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

|  |
| --- |
|  |

中华人民共和国农业行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

木薯品种鉴定技术规程 SSR分子标记法

Protocol for identification of Cassava varieties verification

SSR markers method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中华人民共和国农业农村部  发布

目次

[前言 II](#_Toc93066292)

[1 范围 1](#_Toc93066293)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc93066294)

[3 术语和定义 1](#_Toc93066295)

[4 原理 1](#_Toc93066296)

[5 仪器设备及试剂 2](#_Toc93066297)

[6 溶液配制 2](#_Toc93066298)

[7 引物 2](#_Toc93066299)

[8 参照品种及其使用 2](#_Toc93066300)

[9 操作步骤 2](#_Toc93066301)

[10 等位变异数据采集 4](#_Toc93066302)

[11 判定方法 5](#_Toc93066303)

[附录A（规范性） 主要仪器设备及试剂 6](#_Toc93066304)

[附录B（规范性） 溶液配制 8](#_Toc93066305)

[附录C（规范性） 核心引物 11](#_Toc93066306)

[附录D](#_Toc93066308)[（规范性） 参照品种 17](#_Toc93066309)

[附录E](#_Toc93066311)[（资料性） 核心引物分组 19](#_Toc93066312)

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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部农垦局提出。

本标准由农业农村部热带作物及制品标准化技术委员会热带经济作物分技术委员会归口。

本标准起草单位：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所。

本标准主要起草人：王明、肖鑫辉、叶剑秋、王琴飞、张洁、薛茂富、应东山、张如莲、韦卓文、高玲、刘迪发、徐丽。

木薯品种鉴定技术规程 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）分子标记进行木薯（*Manihot esculenta* Crantz）品种鉴定的试验方法、数据记录格式和判定标准。

本标准适用于基于SSR分子标记的木薯DNA分子数据采集和品种鉴定。

* 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

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

NY/T 3055 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 木薯

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标准。

3.1

核心引物 core primers

指品种DNA鉴定中优先选用的一套SSR引物，具有多态性、稳定性、重复性等综合特性好，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

指对应于特定SSR位点上大小已知的不同等位变异的一组品种。参照品种用于确定待测品种等位变异，校正不同仪器设备和不同实验室间检测数据的系统误差。

* 1. 原理

SSR广泛分布于植物基因组中，不同物种或同一物种不同品种间每个SSR位点重复单位的数量可能不同。简单重复序列的的两侧序列高度保守，针对侧翼保守序列设计特异引物，利用聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）技术进行重复序列扩增。由于SSR位点重复单位的数量不同导致SSR片段长度不同，可在电泳电场作用下得到分离，经硝酸银或荧光染料加以区分。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木薯品种。

* 1. 仪器设备及试剂

见附录A。

* 1. 溶液配制

见附录B。

* 1. 引物

见附录C。

* 1. 参照品种及其使用

参照品种的名称及来源见附录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.多个品种在某一SSR位点上可能都具有相同的等位变异。在确认这些品种该位点等位变异大小与参照品种相同后，这些品种也可以代替附录D中的参照品种使用。

2.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。

3.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。

* 1. 操作步骤

9.1 样品制备

每个品种随机抽取10个单株的幼嫩叶片或其它等效物进行混合分析。

9.2 DNA提取

1）称取适量幼嫩叶片，液氮下迅速磨成粉末。

2）将粉末转入2.0 mL离心管中，加入700 μL 65 ℃预热的2% CTAB缓冲液，并使其混匀。

3）65 ℃水浴加热45min，不断地轻轻倒转摇动。水浴后，取出离心管，冷却至室温。

4）通风橱下加入700 μL的氯仿:异戊醇（24:1），轻轻倒转摇动5-10min。

5）12000 rpm(室温)离心10min，用枪头将上清液转至一新的2.0 mL离心管中。

6）重复4-5步骤。

7）加入-20 ℃预冷的异丙醇（1倍体积）或无水乙醇（2倍体积）于2.0 mL离心管中，轻轻混匀。-20 ℃冰箱静置一段时间后，低速离心，至DNA凝集。

8）75％乙醇洗涤两次（其中一次可过夜）。洗涤完毕后，将DNA晾干。

9）加入适量的1×TE (pH 8.0)溶解于试管中，4 ℃下保存备用。

10）加入10 μL RNA酶溶液（10 mg/mL），37 ℃下温浴30min。

11）将DNA原液于0.8%琼脂糖凝胶电泳检测质量（DL2000为Marker)。-20 ℃下保存备用。

注：上述DNA提取方法为标准推荐使用的，在保证DNA提取质量的前提下其它DNA提取方法均可采用。

9.3 PCR反应体系及程序

9.3.1 反应体系

20 µL的反应体积，含每种dNTP 0.10 mmol/L，正向、反向引物各0.025 mol/L，*Taq* DNA聚合酶1 U，1×PCR缓冲液（含Mg2+ 2.5 mmol/L），样品DNA 50 ng，其余以超纯水补足至所需体积。如果PCR过程中不采用热盖程序，则反应液上加盖15 μL 矿物油，以防止反应过程中水分蒸发。

9.3.2 反应程序

94 ℃预变性5min，1个循环；94 ℃变性45s，55 ℃退火45s，72 ℃延伸60s，共36个循环；72 ℃延伸10min，4 ℃保存。

9.4 电泳检测

9.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测（PAGE）

9.4.1.1 灌胶板制作

首先严格地将玻璃板洗净，再用蒸馏水冲洗并擦干，然后用95%酒精擦拭，最后在母板上均匀涂2-3 mL亲和硅烷工作液，凹槽板上涂2-3 mL剥离硅烷。放置10min以上，让其充分晾干。操作过程中防止两块玻璃板相互污染。

9.4.1.2 组装玻璃板

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50 mL 6%PAGE胶中加入TEMED 65 μL和新配制的10%的过硫酸铵250 μL，迅速混匀后灌胶。待胶液流动到下部，在上部轻轻插入梳子，使其凝聚至少1 h以上。灌胶过程中防止出现气泡。

9.4.1.4 预电泳

垂直拔出梳子，在正极槽（下槽）中加入1×TBE缓冲液600 mL，在负极槽（上槽）中加入1×TBE缓冲液600 mL。80 W恒功率预电泳30-40min。

9.4.1.5 样品制备

2 μL PCR扩增样品加入2 μL变性缓冲液，混匀后，在94 ℃变性10min，迅速用冰水浴冷却10min以上。

9.4.1.6 电泳

用移液器吹吸加样槽，清除残胶和气泡，插入样品梳子，每一个加样孔点入5 μL样品。80 W恒功率电泳至上部的指示带（二甲苯青）达到胶板的中部（50-60min）。电泳结束后，小心分开两块玻璃板，胶会紧贴在涂有亲和硅烷的玻璃平板上。

9.4.1.7 银染

固定：将凝胶板置于装有固定液的塑料盒内，轻轻摇荡10min。

漂洗：双蒸水漂洗3min。

染色：在新配染色液中，轻轻摇荡20min。

漂洗：双蒸水漂洗，时间不超过10s。

显影：在显影液中、轻轻摇荡，直至出现带纹。

定影：在固定液中定影2min。

漂洗：用1.5 L双蒸水漂洗2min。

干胶：室温下自然晾干。

观察：放在胶片观察灯上观察记录结果，用数码相机或凝胶成像系统拍照保存。

9.4.2 毛细管电泳荧光检测

9.4.2.1 PCR产物的样品准备

根据预先确定的引物分组（见附录E），取等体积的同一组合中各引物的扩增产物，混匀稀释，从混合液中吸取1 µL加入到DNA分析仪专用96孔板中。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95 ℃变性5min，取出后立即置于冰上，冷却10min以上。瞬时离心10s后放置于DNA分析仪上。

注：荧光标记的扩增产物的稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。

9.4.2.2 等位变异检测

打开DNA分析仪，检查仪器工作状态和试剂状态，将装有样品的96孔上样板放置于样品架基座上，打开数据收集软件，按照仪器使用手册，编辑样品表，执行运行程序，DNA分析仪将自动运行，并保存电泳原始数据。

* 1. 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 普通变性聚丙烯凝胶电泳检测方法

将待测样品扩增片段的带型和迁移位置与对应的参照品种进行比较，与待测样品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

使用毛细管电泳检测设备的片段分析软件，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D.1中参照品种相应的数据，两者之间的差值为系统误差。可通过左右整体位移调整，使参照品种数据读取与已知结果相一致，以校正不同电泳板的系统误差。

10.4 结果记录

纯合位点的等位变异大小数据记为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大小数据记录为X/Y，其中X、Y分别为该位点上的两个等位变异的大小，小片段数据在前，大片段数据在后。缺失位点的等位变异大小数据记录为0/0。

示例1：样品在某个位点上仅出现一个等位变异，大小为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。

* 1. 判定方法

利用附录C中28对基本核心引物检测，获得待测品种在这些引物位点的等位变异数据，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)的情况，按《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 木薯》进行田间鉴定。

附录 A  
（规范性）  
主要仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

A.1.1 PCR扩增仪；

A.1.2 高压电泳仪：规格为3000 V、400 mA、400 W，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 水平电泳槽及配套的制胶附件；

A.1.6 高速冷冻离心机：最大转速不小于15,000 rpm；

A.1.7 水平摇床；

A.1.8 胶片观察灯；

A.1.9 电子天平：精确度为0.01 g、0.001 g；

A.1.10 微量移液器：规格分别为10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000μL，连续可调；

A.1.11 磁力搅拌器；

A.1.12 紫外分光光度计：波长260 nm及280 nm；

A.1.13 微波炉；

A.1.14 高压灭菌锅；

A.1.15 酸度计；

A.1.16 水浴锅或金属浴：控温精度±1 ℃；

A.1.17 冰箱：最低温度-20 ℃；

A.1.18 制冰机；

A.1.19 凝胶成像系统或紫外透射仪；

A.1.20 其它相关仪器和设备

A.2 主要试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯试剂。

A.2.1 十六烷基三乙基溴化铵；

A.2.2 三氯甲烷；

A.2.3 异丙醇；

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 盐酸：37%；

A.2.8 氢氧化钠；

A.2.9 氯化钠；

A.2.10 10×Buffer缓冲液：含Mg2+ 25 mmol/L；

A.2.11 四种脱氧核苷三磷酸：dATP、dTTP、dGTP、dCTP（10 mmol/L each）；

A.2.12 *Taq* DNA聚合酶：5 U/μl；

A.2.13 矿物油；

A.2.14 琼脂糖；

A.2.15 DNA分子量标准：DL2000；

A.2.16 核酸染色剂；

A.2.17 去离子甲酰胺；

A.2.18 溴酚蓝；

A.2.19 二甲苯青FF；

A.2.20 甲叉双丙烯酰胺；

A.2.21 丙烯酰胺；

A.2.22 硼酸；

A.2.23 尿素；

A.2.24 亲和硅烷：97%；

A.2.25 剥离硅烷：2%二甲基二氯硅烷；

A.2.26 无水乙醇；

A.2.27 四甲基乙二胺；

A.2.28 过硫酸铵；

A.2.29 冰醋酸；

A.2.30 乙酸铵；

A.2.31 硝酸银；

A.2.32 甲醛溶液：37%；

A.2.33 DNA分析仪用电泳缓冲液。

A.2.34 DNA分析仪用光谱校准基质，包括6-FAM、TAMRA、HEX和ROX等四种荧光标记。

附录 B  
（规范性）  
溶液配制

除另有说明外，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和GB/T 6682规定的一级水。

B.1 DNA提取试剂的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA溶液

186.1 g EDTA -Na2•2H2O溶于800 mL水中，用1 N NaOH调pH值至8.0，定容至1000 mL，在103.4 kPa灭菌。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCL溶液

60.55 g Tris-base溶于适量水中，加1 N HCl调pH至8.0，定容至500 mL，103.4 kPa灭菌。

B.1.3 0.5 mol/L HCl溶液

25 mL浓盐酸(36-38%)，加水定容至500 mL。

B.1.4 DNA提取CTAB缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 83.5mL，5 mol/L NaCL 235 mL，0.5 mol/L EDTA 33.4 mL，CTAB固体20 g，定容至1000 mL。其中，292.5 g NaCl (MW=58.44)加 ddH2O至终体积1000 mL，103.4 kPa灭菌，即为5 mol/L NaCl溶液。

B.1.5 氯仿-异戊醇(24:1)

按24:1的比例（体积比）配制混合液。

B.1.6 75%乙醇

无水乙醇375 mL，加水定容至500 mL。

B.1.7 TE缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 5 mL，0.5mol/L EDTA 1 mL，加HCl调pH至8.0，定容至500 mL。

B.2 PCR扩增试剂的配制

B.2.1 dNTPs

用超纯水分别配制dATP、dTTP、dCTP、dGTP 4种脱氧核糖核苷酸终浓度为100 mmol/L的储存液。103.4 kPa灭菌，-20 ℃保存。

B.2.2 SSR引物

引物干粉快速离心，用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均为20 μmol/L，等体积混合成5 μmol/L的工作液。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂的配制

B.3.1 40％PAGE胶

190 g丙烯酰胺和10 g甲叉双丙烯酰胺，定容至500 mL，混匀。4 ℃贮存备用。

B.3.2 6% PAGE胶

尿素450 g，10×BTE缓冲液100 mL，40%PAGE胶150 mL，定容至1000 mL。

B.3.3 亲和硅烷工作液

250 μL冰醋酸，250 μL亲和硅烷，加无水乙醇至50 mL，混匀。分装于1.5 mL离心管中。4 ℃贮存备用。

B.3.4 剥离硅烷工作液

2%二甲基二氯硅烷。

B.3.5 25%过硫酸铵溶液

0.25 g过硫酸铵溶于1 mL超纯水中。

B.3.6 10×TBE缓冲液

Tris-base 108 g，硼酸 55 g，EDTA-Na2•2H2O 7.44 g，定容至1 L。

B.3.7 1×TBE缓冲液

10×TBE缓冲液500 mL，加水定容至5 L。

B.3.8 变性缓冲液

去离子甲酰胺（用于DNA变性）49 mL，0.5 mmol/L EDTA 1 mL，溴酚兰0.125 g，二甲苯青0.125 g。

B.4 银染试剂的配制

B.4.1 固定液

200 mL冰醋酸，加水定容至2000 mL。

B.4.2 染色液

3 g硝酸银，加水定容至2000 mL。

B.4.3 显影液

2000 mL蒸馏水中加入25 g氢氧化钠和7 mL甲醛。

银染溶液的配制可使用符合GB/T 6682规定的三级水。

附录C  
（规范性）

核心引物

表C.1 核心引物

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 连锁群 | 引物编号 | 引物序列（5’→3’） | 荧光 | 等位变异  *bp* | 参照品种 |
| 1 | CB18 | F: AGGATTGTGGTTGACAGGCT  R: GAGACAACGGGGACAAAAGA | HEX | 202 | SC11 |
| 208 | SC10 |
| 212 | 桂热6号 |
| 216 | SC11 |
| 218 | SC6068 |
| 2 | CB26 | F: CGGGTCGCAGCTTCAATAAG  R: TCTGGGTTGCTCTCATCTTG | FAM | 358 | SC124 |
| 364 | SC6 |
| 366 | 糯米 |
| 376 | IAC |
| 380 | 糯米 |
| 2 | C91 | F: TTACAGGTGCCCGATGTGTA  R: CGTTCGAGTTGCATTCATTC | FAM | 162 | SC124 |
| 166 | SC11 |
| 168 | Ecu84 |
| 172 | SC205 |
| 186 | SC6 |
|  |  |  | HEX | 156 | SC12 |
| 2 | CB33 | F:GGAAGCATGTTTCTTTGATAATTC  R: ATCTGGTTCTCGTGGGAGTG | 158 | SC124 |
| 160 | SC15 |
| 162 | Bra-home |
| 164 | GR891 |
| 170 | 桂热7号 |
| 172 | SC6068 |
| 178 | SC8 |
| 3 | CB39 | F: GCGCTTGCAGTTGCTCTATC  R: GCCACAACACACGCATATCT | HEX | 287 | SC124 |
| 289 | SC9 |
| 291 | SC10 |
| 293 | 桂热4号 |
| 297 | 桂热5号 |
| 3 | CB41 | F: AATGGAGCCAAAATCACCAC  R: CAAATGCTATCAAGCACAAGG | ROX | 233 | SC124 |
| 241 | 巴西9号 |
| 243 | 桂热6号 |
| 245 | GR891 |
| 247 | SC5 |
| 253 | SC7 |
| 259 | IAC |
| 261 | SC5 |
| 263 | 东莞红尾 |
| 265 | SC5 |
| 269 | SC9 |
| 273 | SC10 |
| 283 | 桂热7号 |
| 285 | SC201 |
| 3 | C516 | F: ATCTCAGGGTGGTCGACAGA  R: TGCCAAAGGAGGAGAAAATG | FAM | 215 | SC9 |
| 223 | 桂热7号 |
| 225 | 桂热6号 |
| 227 | SC6 |
| 4 | C24 | F: GTCTGCGCTGAGCAGTCTC  R: GAGTGAGACGACGAAACGTG | FAM | 170 | SC6 |
| 172 | SC5 |
| 176 | SC9 |
| 182 | SC6068 |
| 186 | 桂热7号 |
| 188 | SC205 |
| 194 | SC10 |
| 5 | C524 | F: TAACCTTTCGCCGTCTTCTG  R: GAAGGAAGGGGGAATTTGAG | TAMRA | 219 | SC11 |
| 222 | 桂热9号 |
| 225 | GR11 |
| 227 | 巴西15号 |
| 231 | SC205 |
| 234 | COL2626 |
| 237 | 桂热6号 |
| 6 | CB192 | F: AGTTCAAGTGGGTGGTCAGG  R: ACCCCAGACATGTTGCATTT | TAMRA | 201 | SC10 |
| 203 | SC124 |
| 207 | SC11 |
| 211 | SC12 |
| 213 | 桂热10 |
| 215 | 桂热6号 |
| 7 | CB82 | F: TGAGAATGCTGAGACGGATG  R:AAAAGGGCAAGAAAACAAGAAA | FAM | 298 | SC15 |
| 301 | SC124 |
| 304 | SC8013 |
| 307 | SC11 |
| 8 | CB93 | F: GATCGGATGTCTGAGGAGGA  R: TGCTAGTCCTTTTTGGCAGG | TAMRA | 202 | SC10 |
| 204 | SC13 |
| 210 | Bra-home |
| 212 | SC9 |
| 214 | GR911 |
| 226 | 东莞红尾 |
| 8 | C109 | F: GCAAATTGGGGGAATGTTTT  R: AAGACACGAAGACGGTTGCT | HEX | 192 | GR891 |
| 194 | SC6 |
| 196 | SC9 |
| 200 | R72 |
| 206 | SC205 |
| 9 | CB220 | F: CCCACGCTTCTGCTCTTTTA  R: AGGCATACCGCCATGATTAG | HEX | 218 | 粉红 |
| 220 | SC6 |
| 226 | SC15 |
| 9 | CB226 | F: AAATTGGACAGGAGAGGTTGG  R: ACGGAGGAGAGTTGGATTTACA | HEX | 123 | SC12 |
| 129 | 瑞士517 |
| 133 | SC11 |
| 135 | SC8 |
| 137 | SC5 |
| 139 | GR11 |
| 10 | C49 | F: GATTGAGCGGTTGGATTTGT  R: CCTGCACCTTGTGGAGAGAT | HEX | 253 | SC5 |
| 259 | 南植199 |
| 265 | SC10 |
| 267 | SC124 |
| 273 | 桂热4号 |
| 10 | CB232 | F: TCCTCTCAATCCCTACCTCT  R: TTATCGGGCCATATGTTATC | FAM | 290 | SC12 |
| 294 | GR11 |
| 306 | 桂热5号 |
| 11 | CB235 | F: CCAACTCACCTTTCAACCAGA  R: GAAGCCAACCCATCATCTTC | ROX | 207 | SC5 |
| 211 | SC6 |
| 221 | SC13 |
| 11 | CB238 | F: TCACAATGAAGCCCAGTGAA  R: TTGTATCTGAGCCTTGCGTG | HEX | 315 | SC124 |
| 318 | SC5 |
| 321 | SC6 |
| 327 | 桂热4号 |
| 330 | SC8 |
| 12 | CB149 | F: GGACGAGTCCCTGTCCATAA  R: GGGACCATGTCGCTAGAAAA | TAMRA | 204 | SC8013 |
| 212 | GR891 |
| 214 | GR911 |
| 222 | SC11 |
| 14 | CB157 | F:AAACCACCAATCAGTCCAGC  R: ATGTCTAATTGAAGGAGAGGATTC | ROX | 208 | 糯米 |
| 210 | SC9 |
| 212 | 桂热4号 |
| 214 | SC124 |
| 216 | SC5 |
| 220 | 桂热7号 |
| 224 | SC11 |
| 238 | 桂热6号 |
| 15 | CB161 | F: ACCACAAACATAGGCACGAG  R: CACCCAATTCACCAATTACCA | FAM | 234 | SC5 |
| 240 | GR911 |
| 254 | I93 |
| 256 | R1 |
| 260 | SC7 |
| 266 | 糯米 |
| 268 | 桂热8号 |
| 270 | SC12 |
| 15 | CB164 | F: ATGCTCTCTGCCAAAAGGAA  R: CTGCCATGGAAGAAGCTACC | HEX | 177 | 糯米 |
| 186 | SC205 |
| 189 | GR891 |
| 192 | 桂热6号 |
| 15 | CB244 | F: TCCTAGTGTCCTGTTTGCCC  R: TGAGACGACCATCCAAATCA | FAM | 265 | SC124 |
| 269 | SC6068 |
| 277 | SC11 |
| 279 | SC8013 |
| 283 | SC10 |
| 289 | SC6068 |
| 16 | CB166 | F: CCATGCAGTAGTGCCATCTTT  R: ATTTTCACCAACCGCAACTC | FAM | 114 | 新选048 |
| 122 | SC7 |
| 138 | SC6 |
| 140 | SC124 |
| 17 | CB246 | F: CTGTCTTGATTCCGGCAACT  R: GCAAGTCGTTGCCTACCTTG | FAM | 202 | SC101 |
| 204 | SC124 |
| 206 | SC7 |
| 208 | 桂热6号 |
| 210 | SC5 |
| 212 | 桂热6号 |
| 224 | 桂热9号 |
| 17 | C79 | F: CATCTCTCTGCAGTCCGTCA  R: GGTCGATGAGAGGGAAATCA | FAM | 131 | SC6 |
| 133 | SC8 |
| 135 | SC10 |
| 137 | GR11 |
| 139 | GR891 |
| 141 | R3 |
| 18 | CB248 | F: GGACTGCTTGGATCCATTAAA  R: CACCATTCCCTCTGGAGAAA | FAM | 187 | SC9 |
| 191 | SC14 |
| 193 | 桂热7号 |
| 197 | GR11 |

附录D

（规范性）

参照品种相关信息

表D 参照品种相关信息

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 序号 | 名称 | 来源 |
| 1 | SC5 | 国家木薯种质资源圃 |
| 2 | SC6 | 国家木薯种质资源圃 |
| 3 | SC7 | 国家木薯种质资源圃 |
| 4 | SC8 | 国家木薯种质资源圃 |
| 5 | SC9 | 国家木薯种质资源圃 |
| 6 | SC10 | 国家木薯种质资源圃 |
| 7 | SC11 | 国家木薯种质资源圃 |
| 8 | SC12 | 国家木薯种质资源圃 |
| 9 | SC13 | 国家木薯种质资源圃 |
| 10 | SC14 | 国家木薯种质资源圃 |
| 11 | SC15 | 国家木薯种质资源圃 |
| 12 | SC101 | 国家木薯种质资源圃 |
| 13 | SC124 | 国家木薯种质资源圃 |
| 14 | SC201 | 国家木薯种质资源圃 |
| 15 | SC205 | 国家木薯种质资源圃 |
| 16 | SC6068 | 国家木薯种质资源圃 |
| 17 | SC8013 | 国家木薯种质资源圃 |
| 18 | 桂热4号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 19 | 桂热5号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 20 | 桂热6号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 21 | 桂热7号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 22 | 桂热8号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 23 | 桂热9号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 24 | 桂热10号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 25 | 桂热11号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 26 | GR891 | 国家木薯种质资源圃 |
| 27 | GR911 | 国家木薯种质资源圃 |
| 28 | 南植199 | 国家木薯种质资源圃 |
| 29 | 糯米 | 国家木薯种质资源圃 |
| 30 | 瑞士517 | 国家木薯种质资源圃 |
| 31 | 新选048 | 国家木薯种质资源圃 |
| 32 | 巴西9号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 33 | 巴西15号 | 国家木薯种质资源圃 |
| 34 | 东莞红尾 | 国家木薯种质资源圃 |
| 35 | 粉红 | 国家木薯种质资源圃 |
| 36 | Bra-home | 国家木薯种质资源圃 |
| 37 | COL2626 | 国家木薯种质资源圃 |
| 38 | Ecu84 | 国家木薯种质资源圃 |
| 39 | I93 | 国家木薯种质资源圃 |
| 40 | IAC | 国家木薯种质资源圃 |
| 41 | R1 | 国家木薯种质资源圃 |
| 42 | R3 | 国家木薯种质资源圃 |
| 43 | R72 | 国家木薯种质资源圃 |

****附录E****

**（资料性）**

**核心引物分组**

表E 核心引物分组

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 荧光标记（FAM） | 荧光标记（HEX） | 荧光标记（TAMRA） | 荧光标记（ROX） |
| 1 | CB166(139-160）C24(191-213)  CB161(252-286)  CB82(315-322)  CB26(376-397) | CB226(140-158)  CB164(195-211)  C49(271-289)  CB238(332-347) | CB192(218-230) | CB235(223-239) |
| 2 | C79(150-156)  CB248(207-215)  CB244(283-297) | CB33(174-190)  CB18(221-238)  CB39(304-316) | CB93(218-241) | CB157(224-261) |
| 3 | C91(180-190)  CB246(221-245)  CB232(307-323) | C109(211-225) | CB149(220-232) | CB41(231-288) |
| 4 | C516(235-248) | CB220(237-245) | C524(239-255) | / |