

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—201X

萝卜品种鉴定
SSR 分子标记法

Identification of radish varieties—SSR marker method

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 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 原理 1

5 仪器设备及试剂 1

6 溶液配制 1

7 引物 1

8 参照品种及其使用 1

9 操作程序 2

10 等位变异数据采集 4

11 判定标准 4

附录 A（规范性附录） 仪器设备及试剂..... 6

附录 B（规范性附录） 溶液配制..... 9

附录 C（规范性附录） 引物..... 12

附录 D（资料性附录） 参照品种名单..... 17

前 言

本文件按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。

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/TC277）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：

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 (simple sequence repeats, SSR) 标记进行萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 品种鉴定的试验方法、数据记录格式和判定标准。

本文件适用于萝卜SSR标记分子数据的采集和品种鉴定。

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

NY/T 2594-2016 植物品种鉴定 DNA分子标记法 总则

3 术语和定义

NY/T 2594-2016界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

SSR广泛分布于萝卜基因组中，不同品种间每个SSR位点重复单元的数量可能不同。由于每个SSR位点两侧的序列一般是高度保守和单拷贝的，因而可根据其两侧的序列设计一对特异引物，利用PCR技术对两条引物间的DNA序列进行扩增。在电泳过程中，主要由于SSR位点重复单元的数量不同引起的不同长度的PCR扩增片段在电场作用下得到分离，经硝酸银染色或者荧光染料标记加以区分。因此，根据SSR位点的多态性，利用PCR扩增和电泳技术可以鉴定萝卜品种。

5 仪器设备及试剂

仪器设备及试剂见附录A。

6 溶液配制

溶液配制方法见附录B。

7 引物

引物相关信息见附录C。

8 参照品种及其使用

参照品种的名称见附录C，参照品种信息参见附录D。

在进行等位变异检测时，应同时包括相应参照品种。

注1：多个品种在某一SSR位点上可能都具有相同的等位变异。在确认这些品种该位点等位变异大小与参照品种相同后，这些品种也可以代替附录C中的参照品种使用。

注2：同一名称不同来源的参照品种的某一位点上的等位变异可能不相同，在使用其他来源的参照品种时，应与附录C中的参照品种核对，确认无误后使用。

注3：对于附录C中未包括的等位变异，应按本标准方法，确定其大小和对应参照品种。

9 操作程序

9.1 样品准备

种子样品的扦样、分样和保存，应符合GB/T 3543.2的规定。

每个品种分取2个样品。每个样品30个个体(种子、叶片或其他器官组织)，等量混合。

9.2 DNA 提取

采用CTAB法：取幼嫩组织混合样0.2 g，放入1.5 mL离心管中，在液氮中研碎。或将种子研碎，放入1.5 mL离心管中。将DNA提取液预热到65 °C，每管加入400 μL，混匀样品。将离心管置于65 °C金属浴或水浴锅中，保温30 min后取下。向离心管中加入400 μL 24:1 氯仿-异戊醇(V/V)，振荡混匀。10 000 g离心10 min。将上清液200 μL转入另一只1.5 mL离心管，加入400 μL -20 °C预冷无水乙醇沉淀DNA。10 000 g离心1 min，弃上清液，加入500 μL乙醇-乙酸铵溶液，6 000 g离心5 min收集沉淀。加入100 μL TE (pH 8.0) 溶液溶解DNA，检测DNA浓度和质量。-20 °C保存。

注：其他所获DNA质量能够满足PCR扩增需要的DNA提取方法都适用于本标准。

9.3 PCR 扩增

9.3.1 反应体系

25 μL的反应体积，含每种dNTP 0.25 mmol/L，正向引物、反向引物各0.4 μmol/L，Taq DNA聚合酶1.0单位，1×PCR缓冲液(含Mg²⁺ 2.5 mmol/L)，样品DNA 10-40 ng。

利用毛细管电泳荧光检测时使用荧光标记的引物。引物的荧光染料种类见附录C。

注：反应体系的体积可以根据具体情况进行调整。

9.3.2 反应程序

94°C 预变性4 min；94°C 变性45 s，65°C 退火45 s，72°C 延伸45 s，每循环退火温度降1°C，共15个循环；94°C 变性45 s，50°C 退火30 s，72°C 延伸45 s，共30个循环；72°C 延伸10 min，4°C 保存。

9.4 PCR 产物检测

9.4.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染检测

9.4.1.1 清洗玻璃板

将玻璃板清洗干净，用去离子水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗两遍，吸水纸擦干。在长板上涂0.5 mL 亲和硅烷工作液，带凹槽的短板上涂0.5 mL 剥离硅烷工作液。操作过程中防止两块玻璃板互相污染。

9.4.1.2 组装玻璃板

玻璃板彻底干燥后，将其组装成电泳胶板，用水平仪调平。垫片厚度为0.4 mm。

9.4.1.3 制胶

在100 mL 6.0% PAGE胶中分别加入TEMED 50 μL和新配制的10%过硫酸铵溶液500 μL，迅速混匀后灌胶。待胶液充满玻璃板夹层，将0.4 mm厚鲨鱼齿梳子平齐端向里轻轻插入胶液约0.4 cm。灌胶过程中防止出现气泡。使胶液聚合至少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。

9.4.1.4 预电泳

将胶板安装于电泳槽上。向上槽中加入预热至65℃的0.25×TBE缓冲液，使其超过凝胶顶部约3 cm；向下槽中加入1×TBE缓冲液（缓冲液具体用量视电泳槽型号而定）。在60 W恒功率下，预电泳10~20 min。

9.4.1.5 扩增产物样品制备

在25 μL PCR样品中加入5 μL上样缓冲液，混匀。在水浴锅或PCR仪上95℃变性5 min，取出，迅速置于碎冰上。

9.4.1.6 电泳

用注射器吸取缓冲液冲洗凝胶顶端几次，清除气泡和聚丙烯酰胺碎片。将鲨鱼齿梳子梳齿端插入凝胶1~2 mm。每一个加样孔点入2~3 μL样品。除待测样品外，还应同时加入参照品种扩增产物和合适的DNA分子量标准。在50~80 W恒功率下电泳，使凝胶温度保持在约50℃。电泳1.5~2.5 h（电泳时间取决于扩增片段的大小范围）。电泳结束后，小心分开两块玻璃板，取下凝胶附着的长玻璃板准备固定。

注：具体功率大小根据电泳槽的规格型号和实验室室温设定。

9.4.1.7 银染

（1）固定：将凝胶附着的长玻璃板置于塑料盒中，加入约1000 mL银染固定液，使固定液没过凝胶，在摇床上轻轻晃动20~30 min。

（2）漂洗：取出玻璃板，在去离子水中漂洗1~2次，每次2 min。

（3）染色：将玻璃板置放入约1000 mL染色液中，使染色液没过凝胶，在摇床上轻轻晃动30 min。

（4）漂洗：在去离子水中快速漂洗，时间不超过10 s。

（5）显影：将玻璃板在预冷的显影液中轻轻晃动至出现清晰带纹。

（6）定影：将凝胶在固定液中定影5 min。

（7）漂洗：在去离子水中漂洗1 min。

9.4.2 毛细管电泳荧光检测

9.4.2.1 扩增产物样品准备

将6-FAM和HEX荧光标记的PCR产物用超纯水稀释30倍，TAMRA和ROX荧光标记的PCR产物稀释10倍。分别取等体积的上述4种稀释后溶液混合，从混合液中吸取1 μL加入到DNA分析仪专用深孔板孔中。板中各孔分别加入0.1 μL LIZ500分子量内标和8.9 μL去离子甲酰胺。将样品在PCR仪上95℃变性5 min，取出，立即置于碎冰上，冷却10 min以上。瞬时离心10 s后置放到DNA分析仪上。

除待测样品外，每个SSR位点还应同时包括2~3个参照品种的扩增产物。

注：不同荧光标记的扩增产物的最适稀释倍数最好通过毛细管电泳荧光检测预试验确定。

9.4.2.2 开机准备

打开DNA分析仪，检查仪器工作状态。更换缓冲液，灌胶。将装有样品的深孔板置放于样品架基座上。打开数据收集软件。

9.4.2.3 编板

按照仪器操作程序，创建电泳板，输入电泳板名称，选择适合的程序和电泳板类型，输入样品编号或名称。

9.4.2.4 运行程序

运行程序。DNA分析仪自动将毛细管电泳数据、运行参数等存放在仪器中。

10 等位变异数据采集

10.1 数据表示

样品每个SSR位点的等位变异采用扩增片段大小的形式表示，详见附录C表C.1。

10.2 变性聚丙烯酰胺电泳与银染检测

将某一位点待测样品和相应的参照品种扩增片段的带型和移动位置进行比较，根据参照品种的移动位置和扩增片段大小，确定待测样品该位点的等位变异大小。

10.3 毛细管电泳荧光检测

使用DNA分析仪的片段分析软件，读出每个位点每个样品的等位变异大小数据。比较参照品种的等位变异大小数据与附录表C中参照品种相应的数据，两者之间的差值为系统误差。从待测样品的等位变异数据中去除该系统误差，得到的数据即为待测样品该位点的等位变异大小。

示例1：参照品种“德高春玉”、“捷秀美”在R1-15位点上检测的等位变异大小分别为208 bp和222 bp，附录表C中“德高春玉”、“捷秀美”相应的数据分别为206 bp和220 bp，则系统误差为+2 bp。如果一个待测样品该位点检测的等位变异大小为214 bp，则待测样品在该位点上的等位变异实际数据应为212 bp。

示例2：参照品种“德高春玉”、“捷秀美”在R1-15位点上检测的等位变异大小分别为206 bp和220 bp，附录表C中“德高春玉”、“捷秀美”相应的数据分别为206 bp和220 bp，则系统误差为0 bp。一个待测样品检测的等位变异大小为200bp，则待测样品在该位点上的等位变异实际数据应为200 bp。

示例3：参照品种“德高春玉”、“捷秀美”在R1-15位点上检测的等位变异大小分别为204 bp和218 bp，附录表C中“德高春玉”、“捷秀美”相应的数据分别为206 bp和220 bp，系统误差为-2 bp。如果一个待测样品的等位变异大小测定的数据为214 bp，则待测样品在该位点上的等位变异实际数据应为216 bp。

10.4 结果记录

纯合位点的等位变异记录为X/X，杂合位点的等位变异记录为X/Y，其中X、Y为该位点上两个不同的等位变异片段大小，小片段在前，大片段在后。无效等位变异记录为0/0。

示例1：一个品种在R1-15位点上有一个等位变异，大小为232 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为232/232。

示例2：一个品种在R1-15位点上有二个等位变异，大小分别为216 bp、220 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为216/220。

11 判定标准

依据附录C表C.1 20对引物的检测结果进行判定：

- a) 品种间差异位点数 ≥ 3 为不同品种；
- b) 品种间差异位点数 < 3 为近似品种或疑同品种。

附 录 A
(规范性)
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2000 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 水平电泳槽及配套的制胶附件

A. 1. 5 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，能够分辨最少1个核苷酸的差异。

A. 1. 6 高速离心机

A. 1. 7 水平摇床

A. 1. 8 胶片观察灯

A. 1. 9 电子天平：

A. 1. 10 微量移液器：规格分别为10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000 μL，连续可调。

A. 1. 11 紫外分光光度计

A. 1. 12 高压灭菌锅

A. 1. 13 酸度计

A. 1. 14 水浴锅或金属浴

A. 1. 15 制冰机

A. 1. 16 凝胶成像系统或紫外透射仪

A. 2 试剂

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

A. 2. 1 十六烷基三乙基溴化铵

A. 2. 2 聚乙烯吡咯烷酮

A. 2. 3 三氯甲烷

A. 2. 4 异戊醇

A. 2. 5 乙二胺四乙酸二钠

A. 2. 6 三羟甲基氨基甲烷

A. 2. 7 浓盐酸

A. 2. 8 氢氧化钠

A. 2. 9 *Taq* DNA聚合酶

A. 2. 10 10×PCR 缓冲液

A. 2. 11 氯化镁

A. 2. 12 氯化钠

A. 2. 13 四种脱氧核糖核苷酸

A. 2. 14 SSR引物

A. 2. 15 矿物油

A. 2. 16 琼脂糖

A. 2. 17 核酸染色剂

A. 2. 18 去离子甲酰胺

A. 2. 19 溴酚蓝

A. 2. 20 二甲苯青

A. 2. 21 甲叉双丙烯酰胺

A. 2. 22 丙烯酰胺

A. 2. 23 硼酸

A. 2. 24 尿素

A. 2. 25 亲和硅烷

A. 2. 26 剥离硅烷

A. 2. 27 无水乙醇

A. 2. 28 四甲基乙二胺

A. 2. 29 过硫酸铵

A. 2. 30 冰醋酸

A. 2. 31 乙酸铵

A. 2. 32 硝酸银

A. 2. 33 甲醛

A. 2. 34 DNA分析仪用聚丙烯酰胺胶液

A. 2. 35 DNA分析仪用分子量内标：最大分子量500 bp, Liz标记。

A. 2. 36 DNA分析仪用光谱校准基质：包括6-FAM、TAMRA、HEX和ROX等四种荧光染料标记的DNA片段。

A. 2. 37 DNA分析仪用电泳缓冲液。

附 录 B

(规范性)

溶液配制

B.1 DNA提取溶液的配制

B.1.1 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取40.0 g氢氧化钠，溶于800 mL 去离子水中，冷却至室温，定容至1000 mL。

B.1.2 0.5 mol/L 盐酸溶液

量取25 mL36-38%浓盐酸，加去离子水定容至500 mL。

B.1.3 0.5 mol/L乙二胺四乙酸二钠盐 (pH8.0) 溶液

称取186.1 g 乙二胺四乙酸二钠盐，加入 800 mL去离子水，再加入20 g氢氧化钠，搅拌。待乙二胺四乙酸二钠盐完全溶解后，冷却至室温。再用氢氧化钠溶液 (B.1.1) 准确调pH值至 8.0，定容至1000 mL。在103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌20 min。

B.1.4 1 mol/L三羟甲基氨基甲烷盐酸 (pH8.0) 溶液

称取 60.55 g 三羟甲基氨基甲烷，溶于 400 mL 去离子水中，用盐酸溶液(B.1.2)调 pH 至 8.0，定容至 500 mL，在 103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌 20 min。

B.1.5 DNA提取液

分别称取20.0 g十六烷基三乙基溴化铵和 81.82 g 氯化钠，分别加入 40 mL 乙二胺四乙酸二钠盐溶液 (pH8.0) (B.1.3)、100 mL 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液 (pH8.0) (B.1.4) 和 10.0 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，再加入800 mL去离子水，65 °C水浴中加热溶解，冷却后定容至1000 mL。在103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌20 min。于4°C保存。

B.1.6 三氯甲烷+异戊醇混合液

$V(\text{三氯甲烷}) + V(\text{异戊醇}) = 24 + 1$

B.1.7 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.1.8 TE缓冲液

分别量取5 mL三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液 (pH8.0) (B.1.4) 和 1 mL乙二胺四乙酸二钠盐溶液 (pH8.0) (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扩增溶液的配制

B.2.1 dNTP溶液

用超纯水分别配制dATP、dTTP、dGTP、dCTP四种脱氧核糖核苷酸终浓度为100 mmol/L的储存液。分别量取4种储存液20 μ L混合，用120 μ L超纯水定容，配制成每种核苷酸终浓度为10 mmol/L的工作液。在103.4 kPa (121 $^{\circ}$ C) 条件下灭菌20 min，于-20 $^{\circ}$ C保存。

注：也可使用满足试验要求的商品dNTP溶液。

B. 2. 2 SSR引物溶液

用超纯水分别配制正向引物和反向引物浓度为5 μ mol/L的工作液。

B. 2. 3 氯化镁溶液

称取1.190 g氯化镁，用去离子水溶解，定容至500 mL，配制成25 mmol/L的工作液。在103.4 kPa (121 $^{\circ}$ C) 条件下灭菌20 min，-20 $^{\circ}$ C保存。

注：也可使用满足试验要求的商品氯化镁溶液。

B. 3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溶液的配制

B. 3. 1 10 $\times$ TBE缓冲液

分别称取108.0 g三羟甲基氨基甲烷和55.0 g硼酸，溶于800 mL 去离子水中，加入37 mL乙二醇四乙酸二钠盐溶液 (pH8.0) (B. 1. 3)，定容至1000 mL。

B. 3. 2 40%丙烯酰胺溶液

分别称取190.0 g丙烯酰胺和10.0 g甲叉双丙烯酰胺，溶于400 mL 去离子水中，定容至500 mL。

B. 3. 3 6% 变性聚丙烯酰胺胶溶液

称取420.0 g尿素，用去离子水溶解，分别加入100 mL 10 $\times$ TBE缓冲液(B. 3. 1)和150 mL 40% 丙烯酰胺溶液(B. 3. 2)，定容至1000 mL。

B. 3. 4 亲和硅烷缓冲液

分别量取49.75 mL无水乙醇和250 μ L冰醋酸，用去离子水定容至50 mL。

B. 3. 5 亲和硅烷工作液

分别量取5 μ L亲和硅烷和1 mL亲和硅烷缓冲液，混匀。

B. 3. 6 剥离硅烷工作液

分别量取98 mL 三氯甲烷溶液和2 mL 二甲基二氯硅烷溶液，混匀。

B. 3. 7 10%过硫酸铵溶液

称取1.0 g过硫酸铵，溶于10 mL去离子水中，混匀。于-4 $^{\circ}$ C保存

B. 3. 8 1 $\times$ TBE缓冲液

量取500 mL 10 $\times$ TBE缓冲液(B. 3. 1)，用去离子水定容至5000 mL。

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，分别加入98 mL去离子甲酰胺和1 mL乙二胺四乙酸二钠盐溶液（pH8.0），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，加入1000 mL去离子水。

B.4.2 染色液

称取1.0 g硝酸银，溶于1000 mL去离子水中。

B.4.3 显影液

称取10 g 氢氧化钠，溶于1000 mL去离子水中，再加入5 mL甲醛。

附 录 C
(规范性)
引物

表 C.1 提供了引物信息，包括引物名称、引物所在连锁群、引物序列、标记的荧光染料、等位变异及其对应的参照品种名称。

表 C.1 引物

序号	标记	连锁群	引物序列 (5' → 3')	荧光	等位变异	参照品种
1	R1-15	1	F:GATAATGATGTTTCAGGAAAACGGCA R:TCCTGGCATTTCATTATGTACTGATTG	5'6-FAM	192 194 196 200 204 206 216 220 224 232 234 236 250	昆优 2 号 翘头青萝卜 汉红一号 义和 206 广东短叶十三号 德高春玉 RKA131 捷秀美 德高秋玉 靓绿速生 白凤珍 1 立春美浓 京脆 2 号
2	R1-19	1	F:GCATGACGGTGAGGATTAAACGC R:ATTGGGGGACTAAAATGAAAGGGAG	5'6-FAM	208 215 233 238 243 249 251 253	京脆 2 号 秀绿 1621 东星 1871 昆优 2 号 广东短叶十三号 德高秋玉 靓绿速生 义和 206
3	R2-23	2	F:CTTCAAGATGACGACAAGAACAGC R:ACAACCATACATTAACAAGATCCAA	5'6-FAM	197 201 205 207 211 215 217 219 221 223 227	秀绿 1621 汉红一号 圣萝碧玉 靓绿速生 翘头青萝卜 捷秀美 捷秀美 义和 206 京脆 2 号 德高秋玉 广东短叶十三号
4	RSS007	2	F:ATCGAGACAAGGGAAGGGTT	5' TAMRA	109	义和 206

	3		R:TCAGTCCATCCAACAGACCA		127 133 136	昆优 2 号 义和 206 广东短叶十三号
--	---	--	------------------------	--	-------------------	-----------------------------

表 C.1 (续)

序号	标记	连锁群	引物序列 (5' → 3')	荧光	等位变异	参照品种
5	R3-16	3	F:GAGAGATTCTGATCATTGGGGGTT R:GAGGAGGTTGGGGATAGTGACGAG	5'RO X	283 285 287 289 291 293 295 299 303 305	幕田红福三号 昆优 2 号 秀绿 1621 捷秀美 广东短叶十三号 翘头青萝卜 圣萝碧玉 义和青脆一号 德高秋玉 汉红一号
6	R3-21	3	F:GATAGCAGACAGACCCTCAAAACAG R:GGACAGTGCTGCTTATCAGAGGAC	5'HE X	266 272 276	立春美浓 翘头青萝卜 秋美 40
7	R4-23	4	F:CTACCGTTTTTAGCACACGCAGC R:ATCTTATGTAGGGGAAGTGTGGA	5'TA MRA	254 256 258 260 262 264	广东短叶十三号 翘头青萝卜 义和 206 京脆 2 号 靓绿速生 靓绿速生
8	R4-63	4	F:TTGAGTAGCTTGGGCTTATGTATCT R:CTGACTGAGAAAGAGCCATAGGAG	5'HE X	176 182 184 188 199	翘头青萝卜 立春美浓 秋美 40 京红 5 号 昆优 2 号
9	R5-2	5	F:TAACAAGGAAATGGATTACAAAGTC R:AAGAGGAGAAACAGTAGTGGAGAAG	5'6-F AM	147 149 151 153	翘头青萝卜 京红 5 号 法国红星 老油瓶
10	R5-3	5	F:GTCGCTCGCTGAGGCTAGGCTT R:CATTCAACTGTCCACTGTTTCTG C	5'6-F AM	239 242 245 254	昆优 2 号 立春美浓 翘头青萝卜 立春美浓
11	R5-9	5	F:TATGGTATTGTTTGAGAGTTAGTGT C R:ACAAGTGGTCAGGTTTACATCAG	5'6-F AM	216 219 222 228 231	京红 5 号 捷秀美 秋美 40 秋美 40 昆优 3 号

表 C.1 (续)

序号	标记	连锁群	引物序列 (5' → 3')	荧光	等位变异	参照品种
12	R6-11	6	F:CTTTGCTAAATAAGACGCTGAATAC G R:GAGAGATTACAGATCGATTTTGAAGG	5'ROX	217 220 223 225 228	昆优 2 号 幕田红福三号 京红 5 号 满堂红 广东短叶十三号
13	R6-26	6	F:CTGTGAATGCTTTGTTTTCCCGAC R:TTGTGGTTGGTGTTAAAGGATGTGG	5'HEX	190 207 210 213	法国红星 白凤珍 1 翘头青萝卜 满堂红
14	R6-35	6	F:TCGACAGCTTTGGCGGCGTACTC R:ACCCCCATTCTCCGATCCTTCTTA	5'HEX	161 164 169 172 177	汉红一号 昆优 3 号 昆优 3 号 丰邦圆白萝卜 秀绿 1621
15	R7-20	7	F:GAGTAGAGAGATTTTGCGGGTGTT R:TCTCTGTTAAGCAACTTCTCTGGT	5'HEX	215 224 230	京红 5 号 昆优 3 号 京研满堂红
16	R7-33	7	F:GAAAGCACAAGAGGAAGTAGACAGAG G R:TAATCAAGACCTACCAAGAACACAAAC	5'ROX	227 230 236 241 244 253 256	昆优 3 号 昆优 2 号 德高秋玉 翘头青萝卜 靓绿速生 捷秀美 捷秀美
17	R7-34	7	F:TTATTTCTCAGATTTTCGAGTGATGTG TG R:GAATGGGGGAGGGAGAATAAAGTT	5'TAM RA	225 228 231 234 237 240	雪印 X1 秀绿 1621 白凤珍 1 义和 206 捷秀美 秀绿 1621
18	R8-17	8	F:CGACCTCCTCTGTTTCGTCTGTAG R:CATTAAAAAGTGCGTGTGGCTG	5'ROX	242 244 253 255 263	义和 206 昆优 2 号 捷秀美 京红 5 号 白凤珍 1

表 C.1（续）

序号	标记	连锁群	引物序列（5' → 3'）	荧光	等位变异	参照品种
19	RSS002 7	8	F:GACACGCCTCTTCCTTCTTG R:TCAAGTACCACTTCCCGAGG	5'ROX	173 175 177 183 187 189	白凤珍 1 义和 206 昆优 2 号 广东短叶十三号 京脆 2 号 老油瓶
20	R9-5	9	F:CGGATAGAGTGAACCTGATGAGAG R:GCTGAAGATAGACATTGGAGAGTA AG	5'HEX	223 229 235 241 243 245 247	昆优 3 号 广东短叶十三号 秀绿 1621 福春大根 德高秋玉 靓绿速生 丰邦圆白萝卜
注：可以不采用本标准推荐的荧光。为保持检测数据的一致性，无论采用何种荧光，检测数据都需要用参照品种校正。						

附 录 D
(资料性)
参照品种名单

表D.1参照品种信息提供了参照品种名称、来源和保藏编号

表D.1 参照品种名单

序号	品种名称	品种来源	保藏编号
1	法国红星	山东省农业科学院作物研究所	LB94
2	翘头青萝卜	山东省农业科学院作物研究所	LB135
3	老油瓶	山东省农业科学院作物研究所	LB212
4	汉红一号	山东省农业科学院作物研究所	LB223
5	捷秀美	国家作物种质库	XIN29914
6	昆优 2 号	国家作物种质库	XIN31309
7	广东短叶十三号	国家作物种质库	XIN31311
8	义和青脆一号	国家作物种质库	XIN31358
9	昆优 3 号	国家作物种质库	XIN31312
10	满堂红	国家作物种质库	XIN17100
11	京红 5 号	国家作物种质库	XIN34350
12	义和 206	国家作物种质库	XIN34499
13	德高秋玉	国家作物种质库	XIN34690
14	RKA131	国家作物种质库	XIN34703
15	丰邦圆白萝卜	国家作物种质库	XIN40071
16	德高春玉	国家作物种质库	XIN40072
17	京研满堂红	国家作物种质库	XIN40120
18	白凤珍 1	国家作物种质库	XIN41686
19	立春美浓	国家作物种质库	XIN41687
20	雪印 X1	国家作物种质库	XIN41688
21	京脆 2 号	国家作物种质库	XIN41689
22	秀绿 1621	国家作物种质库	XIN41973
23	圣萝碧玉	国家作物种质库	XIN41978
24	福春大根	国家作物种质库	XIN42286
25	秋美 40	国家作物种质库	XIN43051
26	靓绿速生	国家作物种质库	2021220697
27	幕田红福三号	国家作物种质库	2021220700
28	东星 1871	国家作物种质库	2021220715

