

《结球甘蓝品种真实性鉴定 SNP 分子标记法》

编制说明

起草单位：中国农业科学院蔬菜花卉研究所、北京市农林科学院蔬菜研究所、农业农村部科技发展中心、全国农业技术推广服务中心

负责人：任君

联系电话：010-82105951

邮箱：renjun@caas.cn

一、工作简况

(一) 任务来源

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) 简称甘蓝, 别名圆白菜、卷心菜、包菜等, 属十字花科芸苔属 (*Brassica*) 的一二年生草本植物。结球甘蓝具有品质好、适应性强、产量高、耐储运等特点, 在我国蔬菜的周年供应中起着重要的作用。现如今, 甘蓝在我国的种植面积达 1400 万亩, 是我国的大宗蔬菜之一。我国近几年育成了大量的优良品种, 目前, 我国审(鉴、认)定或者登记的甘蓝品种超过了 400 份, 其中大部分为杂交一代。随着种业的快速发展, 品种不断增多、种植面积不断扩大, 种子市场上品种套袋经营、以次充好等事件时有发生, 不仅造成了巨大的经济损失, 还使得资源和品种不能得到有效保护。甘蓝育种企业小而分散, 品种更新换代快, 衍生品种较多, 给市场监管和品种保护带来了困难。因此, 建立甘蓝种子分子身份证, 对品种进行快速准确鉴定, 对于假种辨别、产权纠纷、育种者权益保护、规范种子市场、保护农民利益等具有重要意义。

随着分子生物学的发展, 分子标记技术的出现为品种鉴定提供了新的手段。分子标记技术具有周期短、不受环境条件影响、可进行高通量测试分析等优点, 已经在品种鉴定、种子纯度鉴定等方面得到广泛应用。其中, SNP 分子标记是国际植物新品种权保护联盟 (UPOV) BMT 分子测试指南中构建 DNA 指纹数据库的推荐标记之一。近年来, SNP 作为第三代分子标记, 以其数量多、分布广、遗传稳定、易于快速且高通量地检测等优点受到广泛重视。随着测序技术的发展和测序成本的降低, 大量甘蓝重测序数据得以公布。基于分析甘蓝的变异组信息, 可以挖掘更加稳定高效的 SNP 标记。

目前, 甘蓝品种鉴定中常用的是 SSR 等分子标记方法, 但是 SSR 检测方式极易导致不真实、假阳性、假阴性结果; 不能适应自动化、高通量、大规模的要求。与 SSR 标记相比, SNP 具有多个方面的优势: 变异清晰稳定容易检测, 真实性、准确性高; 每个作物均有数以百万计 SNP 可供选择; 适宜于高通量、低成本、自动化快速检测; SNP 分型无需对照品种, 以准确的碱基呈现结果, 可减少人为误差。

以种子管理部门、企业、科研机构、农民的市场需求为导向，研发基于 SNP 分子标记的甘蓝品种身份鉴别、纯度鉴定、品种确权的分子鉴定技术，制定甘蓝品种分子指纹检测标准，能够保证甘蓝品种的真实性，切实保护生产者和育种家的权益，并为甘蓝种质资源和新品种保护提供技术支持，也能够为今后所有作物分子指纹检测发挥示范效应，为种业健康可持续发展提供技术支撑。

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，2023 年 3 月 16 日发），第 244 项，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主持承担《结球甘蓝品种真实性鉴定 SNP 分子标记法》的制定工作，计划编号为 NYB-23142。

（二）主要起草单位

本标准由中国农业科学院蔬菜花卉研究所、北京市农林科学院蔬菜研究所、农业农村部科技发展中心、全国农业技术推广服务中心起草。

（三）编写人员与分工

起草人员与分工见表 1。

表 1 起草人分工情况表

序号	姓名	工作单位	分工
1	杨坤	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	整体鉴定方案、思路制定，标准修改
2	任君	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	项目负责人，鉴定技术流程制定，市场调研，标准编制
3	付深造	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	材料收集，标准修改
4	温常龙	北京市农林科学院蔬菜研究所	体系制定，标准修改
5	张建	北京市农林科学院蔬菜研究所	标记筛选，体系制定，标准修改
6	王红尧	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	标记筛选、指纹数据库构建、数据分析与处理
7	张皓文	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	标记筛选、指纹数据库构建、数据分析与处理
8	金石桥	全国农业技术推广服务中心	标准申请、制定、审定总体流程
9	晋芳	全国农业技术推广服务中心	标准申报、外部验证、实验室比对、标准修改

10	吕红豪	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	材料收集, 标准修改
11	张扬勇	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	材料收集, 标准修改
12	徐东辉	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	标准修改
13	张秀杰	农业农村部科技发展中心	材料收集, 标准修改
14	韩瑞玺	农业农村部科技发展中心	材料收集, 标准修改

(四) 主要工作过程

2015年5月8日,原农业部发布《农作物品种DNA身份鉴定体系构建实施方案》(农办种[2015]18号)文件,明确提出开展农作物品种DNA身份鉴定技术研发及数据库构建工作。本单位自2017年启动结球甘蓝品种DNA指纹分子鉴定技术研究工作,历经5年科学研究,建立起结球甘蓝品种真实性SNP标记鉴定技术体系,形成结球甘蓝SNP分子鉴定技术规范。在一系列工作的基础上于2022年6月开始起草《结球甘蓝品种真实性鉴定SNP分子标记法》初稿。2023年3月根据《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》,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主持承担《结球甘蓝品种真实性鉴定SNP分子标记法》的制定工作。2023年4月开始复筛SNP引物和体系优化,在之前的基础上,不断与检验、育种、种业、管理等各领域专家征询意见,最终形成了现在的《结球甘蓝品种真实性鉴定SNP分子标记法》初稿。2023年10月形成结球甘蓝品种真实性鉴定SNP分子标记法》征求意见稿,并向xx位专家发出征求意见,返回征求意见的专家数目为XX个。

二、标准编制原则和确定标准主要内容

(一) 编制原则

根据结球甘蓝品种的特点,按照农业农村部制定的《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《结球甘蓝品种真实性鉴定SNP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《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

3543.1 农作物种子检验规程 总则》、《 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》。

适用性原则：本规程的全部内容具有可操作性和适用性。

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：本规程采用目前国际国内品种鉴定领域均认可的 SNP 标记技术，以基于 KASP 技术的多种荧光扫描平台如 LGC-SNPline、Douglas Array Tape、荧光定量 PCR 等平台为主，通过与现有的 SSR 标记法、田间 DUS 测试等结果对比，证明采用 SNP 标记技术在结球甘蓝品种真实性鉴定方面可以保证检测结果的规模化、准确性和时效性。该方法的先进性在于不受环境影响和季节约束，检测通量高、数据统计分析简单、数据兼容性强、易实现数据共享、重复性稳定性较高。

（二）主要技术内容

1、分子标记类型的选择

根据 UPOV-BMT 测试指南，结合品种真实性检测的实际情况及检测技术的不断进步，国际上公认用于品种鉴定的 DNA 标记是 SSR 和 SNP 标记。目前，全球范围应用最为广泛成熟的植物品种鉴定技术规程多为 SSR 标记法，而 SNP 作为继 SSR 之后的第三代分子标记具有广阔的应用前景。与 SSR 标记相比，SNP 标记具有以下特征：（1）为共显性标记，反映的是确定序列信息的差异；（2）为二等位基因变异，基因型用共同语言（碱基 A/T/C/G）表示，易实现不同实验室及不同平台间数据整合，适合应用 DNA 指纹库建立；（3）错误率低；（4）在基因组中分布密度更高更均匀；（5）SNP 位点在基因内区域分布较多，与功能基因关联度更高；（6）易实现高通量检测；（7）成本低。SNP 标记被国际种子检验协会（ISTA）、国际植物新品种保护联盟（UPOV）、国际种子贸易联盟（ISF）推荐为作物品种鉴定和指纹数据库构建的优选标记。

2、38 个 SNP 位点组合的筛选和确定

基于前期与北京市农林科学院蔬菜研究所的合作项目《主要蔬菜与油菜品种 DNA 指纹分子鉴定技术研究》中获得的结球甘蓝 SNP 数据，利用 80 份杂交种从 500 对标记中筛选出 90 对结球甘蓝 SNP 标记，随后利用本单位保藏的结球甘蓝品种保护样品 235 份（见表 2）对 90 对 SNP 标记进一步筛选和验证。

表 2 235 份结球甘蓝保护品种信息

材料名称	样品类型	样品来源	材料名称	样品类型	样品来源
中甘 W137	杂交种	品种保护申请品种	苏甘 27	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 16	杂交种	品种保护近似品种	春丰 007	杂交种	品种保护申请品种
苏甘 3 号	杂交种	品种保护申请品种	满月 53	杂交种	品种保护申请品种
华耐 G1202	杂交种	品种保护申请品种	铁头 8 号	杂交种	品种保护近似品种
瑞甘 37	杂交种	品种保护申请品种	探春	杂交种	品种保护申请品种
满月 51	杂交种	品种保护申请品种	双环 419	杂交种	品种保护申请品种
双环 50	杂交种	品种保护近似品种	瑞甘 22	杂交种	品种保护申请品种
Y2	杂交种	品种保护申请品种	铁头 46	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 21	杂交种	品种保护申请品种	满月 56	杂交种	品种保护申请品种
双环 49	杂交种	品种保护近似品种	先甘 382	杂交种	品种保护申请品种
双环 60	杂交种	品种保护申请品种	秀美	杂交种	品种保护申请品种
秦甘 1652	杂交种	品种保护近似品种	先甘 011	杂交种	品种保护申请品种
福兰	杂交种	品种保护申请品种	名图	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 50	杂交种	品种保护近似品种	宿甘 6 号	杂交种	品种保护申请品种
苏甘 65	杂交种	品种保护申请品种	格林	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 17	杂交种	品种保护近似品种	沪甘 394	杂交种	品种保护申请品种
绿宝石	杂交种	品种保护申请品种	争春	杂交种	品种保护申请品种
碧浪	杂交种	品种保护申请品种	申丰六号	杂交种	品种保护近似品种
华耐 G1103	杂交种	品种保护近似品种	春秋臻美	杂交种	品种保护近似品种
苏甘 19	杂交种	品种保护申请品种	秋实 1 号	杂交种	品种保护近似品种
黔甘 3 号	杂交种	品种保护申请品种	草色烟光	杂交种	品种保护申请品种
千美 5 号	杂交种	品种保护近似品种	大尖	杂交种	品种保护近似品种
冬丽 40	杂交种	品种保护近似品种	超级争春	杂交种	品种保护申请品种
苏甘 20	杂交种	品种保护申请品种	苏甘 35	杂交种	品种保护近似品种
满月 55	杂交种	品种保护近似品种	伯爵	杂交种	品种保护申请品种
双环 56	杂交种	品种保护近似品种	邢甘 26	杂交种	品种保护申请品种
中甘 26	杂交种	品种保护近似品种	邢甘 24	杂交种	品种保护申请品种
中甘 27	杂交种	品种保护申请品种	捷甘 20	杂交种	品种保护申请品种
中甘 28	杂交种	品种保护申请品种	先甘 009	杂交种	品种保护申请品种
中甘 10 号	杂交种	品种保护申请品种	先甘 097	杂交种	品种保护申请品种
中甘 8 号	杂交种	品种保护近似品种	邢甘 30	杂交种	品种保护申请品种
惠丰 5 号	杂交种	品种保护申请品种	邢甘 45	杂交种	品种保护申请品种
惠丰 4 号	杂交种	品种保护近似品种	春秋婷美	杂交种	品种保护申请品种
铁头八号	杂交种	品种保护申请品种	春秋秀美	杂交种	品种保护申请品种
中甘 15 号	杂交种	品种保护申请品种	展望	杂交种	品种保护申请品种
华耐 G1301	杂交种	品种保护申请品种	捷甘 250	杂交种	品种保护近似品种
希望	杂交种	品种保护近似品种	世农 200	杂交种	品种保护近似品种
华耐 0903	杂交种	品种保护申请品种	秦萌 1455	杂交种	品种保护近似品种
中甘 15	杂交种	品种保护近似品种	秦萌 1597	杂交种	品种保护申请品种

铁头四号	杂交种	品种保护申请品种	先甘 005	杂交种	品种保护近似品种
北京早熟	杂交种	品种保护近似品种	先甘 028	杂交种	品种保护申请品种
先甘 035	杂交种	品种保护申请品种	春早 2	杂交种	品种保护申请品种
先甘 025	杂交种	品种保护申请品种	中甘 D83	杂交种	品种保护近似品种
先甘 802	杂交种	品种保护近似品种	京甘 611	杂交种	品种保护近似品种
先甘 816	杂交种	品种保护近似品种	双环 58	杂交种	品种保护近似品种
先甘 815	杂交种	品种保护近似品种	双环 66	杂交种	品种保护近似品种
先甘 803	杂交种	品种保护申请品种	MS23	杂交种	品种保护近似品种
先甘 809	杂交种	品种保护申请品种	湖月	杂交种	品种保护近似品种
中甘 11	杂交种	品种保护近似品种	捷甘 111	杂交种	品种保护近似品种
雪宝	杂交种	品种保护申请品种	中甘 8398	杂交种	品种保护近似品种
庆丰	杂交种	品种保护申请品种	双环 40	杂交种	品种保护申请品种
中甘 11 号	杂交种	品种保护申请品种	双环 515	杂交种	品种保护近似品种
8398	杂交种	品种保护近似品种	苏甘 55	杂交种	品种保护申请品种
中甘 56 号	杂交种	品种保护申请品种	中 588	杂交种	品种保护近似品种
中甘 628	杂交种	品种保护近似品种	中 590	杂交种	品种保护申请品种
夏强	杂交种	品种保护申请品种	中甘 596	杂交种	品种保护申请品种
争牛	杂交种	品种保护近似品种	绿缘	杂交种	品种保护申请品种
新夏 50	杂交种	品种保护近似品种	中甘 1305	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 30	杂交种	品种保护申请品种	中甘 D22	杂交种	品种保护近似品种
瑞甘 55	杂交种	品种保护申请品种	劲绿	杂交种	品种保护申请品种
中甘 23 号	杂交种	品种保护申请品种	菲绿	杂交种	品种保护申请品种
中甘 192 号	杂交种	品种保护申请品种	金绿 630	杂交种	品种保护申请品种
中甘 103 号	杂交种	品种保护申请品种	德瑞 55	杂交种	品种保护申请品种
中甘 301 号	杂交种	品种保护近似品种	JM1214	杂交种	品种保护申请品种
甘蓝 628	杂交种	品种保护申请品种	寒秀 801	杂交种	品种保护申请品种
中甘 19 号	杂交种	品种保护申请品种	图翠一号	杂交种	品种保护申请品种
中甘 96 号	杂交种	品种保护申请品种	绿峰 68	杂交种	品种保护申请品种
中甘 101 号	杂交种	品种保护近似品种	富春	杂交种	品种保护申请品种
中甘 588	杂交种	品种保护近似品种	先甘 419	杂交种	品种保护近似品种
中甘 18 号	杂交种	品种保护近似品种	CXIZCFK27DH17	杂交种	品种保护申请品种
中甘 9 号	杂交种	品种保护申请品种	菁山	杂交种	品种保护申请品种
中甘 30	杂交种	品种保护申请品种	中甘 602	杂交种	品种保护近似品种
中甘 166	杂交种	品种保护近似品种	中甘 107	杂交种	品种保护申请品种
中甘 167	杂交种	品种保护申请品种	中甘 108	杂交种	品种保护申请品种
中甘 35	杂交种	品种保护近似品种	世纪	杂交种	品种保护申请品种
中甘 196	杂交种	品种保护申请品种	C001CMS	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 31	杂交种	品种保护近似品种	中甘 C33	杂交种	品种保护申请品种
琴萌 519	杂交种	品种保护申请品种	中甘 C40	杂交种	品种保护申请品种
瑞甘 26	杂交种	品种保护近似品种	YR 中甘 628	杂交种	品种保护申请品种
先甘 017	杂交种	品种保护申请品种	中甘 828	杂交种	品种保护申请品种
先甘 018	杂交种	品种保护申请品种	忠兴天宝	杂交种	品种保护申请品种
先甘 045	杂交种	品种保护近似品种	嘉春	杂交种	品种保护近似品种

东农 613	杂交种	品种保护申请品种	楚圆春 114	杂交种	品种保护申请品种
中甘 YR21	杂交种	品种保护近似品种	楚甘 231	杂交种	品种保护近似品种
16C3441	杂交种	品种保护申请品种	楚圆春 109	杂交种	品种保护近似品种
16C3480	杂交种	品种保护申请品种	绿满园	杂交种	品种保护申请品种
17C3627	杂交种	品种保护申请品种	精英 2 号	杂交种	品种保护申请品种
东农 614	杂交种	品种保护申请品种	泽鸿暄绿	杂交种	品种保护申请品种
XC1010	杂交种	品种保护近似品种	楚圆春 105	杂交种	品种保护申请品种
绿凤	杂交种	品种保护申请品种	夏之味	杂交种	品种保护申请品种
中甘 605	杂交种	品种保护申请品种	米女 2 号	杂交种	品种保护申请品种
中甘 606	杂交种	品种保护近似品种	瑞甘 27	杂交种	品种保护申请品种
中甘 607	杂交种	品种保护申请品种	奥奇娜	杂交种	品种保护申请品种
中甘 105	杂交种	品种保护申请品种	西园秋丰	杂交种	品种保护申请品种
中甘 106	杂交种	品种保护近似品种	紫霞甘蓝	杂交种	品种保护申请品种
京甘 161	杂交种	品种保护申请品种	奥萨罗	杂交种	品种保护近似品种
京甘 5 号	杂交种	品种保护申请品种	普来米罗	杂交种	品种保护近似品种
金绿美	杂交种	品种保护近似品种	先甘 051	杂交种	品种保护申请品种
美华	杂交种	品种保护申请品种	精英	杂交种	品种保护申请品种
成功早生	杂交种	品种保护申请品种	F27148	杂交种	品种保护申请品种
13C2932	杂交种	品种保护申请品种	双环 012	杂交种	品种保护近似品种
绿绮罗	杂交种	品种保护申请品种	春甘 108	杂交种	品种保护申请品种
楚圆春 106	杂交种	品种保护申请品种	JM1636	杂交种	品种保护申请品种
楚圆春 107	杂交种	品种保护申请品种	JM1655	杂交种	品种保护申请品种
楚甘 668	杂交种	品种保护申请品种	JM1530	杂交种	品种保护近似品种
春光珠	杂交种	品种保护申请品种	JM1001	杂交种	品种保护申请品种
金绿 139	杂交种	品种保护申请品种	绿宝宝	杂交种	品种保护申请品种
中甘 1388	杂交种	品种保护近似品种	621DH51	杂交种	品种保护申请品种
中甘 CQ33	杂交种	品种保护近似品种	mT0209	自交系	品种保护申请品种
中甘 CQ55	杂交种	品种保护申请品种	WWDH01	亲本	品种保护近似品种
中甘 YN22	杂交种	品种保护近似品种	安迪	不育系	品种保护申请品种
中甘 W51	杂交种	品种保护申请品种	明珠	不育系	品种保护近似品种
极早	杂交种	品种保护近似品种	SS103	不育系	品种保护申请品种
甘蓝 21039	杂交种	品种保护申请品种	Q0316	不育系	品种保护申请品种
春秋 65	杂交种	品种保护申请品种	C777	杂交种	品种保护申请品种
极早二号	杂交种	品种保护申请品种	金绿 007	杂交种	品种保护近似品种
小龙女	杂交种	品种保护近似品种	楚甘 647	杂交种	品种保护近似品种
双环 006	杂交种	品种保护申请品种			

前期先利用其中的 95 份品种 DNA 对 90 对引物进行数据验证，淘汰 30 对扩增不稳定、PIC 值较低的引物，加大样本数量，将 235 份样品全部扩增，综合考虑重复性、稳定性、分型质量、数据缺失率、自动分型情况、兼容多种平台等原则，以及经济、方便、区分未来不断扩容的新品种，选了 38 个 SNP 位点作为品种鉴定首选标记。起草单位整理结果，按照相关要求，完成标准初稿。

基于 38 个 SNP 位点 235 份结球甘蓝保护品种标准样品指纹数据，利用北京市农林科学院蔬菜研究所自主研发的软件计算发现，本标准识别率达到 99.85%。标记的 PIC 值和缺失率见表 3。

表 3 结球甘蓝保护品种鉴定的 38 个 SNP 位点多态性信息

标记名称	Chr	最小等位变异频 (MAF)	多态性指 (PIC)	缺失率
BoSNP1	1	0.36	0.46	0.00%
BoSNP2	1	0.35	0.45	1.09%
BoSNP3	1	0.50	0.50	1.82%
BoSNP4	1	0.29	0.41	2.55%
BoSNP5	2	0.45	0.49	1.09%
BoSNP6	2	0.48	0.50	2.18%
BoSNP7	2	0.27	0.39	0.36%
BoSNP8	3	0.41	0.48	0.36%
BoSNP9	3	0.41	0.48	0.36%
BoSNP10	3	0.35	0.46	0.73%
BoSNP11	3	0.37	0.46	1.45%
BoSNP12	4	0.37	0.46	2.18%
BoSNP13	4	0.46	0.50	1.82%
BoSNP14	4	0.26	0.39	1.09%
BoSNP15	4	0.20	0.31	1.45%
BoSNP16	4	0.29	0.41	0.36%
BoSNP17	5	0.37	0.47	0.73%
BoSNP18	5	0.11	0.19	1.45%
BoSNP19	5	0.38	0.47	1.82%
BoSNP20	6	0.49	0.50	1.09%
BoSNP21	6	0.47	0.50	1.82%
BoSNP22	6	0.39	0.48	0.36%
BoSNP23	6	0.42	0.49	0.00%
BoSNP24	6	0.29	0.41	0.36%
BoSNP25	7	0.45	0.50	0.73%
BoSNP26	7	0.44	0.49	0.36%
BoSNP27	7	0.47	0.50	0.73%
BoSNP28	7	0.27	0.40	0.73%
BoSNP29	8	0.46	0.50	1.09%
BoSNP30	8	0.39	0.48	0.00%
BoSNP31	8	0.37	0.47	0.36%
BoSNP32	8	0.26	0.38	0.00%
BoSNP33	8	0.40	0.48	0.00%
BoSNP34	9	0.35	0.46	1.45%
BoSNP35	9	0.46	0.50	1.82%

BoSNP36	9	0.37	0.46	1.09%
BoSNP37	9	0.47	0.50	1.82%
BoSNP38	9	0.36	0.46	0.00%
AVERAGE		0.38	0.45	1.00%

为了验证这套标记体系的鉴别力，我们又采集了 63 份市场品种，进行验证。其中，两个不同名的市场品种差异位点数为 0，咨询育种人后，得知两个品种属于近似品种，两个品种的差别在于一个品种中插入一个抗性基因。由于 SNP 标记中没有相关的标记，因此，没有把两个品种区分开来。

同时，我们利用 23 组不同年份或者不同地区收集的共 51 份品种进行了 38 个标记体系稳定性验证。其中有 12 组品种不同年份间差异位点数为 0，有 7 组品种不同年份间差异位点数为 1，有 4 组品种不同年份间差异位点数为 2；同一年在不同地区收集的 3 组品种差异位点数为 0，同一年在不同地区收集的 6 组品种差异位点数为 1，同一年在不同地区收集的 1 组品种差异位点数为 2（见表 4）。咨询育种人后，得知甘蓝育种企业小而分散，甘蓝品种保护期结束后，这些企业在繁种过程中，可能使用了不纯的亲本。

3、试样样本量确定依据

本文件取样策略依然沿用 SSR 标记的实验结果作为本文件的取样依据。全球甘蓝品种鉴定应至少要含有 30 个以上个体，个体数量越多越具有代表性。

4、鉴定意见确定依据

（1）38 个 SNP 位点在不同检测平台基因分型结果的比较

对 38 个位点进行了验证，比较 96 份材料 38 个 SNP 位点在不同平台基因分型的结果显示，LGC-SNPline 与荧光定量 PCR 两个平台基因分型数据一致率达 99.27%。

在 XXX、XXX、XXX 等多家单位分别对 38 个位点进行了验证，比较 X 份材料 38 个 SNP 位点在不同平台基因分型的结果显示，LGC-SNPline 和荧光定量两个平台基因分型数据一致率达 XX。

（2）38 个 SNP 位点在不同实验室相同 LGC-SNPline/荧光定量平台的基因分型数据的比较

将 X 份样品的 38 个 SNP 位点分别在 XXX、XXX、XXX 等单位进行了验证，数据一致率达 XX，表明所筛选的位点在不同实验室间具有较好的重演性。

（3）品种鉴定允许误差确定依据

298 份样品有 23 组 51 份同名样品，其中 12 组 27 份样品差异位点为 0，10 组 23 份差异位点为 1，4 组 9 份差异位点为 2（见表 4），说明同名的品种大概率是同一品种，但因来源或批次不同，部分样品会产生 2 个位点的差异，因而将阈值定为 3。

表 4 同名品种差异位点数

分组	品种编号	品种名称	品种来源	品种编号	品种名称	品种来源	检测标记数量	差异标记数量
1	2017-016	苏甘 65	申请品种	2023-081	苏甘 65	江苏省农科院赠送	36	0
2	2019-060	苏甘 55	申请品种	2023-082	苏甘 55	江苏省农科院赠送	36	0
3	2019-001	春秋臻美	申请品种	2023-083	春秋臻美	江苏省农科院赠送	36	0
4	2017-117	中甘 11 号	近似品种	2023-093	中甘 11 号	甘蓝课题组赠送	36	0
	2017-117	中甘 11 号	近似品种	2017-111	中甘 11 号	近似品种	36	1
	2017-111	中甘 11 号	近似品种	2023-093	中甘 11 号	甘蓝课题组赠送	36	1
5	2017-084	中甘 15 号	近似品种	2017-091	中甘 15 号	近似品种	36	0
	2017-084	中甘 15 号	近似品种	2023-094	中甘 15 号	甘蓝课题组赠送	36	2
	2017-091	中甘 15 号	近似品种	2023-094	中甘 15 号	甘蓝课题组赠送	36	2
6	2019-084	中甘 18	申请品种	2023-095	中甘 18	甘蓝课题组赠送	36	2
7	2023-053	中甘 21	市场收集	2023-096	中甘 21	甘蓝课题组赠送	36	1
8	2017-052	中甘 26	近似品种	2023-099	中甘 26	甘蓝课题组赠送	35	0
9	2017-053	中甘 27	申请品种	2023-100	中甘 27	甘蓝课题组赠送	34	1
10	2017-054	中甘 28	申请品种	2023-101	中甘 28	甘蓝课题组赠送	36	0
11	2019-080	中甘 96	申请品种	2023-106	中甘 96	甘蓝课题组赠送	36	2
12	2019-081	中甘 101	申请品种	2023-107	中甘 101	甘蓝课题组赠送	36	0
13	2019-076	中甘 103	申请品种	2023-109	中甘 103	甘蓝课题组赠送	35	0
14	2020-055	中甘 106	近似品种	2023-111	中甘 106	甘蓝课题组赠送	36	1
15	2019-095	中甘 196	申请品种	2023-110	中甘 196	甘蓝课题组赠送	36	0
16	2019-082	中甘 588	申请品种	2023-110	中甘 588	甘蓝课题组赠送	36	1
17	2017-122	中甘 628	申请品种	2019-078	中甘 628	近似品种	36	0
	2017-122	中甘 628	申请品种	2023-118	中甘 628	甘蓝课题组赠送	36	0
	2019-078	中甘 628	近似品种	2023-118	中甘 628	甘蓝课题组赠送	36	0
18	2019-066	中甘 1305	申请品种	2023-108	中甘 1305	甘蓝课题组赠送	36	1
19	2022-060	中甘 1388	申请品种	2023-104	中甘 1388	甘蓝课题组赠送	36	1
20	2017-116	庆丰	申请品种	2023-121	庆丰	甘蓝课题组赠送	35	1
21	2023-033	春丰甘蓝	市场收集	2023-038	春丰甘蓝	市场收集	35	1
	2023-033	春丰甘蓝	市场收集	2023-043	春丰甘蓝	市场收集	35	1
	2023-038	春丰甘蓝	市场收集	2023-043	春丰甘蓝	市场收集	35	2
22	2023-039	晚丰甘蓝	市场收集	2023-044	晚丰甘蓝	市场收集	36	0
	2023-039	晚丰甘蓝	市场收集	2023-123	晚丰甘蓝	甘蓝课题组赠送	36	1
	2023-044	晚丰甘蓝	市场收集	2023-123	晚丰甘蓝	甘蓝课题组赠送	36	1
23	2023-037	京丰一号	市场收集	2023-122	京丰一号	甘蓝课题组赠送	36	0

综上所述，SNP 标记阈值定为 3，当品种间差异位点数 ≥ 3 时，排除两者为同一品种；当品种间差异位点数为 1-2 时，不确定两者为同一品种；当差异位点数为 0 时，不排除两者为同一品种。

5、DNA 提取方法的选择

结球甘蓝送检的材料多样，有种子、叶片、幼苗、叶球等。随着技术的发展，可用的 DNA 提取方法越来越多。因此，无法规定统一的 DNA 提取方式，只要 DNA 提取总量、质量符合 PCR 扩增要求，或经过验证可以稳定获得符合要求 DNA 的提取方法均可使用。DNA 提取方法应保证提取的 DNA 浓度与质量符合 PCR 扩增的要求，DNA 无降解，紫外光吸光度 OD_{260}/OD_{280} 宜介于 1.7~2.0。本标准推荐使用改良的 CTAB 法，具体方法如下：

取幼苗或叶片 200 mg~300 mg，置于 2.0 mL 离心管，加液氮充分研磨；每管加入 600 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液，充分混合，65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min~60 min，期间多次轻缓颠倒混匀。每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇（24:1），轻缓混匀后静置 10 min；以 12 000 r/min 转速离心 10 min。吸取上清液转移至新的离心管中，再加入等体积预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀，-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min，4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液，用 70%乙醇溶液洗涤 2 遍，晾干，加入 100 μ L 超纯水或 TE 缓冲液充分溶解，检测 DNA 浓度后 4 $^{\circ}$ C 备用。

6、PCR 反应体系配制及扩增条件优化

本文件采用 LGC 公司的 1536 板对 DNA 模板用量进行了摸索，最终确定不去除 RNA 的最佳 DNA 用量是每个反应 30 ng 全基因组 DNA，而去除 RNA 的最佳 DNA 用量是每个反应 15 ng 全基因组 DNA。同时对扩增循环数也进行了优化，最终确定所有 38 个 SNP 标记的基础扩增循环数定为 36 个，阴性空白对照 NTC 保持在原点附近，且两种纯合类型和杂合类型聚类紧凑，分型理想，当聚类效果不理想或未达到扩增终点时，再以 3 个循环为单位循序渐进增加循环数直到达到理想分型效果为止。最终确定了微孔板 96 孔板、384 孔板和 1536 板的 PCR 反应体系（见表 5）及扩增条件。

表 5 基于微孔板平台的 PCR 反应体系

微孔板类型	96 微孔板 (μ L)	384 微孔板 (μ L)	微量反应孔膜 (μ L)
-------	----------------------	-----------------------	----------------------

DNA 模板 (30 ng/μL)	1.5	3 (烘干)	1.5 (烘干)
2×PCR MIX	5	3	2
引物混合液	0.14	2	1.5
ddH ₂ O	3.36	/	0.486
总反应体积	10	8	5.486

注：反应体系可依据平台、试剂、耗材不同作相应调整。

PCR 扩增通用程序：94 °C 10 min；94 °C 20 s，61-55 °C 60 s，10 次循环（每个循环降低 0.6 °C）；94 °C 20 s，55 °C 60 s，26 次循环；如果初始反应结束检测不到荧光信号，可用如下程序加循环：94 °C 20 s，57 °C 60 s，10 个~20 个循环。

三、主要试验（或验证）的分析、综合报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）主要试验或验证的分析、综述报告

1、SNP 标记与现有 SSR 标记技术标准的筛选效果比较

SNP 标记差异位点数为 0 或 1 的品种，SSR 标记差异位点基本在 3 个以内，SNP 标记差异位点数为 0、1 或 2 的组合有 66 个，SSR 标记差异位点为 0、1 或 2 的组合有 65 个，数据吻合度为 98%，总体分型结果吻合度较高。

表 6 相同组合 SNP 和 SSR 标记差异位点比较

品种名称 1	品种名称 2	差异位点数	
		SNP	SSR
满环 51	铁头 8 号	0	0
瑞甘 30	劲绿	0	0
菲绿	金绿 630	0	0
世纪	楚圆春 109	0	0
中甘 605	中甘 606	0	0
春光珠	小龙女	0	1
格林	华耐 G1103	0	3
极早	小龙女	1	1
金绿美	泽鸿暄绿	1	0
绿凤	忠兴天宝	1	0
甘蓝 628	YR 中甘 628	1	1
苏甘 27	春丰甘蓝	1	2
中甘 26	中甘 8398	2	1

探春	春雷	2	2
苏甘 65	菁山	2	2

2、SNP 标记差异位点数为 0 的组的 DUS 测试性状差异

选择 3 组差异位点数为 0 的组合，瑞甘 30 和劲绿，菲绿和金绿 630，春光珠和小龙女。查阅 DUS 测试 46 个性状描述。经过比较，同组的样品性状描述接近，每对样品间存在不会因认为判断造成较大误差的显著差异的性状有 2-6 个，如说明利用本套引物可筛选到性状相近的样品。

表 7 3 组差异位点数为 0 的组的 DUS 测试性状描述

性状	1 组		2 组		3 组	
	瑞甘 30	劲绿	菲绿	金绿 630	中甘 605	中甘 605
1.幼苗：下子叶颜色	中等绿色	中等绿色	中等绿色	中等绿色	中等绿色	中等绿色
2.幼苗：下胚轴颜色	中等绿色	浅紫色	浅紫色	浅紫色	浅紫色	紫色
3.植株：株型	开展	开展	开展	半开展	半开展	半开展
4.植株：高度	高	中	中	中	高	高
5.植株：开展度	中	大	大	中	中	中
6.叶球：外茎长度	中	长	长	长	长	长
7.外叶：形状	卵圆形	椭圆形	倒卵圆形	倒卵圆形	椭圆	圆
8.外叶：长度	中	中	中	中	中	中
9.外叶：宽度	中	宽	宽	宽	中	中
10.外叶：叶端性状	平	凸	凸	凸	平	平
11.外叶：颜色	绿色	绿色	绿色	绿色	灰绿色	灰绿色
12.外叶：颜色深度	中	中	中	中	浅到中	浅到中
13.外叶：花青苷显色	无或极弱	无或极弱	无或极弱	无或极弱	无或极弱	无或极弱
14.外叶：数目	中	中	中	中	中	中
15.外叶：蜡粉	中到多	中	少	少	中	中
16.外叶：叶缘波状密度	中到密	稀	稀	稀	中	中
17.外叶：叶缘波状大小	小	小	小	小	小	小
18.外叶：缺刻	无	无	无	无	无	无
19.外叶：反曲	无	无	无	无	无	无
20.外叶：叶面波纹	弱	中	弱	中	极弱到弱	弱
21.外叶：叶面疱状凸起	弱	弱	弱	弱	弱	弱
22.外叶：叶面疱状凸起大小	极小	中	中	中	小	小
23.外叶：叶脉	不明显	明显	明显	明显	不明显	中
24.外叶：叶柄长度	中				短	短
25.外叶：叶柄横切面形状	圆	圆	圆	圆	扁	圆
26.叶球：叶球相对于外	低于	低于	低于	等于	低于	低于

叶位置						
27.叶球：覆盖类型	完全覆盖	完全覆盖	完全覆盖	完全覆盖	完全覆盖	完全覆盖
28. 仅适用于叶球覆盖的品种：叶球：覆盖包叶数	2片	2片	2片	2片	2片	1片
29. 叶球：覆盖包叶花青苷显色程度	无或极弱	弱	弱	弱	无或极弱	无或极弱
30.叶球：颜色	绿色	绿色	绿色	绿色	绿色	绿色
31.叶球：球色深度	中	中	中	中	中	浅到中
32.1 仅适用于尖球类型：叶球：质量	极小	中	大	大	中	小
32.2 仅适用于圆球类型：叶球：质量	椭圆形	圆形	宽卵圆形（矮尖）	椭圆形	圆形	椭圆形
32.3 仅适用于扁球类型：叶球：质量	凹	平	凸	凸	凸	凸
33.叶球：纵切面形状	尖	圆	尖	圆	圆	圆
34. 叶球：纵切面基部形状	宽	中	中	中	窄	窄
35. 叶球：顶端形状	中	中	长	长	中	中
36. 叶球：横径	短	短	短	中	短	短
37. 叶球：纵径	中	中	中	中	中	中
38. 叶球：相对中心柱长度	黄色	浅黄色	浅黄色	黄色	黄色	黄色
39. 叶球：中心柱横径	极浅到浅	中	中	中	浅到中	浅到中
40. 叶球：球内颜色	极细密到细密	细密	中等	细密	细密	细密
41. 叶球：球内颜色深度	中	紧	中	紧	紧到极紧	紧到极紧
42. 叶球：球内结构	无	无	无	无	无	无
43. 叶球：紧实度	极不易	极不易	极不易	极不易	极不易	极不易
44.叶球：球内花茎						
45.叶球：裂球性	晚	中	早	中	晚	晚
46.1 仅适用于春甘蓝：叶球：熟性	瑞甘 30	劲绿	菲绿	金绿 630	中甘 605	中甘 605
46.2 仅适用于夏、秋甘蓝：叶球：熟性	中等绿色	中等绿色	中等绿色	中等绿色	中等绿色	中等绿色

3、标准在多家单位进行了验证

标准研制单位联合国内多家具有丰富经验的科研院所、第三方检测机构对标准进行重复性、稳定性、一致性的验证工作，数据一致率大于 99%。数据缺失率介于 0.00%-0.4%之间，平均值为 0.067%（见表 8），具体验证数据见验证报告。

提高执法的时效性和高效性，为我国蔬菜安全保驾护航，也必将产生巨大的生态效益、间接或直接的经济效益和社会效益。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无国际标准。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

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。

六、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。

七、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

建议作为推荐性标准予以颁布实施。

八、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

本文件拟规范各级种子质量检验机构在利用 SNP 标记法进行甘蓝品种鉴定时所采用的样本量、位点数、标记引物、仪器设备和检测方法。为了使检测人员理解标准中的要求，应由本文件的起草单位对检测人员进行理论和实操的培训。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。