ICS 65.020.01
CCS B 05

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4499—2025

不结球白菜品种鉴定　SSR分子标记法

Identification of Non-heading Chinese cabbage varieties—SSR marker method

纸质文本正式版
参考件

2025-01-09 发布　　2025-05-01 实施

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 …… 17
附录 F(资料性)　引物分组 …… 18

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、南京农业大学。

本文件主要起草人：韩瑞玺、殷纪伟、赵洪、徐振江、冯艳芳、马莹雪、任丽、王晨宇、张秀杰、张余、荆若男、李媛媛、张昌伟、陈海荣、李英、侯喜林、丁小惠、王雨。

印刷版纸质文本为参考件
联系电话010-59194426

不结球白菜品种鉴定　SSR分子标记法

1　范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis* 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。

本文件适用于不结球白菜品种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

不结球白菜品种基因组中存在着大量能够稳定遗传的SSR标记,不同不结球白菜品种在同一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 μL 预热到 65 ℃的 CTAB 提取液,充分混合;65 ℃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 ℃放置 30 min,4 ℃、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 μL 双蒸水或 TE 缓冲液充分溶解,检测 DNA 浓度和质量,－20 ℃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 OD_{260} 与 OD_{280} 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	推荐反应体积,μL
10×缓冲液(含 $MgCl_2$)	10×	1×	2.0
dNTPs	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	1.6
Taq 酶	5 U/μL	0.05 U/μL	0.2
正向引物	5 μmol/L	0.25 μmol/L	1.0
反向引物	5 μmol/L	0.25 μmol/L	1.0
DNA	25ng/μL	2.5ng/μL	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 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,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 μL 四甲基乙二胺(TEMED)和 500 μL 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 μL PCR 产物中加入 4 μL 6×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(上槽)各加入 600 mL 的 1×TBE 缓冲液，使其没过电极线。180 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 μL～5 μL 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 ± 30)bp、(150 ± 30)bp、(200 ± 30)bp、(250 ± 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 μL 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 μL 分子量内标和 8.9 μL 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 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL，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×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($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$,CAS 号:115-39-9)。

A.2.17 二甲苯青($C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$,CAS 号:2650-17-1)。

A.2.18 甲叉双丙烯酰胺[$(H_2C{=}CHCONH)_2CH_2$,CAS 号:110-26-9]。

A.2.19 丙烯酰胺(C_3H_5NO,CAS 号:79-06-1)。

A.2.20 硼酸(H_3BO_3,CAS 号:10043-35-3)。

A.2.21 尿素(CH_4N_2O,CAS 号:57-13-6)。

A.2.22 亲和硅烷。

A.2.23 二甲基二氯硅烷($C_2H_6Cl_2Si$,CAS 号:75-78-5)。

A.2.24 无水乙醇(C_2H_6O,CAS 号:64-17-5)。

A.2.25 四甲基乙二胺(TEMED,$C_6H_{16}N_2$,CAS 号:110-18-9)。

A.2.26 过硫酸铵[APS,$(NH_4)_2S_2O_8$,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 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 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 ℃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 ℃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 ℃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 ℃高压灭菌 20 min，4 ℃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 ℃高压灭菌 20 min，−20 ℃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 ℃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 μL 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 μL 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 ℃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	BrcSSR22	1	ATGCACAGAGGAAGAAACCG	GGGGATGAAGAAGAAGCAGA
2	BraSSR01035	1	TGCTCTTTGACACGTGCTATC	AGAGGAGAGAAGGGGAGAGG
3	BraSSR02029	2	TGATCACTGGGGTCCATTTA	CTGCGTCGAAGTTAGAGACG
4	BraSSR02070	2	TGCGTGCGGATTATCATCTA	GGACGTAAACTTAGCACGATTC
5	sR2103	2	TTCCACCTCTCTGCTCCAAC	ATGCGTGAGCGAGGATAACT
6	B068E07-2	3	GGTCAGGTGCTACTCAGACTCC	TTGAAGAGGATCCACCAAAAG
7	SSR03	3	TTTGACATCGTGCAATGCTA	TTGGGCTGGTCCTGAAGATA
8	D3	3	GGAGCCAGGAGAGAAGAAGG	CCCAAAACTTCCAAGAAAAGC
9	BrcSSR45	4	GATTTGGGCCATTTGGATTA	TTGAGCATTGTTCCCAGACA
10	BRMS-125	4	GTTCTCAAAGGGAAACCGAAAAACA	GAGTTGGCCAGAGATTTACATGCGT
11	CX51	5	TGGAGTGTTTGTTGTAAGCTCAA	TTCGGGATGAGAGTTCCAAG
12	Ra3H10	5	TAATCGCGATCTGGATTCAC	ATCAGAACAGCGACGAGGTC
13	BRMS030	6	TCAGCCTACCAACGAGTCATAA	AAGGTCTCATACGATGGGAGTG
14	BRMS108	6	ATTCAAAGACAAAGGAATGCCTGAG	GTTTCTTTGATCCTGTCGAATGGCATTAATAAA
15	BRMS-309	6	CAAGAGCAAGTTTGAAACAAACGAT	CATCAGTTCTTGATATGCTAGGTGA
16	BRMS036	7	GGTCCATTCCTTTTTGCATCTG	CATGGCAAGGGGTAACAAACAT
17	P46	7	TCGGATTTGCATGTTCCTGA	CCGATACACAACCAGCCAACT
18	Ra2E12	8	TGTCAGTGTGTCCACTTCGC	AAGAGAAACCCAATAAAGTAGAACC
19	sR3688	8	GGAGTCCACTTCATGGAGGA	CTCTTGCTCGTAGGTTTCCG
20	BrcSSR56	9	GTTAAGTTCGAACGCGAAGG	GATCGGGGAAAATTAGGGAA
21	sR5795	9	TCAGTCACAAAAAGTCAACTCAAA	ACGGAGTAGGAGTTGGGAGG
22	CX29	10	TGCCTTTGTGTTCAGCTCAC	CCCAAACGCTTTTGACACAT
23	08C0425	10	CCAACACCAAATCGCATAATC	GGAGCTCCCACCTACAGTTTC

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	BrcSSR22	TAMRA	155 ～ 191	155	Qgc89A
				161	水菜
				163	水菜
				173	CT9970
				175	热火 P3
				179	甬青 805
				182	Qgc43
				185	叶家青 001
				189	紫钻
				191	青山
2	BraSSR01035	6-FAM	110 ～ 139	110	甬青 805
				112	小松菜
				114	叶家青 001
				116	改良九月鲜
				121	Qgc48
				123	C-7-38
				125	武皇芯 2 号
				127	Qgc14B
				129	小八叶
				131	粤翠 2 号
				133	速腾 6 号
				135	速腾 6 号
				137	青浪 8 号
				139	青浪 8 号
3	BraSSR02029	6-FAM	153 ～ 201	153	Qgc48
				183	甬青 805
				193	Qgc03
				197	金品绿松
				199	广良增江菜心 2 号
				201	苏青 1 号
4	BraSSR02070	6-FAM	160 ～ 174	160	青梗菜薹 2 号
				162	武皇芯 2 号
				164	叶家青 001
				166	金品瑞菲 3 号
				168	甬青 805
				170	H1
				172	Qgc03
				174	金品 577

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
5	sR2103	6-FAM	271 ～ 355	271	叶家青 001
				273	广府 35
				285	小松菜
				287	青绿 5 号
				289	青芸 2 号
				297	金品瑞菲 3 号
				299	Qgc43
				301	C-7-38
				303	武皇芯 2 号
				305	热火 P3
				307	德高黑旋风
				309	紫钻
				311	528
				320	甬青 805
				322	金品 CX1603
				324	Qgc03
				326	理想肉菜
				328	CT9970
				330	乌青 1 号
				337	H171 泡泡青
				339	天鹅白甜心
				349	水菜
				355	增迟 5 号
6	B068E07-2	6-FAM	276 ～ 314	276	小松菜
				278	Qgc03
				281	H171 泡泡青
				287	德高黑旋风
				293	青浪 8 号
				296	紫钻
				299	金品 181
				303	叶家青 001
				306	甬青 805
				308	青山
				312	黄心乌
				314	水菜
7	SSR03	ROX	278 ～ 325	278	理想肉菜
				284	C-7-38
				289	叶家青 001
				297	金品 181
				299	增迟 5 号
				301	C-2-8
				303	甬青 805
				313	CT9970
				319	605
				321	Qgc48
				323	广府 35
				325	苏青 1 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
8	D3	6-FAM	168 ～ 206	168	金品 181
				172	青山
				176	理想肉菜
				180	绿美凤 009
				184	金品绿优 2 号
				186	甬青 805
				188	广府 35
				190	H171 泡泡青
				192	小松菜
				194	速腾 6 号
				196	绿美凤 009
				198	H1
				200	PS143341
				202	Qgc55
				204	宁红 69
				206	塌地乌 1 号
9	BrcSSR45	6-FAM	206 ～ 230	206	广府 35
				214	小松菜
				216	叶家青 001
				218	甬青 805
				221	Qgc48
				228	CT9970
				230	金品绿优 2 号
10	BRMS-125	6-FAM	99 ～ 178	99	武皇芯 2 号
				102	Qgc03
				104	PQ310214
				109	Qgc55
				111	金品瑞菲 3 号
				136	京研黑叶
				150	金品绿优 2 号
				154	绿金花
				156	紫钻
				158	叶家青 001
				160	乌青 1 号
				162	速腾 6 号
				164	Qgc43
				166	艳春
				172	金品 598
				178	广府 35
11	CX51	ROX	188 ～ 227	188	叶家青 001
				197	黄心乌
				199	甬青 805
				205	南京矮脚黄
				207	武皇芯 2 号
				209	绿金花
				218	Qgc03
				220	水菜
				225	C-2-8
				227	正源 31 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
12	Ra3H10	ROX	114 ～ 162	114	无锡白
				116	暑玉
				118	青绿 5 号
				122	广府 35
				124	H1
				132	冬赏味
				134	小松菜
				136	南农 L046
				138	C-7-38
				140	南京矮脚黄
				142	甬青 805
				145	武皇芯 2 号
				147	CT9970
				149	黄心乌
				151	金品 181
				153	水菜
				155	金品丽菲
				158	菁冠
				160	PC363
				162	金品 1626
13	BRMS030	HEX	144 ～ 212	144	金品 CX1603
				160	Qgc55
				195	水菜
				200	Qgc03
				210	叶家青 001
				212	C-7-38
14	BRMS108	ROX	123 ～ 144	123	小松菜
				125	Qgc89A
				127	水菜
				129	甬青 805
				131	绿金花
				135	金品 181
				137	夏绿妃
				139	Qgc03
				142	黄心乌
				144	苏青 1 号
15	BRMS-309	ROX	175 ～ 280	175	叶家青 001
				178	正源 31 号
				181	金品丽菲
				184	晶苔 11 号
				187	ZLL28
				193	PQ690761
				196	增迟 5 号
				198	紫金云苔
				200	汉白珍
				202	金品绿松
				206	理想 2008
				208	小八叶
				211	塌地乌 1 号
				213	PQ310214
				216	黄薹 5 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
15	BRMS-309	ROX	175 ～ 280	219	德高黑旋风
				221	金品 181
				223	京绿 7 号
				225	暑玉
				228	苏青 1 号
				231	黄心乌
				234	紫钻
				237	金品瑞菲 3 号
				239	沈农 GMS41
				241	水菜
				243	Qgc03
				245	Qgc55
				247	青浪 8 号
				249	甬青 805
				252	叶家青 001
				254	德高苏珊娜
				256	京研黑叶
				259	Qgc48
				262	CT9970
				265	C-7-38
				268	绿美凤 009
				271	正源 31 号
				274	C-2-8
				277	广良增江菜心 1 号
				280	青梗菜薹 2 号
16	BRMS036	ROX	128 ～ 154	128	甬青 805
				132	Qgc03
				136	水菜
				138	Qgc48
				140	PS143341
				149	紫钻
				154	Qgc89A
17	P46	ROX	187 ～ 305	187	金品绿松
				197	叶家青 001
				200	金品绿优 2 号
				202	小松菜
				204	汉白珍
				231	京研黑叶
				234	油亮菜薹
				236	青芸 2 号
				247	CT9970
				249	H1
				252	绿金花
				254	ZLL28
				256	金品丽菲
				259	马耳头
				263	黄心乌
				266	Qgc48
				269	塌地乌 1 号
				271	H171 泡泡青
				273	C-7-38

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
17	P46	ROX	187 ～ 305	276	武皇芯 2 号
				278	菁冠
				280	Qgc55
				282	甬青 805
				284	Qgc43
				286	赏夏 1 号
				288	夏青 6 号
				290	乌青 1 号
				294	晶苔 11 号
				300	黄心乌
				305	赏夏 2 号
18	Ra2E12	TAMRA	124 ～ 207	124	C-2-8
				140	水菜
				145	甜脆小白菜
				147	金品 598
				153	小松菜
				155	金品绿松
				158	绿美凤 009
				161	小松菜
				163	德高黑旋风
				170	增迟 5 号
				174	广府 35
				176	南农 L046
				178	紫钻
				180	青山
				182	Qgc03
				184	叶家青 001
				186	金品 181
				188	黄心乌
				190	乌青 1 号
				192	H171 泡泡青
				194	甬青 805
				196	C-7-38
				198	金品 1626
				200	广良 CX 三号
				202	广良增江菜心 1 号
				207	CT9970
19	sR3688	6-FAM	233 ～ 274	233	H1
				241	金品 181
				243	南京矮脚黄
				249	甬青 805
				251	小松菜
				253	CT9970
				255	金品瑞菲 3 号
				258	正源 31 号
				264	暑玉
				268	PQ310214
				270	广府 35
				272	宁红 69
				274	广良增江菜心 2 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
20	BrcSSR56	6-FAM	241 ～ 272	241	水菜
				243	CT9970
				258	甬青 805
				260	紫钻
				268	金品绿优 2 号
				270	金品绿松
				272	金品 577
21	sR5795	TAMRA	114 ～ 148	114	叶家青 001
				116	水菜
				122	CT9970
				138	金品 1626
				140	广府 35
				142	理想肉菜
				144	晶苔 11 号
				146	京研黑叶
				148	Qgc03
22	CX29	ROX	202 ～ 211	202	CT9970
				205	甬青 805
				207	C-7-38
				209	叶家青 001
				211	广府 35
23	08C0425	6-FAM	163 ～ 182	163	甬青 805
				164	CT9970
				172	C-2-8
				175	苏青 1 号
				177	Qgc48
				182	小松菜

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	甬青 805	农业农村部植物新品种保藏中心	30	汉白珍	农业农村部植物新品种保藏中心
2	Qgc03	农业农村部植物新品种保藏中心	31	金品 1626	农业农村部植物新品种保藏中心
3	叶家青 001	农业农村部植物新品种保藏中心	32	青山	农业农村部植物新品种保藏中心
4	CT9970	农业农村部植物新品种保藏中心	33	青浪 8 号	农业农村部植物新品种保藏中心
5	Qgc48	农业农村部植物新品种保藏中心	34	天鹅白甜心	农业农村部植物新品种保藏中心
6	Qgc89A	农业农村部植物新品种保藏中心	35	金品 598	农业农村部植物新品种保藏中心
7	武皇芯 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心	36	增迟 5 号	农业农村部植物新品种保藏中心
8	Qgc55	农业农村部植物新品种保藏中心	37	绿美凤 009	农业农村部植物新品种保藏中心
9	青梗菜薹 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心	38	南农 L046	农业农村部植物新品种保藏中心
10	PQ310214	农业农村部植物新品种保藏中心	39	艳春	农业农村部植物新品种保藏中心
11	PQ690761	农业农村部植物新品种保藏中心	40	金品丽菲	农业农村部植物新品种保藏中心
12	金品 181	农业农村部植物新品种保藏中心	41	沈农 GMS41	农业农村部植物新品种保藏中心
13	广府 35	农业农村部植物新品种保藏中心	42	德高苏珊娜	农业农村部植物新品种保藏中心
14	德高黑旋风	农业农村部植物新品种保藏中心	43	赏夏 1 号	农业农村部植物新品种保藏中心
15	苏青 1 号	农业农村部植物新品种保藏中心	44	速腾 6 号	农业农村部植物新品种保藏中心
16	金品绿优 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心	45	广良 CX 三号	农业农村部植物新品种保藏中心
17	金品绿松	农业农村部植物新品种保藏中心	46	赏夏 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心
18	金品 577	农业农村部植物新品种保藏中心	47	广良增江菜心 1 号	农业农村部植物新品种保藏中心
19	金品 CX1603	农业农村部植物新品种保藏中心	48	黄薹 5 号	农业农村部植物新品种保藏中心
20	夏绿妃	农业农村部植物新品种保藏中心	49	粤翠 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心
21	正源 31 号	农业农村部植物新品种保藏中心	50	青芸 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心
22	H1	农业农村部植物新品种保藏中心	51	晶苔 11 号	农业农村部植物新品种保藏中心
23	金品瑞菲 3 号	农业农村部植物新品种保藏中心	52	PC363	农业农村部植物新品种保藏中心
24	暑玉	农业农村部植物新品种保藏中心	53	ZLL28	农业农村部植物新品种保藏中心
25	广良增江菜心 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心	54	夏青 6 号	农业农村部植物新品种保藏中心
26	青绿 5 号	农业农村部植物新品种保藏中心	55	赏夏 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心
27	PS143341	农业农村部植物新品种保藏中心	56	Qgc43	农业农村部植物新品种保藏中心
28	Qgc14B	农业农村部植物新品种保藏中心	57	紫钻	农业农村部植物新品种保藏中心
29	宁红 69	农业农村部植物新品种保藏中心	58	京研黑叶	农业农村部植物新品种保藏中心
59	紫金云苔	农业农村部植物新品种保藏中心	72	汉白珍	上海市农业科学院
60	甜脆小白菜	农业农村部植物新品种保藏中心	73	水菜	南京农业大学
61	605	农业农村部植物新品种保藏中心	74	小松菜	南京农业大学
62	冬赏味	农业农村部植物新品种保藏中心	75	绿金花	南京农业大学
63	菁冠	农业农村部植物新品种保藏中心	76	黄心乌	南京农业大学
64	京绿 7 号	农业农村部植物新品种保藏中心	77	H171 泡泡青	南京农业大学
65	武皇芯 1 号	上海市农业科学院	78	热火 P3	南京农业大学
66	南京矮脚黄	上海市农业科学院	79	马耳头	南京农业大学
67	乌青 1 号	上海市农业科学院	80	油亮菜薹	南京农业大学
68	塌地乌 1 号	上海市农业科学院	81	理想 2008	南京农业大学
69	无锡白	上海市农业科学院	82	小八叶	南京农业大学
70	改良九月鲜	上海市农业科学院	83	C-2-8	福建金品农业有限公司
71	理想肉菜	上海市农业科学院	84	C-7-38	福建金品农业有限公司

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	ROX 标记引物	TAMRA 标记引物	HEX 标记引物
1	BraSSR01035 （110～139）	BRMS108 （123～144）	—	BRMS030 （144～212）
	08C0425 （163～182）	P46 （187～305）	—	—
	sR3688 （233～274）	—	—	—
2	BraSSR02070 （160～174）	CX51 （188～227）	sR5795 （114～148）	—
	BrcSSR45 （206～230）	SSR03 （278～325）	—	—
	sR2103 （271～355）	—	—	—
3	D3 （168～206）	BRMS036 （128～154）	BrcSSR22 （155～191）	—
	BrcSSR56 （241～272）	—	—	—
4	BRMS-125 （99～178）	CX29 （202～211）	—	—
5	BraSSR02029 （153～201）	Ra3H10 （114～162）	Ra2E12 （124～207）	—
	B068E07-2 （276～314）	BRMS-309 （175～280）	—	—

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。