

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4500—2025

萝卜品种鉴定 SSR分子标记法

Identification of radish 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、济南海关技术中心、农业农村部科技发展中心。

本文件主要起草人：张晗、郑永胜、郑新华、李汝玉、王丽媛、马莹雪、王穆穆、王晖、王东建、荆若男、安聪聪、段丽丽、李华、王玮、耿慧晶、程惠敏。



萝卜品种鉴定 SSR 分子标记法

1 范围

本文件规定了利用简单重复序列(SSR)标记进行萝卜(*Raphanus sativus* 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。

本文件适用于萝卜品种 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

萝卜品种基因组中存在着大量能够稳定遗传的 SSR 标记,不同萝卜品种在同一 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

取幼嫩组织混合样 0.2 g,放入 1.5 mL 离心管中,经液氮冷冻后充分研磨。或将 30 粒种子研碎,放入 1.5 mL 离心管中。每管加入 400 μ L 预热到 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 400 μ L 24 : 1 氯仿-异戊醇(V/V),振荡混匀。10 000 g 离心 10 min。吸取上清液 200 μ L 转入新的 1.5 mL 离心管中,加入 400 μ L -20 $^{\circ}$ C 预冷无水乙醇沉淀 DNA。12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,加入 500 μ L 乙醇-乙酸铵溶液,6 000 g 离心 5 min 收集沉淀。加入 100 μ L TE 缓冲液(pH 8.0)溶解 DNA,检测 DNA 浓度和质量。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

注: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标准。DNA 溶液的紫外吸光度 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值宜介于 1.7~2.0。

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 $\times$	2.5
dNTPs	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	0.625
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L	0.4
正向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L	2
反向引物	5 μ mol/L	0.25 (mol/L	2
DNA	25 ng/ μ L	2.5 ng/ μ L	5
双蒸水	—	—	12.475
总体积			25.0

10.3.2 反应程序

推荐反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,65 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,每循环退火温度降 1 $^{\circ}$ C,共 15 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 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 25 (L PCR 样品中加入 5 (L 6 $\times$ 加样缓冲液,混匀。在水浴锅或 PCR 扩增仪上 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,加入到 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 R1-15 位点上仅出现一个等位变异，为 232 bp，则该位点的等位变异数据记录为 232/232。

示例 2：样品在 R1-15 位点上有两个等位变异，分别为 216 bp、220 bp，则该位点的等位变异数据记录为 216/220。

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 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 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 乙醇-乙酸铵溶液

称取 154.6 mg 乙酸铵,加入 140 mL 无水乙醇,用去离子水定容至 200 mL。

B.1.7 TE 缓冲液

分别量取 5 mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液(pH 8.0)(B.1.4)和 1 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液(pH 8.0)(B.1.3),定容至 500 mL,在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。于 4 °C 下保存。

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')
1	R1-15	1	GATAATGATGTTTCAGGAAAACGGCA	TCCTGGCATTCATTATGTACTGATTTG
2	R1-19	1	GCATGACGGTGAGGATTAAACGC	ATTGGGGGACTAAAATGAAAGGGAG
3	R2-23	2	CTTCAAGATGACGACAAGAACAGC	ACAACCATACATTAACAAGATCCAA
4	RSS0073	2	ATCGAGACAAGGGAAGGGTT	TCAGTCCATCCAACAGACCA
5	R3-16	3	GAGAGATTCTGATCATTTGGGGGTT	GAGGAGGTTGGGGATAGTGACGAG
6	R3-21	3	GATAGCAGACAGACCCTCAAAACAG	GGACAGTGCTGCTTATCAGAGGAC
7	R4-23	4	CTACCGTTTTTTAGCACACGCAGC	ATCTTATGTAGGGGGAAGTGTTGGA
8	R4-63	4	TTGAGTAGCTTGGGCTTATGTATCT	CTGACTGAGAAAGAGCCATAGGAG
9	R5-2	5	TAACAAGGAAATGGATTACAAAGTC	AAGAGGAGAAACAGTAGTGGAAG
10	R5-3	5	GTCGCTCGCTGAGGCTAGGCTT	CATTCAACTTGTCCTTGTCTCTGC
11	R5-9	5	TATGGTATTGTTTGAGAGTTAGTGTC	ACAAGTGGTCAGGTTTACATCAG
12	R6-11	6	CTTTGCTAAATAAGACGCTGAATACG	GAGAGATTACAGATCGATTTTTGAAGG
13	R6-26	6	CTGTGAATGCTTTGTTTTCCCGAC	TTGTGGTTGGTGTTAAAGGATGTGG
14	R6-35	6	TCGACAGCTTTGGCGGCGTACTC	ACCCCCATTCTCCGATCCTTCTTA
15	R7-20	7	GAGTAGAGAGATTTTGCGGGTGTT	TCTCTGTTAAGCAACTTCCTCTGGT
16	R7-33	7	GAAAGCACAAGAGGAAGTAGACAGAG	TAATCAAGACCTACCAAGAACACAAAC
17	R7-34	7	TTATTTCTCAGATTTTCGAGTGATGTG	GAATGGGGGAGGGAGAATAAAGTT
18	R8-17	8	CGACCTCCTCTTGTTTCGTCTGTAG	CATTAAAAAGTGCGTGTGGCTG
19	RSS0027	8	GACACGCCTCTTCCTTCTTG	TCAAGTACCACTTCCCGAGG
20	R9-5	9	CGGATAGAGTGAACCTGATGAGAG	GCTGAAGATAGACATTGGAGAGTAAG

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	R1-15	6-FAM	192~250	192	昆优 2 号
				194	翘头青萝卜
				196	汉红一号
				200	义和 206
				204	广东短叶十三号
				206	德高春玉
				216	RKA131
				220	捷秀美
				224	德高秋玉
				232	靓绿速生
				234	白凤珍 1
				236	立春美浓
				250	京脆 2 号
2	R1-19	6-FAM	208~253	208	京脆 2 号
				215	秀绿 1621
				233	东星 1871
				238	昆优 2 号
				243	广东短叶十三号
				249	德高秋玉
				251	靓绿速生
				253	义和 206
3	R2-23	6-FAM	197~227	197	秀绿 1621
				201	汉红一号
				205	圣萝碧玉
				207	靓绿速生
				211	翘头青萝卜
				215	捷秀美
				217	捷秀美
				219	义和 206
				221	京脆 2 号
				223	德高秋玉
				227	广东短叶十三号
4	RSS0073	TAMRA	109~136	109	义和 206
				127	昆优 2 号
				133	义和 206
				136	广东短叶十三号
5	R3-16	ROX	283~305	283	幕田红福三号
				285	昆优 2 号
				287	秀绿 1621
				289	捷秀美
				291	广东短叶十三号

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
5	R3-16	ROX	283~305	293	翘头青萝卜
				295	圣萝碧玉
				299	义和青脆一号
				303	德高秋玉
				305	汉红一号
6	R3-21	HEX	266~276	266	立春美浓
				272	翘头青萝卜
				276	秋美 40
7	R4-23	TAMRA	254~264	254	广东短叶十三号
				256	翘头青萝卜
				258	义和 206
				260	京脆 2 号
				262	靓绿速生
				264	靓绿速生
8	R4-63	HEX	176~199	176	翘头青萝卜
				182	立春美浓
				184	秋美 40
				188	京红 5 号
				199	昆优 2 号
9	R5-2	6-FAM	147~153	147	翘头青萝卜
				149	京红 5 号
				151	法国红星
				153	老油瓶
10	R5-3	6-FAM	239~254	239	昆优 2 号
				242	立春美浓
				245	翘头青萝卜
				254	立春美浓
11	R5-9	6-FAM	216~231	216	京红 5 号
				219	捷秀美
				222	秋美 40
				228	秋美 40
				231	昆优 3 号
12	R6-11	ROX	217~228	217	昆优 2 号
				220	幕田红福三号
				223	京红 5 号
				225	满堂红
				228	广东短叶十三号
13	R6-26	HEX	190~213	190	法国红星
				207	白凤珍 1
				210	翘头青萝卜
				213	满堂红
14	R6-35	HEX	161~177	161	汉红一号
				164	昆优 3 号
				169	昆优 3 号
				172	丰邦圆白萝卜
				177	秀绿 1621
15	R7-20	HEX	215~230	215	京红 5 号
				224	昆优 3 号
				230	京研满堂红
16	R7-33	ROX	227~256	227	昆优 3 号
				230	昆优 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
16	R7-33	ROX	227~256	236	德高秋玉
				241	翘头青萝卜
				244	靓绿速生
				253	捷秀美
				256	捷秀美
17	R7-34	TAMRA	225~240	225	雪印 X1
				228	秀绿 1621
				231	白凤珍 1
				234	义和 206
				237	捷秀美
				240	秀绿 1621
18	R8-17	ROX	242~263	242	义和 206
				244	昆优 2 号
				253	捷秀美
				255	京红 5 号
				263	白凤珍 1
19	RSS0027	ROX	173~189	173	白凤珍 1
				175	义和 206
				177	昆优 2 号
				183	广东短叶十三号
				187	京脆 2 号
				189	老油瓶
20	R9-5	HEX	223~247	223	昆优 3 号
				229	广东短叶十三号
				235	秀绿 1621
				241	福春大根
				243	德高秋玉
				245	靓绿速生
				247	丰邦圆白萝卜
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
1	昆优 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心
2	翘头青萝卜	青岛市胶州大白菜研究所有限公司
3	汉红一号	上海古槐情农业科技有限公司
4	义和 206	农业农村部植物新品种保藏中心
5	广东短叶十三号	农业农村部植物新品种保藏中心
6	德高春玉	农业农村部植物新品种保藏中心
7	RKA131	农业农村部植物新品种保藏中心
8	捷秀美	农业农村部植物新品种保藏中心
9	德高秋玉	农业农村部植物新品种保藏中心
10	靓绿速生	农业农村部植物新品种保藏中心
11	白凤珍 1	农业农村部植物新品种保藏中心
12	立春美浓	农业农村部植物新品种保藏中心
13	京脆 2 号	农业农村部植物新品种保藏中心
14	秀绿 1621	农业农村部植物新品种保藏中心
15	东星 1871	农业农村部植物新品种保藏中心
16	圣萝碧玉	农业农村部植物新品种保藏中心
17	幕田红福三号	农业农村部植物新品种保藏中心
18	义和青脆一号	农业农村部植物新品种保藏中心
19	秋美 40	农业农村部植物新品种保藏中心
20	京红 5 号	农业农村部植物新品种保藏中心
21	法国红星	北京盛丰地种子有限公司
22	老油瓶	山东省农业科学院作物研究所
23	昆优 3 号	农业农村部植物新品种保藏中心
24	满堂红	农业农村部植物新品种保藏中心
25	丰邦圆白萝卜	农业农村部植物新品种保藏中心
26	京研满堂红	农业农村部植物新品种保藏中心
27	雪印 X1	农业农村部植物新品种保藏中心
28	福春大根	农业农村部植物新品种保藏中心

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	R2-23 (197~227)	RSS0027 (173~189)	RSS0073 (109~136)	R6-35 (161~177)
2	R5-9 (216~231)	R3-16 (283~305)	R7-34 (225~240)	R6-26 (190~213)
3	R5-2 (147~153)	R7-33 (227~256)	R4-23 (254~264)	R4-63 (176~199)
	R5-3 (239~254)	—	—	R7-20 (215~230)
4	R1-15 (192~250)	R8-17 (242~263)	—	R3-21 (266~276)
5	R1-19 (208~253)	R6-11 (217~228)	—	R9-5 (223~247)
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。				