

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4498—2025

大葱品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of scallion 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 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：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：王穆穆、王东建、王晨宇、王晖、李汝玉、张晗、郑永胜、王丽媛、程惠敏、耿慧晶、段丽丽、李华、安聪聪、王玮。



大葱品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行大葱(*Allium fistulosum* L. var. *giganteum* Makino)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。

本文件适用于大葱品种 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

大葱品种基因组存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同大葱品种在同一 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

取混合样本约 200 mg,置于 2.0 mL 圆底离心管中,经液氮冷冻后充分研磨;每管加入 600 μ L 预热至 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	推荐体积, μ L
10 $\times$ 缓冲液(含 MgCl ₂)	10 $\times$	1 $\times$	2.0
dNTPs	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	1.6
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.2
正向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L)	1.0
反向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L)	1.0
DNA	25 ng/ μ L	2.5 ng/ μ L	2.0
双蒸水	—	—	12.2
总体积			20.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 35 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 20 μ L PCR 产物中加入 4 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液,混匀。在 PCR 扩增仪上运行 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 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 分析仪操作手册进行电泳,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。

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_____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 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,(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 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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.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 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,各取 10 μL 储存液,加 180 μL TE 缓冲液配制成终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 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×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')
P01	AFS015	1	ATCTCACTGTCCTTGTACCTGAAAG	CATCTTGACTTTGTGATATTTGTGC
P02	AFB06E05	1	TTTGAATTGGCAGAGACAATGGTG	TGTATGGAGGAAGGGCTGAAAGAG
P03	AFS111	2	TGTTTAATGGACTTTCAATGCCTGT	GCATTAAAATGAAGAAATCCCGAAG
P04	AFC08G05	2	GTAAAGGCCCATTTGGGTATGACA	GAAGTTCGATGCCTTCATGTCTCA
P05	AFS006	3	GTGACCTTATGTAGGGGTTAGGAT	TCGCTCCATTCAAATTAATAAAA
P06	AFC03G02	3	TCATCTCCCTCTTGTCTGATGTCTG	TCCGATGAAGTTCGAGTAGAAGGG
P07	AFS156	4	TCATATGCATGTCCATAATCCGATA	TTTATAAATAGACCCCGAGCGAAAA
P08	AFA15G07	4	AGAGCGAGAACAATAGTGGAGGGA	AACGAATACCTAAGGAAGGGTAACG
P09	AFAT05D09	4	CCGGATAAAATTTACCTGCAAATCC	CAGCCATTAAAGAACCTGATGTAAG
P10	AFS109	5	CCTATGTCTTTACCTATCCAACCAACA	CCGAATTTCAAGTGTGTCAAGTTTT
P11	AFS131	5	CAACAAATCAGAGAGAAACAGATGA	ACTGTATATTTATGTATCACTCCATGTAAA
P12	AFRA04B10	6	GTGAGTGTGCAGTTTGTGAGGGT	GTGCGCAGGTCCATCTGTAAAAA
P13	AFB20G05	6	TTCCACACCGTAATCCAACCTCCTT	ATTAAAATGAGCGTTGTTGGCTCG
P14	AFB12A08	6	CAACACTCTAATTCGAACAAAAATGAGA	CATCCGAAATAAAAATTGATAGTGGACA
P15	AFAA03F01	7	CGACTTTGTTTCTCGCTCTTGGTT	AAATTGCACAAGGCTCTGCGAGATT
P16	AFA15E08	7	TGAGAAGTGTGTGTAAGGCAAGGC	GCCCCAAAGTCATACTGCTGGTAG
P17	AFA16D05	7	AATTCACCCATAACTCCGCTACG	GTGCAACACTACTGACCTCGCATT
P18	AFS088	8	TATCTTCGAGCACGGTTCTTCTTGT	ATGGCTTCGATGATGGATAGTTGTA
P19	AFA02F09	8	CCTAGGTTCATTAGGGGACTATAGGA	CCAAGCACCAGTATCTGCCTTTCT
P20	AFAT01F03	8	TGACATAGACCCTTTTGTAGGAGGAAA	TGCATACATACATACATACGCATATACATAAA

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
P01	AFS015	6-FAM	329~364	329	夏薇
				344	惠和 68
				356	春香
				358	冀葱 8 号
				360	辽葱 6 号
				362	08 青 601A
				364	244A
P02	AFB06E05	HEX	124~147	124	辽葱 6 号
				129	青杂 2 号
				143	济葱 1903
				145	244A
				147	惠和 68
P03	AFS111	6-FAM	223~229	223	辽葱 6 号
				225	244A
				229	寒青独秀
P04	AFC08G05	TAMRA	278~296	278	济葱 1904
				287	夏薇
				290	春香
				293	冀葱 8 号
				296	冀葱 4 号
P05	AFS006	TAMRA	285~307	285	辽葱 6 号
				287	光辉
				289	冀葱 7 号
				291	攀登者
				293	惠和晚抽
				295	济葱 1903
				297	春香
				299	244A
				301	青杂 2 号
				303	08 青 601A
				307	绿+白
P06	AFC03G02	TAMRA	161~170	161	寒青独秀
				164	905 开拓者
				167	辽葱 6 号
				170	08 青 601A
P07	AFS156	HEX	209~223	209	长白葱
				211	青杂 2 号
				213	春香
				215	夏薇
				217	905 开拓者
				219	济葱 1903

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
P07	AFS156	HEX	209~223	221	冀葱 8 号
				223	光辉
P08	AFA15G07	TAMRA	207~214	207	光辉
				209	长白葱
				214	244A
P09	AFAT05D09	ROX	294~308	294	春香
				296	244A
				298	辽葱 6 号
				300	青杂 2 号
				302	绿+白
				304	08 青 601A
				306	光辉
P10	AFS109	6-FAM	192~196	308	寒青独秀
				192	青杂 2 号
				194	章丘大梧桐
				196	春香
P11	AFS131	6-FAM	158~164	158	春香
				160	辽葱 6 号
				162	光辉
				164	08 青 601A
P12	AFRA04B10	HEX	277~296	277	长白葱
				282	244A
				286	钢杆巨葱王
				288	济葱 1904
				292	青杂 2 号
				294	春香
				296	惠和晚抽
P13	AFB20G05	ROX	103~123	103	辽葱 6 号
				105	寒青独秀
				107	济葱 1904
				109	长白葱
				111	济葱 1903
				113	青杂 2 号
				115	08 青 601A
				117	攀登者
				119	244A
				121	光辉
				123	冀葱 7 号
P14	AFB12A08	ROX	152~174	152	244A
				154	冀葱 7 号
				156	冀葱 8 号
				158	攀登者
				160	惠和 68
				166	冀葱 4 号
				168	辽葱 6 号
				170	春香
				172	济葱 1903
				174	钢杆巨葱王
P15	AFAA03F01	HEX	224~232	224	济葱 1904
				226	春香
				228	辽葱 6 号

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
P15	AFAA03F01	HEX	224~232	230	钢杆巨葱王
				232	惠和 68
P16	AFA15E08	HEX	240~244	240	青杂 2 号
				242	244A
				244	惠和晚抽
P17	AFA16D05	ROX	184~208	184	惠和晚抽
				188	244A
				190	钢杆巨葱王
				204	夏薇
				206	春香
				208	攀登者
P18	AFS088	6-FAM	158~172	158	钢杆巨葱王
				160	绿+白
				164	春香
				168	章丘大梧桐
				172	惠和晚抽
P19	AFA02F09	TAMRA	265~291	265	905 开拓者
				283	铁杆巨葱王
				285	冀葱 4 号
				287	辽葱 6 号
				289	青杂 2 号
				291	惠和 68
P20	AFAT01F03	HEX	193~209	193	钢杆巨葱王
				195	春香
				197	青杂 2 号
				199	冀葱 8 号
				201	夏薇
				203	济葱 1903
				205	辽葱 6 号
				209	绿+白
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,应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

序号	品种名称	品种来源	保藏编号
1	青杂 2 号	国家作物种质库	XIN25051
2	244A	国家作物种质库	XIN25054
3	08 青 601A	国家作物种质库	XIN26454
4	辽葱 6 号	国家作物种质库	XIN26455
5	惠和 68	国家作物种质库	XIN34027
6	惠和晚抽	国家作物种质库	XIN34028
7	光辉	国家作物种质库	XIN36883
8	905 开拓者	国家作物种质库	XIN37159
9	夏薇	国家作物种质库	XIN37488
10	冀葱 8 号	国家作物种质库	XIN48353
11	冀葱 7 号	国家作物种质库	XIN48354
12	攀登者	国家作物种质库	XIN580038497
13	春香	国家作物种质库	XIN580040995
14	冀葱 4 号	国家作物种质库	XIN580045484
15	济葱 1903	国家作物种质库	2023221280
16	济葱 1904	国家作物种质库	2023221281
17	寒青独秀	山东科丰种业有限公司	—
18	钢杆巨葱王	侯马农人种业有限公司	—
19	章丘大梧桐	河北昊蔬农业开发有限公司	—
20	绿十白	济南三葱良种繁育有限公司	—
21	长白葱	京研益农种业科技有限公司	—

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	HEX 标记引物	ROX 标记引物	TAMRA 标记引物
1	AFS088(158~172)	AFS156(209~223) AFA15E08(240~244)	AFB20G05(103~123) AFA16D05(184~208)	AFC08G05(278~296)
2	AFS131(158~164) AFS015(329~364)	AFAA03F01(224~232) AFRA04B10(277~296)		AFS006(285~307) AFA15G07(207~214)
3	AFS109(192~196) AFS111(223~229)	AFB06E05(124~147) AFAT01F03(193~209)	AFAT05D09(294~308) AFB12A08(152~174)	AFC03G02(161~170) AFA02F09(265~291)
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。				