**《****梨品种及其实质性派生品种鉴定 MNP标记法》**

**农业行业标准编制说明**

一、工作简况

**（一）任务来源**

根据《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)，由江汉大学承担《梨品种及其实质性派生品种鉴定 MNP标记法》（项目编号NYB-23161）的制定工作。

1. **制定背景**

我国是梨的起源中心，拥有丰富的种质资源。地方梨品种和自主育成的新品种约占我国栽培总面积的 85% ，其中‘黄冠’、‘翠冠’、‘早酥’、‘玉露香’、‘红香酥’、‘翠玉’等经济性状优良的品种，显著促进了我国梨产业的发展。梨属是首个被列入我国植物新品种保护名录的果树属（种），自2016年起，梨新品种申请量显著上升，年平均申请量由个位数提升至40件以上，其中2023年申请量最多，达到42件；截止2023年底，梨新品种申请量合计约295件。

梨品种的选育周期长，如通过杂交育种培育出一个新品种，平均育种周期长达 22 年，且资金需求大。然而，梨品种行业面临诸多挑战，未经品种登记、品种权人许可私自繁育苗木，市场套牌、同名异物、同物异名等现象屡见不鲜。加之农业执法、市场监管手段落后、维权周期长、维权难度大等因素，造成侵权现象严重，如 2020 年发生了多起‘苏翠 1 号’‘丹霞红’等侵犯梨品种权的事件，阻碍了梨品种选育的积极性，严重制约梨种业的持续健康发展。

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，因此急需制定梨实质性派生品种鉴定技术标准，以规范梨市场秩序，保障创新性品种的知识产权，促进科研人员的创新动力，提升我国梨品种的原始创新能力。

**（三）起草过程**

**1.起草阶段**

1.1起草单位

本文件由江汉大学、农业农村部科技发展中心、武汉明了生物技术有限公司、福建省农业科学院作物研究所、上海市农业科学院、云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所、湖北省农业科学院经济作物研究所等7家单位起草。

表1 主要起草人信息及任务分工

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **姓名** | **工作单位** | **分工** |
| 1 | 李甜甜 | 江汉大学 | 制定标准技术研发方案、组织实施、起草标准文本 |
| 2 | 彭海 | 江汉大学 | 标准技术评估、起草标准文本 |
| 3 | 周俊飞 | 江汉大学 | 体系建立、品种检测 |
| 4 | 方治伟 | 江汉大学 | 引物筛选、数据分析与处理 |
| 5 | 张秀杰 | 农业农村部科技发展中心 | 标准技术评估、标准文本修改 |
| 6 | 董星光 | 中国农业科学院果树研究所 | 材料收集、标记评价 |
| 7 | 陈红 | 农业农村部科技发展中心 | 材料收集、标记评价 |
| 8 | 张凯淅 | 农业农村部科技发展中心 | 资料收集、标准文本修改 |
| 9 | 曹玉芬 | 中国农业科学院果树研究所 | 材料收集、标记评价 |
| 10 | 李论 | 江汉大学 | 数据分析 |
| 11 | 田路明 | 中国农业科学院果树研究所 | 材料收集 |
| 12 | 张静 | 武汉明了生物技术有限公司 | 实验室比对 |
| 13 | 陈启亮 | 湖北省农业科学院果树茶叶研究所 | 材料收集 |
| 14 | 涂俊凡 | 湖北省农业科学院果树茶叶研究所 | 材料收集 |
| 15 | 高利芬 | 江汉大学 | 品种检测 |
| 16 | 陈利红 | 江汉大学 | 实验室比对 |
| 17 | 肖华锋 | 江汉大学 | 实验室比对 |

1.2前期准备

2021年3月，江汉大学和农业农村部科技发展中心在江汉大学和农业农村部的项目资助下，利用梨品种的高通量测序数据，设计了558个梨MNP标记位点，建立了基于超多重PCR、高通量测序和大数据处理技术的梨实质性派生品种DNA鉴定技术体系。该技术体系和梨MNP标记数据为本标准的研制提供了技术支撑和大量数据基础，保障了标准制定的顺利完成。

1.3技术确定

2023年3月-2023年8月，成立了由江汉大学、农业农村部科技发展中心、武汉明了生物技术有限公司、中国农业科学院果树研究所、湖北省农业科学院果树茶叶研究所组成的起草小组，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。起草小组利用所开发的技术体系，开展了77个梨品种MNP标记分子鉴定，以及实验室比对和田间表型与分子数据相关性验证工作。确定了梨品种鉴定所采用的MNP标记位点、技术流程和判定阈值。

1.4技术验证

2023年8月委托石家庄博瑞迪生物技术有限公司、江苏徐淮地区徐州农业科学研究所、上海市农业科学院食用菌研究所、巴彦淖尔市农牧业科学研究所、中国农业科学院油料作物研究所、农业农村部植物新品种测试（昆明）分中心等6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。6家单位都采用了5个品种，对梨MNP标记进行了多重PCR扩增和二代高通量测序。经验证，《梨品种及其实质性派生品种鉴定 MNP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扩增了标准规定的所有标记位点，标记检出率均高于95%，分型准确性均大于99.65%，品种判定结论重现率为100%。

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《梨品种及其实质性派生品种鉴定 MNP标记法》：

规范性原则：本标准的制定要求符合法律法规，符合有关标准要求，包括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《农作物种子检验规程 扦样》、GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》、GB/T 38551 《植物品种鉴定 MNP标记法》。

适用性原则：本标准要求尽量适用于历史、当前和未来的梨品种鉴定，以及常规品种的实质性派生品种鉴定；要求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：本标准要求与现行相关标准协调统一，不发生冲突。本标准实质性派生品种鉴定指标与品种鉴定要求保持了统一性，有助于标准使用者理解。

先进性原则：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；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310个梨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99.80%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。

**（二）****标准主要内容及其确定依据**

**1. 梨MNP标记位点的筛选**

本标准中MNP标记是指在一段核苷酸序列中，由一个或多个核苷酸变异引起的序列多态性。除单核苷酸变为多核苷酸外，该定义的其它描述仿照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定量计算遗传相似度，需要采用较多的标记位点以便准确计算遗传相似度。通过高通量测序和生物信息学软件，实现了MNP标记位点的高通量开发，极大增强了标记开发效率，更加适合制定实质性派生品种鉴定标准。

我们采用了143份梨品种的基因组测序数据开发梨MNP标记，其中113份数据来源于NCBI，包含全世界收集的野生和栽培种全基因组重测序数据（NCBI数据下载号ref:PRJNA381668）；另外30份梨品种的基因组测序数据为编制单位采集，品种来源于中国农业科学院果树研究所和梨品种育种企业，包含新品种、日本砂梨、白梨、新疆梨、白梨、秋子梨、西洋梨等梨品种。 对这30份梨品种进行了简化基因组测序，且重测序深度设置为20倍，以保证获取较高质量的基因组测序数据。基于这143份基因组测序数据，采用Samtools（Version 1.2）和BCFtools（Version 1.2）获取梨全基因组上的SNP 位点；基于全部SNP位点，以125 bp为窗口大小，5 bp为步长在梨参考基因组（GCA\_000315295.1）上移动，筛选候选MNP标记，并对这些标记设计引物。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≥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梨中扩增；（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。

最终，共设计并合成了558对超多重扩增引物；实测了77个梨品种，根据实测数据分析结果，放弃了248个在检出率、非特异性扩增、标记分型重现性等指标上可能存在问题的引物和标记位点；最终保留310个梨MNP标记及其超多重扩增引物。

**2.关于标记数量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。

中国农业科学院果树研究所和梨品种育种企业提供的样品中，编号为“SL240730040”和编号为“SL240730078”的两个品种，品种间遗传相似系数检测结果为95.19%，由于其大于90%的判定阈值，因此，判定结论应为“待测品种与对照品种为疑似实质性派生品种”。假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$N×90\%$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$=\sum\_{i=N×90\%}^{N}C\_{N}^{i}(95.19\%)^{i}×(1−95.19\%)^{(N−i)}$。

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）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95.19%

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250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$N=310$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99.99%。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。中国农业科学院果树研究所和梨品种育种企业提供的样品中，编号为“SL240730068”和编号为“SL240730011”的两个品种，品种间遗传相似系数检测结果为98.71%，由于该遗传相似度大于96%，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98.11%。

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大于99%。按本标准中采用的310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99.98%。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。

**3. 关于样本抽样量**

梨品种通常采用嫁接繁殖的方式繁殖，单株间的遗传差异可忽略，因此样本的抽样量对鉴定结果影响不大。本标准具体规定了抽样样本数量宜大于30，主要理由如下：（1）统计学上，30个个体为大样本；（2）现有植物品种DNA鉴定标准抽样量大多为30个左右；（3）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；（4）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$\sum\_{i=30×20\%}^{30}C\_{i}^{30}(5\%)^{i}(1−5\%)^{(30−i)}=0.057\%$。

**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1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量质量控制**

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171个梨样品，它们的测序覆盖倍数均设置为700倍以上，其中共有165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96.49%（图5）。

图5 梨标记测序覆盖倍数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可接受

本标准共有310个位点，每个位点长度按300 bp计算，700倍的测序覆盖倍数需要0.07G的测序数据量；每个品种按重复检测2次计算，总共需要0.14 G的测序数据量；每个G的商业测序费用按60元计算，每个品种高通量测序检测需要费用共计8.4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310个位点中最大缺失率5%计算，缺失位点数目为15.5个；缺失位点中，差异位点分布服从实验次数为15.5且发生频率为（1-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0个和1个，观察到的遗传相似度介于97.89%和98.23%之间；最终推断出遗传相似度的最大偏差为0.24%，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3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 |
|
| 310 | 98% | 6.20 | 5% | 294.50 | 15.50 |
| 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 | 最小值 | 最大值 |
| 95% | 0 | 1 | 5.20 | 6.20 |
| 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 | 　 | 　 |
| 97.89% | 98.23% | 0.11% | 0.24% | 　 | 　 |

**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

标准引物在开发和验证过程中，不能穷尽现有全部梨品种或者未来可能出现的梨品种。可能存在与标准开发过程中使用的梨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，假设检出位点数量为240个；当R2值为95%时，那么，非共同检出位点数量为12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1个，由此观察到的遗传相似度最大值为98.01%，遗传相似度（GS）偏差最大为0.32%。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4 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 |
|  |
| 240 | 98% | 4.8 | 95% | 228.00 | 12.00 |  |
| 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% | 0 | 1 | 97.68% | 98.10% | 0.32% |  |

**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，我们对57个随机选择品种进行重复性实验（在江汉大学对同一个样品重复做两次实验），对5个品种进行重现性实验（在江汉大学、石家庄博瑞迪公司或崖州湾分子检测鉴定中心等5家单位，对同一个样品做两次实验）来计算MNP标记分型的准确性。从表5可以看出，在比较的12414个MNP标记的重现性实验检测结果中，共有49个标记位点分型确定存在差异，比例为0.39%，折算标记分型重现性和准确性分别为99.61%和99.80%。

表5 MNP标记在重复性和重现性实验中的分型准确性

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验类别　 | 比较的标记位点的数目　 | 基因型确定不同的标记位点　 | 重现率　 | 准确率　 |
| 建库 | 测序 | 数目 | 比例 |
| 重复性实验 | 重复性实验 | 33694 | 64 | 0.29% | 99.81% | 99.91% |
| 重现性实验 | 重现性实验 | 12414 | 49 | 0.37% | 99.61% | 99.80% |

（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310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310×（1-99.91%）=0.28个，其对遗传相似系数的影响仅为0.09%，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2×310×（1-99.80%）=1.24个，其对遗传相似系数的影响仅为0.40%，对不同实验室鉴定结论重现性的影响也可忽略。

**9.关于MNP标记的多态性**

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。我们在77个梨品种中统计标准所用310个MNP标记的等位基因型数量，MNP标记的等位基因型平均值为18.14±11.08；每个标记的PIC值范围为0.57-0.99，平均值为0.91±0.07，表明MNP标记多态性高。

图6 310个梨品种MNP标记的等位基因型数量分布

**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，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。通过上述的分析表明本标准所用的310个标记具有高准确性和多态性，可以用于品种和实质性派生品种鉴定。

江汉大学采用本标准检测77份梨品种（地方品种和授权品种）的DNA指纹。将这77个品种进行两两组合，共获得2926对品种组合，计算每一对品种组合的遗传相似系数。结果表明，品种间平均差异273个MNP标记，品种间遗传差异平均达90.89%。整体看，有2917（占比99.69%）对品种间遗传相似系数低于96%，判定为不同品种；9对品种的遗传相似系数高于96%，占比仅为0.31%，且这9对品种都为芽变品种；表明MNP标记法具有很强的品种区分能力（见图7）。

图7 2926对梨品种间MNP标记差异分布

**11.关于****梨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90%的品种判定为“待测品种与对照品种为疑似实质性派生品种”，其依据与相关重要说明如下。

**（1）根据发表文献中的实质性派生品种判定阈值制定方法，梨实质性派生品种的判定阈值应该介于89.97%到98.71%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技术探讨了月季品种的实质性派生品种判定阈值。在Vosman的实验中，检测了83对月季品种，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56个育种实例的结果，推断梨实质性派生品种的判定阈值应设置在89.97%到98.71%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（自然突变、诱变等）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88.20%**

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，获得梨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77个梨品种，任意两个梨品种之间的平均遗传差异为90.89%，那么，在本标准检测的310个标记位点中，它们之间有$310×90.89\%=281.8$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，当后代与亲本的差异位点数量小于$310×\left(1−x\right)$，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$281.8$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$p=1−BINOM.DIST(310×\left(1−x\right),281.8,0.5,TRUE)$；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63%，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6 梨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** | **梨品种间的平均差异** | **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（**$p$**）** |
| --- | --- | --- | --- |
| 310 | 90.89% | 100% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 99% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 98% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 97% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 96% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 95% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 94% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 93% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 92% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 91% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 90% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 89% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 88% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 87% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 86% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 85% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 84% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 83% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 82% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 81% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 80% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 79% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 78% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 77% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 76% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 75% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 74% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 73% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 72% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 71% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 70% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 69% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 68% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 67% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 66% | 100.00% |
| 310 | 90.89% | 65% | 99.99% |
| 310 | 90.89% | 64% | 99.97% |
| 310 | 90.89% | 63% | 99.91% |
| 310 | 90.89% | 62% | 99.70% |
| 310 | 90.89% | 61% | 99.16% |
| 310 | 90.89% | 60% | 97.20% |
| 310 | 90.89% | 59% | 93.96% |
| 310 | 90.89% | 58% | 88.36% |

**实质性派生品种判定阈值下限的育种检验。**我们检测了50对杂交梨品种与其亲本，包含12个育成品种和38个杂交后代材料，它们与亲本的遗传相似系数介于0.00%-89.97%之间。如表7育成的梨品种和亲本间的遗传差异所示，即若梨实质性派生品种判定阈值大于89.97%，可以保障通过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，梨的实质性派生品种判定阈值下限为89.97%。

表7 梨品种与其亲本间的遗传差异分析

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **梨品种** | **母本/父本** | **梨品种与母本/父本的MNP标记比较结果** |
| **比较位点数** | **差异位点数** | **差异比例** | **遗传相似度** |
| 1 | 华蜜 | 红香酥 | 301 | 301 | 100.00% | 0.00% |
| 2 | 早金酥 | 雪花 | 306 | 280 | 91.50% | 8.50% |
| 3 | 新梨7号 | 早酥 | 292 | 243 | 83.22% | 16.78% |
| 4 | 新梨7号 | 库尔勒香 | 295 | 243 | 82.37% | 17.63% |
| 5 | 雪青 | 雪花 | 304 | 249 | 81.91% | 18.09% |
| 6 | 红酥蜜 | 红香酥 | 302 | 233 | 77.15% | 22.85% |
| 7 | 早金酥 | 早酥 | 302 | 231 | 76.49% | 23.51% |
| 8 | 雪青 | 翠冠 | 305 | 233 | 76.39% | 23.61% |
| 9 | 丹霞红 | 红香酥 | 303 | 229 | 75.58% | 24.42% |
| 10 | 玉露香 | 库尔勒香 | 309 | 225 | 72.82% | 27.18% |
| 11 | 新玉 | 翠冠 | 307 | 195 | 63.52% | 36.48% |
| 12 | 苏翠1号 | 翠冠 | 309 | 31 | 10.03% | 89.97% |

**b) 按照“校对规则”，实质性派生品种判定阈值的上限为98.71%**

根据UPOV有关文件描述，多代回交育种、诱变育种、转基因育种、基因编辑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，因此被认为是实质性派生品种育种行为。在本标准中，实质性派生品种的判定阈值为90%，相当于在310个标记位点中，有10%即31个位点存在差异。现有的定向改良技术一般是定向改良1个或少数几个基因，要定向改良31个基因位点的难度是很大的。因此，从技术难度上讲，90%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。

目前梨品种培育的实质性派生育种方式主要为芽变，我们搜集到6对通过芽变产生的品种。利用本标准检测获得原始品种和派生品种间的遗传相似系数在98.71%-100%之间。即若梨实质性派生品种判定阈值小于98.71%，可以在99%的概率保障下，将容易产生实质性派生品种的育种行为（芽变）产生的后代判定为实质性派生品种。

表8 实质性派生育种行为所产生的后代与其原始品种间的遗传相似度

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **编号** | **原始品种** | **派生品种** | **育种方式** | **比较位点数** | **差异位点数目** | **遗传相似度(GS)** |
| 1 | 巴梨 | 红巴梨 | 芽变 | 294 | 0 | 100.00% |
| 2 | 兰州长把梨 | 花长把 | 芽变 | 307 | 0 | 100.00% |
| 3 | 南果 | 南红 | 芽变 | 302 | 1 | 99.67% |
| 4 | 鸭梨 | 大鸭梨 | 多倍体芽变 | 307 | 2 | 99.35% |
| 5 | 早酥 | 奥红1号 | 芽变 | 305 | 3 | 99.02% |
| 6 | 库尔勒香 | 沙01 | 芽变 | 310 | 4 | 98.71% |

综上实质性派生品种判定阈值上限的统计推断和育种实例，梨的实质性派生品种判定阈值上限为98.71%。

**（2）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96%**

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植物新品种的判定阈值。梨新品种的判定阈值为96%，因此，梨实质性派生品种的判定阈值应该小于96%。

**（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。

**（4）在我国过往的梨育种创新水平下，不同的实质性派生品种判定阈值对育成品种的影响程度**

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应在创新与稳定间寻求平衡。利用本标准检测了77个育成梨品种，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表9中所设定的实质性派生品种判定阈值，则判定授权日期更晚的品种可能为实质性派生品种。从表9可以看出，当实质性派生品种判定阈值为90%时，判定为实质性派生品种的数量逐步稳定为最大值，有13个品种可能为实质性派生品种，占比17.53%。对于17.53%现有育成品种可能被判定为实质性派生品种，有两点关键说明：a) 实质性派生品种制度设计的初衷是改变中国当前品种同质化严重的现象，因此，有一定比例的创新性不足的品种被判定为实质性派生品种是符合实质性派生品种制度的初衷的；b) 实质性派生品种制度实施后，模仿式育种行为预期会显著减少，因此，未来新育成品种被判定为实质性派生品种的比例会远低于17.53%。

表8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

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 11 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 | 12 |
| 实质性派生品种比例 | 14.94% | 14.94% | 14.94% | 14.94% | 16.24% | 16.24% | 16.24% |
| 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 | 12 | 12 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| 实质性派生品种比例 | 16.24% | 16.24% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% |
| 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 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| 实质性派生品种比例 | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% |
| 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 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| 实质性派生品种比例 | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% |
| 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 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| 实质性派生品种比例 | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% | 17.53% |

**（5）****根据UPOV和ISF等国际组织制定实质性派生品种判定阈值需要综合考虑科学、现状、需求等因素的基本原则，本标准将实质性派生品种判定阈值确定为92%**

**仅考虑科学因素，实质性派生品种的判定阈值应设置在89.97%到96%之间**。实质性派生品种为新品种，因此，其判定阈值应小于国家标准中规定的新品种判定阈值，即96%。按照文献中实质性派生品种判定阈值的确定方法（校对规则，calibration principle），结合二项式分布理论和育种实例，推断出实质性派生品种判定阈值应设置在89.97%到98.71%之间，可以在99%的概率保障下，正确区分实质性派生和非实质性派生的育种行为。

**科学因素结合行业共识，确定本标准中实质性派生品种判定阈值为90%**。UPOV和ISF认为实质性派生品种判定阈值应结合种业国情、行业共识等因素，做出具体规定并定期调整。实际上，ISF制定的实质性派生品种判定阈值并不固定，介于82%到96%之间，其中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。90%判定阈值也在科学因素确定的范围（89.97%到96%）内，因此被采纳为本标准的判定阈值。

**本标准确定的实质性派生品种判定阈值，较好地平衡了种业创新与种业稳定**。在本标准的判定阈值下，假设我国在未来依旧保持过往同质化较为严重的育种创新水平，将有17.53%的育成品种被判定成为实质性派生品种，但预计实质性派生品种制度将显著改善我国品种同质化现象，因而未来育成的梨品种被判定为实质性派生品种的概率将远低于17.53%，能较好地平衡种业创新与种业稳定。

**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90%时，结果表述为待测品种与对照品种为“疑似实质性派生品种”。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证责任，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》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，并综合品种培育过程中产生的突变、退化等因素，本标准中将不同品种的遗传相似度阈值确定为96%，主要有以下两个方面的依据：

（1）现有SSR标记法品种鉴定行业标准、SNP标记法品种鉴定行业标准、MNP标记法品种鉴定国家标准中判定不同品种的遗传相似度的阈值多为96%。

（2）检测的2926对育成品种中，除去芽变品种，品种间遗传相似系数均低于96%，其中不同品种间的遗传相似系数最大值为95.19%。可见96%的判定阈值下，通过本标准方法不同品种可以被判定为不同品种。

**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）试验验证的分析、综述报告**

本标准草案试验验证单位共6家，分别为江苏徐淮地区徐州农业科学研究所、石家庄博瑞迪生物技术有限公司、上海市农业科学院食用菌研究所、巴彦淖尔市农牧业科学研究所、中国农业科学院油料作物研究所和农业农村部植物新品种测试（昆明）分中心；标准验证所用的实验材料均为叶片，由中国农业科学院果树研究所和湖北省农业科学院果树茶叶研究所提供。

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所有标记位点，一次高通量测序检测所有待测样品的标记位点；

（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95.29%-99.80%；

（4）标记分型重现率为99.65%-99.80%；

（5）品种鉴定和实质性派生品种判定结论重现率均为100%。

6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，310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。

1. **预期的经济效益、社会效益和生态效益**

本标准发布实施后，可以规范对梨品种和实质性派生品种鉴定所进行的测试，为梨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梨新品种进行保护，还可对国外梨品种的引进和利用进行规范管理，促进梨新品种贸易，促进我国梨育种和梨品种知识产权保护工作的发展。

1. 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、准确的梨实质性派生品种分子标记鉴定技术体系的报道。

1. 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。

1. 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、行政法规及相关标准不发生冲突，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。

1. 重大分歧意见的处理经过和依据

无

八、涉及专利的有关说明

本文件所采用的310个MNP标记位点与标准编制单位江汉大学的发明专利“用于梨品种鉴定的MNP标记位点、引物组合物和试剂盒及其应用（专利号ZL202110977722.2）”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。

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、其它应于说明的事项

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.