



中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2426—2015

枣品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法

Technical regulations for the identification of Chinese jujube
(*Ziziphus jujuba* Mill) cultivars—SSR marker method

2015-01-27 发布

2015-05-01 实施

国家林业局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家林业局提出并归口。

本标准起草单位：北京林业大学。

本标准主要起草人：庞晓明、李颖岳、续九如、王斯琪、麻丽颖、刘华波。

枣品种鉴定技术规程

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 repeat, SSR)分子标记对枣(*Ziziphus jujuba* Mill)品种 DNA 指纹鉴定的试验方法。

本标准适用于基于 SSR 分子标记技术构建的 DNA 指纹图谱对枣品种 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 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

LY/T 2190—2013 植物品种特异性、一致性、稳定性测试指南 枣

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

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

3.2

SSR 指纹图谱 SSR fingerprint

基于 SSR 分子标记鉴别生物个体之间差异的 DNA 电泳图谱,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳,得到不同大小的 DNA 片段图谱。

3.3

参照品种 reference cultivar

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。

3.4

待检样品 test sample

送检单位提供的待鉴定的枣种质、品系、品种。

3.5

对照品种 control cultivar

与待检样品近似的品种,用于与待检样品进行对比;或指已知品种中与待检样品相似度最高的品种。

4 原理

SSR 广泛分布于枣基因组中,不同枣品种每个 SSR 位点的重复基元重复次数可能不同。设计特异性引物对重复序列进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增,扩增产物的片段长度可以通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色,或通过毛细管电泳技术加以区分。不同的枣品种间遗传组成存在差异,某些 SSR 位点重复次数不同显示不同的谱带,从而实现品种差异鉴定。

5 仪器设备及试剂

除非另有说明,本标准所用试剂均为分析纯。仪器设备及试剂参见附录 A。

6 溶液配制

所有用水按照 GB/T 6682 的要求,相关溶液配制方法参见附录 B。

7 核心引物

核心引物相关信息见附录 C,附录 C 中的参考品种及代码参见附录 D。

8 枣样品 DNA 指纹图谱鉴定及其使用

枣样品 DNA 指纹图谱鉴定报告书参见附录 E。在进行等位变异检测时,应同时包括相应参照品种的编号及名称。同一名称不同来源的对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。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

试验样品为待鉴定枣样品和对照品种的叶片、枝条等器官或组织,最好为幼嫩叶片,采样后在 4℃ 贮藏条件下送至检测机构。选用 2 个~3 个参照品种同时进行分析。

9.2 DNA 提取

按以下步骤进行 DNA 提取:

- 称取样品组织材料 0.30 g,放入-20℃预冷的研钵中,加入液氮迅速研磨至粉末状后,立即用预冷的药匙转移至 2 mL 离心管中,依次加入 1 mL 预热(65℃)的 DNA 提取缓冲液和 50 μL β-巯基乙醇,充分颠倒混匀。
- 65℃恒温水浴 50 min,每隔 10 min 轻轻颠倒混匀一次,12 000 g 常温下离心 10 min。
- 取上清液,加入等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1,体积比),轻轻颠倒混匀,静置 10 min,于常温下 12 000 g 离心 10 min。
- 取上清液,转入另一个 2 mL 离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1,体积比),轻轻颠倒混匀,静置 10 min,于 4℃ 12 000 g 离心 10 min。

- e) 吸取上清液于新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积 -20°C 预冷的异丙醇沉淀 DNA,颠倒混匀,在 -20°C 下静置 30 min; $12\,000\text{ g}$, 4°C 离心 10 min,弃上清液。
 - f) 沉淀的 DNA 用 70%乙醇洗涤两次,离心后风干,溶于 200 μL 超纯水中, -20°C 保存待用。
- 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 SSR 引物

使用的核心引物及其序列见附录 C。

9.3.2 PCR 反应体系

利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测时,PCR 反应体系为 10 μL ,包括成分为:20 ng~25 ng 基因组 DNA, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, $1\times$ PCR 缓冲液,每种 dNTPs 0.2 mmol/L,正向引物和反向引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$,剩余体积用超纯水补足至 10 μL 。

利用毛细管电泳检测时 PCR 反应体系为 10 μL ,包括成分为:20 ng~25 ng 基因组 DNA, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, $1\times$ PCR 缓冲液,每种 dNTPs 0.2 mmol/L, M13 荧光标记引物和反向引物各 3.2 $\mu\text{mol/L}$,正向引物 0.8 $\mu\text{mol/L}$,剩余体积用超纯水补足至 10 μL 。

9.3.3 PCR 反应程序

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测时,PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 50°C ~ 65°C (根据附录 C 引物退火温度设定)退火 40 s, 72°C 延伸 45 s,共 32 个循环; 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。

毛细管电泳检测时,PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 50°C ~ 65°C (根据附录 C 引物退火温度设定)退火 40 s, 72°C 延伸 45 s,共 30 个循环; 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 40 s, 72°C 延伸 45 s, 8 个循环; 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。

9.4 PCR 产物检测

9.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

9.4.1.1 清洗玻璃板

用去污剂和清水将玻璃板洗涤干净并晾干。用无水乙醇擦洗 2 遍,吸水纸擦干。小玻璃板用 1 mL 剥离硅烷处理,大玻璃板用 3 mL 预混的亲硅烷工作液处理。操作过程中防止两块玻璃板互相污染。

9.4.1.2 组装电泳板

将两块玻璃板晾干,以 0.4 mm 的边条置于大玻璃板左右两侧,将小玻璃板压于其上并固定,用胶带封住底部;在两玻璃板两侧在有边条处用夹子夹住,注意间距。

9.4.1.3 配胶及灌胶

按附录 B 配制 50 mL 6%的变性 PAGE 胶溶液,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 厚鲨鱼齿梳平齐端向里轻轻插入胶液约 0.5 cm 处。室温下聚合 1 h 以上。待胶聚合后,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

正极槽(下槽)中加入 $1\times$ TBE 缓冲液(没过下槽高度的 80%),在负极槽(上槽)加入 $1\times$ TBE 缓

LY/T 2426—2015

冲液(没过短玻璃板上端 1 cm),60 W 恒功率预电泳 30 min。

9.4.1.5 变性

把 PCR 扩增产物与凝胶加样缓冲液按 5 : 1(体积比)混合,95 ℃变性 5 min,立即置于冰上冷却待用。

9.4.1.6 电泳

用吸球吹吸加样槽,清除气泡和残胶。将梳子反过来,把梳齿端插入凝胶 2 mm,形成加样孔。每个加样孔点入 3 μ L 扩增产物,在胶板两侧点入 DNA 分子量标准。在 60 W 恒功率电泳,溴酚蓝至胶的四分之三处时,终止电泳。

9.4.1.7 银染

按以下步骤进行银染:

- 固定:电泳结束后,小心分开两块玻璃板,把附着凝胶的玻璃板放入盛有固定液的托盘中,放在摇床中轻摇直至溴酚蓝颜色褪去,回收固定液;
- 漂洗:取出胶板,放入水洗框中,用蒸馏水清洗凝胶 2 次,每次 2 min;
- 染色:将凝胶放入染色液中,在摇床上轻摇,避光染色 30 min;
- 漂洗:弃掉染色液,用蒸馏水轻轻漂洗一次,冲洗凝胶不超过 10 s;
- 显影:凝胶放到预冷的显影液中,置摇床上轻摇,直到条带清楚可见;
- 定影:待条带清晰后,将胶板放入回收的固定液中定影 10 min;
- 漂洗:用蒸馏水清洗胶板 1 min。

9.4.1.8 PCR 扩增产物的谱带分析

干燥后扫描或拍照成像并保存,参照 DNA 分子量标准进行谱带判定。

9.4.2 毛细管电泳荧光检测

9.4.2.1 样品准备

对 6-FAM(6-Carboxyfluorescein)和 HEX(Hexachlorofluorescein)荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍,ROX(Carboxy-X-Rhodamine)和 TAMRA(Carboxytetramethylrhodamine)荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 10 倍。混合等体积的上述四种稀释液,从混合液中吸取 1 μ L 加入到 DNA 分析仪专用深孔板中,在各孔中分别加入 0.1 μ L 的 LIZ-500 分子量内标和 8.9 μ L 去离子甲酰胺,置于离心机中 1 000 g 下离心 10 s。将样品在 PCR 仪上 95 ℃变性 5 min,取出后迅速置于冰水中,冷却 10 min 以上。离心 10 s 后上机电泳。

注:不同荧光标记的扩增产物的最适稀释倍数通过预试验确定。

9.4.2.2 收集数据

启动 DNA 分析仪,检查仪器工作状态后更换缓冲液,灌胶。将装有样品的深孔板置于样品架基座上,打开数据收集软件。将电泳板信息等录入后,启动运行程序,DNA 分析仪自动收集毛细管电泳数据。

10 结果及判定

10.1 结果记录

根据 DNA 分子量标准确定样品扩增谱带大小来表示每个 SSR 位点的等位变异。以所分析的 SSR

引物名称为前缀,该标记在某样品上扩谱增带的分子量为后缀,得到每个样品在某个标记的带型编号。

示例 1:

黄骅冬枣:BFU1205,169,171/BFU0377,298,304/BFU0614,275,275。

示例 2:

成武冬枣:BFU1205,171,181/BFU0377,298,304/BFU0614,275,275。

10.2 判定方法

对待检样品和对照品种以附录 C 中的引物进行标记检测,获得待检样品和对照品种在这些位点的等位变异数据,利用这些数据进行比较,判定方法如下:

- a) 检测样品间的差异谱带数 ≥ 2 ,判定为不同的品种;
- b) 检测样品间的差异谱带数=1,判定为相近的品种;
- c) 检测样品间的差异谱带数=0,判定为疑同品种。

对于 10.2b)或 10.2c)的情况,按照 GB/T 19557.1 和 LY/T 2190—2013 的规定进行田间鉴定。

10.3 结论

根据 10.2 的判定结果,填写枣样品 DNA 指纹图谱鉴定报告书。

LY/T 2426—2015

附 录 A
(资料性附录)
仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 PCR 核酸扩增仪。
- A.1.2 DNA 分析仪。
- A.1.3 制冰机。
- A.1.4 电子天平(精确到 0.01 g)。
- A.1.5 微量移液器。
- A.1.6 微波炉。
- A.1.7 高压灭菌锅。
- A.1.8 pH 酸度计。
- A.1.9 高速台式离心机。
- A.1.10 磁力搅拌器。
- A.1.11 垂直电泳槽及配套的制胶附件。
- A.1.12 恒温水浴锅。
- A.1.13 凝胶成像系统。
- A.1.14 超纯水系统。
- A.1.15 扫描仪。

A.2 试剂

除非另有说明,在分析中均使用分析纯试剂,所用水符合 GB/T 6682 的规定。

- A.2.1 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- A.2.2 氯化钠(NaCl)。
- A.2.3 乙二胺四乙酸二钠盐。
- A.2.4 十六烷基三乙基溴化铵(Cetyltriethylammonium bromide, CTAB)。
- A.2.5 聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone, PVP)。
- A.2.6 三氯甲烷(氯仿)。
- A.2.7 水饱和酚。
- A.2.8 无水乙醇。
- A.2.9 浓盐酸。
- A.2.10 氢氧化钠。
- A.2.11 β -巯基乙醇。
- A.2.12 硼酸。
- A.2.13 溴化乙锭(EB)。
- A.2.14 SSR 引物。
- A.2.15 Taq DNA 聚合酶。
- A.2.16 琼脂糖。
- A.2.17 四种脱氧核苷酸(dNTPs)

- A.2.18 PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})。
- A.2.19 亲和硅烷。
- A.2.20 丙烯酰胺。
- A.2.21 尿素。
- A.2.22 过硫酸铵(APS)。
- A.2.23 四甲基乙二胺(TEMED)。
- A.2.24 甲醛。
- A.2.25 M13 荧光标记引物。
- A.2.26 剥离硅烷。
- A.2.27 冰醋酸。
- A.2.28 硝酸银。
- A.2.29 异戊醇。
- A.2.30 甲叉双丙烯酰胺。
- A.2.31 去离子甲酰胺。
- A.2.32 二甲苯青。
- A.2.33 LIZ-500 分子量内标。
- A.2.34 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液。
- A.2.35 DNA 分析仪用光谱校准基质,包括 FAM、HEX、TAMRA、ROX 4 种荧光标记的 DNA 片段。
- A.2.36 DNA 分析仪专用电泳缓冲液。
- A.2.37 硫代硫酸钠。

A.3 耗材

- A.3.1 离心管(1.5 mL、2 mL)。
- A.3.2 移液器吸头(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。
- A.3.3 200 μ L PCR 薄壁管或 96 孔 PCR 板。
- A.3.4 一次性手套。

附 录 B
(资料性附录)
溶液配制

B.1 DNA 提取溶液的配制

DNA 提取溶液的配制使用超纯水。

B.1.1 DNA 提取液

称取 12.114 g Tris 碱、81.816 g NaCl、7.445 g 乙二胺四乙酸二钠盐、20.000 g CTAB、20.000 g PVP,溶于适量水中,搅拌溶解,定容至 1 000 mL。 β -巯基乙醇用前加入。

B.1.2 70%(体积分数)乙醇溶液

量取无水乙醇 700 mL,加超纯水定容至 1 000 mL。

B.1.3 1×TE 缓冲液

称取 0.606 g Tris 碱、0.186 g EDTA,加入适量水溶解,加浓盐酸调 pH 至 8.0,定容至 500 mL,高压灭菌后备用。

B.2 电泳缓冲液的配制

电泳缓冲液的配制使用超纯水。

B.2.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠盐,溶于 800 mL 水中,氢氧化钠调 pH 至 8.0,定容至 1 L。

B.2.2 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 乙二胺四乙酸二钠盐溶液(0.5 mol/L, pH 8.0),搅拌均匀。

B.2.3 10×TBE 浓贮液

称取 108.0 g Tris 碱、55.0 g 硼酸、37.0 mL 0.5 mol/L EDTA,加水定容至 1 000 mL,室温保存,出现沉淀则予以废弃。

B.2.4 1×TBE 使用液

量取 100 mL 10×TBE 浓贮液,加水定容至 1 000 mL。

B.3 SSR 引物溶液的配制

引物干粉 12 000 g 离心 10 s,加入相应体积的超纯水,稀释成 10 μ mol/L,分装保存,避免反复冻融。取 30 μ L 加入超纯水至 300 μ L,配制成 1 μ mol/L 的工作液。

B.4 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.4.1 40%(W/V)丙烯酰胺溶液

分别称取 190.0 g 丙烯酰胺和 10.0 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.4.2 6.0%变性 PAGE 胶溶液

称取 42.0 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(TEMED),加水定容至 100 mL。

B.4.3 亲和硅烷工作液

吸取 3.0 mL 无水乙醇,加入 15 μL 亲和硅烷和 15 μL 冰醋酸,混匀。

B.4.4 10%(W/V)过硫酸铵溶液

称取 0.100 g 过硫酸铵溶于 1 mL 水中。

B.5 银染溶液的配制

银染溶液的配制使用超纯水。

B.5.1 固定液

量取 200 mL 冰醋酸,用水定容至 2 000 mL。

B.5.2 染色液

称取 1.000 g 硝酸银并量取 3 mL 37%甲醛,溶于 2 000 mL 水中。

B.5.3 显影液

称取 60.0 g 无水碳酸钠,溶解于 2 000 mL 双蒸水,冷却到 4 ℃,使用之前加入 37%的甲醛和 400 μL 浓度为 10 mg/mL 的硫代硫酸钠。取 10.0 g 氢氧化钠溶液于 1 000 mL 水中,用前加上甲醛。

附 录 C
(规范性附录)
核心引物

核心引物(24 对)见表 C.1。

表 C.1 核心引物(24 对)

位点	连锁群	引物序列(5'→3')	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种 代码
BFU0263	1	正向引物:	55	292	28
		GGTTTTTGTGGGTATGGAGGT		296	10
		反向引物:		306	8
		AGGAAAACAAAGGGATGGAGA		308	41
BFU0478	8	正向引物:	55	190	8
		AACGCTGAAGATTCCTCCTC		206	41
		反向引物:		208	5
		CCTGAATTCCAACCAAAACAG		210	1
BFU1205	6	正向引物:	55	169	20
		TGTTGCTGGTTCAATTCCAG		171	5
		反向引物:		177	18
		CTTATGGCTTTTTCATTTTGTGA		179	1
				181	4
BFU0586	9	正向引物:	55	271	2
		CGAACTTGGAGAGCTTGGAG		275	7
		反向引物:		277	1
		TTGAGCTCTGCAACGAAATG		279	28
				283	42
BFU0377	2	正向引物:	55	285	37
		CCAGCTGGTATCCAATTGCT		294	3
		反向引物:		298	10
		ACGACGATGCCATGAAAGAT		300	41
				302	38
				304	42
BFU0539	4	正向引物:	55	306	34
		CCGAAACGTTTAAAATGACA		312	40
		反向引物:		229	6
		GGAGGAAGAAGGATCCAAGG		231	23
				235	13
				241	41
				243	18
				247	19
				249	41
				251	36

表 C.1 (续)

位点	连锁群	引物序列(5'→3')	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种 代码
BFU1279	1	正向引物: TTTTTCAAGACCTCCACGATG 反向引物: TCCCACCACTTTCCTCTCAT	55	176 180 184 188 192 196	25 31 30 22 26 18
BFU0249	3	正向引物: AATGGGTCCACGTAGACAGG 反向引物: GCCCTGAGGTTGGACATAGA	55	274 282 286	21 42 33
BFU0733	9	正向引物: TCCTTTTGCCGAGAATATGAA 反向引物: GTGAAGCCCCCTAATTGTGTCA	55	302 308 310	41 17 34
BFU0467	3	正向引物: CCGGACCGAGTGGAGTTATTA 反向引物: AGAATATGGCATCAACCTATACCA	55	240 242 244 246 248 252 254 256	17 9 21 38 37 32 3 20
BFU0308	1	正向引物: TTTCCACCCCAAAATACCAA 反向引物: AGACGCTGGATGAGGATGAT	55	156 158 168 170 172 174 176 184 190 192 194 196	26 3 31 36 25 10 13 33 18 25 29 6
BFU0584	2	正向引物: AGGTCGATTTCCCCATCAC 反向引物: GCTGAGAGAGAATCCCAACG	55	310 312	29 13

表 C.1 (续)

位点	连锁群	引物序列(5'→3')	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种 代码
BFU0467	3	正向引物: CCGGACCGAGTGGAGTTATTA 反向引物: AGAATATGGCATCAACCTATACCA	55	240	17
				242	9
				244	21
				246	38
				248	37
				252	32
				254	3
				256	20
BFU0308	1	正向引物: TTTCCACCCCAAAATACCAA 反向引物: AGACGCTGGATGAGGATGAT	55	156	26
				158	3
				168	31
				170	36
				172	25
				174	10
				176	13
				184	33
				190	18
				192	25
				194	29
				196	6
BFU0473	8	正向引物: GTCCTGATGTGGAGTGCATTT 反向引物: TCTACAAGGACGAATCGTTGC	55	287	31
				291	33
				293	29
BFU1157	2	正向引物: TCCCTAAATTACCCTTCCCAAT 反向引物: AAAGCGACAGCGAAAACGT	55	226	4
				238	23
				240	29
				248	5
				252	6
				254	18
				256	21
				260	24
				262	42
BFU0501	3	正向引物: GCCATGCTTGACTTGCTACA 反向引物: AATGTTCCCATCCTCCCTTC	55	150	9
				152	28
				156	30

表 C.1 (续)

位点	连锁群	引物序列(5'→3')	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种 代码
BFU0614	1	正向引物: GATCGGTCCGAGACGATAAA 反向引物: ATACGCTCACGCCCTAGTGT	55	273 275	3 10
BFU1178	2	正向引物: CCTTGGTGGATTTTGTTTG 反向引物: TATACTTTGGCAGCGGTGTG	55	297 299 301 303	1 23 12 26
BFU0479	1	正向引物: GAAAACCATTTGTTGGAGACCA 反向引物: TGAACCAAGCAACAAAATCA	55	226 228 234 236 256 258	21 11 6 7 20 33
BFU0574	1	正向引物: GAAGGTTGAAGATGCTCTCTCTC 反向引物: CCTGACATCCATTTGAAGGAA	55	104 110 112 116 118 126 134 136	17 15 22 30 31 12 13 23
BFU0521	9	正向引物: CCTTTACTCGGCATTTCCAA 反向引物: TGGTGAAGCAGCAAAAACAG	55	240 246 262 264 266	19 41 17 25 13
BFU0286	2	正向引物: GATTGTTGCTGGTTTCCATGT 反向引物: CTGGACTCTCCGATGCAGTAG	55	278 282 284 286 290 292	13 18 15 24 25 20
BFU0564	1	正向引物: CTTTTCAAGCACCGCTTTTT 反向引物: GACTATTGGCAACCCTCCAA	55	127 133 135	14 13 17

表 C.1 (续)

位点	连锁群	引物序列(5'→3')	退火温度 ℃	等位变异 bp	参照品种 代码
BFU1409	1	正向引物: CAAATGATGGATCGAGCAAA 反向引物: AATGGAGGACAAACCGTCAC	55	174	13
				176	25
				178	33
				182	36
				184	1
				188	39
				190	38
BFU0277	6	正向引物: GCACTACCCTGTGGA ACTCAA 反向引物: AGTGTTGACCTGGCAAGAAGA	55	253	16
				255	8
				257	40
				259	17
				261	18
				263	23
				267	37

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	品种名称	品种 代码	品种名称	品种 代码	品种名称
1	沧县金丝小枣 Cangxianjinsixiaozao	15	新郑鸡心枣 Xinzhengjixinzao	29	金丝 1 号 Jinsiyihao
2	河北无核枣 Hebeiwuhezao	16	壶瓶枣 Hupingzao	30	运城相枣 Yunchengxiangzao
3	雪枣 Xuezao	17	枣强婆枣 Zaoqiangpozao	31	连县木枣 Lianxianmuzao
4	交城骏枣 Jiaochengjunzao	18	京枣 39 Jingzao 39	32	哈密大枣 Hamidazao
5	圆铃枣 Yuanlingzao	19	北京马牙枣 Beijingmayazao	33	保定月光 Baodingyueguang
6	蜜罐新 1 号 Miguanxinyihao	20	赞皇大枣 Zanhuangdazao	34	河北早脆王 Heibeizaocuiwang
7	民勤小枣 Minqinxiaozao	21	黄骅冬枣 Huanghuadongzao	35	溆浦鸡蛋枣 Xupujidanzao
8	河北辣椒枣 Hebeilajiaozao	22	中阳木枣 Zhongyangmuzao	36	灵宝大枣 Lingbaodazao
9	蚂蚁枣 Mayizao	23	成武冬枣 Chengwudongzao	37	冷白玉 Lengbaiyu
10	内黄大叶无核 Neihuangdayewuhe	24	朝阳小平顶 Chaoyangxiaopingding	38	针葫芦枣 Zhenhuluzao
11	新郑灰枣 Xinzhenghuizao	25	葫芦长红 Huluchanghong	39	襄汾官滩枣 Xiangfenguantanzao
12	长辛店白枣 Changxindianbaizao	26	榆次面枣 Yucimianzao	40	太谷葫芦枣 Taiguhuluzao
13	交城牙枣 Jiaochengyazao	27	稷山板枣 Jishanbanzao	41	随州大枣 Suizhoudazao
14	临猗梨枣 Linyilizao	28	陕西面枣 Shaanximianzao	42	晋枣一号 Jinzaoyihao

附 录 E
(资料性附录)
枣样品 DNA 指纹图谱鉴定报告书

待检样品编号		待检样品名称	
对照品种编号		对照品种名称	
送检单位			
测试单位		依据标准	
检测引物数量： 检测引物编号： DNA 指纹图谱检测结果： 检测差异引物和谱带： 结论： 评语： 测试单位(公章) 年 月 日			

制表人：

审核人：

批准人：
