农业农村行业标准《香菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP标记法》（征求意见稿）编制说明

一、工作简况

**（一）任务来源**

为改变我国植物品种同质化较为严重的现象，提升我国品种原始创新动力，2018年，农业农村部提出探索实施实质性派生品种制度。2021年12月24日，中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第三十二次会议通过《全国人民代表大会常务委员会关于修改＜中华人民共和国种子法＞的决定》，自2022年3月1日起施行。新修改《种子法》建立了实质性派生品种制度，规定实质性派生品种制度的实施步骤和办法由国务院规定。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。

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)，《香菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP标记法》行业标准制定（项目编号NYB-23154），由上海市农业科学院、江汉大学承担行业标准的制定工作。

**（二）制定背景**

香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 隶属于担子菌门Basidiomycota、蘑菇纲 Agaricomycetes、蘑菇目Agaricales、类脐菇科Omphalotaceae，是我国广泛栽培的食用菌之一。香菇富含氨基酸、矿质元素和香菇多糖等对人体有益的成分，具有抗病毒、抗肿瘤和调节免疫系统等功能，长期以来深受消费者喜爱。

2016年，香菇列入第十批农业植物新品种保护名录。截止2024年5月18日，现有香菇品种权申请108个，其中已授权品种为27个，因特异性或一致性不合格导致实审驳回的有2个，视为撤回申请的品种有2个，主动撤回申请的有1个，处于DUS测试中的共有42个。从申请主体来看，14家申请企业中，山东七河生物科技有限公司申请数最多，为21件；12家科研单位中，上海市农业科学院申请最多，为31件；2所国内高校中，福建农林大学申请最多，为8件。

由于香菇具有无性繁殖的特性，且具有优良性状的栽培品种遗传背景狭窄，所以育种工作者在育种时可利用的亲本材料有限，导致香菇新品种在外观、品质和抗性等方面趋于同质化。优良品种的培育是一个系统工程，需耗费大量的人力、物力去选育和纯化。因此，目前大多数育种家多选用简单易行的育种方式。如通过杂交、多孢自交、系统选育等，大量品种共用一个亲本，同质化现象越来越严重。目前，在香菇DUS测试过程中，部分申请品种与近似品种的表型差异不明显，缺乏特异性。原因是使用同一类型的材料作为亲本，遗传多样性不高，品种间差异小，表型上很难区分。同时随着品种数量增加，同物异名和同名异物的现象时有发生，给市场监管和维权打假带来挑战，因此急需建立快速、准确鉴定不同香菇品种的检测方法，为品种管理服务。

为了加大市场监管力度，规范种业市场秩序，《种子法》规定：“农业、林业主管部门可以采用国家规定的快速检测方法对生产经营的种子品种进行检测，检测结果可以作为行政处罚依据”。DNA分子标记技术在品种快速鉴定方面具有独特的优势，已被世界各国应用于品种鉴定中。我国颁布了玉米、水稻、小麦和大豆等30余种农业植物DNA指纹鉴定标准，为种子市场执法和DUS测试近似品种筛选提供技术支持。因此，制定《香菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP标记法》标准以满足香菇育种、DUS测试与品种保护、市场监管、品种纠纷仲裁快速鉴定以及国际合作交流的需求。

**（三）起草过程**

**1.起草阶段**

1.1 起草单位

本文件由上海市农业科学院、江汉大学和农业农村部植物新品种测试（上海）分中心起草。

1.2前期准备

本标准研制过程中使用的508对MNP引物是利用香菇品种的高通量测序数据开发，同时建立了基于超多重PCR、高通量测序和大数据处理技术的香菇品种及其实质性派生品种DNA鉴定技术体系。本实验收集的材料由上海市农业科学院提供，共计161份（如表1所示）。在品种类型上，这161份材料包括25份国认香菇品种、38份省级认定香菇品种、84份DUS测试送检菌株、14份育种材料；在不同地域来源上，有福建省、浙江省、江苏省、广东省等不同地域选育的品种，以及地方代表品种。

表1 161份材料的基本信息

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 品种名称 | 来源 | 区域 | 编号 | 品种名称 | 来源 | 区域 |
| 1 | L808 | 国审品种 | 浙江 | 82 | XGU230825085 | DUS | 日本 |
| 2 | L135 | 国审品种 | 浙江 | 83 | XGU230825086 | DUS | 日本 |
| 3 | 庆元9015 | 国审品种 | 浙江 | 84 | XGU230825087 | DUS | 日本 |
| 4 | 香菇241-4 | 国审品种 | 浙江 | 85 | XGU230825089 | DUS | 日本 |
| 5 | 武香1号 | 国审品种 | 浙江 | 86 | XGU230825090 | DUS | 日本 |
| 6 | 菌兴8号 | 国审品种 | 浙江 | 87 | XGU220714003 | DUS | 山东 |
| 7 | L9319 | 国审品种 | 浙江 | 88 | XGU220714004 | DUS | 山东 |
| 8 | 沪农1号 | 国审品种 | 上海 | 89 | XGU220714010 | DUS | 山东 |
| 9 | 申香8号 | 国审品种 | 上海 | 90 | XGU220714011 | DUS | 山东 |
| 10 | 申香10号 | 国审品种 | 上海 | 91 | XGU220714022 | DUS | 山东 |
| 11 | 申香12号 | 国审品种 | 上海 | 92 | XGU220714023 | DUS | 山东 |
| 12 | 森源10号 | 国审品种 | 湖北 | 93 | XGU220714024 | DUS | 山东 |
| 13 | 森源8404 | 国审品种 | 湖北 | 94 | XGU220714025 | DUS | 山东 |
| 14 | 华香8号 | 国审品种 | 湖北 | 95 | XGU220714026 | DUS | 山东 |
| 15 | 华香5号 | 国审品种 | 湖北 | 96 | XGU220714027 | DUS | 山东 |
| 16 | L952 | 国审品种 | 湖北 | 97 | XGU220714033 | DUS | 山东 |
| 17 | Cr-02 | 国审品种 | 福建 | 98 | XGU220714054 | DUS | 山东 |
| 18 | 闽丰一号 | 国审品种 | 福建 | 99 | XGU220714055 | DUS | 山东 |
| 19 | Cr-62 | 国审品种 | 福建 | 100 | XGU220714056 | DUS | 山东 |
| 20 | Cr-04 | 国审品种 | 福建 | 101 | XGU220714057 | DUS | 山东 |
| 21 | 香九 | 国审品种 | 广东 | 102 | XGU220714058 | DUS | 山东 |
| 22 | 香杂26号 | 国审品种 | 广东 | 103 | XGU230825075 | DUS | 山东 |
| 23 | 广香51号 | 国审品种 | 广东 | 104 | XGU220714030 | DUS | 上海 |
| 24 | 赣香1号 | 国审品种 | 江西 | 105 | XGU220714044 | DUS | 上海 |
| 25 | 金地香菇 | 国审品种 | 四川 | 106 | XGU220714045 | DUS | 上海 |
| 26 | 沪香922 | 省级认定 | 上海 | 107 | XGU220714046 | DUS | 上海 |
| 27 | 沪香F2 | 省级认定 | 上海 | 108 | XGU220714047 | DUS | 上海 |
| 28 | 申香1501 | 省级认定 | 上海 | 109 | XGU230825047 | DUS | 上海 |
| 29 | 申香1504 | 省级认定 | 上海 | 110 | XGU230825068 | DUS | 上海 |
| 30 | 申香1513 | 省级认定 | 上海 | 111 | XGU230825069 | DUS | 上海 |
| 31 | 申香1644 | 省级认定 | 上海 | 112 | XGU230825070 | DUS | 上海 |
| 32 | 申香16号 | 省级认定 | 上海 | 113 | XGU230825088 | DUS | 上海 |
| 33 | 申香1709 | 省级认定 | 上海 | 114 | XGU230825054 | DUS | 湖北 |
| 34 | 申香1726 | 省级认定 | 上海 | 115 | XGU230825055 | DUS | 湖北 |
| 35 | 申香1828 | 省级认定 | 上海 | 116 | XGU230825056 | DUS | 湖北 |
| 36 | 申香1845 | 省级认定 | 上海 | 117 | XGU230825057 | DUS | 湖北 |
| 37 | 申香18号 | 省级认定 | 上海 | 118 | XGU230825058 | DUS | 湖北 |
| 38 | 申香215 | 省级认定 | 上海 | 119 | XGU230825059 | DUS | 湖北 |
| 39 | 申香34 | 省级认定 | 上海 | 120 | XGU230825060 | DUS | 湖北 |
| 40 | 申香60 | 省级认定 | 上海 | 121 | XGU230825061 | DUS | 湖北 |
| 41 | 香茸一号 | 省级认定 | 上海 | 122 | XGU220714050 | DUS | 浙江 |
| 42 | 1363 | 省级认定 | 辽宁 | 123 | XGU230825066 | DUS | 浙江 |
| 43 | 0912 | 省级认定 | 辽宁 | 124 | XGU230825067 | DUS | 浙江 |
| 44 | Q1 | 省级认定 | 辽宁 | 125 | XGU230825071 | DUS | 浙江 |
| 45 | 抚香3号 | 省级认定 | 辽宁 | 126 | XGU230825072 | DUS | 浙江 |
| 46 | 盖香 | 省级认定 | 辽宁 | 127 | XGU230825073 | DUS | 浙江 |
| 47 | 辽抚4号 | 省级认定 | 辽宁 | 128 | XGU230825074 | DUS | 浙江 |
| 48 | 辽宁XY1 | 省级认定 | 辽宁 | 129 | XGU220714001 | DUS | 河南 |
| 49 | 18 | 省级认定 | 河北 | 130 | XGU220714002 | DUS | 河南 |
| 50 | 国煦T2 | 省级认定 | 河北 | 131 | XGU220714020 | DUS | 河南 |
| 51 | 冀香E15 | 省级认定 | 河北 | 132 | XGU230825077 | DUS | 河南 |
| 52 | 冀香E16 | 省级认定 | 河北 | 133 | XGU230825078 | DUS | 河南 |
| 53 | L26 | 省级认定 | 湖北 | 134 | XGU230825079 | DUS | 河南 |
| 54 | 久香秋7 | 省级认定 | 湖北 | 135 | XGU230825080 | DUS | 河南 |
| 55 | 香L607 | 省级认定 | 湖北 | 136 | XGU220714008 | DUS | 福建 |
| 56 | 川香DT1 | 省级认定 | 四川 | 137 | XGU220714018 | DUS | 福建 |
| 57 | 川香DT2 | 省级认定 | 四川 | 138 | XGU220714019 | DUS | 福建 |
| 58 | 丽香2号 | 省级认定 | 浙江 | 139 | XGU220714021 | DUS | 福建 |
| 59 | 浙香6号 | 省级认定 | 浙江 | 140 | XGU220714049 | DUS | 福建 |
| 60 | 浓香2号 | 省级认定 | 福建 | 141 | XGU230825062 | DUS | 河北 |
| 61 | XGU220714005 | DUS | 日本 | 142 | XGU230825063 | DUS | 河北 |
| 62 | XGU220714006 | DUS | 日本 | 143 | XGU230825064 | DUS | 北京 |
| 63 | XGU220714007 | DUS | 日本 | 144 | XGU230825065 | DUS | 北京 |
| 64 | XGU220714012 | DUS | 日本 | 145 | XGU230825076 | DUS | 广西 |
| 65 | XGU220714013 | DUS | 日本 | 146 | XGU220714051 | DUS | 辽宁 |
| 66 | XGU220714014 | DUS | 日本 | 147 | XGU220714009 | 野生 | 吉林 |
| 67 | XGU220714015 | DUS | 日本 | 148 | XGU220714053 | 野生 | 吉林 |
| 68 | XGU220714016 | DUS | 日本 | 149 | XGU220714059 | 野生 | 云南 |
| 69 | XGU220714017 | DUS | 日本 | 150 | XGU220714065 | 野生 | 云南 |
| 70 | XGU220714028 | DUS | 日本 | 151 | XGU220714066 | 野生 | 云南 |
| 71 | XGU220714029 | DUS | 日本 | 152 | XGU220714067 | 野生 | 云南 |
| 72 | XGU230825048 | DUS | 日本 | 153 | XGU220714032 | 野生 | 云南 |
| 73 | XGU230825049 | DUS | 日本 | 154 | XGU220714031 | 野生 | 日本 |
| 74 | XGU230825050 | DUS | 日本 | 155 | XGU220714038 | 育种材料 | 上海 |
| 75 | XGU230825051 | DUS | 日本 | 156 | XGU230825091 | 育种材料 | 上海 |
| 76 | XGU230825052 | DUS | 日本 | 157 | XGU230825092 | 育种材料 | 上海 |
| 77 | XGU230825053 | DUS | 日本 | 158 | XGU230825093 | 育种材料 | 上海 |
| 78 | XGU230825081 | DUS | 日本 | 159 | XGU230825094 | 育种材料 | 上海 |
| 79 | XGU230825082 | DUS | 日本 | 160 | XGU230825013 | 育种材料 | 湖北 |
| 80 | XGU230825083 | DUS | 日本 | 161 | XGU230825026 | 育种材料 | 日本 |
| 81 | XGU230825084 | DUS | 日本 |  |  |  |  |

1.3技术确定

2019年1月至6月，为设计MNP标记引物，选择了遗传背景上具有差异的19个香菇栽培品种和10个野生菌株，对每个菌株均进行基因组重测序，测序深度设置为50倍。通过与香菇参考基因组进行比对（基因组版本：GCA\_001562095.1\_B17\_genomic.fna.gz），筛选出SNP位点。根据扩增区多态性高、引物区保守、扩增区单拷贝、扩增长度不超过250bp、扩增区包含2个及以上的不连续的SNP标记、引物退火温度保持一致、分布均匀、标记序列和引物序列之间相互不干扰等标记筛选与引物设计原则，共筛选得到596个MNP标记位点，并设计引物。引物合成后，利用该29份香菇菌株进行实测，根据实测数据分析所设计引物和标记位点的检出率、非特异性扩增、标记分型重现性等指标，放弃检出率低、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，最终获得508对引物，其序列见标准中附录A。

1.4技术验证

2023年10月委托云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所、巴彦淖尔市农牧业科学研究所、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和江苏徐淮地区徐州农业科学研究所5家单位，对标准的可操作性和检测数据的可重现性进行了验证。5家单位分别对5个品种的506个MNP位点进行了技术验证。经验证，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鉴定和实质性派生品种鉴定结论。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

**（一）标准编制原则**

**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 6682分析实验室用水规格和试验方法和GB/T38551-2020植物品种鉴定 MNP 标记法。

**适用性原则：**本标准适用于香菇品种真实性鉴定及香菇品种（不含杂交种）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。

**统一性原则：**本规程与现行相关标准协调统一，不发生冲突；保持实质性派生品种鉴定与品种真实性鉴定的统一性。

**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MNP标记法，经过多位专家鉴定评价，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508个香菇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倍数为3392倍，所筛选的508个标记都能被检出，其中平均每个样品可以检出482个（94.92%）MNP标记，检出率达90%以上的样品占比89.3%；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。

**（二）主要内容及其确定依据**

**1．标准编制的主要参考资料：**

中华人民共和国主席令（2021年第105号） 中华人民共和国种子法

GB/T 38551 植物品种鉴定 MNP标记法

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

**2.香菇MNP标记验证**

利用合成的508个香菇MNP标记引物，对收集的161份香菇菌株进行了多重扩增、二代高通量测序与数据分析，每个样品的测序平均覆盖倍数达3392倍。对样品的MNP-Seq数据进行分析，所筛选的508个标记都能被检出，其中平均每个样品可以检出482个（94.92%）MNP标记，检出率达90%以上的样品占比89.3%（图1. MNP标记检出率分布图）。

图1 161个样品中香菇MNP标记的检出率分布图（注：横坐标为菌株）

**3.关于本标准中的标记数量**

《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，是希望通过更多的标记数量，提升品种鉴定准确性。

编号为XGU220714001的待测品种与编号为XGU220714045的对照品种间的遗传相似系数检测结果为97.45%，假定以90%为实质性派生品种的判定阈值，判定结论应为“待测品种与对照品种疑似存在实质性派生关系”。假设标准采用的标记数量为个，那么，仅当从基因组上抽取的 个标记位点中，有大于或等于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。

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）实质性派生品种的遗传相似系数判定阈值为90%；（2）待测品种与对照品种的遗传相似系数为97.45%

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。本标准采用的标记数量个，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100.00%。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。

下面举例定量说明标记数量与标记抽样误差对品种鉴定结论准确性的影响。样品XGU220714011与对照样品XGU230825032的遗传相似系数为98.21%，假定品种真实性鉴定阈值为96%，由于该遗传相似度介于96%和99%之间，品种鉴定的判定结论为“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）品种鉴定判定阈值为96%；（2）待测品种与对照品种的遗传相似系数为98.21%。

从图3可以看出，由于品种鉴定判定阈值与品种间遗传相似系数较为接近，只有当标准中使用的标记数量达到300个及以上时，在本实例中品种鉴定的判定结论才接近100%。按本标准中采用的508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为99.91%。需要特别说明的是，图3只针对本实例实用，随着品种鉴定判定阈值的不同，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。

**4. 高通量测序平均覆盖倍数和测序数据量质量控制**

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161个香菇样品，它们的测序覆盖倍数均设置为700倍以上，其中共有156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96.89%（图4）。

图4 香菇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508个位点，每个位点按300 bp计算，700倍的测序覆盖倍数需要0.099 G的测序数据量；每个品种按重复检测2次计算，总共需要0.198 G的测序数据量；每个G的商业测序费用按150元计算，每个品种高通量测序检测需要费用共计29.7元，是可以接受的。

**5. 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2。我们按508个位点中最大缺失率5%计算，缺失位点数目为25.4个；缺失位点中，差异位点分布服从实验次数为25.4且发生频率为（1-真实的遗传相似度）的二项分布；以真实的遗传相似度80%为例，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8个，观察到的遗传相似度介于79.36%和80.61%之间；最终推断出遗传相似度的最大偏差为0.80%，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2 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（nij） | 缺失率 | 检出位点数（Nij） | 缺失位点数 |
|  |
| 508 | 80% | 101.6 | 5% | 482.6 | 25.4 |  |
| 缺失位点中的差异位点 | | | 观察到的差异位点数（nij） | |  |  |
| 概率保障 | 最小值 | 最大值 | 最大值 | 最小值 |  |  |
| 95% | 2 | 8 | 93.6 | 99.6 |  |  |
| 观察到的遗传相似度（GS） | | 遗传相似度（GS）偏差 | |  |  |  |
| 最大值 | 最小值 | 最小值 | 最大值 |  |  |  |
| 80.61% | 79.36% | 0.76% | 0.80% |  |  |  |

**6. 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，不能穷尽现有全部香菇品种或者未来可能出现的香菇品种。可能存在与标准开发过程中使用的香菇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3。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350个；当R2值为95%时，那么，非共同检出位点数量为17.5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最大值为80.71%，遗传相似度（GS）偏差为0.89%。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3 位点检出稳定性对鉴定结论稳定性的影响

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 可检测位点总数 | 真实的遗传相似度（GS） | 真实差异位点数（nij） | R2的值 | 共同检出位点数（Nij） | 非共同检出位点数 |
|  |
| 350 | 80% | 70 | 95% | 332.5 | 17.5 |  |
| 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 | 79.29% | 80.71% | 0.89% |  |

**7. 关于MNP标记分型准确性和重现性**

（1）MNP标记分型准确性高

为了检验开发的香菇MNP标记位点及检测方法的准确性，对7个样品，进行了重现性实验，每份品种的同一份DNA分别构建了2次文库，编号-11、-12；2个文库不同时间测序两次。统计不同批次文库第一次和第二次测序的位点差异数目，统计结果见表4：香菇MNP标记法准确性分析结果。同一样品的不同文库间检出相同的MNP标记基因型是可重现的，按照重现性计算公式r=n/N，n:可重复的基因型对数，N：比较的基因型总对数。依据2次实验间可重现的基因型认为是准确的原则，准确性=1-(1-r)/2=0.5+0.5r。本项目重现性试验中所有样品N=3447，n=3443，r=99.88%，准确率为99.94%。结果说明开发的MNP标记位点以及检测方法准确性高。

表4 香菇MNP标记法准确性分析结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **样品接收编号** | **文库** | | **共同位点数** | **差异位点数** | **相同位点数** | **重现性** | **准确性** |
| **重复1** | **重复2** |
| A7 | XGU220714003-11 | XGU220714003-12 | 502 | 0 | 502 | 100.00% | 100.00% |
| A11 | XGU220714007-11 | XGU220714007-12 | 494 | 1 | 493 | 99.80% | 99.90% |
| A15 | XGU220714008-11 | XGU220714008-12 | 462 | 1 | 461 | 99.78% | 99.89% |
| A9 | XGU220714005-11 | XGU220714005-12 | 492 | 2 | 490 | 99.59% | 99.80% |
| A4 | XGU220714001-11 | XGU220714001-12 | 505 | 0 | 505 | 100.00% | 100.00% |
| A8 | XGU220714004-11 | XGU220714004-12 | 497 | 0 | 497 | 100.00% | 100.00% |
| A10 | XGU220714006-11 | XGU220714006-12 | 495 | 0 | 495 | 100.00% | 100.00% |
| 平均 |  |  | 492.43 | 0.57 | 491.86 | 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508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508×（1-99.94%）=0.3个，其对遗传相似系数的影响为0.059%，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2×508×（1-99.88%）=1.22个，其对遗传相似系数的影响为0.12%，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，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。

**8.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。我们利用161个香菇菌株，检测了508个MNP标记的等位基因型数量，结果表明，在161个香菇菌株中，MNP标记的等位基因型的平均值为8.62个。对508个MNP标记的PIC检测结果表明，所有标记在161个香菇菌株中标记的PIC值变化范围为0.013-0.842，平均值为0.54。结果显示MNP标记具有丰富的多态性，PIC值分布情况如图5所示。

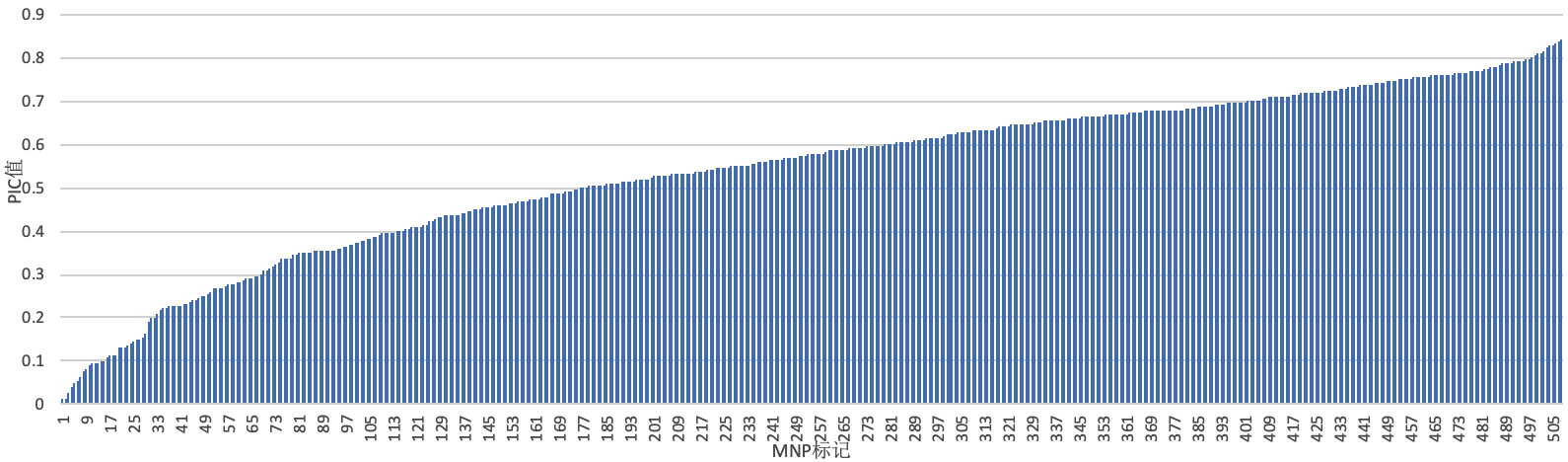
****

图5 MNP标记的PIC值分布

**9. 香菇MNP标记品种区分能力**

DNA标记最终目的是用于品种区分，其一是要求DNA标记多态性高，二是实质性派生品种鉴定中要求DNA标记数量多。本标准使用了508个标记位点，数量远大于传统分子标记，可以更好地用于实质性派生品种鉴定。

对161份香菇样品进行两两比较，分析样品间MNP标记位点的差异，共得到12880对比较结果，12880对样品的遗传距离的差异位于0%-100%之间，任意样品间平均MNP标记差异位点为307.35个，平均差异达67.47%（图6），其中48对样品MNP标记差异比例为0，占比0.373%。共有12,635（占比98.10%）对样品间遗传相似系数低于96%；共有245对样品的遗传相似系数高于96%，占比为1.90%，表明开发的香菇MNP标记多态性高、菌株区分力强（图6）。

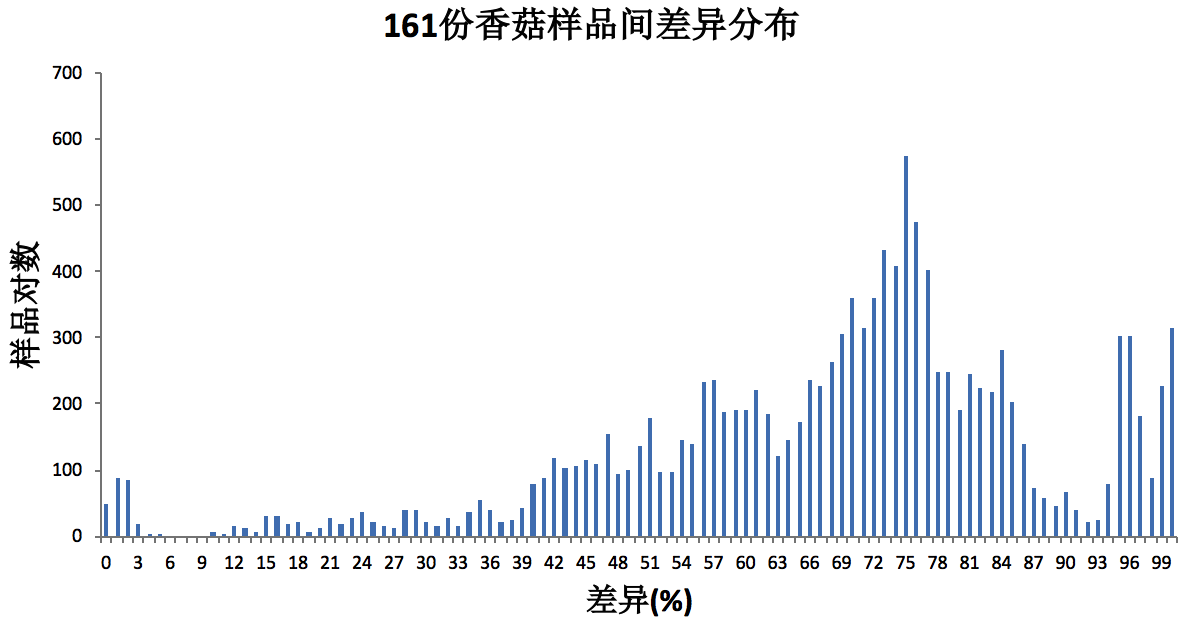


图6 161份香菇样品间差异分布

利用MNP标记对供试161份香菇菌株进行UPGMA系统聚类，结果表明所有菌株依据亲缘关系可被归为不同的亚群，大部分菌株的遗传背景具有特异性，少量菌株之间的遗传背景差异较小（图7）。

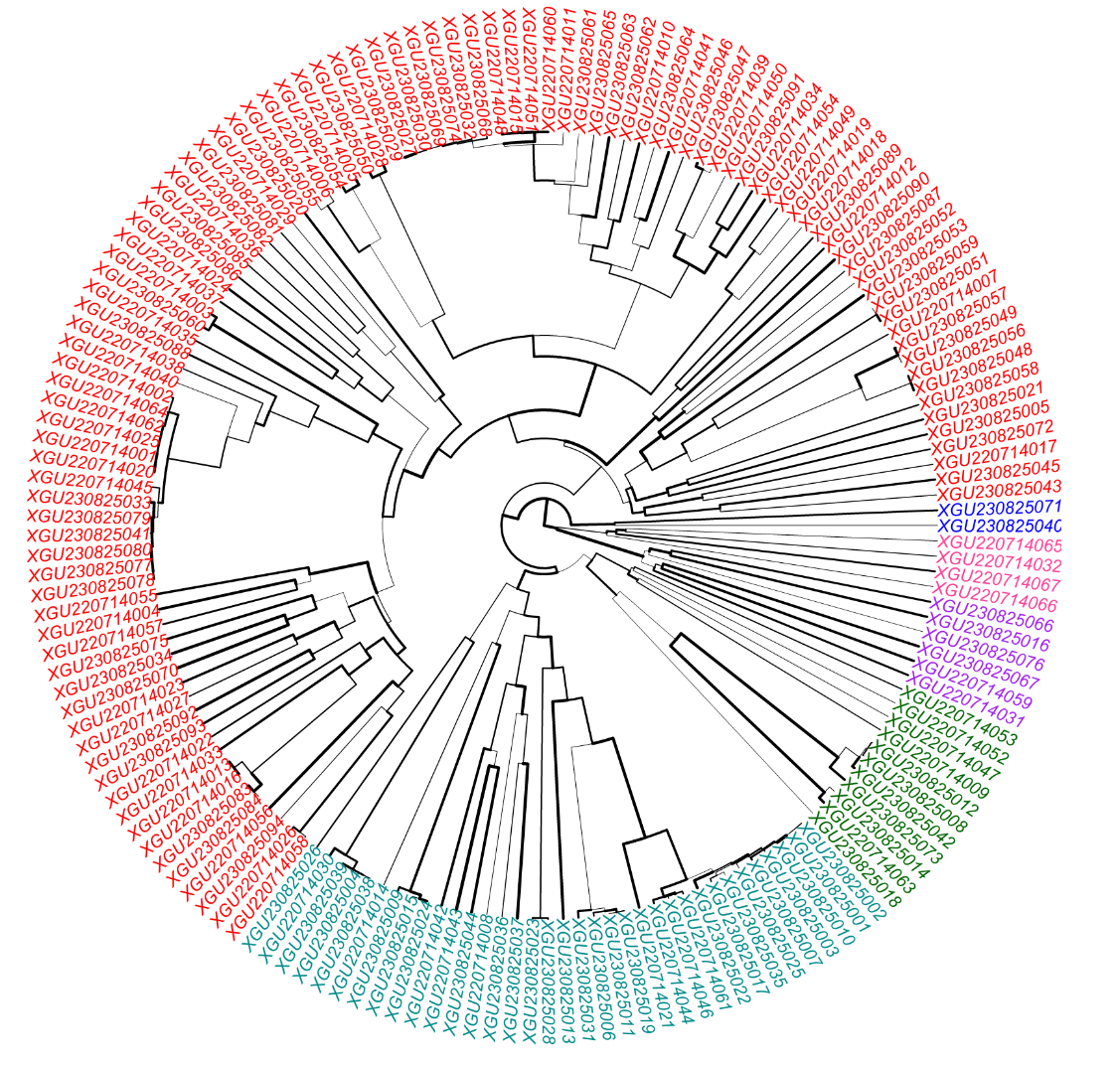


图7 161份香菇菌株的UPGMA系统聚类图

**10.关于香菇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95%的品种判定为“待测品种与对照品种疑似存在实质性派生关系”，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，香菇实质性派生品种的判定阈值应该介于71%到95%之间**

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。一种是“校对规则”（calibration principle），第二种是“尾巴规则”（tail principle），第三种是“血缘原则”（pedigree principle）。“尾巴规则”是利用非实质性派生品种间的距离分布的百分位数作为实质性派生品种的判定总阈值，该方法实际上是将实质性派生品种的问题转化为了非实质性派生品种的问题，而目前并没有客观的办法来确定文献中要求的距离适中的非实质性派生品种，因此，利用该方法确定实质性派生品种判定阈值依旧具有较强的个人主观性。“血缘原则”要求事先确定一个实质性派生品种判定的血缘阈值，再根据血缘阈值判定实质性派生品种，该方法实质上是将确定实质性派生品种判定阈值在概念上转化为了确定血缘阈值，而确定血缘阈值依旧是主观的，客观上同样没有良好的可操作性。另外，“血缘原则”没有考虑亲本间遗传距离这一重要因素，也显然是不合理的。

“校对规则”要求实质性派生品种判定阈值将实质性派生育种行为和非实质性派生育种行为产生的品种分别判定为实质性派生品种和非实质性派生品种，而实质性派生品种育种行为和非实质性派生品种育种行为在UPOV中已有较明确的描述，是一种客观的，可以操作的方法。例如，Vosman等于2004年首先利用AFLP技术探讨了玫瑰品种的实质性派生品种判定阈值。在Vosman的实验中，检测了83对玫瑰品种，其中包括独立品种（非实质性派生品种）和突变品种（实质性派生品种），结果表明，独立品种和它们的突变体（实质性派生品种）间的遗传相似系数大于96%，而独立品种间（非实质性派生品种间）的遗传相似系数小于80%。因此，在该实例中，实质性派生品种的判定阈值可以在80%-96%之间选择，具体值需要综合考虑该国育种现状、行业共识、创新要求等因素。

由于采用“校对规则”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。利用校对规则，并结合二项式分布统计理论分析和供试香菇菌株间遗传相似度的结果，推断香菇实质性派生品种的判定阈值应设置在71%到95%之间，以实现在99%的概率保障下，将容易产生实质性派生品种的育种行为（组织分离等）的育成品种判定为实质性派生品种，同时将不容易产生实质性派生品种的育种行为（正常杂交选育）的育成品种判定为非实质性派生品种。

**a）按照“校对规则”，实质性派生品种判定阈值的下限为71%**

UPOV认为，正常杂交选育为非实质性派生品种育种行为。根据UPOV在2021年11月19日发布的文件《EXPLANATORY NOTES ON ESSENTIALLY DERIVED VARIETIES UNDER THE 1991 ACT OF THE UPOV CONVENTION》（UPOV/EXN/EDV/3 Draft 3），正常杂交选育指表型和遗传上均不相同的两个亲本杂交后，以创造分离群体为选择目的育种行为。该定义有两个要点，一是亲本间要有一定的遗传距离，不能选用遗传上近似的品种进行杂交，二是选育时要以创新分离群体为目的，不能有意选择与亲本相似的后代。由于正常杂交选育为非实质性派生品种育种行为，因此，可以根据校对规则，获得香菇实质性派生品种判定阈值的下限。

**实质性派生品种判定阈值下限的理论推断。**利用本标准检测了161个供试香菇菌株，任意两个菌株间的平均遗传差异为67.47%，那么，在本标准检测的508个标记位点中，它们之间有个差异标记位点；设实质性派生品种的遗传相似系数判定阈值为，那么，当两个菌株间的差异位点数量小于，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，香菇品种杂交后代为非实质性派生品种的平均概率；根据上述公式，计算了实质性派生品种发生概率与其判定阈值间对应的关系，其结果见表5；从表5可以看出，中国香菇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71%，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。

表5 供试香菇菌株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 | 供试香菇品种间的平均差异 | 实质性派生品种的遗传相似系数判定阈值（） | 非实质性派生品种发生概率（） |
| 508 | 67.47% | 100% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 99% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 98% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 97% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 96% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 95% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 94% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 93% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 92% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 91% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 90% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 89% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 88% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 87% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 86% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 85% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 84% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 83% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 82% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 81% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 80% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 79% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 78% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 77% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 76% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 75% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 74% | 100.00% |
| 508 | 67.47% | 73% | 99.99% |
| 508 | 67.47% | 72% | 99.90% |
| 508 | 67.47% | 71% | 99.45% |
| 508 | 67.47% | 70% | 97.74% |
| 508 | 67.47% | 69% | 92.79% |
| 508 | 67.47% | 68% | 82.10% |
| 508 | 67.47% | 67% | 64.74% |
| 508 | 67.47% | 66% | 43.56% |
| 508 | 67.47% | 65% | 24.11% |
| 508 | 67.47% | 64% | 10.68% |
| 508 | 67.47% | 63% | 3.71% |

**实质性派生品种判定阈值下限的育种检验。**我们对育种实践中杂交产生的菌株进行了分析，选取了菌株A136和菌株A152作为亲本杂交产生了菌株A112和菌株A115。利用本标准检测获得菌株A136与菌株A152亲本之间的遗传相似系数为44.11%；杂交菌株A112与亲本A136、A152的遗传相似系数分别为57.02%、44.00%；杂交菌株A115与亲本A136、A152的遗传相似系数分别为58.54%、59.96%；杂交菌株A112和A115之间的遗传相似系数为55.14%。结果表明，杂交后代菌株与亲本之间以及杂交子代菌株之间的遗传相似度均低于60%。若香菇实质性派生品种判定阈值大于71%，可以在99%的概率保障下，将容易产生非实质性派生品种的育种行为（正常杂交选育）产生的后代判定为非实质性派生品种。

综上实质性派生品种判定阈值下限的统计推断和育种实例，的实质性派生品种判定阈值下限为71%。

**b) 按照“校对规则”，实质性派生品种判定阈值的上限为95%**

我们从菌株库中挑选了3对组织分离产生菌株，利用508个标记进行了分析。**实例一**，菌株A152为菌株A150通过组织分离获得，利用本标准检测获得A150与A152之间的遗传相似系数为100%。**实例二**，菌株A51为菌株A133通过组织分离获得，利用本标准检测获得两者的遗传相似系数为99.27%。**实例三**，菌株A132为菌株A149组织分离获得，利用本标准检测获得两者的遗传相似系数为99.12%。

我们利用508个MNP标记分析了8对经自交产生的菌株，菌株A108、A125、A128、20L23、香茸一号为菌株A136通过自交产生的菌株。菌株A109、A127、17L22为菌株A152自交产生的菌株。利用本标准检测获得菌株A136与菌株A108之间的遗传相似系数为78.18%。菌株A136与菌株A125之间的遗传相似系数为84.16%。菌株A136与菌株A128之间的遗传相似系数为87.73%。菌株A136与菌株20L23之间的遗传相似系数为82.80%。菌株A136与菌株香茸一号之间的遗传相似系数为80.00%。菌株A152与菌株A109之间的遗传相似系数为75.59%。菌株A152与菌株A127之间的遗传相似系数为84.92%。菌株A152与菌株17L22之间的遗传相似系数为76.00%。8个自交菌株与对应亲本的遗传相似度变化范围为75.59%-87.73%，平均值为81.17%。

1. **实质性派生品种判定阈值制定需要综合考虑科学、现实状况、未来需求等因素**

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，要求实质性派生品种判定阈值大于品种真实性中近似品种与不同品种间的判定阈值；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。基本一词为定性描述，从国际上EDV制度实施经验看，实质性派生品种判定的定量阈值可以根据种业现实情况和国家对种业未来创新需求进行调整，例如，若当前育种创新水平或对未来育种创新的期望较高，就可以制定相对严格的实质性派生品种判定阈值，反之亦然。因此，实质性派生品种判定阈值设置不是一个纯科学问题，需要综合考虑育种水平现状和满足未来对育种创新激励的需要，由品种管理者来权衡和考虑，同时也应得到行业的认可和支持。

1. **该判定阈值满足了实质性派生品种定义中的基本要求**

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，其为通过派生行为产生的新品种。因此，该定义对实质性派生品种判定阈值做出了三个方面的基本要求。

* 1. 实质性派生品种的判定阈值要小于植物新品种的判定阈值

在《植物品种鉴定 MNP标记法》国家标准（GB/T 38551-2020）中，植物新品种的判定阈值为96%，而本标准中实质性派生品种的判定阈值为95%，是满足本项要求的。

* 1. 阈值应该让大部分实质性派生行为产生的品种被判定为实质性派生品种

根据UPOV有关文件描述，回交育种、诱变育种、转基因育种、基因打靶育种等通过现代生物技术进行的快速品种改良行为容易产生实质性派生品种。本标准判定阈值为95%，相当于在508个标记位点中，有5%即25.4个位点存在差异，95%的判定阈值基本排除了由现有实质性派生行为产生的品种。

1. **该判定阈值考虑了种业创新与稳定的平衡**

我国当前品种同质化现象严重，亟需激励原始创新。实质性派生品种判定阈值越严格，激励种业原始创新的力度就越大，但较微小的创新又可能会被人为淘汰。因此，实质性派生品种判定阈值对种业创新是一把双刃剑，应在创新与稳定间寻求平衡。

利用本标准检测了161个供试的香菇菌株，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表6中所设定的实质性派生品种判定阈值，则判定菌株对授权日期更晚的菌株可能为实质性派生品种。从表6可以看出，当实质性派生品种判定阈值为95%时，有78个菌株可能为实质性派生品种，占比48.45%。

表6 现有菌株在各种判定阈值下，可能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 | 66 | 77 | 77 | 77 | 78 | 78 | 78 |
| 实质性派生品种比例 | 40.99% | 47.83% | 47.83% | 47.83% | 48.45% | 48.45% | 48.45% |
| 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 | 78 | 78 | 79 | 79 | 82 | 85 | 88 |
| 实质性派生品种比例 | 48.45% | 48.45% | 49.07% | 49.07% | 50.93% | 52.80% | 54.66% |
| 实质性派生品种阈值 | 85% | 84% | 83% | 82% | 81% | 80% | 79% |
| 实质性派生品种数量 | 89 | 89 | 90 | 92 | 93 | 94 | 96 |
| 实质性派生品种比例 | 55.28% | 55.28% | 55.90% | 57.14% | 57.76% | 58.39% | 59.63% |
| 实质性派生品种阈值 | 78% | 77% | 76% | 75% | 74% | 73% | 72% |
| 实质性派生品种数量 | 97 | 98 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 |
| 实质性派生品种比例 | 60.25% | 60.87% | 61.49% | 61.49% | 61.49% | 61.49% | 61.49% |
| 实质性派生品种阈值 | 71% | 70% | 69% | 68% | 67% | 66% | 65% |
| 实质性派生品种数量 | 99 | 99 | 103 | 106 | 108 | 108 | 110 |
| 实质性派生品种比例 | 61.49% | 61.49% | 63.98% | 65.84% | 67.08% | 67.08% | 68.32% |

1. 该判定阈值与国际实质性派生品种实践不矛盾

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。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。

**13.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95%时，结果表述为“待测品种疑似为对照品种的实质性派生品种”。采用“疑似”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，且分子与性状并非一一对应，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。

**14. 关于品种真实性的判定阈值**

《种子法》依据性状，将新品种定义为已知品种间至少有一个性状的差异的品种。然而，分子标记差异与性状差异大多不存在一一对应关系，只能在一定概率保障下具有对应关系。当分子标记差异较大时，至少有一个性状差异的概率也高，判定其为不同品种的概率保障也高；同理，当分子标记差异较小时，至少有一个性状差异的概率就低，可以有一定的概率保障判定它们为相同品种。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是检测标记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。

基于上述理由，制定判定疑同品种和不同品种的遗传相似度阈值具有一定的主观性。本标准中，将疑同品种与不同品种的遗传相似度阈值确定为97%，利用所确定的阈值，我们对组织分离的菌株进行相似性检测，将其均判定为了“疑同品种”，正确率100%。

**15. 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、巴彦淖尔市农牧业科学研究所、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和江苏徐淮地区徐州农业科学研究所；标准验证所用的实验材料均为母种菌丝体，由上海市农业科学院食用菌研究所提供。

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扩增了标准规定每个品种需要检测的506个标记位点，一次高通量测序检测506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98.62%-100%；

（4）标记分型重现率为99.78%-100%；

（5）品种鉴定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鉴定和实质性派生品种鉴定结论。

**（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，508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99.80%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）预期的经济效益、社会效益和生态效益**

本标准发布实施后，可以规范对香菇品种和实质性派生品种鉴定所进行的测试，为香菇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香菇新品种进行保护，还可对国外香菇品种的引进和利用进行规范管理，促进香菇新品种贸易，促进我国香菇育种和香菇品种知识产权保护工作的发展。

本标准规定样品准备、DNA提取、多重PCR扩增与文库构建、高通量测序在规定的区域或相互隔离的区域按单一方向进行操作且保持实验室洁净。不同区域的仪器设备应专用。本标准中多重扩增循环数不超过20个，扩增产物处于线性增长期，可以实现等位基因相对定量。利用定量结果，可以排除实验室的气溶胶污染和少量杂株的影响。因此，本标准对防止气溶胶污染的要求并不是十分严格，只要求实验分区、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。

本标准少量杂株的等位基因型可以根据其比例低的特点加以排除，因而，本标准对抽取样本实行混样检测，相对于单株检测更为便捷高效。

传统DNA标记方法一次扩增一个标记，而本标准采用超多重扩增，508个标记仅需要1次PCR扩增和纯化程序即可，工作效率提升数百倍；传统DNA标记方法需要逐个标记检测和分析，而本标准采用高通量测序和计算机软件，一次自动化检测和分析数千甚至上万个标记，工作效率和便捷性获得大幅提升。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国际、国外尚未有系统、高效、准确的香菇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

文本内容与现行法律、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、研讨和征求意见过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件编制过程中未识别出文件的内容涉及专利。

九、实施国家标准的要求，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。

目前新种子法颁布已两年，为尽快落实种子法中实质性派生品种制度，建议尽快实施该标准，为制度的实施提供充足的技术保障。

十、其他应予说明的事项

无。

参考文献

1. Enrico Noli, Maria Soccorsa Teriaca, Sergio Conti, and K. Gill, 2013, Criteria for the Definition of Similarity Thresholds for Identifying Essentially Derived Varieties, Plant Breeding, 132, 525-31.
2. Vosman, B., D. Visser, J. R. van der Voort, M. J. M. Smulders, and F.van Eeuwijk, 2004, The establishment of ‘essential derivation’ among rose varieties, using AFLP, Theor. Appl. Genet, 109, 1718—1725.
3. Ling, Y., Zhang, M., Ling, Z., Cao, B., Wu, X., Peng, H., Wang, Z., & Zhao, R. (2023). Evolutionary relationship and a novel method of efficient identification of Lentinula edodes cultivars in China. Mycosphere, 13(1), 56–85.