品准备

送检样品为芒果的叶片或其他等效物，每份样品至少随机抽取3个单株，等量混合分析，必要时进行个体检测。

* + 1. DNA提取

取混合样本约100 mg，置于2.0 mL离心管中，液氮冷冻后充分研磨；每管加入600 *µ*L预热到65 ℃的CTAB提取液，充分混合，65 ℃水浴45 min~60 min，每隔15 min轻缓颠倒混匀，水浴后12 000 rpm离心10 min。吸取上清液转移至新的离心管中，每管加入等体积的三氯甲烷和异戊醇混合液，轻缓混匀后静置10 min，12 000 rpm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 ℃放置30 min，DNA沉淀后12 000 rpm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，室温晾干，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 ℃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。

* + 1. PCR扩增
			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×缓冲液(含MgCl2) | 10× | 1× | 2.0 |
| dNTPs | 2.5 mmol/L | 0.2 mmol/L | 1.6 |
| *Taq*酶 | 5 U/µL | 0.05 U/µL | 0.2 |
| 正向引物 | 10 µmol/L | 0.25 μmol/L | 0.5 |
| 反向引物 | 10 µmol/L | 0.25 μmol/L | 0.5 |
| DNA | 20 ng/µL | 2.0 ng/µL | 2.0 |
| 双蒸水 | - | - | 13.2 |
| 总体积 | 20.0 |

* + - 1. 反应程序

推荐反应程序：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共35个循环；72 ℃延伸10 min，产物4 ℃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。

* + 1. PCR产物电泳
			1. 垂直板变性PAGE
				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。

* + - * 1. 变性

在20 *µ*L PCR产物中加入4 *µ*L 6×加样缓冲液，混匀。在PCR扩增仪上运行95 ℃变性5 min，4 ℃冷却10 min以上备用。

* + - * 1. 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×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 *µ*L~5 *µ*L样品。除送检样品外，还宜同时加入参照品种扩增产物和合适的DNA分子量标准。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 % 变性PAGE胶电泳的移动位置与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 ± 30）bp、（150 ± 30）bp、（200 ± 30）bp范围的，电泳参考时间分别为1.5 h、2.0 h、2.5 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。

* + - * 1. 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。

1. 固定液、染色液、双蒸水和显影液的用量，以淹没胶面为准。
	* + 1. 荧光毛细管电泳
				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 *µ*L混合液加入DNA分析仪配套上样板中。

1. 稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。
	* + - 1. 变性

上样板各孔分别加入0.1 *µ*L分子量内标和8.9 *µ*L去离子甲酰胺，在PCR扩增仪上95 ℃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。

* + - * 1. 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电泳，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。

* 1. 结果判定与表述
		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”。

* + 1. 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 。

1.
2. （规范性）
仪器设备及试剂
	1. 主要仪器设备
		1. PCR扩增仪
		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。
		3. 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
		4. 离心机。
		5. 水平摇床。
		6. 胶片观察灯。
		7. 电子天平：感量为0.1 g和0.01 g。
		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。
		9. 磁力搅拌器。
		10. 核酸浓度测定仪或超微量紫外分光光度计。
		11. 微波炉。
		12. 高压灭菌锅。
		13. 酸度计。
		14. 水浴锅。
		15. 低温冰箱。
		16. 制冰机。
		17. 凝胶成像系统或紫外透射仪。
		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。
		19. 其他相关仪器和设备。
	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，C16H33(CH3)3NBr，CAS号：57-09-0]。

A.2.2 三氯甲烷（CHCl3，CAS号：67-66-3）。

A.2.3 异戊醇（C5H12O，CAS号：123-51-3）。

A.2.4 异丙醇[(CH3)2CHOH，CAS号：67-63-0]。

A.2.5 乙二胺四乙酸二钠（EDTA-Na，C10H14N2Na2O8，CAS号：139-33-3）。

A.2.6 三羟甲基氨基甲烷（Tris，C4H11NO3，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Mg2+ 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（CH3NO，CAS号：75-12-7）。

A.2.16 溴酚蓝（C19H10Br4O5S，CAS号：115-39-9）。

A.2.17 二甲苯青（C25H27N2NaO6S2，CAS号：2650-17-1）。

A.2.18 甲叉双丙烯酰胺[(H2C=CHCONH)2CH2，CAS号：110-26-9]。

A.2.19 丙烯酰胺（C3H5NO，CAS号：79-06-1）。

A.2.20 硼酸（H3BO3，CAS号：10043-35-3）。

A.2.21 尿素（CH4N2O，CAS号：57-13-6）。

A.2.22 亲和硅烷。

A.2.23 二甲基二氯硅烷（C2H6Cl2Si，CAS号：75-78-5）。

A.2.24 无水乙醇（C2H6O，CAS号：64-17-5）。

A.2.25 四甲基乙二胺（TEMED，C6H16N2，CAS号：110-18-9）。

A.2.26 过硫酸铵[APS，(NH4)2S2O8，CAS号：7727-54-0]。

A.2.27 冰醋酸（CH3COOH，CAS号：64-19-7）。

A.2.28 硝酸银（AgNO3，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，包括６-FAM、TAMRA、HEX和ROX４种荧光标记。

1. （规范性）
溶液配置

试剂配制用水应符合标准GB/T6682的要求。

* 1. DNA提取溶液的配制
		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 ℃高压灭菌20 min。

* + 1. 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。

* + 1. 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1000 mL。

* + 1. 1 moI/L Tris-HCl溶液

称取121.1 g Tris碱溶于800 mL水中，加HCl盐酸溶液（0.5 mol/L）调pH至8.0，定容至1000 mL，121 ℃高压灭菌20 min。

* + 1. CTAB提取液

称取20.0 g CTAB、81.8 g NaCl, 置于烧杯中，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 ℃高压灭菌20 min。

* + 1. 氯仿-异戊醇（24:1）

分别量取240 mL 氯仿和100 mL 异戊醇，将两者混匀。

* + 1. 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，在121 ℃高压灭菌20 min，4℃保存。

* 1. PCR 扩增试剂的配制
		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 ℃高压灭菌20 min，-20 ℃保存。

* + 1. 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均为100 *µ*mol/L的储存液，取10 *µ*L加90 *µ*LTE缓冲液配制成终浓度10 *µ*mol/L的工作液。

* 1. 变性PAGE试剂的配制
		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 ℃储存。

* + 1. 质量分数为6.0%的变性PAGE胶溶液

称取420.0 g尿素置于1 000 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。

* + 1. 亲和硅烷缓冲液

分别量取99.5 mL无水乙醇和500 *µ*L冰醋酸，加水定容至100 mL。

* + 1. 亲和硅烷工作液

分别量取1 mL亲和硅烷缓冲液和5 *μ*L亲和硅烷原液，混匀。

* + 1. 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。

* + 1. 质量分数为10%的APS溶液

称取1.0 gAPS溶于10 mL水中，混匀，于4℃保存（不超过5天）。

* + 1. **10×TBE**缓冲液

称取Tris108.0 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。

* + 1. **1×TBE**缓冲液

量取50 mL 10×TBE 缓冲液，加水定容至500 mL，混匀。

* + 1. **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 0.5 mol/L EDTA溶液（0.5 mol/L，pH 8.0），搅拌溶解。

* 1. 银染溶液的配制
		1. 固定液

量取100 mL冰醋酸，加水定容至1 000 mL。

* + 1. 染色液

称取1.0 g硝酸银，加水定容到1000 mL。

* + 1. 显影液

称取20.0 g氢氧化钠溶于1 000 mL水中，用前加2 mL甲醛。

1. （规范性）
引物及序列

引物及序列见C.1。

* 1. 引物及序列

| 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 | G33 | 1 | GCCATAAGTATTGCGAGCGC | ACGCCTAGTGGTGAAGAAGC |
| 2 | G111 | 1 | TGGCGGGAGATTCCAAATCG | GTTGAGCTTGCACATGGTGG |
| 3 | G216 | 2 | AGATCCCTGCCAAAAGCTCC | CAGCATGGAGGAGAATGTTAACG |
| 4 | G304 | 3 | TCTTCCAACTCCTCAACTGAGC | AGAGTGAGAACCTGGCAAGC |
| 5 | G386 | 4 | CGGCGAGTTGAGAAACAAAGG | TCCACAGAACACCAACTCCC |
| 6 | G440 | 4 | AACGAAAACCAGGCATCACC | GTTTATGGCAATTGCAGCAGC |
| 7 | G573 | 5 | GACCCACAGTGATTGTCTTTCC | CATGGTTTTCGTGTTGGGCC |
| 8 | G584 | 5 | AGACACTCCACAAGCTGTGC | TTGGAGTGTTGGAGTTGCCC |
| 9 | G589 | 5 | TTGATCCTTGAGCCTGAGGG | AACTCAAGCACCAGGACTGC |
| 10 | G676 | 6 | CCCAGTTGAAAATATGGGTTCCC | TCCACCGCTGAAACAACTCG |
| 11 | G744 | 7 | AGATGGACGGTTGAGGTTGC | TTCCCCCTTAAATGGCCACC |
| 12 | G824 | 8 | GCAAGCGCATGAAGTATGACC | TGCTCCCCAATTTCCATTTTGC |
| 13 | G833 | 8 | ACCATCATCACCATTCCCCC | ACTGCCACTCTGTTCCTTCG |
| 14 | G886 | 9 | GCCTGTGCATTCATCAACCG | ACCCATTGGAGATGGTCTGC |
| 15 | ES83 | 9 | TCCAAATGTTGCAGCCTATTTAC | ATTATGTCCAGATTCACCATTCG |
| 16 | G1028 | 10 | ATCCGGTGCTGATCATCAGG | TCCTGGATGAAACCTTGGAGC |
| 17 | G1077 | 11 | AGTTTGGCACCTCTTGGAGC | TTCCTCTTCACCCGAACTCG |
| 18 | G1097 | 11 | TGGAAAGCCTTTGCAATCCC | TCAATCTTGGGACCAGCACC |
| 19 | G1134 | 11 | CACATTGTCCCAACATGCCC | GAGCAGCACACAACTTGAGG |
| 20 | G1151 | 12 | GTCAGATGTTGTCCGCATGC | TCATCGTCCATTCCTGTGCC |
| 21 | G1212 | 12 | TGTCAATCAGGTCTCGTCGG | TCGATGAGTCAATCCACCGC |
| 22 | G1234 | 13 | TCGTTTTTCCCTTCCTTCCCC | AGGGGAAGCACAGAGAATCG |
| 23 | G1268 | 13 | ACCTCATGAGTGCCGTAACG | TAAAGCCACAACGACATCGC |
| 24 | G1342 | 14 | TGGACTCGACATCCTGAAGC | CTTCACCGCTTTGTCAAGGG |
| 25 | G1360 | 14 | GCAACTCAACTGGTTCAGTGC | AATGGAGGCTTCTGGTACGC |
| 26 | G1382 | 15 | TCCACGGTGGATGATGTAGC | GAAGATTCAGCAAGCCAGACG |
| 27 | G1424 | 15 | AGGATTCCATCACCGAAGCC | CCTTTTGTTGCAGGGTTGGG |
| 28 | G1450 | 16 | ATGCTTCACCAAAACGACGC | CAAACAGAGCAACAGAACGGG |
| 29 | G1454 | 16 | AAAAGGAGGACGGTTTGGGG | GTACCCACCAAATTAGGCGC |
| 30 | G1527 | 17 | CACCCGTCTTGAACCTCTCC | TCAGGCAAATGAGTGCTGGG |
| 31 | G1617 | 18 | CAAACACGAAGACGACGACG | TCGCCGTTGTCCATATTCCC |
| 32 | G1666 | 19 | TATAACGCTGGACACGACGC | GCCAAACCTTGACTTCATTACAGG |
| 33 | G1745 | 20 | TGAGTGTGCCCAATGTTTGC | CAAGCCCAAACCCAATCACC |
| 34 | G1783 | 20 | GGAAGTTGCAGCAATAAGGGG | ACCACACATCCTGAGCAACC |

1. （资料性）
引物相关信息

引物相关信息见表D.1。

* 1. 引物相关信息

| 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 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| G33 | FAM | 170~191 | 170 | 热农1号 |
| 176 | Haden |
| 185 | 椰香 |
| 188 | 斯里兰卡811 |
| 191 | Neelum |
| G111 | FAM | 88~117 | 88 | Keitt |
| 102 | 金煌 |
| 108 | 椰香 |
| 114 | Neelum |
| 117 | 热农1号 |
| G216 | FAM | 121~136 | 121 | 金煌 |
| 127 | Keitt |
| 130 | 椰香 |
| 136 | 台农1号 |
| G304 | FAM | 112~118 | 112 | 桂热芒82号 |
| 115 | 金煌 |
| 118 | Keitt |
| G386 | ROX | 144~156 | 144 | Neelum |
| 150 | Haden |
| 156 | 金煌 |
| G440 | HEX | 124~130 | 124 | 金煌 |
| 127 | Neelum |
| 130 | Haden |
| G573 | TAMRA | 123~150 | 123 | 桂热芒82号 |
| 135 | 热农1号 |
| 138 | 金白花 |
| 150 | 台农1号 |
| G584 | TAMRA | 96~111 | 96 | Haden |
| 105 | Neelum |
| 108 | 热农1号 |
| 111 | 椰香 |
| G589 | ROX | 164~182 | 164 | 斯里兰卡811 |
| 170 | 金白花 |
| 176 | 台农1号 |
| 182 | 斯里兰卡811 |
| G676 | ROX | 184~221 | 184 | 椰香 |
| 190 | 台农1号 |
| 196 | 斯里兰卡811 |
| 202 | Neelum |
| 208 | Haden |
| 221 | Gedong R |
| G744 | HEX | 145~174 | 145 | 金煌 |
| 154 | 台农1号 |
| 162 | 斯里兰卡811 |
| 165 | 桂热芒82号 |
| 174 | 椰香 |
| G824 | FAM | 101~107 | 101 | 热农1号 |
| 104 | Keitt |
| 107 | 椰香 |
| G833 | HEX | 133~151 | 133 | Gedong R |
| 139 | 斯里兰卡811 |
| 145 | 热农1号 |
| 151 | Neelum |
| G886 | ROX | 130~148 | 130 | Gedong R |
| 142 | 台农1号 |
| 148 | Neelum |
| ES83 | HEX | 139~148 | 139 | 椰香 |
| 142 | 金煌 |
| 145 | Keitt |
| 148 | 桂热芒82号 |
| G1028 | TAMRA | 100~117 | 100 | 台农1号 |
| 111 | 斯里兰卡811 |
| 114 | 金煌 |
| 117 | 椰香 |
| G1077 | TAMRA | 120~139 | 120 | 热农1号 |
| 126 | 斯里兰卡811 |
| 132 | 桂热芒82号 |
| 139 | 金白花 |
| G1097 | ROX | 132~150 | 132 | 红芒6号 |
| 138 | 斯里兰卡811 |
| 144 | 金白花 |
| 150 | 台农1号 |
| G1134 | FAM | 107~125 | 107 | 台农1号 |
| 112 | 热农1号 |
| 118 | Keitt |
| 125 | 金煌 |
| G1151 | FAM | 194~205 | 194 | Neelum |
| 197 | 台农1号 |
| 202 | 椰香 |
| 205 | 桂热芒82号 |
| G1212 | ROX | 135~148 | 135 | 热农1号 |
| 138 | 金煌 |
| 141 | Keitt |
| 148 | 椰香 |
| G1234 | FAM | 88~112 | 88 | 金白花 |
| 94 | 金煌 |
| 100 | 台农1号 |
| 106 | 椰香 |
| 112 | 斯里兰卡811 |
| G1268 | ROX | 156~168 | 156 | 斯里兰卡811 |
| 162 | 台农1号 |
| 168 | 椰香 |
| G1342 | FAM | 165~183 | 165 | 斯里兰卡811 |
| 171 | 椰香 |
| 177 | Neelum |
| 183 | Haden |
| G1360 | TAMRA | 127~136 | 127 | 热农1号 |
| 130 | 椰香 |
| 133 | Haden |
| 136 | 台农1号 |
| G1382 | FAM | 107~119 | 107 | 热农1号 |
| 110 | Haden |
| 113 | Keitt |
| 116 | Neelum |
| 119 | 金煌 |
| G1424 | TAMRA | 88~112 | 88 | Keitt |
| 103 | 台农1号 |
| 106 | 椰香 |
| 112 | Neelum |
| G1450 | TAMRA | 104~116 | 104 | GEDONG |
| 108 | 椰香 |
| 112 | 桂热82号 |
| 116 | 金煌 |
| G1454 | FAM | 118~136 | 118 | 台农1号 |
| 121 | 红芒6号 |
| 127 | Neelum |
| 130 | Keitt |
| 133 | Haden |
| 136 | 斯里兰卡811 |
| G1527 | FAM | 187~193 | 187 | 台农1号 |
| 190 | Keitt |
| 193 | 热农1号 |
| G1617 | FAM | 111~120 | 111 | 金白花 |
| 114 | Keitt |
| 117 | 椰香 |
| 120 | 金煌 |
| G1666 | HEX | 115~124 | 115 | 椰香 |
| 118 | Haden |
| 124 | 热农1号 |
| G1745 | ROX | 117~132 | 117 | Keitt |
| 123 | 金煌 |
| 126 | 桂热芒82号 |
| 129 | 椰香 |
| 132 | 热农1号 |
| G1783 | TAMRA | 127~148 | 127 | 热农1号 |
| 130 | 椰香 |
| 133 | Haden |
| 148 | Neelum |
| 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。注2：附录D中未包含的等位变异，应按本文件方法，确定其大小和相应参照品种。注3：附录D中所列参照品种仅为示例，与参照品种具有相同等位变异的其他品种也可用作该等位变异的参照品种。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。 |

1. （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 |
| --- | --- | --- |
| 1 | 金煌 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 2 | 热农1号 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 3 | Keitt | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 4 | 桂热芒82号 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 5 | 金白花 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 6 | 台农1号 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 7 | GeDong R | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 8 | 斯里兰卡811 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 9 | 椰香 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 10 | 红芒6号 | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 11 | Haden | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |
| 12 | Neelum | 国家热带果树种质资源圃（湛江） |

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 | FAM标记引物 | ROX标记引物 | HEX标记引物 | TAMRA标记引物 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | G1234（88~112） | G589（164~182） | G440（124~130） | G584（96~111） |
| G1527（187~193） |  |  |  |
| 2 | G824（101~107） | G1212（135~148） | G1666（115~124） | G1454（118~136） |
| G33（170~191） |  |  |  |
| 3 | G1134（107~125） | G1745（117~132） | ES83（139~148） | G1028（100~117） |
| G1342（165~183） |  |  |  |
| 4 | G304（112~118） | G676（184~221） | G833（133~151） | G1424（88~112） |
| 5 | G216（121~136） | G886（130~148） | G744（145~174） | G1450（104~116） |
| G1151（194~205） |  |  |  |
| 6 | G1382（107~119） | G386（144~156） | G1077（120~139） | G1360（127~136） |
| 7 | G1617（111~120） | G1268（156~168） |  | G1783（127~148） |
| 8 | G111（88~117） | G1097（132~150） |  | G573（123~150） |
| 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。注3：可结合引物等位变异范围，更换荧光标记，调整分组。 |  |

