

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4496—2025

白菜型油菜品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of turnip type rape 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 结果判定及表述 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 13

附录 F(资料性) 引物分组 14

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：四川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：余毅、张浙峰、毛强、冷亚梅、张凯浙、王晨宇、王雨、李姣、胡禄贵、罗俊、徐宇恒、赖运平。



白菜型油菜品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)进行白菜型油菜(*brassia campestris* L.)品种鉴定的术语和定义、缩略语、原理、主要仪器设备及试剂、溶液配置、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。

本文件适用于白菜型油菜品种的 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 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 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

白菜型油菜品种基因组中存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同白菜型油菜品种在同一 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

引物名单及序列见附录 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

送验样品可为种子、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 的要求。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

将混合样品在液氮中研磨至粉末,迅速取约 200 mg 粉末置于 2.0 mL 离心管中;每管加入 600 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液,充分混合,65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min~60 min,每间隔 15 min 轻缓颠倒混匀,水浴后 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液转移至新的离心管中,每管加入与提取液等体积的三氯甲烷和异戊醇,轻缓混匀后静置 10 min;12 000 r/min 离心 10 min 后。吸取上清液至新的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min,DNA 沉淀后 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,用体积分数为 70%的乙醇溶液洗涤沉淀 2 遍,晾干,加入 100 μ L 双蒸水或 TE 缓冲液充分溶解。检测 DNA 浓度和质量,-20 $^{\circ}$ C 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 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 PCR 扩增反应体系

反应组分	原浓度	终浓度	反应体积(μ L)
10 $\times$ 缓冲液(含 MgCl ₂)	10 $\times$	1 $\times$	1.0
dNTPs	2.5 mmol/L	0.15 mmol/L	0.6
Taq 酶	5 U/ μ L	0.5 U/ μ L	0.1
正向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L	0.5
反向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L	0.5
DNA	25 ng/ μ L	2.5 ng/ μ L	1
双蒸水	—	—	6.3
总体积			10
注:反应组分的原浓度、体积为参考值。			

10.3.2 反应程序

推荐反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 35 个循环;

72 ℃延伸 5 min,产物 4 ℃保存。

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 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% 的变性 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。

注:聚丙烯酰胺凝胶电泳可根据不同仪器设备进行调整。

10.4.1.2 变性

在 10 μ L PCR 产物中加入 2 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液,混匀。在 PCR 扩增仪上运行 95 ℃变性 5 min,4 ℃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各加入 600 mL 的 1 $\times$ TBE 缓冲液,使其没过电极线。85 W 恒功率预电泳 10 min~20 min。用移液器清除凝胶顶端气泡和杂质。将样品梳插入凝胶 1 mm~2 mm。每一个加样孔点入 2 μ L~3 μ L 样品,除送检样品外,还宜同时加入参照品种扩增产物。85 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)。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。电泳参考时间为 1 h~2.5 h(电泳时间取决于扩增片段的大小范围)。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 银染

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

按照预先确定的引物分组(见附录 F),分别取等体积的同一组中不同荧光标记引物的扩增产物,混匀稀释。从混合液中吸取 1 μ L 加入 DNA 分析仪专用深孔板孔中。

除待测样品外,每个 SSR 位点还应同时包括 2 个~3 个参照品种的扩增产物。

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 ℃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 位点的等位变异以扩增片段大小的形式表示,详见附录 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。

纯合位点的等位变异数据记为 X/X ,其中 X 为该位点等位变异大小;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大小,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一个等位变异,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两个等位变异,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_____品种指纹)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 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 琼脂糖(C₂₄H₃₈O₁₉,CAS 号:9012-36-6)。
- A. 2. 15 DNA Marker:DNA 片段分布范围在 50 bp~500 bp。
- A. 2. 16 甲酰胺(CH₃NO,CAS 号:75-12-7)。
- A. 2. 17 溴酚蓝(C₁₉H₁₀Br₄O₅S,CAS 号:115-39-9)。
- A. 2. 18 二甲苯青(C₂₅H₂₇N₂NaO₆S₂,CAS 号:2650-17-1)。
- A. 2. 19 甲叉双丙烯酰胺[(H₂C=CHCONH)₂CH₂,CAS 号:110-26-9]。
- A. 2. 20 丙烯酰胺(C₃H₅NO,CAS 号:79-06-1)。
- A. 2. 21 硼酸(H₃BO₃,CAS 号:10043-35-3)。
- A. 2. 22 尿素(CH₄N₂O,CAS 号:57-13-6)。
- A. 2. 23 亲和硅烷。
- A. 2. 24 二甲基二氯硅烷(C₂H₆Cl₂Si,CAS 号:75-78-5)。
- A. 2. 25 无水乙醇(C₂H₆O,CAS 号:64-17-5)。
- A. 2. 26 四甲基乙二胺(TEMED,C₆H₁₆N₂,CAS 号:110-18-9)。
- A. 2. 27 过硫酸铵[APS,(NH₄)₂S₂O₈,CAS 号:7727-54-0]。
- A. 2. 28 冰醋酸(CH₃COOH,CAS 号:64-19-7)。
- A. 2. 29 硝酸银(AgNO₃,CAS 号:7761-88-8)。
- A. 2. 30 甲醛(HCHO,CAS 号:50-00-0)。
- A. 2. 31 DNA 分析仪用丙烯酰胺胶液。
- A. 2. 32 DNA 分析仪用分子量内标。
- A. 2. 33 DNA 分析仪用电泳缓冲液。
- A. 2. 34 DNA 分析仪用光谱校准基质,包括 6-FAM、TAMRA、HEX 和 ROX 4 种荧光标记。

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(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 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,按照说明书加水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,各取 10 μL 储存液,加 80 μL 水配制成终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

B.3 变性 PAGE 溶液的配制

B.3.1 40%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 6%变性聚丙烯酰胺凝胶溶液

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 天)。

B.3.7 10 $\times$ TBE 缓冲液

称取 Tris 108 g,硼酸 55 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 L。

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 L。

B.4.2 染色液

称取 1 g 硝酸银,加水定容至 1 L。

B.4.3 显影液

称取 10 g 氢氧化钠溶于 1 L 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 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')
1	ACMP00064	A05	GCATCATCTTCGTCATTTTCG	GGGTCACCGAGTTATGCAA
2	ACMP00085	A03	CTTCACGTTGCAGGTTTCC	TGCTAAATGCTCTCGTCGTC
3	ACMP00253	A03	TCCTCTCCTTCAGACACAGC	CAGCATCCATTGGTTTCATTC
4	ACMP00374	A02	TTCCTTATTGGGATGTCGTG	CTCGTTGTTGAGGAAGCAAA
5	ACMP00424	A08	CATCAGACGGTGGATTTGAG	CCGATCCTCTCTTCTCTTGG
6	ACMP00528	A02	ACAGAGTCCAAGCAGCCATA	AGAAGGCTCCATCCTCTTCA
7	ACMP00716	未知	GTGGAGAAACGAGCGGTAAT	AGCAGGCTTCAATGTGGAC
8	ACMP00749	A02	AAGGGATCGACGAACATCTC	ACGCATGTCACACCAACATA
9	ACMP00759	A01	GTGCTGGCCTCACACAGTA	TCAACAACCTACGGACCTGGA
10	ACMP00839	A07	ATCTCACGTTGAAGCACCT	GCAGTTCCATCATTGGTTTG
11	sau-um146	A03	CTCGCAAAATCCCTTCTTCG	CATATCGCTCGAGTTGCAGA
12	sau-um445	A09	AACAAAAACCTTGGCTCCCC	ACGCTCCACTGAAAGACGTTAC
13	CALSSR	A08	GTTAAGTGTGGCGTTAGAGG	CCTTGGTACATGCCACTGAA
14	BnGMS165	A04	ATTGACGCACTGTCTTCTCT	AAACAATAAGCCAACGAAAG
15	BnGMS175	A02	TGATCTTCCTGAGAATCAGC	GAGGAAGAAGGAGAGAGGAA
16	BnGMS181	A09	GTAAATGAAGGAATGGGTCA	GTCTTCTCTGTCTTCTCTCT
17	CX48	A06	CAACACAATACAAGAAACAAACAAA	CGCGAAAGAGAAGTTCGAGT
18	CX81	A05	TGCCCTTCTTTTCATCTGCTT	TCTGTTCCCTCATTACCAA
19	CX111	A02	TGCGTTGTGGTCTGAGAATC	AGCCTCACATCAGCGTCTCT
20	CX119	A03	GGTGGTTTCGCTAGAGGATG	CTGCGAATTCAACCGTCTCT
21	CX63	A08	CAGAACCAGTCGCCACATAA	CTGCTCTCGAGTATGCCTGA
22	Ra1-H08	A06	GTCGATGATCACGGAAGAGG	CTTGACAGCTACGGTTTGTCC
23	A77096	A08	TAGGACACGTGACAAAACCTTCAT	TATCGATGGTATCAAAGAATGGA
24	CB10298	A09	CAACATCCCAGCAGGTAA	CCGTAGCTGTGCTCATTC
25	CB10109	A10	GTGTAGCCAGCTTGATCCT	CTTCTTCTGATGCAGCAGTG
26	CB10524	A10	ATGGAAGGCAACGATTCT	TTCTGTGCTAGGTCTGCC
27	Na12D04	A06	ACGGAGTGATGATGGGTCTC	CCTCAATGAAACTGAAATATGTGTG
28	Na14D07	A01	GCATAACGTCAGCGTCAAAC	CTGCGGGACACATAACTTTG
29	Na14G10	A03	ACGAAGTGGGTTAGTAGGCG	GAAGCCTTTCTCCACCATTG
30	Ol10F12	A08	TCCATGTTTCATGTTGGAGG	CTCTCCGGCTTCACTTTCC

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	ACMP00064	TAMRA	230~263	230	浩油 6 号
				236	浩油 6 号
				240	宁强苍社油菜
				250	泾阳油菜
				253	银黄
				256	芮城五角籽
				263	泾阳油菜
2	ACMP00085	HEX	156~170	156	延油 3 号
				162	花籽北方白
				164	云梦剑杆白
				168	浩油 6 号
				170	宁强苍社油菜
3	ACMP00253	TAMRA	195~201	195	9858
				197	青油 241
				199	芮城五角籽
				201	门源小油菜
4	ACMP00374	ROX	272~293	272	北山油菜
				275	天油 1 号
				283	延油 3 号
				287	延油 3 号
				290	碛石向阳籽
				293	芮城五角籽
5	ACMP00424	HEX	135~151	135	云梦剑杆白
				140	天油 3 号
				143	天油 4 号
				146	花籽北方白
				148	延油 3 号
				151	宁强苍社油菜
6	ACMP00528	6-FAM	288~300	288	芮城五角籽
				291	泾阳油菜
6	ACMP00528	6-FAM	288~300	297	紫株分混
				300	兴义白油菜
7	ACMP00716	HEX	187~211	187	芮城五角籽
				205	云梦剑杆白
				208	延油 3 号
				211	皖油 1 号
8	ACMP00749	6-FAM	173~179	173	延油 3 号
				175	浩油 5 号
				177	兴义白油菜
				179	花籽北方白

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
9	ACMP00759	TAMRA	179~193	179	云梦剑杆白
				181	芮城五角籽
				183	泾阳油菜
				185	青油 9 号
				187	青油 9 号
				189	北油 1 号
				191	芮城五角籽
				193	碛石向阳籽
10	ACMP00839	ROX	348~392	348	云梦剑杆白
				350	天油 4 号
				362	宁强苍社油菜
				364	芮城五角籽
				374	浩油 4 号
				377	延油 3 号
				380	白杂 19 号
				392	芮城五角籽
11	sau-um146	6-FAM	154~170	154	皖油 1 号
				160	芮城五角籽
				164	延油 3 号
				170	兴义白油菜
12	sau-um445	TAMRA	293~314	293	浩油 11 号
				295	银黄
				297	芮城五角籽
				305	兴义白油菜
				307	天油 4 号
				312	泾阳油菜
				314	天油 3 号
13	CALSSR	ROX	136~161	136	芮城五角籽
				139	泾阳油菜
				142	白杂 19 号
				144	皖油 1 号
				146	兴义白油菜
				161	斯班
14	BnGMS165	TAMRA	353~370	353	浩油 5 号
				356	浩油 4 号
				361	芮城五角籽
				364	云梦剑杆白
				370	9858
15	BnGMS175	ROX	224~238	224	北油 1 号
				226	北山油菜
				228	宁强苍社油菜
				234	延油 3 号
				238	兴义白油菜
16	BnGMS181	HEX	181~188	181	皖油 1 号
				185	碛石向阳籽
				188	泾阳油菜
17	CX48	ROX	219~244	219	芮城五角籽
				234	泾阳油菜
				240	宁强苍社油菜
				244	碛石向阳籽

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
18	CX81	HEX	188~209	188	碛石向阳籽
				200	泾阳油菜
				203	青油 17 号
				209	云梦剑杆白
19	CX111	6-FAM	200~206	200	天油 3 号
				203	碛石向阳籽
				206	泾阳油菜
20	CX119	ROX	199~211	199	云梦剑杆白
				205	泾阳油菜
				211	芮城五角籽
21	CX63	6-FAM	192~201	192	延油 3 号
				195	碛石向阳籽
				201	云梦剑杆白
22	Ra1-H08	HEX	179~191	179	泾阳油菜
				185	皖油 1 号
				191	芮城五角籽
23	A77096	6-FAM	205~220	205	碛石向阳籽
				218	天油 3 号
				220	泾阳油菜
24	CB10298	ROX	199~218	199	青油 241
				205	云梦剑杆白
				218	芮城五角籽
25	CB10109	HEX	259~282	259	泾阳油菜
				272	云梦剑杆白
				278	银黄
				282	青油 17 号
26	CB10524	HEX	217~238	217	碛石向阳籽
				223	白杂 19 号
				238	泾阳油菜
27	Na12D04	HEX	268~286	268	斯班
				272	宁强苍社油菜
				278	青油 241
				280	云梦剑杆白
				282	门源小油菜
				286	银黄
28	Na14D07	6-FAM	123~129	123	兴义白油菜
				126	芮城五角籽
				129	宁强苍社油菜
29	Na14G10	TAMRA	128~176	128	天油 3 号
				157	云梦剑杆白
				164	泾阳油菜
				176	碛石向阳籽
30	Ol10F12	6-FAM	109~129	109	白杂 19 号
				112	芮城五角籽
				123	泾阳油菜
				129	云梦剑杆白

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,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: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,使用前需确认其等位变异。

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	浩油 11 号	青海大学	15	花籽北方白	青海大学
2	天油 1 号	青海大学	16	天油 4 号	青海大学
3	紫株分混	青海大学	17	银黄	青海大学
4	青油 9 号	青海大学	18	白杂 19 号	青海大学
5	北油 1 号	青海大学	19	天油 3 号	青海大学
6	北山油菜	青海大学	20	皖油 1 号	青海大学
7	9858	青海大学	21	兴义白油菜	青海大学
8	浩油 4 号	青海大学	22	宁强苍社油菜	青海大学
9	浩油 5 号	青海大学	23	延油 3 号	青海大学
10	门源小油菜	青海大学	24	碛石向阳籽	青海大学
11	斯班	青海大学	25	云梦剑杆白	青海大学
12	青油 17 号	青海大学	26	泾阳油菜	青海大学
13	青油 241	青海大学	27	芮城五角籽	青海大学
14	浩油 6 号	青海大学	28		

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

分组	6-FAM 标记引物	HEX 标记引物	ROX 标记引物	TAMRA 标记引物
1	Ol10F12(109~129)	ACMP00424(135~151)	CB10298(199~218)	ACMP00759(179~193)
2	Na14D07(123~129)	Ra1-H08(179~191)	CALSSR(136~161)	ACMP00253(195~201)
3	ACMP00749(173~179)	ACMP00085(156~170)	CX119(199~211)	ACMP00064(230~263)
4	Sau-um146(154~170)	ACMP00716(187~211)	BnGMS175(224~238)	Sau-um445(293~314)
5	CX63(192~201)	BnGMS181(181~188)	CX48(219~244)	Na14G10(128~176)
6	CX111(200~206)	CB10524(217~238)	ACMP00374(272~293)	BnGMS165(353~370)
7	A77096(205~220)	CB10109(259~282)	ACMP00839(348~392)	
8	ACMP00528(288~300)	CX81(188~209) Na12D04(268~286)		
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。				