

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4494—2025

莴苣品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of lettuce (*Lactuca sativa* L.) 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 引物相关信息 2

9 参照品种 2

10 操作程序 2

11 结果统计 4

12 结果判定 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) 引物名单及序列 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 16

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：农业农村部科技发展中心、华南农业大学、上海市农业科学院、北京市农林科学院。

本文件主要起草人：邓超、凌晨、徐振江、赵洪、李波、颜军、庞雪兵、王晨宇、马莹雪、张靖立、冯艳芳、唐浩、陈红、张秀杰。



莴苣品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行莴苣(*Lactuca sativa* L.)品种鉴定的操作程序、结果统计与结果判定。

本文件适用于莴苣品种 SSR 指纹数据采集、数据库构建和品种鉴定。

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 规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 triphosphate)

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)

Tris:三羟甲基氨基甲烷(Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane THAM)

TE:三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)

TBE:三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸(Tris-borate-EDTA)

TEMED:四甲基乙二胺(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)

5 原理

不同莴苣品种基因组中 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,进而区分不同的莴苣品种。

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 引物相关信息

引物名单及序列见附录 C,引物相关信息见附录 D。

9 参照品种

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。样品需扦样时,应符合 GB/T 3543.2 的要求。每份样品取不少于 30 个个体的叶片或其他等效物,混合分析,必要时进行个体检测。

10.2

DNA 提取

取幼苗或叶片 200 mg~300 mg,置于 2.0 mL 离心管,加液氮充分研磨;每管加入 600 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液,充分混合,65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min~60 min,其间多次轻缓颠倒混匀。每管加入与 CTAB 提取液等体积的三氯甲烷和异戊醇混合液,轻缓混匀后静置 10 min,在 12 000 r/min 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 $^{\circ}$ C 放置 30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,用体积分数为 70% 的乙醇溶液洗涤 2 遍,晾干,加入 100 μ L 双蒸水或 TE 缓冲液充分溶解,检测 DNA 浓度后 4 $^{\circ}$ C 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。DNA 溶液的紫外吸光度 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.7~2.0。

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。

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 中的缓冲液若含有氯化镁(MgCl₂),不再加 MgCl₂ 溶液,加等体积双蒸水替代。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,荧光标记位于上游引物 5' 端,推荐的荧光标记见附录 D。

表 1 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	推荐加样体积, μ L
10 $\times$ 缓冲液(含 MgCl ₂)	10 $\times$	1 $\times$	2.0
dNTPs	10 mmol/L	0.1 mmol/L	0.2
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.2
上游引物	10 μ mol/L	0.25 μ mol/L	0.5
下游引物	10 μ mol/L	0.25 μ mol/L	0.5
DNA	50 ng/ μ L	5 ng/ μ L	2.0
双蒸水	—	—	14.6
总体积			20.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,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。

10.4

PCR 产物检测

10.4.1 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 2 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。配制 8 %PAGE 胶,取 26.7 mL 质量分数为 30% 的 PAGE 胶溶液,加入 62.5 mL 蒸馏水、50 μ L 四甲基乙二胺(TEMED)和 550 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,用水清洗干净备用。

注:为保证检测结果的准确性,建议玻璃板的规格为 45 cm $\times$ 35 cm。

10.4.1.2 变性

在 20 μ L PCR 产物中加入 4 μ L 6 $\times$ 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 $\times$ TBE 缓冲液,负极槽(上槽)加入 600 mL 经的 1 $\times$ TBE 缓冲液,使其超过凝胶顶部约 3 cm。80 W 恒功率预电泳 10 min $\sim$ 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 $\sim$ 2 mm。每一个加样孔点入 3 μ L $\sim$ 5 μ L 样品。除送检样品外,还应同时加入参照品种扩增产物。80 W 恒功率电泳,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 8% 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 $\pm$ 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。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。

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,分别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 μ L,加入 DNA 分析仪专用 96 孔板中。板中各孔分别加入 0.1 μ L 分子量内标和 8.9 μ L 去离子甲酰胺,在 PCR 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。

注:引物分组和稀释倍数通过荧光毛细管电泳预实验确定。

10.4.2.2 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。

10.5 数据分析

10.5.1 数据读取

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

将送检样品每个位点的等位变异数据逐一比对,按照位点相同、差异、数据缺失、无法判定等情形,记 录每个位点的结果。

11 结果统计

统计比对结果为位点差异的情况,计算差异位点数。

12 结果判定

12.1

判定规则

当品种间差异位点数 >2 ,判定为“不同”;当品种间差异位点数 ≤ 2 ,判定为“疑同”;当品种间差异位 点数 ≤ 2 ,但存在位点数据缺失或无法判定情形时,不做判定。

12.2

结果表述

送检样品_____与对照样品_____ (或数据库中_____品种)采用_____检测平 台,检测位点数为_____,差异位点数为_____,判定为_____。当存在位点数据缺失或无 法判定情形时,应表述具体情况。

示例 1:送检样品 A 与对照样品 B 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测平台,检测位点数为 22,差异位点数为 2,判定为 疑同。

示例 2:送检样品 A 与对照样品 B 采用荧光毛细管电泳检测平台,检测位点数为 22,差异位点数为 1,送检样品在 WSULs159 位点数据缺失。

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,在分析中均使用分析纯试剂。

- 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-Na, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, 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 氯化钠(NaCl, CAS 号:7647-14-5)。

- A. 2. 12 *Taq* DNA 聚合酶(*Taq* 酶,CAS 号:9012-90-2)。
- A. 2. 13 DNA Marker;DNA 片段分布范围在 50 bp ~ 500 bp。
- A. 2. 14 甲酰胺(CH_3NO ,CAS 号:75-12-7)。
- A. 2. 15 溴酚蓝($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$,CAS 号:115-39-9)。
- A. 2. 16 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. 17 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. 18 丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$,CAS 号:79-06-1)。
- A. 2. 19 硼酸(H_3BO_3 ,CAS 号:10043-35-3)。
- A. 2. 20 尿素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$,CAS 号:57-13-6)。
- A. 2. 21 亲和硅烷。
- A. 2. 22 剥离硅烷。
- A. 2. 23 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 24 四甲基乙二胺(TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$,CAS 号:110-18-9)。
- A. 2. 25 过硫酸铵[APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$,CAS 号:7727-54-0]。
- A. 2. 26 冰醋酸(CH_3COOH ,CAS 号:64-19-7)。
- A. 2. 27 硝酸银(AgNO_3 ,CAS 号:7761-88-8)。
- A. 2. 28 甲醛(HCHO ,CAS 号:50-00-0)。
- A. 2. 29 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 30 DNA 分析仪用分子量内标。
- A. 2. 31 DNA 分析仪用电泳缓冲液。
- A. 2. 32 DNA 分析仪用光谱校准基质。

附 录 B
(规范性)
溶液配制

试剂配制用水需符合 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 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 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 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 保存。

B.2 PCR 扩增试剂的配制

B.2.1 dNTP 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 120 μL TE 缓冲液定容, 配制成每种脱氧核糖核苷酸终浓度为 10 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 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液, 取 10 μL 储存液, 加 90 μL TE 缓冲液配制成终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

B.3 变性 PAGE 试剂的配制

B.3.1 质量分数为 30% PAGE 胶溶液

称取 290.0 g 丙烯酰胺和 10.0 g 甲叉双丙烯酰胺, 溶于 800 mL 水中, 充分搅拌溶解, 加水定容至 1 000 mL, 置于棕色瓶中, 4 °C 储存。

B.3.2 亲和硅烷缓冲液

分别量取 99.5 mL 无水乙醇和 500 μL 冰醋酸, 混匀。

B.3.3 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.3.4 剥离硅烷工作液

分别量取 98 mL 氯仿溶液和 2 mL 二甲基二氯硅烷溶液,混匀。

B.3.5 质量分数为 10% 的 APS 溶液

称取 1.0 g 过硫酸铵,溶于 10 mL 去离子水中,混匀,于 4 $^{\circ}$ C 保存(不超过 5 d)。

B.3.6 10 $\times$ 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.3.7 1 $\times$ TBE 缓冲液

量取 50 mL 10 $\times$ TBE 缓冲液,加水定容至 500 mL,混匀。

B.3.8 6 $\times$ 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 10.0 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)
引物名单及序列

引物名单及序列见表 C. 1。

表 C. 1 引物名单及序列

引物 编号	引物名称	参考 文献	所在 染色体	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
WJ01	WSULs159	[4]	Chr1	GGACTTCACTAGTCGACGACATC	GCTTGTCTTTCCAACCCAAAAG
WJ02	WSULs153	[4]	Chr2	ACCGCTCTCACTCTGAGCACAC	CAGTTTGTGCTAGCGTTTCACCA
WJ03	LSE-64	[7]	Chr2	CTAGTTCTTCTGCTGCTAGG	GATAGGATCGGATCGGATTG
WJ04	KSL-92	[1]	Chr3	GGTCTCTTTCCTCTGCCCTG	TCGCGTTCTGAAGTAGCCAT
WJ05	LSE-56	[7]	Chr3	CCTCCATAACCAAAACCTCA	ACTTCTTTCGACATGCTTCT
WJ06	SSR-8	[6]	Chr3	GTTGTCTCGTCTCGACCAA	GCGTTCTGAAGTAGCCATGG
WJ07	WSULs162	[4]	Chr4	TTTCTCGCTTTCTCTCCTTTCC	CAAATCTCCACCCCAAAATAGG
WJ08	KSL-32	[1]	Chr4	CGGGGAGCATTTAGTGTGTG	AATTTGGGGTCCGATTTGAG
WJ09	LSE-83	[7]	Chr4	CCGAAAACAGCCTTGCATCT	GTATTGTAGCTGACGGTGGC
WJ10	LSSA28-1	[3]	Chr4	TTCATCTCTCTCCTCCTTCAGC	ATCCCCATTGTCTCTCC
WJ11	Li-1	[2]	Chr5	TTTACCTCCCACCACACACA	CCGGCGATTCCATTATTGAT
WJ12	LSE-79	[7]	Chr5	TTGATACCTCCGCCATCCTC	AGCACAGAAAACACACACACA
WJ13	KSL-245	[1]	Chr6	CTTCACCTCCGGAATCCTGT	GAGGCACGACTGCCATTTAG
WJ14	KSL-97	[1]	Chr6	CGCAGAAAAGGGATCAGACA	TCAGAGACACTGCAAAAGGGA
WJ15	SH42	[8]	Chr6	GCAAGCTAAAGGGCTTTTTGT	CAGCCTGGGAATATTTACTCTGA
WJ16	WSULs18	[4]	Chr7	GAAGGTGGTGGGTGCTGTC	TGGGCAATTGCAGATTGAGA
WJ17	SSR-15	[6]	Chr8	CAGATCAAGCGGGTAACTAA	TATCAAGACCCTAAGCGAAC
WJ18	LSSA05	[3]	Chr8	AGAACAACGGTAGCTTGTTAAATTG	ATCGTCGGTTAATCTTCGTCG
WJ19	LSSA21-1	[3]	Chr8	TTGTACCCAGTTGTCCAAACAG	CAGATTGTTGCAGATTTCTTCG
WJ20	SML-002	[5]	Chr9	GTGATTGCATGCCAAATGAA	TTAGTAGCCCGCATGCTTTT
WJ21	SML-015	[5]	Chr9	TTGAGGAGGGCATTTACGTC	GAGGCGTATCTCCAAGGTGT
WJ22	LSE-77	[7]	Chr9	TGTCCACAGATCAGCGATGA	CTGGACAGTCGGGATCAGAA
注:表中 22 对引物主要参考文献[1]Hong J H,2015;[2]Oliya B K,2018;[3]Patella A,2019;[4]Riar D S,2011;[5]Simko I,2009;[6]Wang S,2017;[7]Zhang G W,2016;[8]Zhou H,2019。					

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
WJ01	WSULs159	TAMRA	177~202	177	火棍笋
				180	R1226
				182	香优九号
				184	N1175
				186	红茼笋 ¹
				188	S1240
				190	红茼笋 ²
				192	KNV000256
				194	耐寒二白皮
				196	尖叶茼笋
				198	青皮臭
				200	L525
				202	KAY008
WJ02	WSULs153	HEX	188~218	188	KNV000245
				192	N727
				194	红福
				196	火棍笋
				198	红茼笋 ¹
				200	耐寒二白皮
				202	青皮臭
				204	香优九号
				206	N1145
				208	紫叶茼笋
				210	L1043
				212	白皮笋
				214	S1240
				216	KAY008
WJ03	LSE-64	TAMRA	151~179	151	耐寒二白皮
				153	红茼笋 ¹
WJ03	LSE-64	TAMRA	151~179	155	火棍笋
				157	青皮臭
				159	红福
				161	紫叶茼笋
				163	KAY008
				167	KNV000241
				175	N1145
				177	KNV000259
				179	KNV000256

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
WJ04	KSL-92	FAM	169~199	169	N1194
				177	N1136
				179	红福
				185	红莴笋 ¹
				187	光叶莴苣
				189	青皮臭
				191	火棍笋
				193	沪优仕
				195	尖叶莴笋
				197	L1043
				199	酱笋
WJ05	LSE-56	FAM	90~136	90	N1194
				92	白皮笋
				118	L1043
				120	N1145
				124	沪优仕
				126	B200
				128	火棍笋
				130	青皮臭
				132	红莴笋 ²
				134	L1035
				136	R1226
WJ06	SSR-8	TAMRA	151~173	151	N1136
				153	红福
				159	红莴笋 ¹
				161	光叶莴苣
				163	青皮臭
				165	火棍笋
WJ06	SSR-8	TAMRA	151~173	167	N1136
				169	KAY008
				171	L1043
				173	KNV000246
WJ07	WSULs162	ROX	248~270	248	KNV000259
				250	L1035
				252	紫叶莴笋
				254	R1226
				256	L489
				258	青皮臭
				260	火棍笋
				262	耐寒二白皮
				264	香优九号
				266	红福
				268	N1145
				270	KNV000258

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
WJ08	KSL-32	ROX	201~219	201	火棍笋
				207	L525
				209	B200
				211	青皮臭
				213	KNV000285
				215	红福
				217	R1226
				219	SY-9
WJ09	LSE-83	TAMRA	176~222	176	KNV000285
				178	S1251
				180	KAY008
				182	R1226
				184	L489
				186	B200
				188	灰叶莴苣
				190	青皮臭
WJ09	LSE-83	TAMRA	176~222	192	火棍笋
				194	红莴笋 ¹
				196	KNV000286
				198	红莴笋 ²
				200	沪优仕
				202	KNV000251
				204	红福
				206	紫叶莴笋
				210	KNV000258
				212	KNV000258
				216	香优九号
				218	香优九号
WJ10	LSSA28-1	FAM	136~182	220	白皮香莴笋
				222	白皮香莴笋
				136	KNV000241
				140	KNV000286
				141	圆叶白皮笋
				142	布莱克柔丝
				144	KNV000259
				146	N1145
				148	四季白尖叶
				150	N727
				154	KNV000246
				156	KNV000280
				158	KNV000245
				160	KAY008
				162	尖叶莴笋
				164	红莴笋 ¹
				166	紫叶笋
				168	L1043
WJ10	LSSA28-1	FAM	136~182	170	青皮臭
				172	香优九号
				174	火棍笋
				176	白皮笋
WJ10	LSSA28-1	FAM	136~182	180	耐寒二白皮
				182	S1240

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
WJ11	Li-1	FAM	200~212	200	N1145
				203	青皮臭
				209	N1194
				212	B200
WJ12	LSE-79	ROX	150~204	150	红莴笋 ²
				156	碧霄
				158	R1226
				160	沪优仕
				162	紫叶莴笋
				164	青皮臭
				166	火棍笋
				168	KNV000241
				170	光叶莴苣
				172	香优九号
				174	SY-8
				176	KNV000246
				178	KAY008
				180	B200
				182	R752
				184	LS15523
				192	KNV000252
				194	KNV000251
				196	沪优仕
				200	N1145
WJ13	KSL-245	FAM	253~273	202	N1145
				204	N745
				253	B200
				255	N1145
				257	N1136
				265	红福
				267	沪优仕
				269	S1240
WJ14	KSL-97	HEX	221~233	271	青皮臭
				273	火棍笋
WJ14	KSL-97	HEX	221~233	221	S1240
				227	紫叶莴笋
				229	青皮臭
WJ15	SH42	TAMRA	265~307	231	KNV000256
				233	N1194
				265	沪优仕
				268	KNV000283
				271	尖叶莴笋
				274	L1025
				277	沪优仕
				280	火棍笋
				286	N1136
				292	L525
				295	KAY008
				298	N1175
				301	红莴笋 ¹
				304	紫叶莴笋
				307	青皮臭

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
WJ16	WSULs18	ROX	207~260	207	沪优仕
				210	KAY008
				233	KNV000258
				236	M577
				239	紫叶笋
				248	沪优仕
				254	火棍笋
				257	白皮笋
				260	尖叶茭笋
WJ17	SSR-15	FAM	137~155	137	N1175
				142	尖叶茭笋
				144	紫叶笋
				147	S1251
				149	红茭笋 ²
				151	N1175
				153	N727
				155	碧霄
WJ18	LSSA05	ROX	249~287	249	KAY008
				255	N1175
				259	N1175
				263	KAY008
				267	沪优仕
WJ18	LSSA05	ROX	249~287	269	KNV000245
				271	红福
				273	青皮臭
				275	沪优仕
				277	KNV000241
				279	紫叶茭笋
				281	M1067
				283	N727
				285	L1043
				287	S1251
WJ19	LSSA21-1	HEX	269~331	269	N1194
				273	KNV000245
				279	R1226
				281	S1240
				283	青皮臭
				285	N1145
				287	尖叶茭笋
				289	S1251
				291	火棍笋
				293	酱笋
				295	白皮香茭笋
				297	沪优仕
				299	KNV000256
				301	光叶茭苳
				303	紫叶笋
				305	KNV000259
				309	L525
				331	L489

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
WJ20	SML-002	FAM	169~223	169	KNV000286
				184	青皮臭
				190	N1145
				196	灰叶茼蒿
				199	M1067
				202	碧霄
				208	沪优仕
				211	红茼蒿 ¹
				214	N727
				217	火棍笋
WJ20	SML-002	FAM	169~223	220	耐寒二白皮
				223	红福
WJ21	SML-015	FAM	240~270	240	沪优仕
				245	红福
				250	KNV000283
				255	沪优仕
				260	S1240
				265	尖叶茼蒿
				270	R1226
WJ22	LSE-77	TAMRA	189~213	189	绿叶鲫鱼笋
				191	KNV000245
				193	KNV000283
				195	绿叶鲫鱼笋
				197	紫叶茼蒿
				199	N727
				201	N1175
				203	R1226
				207	S1251
				209	SY-9
				211	KNV000256
				213	KNV000256
注 1:附录 D 中采用的荧光标记仅为示例,采用其他荧光标记类型时,需要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:品种右上角的编号,1——保藏编号为 V09F0064,2——保藏编号为 V09F0077。					

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/代号	品种来源	保藏编号	编号	品种名称/代号	品种来源	保藏编号
1	LS15523	NCGB	XIN31786	29	SY-8	BAAFS	—
2	KAY008	NCGB	XIN36866	30	SY-9	BAAFS	—
3	耐寒二白皮	NCGB	XIN33825	31	L1043	BAAFS	—
4	碧霄	NCGB	XIN40964	32	S1251	BAAFS	—
5	布莱克柔丝	NCGB	XIN39647	33	L1025	BAAFS	—
6	四季白尖叶	NCGB	XIN33130	34	L1035	BAAFS	—
7	火棍笋	IVFCAAS	V09F0360	35	N1136	BAAFS	—
8	红茼笋	IVFCAAS	V09F0064	36	M577	BAAFS	—
9	红茼笋	IVFCAAS	V09F0077	37	N1175	BAAFS	—
10	尖叶茼笋	IVFCAAS	V09F0190	38	N1145	BAAFS	—
11	青皮臭	IVFCAAS	V09F0216	39	N745	BAAFS	—
12	绿叶鲫鱼笋	IVFCAAS	V09F0130	40	L525	BAAFS	—
13	紫叶茼笋	IVFCAAS	V09F0268	41	N1194	BAAFS	—
14	紫叶笋	IVFCAAS	V09F0120	42	M1067	BAAFS	—
15	酱笋	IVFCAAS	V09F0123	43	N727	BAAFS	—
16	白皮笋	IVFCAAS	V09F0260	44	KNV000241	SAGC	—
17	白皮香茼笋	IVFCAAS	V09F0215	45	KNV000245	SAGC	—
18	光叶茼茞	IVFCAAS	V09F0415	46	KNV000246	SAGC	—
19	灰叶茼茞	IVFCAAS	V09F0392	47	KNV000251	SAGC	—
20	圆叶白皮笋	IVFCAAS	V09F0289	48	KNV000252	SAGC	—
21	香优九号	SSCNPVTMARA	—	49	KNV000256	SAGC	—
22	红福	SSCNPVTMARA	—	50	KNV000258	SAGC	—
23	沪优仕	SSCNPVTMARA	—	51	KNV000259	SAGC	—
24	B200	BAAFS	—	52	KNV000280	SAGC	—
25	R752	BAAFS	—	53	KNV000283	SAGC	—
26	L489	BAAFS	—	54	KNV000285	SAGC	—
27	R1226	BAAFS	—	55	KNV000286	SAGC	—
28	S1240	BAAFS	—				

注:NCGB为国家作物种质库;IVFCAAS为中国农业科学院蔬菜花卉研究所;SSCNPVTMARA为农业农村部植物新品种测试(上海)分中心;BAAFS为北京市农林科学院;SAGC为上海市农业生物基因中心。