

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4495—2025

芥菜品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of Mustard (*Brassica juncea* 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 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这些专利的责任。

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、湖南农业大学、四川省农业科学院作物研究所、重庆市渝东南农业科学院。

本文件主要起草人：韩瑞玺、颜新林、沈进娟、余毅、马莹雪、张凯浙、管中荣、张浙峰、冷亚梅、李媛媛、冯艳芳、杨旭红、范永红、饶力群、唐浩、陈红、张秀杰。



芥菜品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

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

本文件适用于芥菜品种 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(deoxyribonucleoside 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

不同芥菜品种基因组中 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,进而区分不同的芥菜品种。

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,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	推荐反应体积, 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	25 ng/ μ L	2.5ng/ μ L	2
双蒸水	—	—	14.6
总体积			20

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 40 s,54 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 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。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 65 ℃预热的 1 $\times$ 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 $\sim$ 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。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)加以确定。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 $\pm$ 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 25,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 25,差异位点数为 1,送检样品在 JCS4 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 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 $\times$ 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.3.8 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.3.9 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	染色体	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
BJ01	JCS4	1A	AAACGGCTTGCATTGTTCTC	GGCTTGCTTGATCCAGTCTC
BJ02	JCS41	1A	ACAAACCTTCTTGTCCTGTCGT	ATATCTTAGCTCTCCCACGATGC
BJ03	JCS42	1A	ATTGGGTTC TGACCTTTTCTC	CTTTTCCTCATCGCTACCAC
BJ04	JCS15	2A	TTCGCTTTCCTTACTTTCG	CTCAGTTTCTGCAATCCACG
BJ05	JCS17	2A	ACGAAGTGGGTTAGTAGGCG	GAAGCCTTTCTCCACCATTG
BJ06	JCS48	2A	GAGAATCTCACCGCTTCTGC	ATGCTTAGGCTTGTTGGGTG
BJ07	JCS22	3A	GTTGCGGCGAAACAGAGAAG	GAGTAGGCGATCAAACCGAG
BJ08	JCS63	3A	GCGATGTTTTTCTTCAGTGTC	TTAATCCCTACCCACAATTTCC
BJ09	JCS39	4A	GCATCACCCCTAGTTAATCGAA	AAGAAGGGAGAAACCTGAAACC
BJ10	JCS21	4A	TCTTCAGGGTTTCCAACGAC	AGGCTCCTTCATTTGATCCC
BJ11	JCS30	6A	TCAAACCATGAACCTTCTTC	TCTCTGTCTAAGCCTATCGC
BJ12	JCS40	7A	TCTGTGTGCAGGAGAACTGTA	AGATCGTGAGTTCTTGATGAC
BJ13	JCS37	7A	GCTTGCGAGTAGGGTCTCAC	TGCTTTCTTCCCTGCGTAAT
BJ14	JCS1	7A	ATGTCCGGATAACCGAATCC	GAAGCTTTTCAATTTTAAAGTTCTCTC
BJ15	JCS35	7A	TCCAGTGCCGTTAAAGAAA	ATTGCATAAAATCGGGAGG
BJ16	JCS72	7A	CGGACCTATTCTCAAGAGC	AGGAGACAAGGAGCCACTCA
BJ17	JCS53	8A	CGTTGGCAAAAAGCCTACTC	CTCAGGGACGTCGTAAGAGC
BJ18	JCS76	8A	CAAACCAATCTCGGACAAAC	CGGAGCCACCATCATCAAC
BJ19	JCS14	9A	GAATCCAACGGATCAGAAGC	GCGTTCCAGAGACTCCTCC
BJ20	JCS64	9A	GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA	GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG
BJ21	JCS80	10A	TCGGGGTTTGTTGTGAGG	GAGGAGGATGCTAAGAGTGAGC
BJ22	JCS81	1B	TATCCGCTCTCCCTCTCTCA	GCCACTCTCCTCTGCTTTTG
BJ23	JCS16	2B	GTCGGGTTTGAGTGAGTTGG	CATCGCAGATCCTTCTCTCC
BJ24	JCS26	6B	GAAGTTTCCAACAAAACAGG	GATTATGAACCACCGAGAGA
BJ25	JCS33	8B	AGTTGGAACCCCTATCCATTTT	TCTTTGCTTTCTTCTCCTTTTCG

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	常见等位变异, bp	参照品种名称
BJ01	JCS4	6-FAM	169~184	169	日本光头芥
				174	日本光头芥
				176	窄板奶奶菜
				180	灰叶头菜
				184	密县小芥
BJ02	JCS41	ROX	235~276	235	小叶冲辣菜
				244	二月青菜
				247	宽板青菜
				250	灰叶头菜
				253	立耳朵
				262	青叶大头菜
				276	华芥 2 号
BJ03	JCS42	TAMRA	101~126	101	立耳朵
				114	宽板青菜
				126	日本光头芥
BJ04	JCS15	TAMRA	271~294	271	南平雪里蕻
				290	吉安早芥菜
				292	宽板青菜
				294	内江棒菜
BJ05	JCS17	ROX	129~177	129	永安小叶
				158	立耳朵
				177	宁波细叶黄种雪里蕻
BJ06	JCS48	HEX	197~215	197	南平雪里蕻
				199	九头鸟雪里蕻
				201	武平大柄芥
				203	九头芥
				207	立耳朵
				209	宽板青菜
				211	紫叶芥
				215	长乐本地大头菜
BJ07	JCS22	6-FAM	133~160	133	永安小叶
				138	灰叶头菜
				144	永安小叶
				160	灰叶头菜
				178	二月青菜
BJ08	JCS63	ROX	297~308	297	内江棒菜
				306	横县大头菜
				308	宽板青菜
BJ09	JCS39	HEX	203~214	203	紫叶芥
				205	紫叶芥
				214	立耳朵

表 D.1 （续）

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围, bp	常见等位变异, bp	参照品种名称
BJ10	JCS21	TAMRA	181~195	181	华芥 5 号
				187	灰叶头菜
				192	小叶冲辣菜
				195	立耳朵
BJ11	JCS30	ROX	183~187	183	立耳朵
				185	灰叶头菜
				187	细叶湾头芥
BJ12	JCS40	6-FAM	254~318	254	立耳朵
				262	华芥 5 号
				264	华芥 2 号
				266	宁波细叶黄种雪里蕻
				268	细叶湾头芥
				282	花叶菜心
				286	九头鸟雪里蕻
				304	吉安早芥菜头
				310	小叶冲辣菜
				314	宽板青菜
				318	南充棒菜
BJ13	JCS37	ROX	152~165	152	立耳朵
				154	灰叶头菜
				159	灰叶头菜
				165	细叶湾头芥
BJ14	JCS1	ROX	320~363	320	二月青菜
				324	宁波细叶黄种雪里蕻
				328	细叶湾头芥
				349	上海金丝芥
BJ14	JCS1	ROX	320~363	353	立耳朵
				355	小叶冲辣菜
				357	甬榨 805
				361	窄板奶奶菜
				363	九头鸟雪里蕻
BJ15	JCS35	TAMRA	365~381	365	南平雪里蕻
				367	武平大柄芥
				373	白甲菜头
				376	优选包包青 2 号
				381	吉安早芥菜头
BJ16	JCS72	ROX	184~202	184	连城青芥菜
				190	南平雪里蕻
				198	九头芥
				200	花叶菜心
				202	吉安迟芥菜头
BJ17	JCS53	ROX	188~214	188	红叶大头菜
				204	华芥 5 号
				210	立耳朵
				214	九头鸟雪里蕻
BJ18	JCS76	HEX	200~254	200	二月青菜
				249	立耳朵
				251	小叶冲辣菜
				254	阉鸡尾辣菜

表 D.1 （续）

引物编号	引物名称	荧光标记	等位变异范围, bp	常见等位变异, bp	参照品种名称
BJ19	JCS14	ROX	208~225	208	灰叶头菜
				222	南平雪里蕻
				225	灰叶头菜
BJ20	JCS64	TAMRA	246~252	246	小叶冲辣菜
				248	凤尾青菜
				250	立耳朵
				252	日本光头芥
BJ21	JCS80	6-FAM	212~249	212	日本光头芥
				231	甬榨 805
				240	立耳朵
				244	二月青菜
				249	密县小芥
BJ22	JCS81	ROX	244~253	244	红叶大头菜
				248	凤尾青菜
				253	青叶大头菜
BJ22	JCS81	ROX	255~261	255	凤尾青菜
				257	小叶冲辣菜
				259	佛爷菜
				261	红叶大头菜
BJ23	JCS16	6-FAM	123~138	123	温县小芥
				129	小叶冲辣菜
				132	温县小芥
				138	立耳朵
BJ24	JCS26	6-FAM	117~124	117	青叶大头菜
				120	细叶湾头芥
				122	南平雪里蕻
				124	立耳朵
BJ25	JCS33	HEX	132~149	132	窄板奶奶菜
				145	华芥 1 号
				147	丰都香菜
				149	华芥 1 号
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: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。					

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	类别	编号	品种名称	品种来源	类别
1	九头芥	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	20	宽板青菜	重庆市渝东南农业科学院	宽柄芥
2	连城青芥菜	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	21	二月青菜	重庆市渝东南农业科学院	宽柄芥
3	南平雪里蕻	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	22	红叶大头菜	重庆市渝东南农业科学院	大头芥
4	武平大柄芥	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	23	青叶大头菜	重庆市渝东南农业科学院	大头芥
5	密县小芥	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	24	日本光头芥	重庆市渝东南农业科学院	大头芥
6	温县小芥	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	25	丰都香菜	重庆市渝东南农业科学院	长柄芥
7	紫叶芥	农业农村部植物新品种保藏中心	叶用芥菜	26	窄板奶油菜	重庆市渝东南农业科学院	叶瘤芥
8	花叶菜心	农业农村部植物新品种保藏中心	茎用芥菜	27	九头鸟雪里蕻	重庆市渝东南农业科学院	分蘖芥
9	吉安早芥菜头	农业农村部植物新品种保藏中心	茎用芥菜	28	阆鸡尾辣菜	重庆市渝东南农业科学院	凤尾芥
10	吉安迟芥菜头	农业农村部植物新品种保藏中心	茎用芥菜	29	凤尾青菜	重庆市渝东南农业科学院	凤尾芥
11	灰叶头菜	农业农村部植物新品种保藏中心	根用芥菜	30	小叶冲辣菜	重庆市渝东南农业科学院	薹芥
12	横县大头菜	农业农村部植物新品种保藏中心	根用芥菜	31	华芥 1 号	农业农村部植物新品种保藏中心	分蘖芥
13	长乐本地大头菜	农业农村部植物新品种保藏中心	根用芥菜	32	华芥 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心	分蘖芥
14	永安小叶	重庆市渝东南农业科学院	茎瘤芥	33	华芥 5 号	农业农村部植物新品种保藏中心	分蘖芥
15	立耳朵	重庆市渝东南农业科学院	茎瘤芥	34	宁波细叶黄种雪里蕻	农业农村部植物新品种保藏中心	分蘖芥
16	佛爷菜	重庆市渝东南农业科学院	茎瘤芥	35	上海金丝芥	农业农村部植物新品种保藏中心	分蘖芥
17	南充棒菜	重庆市渝东南农业科学院	笋子芥	36	优选包包青 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心	宽柄芥
18	白甲菜头	重庆市渝东南农业科学院	笋子芥	37	甬榨 805	宁波市农业科学研究院	茎瘤芥
19	内江棒菜	重庆市渝东南农业科学院	笋子芥	38	细叶湾头芥	宁波市农业科学研究院	分蘖芥