ICS 65.020.01
CCS B 05

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4903—2025

荞麦品种鉴定　SSR分子标记法

Identification of buckwheat varieties—SSR marker method

2025-12-09 发布　　2026-05-01 实施

中华人民共和国农业农村部　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　缩略语 …… 1
5　原理 …… 1
6　主要仪器设备及试剂 …… 1
7　溶液配制 …… 2
8　引物信息及使用 …… 2
9　参照品种及使用 …… 2
10　操作程序 …… 2
11　结果判定与表述 …… 4
附录 A(规范性)　主要仪器设备及试剂 …… 5
附录 B(规范性)　溶液配制 …… 7
附录 C(规范性)　引物及序列 …… 9
附录 D(资料性)　引物相关信息 …… 10
附录 E(资料性)　参照品种相关信息 …… 12
附录 F(资料性)　引物分组 …… 13

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：山西农业大学玉米研究所、农业农村部科技发展中心、巴彦淖尔市农牧业科学研究院、贵州省农业科学院。

本文件主要起草人：焦雄飞、邓超、白雄辉、于晋、张凯淅、冯乐勇、陈伟、刘龙龙、孙朝霞、郭耀东、黎小冰、单飞彪、王晨宇、张晨霞。

荞麦品种鉴定　SSR 分子标记法

1　范围

本文件规定了利用简单重复序列(simple sequence repeat,SSR)标记进行荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench&*Fagopyrum tataricum* Gaertn)品种鉴定的原理、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。

本文件适用于荞麦品种 SSR 指纹数据采集和品种鉴定。

2　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 3543.2　农作物种子检验规程　第 2 部分:扦样

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

3　术语和定义

NY/T 2594 界定的术语和定义适用于本文件。

4　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]。

5　原理

荞麦品种基因组存在着大量能够稳定遗传的 SSR 位点,不同荞麦品种在同一 SSR 位点的重复次数可能存在差异,这种差异可利用 DNA 提取、PCR 扩增及电泳等方法进行检测,进而通过一组 SSR 引物组合区分不同的荞麦品种。

6　主要仪器设备及试剂

主要仪器设备及试剂见附录 A。

7 溶液配制

溶液配制方法见附录 B。

8 引物信息及使用

引物名称及序列见附录 C,引物相关信息见附录 D。利用垂直板变性聚丙烯酰胺凝胶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。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。

9 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。

10 操作程序

10.1 样品准备

送验样品可为种子、幼苗、叶片等组织或器官,送验样品为种子时,种子样本量不少于 20 g,种子样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的要求。试验样品取不少于 30 个个体,等量混合分析,必要时进行个体检测。

10.2 DNA 提取

样品研磨后取样本 200 mg～300 mg,置于 2.0 mL 离心管,每管加入 600 μL 预热到 65 ℃的 CTAB 提取液,充分混合,65 ℃恒温水浴 60 min,每间隔 10 min 轻缓颠倒混匀;每管加入与 CTAB 提取液等体积的三氯甲烷-异戊醇(24∶1,$V∶V$),轻缓混匀后,静置 10 min;12 000 r/min 离心 15 min 后,吸取上清液至新的离心管,再加入等体积预冷的异丙醇,轻缓颠倒离心管数次,在－20 ℃放置 30 min;4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;用 75%乙醇洗涤 2 次,晾干,加入 100 μL TE 缓冲液充分溶解。检测 DNA 浓度和质量,－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文件。DNA 溶液的紫外吸光度 OD_{260} 与 OD_{280} 的比值宜介于 1.7～2.0。

注 2:种子和叶片可使用商业化的种子试剂盒。

10.3 PCR 扩增

10.3.1 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	推荐反应体积,μL
10×缓冲液(含 Mg^{2+})	10×	1×	2.0
dNTPs	10 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	25 ng/μL	2.5 ng/μL	2.0
双蒸水	—	—	13.2
总体积			20.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 40 s,60 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 5 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、引物等不同而作适当的调整。

10.4 PCR产物电泳

10.4.1 垂直板变性PAGE

10.4.1.1 制胶

用洗涤剂将玻璃板清洗干净，再用双蒸水、无水乙醇分别擦洗2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 6%的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，迅速用水清洗干净备用。

10.4.1.2 变性

在20 μL PCR产物中加入4 μL 6×加样缓冲液，混匀。在PCR仪上运行95 ℃变性5 min，取出立即置于冰上，冷却10 min以上备用。

10.4.1.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上，在电泳正极槽(下槽)加入600 mL的1×TBE缓冲液，负极槽(上槽)加入600 mL经65 ℃预热的1×TBE缓冲液，使其超过凝胶顶部约3 cm。1 800 V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 μL～5 μL样品。除送检样品外，还宜同时加入参照品种扩增产物。1 800 V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)。二甲苯青指示带在质量分数为6%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、(250 ± 30)bp范围的、电泳参考时间分别为1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.5 h。电泳结束后关闭电源，取下玻璃板并轻轻撬开，通常凝胶附着在长玻璃板上。

注：为保证检测结果的准确性，建议玻璃板的规格为45 cm×35 cm。

10.4.1.4 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。

注：固定液、染色液、双蒸水和显影液的用量，可依据胶板数量和大小调整，以淹没胶面为准。

10.4.2 荧光毛细管电泳

10.4.2.1 PCR产物样品准备

按照预先确定的引物分组(见附录F)，依据预实验结果按照扩增效率取等体积的同一组中不同荧光引物的扩增产物，混匀稀释。从混合液中吸取1 μL，加入DNA分析仪专用96孔板中。

注：稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。

10.4.2.2 变性

上样板各孔分别加入0.1 μL分子量内标和8.9 μL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。

10.4.2.3 电泳

按照DNA分析仪使用手册进行操作，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命名，见附录D。对于垂直板变性PAGE，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间或者不同型号 DNA 分析仪间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 2 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 0/0。

示例 1：样品在某个位点上仅出现 1 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 2 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。

11 结果判定与表述

11.1 判定规则

当差异位点数大于 2，判定为“不同”；当差异位点数小于等于 2，判定为“疑同”。

11.2 结果表述

送检样品_____与对照样品_____（或对照样品_____指纹）采用_____电泳检测，检测位点数为_____，差异位点数为_____，判定为_____。

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：最高电压不低于 2 000 V，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 离心机。

A.1.5 水平摇床。

A.1.6 胶片观察灯。

A.1.7 电子天平：感量为 0.1 g 和 0.01 g。

A.1.8 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。

A.1.9 磁力搅拌器。

A.1.10 核酸浓度测定仪或超微量紫外分光光度计。

A.1.11 微波炉。

A.1.12 高压灭菌锅。

A.1.13 酸度计。

A.1.14 水浴锅。

A.1.15 低温冰箱。

A.1.16 制冰机。

A.1.17 凝胶成像系统或紫外透射仪。

A.1.18 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，最低区分力 1 bp。

A.1.19 其他相关仪器和设备。

A.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，$C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$，CAS 号：57-09-0]。

A.2.2 三氯甲烷（$CHCl_3$，CAS 号：67-66-3）。

A.2.3 异戊醇（$C_5H_{12}O$，CAS 号：123-51-3）。

A.2.4 异丙醇[$(CH_3)_2CHOH$，CAS 号：67-63-0]。

A.2.5 乙二胺四乙酸二钠二水合物（$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$，$C_{10}H_{18}N_2Na_2O_{10}$，CAS 号：6381-92-6）。

A.2.6 三羟甲基氨基甲烷（Tris，$C_4H_{11}NO_3$，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 Mg^{2+} 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(CH_3NO,CAS 号:75-12-7)。

A.2.16 溴酚蓝($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$,CAS 号:115-39-9)。

A.2.17 二甲苯青($C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$,CAS 号:2650-17-1)。

A.2.18 甲叉双丙烯酰胺[$(H_2C{=}CHCONH)_2CH_2$,CAS 号:110-26-9]。

A.2.19 丙烯酰胺(C_3H_5NO,CAS 号:79-06-1)。

A.2.20 硼酸(H_3BO_3,CAS 号:10043-35-3)。

A.2.21 尿素(CH_4N_2O,CAS 号:57-13-6)。

A.2.22 亲和硅烷。

A.2.23 二甲基二氯硅烷($C_2H_6Cl_2Si$,CAS 号:75-78-5)。

A.2.24 75%乙醇(C_2H_6O,CAS 号:64-17-5)。

A.2.25 四甲基乙二胺(TEMED,$C_6H_{16}N_2$,CAS 号:110-18-9)。

A.2.26 过硫酸铵[APS,$(NH_4)_2S_2O_8$,CAS 号:7727-54-0]。

A.2.27 冰醋酸(CH_3COOH,CAS 号:64-19-7)。

A.2.28 硝酸银($AgNO_3$,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。

附 录 B
（规范性）
溶液配制

试剂配制用水应符合 GB/T 6682 的要求。

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 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。

B.1.2 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。

B.1.3 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 1 000 mL。

B.1.4 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 121.1 g Tris 碱溶于 800 mL 水中，充分搅拌溶解，加 HCl 调 pH 至 8.0，加水定容至 1 000 mL，121 ℃高压灭菌 20 min。

B.1.5 CTAB 提取液

称取 20.0 g CTAB、81.7 g NaCl 置于 1 000 mL 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。

B.1.6 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，121 ℃高压灭菌 20 min，4 ℃保存。

B.2 PCR 扩增试剂的配制

B.2.1 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，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。

B.2.2 SSR 引物溶液

开盖前瞬时离心 10 s，按照引物说明书加 TE 缓冲液，分别配制正向引物和反向引物终浓度为 100 μmol/L 的储存液。分别取 10 μL 正向引物和反向引物储存液，加 90 μLTE 缓冲液配制成终浓度 10 μmol/L 的工作液。

B.3 垂直板变性 PAGE 试剂的配制

B.3.1 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。

B.3.2 质量分数为 6%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 1 000 mL。

B.3.3 亲和硅烷缓冲液

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

B.3.4 亲和硅烷工作液

分别量取 1 mL 亲和硅烷缓冲液和 5 μL 亲和硅烷原液，混匀。

B.3.5 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。

B.3.6 质量分数为 10%的 APS 溶液

称取 1.0 g APS 溶于 10 mL 水中，混匀，于 4 ℃保存(不超过 5 d)。

B.3.7 10×TBE 缓冲液

称取 Tris 108.0 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。

B.3.8 1×TBE 缓冲液

量取 50 mL 10 × TBE 缓冲液，加水定容至 500 mL，混匀。

B.3.9 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 EDTA 溶液(0.5 mol/L，pH 8.0)，搅拌溶解。

B.4 银染溶液的配制

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 1.0 g 硝酸银，加水定容至 1 000 mL。

B.4.3 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。

附 录 C
（规范性）
引物及序列

引物及序列见表 C.1。

表 C.1 引物及序列

序号	引物编号	引物名称	染色体	正向引物序列(5′→3′)	反向引物序列(5′→3′)
1	QMP1	HFP45	chr1	TTTCTGATGTTCGCTGTTGC	GTGCTCATGCTTGTGACCAT
2	QMP2	HFP125	chr1	CCAATTCCACCACCACTAGC	GGAAGAGGAGGAGATGGGTC
3	QMP3	P325	chr1	CGATACTCGTAGGAGGAACTTCA	CCACAATCTCATAAGAATCCCAA
4	QMP4	P354	chr2	CAGGAAAGCTCTCTGAAGATTGA	TAACTTGATCGGTGCAGAAAAAT
5	QMP5	P223	chr2	GAGGGGGTGATGATTTTAAGAAG	AAATCCTTTGACCCAGATTTCAT
6	QMP6	SXAU1389	chr2	CGGTTGTAGAGAGTGGAACTGA	CAATAGAGGTCCCTGCTGGA
7	QMP7	P259	chr3	CTTTCACACCAAACCATCTTCTC	TGTTGCTCGACTTTTTCTTCTTC
8	QMP8	P233	chr4	AGCTGACCCACAAGAGAAATATG	GAGCTAGTGCTGGTGCAAATG
9	QMP9	SXAU3357	chr4	TGGTTGAGTGCTTGAGATGC	TGAGTCCTGCATCATTGCTT
10	QMP10	SXAU4297	chr4	TTTTCAAAGTGACCCAACCC	AAATTGACCCAAACGGAACA
11	QMP11	SXAU3357	chr4	TGGTTGAGTGCTTGAGATGC	TGAGTCCTGCATCATTGCTT
12	QMP12	SXAU5232	chr5	TCAGTATGCACGTATGCACG	GGAGGTATGTGTGACCCGAT
13	QMP13	SXAU6200	chr6	CTCAAAGGATGCCATTGTAAC	GACTTTGAGAACGCCTTGAC
14	QMP14	SXAU6210	chr6	AACAGTGGCCTTGGAACAAC	CCATCCCAACTTCAGTAGCC
15	QMP15	P467	chr7	ACATTCAGAACTTCCACCAGAAA	CCTCTCCATTAACTCTCCCAACT
16	QMP16	SXAU6283	chr7	TGGATCTCATCAACTGCTCG	AGTAGGCGGAGGAACTGGAT
17	QMP17	SXAU7158	chr7	GCGTGAATTGTGGTGTTGAC	GCCTTCAATAGTCCATGCCT
18	QMP18	HFP78	chr8	TTCTTCCTGGTCTGCAAAGG	CACCCCAGCTCATCGTTAAT
注：引物来源为 Hou et al.(2022)、Shi et al.(2017)。					

附 录 D
（资料性）
引物相关信息

引物相关信息见表 D.1。

表 D.1 引物相关信息

引物序号	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
1	QMP1	6-FAM	186～217	186	赤甜 128
				200	广灵苦
				206	云荞 1 号
				211	AS-218
				217	野鸡 3
2	QMP2	6-FAM	145～157	145	广灵苦
				148	晋荞麦 3 号
				154	野鸡 3
				157	道坪甜荞
3	QMP3	6-FAM	142-154	142	AS～218
				148	晋荞麦 3 号
				151	野鸡 3
				154	云荞 1 号
4	QMP4	6-FAM	229～233	229	晋荞麦 3 号
				233	野鸡 3
5	QMP5	TAMRA	137～154	137	启嘎甜荞
				151	野鸡 3
				154	六苦 1901
6	QMP6	6-FAM	151～165	151	广灵苦
				162	六苦 1901
				165	鲁苦 2 号
7	QMP7	ROX	130～149	130	西农 9943
				133	野鸡 3
				136	黔苦 6 号
				142	鲁苦 2 号
				149	晋荞麦 3 号
8	QMP8	ROX	129～185	129	晋荞麦 3 号
				143	AS-218
				149	云苦 3 号
				155	野鸡 3
				161	六苦 1901
				172	晋苦 1 号
				179	西荞 2 号
				185	黔苦 2 号
9	QMP9	ROX	221～263	221	晋苦 1 号
				246	AS-218
				252	迪苦 2 号
				256	黔苦 3 号
				262	威宁黑苦荞
				263	云荞 1 号

表 D.1（续）

引物序号	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
10	QMP10	TAMRA	203～222	203	AS-218
				211	云苦 3 号
				214	晋荞麦 3 号
				216	威宁黑苦荞
				218	西农 9943
				220	鲁苦 2 号
				222	榆 6-21
11	QMP11	HEX	153～178	153	野鸡 3
				165	AS-218
				168	黔苦 3 号
				171	晋苦 2 号
				175	六苦 1901
				178	赫章尖嘴苦荞
12	QMP12	HEX	191～199	191	威宁黑苦荞
				199	处额
13	QMP13	ROX	184～192	184	野鸡 3
				190	云荞 1 号
				192	晋苦 1 号
14	QMP14	HEX	156～160	156	处额
				159	西农 9940
				160	广灵苦
15	QMP15	TAMRA	146～155	146	晋苦 1 号
				149	黔苦 6 号
				155	西荞 1 号
16	QMP16	6-FAM	180～198	180	大方苦荞
				190	晋荞麦 3 号
				198	赫章尖嘴苦荞
17	QMP17	ROX	139～155	139	晋苦 1 号
				143	西农 9940
				146	黔苦 3 号
				152	晋荞麦 3 号
				155	黔苦 2 号
18	QMP18	TAMRA	157～172	157	AS-218
				169	西农 9940
				172	黔苦 3 号

注 1：附录 D 中采用的荧光标记为参照标记，采用其他类型荧光标记时，应使用参照品种校正数据。

注 2：对于附录 D 中未包括的等位变异，应按本文件方法，确定其大小和相应参照品种。

注 3：附录 D 中所列参照品种供本文件推荐使用，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，使用前应确认其等位变异。

附 录 E
（资料性）
参照品种相关信息

荞麦参照品种名单见表 E.1。

表 E.1 参照品种相关信息

编号	品种名称	品种类型	品种来源
1	晋苦 2 号	苦荞	山西
2	AS-218	苦荞	山西
3	大方苦荞	苦荞	贵州
4	处额	苦荞	贵州
5	广灵苦	苦荞	山西
6	赫章尖嘴苦荞	苦荞	贵州
7	晋苦 1 号	苦荞	山西
8	晋荞麦 3 号	苦荞	山西
9	六苦 1901	苦荞	贵州
10	鲁苦 2 号	苦荞	山东
11	黔苦 2 号	苦荞	贵州
12	黔苦 3 号	苦荞	贵州
13	黔苦 6 号	苦荞	贵州
14	威宁黑苦荞	苦荞	甘肃
15	西农 9940	苦荞	陕西
16	西农 9943	苦荞	陕西
17	西荞 1 号	苦荞	陕西
18	西荞 2 号	苦荞	陕西
19	野鸡 3	苦荞	山西
20	榆 6-21	苦荞	陕西
21	云苦 3 号	苦荞	云南
22	云荞 1 号	苦荞	云南
23	赤甜 128	甜荞	内蒙古
24	道坪甜荞	甜荞	贵州
25	启嘎甜荞	甜荞	贵州
26	迪苦 2 号	苦荞	云南

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	TAMRA 标记引物	HEX 标记引物
1	QMP1(186～217)	QMP13(183～192)	QMP5(137～154)	QMP12(191～199)
	QMP3(142～154)	QMP17(139～155)		
2	QMP2(145～157)	QMP8(129～185)	QMP10(203～222)	QMP14(156～160)
	QMP4(229～233)		QMP18(157～172)	
3	QMP6(151～165)	QMP7(130～149)	QMP15(146～155)	QMP11(153～178)
	QMP16(180～198)	QMP9(221～263)		
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。				