

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2476—2025

代替 NY/T 2476—2013

大白菜品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of heading Chinese cabbage varieties—
SSR marker method

2025-01-09 发布

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 14

附录 F(资料性) 引物分组 15

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。

本文件代替 NY/T 2476—2013《大白菜品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法》，与 NY/T 2476—2013 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了 CRIB1-43(A1 连锁群)、CRIB1-54(A1 连锁群)、CRIB2-23(A2 连锁群)、CRIB3-22(A3 连锁群)、CRIB3-28(A3 连锁群)、CRIB4-10(A4 连锁群)、CRIB5-11(A5 连锁群)、CRIB6-3(A6 连锁群)、CRIB6-23(A6 连锁群)、CRIB7-19(A7 连锁群)、CRIB8-12(A8 连锁群)、CRI10-30(A10 连锁群)、CRI10-40(A10 连锁群)等 13 对引物及相应的等位变异和参照品种；
- b) 删除了 cnu_m139a(A1 连锁群)、nia_m086a(A1 连锁群)、nia_m098a(A1 连锁群)、cnu_m073a(A3 连锁群)、cnu_m288a(A3 连锁群)、cnu_m327a(A3 连锁群)、nia_m101a(A3 连锁群)、nia_m049a(A6 连锁群)、cnu_m050a(A6 连锁群)、cnu_m149a(A6 连锁群)、cnu_m016a(A9 连锁群)、nia_m038a(A6 连锁群)、nia_m035a(A10 连锁群)等 13 对引物及相应的等位变异和参照品种。

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：山东省农业科学院作物研究所、农业农村部科技发展中心。

本文件主要起草人：李汝玉、郑永胜、张晗、王丽媛、王穆穆、马莹雪、王晖、王东建、段丽丽、李华、安聪、耿慧晶、程惠敏、冯艳芳、王玮。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2013 年首次发布为 NY/T 2476—2013；

——本次为第一次修订。



大白菜品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行大白菜[*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis* (Lour.) Olsson]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。

本文件适用于大白菜品种 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 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

大白菜品种基因组中存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同大白菜品种在同一 SSR 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。

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

引物及序列见附录 C,引物相关信息见附录 D。利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)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。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

送检样品可为种子、幼苗、叶片等组织或器官。种子样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的规定。每份样品不少于 30 个个体,等量混合分析,必要时进行个体检测。

10.2 DNA 提取

取幼嫩组织混合样 0.2 g,放入 1.5 mL 离心管中,经液氮冷冻后充分研磨。或将 30 粒种子研碎,放入 1.5 mL 离心管中。每管加入 400 μ L 预热到 65 $^{\circ}$ C 的 CTAB 提取液,充分混合;65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min~60 min,每隔 15 min 轻缓颠倒混匀 1 次。每管加入 400 μ L 24 : 1 氯仿-异戊醇(V/V),振荡混匀。10 000 g 离心 10 min。吸取上清液 200 μ L 转入新的 1.5 mL 离心管中,加入 400 μ L -20 $^{\circ}$ C 预冷无水乙醇沉淀 DNA。12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,加入 500 μ L 乙醇-乙酸铵溶液,6 000 g 离心 5 min 收集沉淀。加入 100 μ L TE 缓冲液(pH 8.0)溶解 DNA,检测 DNA 浓度和质量。 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

注: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 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.7~2.0。

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	推荐体积, μ L
10 $\times$ 缓冲液(含 MgCl ₂)	10 $\times$	1 $\times$	2.5
dNTPs	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	0.625
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.4
正向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L	2
反向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L	2
DNA	25 ng/ μ L	2.5 ng/ μ L	5
双蒸水	—	—	12.475
总体积			25.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,65 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,每循环退火温度降 1 $^{\circ}$ C,共 15 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,产物 4 $^{\circ}$ C 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。

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、无水乙醇依次擦洗 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。操作过程中应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,用水平仪调平。取 100 mL 质量分数为 6% 的 PAGE 胶溶液,加入 50 μ L 四甲基乙二胺(TEMED)和 500 μ L 质量分数为 10% 的过硫酸铵(APS),迅速混匀,将胶灌入玻璃胶室,灌胶过程中应防止出现气泡。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。

10.4.1.2 变性

在 25 (L PCR 样品中加入 5 (L 6 $\times$ 加样缓冲液,混匀。在水浴锅或 PCR 扩增仪上 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 4 $^{\circ}$ C 冷却 10 min 以上备用。

10.4.1.3 电泳

将胶板安装于电泳槽上,在电泳正极槽和负极槽(上槽)各加入 600 mL 的 1 $\times$ TBE 缓冲液,使其没过电极线。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 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。1 800 V 恒压电泳,电泳时间参考二甲苯青指示带泳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% PAGE 胶电泳的泳动位置与 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 $\pm$ 30)bp、(150 $\pm$ 30)bp、(200 $\pm$ 30)bp、(250 $\pm$ 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,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。

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~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。

注:固定液、染色液、双蒸水和显影液的用量,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

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引物的扩增产物,混匀稀释。吸取 1 μ L 混合液,加入到 DNA 分析仪配套上样板中。

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 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 $^{\circ}$ C 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,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。

示例 1:参照品种“W13-8”、“W28-8”在 nia_m138a 位点上检测的等位变异分别为 257 bp 和 259 bp。附录表 D 中“W13-8”、“W28-8”相应的数据分别为 259 bp 和 261 bp,则系统误差为+2 bp。如果一个待测样品该位点检测的等位变异为 257 bp,则待测样品在该位点上的等位变异实际应为 259 bp。

示例 2:参照品种“W33-2”、“W13-8”在 cnu_m046a 位点上检测的等位变异分别为 163 bp 和 187 bp,附录表 D 中“W33-2”、“W13-8”相应的数据分别为 161 bp 和 185 bp,则系统误差为-2 bp。一个待测样品检测的等位变异为 189 bp,则待测样品在该位点上的等位变异应为 187 bp。

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 0/0。

示例 1:样品在 nia_m138a 位点上仅出现一个等位变异,为 257 bp,则该位点的等位变异数据记录为 257/257。

示例 2:样品在 cnu_m046a 位点上有两个等位变异,分别为 181 bp、187 bp,则该位点的等位变异数据记录为 181/187。

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_____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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L,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(EDTA-2Na, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, CAS 号:139-33-3)。
- 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 $\times$ 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($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$,CAS 号:115-39-9)。
- A. 2. 17 二甲苯青($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$,CAS 号:2650-17-1)。
- A. 2. 18 甲叉双丙烯酰胺 $[(\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONH})_2\text{CH}_2]$,CAS 号:110-26-9]。
- A. 2. 19 丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$,CAS 号:79-06-1)。
- A. 2. 20 硼酸(H_3BO_3 ,CAS 号:10043-35-3)。
- A. 2. 21 尿素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$,CAS 号:57-13-6)。
- A. 2. 22 亲和硅烷。
- A. 2. 23 二甲基二氯硅烷($\text{C}_2\text{H}_6\text{Cl}_2\text{Si}$,CAS 号:75-78-5)。
- A. 2. 24 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 25 四甲基乙二胺(TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$,CAS 号:110-18-9)。
- A. 2. 26 过硫酸铵[APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$,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 EDTA-2Na · 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 °C 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 °C 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 °C 高压灭菌 20 min。

B.1.6 乙醇-乙酸铵溶液

称取 154.6 mg 乙酸铵,加入 140 mL 无水乙醇,用去离子水定容至 200 mL。

B.1.7 TE 缓冲液

分别量取 5 mL Tris-HCl 溶液(pH 8.0)(B.1.4)和 1 mL EDTA 溶液(pH 8.0)(B.1.1),定容至 500 mL,在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。于 4 °C 下保存。

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 °C 高压灭菌 20 min, -20 °C 保存。

B.2.2 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为 100 μmol/L 的储存液,各取 10 μL 储存液,加 180 μL TE 缓冲液配制成终浓度 5 μmol/L 的工作液。

B.3 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 °C 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 μ L 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 μ L 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 $^{\circ}$ C 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

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	CRIB1-43	A1	TGAAATGCTGTGAGTTGTTGTGAT	TTCAACCTTTTCTTTGCCTTCT
2	CRIB1-54	A1	TCCGAGTAAGCGAATTGGTAAAG	GAAGCACTATCCCCACAAGAAAC
3	nia_m138a	A1	GTTTTAAATGCCGCGTTG	GGGATCAAGAGATGTGGGA
4	CRIB2-23	A2	AGGGAGAGATGTGGCAGATTGTTTT	ATGTGGTGGAAATAACTTCTTGCG
5	cnu_m046a	A2	GCTAAAGGTTTAGTCCAAATAGGATTC	GCAAAATGATGCCCCATAAA
6	nia_m121a	A2	GGATCCTCCCATAGCTCG	CAGTCGTTGCGGGATAGA
7	cnu_m316a	A3	TCAAGCATGTCCTTAAACTCTGA	GCGTTCACGTTTCCCATATC
8	CRIB3-22	A3	CATCTGGGGATCAAACAAGTGTCT	ATAACCATTCTTTTCATACGAACCTG
9	CRIB3-28	A3	CCTATTTTCCCATAAGTTTCAACCT	GGTAGTAACGTCTCATCCCCAAAC
10	cnu_m252a	A4	TGAAAATCAACACGAACACACAGA	CTCGTGGGGGAATGAGTGAG
11	Na10-D09	A4	AAGAACGTCAAGATCCTCTGC	ACCACCACGGTAGTAGAGCG
12	CRIB4-10	A4	CAGAGGCAGGTTCAGTTTCGTCG	CCACATTTTTCGTTTGGGTTAGATT
13	cnu_m289a	A5	CCCCTGGACTCCGTTTATCT	GATCTACGACGATCGGATGC
14	cnu_m442a	A5	CGATTTGGACAATGACTAGTGG	ACGCCATGGAAACAGAAAC
15	CRIB5-11	A5	GAGAATGTGTGATTTTCAAGGGTC	CCTACATCACCTATACACTCTGCCT
16	nia_m037a	A6	GCGGTTAATAGGTTCCGGTT	CCAATTGCATCGATCTGTCA
17	CRIB6-3	A6	GTATGCGTAGATTAGCAAACAAAGAT	CTTTATCTGCATCGCTATACTTCCT
18	CRIB6-23	A6	TCTGTAAGTATGGACCACCCGAAGT	AACATTTTTTCCCCAGACATCAGG
19	cnu_m182a	A7	TTCATCACCGTCTTATGTTGTGC	GGCAGGTGGAATATGTGGAAAT
20	cnu_m295a	A7	GCTGCCTAATAGGGTGCTTG	AGAGCGCATTCAAGTCTGGT
21	CRIB7-19	A7	CCTAAATCACCAAATGTATCCCA	CAGCAGTAACAGCAACACAGAGAG
22	cnu_m090a	A8	GCAAAGATCGGCGAAGAAGA	TGCAGACACATTCGAACAAACA
23	cnu_m537a	A8	TACGCATTCCGATGTTTCAC	GCATCGTTCAAACCACAGTT
24	CRIB8-12	A8	GATGATCGCTCTCTGATCTCTCG	ATGGGAATGTGTATTTTGGTTGA
25	cnu_m530a	A9	TGAGGTGGCTCCCTTGTTAT	AGGGAATAAAGCGGAAAAGG
26	cnu_m534a	A9	TCAGTCTCAGCCTCTCGTCA	GATCTGGTGCGGAAGAGTGT
27	nia_m022a	A9	CTCTCGTCTCGGAGGATCTAAA	GTGAGAGTGGTTGCTGAGTGAG
28	ENA2	A10	GATGGTGATGGTGATAGGTC	GAAGAGAAGGAGTCAGAGATG
29	CRIB10-30	A10	TTCAGACTACGTGTAGAACAGTGTTTA	ACTTTTTCTTTCCATTACAGCAG
30	CRIB10-40	A10	AAACTACATGCAGCAGGTTTCCTAT	CTTTACAAAATTCAACATTTCTCCGC

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

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
1	CRIB1-43	HEX	269~293	269	福 77-105
				272	07-23-1
				275	w37-1
				278	w28-8
				281	659
				284	玉青
				287	w13-8
				290	春绿 1 号
				293	工西 8-2
2	CRIB1-54	HEX	221~238	221	726-2
				224	福 77-105
				227	07-293-3
				238	w13-8
3	nia_m138a	ROX	245~261	245	豫早 0901
				247	09-586-2
				249	2013-YZ1
				251	福 77-105
				253	工西 8-2
				255	津绿-3
				257	659
				259	w13-8
				261	w28-8
4	CRIB2-23	ROX	201~218	201	W13-8
				204	08-359
				207	w28-8
				210	玉青
				218	07-293-3
5	cnu_m046a	TAMRA	161~187	161	w33-2
				173	08-359
				181	659
				185	w13-8
				187	福 77-105
6	nia_m121a	HEX	281~296	281	玉青
				284	小卫固
				290	福 77-105
				296	W13-8
7	cnu_m316a	ROX	200~219	200	2013-YZ5
				204	08-352-2
				211	09-586-2
				219	w37-1

表 D.1 (续)

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
8	CRIB3-22	TAMRA	183~195	183	w28-8
				186	w13-8
				189	玉青
				192	小卫固
				195	09-586-2
9	CRIB3-28	TAMRA	331~386	331	津绿-3
				336	工西 8-2
				339	07-373-1
				342	w13-8
				359	2013-YZ5
				362	青研春白 2 号
				365	金贝-2
				368	津绿-2
				371	玉青
				374	HF
				377	08-352-2
				380	福 77-105
				383	w37-1
				386	w28-8
10	cnu_m252a	TAMRA	238~254	238	w33-2
				241	玉青
				251	W13-8
				254	W28-8
11	Na10-D09	HEX	276~290	276	HF
				282	07-23-1
				284	07-373-1
				290	726-2
12	CRIB4-10	TAMRA	213~245	213	工西 8-2
				216	726-2
				225	07-373-1
				245	659
13	cnu_m289a	TAMRA	150~194	150	2013-YZ1
				172	青研春白 2 号
				178	07-373-1
				180	w28-8
				184	2013-YZ5
				186	w33-2
				188	267-1
				190	玉青
				192	福 77-105
				194	小卫固
14	cnu_m442a	ROX	268~286	268	w28-8
				278	w46-6
				280	w13-8
				286	659
15	CRIB5-11	6-FAM	155~201	155	玉青
				157	08-359
				159	07-373-1
				185	津白 45
				188	春绿 1 号
				192	W28-8

表 D.1 (续)

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
15	CRIB5-11	6-FAM	155~201	195	w37-1
				198	W13-8
				201	豫早 0901
16	nia_m037a	6-FAM	305~319	305	07-373-1
				307	07-293-3
				309	金贝-2
				311	小卫固
				313	08-359
				315	08-352-2
				319	津绿-2
17	CRIB6-3	6-FAM	167~216	167	07-373-1
				176	W34-2
				182	08-352-2
				204	726-2
				207	08-359
				210	w33-2
				213	267-1
				216	W28-8
18	CRIB6-23	6-FAM	232~262	232	工西 8-2
				244	659
				250	09-587-2
				256	07-373-1
				262	W28-8
19	cnu_m182a	6-FAM	271~286	271	小卫固
				274	07-23-1
				277	福 77-105
				280	2013-YZ1
				283	w37-1
				286	玉青
20	cnu_m295a	TAMRA	192~200	192	07-23-1
				194	08-352-2
				200	福 77-105
21	CRIB7-19	6-FAM	218~224	218	w13-8
				221	726-2
				224	09-586-2
22	cnu_m090a	6-FAM	175~205	175	CR117
				184	小卫固
				193	工西 8-2
				199	w33-2
				205	黔白 4 号
23	cnu_m537a	ROX	174~208	174	津绿-2
				182	W28-8
				184	09-586-2
				186	07-373-1
				188	726-2
				190	小卫固
				192	659
				194	W34-2
				196	龙园红 1 号
				200	W13-8
				208	W37-1

表 D.1 (续)

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围, bp	主要等位变异, bp	参照品种
24	CRIB8-12	6-FAM	227~242	227	W28-8
				233	726-2
				242	07-293-3
25	cnu_m530a	HEX	283~291	283	工西 8-2
				285	津绿-3
				287	W28-8
				291	金贝-2
26	cnu_m534a	HEX	201~207	201	HF
				204	07-373-1
				207	小卫固
27	nia_m022a	6-FAM	310~326	310	津绿-2
				316	07-293-3
				318	2013-YZ1
				326	福 77-105
28	ENA2	TAMRA	274~283	274	W13-8
				277	W37-1
				280	w34-2
				283	659
29	CRIB10-30	ROX	166~216	166	黔白 4 号
				176	w37-1
				178	267-1
				198	豫早 0901
				204	津白 45
				206	2012-142-1
				208	玉青
				210	07-23-1
				212	福 77-105
				214	青研春白 2 号
				216	2013-YZ5
30	CRIB10-40	ROX	164~178	164	08-352-2
				166	07-23-1
				174	小卫固
				176	2013-YZ1
				178	09-586-2
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,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,使用前应确认其等位变异。					

附 录 E
(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	编号	品种名称	品种来源
1	w34-2	山东省农业科学院蔬菜研究所	18	07-23-1	山东省农业科学院蔬菜研究所
2	玉青	山东省农业科学院蔬菜研究所	19	09-586-2	山东省农业科学院蔬菜研究所
3	726-2	山东省农业科学院蔬菜研究所	20	HF	山东省农业科学院蔬菜研究所
4	津绿-3	山东省农业科学院蔬菜研究所	21	07-293-3	山东省农业科学院蔬菜研究所
5	金贝-2	山东省农业科学院蔬菜研究所	22	08-352-2	山东省农业科学院蔬菜研究所
6	267-1	山东省农业科学院蔬菜研究所	23	08-359	山东省农业科学院蔬菜研究所
7	w28-8	山东省农业科学院蔬菜研究所	24	工西 8-2	山东省农业科学院蔬菜研究所
8	w13-8	山东省农业科学院蔬菜研究所	25	W46-6	山东省农业科学院蔬菜研究所
9	w33-2	山东省农业科学院蔬菜研究所	26	09-587-2	山东省农业科学院蔬菜研究所
10	津绿-2	山东省农业科学院蔬菜研究所	27	龙园红 1 号	黑龙江省农业科学院园艺分院
11	659	山东省农业科学院蔬菜研究所	28	豫早 0901	河南省农科院园艺种苗研究所
12	w37-1	山东省农业科学院蔬菜研究所	29	津白 45	天津科润蔬菜研究所
13	07-373-1	山东省农业科学院蔬菜研究所	30	青研春白 2 号	青岛市农业科学研究所新技术开发中心
14	福 77-105	山东省农业科学院蔬菜研究所	31	CR117	山东省德高蔬菜种苗研究所
15	小卫固	山东省农业科学院蔬菜研究所	32	春绿 1 号	天津科润蔬菜研究所
16	2013-YZ5	山东省农业科学院蔬菜研究所	33	黔白 4 号	贵州省园艺研究所
17	2013-YZ1	山东省农业科学院蔬菜研究所			

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	cnu_m090a (175~205)	CRIB2-23 (201~218)	cnu_m289a (150~194)	CRIB1-43 (269~293)
	CRIB6-23 (232~262)	nia_m138a (245~261)	cnu_m252a (238~254)	—
	nia_m037a (305~319)	—	—	—
2	CRIB6-3 (167~216)	CRIB10-30 (166~216)	cnu_m046a (161~187)	CRIB1-54 (221~238)
	cnu_m182a (271~286)	cnu_m442a (268~286)	CRIB4-10 (213~245)	cnu_m530a (283~291)
3	CRIB5-11 (155~201)	cnu_m537a (174~208)	CRIB3-22 (183~195)	nia_m121a (281~296)
	CRIB8-12 (227~242)	—	ENA2 (274~283)	cnu_m534a (201~207)
4	CRIB7-19 (218~224)	CRIB10-40 (164~178)	cnu_m295a (192~200)	Na10-D09 (276~290)
	nia_m022a (310~326)	cnu_m316a (200~219)	CRIB3-28 (331~386)	—
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。				