

农业农村行业标准《向日葵品种及其实质性派生品种 鉴定 MNP 分子标记法》编制说明

（送审讨论稿）

一、工作简况

（一）任务来源

根据农业农村部农产品质量安全监管司“关于下达 2023 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知”（农质标函[2023]51 号），《向日葵品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 分子标记法》行业标准制定（项目编号 NYB-23157），本标准编写牵头单位为巴彦淖尔市农牧业科学研究所。

（二）制定背景

向日葵 (*Helianthus annuus*. L.) 属菊科、向日葵属。包括栽培种和野生种，其栽培种包括观赏型、油用型和食用型。向日葵是世界上继大豆、油菜、花生之后的第四大油料作物。向日葵抗旱、耐瘠薄，适宜生长在我国光照时间长、降雨量少的华北北部、东北地区和西北地区，是具有地区特色和优势的重要经济农作物。2023 年，内蒙古、新疆作为全国两大主产区，全国种植面积占比分别为 68% 和 13.2%。近年来随着向日葵国内需求扩大，向日葵种子产业获得重大发展，但由于向日葵种业种质资源积累欠缺、育种技术单一，造成一品多名，套牌，模仿性修饰性品种泛滥等现象严重。2022 年 3 月 1 日正式实施的《中华人民共和国种子法》，以强化种业知识产权保护为重点，建立实质性派生品种制度，扩大植物新品种权的保护范围和保护环节，并由国务院规定实质性派生品种制度的实施步骤和办法。为保障《种子法》实质性派生品种制度的科学实施，为国务院规定实施步骤奠定基础，急需制定实质性派生品种鉴定技术标准。

（三）起草过程

1. 起草阶段

1.1 起草单位

本标准编写牵头单位为巴彦淖尔市农牧业科学研究所，江汉大学、农业农村部科技发展中心、内蒙古自治区中蒙医药研究院、河套学院、三瑞农业科技股份有限公司协作共同完成。

1.2 前期准备

利用巴彦淖尔市农牧业科学研究所植物新品种测试中心保藏的 700 余份向日葵资源，进行表型筛查，最终筛选出性状差异大、具有代表性的向日葵品种 25 份进行测序。筛选引物，利用 648 份向日葵品种进行 MNP 分子检测，在品种类型上包括食用型、油用型、观赏型向日葵。2021 年 12 月，巴彦淖尔市农牧业科学研究所，江汉大学、农业农村部科技发展中心等单位启动了方法和标准研究工作。2023 年 3 月，利用向日葵品种的高通量测序数据及公开的向日葵品种测序数据，开发了 552 个向日葵 MNP 标记位点，后续删除检出率低，多态性弱的位点 30 个，最终确定了 522 个向日葵 MNP 标记位点，参考其他作物 MNP 分子标记 DNA 鉴定体系，建立了基于超多重 PCR、高通量测序和大数据处理技术的向日葵实质性派生品种 DNA 鉴定技术体系。利用所开发的技术体系，构建了 648 份向日葵品种 MNP 标记分子数据库。

1.3 技术确定

2022 年，由巴彦淖尔市农牧业科学研究所，江汉大学、农业农村部科技发展中心、内蒙古自治区中蒙医药研究院、河套学院、三瑞农业科技股份有限公司组成标准起草小组。起草小组制定了项目实施方案，开展了市场调研、文献查新、资料的收集整理、外部验证、数据分析与处理等工作。

1.4 技术验证

2023 年 8 月，联合 5 所标准草案验证单位，对标准的可操作性和检测数据的可重现性进行了验证。验证单位为：云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所，上海市农业科学院，武汉市农科院蔬菜研究所，中国农业科学院油料作物研究所，江苏徐淮地区徐州农业科学研究所。包括起草单位在内的 7 所单位均采用 5 个品种，对 552 个 MNP 标记进行了多重 PCR 扩增和二代高通量测序。经验证《向日葵品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 分子标记法》标准中的 DNA 提取方法、PCR 扩增反应条件、扩增片段检测方法等具备可操作性，按照标准中的方法，一次多重 PCR 扩增了标准规定的 552 个标记位点，标记检出率均高于 95%，分型重现率均大于 99.81%，品种判定结论重现率为 100%。

1.5 形成征求意见稿

2024 年 6 月-2024 年 9 月整理数据，形成标准文本征求意见稿及编制说明。

2. 征求意见阶段

2.1 征求意见形式

巴彦淖尔市农牧业科学研究所官方广泛征求大众意见，同时向科研院所、大学、测试机构、知名育种企业等单位专家征求函审意见。

2.2 起止时间

征求意见的起止时间为 2024 年 10 月 18 日至 2024 年 11 月 18。

2.3 征求意见范围及反馈意见回收情况。

3. 审查阶段

4. 报批阶段

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

按照农业农村部制定的 NY/T 2594《植物品种鉴定 DNA 分子标记法 总则》标准编写要求，采用以下原则编写《向日葵品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 分子标记法》：

规范性原则：本标准的制定符合法律法规，符合有关标准要求，包括中华人民共和国国家主席令（2021 年 105 号）《中华人民共和国种子法》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》GB/T 3543.2《农作物种子检测规程 扦样》GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》GB/T38551-2020《植物品种鉴定 MNP 标记法》。

适用性原则：本标准适用于所有向日葵品种的实质性派生品种鉴定；对操作人员主观判定经验要求少，适用于所有种业检验机构和种业企业。正常的杂交育种行为产生的品种不适用于本标准所述实质性派生品种鉴定，品种鉴定适应全部向日葵品种。

统一性原则：本规程与现行相关标准协调统一，不发生冲突。

先进性原则：先进性对于中国标准走向国际具有重要意义，可以助力中国在国际种业规则制定中的主动性。本标准采用的 MNP 标记法，经过多位院士和专家鉴定评价，认为该技术填补了国内外实用精准高效植物品种 DNA 鉴定技术空白，整体达到国际领先水平；本标准采用多重 PCR 结合高通量测序技术，单个 PCR

反应同时扩增 552 个向日葵 MNP 标记，扩增效率高；本标准采用高通量测序技术和计算机软件分析技术，单次可自动检测和分析数百个以上的品种和十万个以上的标记，检测和分析的效率高，自动化水平高；每个标记位点的测序数据量平均覆盖达到 500 条序列以上，每条序列精确到单个碱基，检测结果准确率达 99.94% 以上；检测过程不需要标准样品实物和参照品种实物进行平行实验，检测结果在不同实验室间高度一致，实现了 DNA 指纹在实验室间的共建、共享和共用；本标准实质性派生品种鉴定指标保持与品种鉴定保持了统一性，有助于标准使用者理解。

（二）主要技术内容及其依据

1 向日葵 MNP 标记位点的筛选

本标准中 MNP 标记定义指在一段核苷酸序列中，由多个核苷酸引起的序列多态性，其依据是：除单核苷酸变为多核苷酸外，定义中的其它描述仿照 SNP 标记的定义进行，以保持标记发展与变革的连续性。

实质性派生品种鉴定中需要计算遗传相似度，采用较多的标记位点可以更加准确地计算遗传相似度。本标准中规定了 522 个 MNP 标记引物用于检测向日葵实质性派生品种，其序列见标准中附录 A。传统 DNA 标记需要逐个标记开发和验证，标记开发效率不高，标记验证工作繁重，难以达到实质性派生品种鉴定对标记数量的要求。MNP 标记法采用多重扩增、高通量测序和生物信息学软件，实现了标记位点的高通量检测，极大增强了标记开发效率，更加适合实质性派生品种鉴定中的标记开发与标准制定。

从向日葵 DUS 测试库中，选择了包括食用型，观赏型，油用型在内的，有代表性的向日葵品种 25 个。参考了公开的 290 份向日葵全基因组测序数据

（PRJNA353001）每个品种进行基因组重测序，测序深度设置为 20 倍；利用 315 份重测序数据，利用获得的 315 份向日葵品种的基因组测序数据，将其比对到参考基因组（GCF_002127325.2_HanXRQr2.0-SUNRISE_genomic.fna.gz），以步长 1 个碱基在基因组上进行滑动，每次滑动获得一个长度为 120 bp 的窗口，计算窗口内 MNP 标记的区分度 D 值。选择边界保守但 D 值最高的前 600 个滑动窗口作为向日葵品种的 MNP 标记鉴定位点，最后引物设计成功 552 个位点，每个候选标记和扩增引物应同时满足以下原则：（1）每个 MNP 标记中含有的 SNP 数量 ≥ 1

个；（2）标记的样本区分力 $DP \geq 0.2$ 且尽可能最大， $DP=d/t$ ，其中 t 是指在该区域所有样品两两比较时可进行比较的样品对数， d 是具有至少 1 个 SNP 差异的样品对数；（3）候选 MNP 标记在基因组上均匀分布；（4）标记引物能够且仅能够在向日葵中扩增；（5）扩增产物长度在 150bp - 275bp 之间；（6）确保不同标记引物在同一个反应中不会产生竞争性扩增，以便在单个反应中能够同时扩增所有标记位点。

设计了 552 对超多重扩增引物，实测了 300 个向日葵品种，放弃了 30 个检出率低、存在明显非特异性扩增和标记分型在技术重复间无法重现的标记位点和引物，最终保留 522 个向日葵超多重扩增引物。平均每对染色体上含有 30.7 个标记位点，每对染色体上的标记位点数分布如图 1 所示。

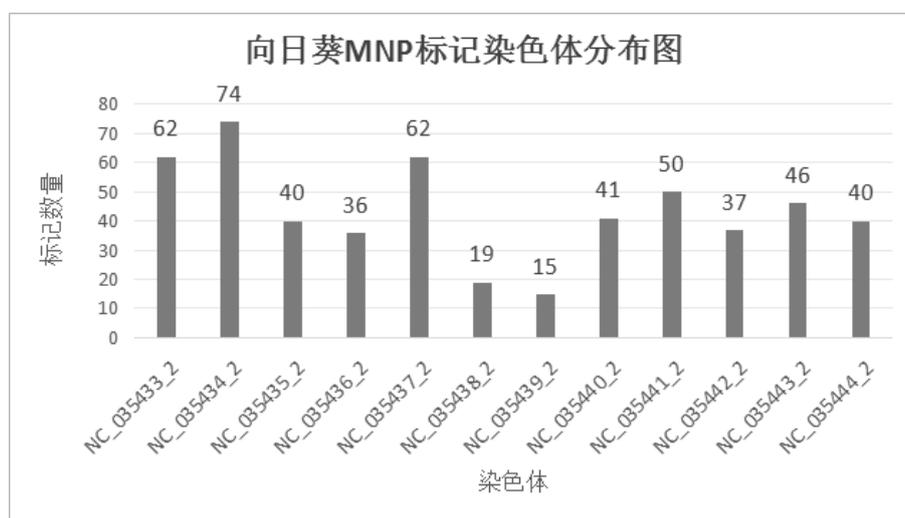


图 1 MNP 标记在向日葵染色体上的分布

本标准制定过程中，利用随机选择的授权品种筛选 MNP 标记位点，其原因是品种鉴定标准需要满足当前、历史和未来品种鉴定需要。未来品种是无法预测的，最佳策略是随机从品种总体中筛选品种，或者从资源中筛选标记，以尽量保证其中所包含的变异位点能够代表变异总体，进而保证筛选出来的位点能够用于未来的品种，以及历史和当前的品种。我们对随机选择的 30 个食用型向日葵授权品种的 522 个标记进行了遗传差异分布分析，其平均遗传距离为 0.54 ± 0.1 （平均值 \pm 标准差）648 份向日葵品种库中所选择的食用型向日葵品种间的平均遗传距离 0.58 ± 0.1 （平均值 \pm 标准差），二者差异不明显。随机选择 20 份油葵间的平均遗传距离为 0.62 ± 0.15 （平均值 \pm 标准差），而 648 份向日葵品种中的油

用型的平均遗传距离为 0.65 ± 0.13 (平均值 \pm 标准差), 二者之间差异不明显。上述结果符合统计学原理, 即随机筛选出来的品种更能无偏地代表了总体遗传多样性, 进而可以最大限度地适应历史、当前和未来的品种鉴定需要, 更能够满足标准制定中的适用性原则。图 7 显示, 648 个品种任意两品种进行比对共有 209628 对品种, 其中 0.39% 的品种间遗传相似系数高于 96%, 印证了随机筛选的标记可以区分总体里的所有品种。

值得说明的是, 本标准虽然采用了较多品种用于筛选 MNP 标记, 但 MNP 标记本身的特点决定了其可以采用较少的品种进行标记筛选。本标准所采用的 MNP 标记总数达到了 522 个, 是 SSR 标记的 15.3 倍, 少数标记缺失和鉴定错误对结果影响不大, 因而可以相应减少筛选标记品种鉴定性能的品种数量。由于 MNP 标记多样性高 (图 6), 因此, 适当降低筛选标记的品种数量并不会导致该方法品种区分能力不强, 例如, 利用本标准鉴定了 648 份向日葵材料 (申请授权品种、审查中采用的近似品种、观赏向日葵品种资源) 的 DNA 指纹, 99.61% 的品种间遗传相似系数低于 96%, 判定为不同品种 (见图 7), 显示了较强的品种区分能力。由于 MNP 标记没有 SSR 标记的扩增滑脱等技术难题, 因此, 减少筛选标记的品种数量不会影响该方法的鉴定准确性, 例如表 5 显示 MNP 标记分型准确率达到了 99.94% 以上。由于基因组上 MNP 标记数量众多, 可以筛选到具有高度保守边界的 MNP 标记, 因此, 减少筛选标记的品种数量也不会影响该方法的标记检出率。

2. 关于本标准中标记数量和标记抽样误差对品种鉴定准确性的影响

从 SSR 标记法, 到 SNP 标记法和 MNP 标记法的分子标记品种鉴定标准中, 标准所采用的标记数量一直在提升, 其主要目的是通过采用更多的标记数量, 降低标记在基因组上抽样误差对鉴定结论准确性的影响。《最高人民法院关于审理侵害植物新品种权纠纷案件具体应用法律问题的若干规定 (二)》规定在品种 DNA 鉴定中可以扩大检测位点进行加测, 也是希望通过更多的标记数量, 提升品种鉴定准确性。下面举两个实例定量说明标记数量与标记抽样误差对鉴定结论准确性的影响。

实例一: 检测编号为 XRK230621001 品种名称 SH361 的待测品种与检测编号为 XRK230621002 品种名称 SH361E 的对照品种间的遗传相似系数检测结果为 98.48%, 若将向日葵实质性派生品种阈值设置为 93%, 由于其超过了判定阈值,

因此，判定结论应为“待测品种可能为对照品种的实质性派生品种”。设标准采用的标记数量为 N 个，那么，仅当从基因组上抽取的 N 个标记位点中，有大于或等于 $N \times 95\%$ 个标记位点在待测品种和对照品种中相同时，才不会因为标记位点抽样误差导致判定结论错误，其概率 = $\sum_{i=N \times 93\%}^N C_N^i (97.25\%)^i \times (1 - 97.25\%)^{(N-i)}$

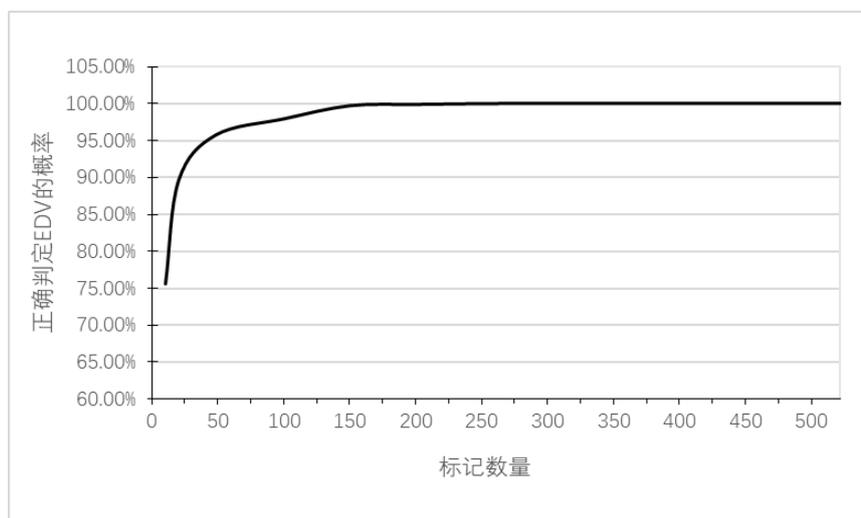


图 2 不同标记数量下实质性派生品种鉴定结论正确的概率

注：（1）设置实质性派生品种的遗传相似系数判定阈值为 93%

（2）待测品种与对照品种的遗传相似系数为 98.48%

根据上述概率方程获得图 2。从图 2 可以看出，当标记数量达到 150 个及以上时，本实例中正确判定实质性派生品种的概率就接近 100%了。国际种子联盟（ISF）认为判定实质性派生品种的标记数量下限 $N=150$ 个，其在本实例中不会因为标记位点抽样误差导致实质性派生品种鉴定结论错误的概率为 100%；本标准采用的标记数量 $N=522$ 个，其在本实例中不会因为标记位点抽样误差导致实质性派生品种鉴定结论错误的概率为 100%。需要特别说明的是，图 2 只针对本实例，随着实质性派生品种判定阈值的不同，以及待测品种与对照品种遗传相似系数的不同，该图表现可能差异较大。

实例二：2024 年 5 月提供给江汉大学的验证样品中，检测编号 XRK240513040 测试编号 20232003039A 与其检测编号 XRK240513017 品种名称 SH363 的遗传相似度检测为 98.25%，经 DUS 测试两品种无明显差异，不具备特异性。若将向日葵品种鉴定阈值设置为 96%，由于该遗传相似度大于 96%，品种的判定结论为“待

测品种与对照品种为疑同品种”。按与上述实质性派生品种鉴定类似的推理可以获得图 3。

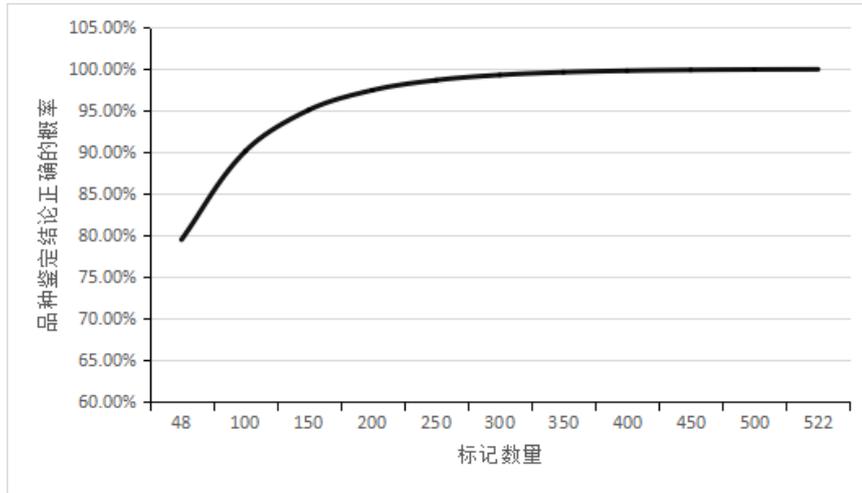


图 3 不同标记数量下品种鉴定结论正确的概率

注：（1）设置品种判定阈值为 96%；

（2）待测品种与对照品种的遗传相似系数为 98.25%。

从图 3 可以看出，只有当标准中使用的标记数量达到 350 个及以上时，在本实例中品种的判定结论接近 99%。按本标准中采用的 522 个标记进行检测，在本实例中不会因为标记位点抽样误差导致判定品种鉴定结论错误的概率 99.63%。需要特别说明的是，图 3 只针对本实例实用，随着品种判定阈值的不同，以及待测品种与对照品种遗传相似系数的不同，该图可能出现完全不同的表现。

3. 关于样本抽样量

向日葵品种是有性繁殖群体，可能存在基因变异单株，需要利用抽取的多个样本按统计方法加以排除。本标准具体规定了抽样样本数量应大于 30，主要理由如下：（1）统计学上，30 个样本为大样本；（2）现有植物品种 DNA 鉴定标准抽样量大多为 30 左右；（3）向日葵种子较小、幼苗也不大，抽取 30 个样本是容易达到的；（4）MNP 标记法采用混合样本检测，多抽取一些样本对检测工作量影响不大；（5）30 个样本中的杂株基因型要被误判为真实基因型，杂株基因型测序片段的比例需要超过 50%；假定杂株率为 5%，由于 MNP 标记法 PCR 扩增产物处于线性增长期，因此，杂株基因型测序片段服从于实验次数为测序深度，发生率为 5%的二项分布；根据二项分布模型计算，杂株基因型测序片段的比例超过 20%的概率，即被误判为品种中真实等位基因型的概率为

$$\sum_{i=30 \times 20\%}^{30} C_i^{30} (5\%)^i (1 - 5\%)^{(30-i)} = 0.057\%$$

；（6）我们随机选取了 3 个向日葵品种，分别从中抽取 10 个、20 个、30 个单株的叶片进行等量混合，共获得 9 个混合样本；对每个混合样本按本标准进行检测；（7）选取 49 个品种的叶片样本，样本量从 20-30 不等，与其 40-100 个种子样本的检测结果进行比对。结果表明：不同叶片样本数量，对结果重现性影响不大（表 2）；在 20 个以上样本量的前提下，采用叶片或者种子 DNA 进行检测，对结果的影响不大（表 3）。

表 2 不同叶片样本数量对分型结果的影响

序号	检测编号	名称	检测编号	名称	共同位点	差异位点	差异比例	遗传相似度
1	XRK240628311	1-10	XRK240628312	1-20	494	0	0.00%	100.00%
2	XRK240628311	1-10	XRK240628313	1-30	494	0	0.00%	100.00%
3	XRK240628312	1-20	XRK240628313	1-30	494	0	0.00%	100.00%
4	XRK240628314	2-10	XRK240628315	2-20	515	0	0.00%	100.00%
5	XRK240628314	2-10	XRK240628316	2-30	515	2	0.40%	99.60%
6	XRK240628315	2-20	XRK240628316	2-30	514	1	0.20%	99.80%
7	XRK240628317	3-10	XRK240628318	3-20	514	1	0.20%	99.80%
8	XRK240628317	3-10	XRK240628319	3-30	515	2	0.40%	99.60%
9	XRK240628318	3-20	XRK240628319	3-30	515	3	0.60%	99.40%
合计					4570	9		

样品名称 1-3 分别为保藏编号 BC816、BC800、BC810 的向日葵材料。序号 1，样本名称为 1-10 为保藏编号 BC816 的向日葵材料 10 个单株的混样，1-20 为此材料 20 个单株的混样。在检测的 3 个品种的 10、20、30 个样本数量的相互比对结果来看，差异位点数最大为 3 个。同一材料不同检测样本量的遗传相似度最小值为 99.4%，差异比例为 0.6%。9 个样品共检测 4589 个位点，差异位点数为共 9 个。遗传相似度平均值为 99.6%。以上数据说明，抽样样本量，对分型结果影响不大。

表 3 不同 DNA 提取方法对样品分型结果的影响

序号	种子编号	叶片编号	共同位点数	差异位点数	差异比例	遗传相似度
1	XRK240119001	XRK240119050	530	0	0	100.00%
2	XRK240119002	XRK240119051	529	2	0.38%	99.62%
3	XRK240119003	XRK240119052	529	1	0.19%	99.81%
4	XRK240119004	XRK240119053	520	1	0.19%	99.81%
5	XRK240119005	XRK240119054	526	1	0.19%	99.81%
6	XRK240119006	XRK240119055	528	1	0.19%	99.81%
7	XRK240119007	XRK240119056	523	2	0.38%	99.62%

8	XRK240119008	XRK240119057	528	5	0.95%	99.05%
9	XRK240119009	XRK240119058	530	1	0.19%	99.81%
10	XRK240119010	XRK240119059	526	1	0.19%	99.81%
11	XRK240119011	XRK240119060	529	0	0	100.00%
12	XRK240119012	XRK240119061	500	2	0.40%	99.60%
13	XRK240119013	XRK240119062	515	1	0.19%	99.81%
14	XRK240119014	XRK240119063	521	0	0	100.00%
15	XRK240119015	XRK240119064	528	1	0.19%	99.81%
16	XRK240119016	XRK240119065	528	1	0.19%	99.81%
17	XRK240119017	XRK240119066	519	3	0.58%	99.42%
18	XRK240119018	XRK240119067	531	0	0	100.00%
19	XRK240119019	XRK240119068	533	3	0.56%	99.44%
20	XRK240119020	XRK240119069	527	0	0	100.00%
21	XRK240119021	XRK240119070	531	0	0	100.00%
22	XRK240119022	XRK240119071	531	2	0.38%	99.62%
23	XRK240119023	XRK240119072	529	2	0.38%	99.62%
24	XRK240119024	XRK240119073	532	1	0.19%	99.81%
25	XRK240119025	XRK240119074	527	0	0	100.00%
26	XRK240119026	XRK240119075	526	0	0	100.00%
27	XRK240119027	XRK240119076	525	2	0.38%	99.62%
28	XRK240119028	XRK240119077	521	0	0	100.00%
29	XRK240119029	XRK240119078	532	1	0.19%	99.81%
30	XRK240119030	XRK240628316	515	1	0.19%	99.81%
31	XRK240119031	XRK240119080	515	0	0	100.00%
32	XRK240119032	XRK240119081	510	5	0.98%	99.02%
33	XRK240119033	XRK240119082	515	1	0.19%	99.81%
34	XRK240119034	XRK240119083	537	1	0.19%	99.81%
35	XRK240119035	XRK240119084	527	0	0	100.00%
36	XRK240119036	XRK240119085	524	2	0.38%	99.62%
37	XRK240119037	XRK240628319	515	2	0.39%	99.61%
38	XRK240119038	XRK240119087	529	3	0.57%	99.43%
39	XRK240119039	XRK240119088	523	0	0	100.00%
40	XRK240119040	XRK240119089	526	3	0.57%	99.43%
41	XRK240119041	XRK240119090	529	4	0.76%	99.24%
42	XRK240119042	XRK240119091	542	5	0.92%	99.08%
43	XRK240119043	XRK240119092	537	2	0.37%	99.63%
44	XRK240119044	XRK240628313	494	3	0.61%	99.39%
45	XRK240119045	XRK240119094	535	1	0.19%	99.81%
46	XRK240119046	XRK240119095	539	4	0.74%	99.26%
47	XRK240119047	XRK240119096	536	0	0	100.00%
48	XRK240119048	XRK240119097	507	0	0	100.00%
49	XRK240119049	XRK240119098	519	5	0.96%	99.04%
			25762	70	0.19%	

建立 648 份向日葵 MNP 数据库, 若用幼苗提取 DNA 每份资源 30 个单株, 需要投入大量资源, 且单株取样容易出现混杂。用种子提取 DNA 则可以很大程度上缩短检测周期, 避免植株混杂。为保证数据的准确, 对 49 份向日葵资源的叶片与种子进行盲测, 叶片样本为 30 个以上, 种子样本量为 30-100 不等。结果见上表, 49 对品种的叶片与种子检测共检出 25762 个位点, 共有 70 个位点有差异, 占比 0.19%, 同一品种种子与叶片样品遗传相似度最低值为 99.29%。以上结果可知, 选择用种子或叶片提取 DNA, 对 MNP 分型结果影响较小。

4. 关于多重 PCR 扩增循环数

本标准中规定多重 PCR 的扩增循环数建议不高于 20 个, 其原因如下。(1) 本标准采用测序对标记进行检测, 理论上一个分子即可, 其下限受限于不同测序平台对测序文库量和浓度的要求, 不宜统一规定; (2) 当高于 20 个循环时, 较多标记位点进入了平台增长期 (图 4), 杂株等位基因型可能会因为扩增偏好性被过度扩增, 可能被误判为真实的等位基因型。

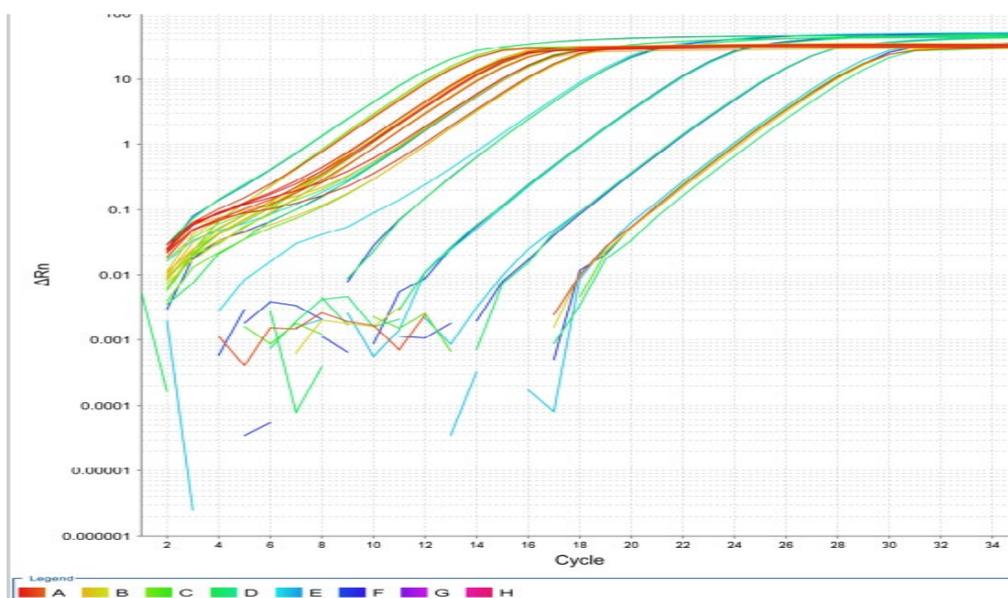


图 4 不同标记位点的扩增曲线

5. 高通量测序平均覆盖倍数和测序数据质量控制

覆盖倍数指比对到标记位点的测序片段的数量。本标准规定高通量测序的平均覆盖倍数设置为 700 倍以上, 其理由如下。

(1) 该覆盖倍数保障了测序数据量可以通过质量控制

按本标准检测了 794 个向日葵样品，它们的测序覆盖倍数均设置为 700 倍以上，其中共有 789 个最后获得的平均覆盖倍数都达到了质量控制中规定的 500 倍以上，其比例为 99.37%（图 5）。

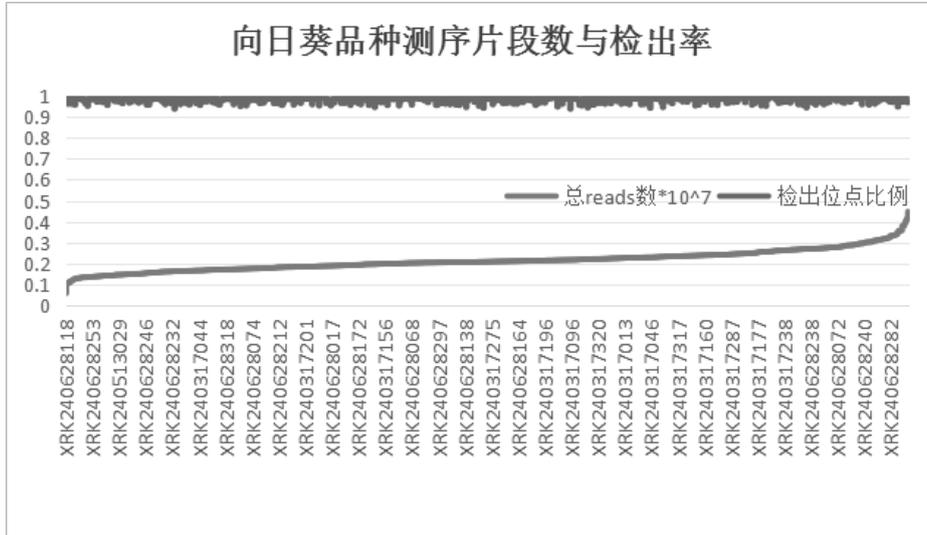


图 5 向日葵的测序片段数量和与标记位点的检出率。（注：横坐标为品种）

(2) 该覆盖倍数在测序成本上是可接受的。

本标准共有 522 个位点，每个位点按 300 bp 计算，700 倍的测序覆盖倍数需要 0.11 G 的测序数据量；每个品种按重复检测 2 次计算，总共需要 0.22G 的测序数据量；每个 G 的商业测序费用按 100 元计算，每个品种高通量测序检测需要费用共计 22 元，是可以接受的。

6. 关于质控参数 R1 的设置

本标准中的 R1 指样品中检出标记位点的比例，标准规定 R1 大于或等于 95% 时，判定测序数据合格，其理由如下：

位点检出率对鉴定结论影响见表 3。我们按 522 个位点中最大缺失率 5% 计算，缺失位点数目为 26.1 个；缺失位点中，差异位点分布服从实验次数为 26.1 且发生频率为 $(1 - \text{真实的遗传相似度})$ 的二项分布；根据二项分布，计算获得在 95% 的概率保障下，缺失位点中的差异位点的最小值和最大值分别为 2 个和 9 个，观察到的遗传相似度介于 79.35% 和 80.76% 之间；最终推断出遗传相似度的最大偏差为 0.83%，表明在 R1 大于或等于 95% 时，检出位点缺失率对鉴定结论的重现性影响不大。

表 4 位点检出率对鉴定结论稳定性影响

检测位点总数	真实的遗传相似度 (GS)	真实差异位点数 (n _{ij})	缺失率	检出位点数 (N _{ij})	缺失位点数
522	80%	104.40	5%	495.90	26.10
缺失位点			观察到的差异位点数 (n _{ij})		
概率保障	最小值	最大值	最小值	最大值	
95%	2	9	95.40	102.40	
观察到的遗传相似度 (GS)		遗传相似度 (GS) 偏差			
最小值	最大值	最小值	最大值		
80.76%	79.35%	0.81%	0.95%		

7. 关于质控参数 R2 的设置

本标准中 R2 指样品的两次重现性实验中，检出标记位点的重现率。本标准规定 R2 大于或等于 95% 时，判定测序数据合格。对于该参数设置的理由如下：

(1) 设置该参数是满足标准范围的需要

标准引物开发和验证过程中，不能穷尽现有全部品种或者未来可能出现的品种。可能存在与标准开发过程中使用的向日葵品种在遗传上有巨大差异的品种，进而导致较多引物无法扩增，出现较多数据缺失。为应对这种情况，需要设置 R2 作为样品数据质量的控制参数。

(2) 该阈值为鉴定结论重现性提供了有效保障

位点检出稳定性 (R2 的值) 对鉴定结论稳定性的影响见表 4。当 R1 值较低时，表明存在大量位点不可检出，假设可检出位点数量为 353 个；当 R2 值为 95% 时，那么，非共同检出位点数量为 17.65 个；根据二项分布，在 95% 的概率保障下，非共同检出位点中，差异位点最多为 6 个，由此观察到的遗传相似度在为 79.3%-80.72% 之间，遗传相似度 (GS) 偏差为 0.87%。由此可见，R2 值确保了遗传相似度的稳定性，保障了检出位点缺失率对鉴定结论重现性影响不大。

表 5 位点检出稳定性对鉴定结论稳定性的影响

位点总数	真实的遗传相似度 (GS)	真实差异位点数 (n _{ij})	R2 的值	共同检出位点数 (N _{ij})	非共同检出位点数
353	80%	70.6	95%	335.35	17.65
非共同位点中，差异位点数			观察到的遗传相似度 (GS)		遗传相似度 (GS) 偏差最大值
概率保障	最小值	最大值	最小值	最大值	
95%	1	6	79.30%	80.72%	0.87%

8. 关于 MNP 标记分型重现性和准确性

(1) MNP 标记分型准确性高

由于标记分型真实值与参考值都是未知的,在 2023 年和 2024 年分别进行了 25 个材料的 2 次重复性实验(在江汉大学对同一个样品重复做两次实验)和重现性实验(在江汉大学、巴彦淖尔市农牧业科学研究所、上海市农科院等 7 所单位)来计算 MNP 标记分型的准确性。两次检测分别使用 522 个位点及优化后的 522 个位点进行检测。从表 4 可以看出,重复性实验在比较的 522 个 MNP 标记的重现性实验检测结果中,共有 13 个标记位点分型确定存在差异,比例为 0.13%,折算标记分型重现性和准确性分别为 99.88%和 99.94%。重现性实验,7 所单位共检出 28 个存在差异位点,比例为 0.17%标记分型重现率与准确率分别为 99.26%和 99.63%。

表 6 MNP 标记在重复性和重现性实验中的分型准确率

实验类别	共同检出位点数	有差异位点数	差异位点比例	无差异位点数	分型重现率	分型准确率
重现性实验	15892	28	0.17%	15864	99.26%	99.63%
重复性实验	10361	13	0.13%	10348	99.88%	99.94%

(2) 高度精准的分型结果为鉴定结论重现性和推广应用提供了有效保障

本标准规定鉴定每个品种检测 522 个 MNP 标记位点,那么在一次鉴定中,分型错误的标记位点不超过 $522 \times (1-99.94\%) = 0.31$ 个,其对遗传相似系数的影响仅为 0.06%,基本可以忽略。不同实验室鉴定同一个品种,其分型不可重现的标记位点数量为 $2 \times 522 \times (1-99.63\%) = 3.86$ 个,其对遗传相似系数的影响仅为 0.73%,对不同实验室鉴定结论重现性的影响也基本可以忽略。

长期以来,分型结果和鉴定结论重现性是 DNA 分子鉴定的核心难题。为解决这一难题,传统品种 DNA 鉴定标准要求统一试剂、设备和软件,要求经验丰富的技术人员,否则要求提供参考样品实物和标准样品实物进行平行实验,以校对实验误差。上述条件限制了传统品种 DNA 鉴定数据的精准数字化、共享共用和推广应用,也限制了以精准数据化为基础的信息化、网络化、自动化、智能化、区块链等现代种业治理手段的使用。本标准首次突破了品种鉴定精准数字化的技术难题,不再需要统一实验条件,对实验技术人员要求并不严苛,也不要求标准样品实物或参照样品实物进行平行实验,有利于检测结果的数字化、网络化和智能化,有利于本标准在种业行业的推广应用。

9. 关于 MNP 标记的多态性

一组 DNA 标记组合的核心功能是品种鉴定，而 DNA 标记多态性越高，品种区分能力就越强。SSR 标记是传统 DNA 标记中多态性最高的标记类型，具有很强的品种区分能力。我们比较了约 440 个以上品种的 SSR 标记和约 440 个品种的 MNP 标记，其结果见表 6。从表 6 可以看出，在 440 个以上向日葵品种中，SSR 标记的等位基因型数量的平均值为 11.5 个，MNP 标记的等位基因型的平均值为 4.4 个，总等位基因型数量 MNP 标记的等位基因型的数量为 2317 个，SSR 标记的等位基因型的数量为 391 个，MNP 标记总等位基因型数量为是 SSR 标记的 5.9 倍。

表 7 MNP 标记和 SSR 标记的等位基因型数量对比

标记类型	位点数 (个)	总等位基因型数量 (个)	平均等位基因数量	检测样品数量
SSR 标记	34	391	11.5	440 份
MNP 标记	522	2317	4.4	440 份

10. 关于 MNP 标记法的品种区分能力

DNA 标记最终目的是用于品种区分，本标准使用了 522 个标记位点，

我们计算了 648 个品种任意两个之间的分型差异，共得到 209628 对品种的差异比例数据。对品种间遗传相似系数低于 96%，判定为不同品种；共有 837 对品种遗传相似系数高于 96%，占比仅为 0.3%，表明 MNP 标记法具有很强的品种区分能力（见图 7）。209628 对品种中 1164 对品种的差异小于 10%，占总对数的 0.56%；2949 对品种的差异 11-30%，占总对数 10.47%；105205 对差异 31%-50% 占总对数 50.19%，78353 差异比例 71-91%，占总对数总对数的 37.38%；结果表明，MNP 标记法可以区分绝大部分品种对。

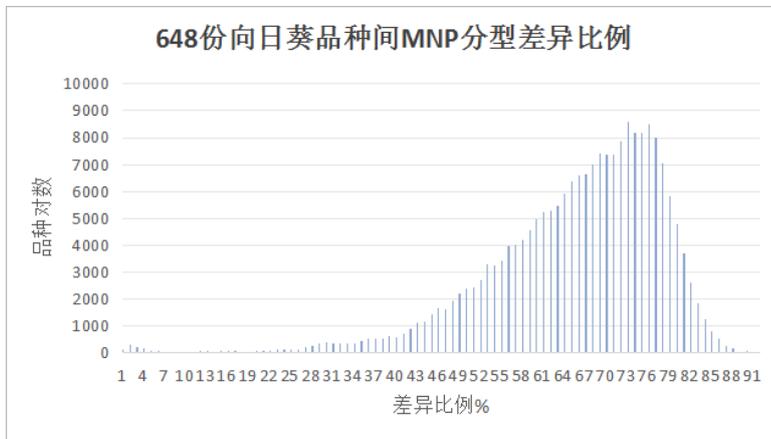


图 6 648 份向日葵品种间 MNP 分型差异比例

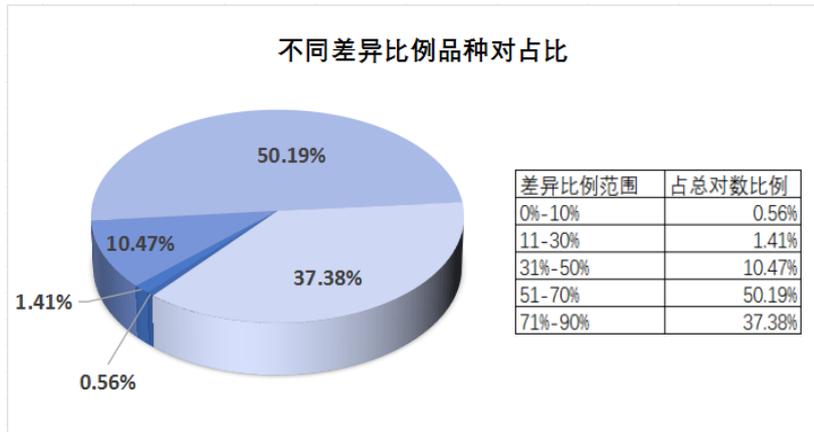


图 7 不同差异比例品种对占比

11. 关于向日葵实质性派生品种的判定阈值

本标准将遗传相似度（GS）大于或等于 93% 的品种判定为“待测品种可能为对照品种的实质性派生品种”，相关重要说明如下。

（1） 根据发表文献中的实质性派生品种判定阈值制定方法、综合考虑向日葵实质性派生品种育种方法现实状况，中国向日葵实质性派生品种阈值范围 72%-96%。

根据我国《种子法》和国际植物新品种保护联盟（UPOV）公约，实质性派生品种指由原始品种实质性派生，或者由该原始品种的实质性派生品种派生出来的品种，与原始品种有明显区别，并且除派生引起的性状差异外，在表达由原始品种基因型或者基因型组合产生的基本性状方面与原始品种相同。定义包含三个要点：一是由原始品种实质性派生；二是与原始品种可以明显区别；三是在表达由原始品种基因型或者基因型组合产生的基本性状方面与原始品种相同。

Enrico Noli 等于 2013 年在《Plant breeding》杂志上发表了题为《Criteria for the Definition of Similarity Thresholds for Identifying Essentially Derived Varieties》的论文。作者在该论文中总结了制定实质性派生品种阈值的方法。其中“校对规则”在制定实质性派生品种判定阈值具有客观性和可操作性，本标准采用“校对规则”来确定实质性派生品种的判定阈值。

实质性派生品种判定阈值范围的理论推断。

由于向日葵是三系杂交，一般市面上常见的品种均为杂交种，向日葵育种历史比较短，常规品种的保护力度欠缺，近年“星火”“三道眉”等常规品种种质资源利用保藏利用较欠缺，常规种较少且难以获得。利用本标准对收集的 30 对

向日葵杂交材料进行检测,任意两个向日葵常规品种品种之间的平均遗传差异为67%,那么,在本标准检测的522个标记位点中,它们之间有 $522 \times 0.67=349$ 个差异标记位点;设实质性派生品种的遗传相似系数判定阈值为 x ,那么,当后代与亲本差异位点数量小于 $522 \times (1-x)$,后代将被判定为实质性派生品种;在正常杂交选育模式下,差异标记在亲本与后代间是否相同服从于实验次为349次,发生频率为50%的二项分布;按二项分布计算正常杂交选育模式下,梨品种杂交后代为非实质性派生品种的平均概率

$p=1-\text{BINOM.DIST}(522*(1-x), 349.74, 0.5, \text{TRUE})$;根据上述公式,计算了实质性派生品种发生概率 P 与其判定阈值 X 间对应的关系,其结果见表6;从表6可以看出,梨品种在正常杂交选育模式下,若实质性派生品种判定阈值大于72%,杂交选育后代就可以在99%以上的概率保障下,被判定为非实质性派生品种。所以,向日葵实质性派生品种阈值判定下限为72%

表8 向日葵品种通过正常杂交选育,在不同实质性派生品种阈值下被判定为非实质性派生品种的概率

检测位点数	向日葵品种间的平均差异	实质性派生品种的遗传相似系数判定阈值(X)	非实质性派生品种发生概率(P)
522	67.00%	100%	100.00%
522	67.00%	99%	100.00%
522	67.00%	98%	100.00%
522	67.00%	97%	100.00%
522	67.00%	96%	100.00%
522	67.00%	95%	100.00%
522	67.00%	94%	100.00%
522	67.00%	93%	100.00%
522	67.00%	92%	100.00%
522	67.00%	91%	100.00%
522	67.00%	90%	100.00%
522	67.00%	89%	100.00%
522	67.00%	88%	100.00%
522	67.00%	87%	100.00%
522	67.00%	86%	100.00%
522	67.00%	85%	100.00%
522	67.00%	84%	100.00%
522	67.00%	83%	100.00%
522	67.00%	82%	100.00%

522	67.00%	81%	100.00%
522	67.00%	80%	100.00%
522	67.00%	79%	100.00%
522	67.00%	78%	100.00%
522	67.00%	77%	100.00%
522	67.00%	76%	100.00%
522	67.00%	75%	100.00%
522	67.00%	74%	100.00%
522	67.00%	73%	99.99%
522	67.00%	72%	99.87%
522	67.00%	71%	99.32%
522	67.00%	70%	97.31%
522	67.00%	69%	91.80%
522	67.00%	68%	77.32%

根据实质性派生品种为新品种的基本要求，实质性派生品种判定阈值应该小于品种鉴定阈值

根据《种子法》和国际植物新品种保护联盟（UPOV）对实质性派生品种的定义，实质性派生品种必须是新品种，因此，实质性派生品种的判定阈值要小于品种鉴定判定阈值。向日葵品种鉴定阈值为 96%，因此，向日葵实质性派生品种的判定阈值应该小于 96%。

(2) . 以向日葵实质性派生品种育种方式级过程为切入点，通过田间测试与检测结果，利用校对原则设定向日葵实质性派生品种阈值为 93%。

a. 以向日葵生产实际的回交转育代数作为研究对象，推断实质性派生品种理论值。

2022 年-2024 年对向日葵实质性派品种进行调查。向日葵 EDV 品种主要是使用传统育种手段，连续回交转育产生的。目前主要包括两类：成对的亲本（不育系与保持系）；渗透某一抗性基因的品种及其原始品种。

一般来说，回交使得后代基因与轮回亲本基因越来越相似，不存在基因连锁时，如果目标性状在双亲间有 n 对基因差异，在不加选择的情况下，回交 r 次，纯合体的比率为： $(1-1/2^r)^n$ ，也就是说，如果 $n=1$ ，回交 3 代基因纯合率为 87.5%，4 代为 93.8%，5 代为 96.9%，6 代为 98.4%，7 代为 99.2%。值得注意的是，这里的 n 是双亲之间的差异基因。 n 越小，即两个亲本遗传背景越接近，回交需要的次数就越少。但双亲遗传背景差异较大时，为保证其派生性状遗传稳定和其他基本性状与轮回亲本一致，其回交代数一般需要 8 代甚至以上。利用分子标记辅助

育种的品种，在其早代（3代左右）选择时有可能就可以选择出与保持系基本性状高度一致的不育系。

一般情况下，生产中通常进行4-5次回交，后代即可恢复轮回亲本大部分性状，即后代与轮回亲本除派生引起的性状差异外，基本性状无明显差异。不论是抗性基因导入还是不育系保持系选育，育种企业及科研单位选育母本或抗性材料回交代最少为4代（通过分子方法辅助选育的除外），抗性导入材料才能与原始材料基本表性状一致，不育系与其保持系基本性状一致。基于以上论述，绝大多数情况下，以回交育种方法产生的实质性派生品种，其回交代数至少应在4代以上，才能保证轮回亲本与其后代基本性状无差异，结合理论与生产实际向日葵实质性派生品种阈值应与回交4代基因纯合率接近，即在93.8%左右。

以上是基于理论值与生产实践的推断，本标准所论述的阈值是选择，以522个MNP位点分型数据计算的某一个遗传相似度作为实质性派生品种阈值。无论几代回交，此阈值都应将绝大多数的实质性派生品种划分在次范围内。

b. 利用校对原则判断实质性派生品种阈值

成对亲本回交育种材料。目前，回交育种为向日葵产生实质性派生品种的主要育种手段，回交转育过程中并非所有后代均为实质性派生品种，只有除了派生性状其他基本性状与轮回亲本一致的可称为实质性派生品种。为了进一步论证阈值。2024年种植了回交3-6代成对亲本共20对，进行遗传相似度检测以及表型DUS测试。结果如下：

表9 成对亲本回交育种材料遗传相似度及性状差异

序号	待测品种	对照样品	比较位点数	差异位点数	遗传相似度	备注	基本性状差异
1	S24-209	S24-210	506	194	61.66%	F3	花盘形态
2	S24-218	S24-219	499	116	76.75%	F3	叶片侧脉角度
3	S24-133	S24-134	498	108	78.31%	F5	生育期差5d
4	S24-223	S24-224	501	75	85.03%	F3	籽粒颜色
5	S24-82	S24-83	505	53	89.50%	F4	籽粒大小

6	S24-185	S24-186	502	34	93.23%	F5	无
7	S24-71	S24-72	506	34	93.28%	F4	叶柄花青甙显色
8	S24-147	S24-149	503	28	94.43%	F5	无
9	s23-128	s23-129	516	26	94.96%	F4	无
10	S24-221	S24-222	505	23	95.45%	F3	无
11	s23-4	s23-5	515	23	95.53%	F5	无
12	S24-23	S24-24	507	22	95.66%	F4	无
13	79*81	81	505	16	96.83%	F4	无
14	S24-13	S24-14	507	16	96.84%	F4	无
15	S24-43	S24-45	506	12	97.63%	F3	无
16	S24-196	S24-200	502	10	98.01%	F4	无
17	S24-19	S24-20	507	10	98.03%	F4	无
18	C15	C16	503	3	99.40%	F5	无
19	79*80	80	505	2	99.60%	F4	无
20	18s55	18s56	510	0	100.00%	>F6	无

根据 20 对品种的田间调查结果来看，共有 6 对存在明显差异，在叶片侧脉夹角，花盘形态，生育期等性状上有明显区别。存在表型差异样品遗传相似度在 61.2%-93.28%之间，存在明显差异的品种遗传相似度最高的品种为 93.28%。这一对品种在叶片叶柄夹角上有明显区别。样品 7，S24-71 与 S24-72 为回交四代的保持系与不育系，二者除了育性的区别外，还在叶柄花甙显色这一形状上有明显区别，从实质性派生品种的定义来看，二者虽然存在遗传上的依赖关系，也存在派生行为，但不属于实质性派生品种。除育性外，基本性状一致的样品其遗传相似度为 93.23%-100%，样品 7，S24-185 与 S24-186，除育性外其他基础性状无明显差异，遗传相似度为 93.23%，属于回交产生的实质性派生品种。以上实验结果说明，的遗传相似度 93%左右时，存在一定数量的实质性派生品种和非实质性派生品种，与向日葵实质性派生品种的阈值为 93%是较为合适的。

抗性导入品种的回交材料。为验证抗性导入材料的 EDV 阈值，收集了回交 3-6 代抗性导入品种的成对亲本材料进行检测，详情如下。

表 10 回交转育抗性导入材料遗传相似度

序号	样品 1		样品 2		代数	共同位点数	差异位点数	分子相似度	明显差异
	编号	名称	编号	名称					
1	XRK2405 13053	B-3	XRK2405 13068	B 原	3	503	5	97.61 %	否
2	XRK2405 13054	B-4	XRK2405 13068	B 原	4	503	5	99.01 %	否
3	XRK2405 13055	B-5	XRK2405 13068	B 原	5	502	5	99.00 %	否
4	XRK2405 13056	B-6	XRK2405 13068	B 原	6	503	12	99.01 %	否
5	XRK2405 13057	24B-3	XRK2405 13069	24B 原	3	505	59	88.32 %	是
6	XRK2405 13058	24B-4	XRK2405 13069	24B 原	4	503	6	98.81 %	否
7	XRK2405 13059	24B-5	XRK2405 13069	24B 原	5	507	6	98.82 %	否
8	XRK2405 13060	24B-6	XRK2405 13069	24B 原	6	506	7	98.62 %	否
9	XRK2405 13061	24B(2)-3	XRK2405 13069	24B 原	3	504	65	87.10 %	是
10	XRK2405 13062	24B(2)-4	XRK2405 13069	24B 原	4	504	48	90.48 %	是
11	XRK2405 13063	24B(2)-5 -1	XRK2405 13069	24B 原	5	502	44	91.24 %	否
12	XRK2405 13064	24B(2)-5 -2	XRK2405 13069	24B 原	6	503	32	93.64 %	否
13	XRK2405 13065	24B(2)-6	XRK2405 13069	24B 原	6	501	8	98.40 %	否

样品 1-4 为分子标记辅助筛选的材料，遗传相似度为 97.61%–99.01。样品 5-8 为传统育种材料，遗传相似度为 88.32%–98.62%。9-13 为野生抗性供体与同一材料不同回交代数后代的遗传相似度。样品 11 与 12 为回交 5 代不同单株与轮回亲本的遗传相似度。以样品 1 为例，样品 1 中 B-3 为抗性供体与原始材料 B 杂交后产生的携带抗性后代与 B 回交 3 代的样品。由于样品 1 是通过分子手段筛选出的抗性后代，可以看出在回交 3 代时，其遗传相似度达 97.61%，远超出另外两组未进行分子辅助筛选的材料三代的遗传相似度。9-13 样品的抗性供体为

野生材料，其遗传背景与原始材料较远，在 4 代回交时，其遗传相似度为 90.48% 不及理论水平。

表型方面，样品 5、9、10、12 在籽粒性状上与原始品种（轮回亲本）有明显差异，其遗传相似度分别为 88.32%、87.10%、90.48%。基本性状无差异的样品有 9 对，除样品 11 之外，抗性渗透材料与其原始材料的遗传相似度均在 93% 以上。由于在现有的 DUS 测试行业标准及表型测试技术下，表型测试也并不能观测作物一切的基础性状。正如分子标记位点数量只能覆盖部分基因一样，二者皆有局限性。所以，实质性派生品种阈值确定，旨在将绝大多数实质性派生分品种划分在此范围之内。本标准的制定旨在在现有科学技术的基础上，判定 EDV 品种的遗传相似度范围，进而保护品种原始创新。因此抗性导入类型的实质性派生品种阈值定为 93%，符合当前育种情况。

已经育成的实质性派生品种。收集了育成的渗透抗性基因的改良品种及其原始品种，并对以下三对品种进行 mnp 标记。育种过程：对照品种保持系与抗性供体材料杂交，选择抗性后代与对照品种保持系回交 6 代，得到抗性保持系，与对照品种不育系回交 2 代得到抗性不育系，最终通过杂交得到抗性品种。

2023 年对三组品种进行 DUS 测试，并进行了抗性调查。除了抗性的区别之外，待测品种与对照品种表型无明显差异，符合实质性派生品种的定义。从 MNP 标记分型结果来看，遗传相似度满足 93% 的实质性派生品种阈值范围。

表 11 育成实质性派生品种遗传相似度

序号	待测品种	对样品	比较位点数	差异位点数	遗传相似度
1	SH361E	SH361	525	8	98.48%
2	三瑞 10 号 E	三瑞 10 号	524	3	99.43%
3	SH363E	SH363	525	13	97.52%

(3) 国际种业知识产权相关组织制定的实质性派生品种判定阈值介于 82%-96%之间

国际种子联盟（ISF）分别于 2004 年和 2007 年制定了一系列作物的实质性派生品种判定准则。对生菜、棉花、玉米、油菜实质性派生品种的遗传相似系数的判定阈值分别规定为 96%、87.5%、82%和 85%；法国提议在蔬菜方面可以采用

200 个标记，如遗传相似度超过 90%以上，可以认定为 EDV；国际无性繁殖园艺植物育种者协会（CIOPORA）建议遗传相似系数 90%作为举证责任转移的阈值。

由此可见，实质性派生品种判定阈值在国际上并没有统一定论，本标准中采用的判定阈值在国际实质性派生品种实践采用过的阈值的范围内；ISF 建议上述标准每 5 年重新审查一次，如果检测方法有变，应根据新的检测方法重新制定标准；UPOV 也认为实质性派生品种判定阈值应根据种业国情的不同，做出具体规定。本标准采用 MNP 标记方法，与国际上采用的 SSR 和 SNP 标记方法不同；中国种业国情与国际种业情况显著不同，应根据自身实际情况做出规定。

（4）我国目前的向日葵育种水平、向日葵种业情况，以及不同的实质性派生品种判定阈值对育成品种的影响程度

我国向日葵育种发展起步较晚，21 世纪起逐步从国外引进了一批杂交品种，通过 20 余年的改良及培育，近年培育出一批品高产优质抗逆适应性广的优良品种。但同时，因为遗传背景相似，选育目标性状相对统一，向日葵品种同质化现象严重，“仿种子”现象屡禁不止，民众对售卖“仿种子”习以为常。这极大损害了原始创新者的利益，为激励原始创新 2021 年中种业振兴行动全面启动以来，截止 2024 年年初，共撤销 5 批，合计 1413 个向日葵品种。目前，向日葵“仿种子”清理工作已初见成效。2024 年建立向日葵 MNP 数据库，通过筛查，发现了大量的同质化品种，其中大部分是套牌品种。从市面购买的 113 份种子里，仅与主栽品种 sh361 遗传相似度大于 96%的有 46 个，通过部分种植比对，与主栽品种 SH361 无明显区别。向日葵种子产业近几年发展迅速的同时，也有许多问题和矛盾亟待解决。

实质性派生品种判定阈值越低，判定越严格，激励种业原始创新的力度就越大，但是较微小的创新又可能会被人为淘汰。对于育种技术较为传统，资源遗传多样性有限的作物来讲，实质性派生品种判定阈值对种业创新是一把双刃剑，应在鼓励创新与粮食安全间寻求平衡。

由于常规选育的杂交向日葵品种，落入实质性派生品种范围的可能性极低，利用本标准检测了 610 个申请授权的向日葵品种，从中任选一对品种组合，判定它们的遗传相似系数；若遗传相似系数大于或等于 93%的的实质性派生品种判定阈值，则判定品种对中授权日期更晚的品种可能为实质性派生品种。从表 5 可以

看出，当实质性派生品种判定阈值为 93%时，有个品种可能为实质性派生品种，占比 28%，能够明显激励种业创新，同时能够保持种业发展的持续性和稳定性。

表 12 为现有品种在各种判定阈值下，可能为实质性派生品种的数量与比例。从下表可知，向日葵种子产业套牌侵权的问题比较严重。品种的快速鉴定与实质性派生品种鉴定工作刻不容缓。

表 12 现有品种在不同判定阈值下成为实质性派生品种的数量与比例

实质性派生品种阈值	99%	98%	97%	96%	95%	94%	93%
实质性派生品种数量	200	219	230	238	241	250	260
实质性派生品种比例	33%	36%	37.7%	39%	39.5%	40.9%	42.6%
实质性派生品种阈值	92%	91%	90%	89%	88%	87%	86%
实质性派生品种数量	272	283	280	291	299	307	314
实质性派生品种比例	44.5%	44.7%	45.9%	47.7%	49%	50.3%	51.5%

12. 关于实质性派生品种判定的结果表述

本标准规定，当遗传相似度（GS）大于或等于 93%时，结果表述为“待测品种可能为对照品种的实质性派生品种”。采用“可能”一词是因为存在例外，例如：（1）若待测品种培育时间早于对照品种，则不是对照品种的实质性派生品种；（2）若待测品种和对照品种均来源于同一杂交组合分离后代的姊妹系，也不是对照品种的实质性派生品种；（3）《种子法》依据性状来定义实质性派生品种，表型测试并不能包含品种一切性状，目前分子标记的位点范围对于全基因组数据来说是十分有限的，且分子与表型性状并非一一对应，因此，分子不能作为实质性派生品种判定的充分条件。在国际实质性派生品种司法实践中，遗传相似度常用于确定举例责任，而非作为判定实质性派生品种的充分证据。

13. 关于品种鉴定的判定阈值

《种子法》将新品种定义为具备新颖性、特异性、一致性、稳定性，并有适当命名的植物品种，特异性要求其已知品种间至少有一个性状的差异。对 2023 年 DUS 测试向日葵品种表型相似度及分子遗传相似度进行了初步分析。结果表明，分子标记差异较小，表型无明显差异的概率也高；分子标记差异较大，表型存在明显差异的概率高，判定其为不同品种的概率也高。需要指出的是，即分子标记差异为 0，也可能因为差异基因不在检测标记范围等原因导致待测品种与对照品种存在性状差异，难以绝对保障两个品种间没有性状差异。在向日葵 DUS 测试中存在已有的分子标记方法下遗传相似度 100%而表型有差异的实例。

基于上述理由，制定判定相同、近似和极近似品种的遗传相似度阈值具有一定的主观性。本标准中，品种鉴定的阈值确定为 96%，主要有以下两个方面的依据。

(1) NY/T3752-2020《向日葵品种真实性鉴定 SSR 分子标记法》中鉴定意见参考原则中规定：供检样品或 SSR 指纹数据平台某品种比较检测出差异位点数大于 2 个，排除两者为同一品种。即向日葵 SSR 分子标记真实性判定阈值为 94%。该判定阈值对向日葵 mnp 品种鉴定，有一定的参考价值。

(2) 对于同一品种年度间的变异应该予以充分考虑，我们对不同年度，同一来源的主栽品种 SH363 SH361 进行了检测，结果如下：

表 13 同一品种不同年度批次差异度

序号	批次 1/来源 1	批次 2/来源 2	差异度
1	SH363(2018 年之前)	SH363(2023 年)	3.24%
2	SH361(2018 年之前)	SH361(2023 年)	3.61%

以上两个品种均为向日葵主栽品种，也是市面上模仿、修饰最多的品种。在实际生产中普遍存在品种在经过较长时间的繁殖后，出现性状改变的情况，这是由于高频率大规模的的种子生产，生物学混杂和基因突变的概率升高，从而导致品种基本性状改变。这也是造成品种退化的原因之一。以上两对品种进行表型性状均无明显区别，但不同生产年份同一品种之间分子遗传相似度也有 4% 以内的差异。实例说明，同一品种，不同批次，同一品种差异度 < 4%，所以初步设定向日葵品种鉴定阈值应在 96%。

为了进一步验证阈值，随机选择整理了 54 对向日葵品种，品种来源主要为市场购买向日葵品种以及 DUS 测试样品。遗传相似度在 88%-100% 的品种进行 DUS 田间表型测试。详情见下表。

表 14 不同遗传相似度品种表型差异调查

区号	检测编号	保藏编号	区号	检测编号	保藏编号	遗传相似度	表型区别
204	XRK240317359	BZ3626	203	XRK0001	BZ3013	100.00%	无
205	XRK240317266	BZ3531	203	XRK0001	BZ3013	98.06%	无
206	XRK240317263	BZ3528	203	XRK0001	BZ3013	97.67%	无

207	XRK240317346	BZ3612	203	XRK0001	BZ3013	96.70%	无
208	XRK240317327	BZ3593	203	XRK0001	BZ3013	96.50%	无
209	XRK240317038	BC0154	203	XRK0001	BZ3013	96.31%	无
210	XRK240317086	BC0218	203	XRK0001	BZ3013	96.31%	无
211	XRK240317028	BC0142	203	XRK0001	BZ3013	93.79%	无
212	XRK240317162	BC551	203	XRK0001	BZ3013	92.82%	无
213	XRK240317168	BC557	203	XRK0001	BZ3013	89.88%	无
215	XRK240317126	BC0365	214	XRK0009	BZ1229	99.61%	无
216	XRK240317138	BC0380	214	XRK0009	BZ1229	98.84%	无
217	XRK240317003	BC0115	214	XRK0009	BZ1229	97.87%	无
218	XRK240317055	BC0173	214	XRK0009	BZ1229	96.52%	无
219	XRK240317274	BZ3539	214	XRK0009	BZ1229	96.12%	无
220	XRK240317287	BZ3552	214	XRK0009	BZ1229	95.74%	无
221	XRK240317301	BZ3566	214	XRK0009	BZ1229	95.16%	无
222	XRK240317241	BC748	214	XRK0009	BZ1229	92.25%	幼茎花青甙/ 叶柄花青甙
223	XRK240317306	BZ3572	214	XRK0009	BZ1229	88.20%	幼茎花青甙
224	XRK240317017	BC0130	225	XRK240317047	BC0164	100.00%	无
226	XRK240317002	BC0114	227	XRK240317055	BC0173	100.00%	无
228	XRK240317312	BZ3578	229	XRK240317329	BZ3595	97.68%	无
230	XRK240317317	BZ3583	231	XRK240317321	BZ3587	97.48%	无
232	XRK240317129	BC0368	233	XRK240317262	BZ3527	96.50%	无
234	XRK240317272	BZ3537	235	XRK240317274	BZ3539	96.00%	舌状花颜色+ 叶片与主茎 夹角
236	XRK240317036	BC0151	237	XRK240317275	BZ3540	96.50%	无
238	XRK240317301	BZ3566	239	XRK240317320	BZ3586	95.34%	无
240	XRK240317214	BC720	241	XRK240317216	BC722	95.33%	无
242	XRK240317054	BC0172	243	XRK240317302	BZ3568	95.17%	无
244	XRK240317028	BC0142	245	XRK240317347	BZ3613	95.17%	无
246	XRK240317028	BC0142	247	XRK240317308	BZ3574	94.21%	无
248	XRK240317161	BC550	249	XRK0019	BC0152	94.20%	无
250	XRK240317028	BC0142	251	XRK240317032	BC0147	94.20%	无
252	XRK240317025	BC0138	253	XRK240317162	BC551	94.17%	无
254	XRK240317162	BC551	255	XRK240317313	BZ3579	94.17%	无
256	XRK240317341	BZ3607	257	XRK0018	BC0144	94.15%	无
258	XRK240317348	BZ3614	259	XRK0018	BC0144	93.79%	无
260	XRK240317020	BC0133	261	XRK240317328	BZ3594	93.79%	无

262	XRK240317028	BC0142	263	XRK240317129	BC0368	93.77%	无
264	XRK240317109	BC0346	265	XRK240317162	BC551	93.41%	无
266	XRK240317162	BC551	267	XRK240317262	BZ3527	93.41%	无
268	XRK240317162	BC551	269	XRK240317330	BZ3596	93.41%	无
270	XRK240317028	BC0142	271	XRK240317109	BC0346	93.22%	无
272	XRK240317008	BC0120	273	XRK0019	BC0152	92.64%	无
274	XRK240317241	BC748	275	XRK240317317	BZ3583	92.64%	幼茎花青甙/ 花期/ 叶柄 花青甙
276	XRK240317241	BC748	277	XRK240317283	BZ3548	92.23%	幼茎花青甙/ 花期/ 叶柄 花青甙
278	XRK240317341	BZ3607	279	XRK0019	BC0152	92.22%	无
280	XRK240317038	BC0154	281	XRK0019	BC0152	92.84%	无
282	XRK240317025	BC0138	283	XRK0019	BC0152	92.83%	无
284	XRK240317017	BC0130	285	XRK240317101	BC0242	91.59%	花盘形态/ 舌状花姿态
286	XRK240317006	BC0118	287	XRK240317168	BC557	91.46%	无
288	XRK240317026	BC0139	289	XRK240317168	BC557	90.25%	无
290	XRK240317002	BC0114	291	XRK240317241	BC748	90.12%	管状花 /舌 状花姿态
292	XRK240317020	BC0133	293	XRK240317156	BC545	90.49%	舌状花姿态

根据 54 对品种的田间调查结果来看，共有 8 对存在明显差异，占总样品数的 14.8%。存在表型差异样品遗传相似度在 88.2%–96.0%之间，其中 7 对遗传相似度 88%–92.25%之间，1 对存在明显差异的品种遗传相似度为 96.0%，这一对品种在叶片叶柄夹角上有明显区别。基于上述实验结果以及田间试验结果，本标准向日葵品种鉴定阈值为 96%。

为进一步验证向日葵品种鉴定阈值，选择下表样品进行 MNP 检测，样品 1–28 为根据 NY/T3752–2020《向日葵品种真实性鉴定 SSR 分子标记法》筛选出的遗传相似度 \geq 94%的品种。此 22 对品种在 2023 年进行 DUS 测试经田间比肩种植，调查向日葵 43 个性状，测试结论为，表型均不具备特异性。

表 15 不具备特异性品种遗传相似度

序号	检测编号	测试编号	对照样品检测编号	对照样品名称（测试编号）	遗传相似度
1	XRK240513018	20232003058A	XRK240513019	XF3113	98.45%
2	XRK240513020	20232003057A	XRK240513019	XF3113	98.84%

3	XRK240513021	20232003053A	XRK240513022	佳农 1 号	98.26%
4	XRK240513023	20232003052A	XRK240513024	RY3638	99.81%
5	XRK240513025	20232003050A	XRK240513026	丰葵 1 号	99.61%
6	XRK240513027	20232003037A	XRK240513013	SH361	96.88%
7	XRK240513028	20232003042A	XRK240513013	SH361	95.72%
8	XRK240513029	20232003025A	XRK240513013	SH361	97.67%
9	XRK240513030	20232003035A	XRK240513013	SH361	98.45%
10	XRK240513033	20232003033A	XRK240513034	双星 8 号	100.00%
11	XRK240513035	20232003028A	XRK240513008	GY9191	99.80%
12	XRK240513036	20232003032A	XRK240513008	GY9191	100.00%
13	XRK240513037	20232003027A	XRK240513038	先瑞 10 号	99.80%
14	XRK240513039	20232003031A	XRK240513017	SH363	98.06%
15	XRK240513040	20232003039A	XRK240513017	SH363	98.25%
16	XRK240513041	20232003044A	XRK240513017	SH363	99.22%
17	XRK240513042	20232003061A	XRK240513017	SH363	91.09%
18	XRK240513046	20232003064A	XRK240513045	20232003055B	99.81%
19	XRK240513046	20232003064A	XRK240513047	20232003064C	99.81%
20	XRK240513048	20232003063A	XRK240513045	20232003055B	86.29%
21	XRK240513048	20232003063A	XRK240513049	20232003063C	100.00%
22	XRK240513051	20232003045A	XRK240513052	20232003045B	99.81%

对此 22 对品种按照本标准的标记方法进行检测，结论如下：22 对表型无差异的品种中，样品 20 遗传相似度最低为 86.29%，最高值为样品 10、12、21，遗传相似度 100%。其中表型不具备明显差异，遗传相似度低于 96%有 3 对，占比 13.6%。表型不具备明显差异，遗传相似度在 96%-100%之间的 19 对，占比 86.3%。可知，在 96%的品种鉴定阈值下，大部分不具备特异性的品种可以被筛选出来。

由于向日葵基因约组有 35 亿碱基对，无论是 MNP 标记还是 SSR 标记都无法完全覆盖，在目前的技术背景下，分子检测结论与表型测试结论并不能在所有品种对鉴定中做到完全。在向日葵 DUS 测试中也存在遗传相似度为 96%以上，表型有明显区别的实例。但可以明确的是，分子遗传相似度越高，表型无差异概率越大。分子标记只能作为辅助手段最大限度的筛选近似品种。根据向日葵现有育种水平，及以上论证分析，得出 96%作为向日葵品种鉴定阈值是适合的。

14. 关于数据分析软件

标准文本“8 质量控制”和“9 数据分析”中，已经公开了数据比对、记录和计算的规则与公式，并在附录 B 中以示例形式详细阐述了分析的流程，有专业背景的标准使用者可以自行按规则与公式编制软件。对于数据分析能力较弱的使用者，研制单位已经上线数据分析软件，网址为

<http://mnp.molecularbreeding.cn/>，用户只用上传待测样品和对照样品的高通量测序数据，即可获得数据分析结果和品种鉴定结论，因此，不影响标准使用。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

（一）主要试验或验证的分析、综述报告

本标准草案验证单位共 5 家，分别为云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所，上海市农业科学院，武汉市农科院蔬菜研究所，中国农业科学院油料作物研究所，江苏徐淮地区徐州农业科学研究所，标准验证所用实验材料均为叶片，由巴彦淖尔市农牧业科学研究所提供。

验证结果包括（每家单位获得其中数项验证结果）：

（1）利用该标准草案，一次多重 PCR 扩增了第一批标准规定每个品种需要检测的所有 552 个标记位点，一次高通量测序检测 522-540 个标记位点；

（2）获得的样品测序数据全部通过了标准草案规定的质量控制标准，通过率均为 100%；

（3）标记检出率为 95.1%-97.80%；

（4）标记分型重现率为 99.81%-99.77%；

（5）品种的和实质性派生品种判定结论重现率均为 100%。

5 家单位验证结论包括：该标准草案具备适用性；依据该标准草案规定的 DNA 提取方法、PCR 扩增反应条件、扩增片段检测方法等，可在不同实验室间得出高度一致的品种和实质性派生品种鉴定结论。

本标准核心指标是标记分型准确率。通过 5 家验证单位，直接验证了标记分型重现率大于 99.81%，间接说明标记分型准确率极高。这里从概率推断的角度再次验证本标准的分型准确性。

（二）技术经济论证

本标准采用 MNP 标记法，经过多位院士和专家鉴定评价，认为该技术填补了国内外实用精准高效植物品种 DNA 鉴定技术空白，整体达到国际领先水平。相比于其它品种鉴定行业标准一次只能扩增一个或少量几个标记，本标准采用超多重扩增，522 个标记仅需要 2 次 PCR 扩增和纯化程序即可，工作效率提升数百倍；传统方法需要逐个检测和分析，本标准采用高通量测序技术和计算机软件分析技术，单次可自动检测和分析数百个以上的品种和十万个以上的标记，检测和分析

的效率，自动化水平高；每个标记位点的测序数据量平均覆盖达到 500 条序列以上，每条序列精确到单个碱基，检测结果准确率达 99.96%以上，首次突破了品种鉴定精准数字化的技术难题，不再需要统一实验条件，不再要求实验技术人员具有丰富的经验，也不要求标准样品实物或参照样品实物进行平行实验，有利于检测结果的数字化、网络化和智能化，有利于本标准在种业行业的推广应用。

此外，本标准实施只要求实验区域分区、过程单向流动、设备器具专用且保持通风，这些要求在普通实验室可以满足，提高了本标准实施可行性，可以在更多实验室更方便地实施。

（三）三预期的经济效益、社会效益和生态效益

本标准发布实施后，可以规范对向日葵品种和实质性派生品种鉴定所进行的测试，为向日葵新品种权保护提供有效的依据，支撑我国新种子法中实质性派生品种制度的实施。本标准制定不但可以对我国拥有自主知识产权的向日葵新品种进行保护，还可对国外向日葵品种的引进和利用进行规范管理，促进向日葵新品种贸易，促进我国向日葵育种和向日葵品种知识产权保护工作的发展。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

国际、国外尚未有系统、高效、准确的向日葵实质性派生品种分子标记鉴定技术体系的报道。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

未以国际标准为基础起草。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

《植物品种鉴定 MNP 标记法》标准（GB/T38551-2020）规定了依据 MNP 标记法鉴定其他作物品种的实验流程，但缺乏向日葵品种及其实质性派生品种判定阈值。因此，本标准与 GB / T38551 比较，最大核心指标的变化是增加了向日葵品种及其实质性派生品种判定阈值。本标准编制过程中，与现行法律、法规和强制性标准不发生冲突，符合我国有关法律、法规和经济发展、科学技术发展的方针、政策的要求。目前国内暂无与本文件内容相关的强制性标准。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

该标准在编制过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件所采用的 522 个 MNP 标记位点与标准编制单位巴彦淖尔市农牧业科学研究所的发明专利“一种鉴定向日葵品种引物组，试剂盒及其应用（申请号 22024103245216）”中部分相同，标准编制单位承诺标准的使用不受专利限制。

九、实施行业标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本文件作为我国品种鉴定标准，为品种鉴定和实质性派生品种鉴定提供了技术指导，建议作为推荐性标准发布。实质性派生品种制度是一个全新制度，MNP 标记法也是一个相对较新的标记方法，建议对其它有意愿开展实质性派生品种鉴定的机构检测人员进行理论和实操的培训，以更好地实施和应用标准。

十、其他应予说明的事项

无。

参 考 文 献

Enrico Noli, Maria Soccora Teriaca, Sergio Conti, and K. Gill, 2013, Criteria for the Definition of Similarity Thresholds for Identifying Essentially Derived Varieties, *Plant Breeding*, 132, 525-31.