

《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》

农业农村行业标准（征求意见稿）

编制说明

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），由上海市农业科学院、江汉大学、上海雪榕生物科技股份有限公司、农业农村部植物新品种测试(上海)分中心和陆良爨乡绿圆菇业有限公司 5 家单位承担行业标准《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》（项目编号 NYB-23155）的制定工作。

（二）制定背景

金针菇（*Flammulina filiformis*）是我国最早实现工厂化生产的食用菌品种，2023 年产量攀升至 213.4 万吨，居食用菌工厂化栽培品种之首，也成为目前工业化水平最高、市场竞争最激烈的品种之一。尽管我国是金针菇资源大国、生产大国、消费大国和出口大国，但还不是强国。尤其是以白色金针菇为代表的种业自主方面，与发达国家差距较大，关键种源对外依存度极高。

金针菇是商业化栽培品种与野生资源形态及品质差异异常显著的食用菌。野生金针菇品种在我国分布广泛，其子实体呈黄色至红棕色、菌盖开展且粘滑、菌柄短且基部有绒毛等特点。1988 年，日本科学家通过杂交培育出纯白色金针菇‘M50’，产量高、一致性好，适合工厂化栽培，迅速占领市场。2008 年国内企业以“菌种使用费”的方式引入日本千曲公司的‘T’系列白色菌种及工厂化栽培技术，迅速成为主栽品种，子实体具有产量高、颜色洁白、菌盖小内卷、菌柄长且基部绒毛不显著等特点。

2022 年 4 月，习近平总书记在海南考察时指出：“中国人的饭碗要牢牢端在自己手中，就必须把种子牢牢攥在自己手里。”随着国家对种源越来越重视，金针菇品种权也日益受到食用菌行业重视。截止 2025 年 3 月 14 日，现有金针菇测试品种 85 个，其中已授权品种为 30 个，因特异性不合格导致实审驳回的有 1

个，待出 DUS 测试报告的有 14 个，处于 DUS 测试中的共有 25 个。从申请主体来看，11 家申请企业中，上海雪榕生物科技股份有限公司申请数最多，为 11 件；9 家科研单位中，上海市农业科学院申请最多，为 27 件；2 家科研单位和企业联合申请中，福建农林大学和福建万辰生物科技股份有限公司申请最多，为 2 件。

组织（基质）分离是食用菌产业广泛采用的获得菌株的方式，由此在生产上造成大量“同物异名”（同一菌株不同名称）现象，造成了生产用种的混淆，育种者的权益也难以保障。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第三十二次会议通过《全国人民代表大会常务委员关于修改〈中华人民共和国种子法〉的决定》，自 2022 年 3 月 1 日起施行。

《种子法》（2021 修正版）第九十条第十款增加了实质性派生品种的内容：是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与原始品种相同。因此，如何判别品种与实质性派生品种成为金针菇种业健康发展的关键点之一。

2020 年，由本标准的申请单位之一江汉大学的彭海教授等起草研制的国家标准《植物品种鉴定 MNP 标记法》（GB/T 38551—2020）颁布实施，该标准适用于水稻、玉米、大豆、棉花等 16 种植物的品种鉴定。应用《植物品种鉴定 MNP 标记法》的基本原理，结合金针菇基因组小的特点，开发一种准确、可靠、稳定、工作量小、通量高的品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记技术，确定品种及实质性派生品种的判定阈值，为育种、DUS 测试与品种保护、市场监管、品种纠纷仲裁快速鉴定等工作提供技术支撑。

（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、上海雪榕生物科技股份有限公司、农业农村部科技发展中心、农业农村部植物新品种测试（上海）、陆良爨乡绿圆菇业有限公司 5 家单位起草。

表 1 主要起草人信息及任务分工

姓 名	工作单位	职称/职务	项目分工
王瑞娟	上海市农业科学院	副研究员	项目的组织实施、质量控制
彭 海	江汉大学	教授	参与制定鉴定技术研发方案、标准文本修改
陆 欢	上海市农业科学院	副研究员	MNP 标记筛选
李甜甜	江汉大学	副研究员	标记评价、标准文本修改
尚晓冬	上海市农业科学院	研究员	起草行业标准与编制说明
胡卫红	上海雪榕生物科技股份有限公司	菌种总监	菌种制备
韩瑞玺	农业农村部科技发展中心	副处长	标准文本修改
方治伟	江汉大学	实验师	标记评价、数据分析与处理
刘建雨	上海市农业科学院	副研究员	MNP 标记验证
周俊飞	江汉大学	高级实验师	指纹数据库构建
徐 珍	上海市农业科学院	副研究员	MNP 标记筛选
吴燕莎	上海市农业科学院	助理研究员	MNP 标记验证
陈海荣	农业农村部植物新品种测试 (上海)	研究员	标准文本修改
王小艳	陆良爨乡绿圆菇业有限公司	副研究员	菌种制备

1.2 前期准备

本标准基于金针菇品种的高通量测序数据研制开发并使用了 350 对 MNP 引物，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金针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 319 份（如表 2 所示）。在品种类型上，319 份材料包括 3 份国认金针菇品种、6 份省级认定金针菇品种、86 份 DUS 测试送检菌株、65 份栽培品种、9 份野生菌株、150 份育种材料；在不同地域来源上，有美国、日本、中国香菇、福建省、四川省、云南省、江苏省、广东省、重庆市、上海市等不同地域选育的品种，菌株清单见附件。

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 9 个黄色和 21 个白色菌株，对每个菌株均进行基因组重测序，测序深度设置为 50 倍。通过与金针菇参考基因组进行比对（基因组版本：Genbank 登录号为 GCA_041682555.1，文件名为 Dan3.fna），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 530 个 MNP 标记位点，并设计引物。引物合成后，利用该 30 份金针菇菌株进行实测，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 350 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 350 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

按照农业农村部制定的《植物品种鉴定 DNA 分子标记法 总则》(NY/T 2594) 标准编写要求，采用以下原则编写《金针菇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、GB/T38551-2020 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、当前和未来的金针菇品种及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。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 350 个金针菇 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，检测和效率，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 350 个标记都能被检出，其中平均每个样品可以检出 326 个（93.27%）MNP 标记，检出率达 90%以上的样品占比 84.30%；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. 金针菇 MNP 标记位点的筛选

1.1 MNP 标记

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。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 标记指一段包含了多个不连续 SNP 变异的序列，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。

1.2 代表性样本及其基因组测序数据

本标准共采用了 319 份金针菇菌株（表 2），用于金针菇品种鉴定及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记方法的开发，其中，30 份用于方法开发中的引物筛选，289 份用于方法开发中的标记评价。这 354 份包含了国内商业化品种、申请授权品种及日本申请授权品种，样品来源具有广泛的代表性。

用于 MNP 标记开发的 30 个金针菇品种从金针菇授权品种与野生菌株库中选择，包含 9 个黄色品种和 21 个白色菌株；对每个品种进行基因组重测序，测序深度设置为 50 倍，以保证获取较高质量的授权品种的基因组测序数据。

表 2 319 份金针菇菌株清单

编号	品种名称	来源	区域	编号	品种名称	来源	区域
1	川金菇 3 号	国品认菌	四川	161	JZG221224075	栽培	上海
2	金杂 19	国品认菌	福建	162	JZG221224076	栽培	云南
3	F3	国品认菌	上海	163	JZG221224081	栽培	山东
4	G1	国审品种	上海	164	JZG221224082	栽培	山东
5	上研 1 号	省级认定	上海	165	JZG221224083	栽培	山东
6	上研 2 号	省级认定	上海	166	JZG221224084	栽培	山东
7	上研 3 号	省级认定	上海	167	JZG221224085	栽培	山东
8	上研 1820 号	省级认定	上海	168	JZG221224086	栽培	山东
9	上研金 31	省级认定	上海	169	JZG221224087	栽培	山东
10	JZG0107	DUS	日本	170	JZG240729011	栽培	四川
11	JZG0109	DUS（近似品种）	四川	171	JZG0078	育种材料	上海
12	JZG0110	DUS	山东	172	JZG0079	育种材料	上海
13	JZG0111	DUS	山东	173	JZG0080	育种材料	上海
14	JZG0112	DUS	上海	174	JZG0081	育种材料	上海
15	JZG0113	DUS	贵州	175	JZG0082	育种材料	上海
16	JZG0114	DUS	上海	176	JZG0083	育种材料	上海
17	JZG0115	DUS	上海	177	JZG0084	育种材料	上海
18	JZG0135	DUS（近似品种）	江苏	178	JZG0085	育种材料	上海
19	JZG0136	DUS（近似品种）	四川	179	JZG0086	育种材料	上海
20	JZG0137	DUS	上海	180	JZG0087	育种材料	上海
21	JZG0138	DUS	上海	181	JZG0088	育种材料	上海
22	JZG0139	DUS	上海	182	JZG0089	育种材料	上海
23	JZG0140	DUS	上海	183	JZG0090	育种材料	上海
24	JZG0145	DUS	福建	184	JZG0091	育种材料	上海
25	JZG0146	DUS	甘肃	185	JZG0092	育种材料	上海
26	JZG0147	DUS	甘肃	186	JZG0093	育种材料	上海
27	JZG0148	DUS	福建	187	JZG0094	育种材料	上海
28	JZG0149	DUS	重庆	188	JZG0095	育种材料	上海
29	JZG0150	DUS	重庆	189	JZG0096	育种材料	上海

30	JZG0151	DUS	广东	190	JZG0097	育种材料	上海
31	JZG0153	DUS	四川	191	JZG0098	育种材料	上海
32	JZG0155	DUS	四川	192	JZG0099	育种材料	上海
33	JZG0156	DUS	四川	193	JZG0100	育种材料	上海
34	JZG0157	DUS	四川	194	JZG0101	育种材料	上海
35	JZG0158	DUS	四川	195	JZG0102	育种材料	上海
36	JZG0159	DUS	四川	196	JZG0103	育种材料	上海
37	JZG0160	DUS	四川	197	JZG0104	育种材料	上海
38	JZG0161	DUS	四川	198	JZG0105	育种材料	上海
39	JZG0162	DUS	四川	199	JZG0116	育种材料	上海
40	JZG0163	DUS	四川	200	JZG0117	育种材料	上海
41	JZG0164	DUS	四川	201	JZG0118	育种材料	上海
42	JZG0175	DUS	甘肃	202	JZG0119	育种材料	上海
43	JZG0197	DUS (近似品种)	上海	203	JZG0120	育种材料	上海
44	JZG0200	DUS	上海	204	JZG0121	育种材料	上海
45	JZG0201	DUS	上海	205	JZG0122	育种材料	上海
46	JZG0202	DUS	四川	206	JZG0123	育种材料	上海
47	JZG0203	DUS	福建	207	JZG0124	育种材料	上海
48	JZG0204	DUS	福建	208	JZG0125	育种材料	上海
49	JZG0205	DUS	福建	209	JZG0126	育种材料	上海
50	JZG0206	DUS	福建	210	JZG0127	育种材料	上海
51	JZG0207	DUS	福建	211	JZG0128	育种材料	上海
52	JZG0208	DUS	上海	212	JZG0129	育种材料	上海
53	JZG0209	DUS	上海	213	JZG0130	育种材料	上海
54	JZG0210	DUS (近似品种)	上海	214	JZG0131	育种材料	上海
55	JZG0211	DUS (近似品种)	上海	215	JZG0132	育种材料	上海
56	JZG220608005	DUS	山东	216	JZG0133	育种材料	上海
57	JZG220608006	DUS	日本	217	JZG0134	育种材料	上海
58	JZG220608021	DUS	上海	218	JZG0142	育种材料	上海
59	JZG220608028	DUS	日本	219	JZG0143	育种材料	上海
60	JZG220608032	DUS	福建	220	JZG0144	育种材料	上海
61	JZG220608033	DUS	福建	221	JZG0165	育种材料	上海
62	JZG220608034	DUS	福建	222	JZG0166	育种材料	上海
63	JZG220608048	DUS	上海	223	JZG0167	育种材料	上海
64	JZG220608049	DUS	上海	224	JZG0168	育种材料	上海
65	JZG220608051	DUS	上海	225	JZG0169	育种材料	上海
66	JZG220608053	DUS	上海	226	JZG0170	育种材料	上海
67	JZG221224022	DUS	上海	227	JZG0171	育种材料	上海
68	JZG221224023	DUS	上海	228	JZG0172	育种材料	上海
69	JZG221224024	DUS	福建	229	JZG0173	育种材料	上海
70	JZG221224025	DUS	上海	230	JZG0174	育种材料	上海
71	JZG221224026	DUS	上海	231	JZG0176	育种材料	上海
72	JZG221224027	DUS	上海	232	JZG0177	育种材料	上海

73	JZG221224028	DUS	上海	233	JZG0178	育种材料	上海
74	JZG221224029	DUS	上海	234	JZG0179	育种材料	上海
75	JZG221224030	DUS	上海	235	JZG0180	育种材料	上海
76	JZG221224031	DUS	上海	236	JZG0181	育种材料	上海
77	JZG221224032	DUS	福建	237	JZG0182	育种材料	上海
78	JZG221224033	DUS	福建	238	JZG0183	育种材料	上海
79	JZG221224034	DUS	上海	239	JZG0184	育种材料	上海
80	JZG221224035	DUS	上海	240	JZG0185	育种材料	上海
81	JZG221224143	DUS	上海	241	JZG0186	育种材料	上海
82	JZG240509043	DUS	辽宁	242	JZG0187	育种材料	上海
83	JZG240509044	DUS	日本	243	JZG0188	育种材料	上海
84	JZG240509045	DUS	贵州	244	JZG0189	育种材料	上海
85	JZG240509046	DUS	陕西	245	JZG0190	育种材料	上海
86	JZG240509048	DUS	辽宁	246	JZG0191	育种材料	上海
87	JZG240509050	对照	山东	247	JZG0192	育种材料	上海
88	JZG240729010	DUS	湖南	248	JZG0193	育种材料	上海
89	JZG240729023	DUS (近似品种)	上海	249	JZG0194	育种材料	上海
90	JZG240729026	对照	山东	250	JZG0195	育种材料	上海
91	JZG240729027	DUS	黑龙江	251	JZG0196	育种材料	上海
92	JZG240729028	DUS	黑龙江	252	JZG220608003	育种材料	上海
93	JZG240729029	DUS (近似品种)	上海	253	JZG220608010	育种材料	上海
94	JZG240729030	DUS	上海	254	JZG220608027	育种材料	上海
95	JZG240729031	DUS	上海	255	JZG220608054	育种材料	上海
96	JZG221224040	野生	黑龙江	256	JZG221224038	育种材料	上海
97	JZG221224041	野生	河南	257	JZG221224046	育种材料	上海
98	JZG221224042	野生	河南	258	JZG221224047	育种材料	上海
99	JZG221224043	野生	湖南	259	JZG221224048	育种材料	上海
100	JZG221224060	野生	吉林	260	JZG221224049	育种材料	上海
101	JZG221224061	野生	吉林	261	JZG221224050	育种材料	上海
102	JZG221224065	野生	吉林	262	JZG221224051	育种材料	上海
103	JZG221224070	野生	吉林	263	JZG221224052	育种材料	上海
104	JZG240729012	野生	四川	264	JZG221224053	育种材料	上海
105	JZG0106	栽培	日本	265	JZG221224054	育种材料	上海
106	JZG0108	栽培	日本	266	JZG221224055	育种材料	上海
107	JZG0141	栽培	福建	267	JZG221224056	育种材料	上海
108	JZG0152	栽培	广东	268	JZG221224057	育种材料	上海
109	JZG220608002	栽培	上海	269	JZG221224073	育种材料	上海
110	JZG220608004	栽培	日本	270	JZG221224074	育种材料	上海
111	JZG220608007	栽培	日本	271	JZG221224077	育种材料	福建
112	JZG220608008	栽培	上海	272	JZG221224078	育种材料	福建
113	JZG220608011	栽培	日本	273	JZG221224079	育种材料	福建
114	JZG220608012	栽培	日本	274	JZG221224080	育种材料	福建
115	JZG220608013	栽培	日本	275	JZG221224088	育种材料	上海

116	JZG220608014	栽培	上海	276	JZG221224089	育种材料	上海
117	JZG220608015	栽培	上海	277	JZG221224090	育种材料	上海
118	JZG220608017	栽培	美国	278	JZG221224091	育种材料	上海
119	JZG220608018	栽培	江苏	279	JZG221224092	育种材料	上海
120	JZG220608020	栽培	重庆	280	JZG221224093	育种材料	上海
121	JZG220608022	栽培	上海	281	JZG221224094	育种材料	上海
122	JZG220608023	栽培	江苏	282	JZG221224095	育种材料	上海
123	JZG220608024	栽培	福建	283	JZG221224096	育种材料	上海
124	JZG220608026	栽培	山东	284	JZG221224097	育种材料	上海
125	JZG220608029	栽培	上海	285	JZG221224098	育种材料	上海
126	JZG220608030	栽培	四川	286	JZG221224099	育种材料	上海
127	JZG220608031	栽培	日本	287	JZG221224100	育种材料	上海
128	JZG220608035	栽培	陕西	288	JZG221224101	育种材料	上海
129	JZG220608037	栽培	日本	289	JZG221224102	育种材料	上海
130	JZG220608039	栽培	香港	290	JZG221224103	育种材料	上海
131	JZG220608040	栽培	美国	291	JZG221224104	育种材料	上海
132	JZG220608042	栽培	湖南	292	JZG221224105	育种材料	上海
133	JZG220608043	栽培	上海	293	JZG221224106	育种材料	上海
134	JZG220608044	栽培	上海	294	JZG221224107	育种材料	上海
135	JZG220608050	栽培	上海	295	JZG221224108	育种材料	上海
136	JZG220608052	栽培	日本	296	JZG221224109	育种材料	上海
137	JZG221224001	栽培	日本	297	JZG221224110	育种材料	上海
138	JZG221224002	栽培	日本	298	JZG221224111	育种材料	上海
139	JZG221224003	栽培	日本	299	JZG221224112	育种材料	上海
140	JZG221224004	栽培	上海	300	JZG221224113	育种材料	上海
141	JZG221224005	栽培	日本	301	JZG221224114	育种材料	上海
142	JZG221224006	栽培	日本	302	JZG221224115	育种材料	上海
143	JZG221224007	栽培	上海	303	JZG221224116	育种材料	上海
144	JZG221224008	栽培	日本	304	JZG221224117	育种材料	上海
145	JZG221224009	栽培	日本	305	JZG221224118	育种材料	上海
146	JZG221224010	栽培	日本	306	JZG221224119	育种材料	上海
147	JZG221224011	栽培	日本	307	JZG221224120	育种材料	上海
148	JZG221224012	栽培	上海	308	JZG221224121	育种材料	上海
149	JZG221224013	栽培	日本	309	JZG221224122	育种材料	上海
150	JZG221224014	栽培	上海	310	JZG221224123	育种材料	上海
151	JZG221224015	栽培	上海	311	JZG221224124	育种材料	上海
152	JZG221224016	栽培	江苏	312	JZG221224125	育种材料	上海
153	JZG221224017	栽培	上海	313	JZG221224126	育种材料	上海
154	JZG221224018	栽培	湖南	314	JZG221224127	育种材料	上海
155	JZG221224019	栽培	上海	315	JZG221224128	育种材料	上海
156	JZG221224020	栽培	上海	316	JZG221224129	育种材料	上海
157	JZG221224021	栽培	上海	317	JZG221224130	育种材料	上海
158	JZG221224039	栽培	日本	318	JZG221224131	育种材料	上海

159	JZG221224071	栽培	四川	319	JZG221224132	育种材料	上海
160	JZG221224072	栽培	云南				

通过与金针菇参考基因组进行比对, 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 250 bp、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 530 个 MNP 标记位点, 并设计引物。引物合成后, 利用该 30 份金针菇菌株进行实测, 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 350 对引物, 其序列见标准中附录 A。

1.3 标记筛选原则

首先基于这 30 份基因组重测序数据, 采用 Samtools (Version 1.2) 和 BCFtools (Version 1.2) 获取金针菇全基因组上的 SNP 位点; 基于全部 SNP 位点, 以 125 bp 为窗口大小, 5 bp 为步长在价值参考基因组 (版本号 GCA_041682555.1) 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 $DP \geq 0.2$ 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金针菇中扩增; (5) 扩增产物长度在 150 bp~275 bp 之间; (6) 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。

1.4 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。

编号为 JZG220608035 的待测品种与编号为 JZG221224034 的对照品种间

的遗传相似系数检测结果为 97.08%，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 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 $N \times 90\%$ 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 = $\sum_{i=N \times 90\%}^N C_N^i (97.08\%)^i \times (1 - 97.08\%)^{(N-i)}$ 。

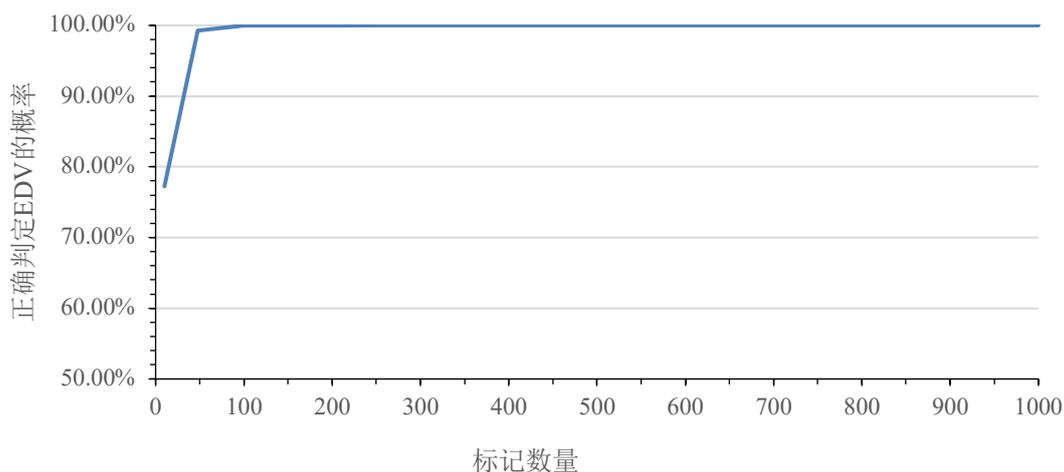


图 1 不同标记数量下实质性派生品种鉴定结论正确的概率

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 97.08%；（3）随着实质性派生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。

根据上述概率方程获得图 1。从图 1 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 $N = 350$ 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 1 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 JZG240509050 对照样品 JZG220608001 的遗传相似系数为 98.85%，假定品种鉴定阈值为 96%，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。

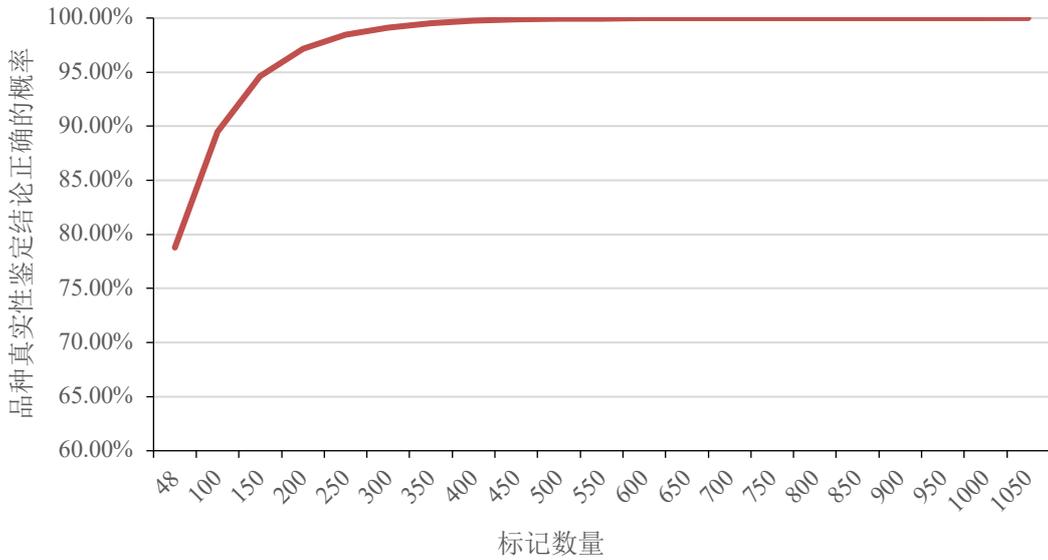


图 2 不同标记数量下品种鉴定结论正确的概率

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 98.99%。（3）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。

从图 2 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 350 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 99.99%。需要特别说明的是，图 2 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。

2. 金针菇 MNP 标记评价

2.1 MNP 标记检出率和多态性

利用合成的 350 个金针菇 MNP 标记引物，对收集的 319 份金针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 4791 倍。对样品的 MNP-Seq 数据进行分析，所筛选的 350 个标记都能被检出，其中平均每个样品可以检出 326 个（93.27%）MNP 标记，检出率达 90% 以上的样品占比 84.3%。

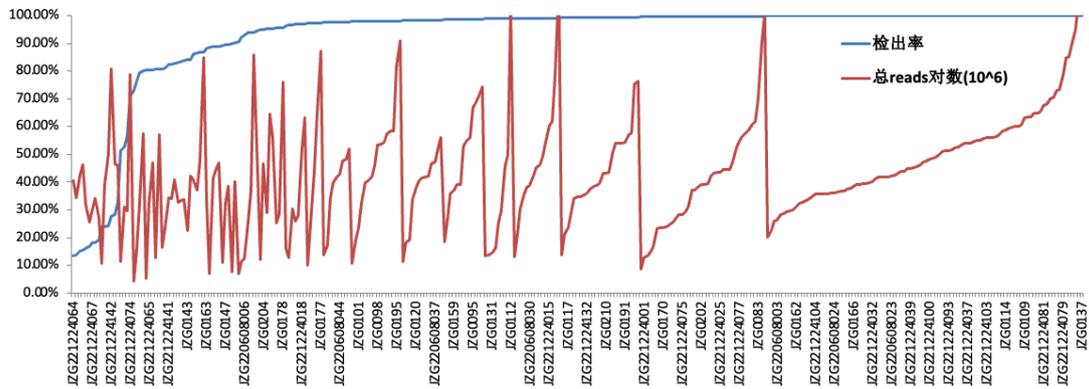


图3 319个样品中金针菇 MNP 标记的检出率和分布序片段数量图

注：横坐标为品种

DNA 标记组合在品种鉴定中发挥着核心作用，DNA 标记的多态性程度直接关联到品种区分的精确度，多态性越高，品种区分能力便越强。我们利用 319 个金针菇菌株，检测了 350 个 MNP 标记的等位基因型数量，结果表明，在 319 个金针菇菌株中，MNP 标记的等位基因型的平均值为 17.05 个。每个标记的 PIC 平均值为 0.39。这些数据有力地证明了标准所采用的 350 个 MNP 标记具有较高的多态性。

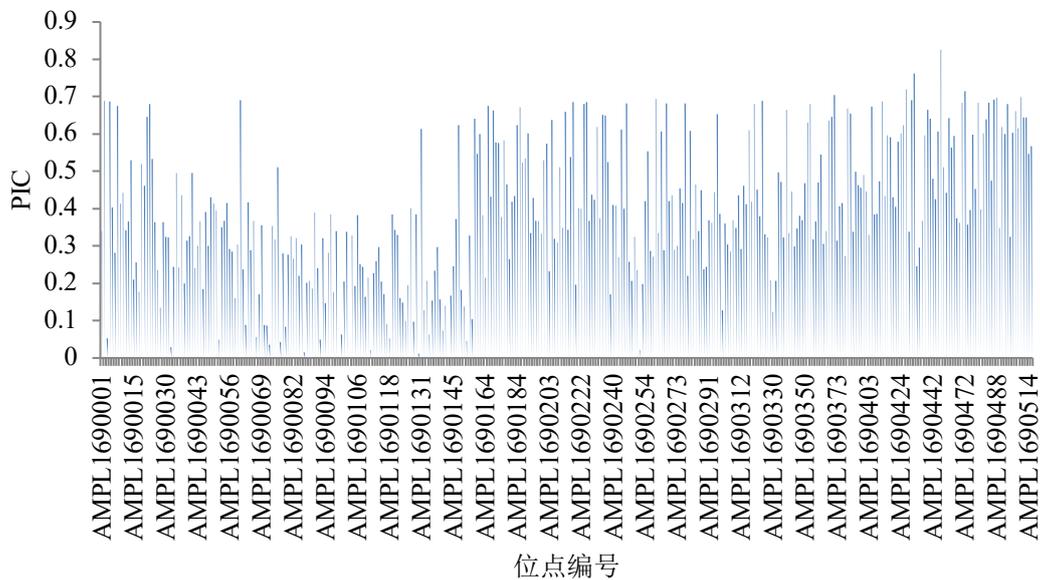


图4 金针菇 MNP 标记的 PIC 值分布图

2.2 MNP 标记的分型准确性

(1) MNP 标记分型准确性高

为了检验开发的金针菇 MNP 标记位点及检测方法的准确性，对 5 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: 金针菇 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 $N=1669$, $n=1667$, $r=99.88\%$, 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 3 MNP 标记在重复性和重现性实验中的分型准确性

样品编号	文库		共同位点数	差异位点数	可重复的基因型对数	重现性	准确性
	重复 1	重复 2					
JZG220608001	JZG22060 8001-11	JZG22060 8001-12	335	0	335	100.00%	100.00%
JZG220608003	JZG22060 8003-11	JZG22060 8003-12	332	0	332	100.00%	100.00%
JZG220608004	JZG22060 8004-11	JZG22060 8004-12	314	1	313	99.68%	99.84%
JZG220608005	JZG22060 8005-11	JZG22060 8005-12	336	0	336	100.00%	100.00%
JZG220608008	JZG22060 8008-11	JZG22060 8008-12	352	1	351	99.71%	99.86%
合计			1669	2	1667	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 350 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 $350 \times (1-99.94\%) = 0.21$ 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 $2 \times 350 \times (1-99.88\%) = 0.84$ 个, 其对遗传相似系数的影响仅为 0.24%, 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，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种实物进行平行实验，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。

2.3 MNP 标记的品种区分能力

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。本标准使用了 350 个标记位点，数量远大于传统分子标记，可以更好地用于品种及实质性派生品种鉴定，图 5 为 AMPL1690064 位点 MNP 结果的聚类图。

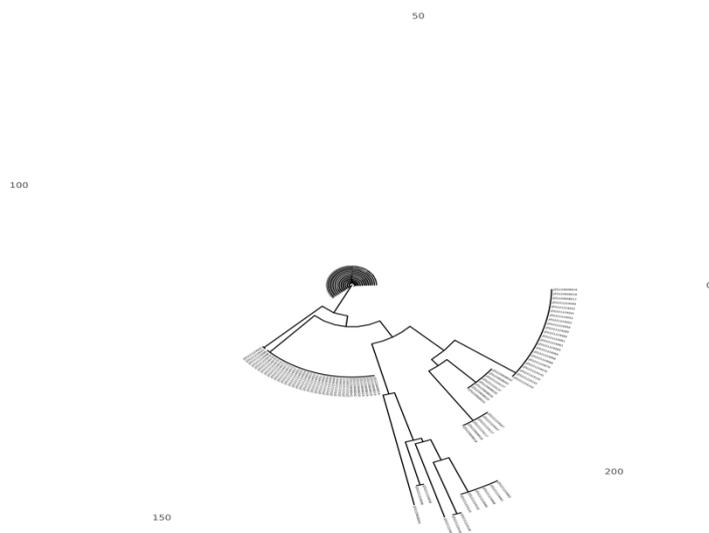


图 5 编号为 AMPL1690064 位点 MNP 结果聚类图

对 319 份金针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 50721 对比较结果（图 6）。50721 对样品的遗传距离的差异位于 0%~100% 之间，共有 45,245（占比 89.20%）对品种间遗传相似系数低于 96%，判定为不同品种；共有 5,476 对品种的遗传相似系数高于 96%，占比为 10.79%，表明 MNP 标记法具有很强的品种区分能力。

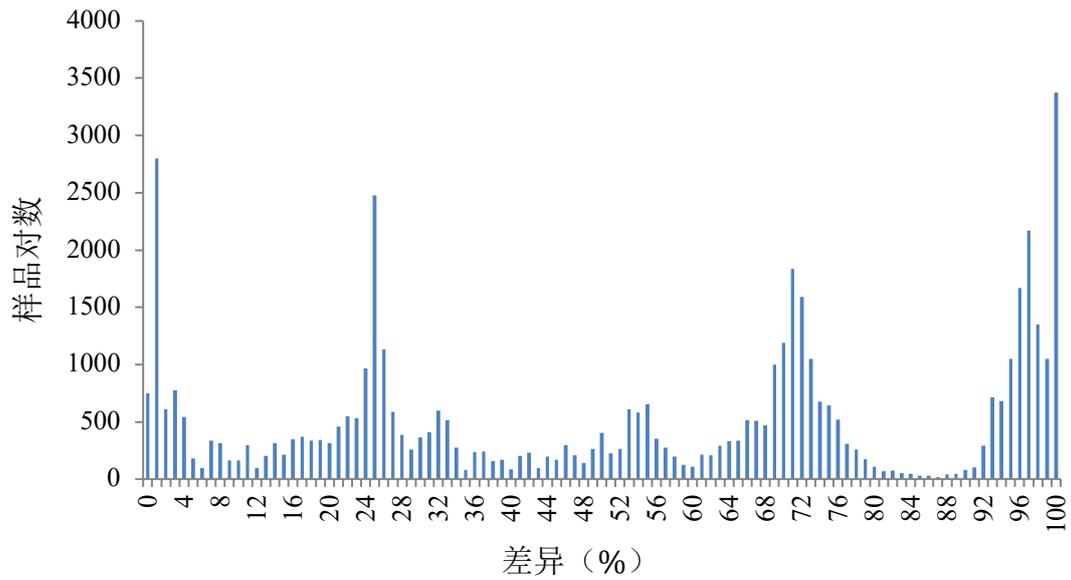


图6 319个金针菇样品间MNP标记位点差异分布

利用MNP标记对供试319份金针菇菌株进行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)。

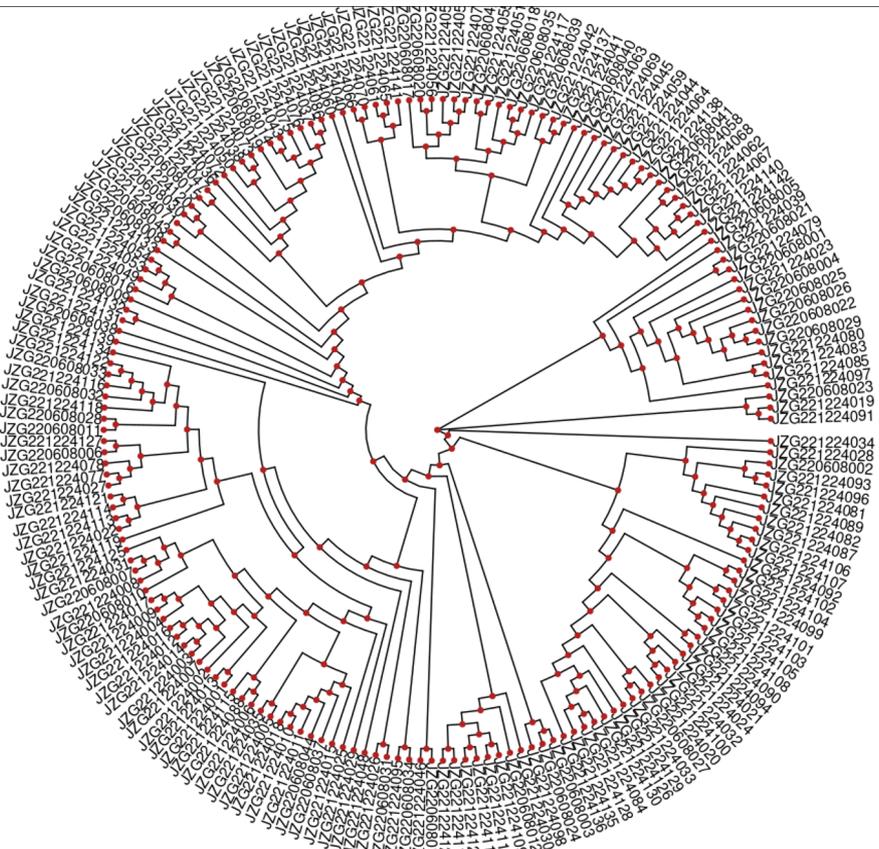


图7 基于350个MNP标记的319份金针菇菌株遗传聚类图

3. 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 8），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。

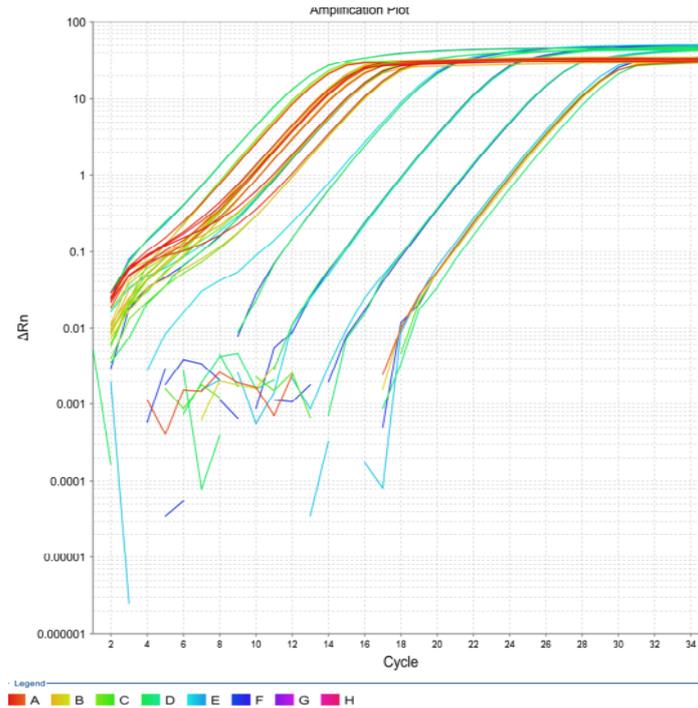


图 8 不同标记位点的扩增曲线

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 319 个金针菇样品，它们的测序覆盖倍数均设置为 700 倍以上，其中共有 318 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 99.69%。

（2）该覆盖倍数在测序成本上是可接受的。

本标准共有 350 个位点，每个位点按 300 bp 计算，700 倍的测序覆盖倍数需要 0.07 G 的测序数据量；每个品种按重复检测 2 次计算，总共需要 0.14 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 14 元，是可以接受的。

5. 关于质控参数 R_1 的设置

本标准中的 R_1 指样品中检出标记位点的比例，标准规定 R_1 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 4。我们按 350 个位点中最大缺失率 5% 计算，缺失位点数目为 17.5 个；缺失位点中，差异位点分布服从实验次数为 17.5 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 1 个和 6 个，观察到的遗传相似度介于 79.25% 和 80.75% 之间；最终推断出遗传相似度的最大偏差为 0.75%，表明在 R_1 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小。

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
350	80%	70	5%	332.5	17.5
缺失位点中的差异位点			观察到的差异位点数 (n_{ij})		
概率保障	最小值	最大值	最大值	最小值	
95%	1	6	64	69	
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		
80.75%	79.25%	0.75%	0.75%		

6. 关于质控参数 R_2 的设置

本标准中 R_2 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 R_2 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，不能穷尽现有全部金针菇品种或者未来可能出现的金针菇品种。可能存在与标准开发过程中使用的金针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 R_2 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 (R_2 的值) 对鉴定结论稳定性的影响见表 5。当 R_1 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 280 个；当 R_2 值为 95%

时，那么，非共同检出位点数量为 14 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 5 个，由此观察到的遗传相似度最大值为 80.64%，遗传相似度 (GS) 偏差为 0.98%。由此可见， R_2 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

可检测位点总数	真实的遗传相似度 (GS)	真实差异位点数 (n_{ij})	R_2 的值	共同检出位点数 (N_{ij})	非共同检出位点数
280	80%	56	95%	266	14
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	5	79.21%	80.64%	0.98%

7. 关于金针菇品种的判定阈值

《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。

7.1 品种鉴定阈值确定

由于我国现行其他作物的相关标准，其他作物品种鉴定阈值均为 80% 以上。我们随机选择了 10 个金针菇品种，在金针菇分子数据库中筛选出了与其遗传相似度 80%~94% 的金针菇品种。将上一步筛选结果的每一对品种进行表型数据筛选，筛选条件为差异性性状数量 ≥ 3 个，共获得 17 对品种数据，结果如下。

表 6 表型差异 3 个性状以上金针菇品种遗传相似度

序号	检测编号	检测编号	遗传相似度	差异性性状数
1	JZG0107	JZG220608011	92.70%	3
2	JZG0107	JZG220608031	81.30%	4
3	JZG220608001	JZG220608031	85.00%	6
4	JZG220608005	JZG220608031	85.00%	5
5	JZG220608012	JZG221224035	82.60%	5

6	JZG220608013	JZG220608012	83.60%	5
7	JZG220608031	JZG220608004	85.00%	6
8	JZG220608031	JZG220608021	85.20%	6
9	JZG220608031	JZG0113	84.20%	6
10	JZG220608031	JZG0161	84.70%	6
11	JZG220608031	JZG0135	84.70%	6
12	JZG220608031	JZG0152	84.90%	6
13	JZG220608031	JZG0108	84.20%	6
14	JZG220608046	JZG220608009	83.30%	5
15	JZG220608050	JZG220608006	80.50%	6
16	JZG221224027	JZG221224035	80.10%	6
17	JZG221224029	JZG220608012	81.00%	6

根据上表筛选结果，随机筛选的遗传相似度 80%~94%的品种中，表型具有明显差异的品种其遗传相似度在 92.70%及以下。两个金针菇品种遗传相似度 < 92%时，其表型有 3 个或多个明显差异。所以我们对遗传相似度 ≥ 92% 的品种进行工厂化栽培，以确定其表型差异情况。

随机选择并整理了遗传相似度在 92%~100% 的 81 对金针菇品种，其来源主要为市场购买金针菇品种以及 DUS 测试样品，进行工厂化栽培并统计性状差异情况见下表。

表 7 不同遗传相似度品种表型差异调查

序号	检测编号 1	检测编号 2	遗传相似度	差异性状
1	JZG220608011	JZG0107	92.70%	菌柄直径
2	JZG221224029	JZG220608050	92.70%	菌盖直径/菌柄直径
3	JZG0148	JZG220608001	93.20%	菌盖直径/菌柄长度
4	JZG0115	JZG0112	93.30%	菌盖直径/菌盖厚度
5	JZG0148	JZG220608025	93.30%	菌盖直径/菌柄直径
6	JZG0115	JZG221224022	93.50%	子实体生育时间/菌盖厚度
7	JZG0148	JZG220608004	93.50%	子实体生育时间/菌柄长度
8	JZG0107	JZG220608050	93.70%	菌柄长度/子实体数量
9	JZG221224012	JZG220608011	93.80%	原基形成时间/菌柄直径
10	JZG221224029	JZG221224035	94.00%	菌柄长度/菌柄直径
11	JZG0148	JZG220608021	94.00%	子实体生育时间/菌柄长度
12	JZG0148	JZG221224034	94.10%	子实体生育时间/子实体数量
13	JZG0148	JZG0111	94.10%	菌盖高度/子实体数量
14	JZG0148	JZG221224032	94.10%	菌柄粘连程度/菌柄长度

15	JZG0148	JZG0114	94.10%	菌盖直径/菌柄长度
16	JZG0148	JZG221224023	94.20%	气生菌丝发生程度/子实体数量
17	JZG0107	JZG220608037	94.20%	菌盖纵切面形状/菌柄长度
18	JZG221224029	JZG220608037	94.20%	菌盖直径/菌柄直径
19	JZG0148	JZG221224024	94.30%	子实体生育时间/菌盖直径
20	JZG221224035	JZG0107	94.30%	菌柄长度/子实体数量
21	JZG0148	JZG220608005	94.50%	子实体生育时间/菌柄长度
22	JZG0148	JZG221224033	94.60%	子实体生育时间/子实体数量
23	JZG0148	JZG0113	94.60%	子实体生育时间/菌柄长度
24	JZG221224030	JZG220608012	94.80%	菌柄长度/子实体数量
25	JZG221224012	JZG220608037	95.30%	菌柄长度/子实体数量
26	JZG221224035	JZG221224012	95.70%	原基形成时间/菌柄长度
27	JZG0146	JZG220608004	95.70%	菌柄长度/子实体数量
28	JZG220608050	JZG220608011	95.80%	子实体生育时间/菌柄长度
29	JZG0146	JZG0114	95.80%	菌盖高度/菌柄长度
30	JZG0146	JZG221224034	95.80%	菌柄长度/子实体数量
31	JZG221224008	JZG220608037	95.80%	菌盖直径/菌柄长度
32	JZG221224031	JZG221224035	95.90%	菌柄长度/子实体数量
33	JZG221224031	JZG220608037	95.90%	菌盖直径/菌柄直径
34	JZG221224008	JZG221224035	95.90%	菌盖直径/菌柄长度
35	JZG0146	JZG0111	96.00%	菌盖直径/菌柄长度
36	JZG221224031	JZG220608050	96.00%	菌盖直径/菌柄直径
37	JZG0146	JZG221224032	96.00%	原基形成时间/菌柄长度
38	JZG0146	JZG220608021	96.00%	菌柄长度/子实体数量
39	JZG221224101	JZG0086	97.16%	无
40	JZG221224103	JZG0085	97.16%	无
41	JZG221224118	JZG0187	97.77%	无
42	JZG221224096	JZG0170	97.81%	无
43	JZG0173	JZG220608004	97.82%	无
44	JZG220608025	JZG0111	98.00%	菌盖直径/菌盖边缘内卷程度
45	JZG221224089	JZG0170	98.07%	无
46	JZG221224102	JZG0170	98.08%	无
47	JZG221224093	JZG240729004	98.29%	无
48	JZG221224096	JZG240729007	98.29%	无
49	JZG220608025	JZG221224024	98.30%	菌柄直径/子实体生育时间
50	JZG221224107	JZG0172	98.46%	无
51	JZG221224102	JZG0168	98.51%	无
52	JZG0078	JZG0174	98.56%	无
53	JZG240509029	JZG220608054	98.57%	无
54	JZG221224089	JZG240729023	98.57%	无
55	JZG0169	JZG220608054	98.58%	无
56	JZG221224126	JZG0078	98.78%	无

57	JZG220608025	JZG220608005	98.80%	菌柄长度/子实体生育时间
58	JZG221224097	JZG0211	98.86%	无
59	JZG240729023	JZG221224023	98.90%	菌盖高度/菌盖边缘内卷程度
60	JZG221224094	JZG0172	99.02%	无
61	JZG221224096	JZG221224126	99.02%	无
62	JZG240729023	JZG221224024	99.10%	菌盖直径/菌盖高度
63	JZG240729023	JZG221224033	99.10%	菌柄直径/菌柄粘连程度
64	JZG220608003	JZG221224130	99.26%	无
65	JZG221224135	JZG0174	99.26%	无
66	JZG0084	JZG220608004	99.27%	无
67	JZG0092	JZG0172	99.27%	无
68	JZG221224094	JZG221224099	99.29%	无
69	JZG221224136	JZG240729023	99.43%	无
70	JZG0078	JZG240509029	99.43%	无
71	JZG0079	JZG0084	99.52%	无
72	JZG221224103	JZG0114	99.53%	无
73	JZG220608027	JZG240729005	99.71%	无
74	JZG220608027	JZG240509031	99.71%	无
75	JZG221224136	JZG0083	99.76%	无
76	JZG0165	JZG0174	99.76%	无
77	JZG0094	JZG0114	100.00%	无
78	JZG0094	JZG240729023	100.00%	无
79	JZG0096	JZG0112	100.00%	无
80	JZG0105	JZG240509037	100.00%	无
81	JZG0165	JZG0166	100.00%	无

根据上表结果，共有 37 对品种表型无明显差异。其遗传相似度在 96.86%~100%之间，表型无差异且遗传相似度最低的为序号 39，样品 JZG221224101 和 JZG0086，其遗传相似度为 97.16%，这两个品种表型无明显差异，不具备特异性。表型有差异的 44 对品种中，37 对遗传相似度在 92%~97%之间，7 对遗传相似度 $\geq 97\%$ 。基于以上试验结果，将向日葵品种鉴定阈值定为 97%。标准文本 10.1.2 品种鉴定判定表述：“当待测品种与对照品种的 $GS \geq 97\%$ 时，判定为“疑同品种”。这里的“疑同”，即是指遗传相似度 $\geq 97\%$ 的品种，并不是表型不具备明显差异的充分条件。

7.2 品种鉴定阈值检验

为检验金针菇品种鉴定阈值，对 10 对经 DUS 测试不具备特异性的品种进行 MNP 检测。结果见下表。

表 8 不具备特异性品种遗传相似度

序号	检测编号	对照样品检测编号	遗传相似度
1	JZG220608021	JZG220608004	99.50%
2	JZG0113	JZG0108	99.80%
3	JZG0112	JZG221224022	99.80%
4	JZG0161	JZG0108	99.80%
5	JZG0136	JZG0108	99.80%
6	JZG0202	JZG0108	99.10%
7	JZG0157	JZG0108	99.80%
8	JZG0162	JZG0108	99.80%
9	JZG0164	JZG0108	100.00%
10	JZG0160	JZG0108	99.30%

对此 10 对样品按照本标准的标记方法进行检测，结论如下：10 对表型无差异的品种中，序号 6 的两品种遗传相似度最低，为 99.10%，序号 9 的两品种遗传相似度最高，为 100%。上述实例可知，在 97% 的品种鉴定阈值下，不具备特异性的品种可以被筛选出来。

由于金针菇基因组约有 37 Mbp 碱基对，目前的任何一种分子标记都无法完全覆盖。目前的技术背景下，分子检测结论与表型测试结论并不能做到完全相符。在金针菇 DUS 测试中也存在遗传相似度 \geq 97%，表型有明显区别的实例。但可以明确的是，遗传相似度越高，表型无差异概率越大。可见在 97% 的阈值下绝大部分不同品种（授权品种）可以被判定为不同品种。

8. 关于金针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 90% 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，金针菇实质性派生品种的判定阈值应该介于 60% 到 96% 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）。

“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金针菇菌株间遗传相似度的结果，推断金针菇实质性派生品种的判定阈值应设置在 60%~96% 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 80.20%

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，获得金针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 319 个供试金针菇菌株，任意两个菌株间的平均遗传差异为 53.78%，那么，在本标准检测的 350 个标记位点中，它们之间有 $350 \times 53.78\% = 188.23$ 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，当两个菌株间的差异位点数量小于 $350 \times (1 - x)$ ，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 188.23 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，金针菇品种杂交后代为非实质性派生品种的平均概率 $p = 1 - BINOM.DIST(350 \times (1 - x), 188.23, 0.5, TRUE)$ ；根据上述公式，计算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，当 $x \geq 60\%$ 时， $P(\text{非 EDV}) \approx 100\%$ （几乎不会误判为 EDV）。

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‘上研 1 号’和菌株 0747（GS 为 2.8%）作为亲本杂交产生了‘上研 1820’，杂交菌株与亲本之间的遗传相似度系数分别为 39.12% 和 18.10%。选取了上研 1 号和菌株 J4137（GS 为 3.1%）作为亲本杂交产生了‘上研金 31’，杂交菌株与亲本之间的遗传相似度系数分别为 40.05% 和 15.63%。中国金针菇品种在正常杂交选育模式下，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低于 60%。若实质性派生品种判定阈值大于等于 60%，杂交选育后代就可以在近 100% 的概率保障下，被判定为非实质性派生品种。

孢子诱变后杂交菌株‘上研 A111’与亲本 2314、‘上研 1 号’（GS 为 75.65%）的遗传相似系数分别为 80.20%、69.90%；单双杂交菌株‘上研 2 号’与亲本‘金 G1’和‘T022’（GS 为 46.70%）之间的遗传相似系数为 58.39%、62.01%。结果表明，若亲本间的遗传相似系数近，则杂交后代与亲本的遗传相似系数较高。

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，实质性派生品种判定阈值下限为 80.20%。

b) 按照“校对规则”，实质性派生品种判定阈值的上限为 97.96%

实质性派生品种判定阈值上限的理论推断。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 94%，相当于在 350 个标记位点中，有 6% 即 21 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 21 个基因位点的难度是很大的。因此，从技术难度上讲，94% 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。

实质性派生品种判定阈值上限的育种检验。生产上，金针菇核心育种材料

的创制和新品种培育大部分是通过优异材料的杂交聚合、分子标记辅助选择等方式获得，而人工诱变、转基因育种和 4 代以上的回交育种等育种行为相对来说应用的比较少。

我们从菌株库中挑选了 2 对组织分离产生菌株，利用 350 个标记进行了分析。**实例一**，菌株 X18 为菌株 T011 通过组织分离获得，利用本标准检测获得两者之间的遗传相似系数为 99.52%。**实例二**，菌株 GMSP 为菌株 T011 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%。

我们利用 350 个 MNP 标记分析了 6 对经自交产生的菌株，菌株 2215、F109、F156 为菌株 2314 通过自交产生的菌株，遗传相似系数分别为 100%、99.35%、99.42%。菌株 2213、F51、F51 为菌株 JZG0107 自交产生的菌株，遗传相似系数分别为 97.96%、97.70%、97.70%。

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，金针菇的实质性派生品种判定阈值上限为 97.96%。

(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。在国家标准《植物品种鉴定 MNP 标记法》（GB/T 38551-2020）中，植物新品种的判定阈值为 96%，因此，金针菇实质性派生品种的判定阈值应该小于 96%。而本标准中实质性派生品种的判定阈值为 94%，是满足本项要求的。

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

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 319 个供试的金针菇品种，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 5 中所设定的实质性派生品

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 94%时，319 个菌株中有 11.34%比例可能为实质性派生品种，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 9 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%
实质性派生品种比例(319)	7.00%	8.20%	9.73%	10.80%	11.15%	11.34%	12.01%
实质性派生品种比例(83)	7.27%	9.80%	10.40%	11.26%	11.89%	12.81%	13.23%
实质性派生品种阈值	92%	91%	90%	89%	88%	87%	86%
实质性派生品种比例(319)	12.63%	12.96%	13.27%	13.86%	14.05%	14.45%	15.07%
实质性派生品种比例(83)	13.35%	13.62%	14.39%	15.14%	16.09%	16.48%	17.07%
实质性派生品种阈值	85%	84%	83%	82%	81%	80%	79%
实质性派生品种比例(319)	15.49%	16.17%	16.89%	17.55%	18.22%	18.84%	19.74%
实质性派生品种比例(83)	17.73%	18.44%	19.49%	20.02%	20.80%	21.63%	22.59%
实质性派生品种阈值	78%	77%	76%	75%	74%	73%	72%
实质性派生品种比例(319)	20.82%	21.86%	23.77%	28.65%	30.88%	32.04%	32.79%
实质性派生品种比例(83)	24.94%	27.12%	30.36%	33.70%	35.43%	33.61%	37.25%

(4) 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 94%

综合上述三点理由，仅考虑科学因素，实质性派生品种的判定阈值应设置在 80.20%~97.96%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），结合二项式分布理论和不同育种单位的育种实例，推断出实质性派生品种判定阈值应设置在 80.20%~97.96%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 94%。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%~96%之间。本标准采用遗传相似系数 94%作为实质性派生品种的判定阈值，不仅是行业共识，也在科学因素确定的范围（80.20%~97.96%）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 11.34%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，因而未来育成的金针菇品种被判定为实质性派生品种的概率将显著低于 11.34%，能较好地平衡种业创新与种业稳定。

9. 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 94%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。

10. 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/>，用户只须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

所有 350 个标记位点，一次高通量测序检测 350 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 98.34%~99.14%；

(4) 标记分型重现率为 99.40%~99.94%；

(5) 品种的真实性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真实性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 99.40%，说明标记分型准确率高。

表 10 五家验证单位高通量测序数据的质量控制统计结果

编号	平均覆盖倍数 (C1)	检出位点的数目	检出率 (R1)	测序数据质控结论	验证单位
JZG1-11	5832	344	98.29%	通过	武汉市农业科学院蔬菜研究所
JZG2-11	4377	349	99.71%	通过	
JZG3-11	7445	349	99.71%	通过	
JZG4-11	9527	344	98.29%	通过	
JZG1-11	5170	344	98.29%	通过	农业农村部植物新品种测试(昆明)分中心
JZG2-11	6144	350	100.00%	通过	
JZG3-11	7179	339	96.86%	通过	
JZG4-11	7477	331	97.92%	通过	
JZG1-11	6287	344	98.29%	通过	江苏徐淮地区徐州农业科学研究所
JZG2-11	10085	350	100.00%	通过	
JZG3-11	8412	348	99.43%	通过	
JZG4-11	7270	344	98.29%	通过	
JZG1-11	1907	336	96.00%	通过	巴彦淖尔市农牧业科学研究所
JZG2-11	7588	349	99.71%	通过	
JZG3-11	3725	348	99.43%	通过	
JZG4-11	4084	331	98.22%	通过	
JZG1-11	20160	344	98.29%	通过	中国农业科学院油料作物研究所
JZG2-11	26746	347	99.14%	通过	
JZG3-11	15647	350	100.00%	通过	
JZG4-11	13885	344	98.29%	通过	

表 11 五家验证单位与上海市农业科学院对同一标记分型结果重现性的统计结果

品种名称	武汉市农业科学院蔬菜研究所	农业农村部植物新品种测试（昆明）分中心	江苏徐淮地区徐州农业科学研究所	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
JZG1-11	100.00%	100.00%	99.71%	99.40%	100.00%
JZG2-11	99.71%	99.71%	99.43%	99.43%	99.71%
JZG3-11	100.00%	99.70%	99.42%	99.43%	100.00%
JZG4-11	100.00%	97.58%	99.71%	99.40%	100.00%
合计	99.93%	99.25%	99.57%	99.42%	99.93%

表 12 验证单位与上海市农业科学院对同一标记分型结果重现性统计结果

品种 1	品种 2	上海市农业科学院鉴定结果					武汉市农业科学院蔬菜研究所鉴定结果				
		共同检出位点的数目	分型无差异位点的数目	遗传相似系数 (GS)	品种真实性鉴定结论	实质性派生品种鉴定结论	共同检出位点的数目	分型无差异位点的数目	遗传相似系数 (GS)	品种真实性鉴定结论	实质性派生品种鉴定结论
JZG1-11	JZG2-11	344	337	97.97%	疑似存在实质性派生关系	疑似存在实质性派生关系	343	337	98.25%	疑似存在实质性派生关系	疑似存在实质性派生关系
JZG1-11	JZG3-11	343	337	98.25%	疑似存在实质性派生关系	疑似存在实质性派生关系	343	337	98.25%	疑似存在实质性派生关系	疑似存在实质性派生关系
JZG1-11	JZG4-11	337	105	31.16%	不同品种	不存在实质性派生关系	338	110	32.54%	不同品种	不存在实质性派生关系
JZG2-11	JZG3-11	349	348	99.71%	疑似存在实质性派生关系	疑似存在实质性派生关系	348	348	100.00%	疑似存在实质性派生关系	疑似存在实质性派生关系
JZG2-11	JZG4-11	343	108	31.49%	不同品种	不存在实质性派生关系	343	114	33.24%	不同品种	不存在实质性派生关系
JZG3-11	JZG4-11	343	107	31.20%	不同品种	不存在实质性派生关系	343	115	33.53%	不同品种	不存在实质性派生关系

注：由于表格限制，仅展示了武汉市农业科学院蔬菜研究所的比较结果。

《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》
标准技术验证报告

我单位按照标准草案，鉴定了4个待测品种。上海市农业科学院同样采用该标准草案检测上述4个待测品种，分析并对比了两个单位的检测数据。实验结果见附件1-附件3。具体如下：(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350个标记位点，一次高通量测序检测了4个样品×350个标记=1400个标记位点；(2) 我单位获得了4个样品的测序数据，全部通过了标准草案规定的质量控制标准；(3) 我单位检测的4个样品×350个标记=1400个标记位点中，共检出1386个标记位点，平均检出率为99.00%；(4) 我单位与上海市农业科学院共同检出的1384个标记位点中，共有1383个标记位点的分型结果在两个单位间无差异，标记分型重现率为99.93%。(5) 本单位和上海市农业科学院利用本标准草案分别获得了6对品种的真实性和实质性派生品种判定结论，全部鉴定结论在两个单位间保持一致。

验证结论：该标准草案具备通用性。依据该标准草案规定的DNA提取方法、PCR扩增反应条件、扩增产段检测方法等，可在不同实验室间得出高度一致的品种真实性和实质性派生品种鉴定结论。

验证人：王彦新 审核人：孙玉利
验证单位（盖章）：
2023年 10 月 18 日
蔬菜研究所

《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》
标准技术验证报告

我单位按照标准草案，鉴定了4个待测品种。上海市农业科学院同样采用该标准草案检测上述4个待测品种，分析并对比了两个单位的检测数据。实验结果见附件1-附件3。具体如下：(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350个标记位点，一次高通量测序检测了4个样品×350个标记=1400个标记位点；(2) 我单位获得了4个样品的测序数据，全部通过了标准草案规定的质量控制标准；(3) 我单位检测的4个样品×350个标记=1400个标记位点中，共检出1364个标记位点，平均检出率为98.27%；(4) 我单位与上海市农业科学院共同检出的1362个标记位点中，共有1352个标记位点的分型结果在两个单位间无差异，标记分型重现率为99.25%。(5) 本单位和上海市农业科学院利用本标准草案分别获得了6对品种的真实性和实质性派生品种判定结论，全部鉴定结论在两个单位间保持一致。

验证结论：该标准草案具备通用性。依据该标准草案规定的DNA提取方法、PCR扩增反应条件、扩增产段检测方法等，可在不同实验室间得出高度一致的品种真实性和实质性派生品种鉴定结论。

验证人：赵森 审核人：陈树斌
验证单位（盖章）：
2023年 10 月 20 日

《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》
标准技术验证报告

我单位按照标准草案，鉴定了4个待测品种。上海市农业科学院同样采用该标准草案检测上述4个待测品种，分析并对比了两个单位的检测数据。实验结果见附件1-附件3。具体如下：(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350个标记位点，一次高通量测序检测了4个样品×350个标记=1400个标记位点；(2) 我单位获得了4个样品的测序数据，全部通过了标准草案规定的质量控制标准；(3) 我单位检测的4个样品×350个标记=1400个标记位点中，共检出1386个标记位点，平均检出率为99.00%；(4) 我单位与上海市农业科学院共同检出的1384个标记位点中，共有1378个标记位点的分型结果在两个单位间无差异，标记分型重现率为99.57%。(5) 本单位和上海市农业科学院利用本标准草案分别获得了6对品种的真实性和实质性派生品种判定结论，全部鉴定结论在两个单位间保持一致。

验证结论：依据该标准草案规定的DNA提取方法、PCR扩增反应条件、扩增产段检测方法等，可在不同实验室间得出高度一致的品种真实性和实质性派生品种鉴定结论。

验证人：谢昊 审核人：范一斌
验证单位（盖章）：
2023年 10 月 18 日

《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》
标准技术验证报告

我单位按照标准草案，鉴定了4个待测品种。上海市农业科学院同样采用该标准草案检测上述4个待测品种，分析并对比了两个单位的检测数据。实验结果见附件1-附件3。具体如下：(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350个标记位点，一次高通量测序检测了4个样品×350个标记=1400个标记位点；(2) 我单位获得了4个样品的测序数据，全部通过了标准草案规定的质量控制标准；(3) 我单位检测的4个样品×350个标记=1400个标记位点中，共检出1364个标记位点，平均检出率为98.34%；(4) 我单位与上海市农业科学院共同检出的1364个标记位点中，共有1356个标记位点的分型结果在两个单位间无差异，标记分型重现率为99.42%。(5) 本单位和上海市农业科学院利用本标准草案分别获得了6对品种的真实性和实质性派生品种判定结论，全部鉴定结论在两个单位间保持一致。

验证结论：该标准草案具备通用性。依据该标准草案规定的DNA提取方法、PCR扩增反应条件、扩增产段检测方法等，可在不同实验室间得出高度一致的品种真实性和实质性派生品种鉴定结论。

验证人：杨晓芳 审核人：陈树斌
验证单位（盖章）：
2023年 10 月 20 日

《金针菇品种及其实质性派生品种鉴定 MNP 标记法》
标准技术验证报告

我单位按照标准草案，鉴定了4个待测品种。上海市农业科学院同样采用该标准草案检测上述4个待测品种，分析并对比了两个单位的检测数据。实验结果见附件1-附件3。具体如下：(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350个标记位点，一次高通量测序检测了4个样品×350个标记=1400个标记位点；(2) 我单位获得了4个样品的测序数据，全部通过了标准草案规定的质量控制标准；(3) 我单位检测的4个样品×350个标记=1400个标记位点中，共检出1385个标记位点，平均检出率为98.93%；(4) 我单位与上海市农业科学院共同检出的1383个标记位点中，共有1382个标记位点的分型结果在两个单位间无差异，标记分型重现率为99.93%。(5) 本单位和上海市农业科学院利用本标准草案分别获得了6对品种的真实性和实质性派生品种判定结论，全部鉴定结论在两个单位间保持一致。

验证结论：该标准草案具备通用性。依据该标准草案规定的DNA提取方法、PCR扩增反应条件、扩增产段检测方法等，可在不同实验室间得出高度一致的品种真实性和实质性派生品种鉴定结论。

验证人：徐益海 审核人：孙玉利
验证单位（盖章）：
2023年 10 月 18 日

图9 第三方技术验证报告首页

（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，350 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，可以规范对金针菇品种和实质性派生品种鉴定所进行的测试，为金针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金针菇新品种进行保护，还可对国外金针菇品种的引进和利用进行规范管理，促进我国金针菇育种和金针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，350 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、准确的金针菇品种及实质性派生品分子标记鉴定体系的报道。

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 and 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。

《植物品种鉴定 MNP 标记法》标准（GB/T 38551-2020）规定了依据 MNP 标记法鉴定金针菇品种的实验流程，但实验流程不够详细完善，缺乏实质性派生品种判定阈值，无法依据该标准获得实质性派生品种鉴定结论。因此，本文件与 GB / T 38551 比较，最大核心指标的变化是添加了实质性派生品种判定阈值。除实质性派生品种判定阈值外，在附录 A 中，添加了等位基因类型与比例；新添加了附录 B，即品种鉴定详细流程示例；对术语重新进行了定义，例如，MNP 标记定义中取消了 3 个及以上 SNP 的限制，其原因是品种鉴定的核心是多态性，虽然 3 个及以上的 SNP 一般情况下较 3 个及以下的 SNP 多态性更高，但不绝对，取消限制更加符合标记筛选的最底层的要求；除以上修改外，还对 GB/T 38551 中大量的其它内容进行了丰富和修改，以保障标准可以更好地落地实施。

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

本文件作为我国金针菇品种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。本标准为首次制定，不涉及新旧标准的过渡，建议发布后立即实施，尽快用于金针菇品种及实质性派生品种的鉴定。

十、其他应予说明的事项

无。

参 考 文 献

- (1) 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.
- (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.