ICS 67.080.20
B 31

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2468—2013

甘蓝型油菜品种鉴定技术规程 SSR分子标记法

Identification of rapeseed varieties—SSR marker method

2013-12-13 发布　　2014-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

目　　次

前言 …… Ⅱ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　原理 …… 1
4　仪器设备及试剂 …… 1
5　溶液配制 …… 1
6　引物 …… 1
7　参照品种及其使用 …… 1
8　操作程序 …… 1
9　等位变异数据采集 …… 3
10　判定方法 …… 3
附录 A(规范性附录)　仪器设备及试剂 …… 5
附录 B(规范性附录)　溶液配制 …… 7
附录 C(规范性附录)　核心引物 …… 9

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本标准由农业部种子管理局提出。

本标准由全国植物新品种测试标准化技术委员会(SAC/TC 277)归口。

本标准起草单位:四川省农业科学院、农业部科技发展中心。

本标准主要起草人:余毅、赖运平、黄维藻、张浙峰、堵苑苑、何巧林、王丽容。

甘蓝型油菜品种鉴定技术规程　SSR 分子标记法

1　范围

本标准规定了利用简单重复序列(Simple sequence repeats,SSR)分子标记进行甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品种鉴定的试验方法、数据记录格式和判定标准。

本标准适用于甘蓝型油菜 DNA 分子数据采集和品种鉴定。

2　规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

3　原理

SSR 广泛分布于甘蓝型油菜基因组中,不同品种间每个 SSR 位点重复单位的数量可能不同。由于每个 SSR 位点两侧的序列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 位点重复单位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甘蓝型油菜品种。

4　仪器设备及试剂

仪器设备及试剂见附录 A。

5　溶液配制

溶液配制方法见附录 B。

6　引物

引物相关信息见附录 C。

7　参照品种及其使用

参照品种的名称见附录 C。在进行等位变异检测时,应同时包括相应参照品种的 PCR 扩增产物。

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,应与原参照品种核对,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。

8　操作程序

8.1　样品准备

8.1.1　待测样品为种子时,样品的扦样、分样和保存,按照 GB/T 3543.2 的规定执行。

8.1.2　待测样品为杂交油菜时,应提供 F_1 代种子或幼苗。

8.1.3 每份检测样品取 50 个个体，混合制样。

8.2 DNA 提取

将混合样品在液氮中研磨至粉末，迅速取约 100 mg 粉末置于 1.5 mL 离心管中，然后加入 500 μL 预热的(65℃)2×CTAB 提取缓冲液(用前加 2-巯基乙醇)，颠倒混匀；将离心管置于 65℃恒温水浴 1 h，期间颠倒混匀 3 次～4 次；取出离心管，冷却至室温；转移上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 氯仿—异戊醇(V∶V=24∶1)，颠倒混匀，室温静置 5 min～10 min，12 000 *g* 离心 10 min；转移上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 150 μL 异丙醇颠倒混匀后，置于－20℃的冰箱中 2 h；12 000 *g* 离心10 min，弃上清液，加 500 μL70%乙醇洗涤沉淀 2 次；室温风干，加 1×TE 缓冲液 60 μL 溶解沉淀；检测 DNA 浓度；于－20℃保存备用。

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。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 反应体系

含每种 dNTP 各 0.15 mmol/L，正向引物 0.25 μmol/L，反向引物 0.25 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 0.5 U/μL，1×PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})，$MgCl_2$ 1.5 mmol/L，样品 DNA 20 ng～40 ng，用超纯水补足所需体积。

利用毛细管电泳荧光检测时使用荧光标记引物，引物的荧光染料种类见附录 C。

8.3.2 反应程序

推荐使用以下两种反应程序：

程序 1：94℃预变性 2 min；94℃变性 40 s，65℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，每循环降 1℃，共 10 个循环；94℃变性 40 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，共 28 个循环；72℃延伸 5 min，4℃保存。

程序 2：94℃预变性 2 min；94℃变性 40 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，每循环降 1℃，共 10 个循环；94℃变性 40 s，50℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，共 28 个循环；72℃延伸 5 min，4℃保存。

每对引物的具体反应程序见附录 C。

8.4 PCR 产物检测

8.4.1 普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测

8.4.1.1 玻璃板处理

将长、短玻璃板清洗干净，用去离子水冲洗后晾干。用无水乙醇擦洗 2 遍，自然晾干。在长板上涂上 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。

8.4.1.2 玻璃板组装

待玻璃板彻底干燥后进行组装，并用水平仪调平。

8.4.1.3 变性 PAGE 胶的制备

按 B.3.2 配置 6.0%的变性 PAGE 胶液，迅速混匀后灌胶。待胶液充满玻璃板夹层，在凹槽处将鲨鱼齿朝外轻轻插入样品梳胶液聚合后，轻轻拔出样品梳，清洗胶板表面、样品梳和凝胶顶端。

8.4.1.4 预电泳

将胶板安装于电泳槽上，在正极槽(下槽)中加入 1×TBE 缓冲液约 800 mL，在负极槽(上槽)加入预热至 65℃的 1×TBE 缓冲液约 800 mL。在 85 W 恒功率下，预电泳 10 min～20 min。

8.4.1.5 样品制备

在 PCR 产物中加入 2 μL6×加样缓冲液，混匀后，在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出，迅速置于碎冰上，冷却 10 min。

8.4.1.6 电泳

清除凝胶顶端气泡。将鲨鱼齿梳齿端插入凝胶 1 mm～2 mm。每一个加样孔点入 2 μL～4 μL 扩增产物，在胶板两侧点入 DNA Marker。除待测样品外，还应同时加入参照品种的扩增产物。在 60 W～

80 W 恒功率下电泳，使凝胶温度保持在约 50℃。电泳 1.5 h～2.5 h。

8.4.1.7 银染

电泳结束后，小心分开两块玻璃板，将附着凝胶的玻璃板浸入固定液中，在摇床上 30 rpm 固定 20 min；取出胶板，放入水洗框中，用蒸馏水漂洗 2 次，每次漂洗 30 s；从水洗框中取出胶板，放入染色液中，在摇床上 30 rpm 染色 20 min；取出胶板，放入水洗框中，用蒸馏水漂洗 1 次，时间不超过 10 s；将胶板放入显影液中，在摇床上 30 rpm 显影，待条带清晰后，将胶板放入固定液中定影 5 min；用蒸馏水漂洗胶板 10 s。

8.4.2 毛细管电泳荧光检测

8.4.2.1 样品准备

将 6-FAM 和 HEX 荧光标记的 PCR 扩增产物用超纯水稀释 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，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，加盖瞬时离心后在 PCR 仪上 95℃变性 5 min，取出深孔板置于碎冰上，冷却 10 min。瞬时离心 10 s。

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：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。

8.4.2.2 电泳

按 DNA 分析仪操作说明，打开仪器，检查仪器工作状态，更换缓冲液，打开数据收集软件，编辑电泳板，将装有样品的深孔板去盖，置于样品架基座上，开始电泳。

9 等位变异数据采集

9.1 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。

9.2 普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染检测

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。

9.3 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 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。

9.4 结果记录

纯合位点的等位变异数据记录为 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 分别为该位点上两个不同的等位变异，小片段数据在前，大片段数据在后；无效等位变异记录为 0/0。

示例 1：一个品种的某个 SSR 位点为纯合位点，等位变异大小为 120 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 120/120。

示例 2：一个品种的某个 SSR 位点为杂合位点，2 个等位变异大小分别为 120 bp、126 bp，则该品种在该位点上的等位变异数据记录为 120/126。

10 判定方法

用附录 C 中引物进行检测，将获得的待测样品等位变异数据进行品种间比较或与数据库中品种比较。判定方法如下：

a) 品种间相似度≤90%，判定为不同品种；

b) 品种间相似度为 90%＜S＜100%时，判定为近似品种；

c) 品种间相似度＝100%，判定为疑同品种。

品种相似度(S)按式(1)计算。

$$S=\frac{2N_{ij}}{N_i+N_j}\times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

S ——相似度；

N_{ij}——材料 i 和 j 之间共同的等位变异数目；

N_i ——材料 i 中出现的等位变异数目；

N_j ——材料 j 中出现的等位变异数目。

对于 10 b)和 10 c)情况，按照 GB/T 19557.1 的规定进行田间鉴定。

附 录 A
（规范性附录）
仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

A.1.1 高压灭菌锅。
A.1.2 PCR 扩增仪。
A.1.3 电泳槽及配套的制胶附件。
A.1.4 高压电泳仪（最高电压不低于 2 000 V）。
A.1.5 DNA 分析仪。
A.1.6 台式高速离心机（最大离心力不小于 20 000 *g*）。
A.1.7 凝胶成像系统或紫外透射仪。
A.1.8 水浴锅。
A.1.9 冰箱。
A.1.10 制冰机。
A.1.11 紫外分光光度计。
A.1.12 微量移液器。
A.1.13 水平摇床。
A.1.14 胶片观察灯。
A.1.15 电子天平（精确到 0.01 g）。
A.1.16 酸度计。

A.2 试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯试剂。
A.2.1 乙二胺四乙酸二钠。
A.2.2 三羟甲基氨基甲烷。
A.2.3 十六烷基三甲基溴化铵。
A.2.4 聚乙烯吡咯烷酮。
A.2.5 三氯甲烷。
A.2.6 异戊醇。
A.2.7 异丙醇。
A.2.8 盐酸（37%）。
A.2.9 氢氧化钠。
A.2.10 10×PCR 缓冲液。
A.2.11 4 种脱氧核苷酸（dCTP、dTTP、dATP、dGTP）。
A.2.12 Taq DNA 聚合酶。

A.2.13 矿物油。
A.2.14 去离子甲酰胺。
A.2.15 溴酚蓝。
A.2.16 二甲苯青。
A.2.17 甲叉双丙烯酰胺。
A.2.18 丙烯酰胺。
A.2.19 硼酸。
A.2.20 尿素。
A.2.21 亲和硅烷。
A.2.22 剥离硅烷。
A.2.23 无水乙醇。
A.2.24 N,N,N′,N′-四甲基乙二胺。
A.2.25 过硫酸铵。
A.2.26 冰醋酸(99.5%)。
A.2.27 硝酸银。
A.2.28 甲醛溶液(37%)。
A.2.29 DNA分析仪专用分子量内标。
A.2.30 DNA分析仪专用胶。
A.2.31 DNA分析仪专用电泳缓冲液。

附 录 B
（规范性附录）
溶 液 配 制

B.1 DNA 提取溶液的配制

DNA 提取溶液的配置使用超纯水。

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 水中，冷却至室温，定容至 1 000 mL。

B.1.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液（pH 8.0）

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠盐，加入 800 mL 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（1 mol/L）准确调 pH 至 8.0，定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

B.1.3 0.5 mol/L 盐酸（HCl）溶液

量取 25 mL 浓盐酸（36%～38%）置于容量瓶中，加水定容至 500 mL。

B.1.4 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（pH 8.0）

称取 60.55 g Tris 碱溶于约 400 mL 中，加盐酸溶液（0.5 mol/L）调 pH 至 8.0，加水定容至500 mL，在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

B.1.5 2%（w/v）十六烷基三甲基溴化铵（2×CTAB）溶液

分别称取 20 g 十六烷基三甲基溴化铵、81.816 g 氯化钠和 20 g 聚乙烯吡咯烷酮溶于约 700 mL 水中，加入 100 mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（1 mol/L，pH 8.0）和 40 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（0.5 mol/L，pH 8.0），加水定容至 1 000 mL。

B.1.6 1×TE 缓冲液

分别量取 5 mL 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液（1 mol/L）和 1 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（0.5 mol/L），加盐酸溶液（0.5 mol/L）调 pH 至 8.0，加水定容至 500 mL，在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

PCR 扩增相关溶液的配制使用超纯水。

B.2.1 SSR 引物稀释

开盖前瞬时离心 10 s，按说明书分别配制前引物和后引物终浓度均 100 μmol/L 的储存液，各取 10 μL混合，加 80 μL 水定容至终浓度各 10 μmol/L 的工作液。

B.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液的配制

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液的配制使用超纯水。

B.3.1 40%（w/v）丙烯酰胺溶液

分别称取 190 g 丙烯酰胺和 10 g 甲叉双丙烯酰胺溶于约 400 mL 水中，加水定容至 500 mL，置于棕色瓶中 4℃储存。

B.3.2 6.0%变性 PAGE 胶

称取 42 g 尿素溶于约 60 mL 水中，分别加入 10 mL 10×TBE 缓冲液、15 mL40%丙烯酰胺溶液、150 μL 10%过硫酸铵(新鲜配制)和 50 μL N,N,N′,N′-四甲基乙二胺，加水定容至 100 mL。

B.3.3 亲和硅烷工作液

吸取 1 mL 无水乙醇，加入 10 μL 亲和硅烷和 10 μL 冰醋酸，混匀。

B.3.4 剥离硅烷工作液

量取 2 mL 的二甲基二氯硅烷，加 8 mL 的三氯甲烷，混匀。

B.3.5 10%过硫酸铵溶液

称取 0.1 g 过硫酸铵溶于 1 mL 水中。

B.3.6 10×TBE 缓冲液

分别称取 108 g 三羟甲基氨基甲烷和 55 g 硼酸溶于约 800 mL 水中，加入 37 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(0.5 mol/L)，加水定容至 1 000 mL。

B.3.7 1×TBE 缓冲液

量取 500 mL 的 10×TBE 缓冲液，加水定容至 5 000 mL。

B.3.8 6×加样缓冲液

分别称取 0.125 g 溴酚蓝和 0.125 g 二甲苯青，置于烧杯中，加入 49 mL 去离子甲酰胺和 1 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(0.5 mol/L，pH 8.0)，搅拌混匀。

B.4 银染溶液的配制

银染溶液的配置使用蒸馏水。

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 g 硝酸银，溶于 1 000 mL 水中。

B.4.3 显影液

称取 10 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 水中，用前加 2 mL 甲醛。

附 录 C
（规范性附录）
核 心 引 物

核心引物（47 对）见表 C.1。

表 C.1 核心引物（47 对）

标记	引物序列（5′→3′）	荧光染料	反应程序	染色体	等位变异 bp	参照品种
BRAS084	F:ATTGGGTTCTGACCTTTTCTC R:TTTTCCTTCATCGCTACCAC	5′HEX	1	N1	96	宁油 20 号
					109	28960
					111	加 8
					114	军农 1 号
Ra2E04	F:ACACACAACAAACAGCTCGC R:AACATCAAACCTCTCGACGG	5′TAMRA	1	N1	114	9636
					133	28960
CB10597	F:AAGCGCGCATAACTACAC R:AACACTGCTCCTTTCCCT	5′6-FAM	1	N1	100	W601B
					104	28960
					109	湘油 15
CB10355	F:GACGGATTGAGTCGGATA R:CCTGCTAGGAAACAGGGT	5′TAMRA	2	N2	201	豫油 2 号
					203	P194
					205	28669
					207	634
					213	28960
CB10172	F:ATTGGTCTCTTAACCCGC R:TTCTCGAATCCCTCGAA	5′HEX	2	N2	219	湘油 15
					224	LINAGOLD
					226	双 72
					229	加 8
Ol11B05	F:TCGCGACGTTGTTTTGTTC R:ACCATCTTCCTCGACCCTG	5′HEX	1	N3	110	9636
					113	双 72
					117	Q93
					119	28960
					121	湘油 15
CB10036	F:ATTCATCTCCTGCTCGCTTAG R:AAACCCAAACCAAAGTAAGAA	5′TAMRA	1	N3	156	宁油 14 号
					162	28960
					164	634
					168	加 8
BRAS029	F:GTTCAACCTCCCTCGTCTCT R:AGGTGCCAACTCATTTCTCAA	5′6-FAM	1	b:N3	182	9636
					186	花叶 991018
					188	荣选
					194	R210
CB10347	F:ATCTGAACACTTTCGGCA R:GGAAGCACCATGTCAGC	5′TAMRA	1	N4	181	W601B
					183	赣油杂 3 号
					185	走马洋油菜
					191	加 8
					193	92-98 系
					195	28960
					199	蓉油 3 号
					201	花叶 991018
					203	P194

表 C.1（续）

标记	引物序列(5′→3′)	荧光染料	反应程序	染色体	等位变异 bp	参照品种
BRAS021	F:ACCGTTGAGATCAATCCCTAT R:CATCTTCCTTAATCGAAACCC	5′TAMRA	1	N4	207	MAZNOO
					219	28960
Ra3H10	F:TAATCGCGATCTGGATTCAC R:ATCAGAACAGCGACGAGGTC	5′ROX	1	N5	116	加 8
					118	9636
					124	绵油 328
					130	湘油 15
					132	蓉油 3 号
					138	中农油 9 号
					140	28669
					142	中油 821
					144	28960
					146	双 72
MR014	F:GGGTTTCTCCTTCTCGTTGTT R:TGACGGTTGAGTGGTTGTGT	5′6-FAM	1	N5	121	LINAGOLD
					125	浙油 758
					127	中油 821
					129	103
					131	中农油 9 号
					137	绵油 88
					139	中油杂 898
					141	加 8
CN57	F:CACACCCTTACCACGTTCCT R:GCAACAAAGCATACTTCGCA	5′6-FAM	1	N6	151	Q93
					157	28960
					163	陕油 3 号
CB10330	F:AGGCGAGTTTACGAGGAT R:ACCTGCACCAGTCATTTG	5′TAMRA	1	N6	140	9636
					152	28960
CB10204	F:TTATCATATGCTGATCCATT R:GACTGTCTAGCTGCTCCAA	5′TAMRA	1	N6	179	28669
					181	28960
					185	浙油 758
BRAS023	F:CCATTGCAAATCCCTTTACTC R:AGATGGAATGCGATCAAAGA	5′TAMRA	1	a:N7	188	湘油 15
					190	28960
					192	634
					196	9636
CB10343	F:ATGCACGTCTCACAGACC R:AGCCCATTGGAGCTAGAG	5′TAMRA	1	a:N7	262	28960
					264	宁油 18
					266	加 8
					268	蓉油 3 号
				b:N16	272	渝油 21
					275	28960
CB10364	F:GAGACGATGCAAAGATCG R:TGCAGACACATTCGAACA	5′6-FAM	1	N8	189	宁油 20 号
					198	杂双 2 号
					201	绵油 328
					204	28960
					207	浙油 758
					210	万油 25
					216	W601B
					228	双 72
CB10026	F:TCGTTCTGACCTGTCGTTAT R:GGAAATGGCTGCTCATGTT	5′6-FAM	1	N8	111	9636
					123	28669

表 C.1（续）

标记	引物序列(5′→3′)	荧光染料	反应程序	染色体	等位变异 bp	参照品种
CB10029	F:ATTCGGAACCTAAATAGTCAG R:GGCGTATAAAACACCTAAAAC	5′HEX	1	N9	100	KW33
					106	28669
					108	苏油 1 号
					110	镇油 1 号
					114	28960
					116	陕油 3 号
					118	湘油 15
					120	Q93
					122	宁油 12 号
					124	申优青
					128	黔油 28 号
					132	苏油 1 号
					134	BRONOWISKI
					136	绵油 15 号
Na10D09	F:AAGAACGTCAAGATCCTCTGC R:ACCACCACGGTAGTAGAGCG	5′ROX	1	N9	284	28960
					369	湘油 15
					379	加 8
Na10A08	F:CATGGTTAAAACAATGGCCC R:CAAGAAACACCATCATTTCTCA	5′6-FAM	1	a:N9	138	浙油 758
					145	28960
				b:N15	159	LINAGOLD
					167	28960
					169	加 8
					171	青杂 2 号
Na10D07	F:CTACTTTGATGGACACTTGCC R:TCTGAAGTTGATTAGTCGGTCC	5′HEX	1	N10	106	28960
					108	浙油 758
					116	湘油 15
					118	镇油 3 号
Ra3D04	F:AAAAGGACCTACCAATTTCGTG R:CGACCCAAACTGAGCCATAC	5′ROX	1	N10	160	KW33
					162	P194
					164	苏油 1 号
					166	28960
					170	油研 1707
CB10587	F:TTGTGTTTTGCCTTCTGA R:TTTGCGCACAAACAATAA	5′ROX	2	N11	152	双 72
					155	P194
					161	634
					164	工农一号
					167	9636
					170	92-98 系
					173	LINAGOLD
					176	28960
					179	湘油 15
					182	浙双 72
					188	28669
CB10369	F:CATTCACAGGACCAGAGC R:CAAAGCCAAGACAACCAT	5′6-FAM	1	N11	147	28669
					165	28960
					171	宁油 12 号
					174	双 72
CB10277	F:ACAAATGCTTGAGTGATA R:TCTTCGTAAACTTGTTCTTGA	5′TAMRA	2	N11	209	BRONOWISKI
					217	28960

表 C.1（续）

标记	引物序列(5′→3′)	荧光染料	反应程序	染色体	等位变异 bp	参照品种
Ol11H09	F:CCCTTTTCCCCTTCTATTGG R:GTGCGACTTGGAATTTCTCC	5′6-FAM	1	N12	141	LINAGOLD
					151	92-98 系
					156	R210
					158	沪油 16 号
					160	湘油 15
Ol13G05	F:GTGTGCAGGAAACGATGTTC R:GGGAGTTTGAAGAGAAAGCG	5′HEX	2	N12	122	9636
					125	双 72
CB10003	F:ACGGTGCCGAATCTCAACG R:AAATGGGTCACAGCCGAGAA	5′HEX	1	N13	234	28960
					237	军农 1 号
CB10057	F:CTAGGCTAAGGAAGATTGTCA R:TAGTTTCTTCCTCCTGCTATC	5′HEX	1	a:N13	168	花叶 991018
					194	9636
					197	28960
				b:N3	223	28960
					229	湘油 15
CB10427	F:TCCCAACAAAAGAGTCCA R:CAGCGAACCGAGTCTAAA	5′6-FAM	1	b:N13	145	陕油 3 号
					148	华油 8 号
					151	28669
					157	双 72
CN48	F:GCGATCTCCTCAGGCATAGT R:CCACGCAAGCTGAAACATAA	5′TAMRA	1	a:N14	218	28960
					223	走马洋油菜
					227	28669
					231	浙油 758
				b:?	238	28960
					253	加 8
CB10320	F:AGTGCATGATGAAGGCAT R:GGGAATCCATGGCTGTA	5′TAMRA	1	N14	250	9636
					254	28960
Ol10C01	F:ATGACTGCTTAAACAGCGCC R:CTTCTCCAACAAAAGCTCGG	5′TAMRA	1	N14	217	28960
					219	P194
					221	LINAGOLD
Na10D11	F:GAGACATAGATGAGTGAATCTGGC R:CATTAGTTGTGGACGGTCGG	5′6-FAM	1	N15	184	9636
					186	中双 4 号
					190	浙双 72
					192	湘油 15
					194	浙油 758
					196	加 8
					198	KW33
MR097	F:TCCGATCTATTATCCGCAAAC R:ATCAACGGAGCAAAGATGATT	5′6-FAM	1	N15	130	双 72
					136	红油 3 号
					138	9636
					140	103
					142	加 8
					144	P194
					146	漕油 2 号
Ol10A10	F:CCTGAAGATAGGTTTGCTTCC R:ACAAATGCAACTACTAAATTGTCG	5′6-FAM	2	N15	194	陕油 3 号
					196	BRONOWISKI
					198	双 72
					201	赣油杂 5 号
					203	9636
					205	28960
					207	宜油 15
					211	浙双 72
					215	634

表 C.1（续）

标记	引物序列(5′→3′)	荧光染料	反应程序	染色体	等位变异 bp	参照品种
Na12A05	F:TGATTGGTGGAAGGTGGAAG R:TCATACATCAACCCTCTCTCTCTC	5′6-FAM	1	N16	144	史力丰
					148	花叶 991018
					152	湘油 15
					154	KW33
					156	92-98 系
					158	湘农油 2 号
					160	双 72
Na12A02	F:AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R:AGTGAATCGATGATCTCGCC	5′TAMRA	1	a:N16	161	9636
					165	28960
				b:N7	173	1470
					175	MAZNOO
					192	28960
					194	加 8
					196	绵油 15 号
CB10299	F:TACAGGTTCCTTGCGATG R:ATGGACGAGACAACATGG	5′6-FAM	1	N17	140	1470
					150	走马洋油菜
					153	LINAGOLD
					157	28960
CB10534	F:AGCTGCAACCACAACTCT R:GGAGCGCAAGAAAAG	5′TAMRA	1	N17	173	浙油 758
					176	28960
CB10217	F:CCCCATATCATCCCTACC R:GCTGAACAACCCACAAAG	5′6-FAM	2	N17	162	28960
					165	634
CB10028	F:CTGCACATTTGAAATTGGTC R:AAATCAACGCTTACCCACT	5′ROX	1	N18	157	浙油 758
					169	MAZNOO
					172	28669
					178	宁油 14 号
					181	28960
					184	634
					187	沪油 12 号
CB10179	F:ACGAAGCAAATAACAAAGA R:GAAACCCGAAAGCCTAAG	5′6-FAM	1	N18	145	9636
					154	28960
Ol13C03	F:GATCGGAGATGCGATGAGAG R:GCATGCACCAGTGAAAAACTC	5′ROX	1	N19	134	28960
					136	9636
					138	BRONOWISKI
CB10413	F:CTTAGCACAACCACTCGG R:GGTGATGAAGATGACGATG	5′TAMRA	1	N19	211	28960
					220	P194