ICS 65.020.01

CCS B 04

|  |
| --- |
|   |

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—202X

|  |
| --- |
|  |

水稻实质性派生品种鉴定 全基因组测序法

Identification of rice (*Oryza sativa* L.) essentially derived varieties—whole genome sequencing method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

|  |
| --- |
| （征求意见稿） |
| 2025年10月 |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中华人民共和国农业农村部       发布

目  次

[前言 II](#_Toc61953146)

[1 范围 1](#_Toc61953148)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc61953149)

[3 术语和定义 1](#_Toc61953150)

[4 缩略语 2](#_Toc61953152)

[5 原理 2](#_Toc61953153)

[6 主要仪器设备及试剂 2](#_Toc61953155)

[7 溶液配制](#_Toc61953156) 2

[8 检测位点相关信息](#_Toc61953160) 2

[9 检测平台的选择](#_Toc61953171) 2

[10 操作程序](#_Toc61953171) 3

[11 结果计算 4](#_Toc61953172)

[12 结果判定与表述](#_Toc61953172) 4

[附 录 A（规范性）主要仪器设备及试剂](#_Toc61953172) 6

[附 录 B（规范性）溶液配制](#_Toc61953172) 7

[[附 录 C](#_Toc2519)[（规范性）](#_Toc27419)[SNP位点名单及相关信息](#_Toc9923)](#_Toc61953172) 8

前  言

本文件按照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》的规定起草。

本文件的某些内容有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由全国植物新品种测试标准化技术委员会（SAC/TC277）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业基因组研究所、农业农村部科技发展中心、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人： XXX

水稻质性派生品种鉴定 全基因组测序法

1. 范围

本文件规定了利用全基因组测序进行水稻（*Oryza sativa* L.）其实质性派生品种鉴定的操作程序、试剂和仪器设备、结果统计与判定。

本文件适用于自交系及其实质性派生自交系鉴定。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注明日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

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 19557.7 植物品种特异性、一致性和稳定性测试指南 水稻

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 35890 高通量测序数据系列格式规范

YY/T 1723 高通量基因测序仪

NY/T 2594 植物品种鉴定 DNA分子标记法 总则

T/CHIA 21.1 全基因组测序数据分析

NY/T 2745 水稻品种真实性鉴定 SNP标记法

GB/T 45214 人全基因组高通量测序数据质量评价方法

1. 术语和定义

GB/T 30989-2014，GB/T 35537-2017，GB/T 35890-2018，NY/T 2745-2021，NY/T 2594-2016及GB/T 45214-2025，界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出了GB/T 30989-2014, GB/T 35537-2017, GB/T 35890-2018 及 NY/T 2745-2021 中的某些术语和定义

全基因组测序 whole genome sequencing

对生物体整个基因组序列进行测定，以获得完整的基因组信息。

[来源： GB/T 30989-2014]

测序深度 sequencing depth

测序得到的总碱基数目于待测基因组大小的比值。

测序平均长度 average read length of sequencing

测序仪器单次测序能达到的平均读长

[来源：GB/T 35537]

测序覆盖度 sequencing coverage

测序序列覆盖基因组的碱基数与待测基因组大小的比值。

[来源：GB/T 30989]

**平均覆盖深度 average depth of coverage**

测序深度的平均值

[来源：GB/T 30989]

**FASTQ格式 FASTQ format**

FASTQ是基于文本的、保存生物序列（通常是核酸序列）和测序质量信息的、每四行表示一条序列的标准格式。

[来源：GB/T 30890]

**SAM/BAM格式 SAM/BAM format**

SAM 是否基于文本的、存储核酸序列和其测序质量信息的、以每一行表示一条序列、每行以制表符分割成11列的标准格式，测序质量信息使用ASCII字符表示，BAM是SAM格式的二进式格式。

[来源：GB/T 30890]

**参考序列 reference sequence**

测序片段对应的物种基因组序列

[来源：GB/T 30890]

单核苷酸多态性 single nucleotide polymorphism (SNP)

在基因组水平上单个核苷酸变异所引起的DNA序列多态性。

[来源：NY/T 2745]

* 1.

实质性派生品种 essential derived variety，EDV

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。

核心位点 core loci

具有多态性高、重复性好等综合特性，作为统一用于品种指纹数据采集和实质性派生品种鉴定，以保证不同实验室数据具有可比性而优先选用的一套SNP位点。

标准样品 standard sample

国家指定机构保存的具有法定身份的代表品种特征特性的实物种子或DNA样品。

[来源：NY/T 2745]

1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵（cetyltrimethyl ammonium bromide）。

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）。

dNTPs：脱氧核苷三磷酸（deoxyribonucleoside triphosphates）。

EDV：实质性派生品种（essential derived variety）。

PCR：聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）。

SDS：十二烷基苯磺酸钠（sodium dodecyl sulfate）。

SNP：单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism）。

1. 原理

水稻不同品种的基因组在核苷酸序列水平存在差异。基于已公开的超过1万份水稻品种全基因组重测序数据，涵盖国际主流栽培稻资源及我国具有代表性的育成品种，建立了参考基因组序列上的群体SNP位点信息体系。本标准采用全基因组高通量测序技术获取待检品种的全基因组碱基序列，通过与标准样品（对照样品）在群体SNP位点上的基因型进行比对分析，计算样本与标准样品（对照样品）之间的遗传相似度。依据遗传相似度结果，并结合预设的判定阈值，完成水稻实质性派生品种（Essentially Derived Variety, EDV）的鉴定。

1. 主要仪器设备及试剂

见附录A。

1. 溶液配制

见附录B。所用试剂均为分析纯。试剂配制所用水应符合GB/T 6682 规定的一级水的要求。

1. 核心位点相关信息

遴选了15772个SNP位点作为水稻品种实质性派生品种鉴定的核心位点，附录C列出了部分位点信息。

10 DNA提取操作程序

10.1 样品准备

送验样品可为种子、幼苗、叶片、果穗、果皮等组织或器官。样品需扦样时，应符合GB/T 3543.2的规定。试验样品取不少于30个个体的叶片或其他等效物进行混合分析，必要时进行个体检测。

10.2 DNA提取

10.2.1 CTAB法

取试样的幼苗或叶片约200 mg，置于2.0 mL离心管，加液氮充分研磨，或取种子充分磨碎后移入2.0 mL离心管。每管加入700 µL经65 ℃预热的CTAB提取液，充分混合，65 ℃水浴60 min。期间不时多次轻缓颠倒混匀。每管加入等体积的三氯甲烷/异戊醇（24：1）混合液，充分混合后静置10 min，12,000 rpm离心15 min至分相。吸取上清液转移至新的离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀，-20 ℃放置30 min后4 ℃、12,000 rpm离心10 min。弃上清液，加入70%乙醇，旋转数次后离心弃去乙醇溶液，并倒立于垫有滤纸的实验台上，室温放置10 min以上。加入100 µL超纯水或TE缓冲液，充分溶解后供备用。

10.2.2 SDS法

取试样的幼苗或叶片约200～300 mg，或取种子充分磨碎后移入2.0 mL离心管，加入100 µL氯仿后研磨，再加入300 µL SDS提取液，混匀后在10,000 rpm离心2 min。吸取上清液，转移至预先装有300 µL异丙醇和300 µL 5 mol/L氯化钠溶液的1.5 mL离心管中。待成团后，挑出DNA，经70%乙醇洗涤后，加入200 µL TE缓冲液，充分溶解后供备用。

注：以上为推荐的DNA提取方法，DNA质量能够满足基因分型平台检测要求的其他提取方法均适用。DNA溶液的紫外吸光度OD260与OD280的比值宜介于1.8~2.0，A260/230的比值宜>1.5，琼脂糖电泳显示条带单一、DNA无明显降解。

10 全基因组测序

以NGS平台进行全基因组标准测序，其他能达到同样效果的方法也可采用。测序深度为 30x 水稻基因组参考序列覆盖（Oryza sativa ssp. japonica cv. 0.37G 全基因组大小），测序量≥ 11.1Gb。

10.1检测平台的选择

宜选择基于二代NGS测序的检测平台。

10.2 测序读长

 读长为PE150

10.2 有效测序深度

 不低于 30X 水稻基因组参考序列覆盖（Oryza sativa ssp. japonica cv. 0.37G 全基因组大小），以测序长度PE150计算，测序量≥ 11.1Gb

11 结果计算

11.1 数据质控

全基因组测序数据的基因组区域覆盖度应大于90%。

11.2全基因组分析流程

 原始测序数据（Fastq文件）应用具有数据质量统计功能的软件进行质量评价，剔除低质量reads和接头污染序列，生成质控后的数据集。

质控后的数据应用序列比对软件（如BWA）比对到参考基因组（Oryza sativa cv. Nipponbare IRGSP-1.0版本），生成初步比对结果文件。

使用排序工具（如samtools）对比对结果按染色体位置进行排序，并输出标准格式的压缩二进制比对文件（BAM格式）。同时，统计比对数据的测序覆盖度及深度信息。

基于排序后的BAM文件，采用符合标准规范的软件工具进行基因型判定（SNP/InDel calling），并输出标准格式的变异检测结果文件（VCF格式）。

11.3 数据比对

将送检样品与标准样本基因型进行比对，计算位点相似度。

11.4 位点相似度计算

将送验样本与标准样品位点基因型成对比较，去除杂合位点后，位点相似度按公式（1）计算：

 $GS=\frac{n\_{ij}}{N\_{ij}}×100\%$ ........................................（1）

式中：

$GS$——待测品种与对照品种的遗传相似度；

$n\_{ij}$——待测品种与对照品种中均检出的但基因型无任何差异的标记位点的数目；

$N\_{ij}$——待测品种与对照品种中均检出标记位点的数目。

12 结果判定与表述

12.1 判定规则

（1）当待测品种与对照品种的遗传相似度（Genetic Similarity, GS）小于92%时，在符合表型相似性要求的前提下，判定待测品种不属于对照品种的实质性派生品种（Essentially Derived Variety, EDV）。

（2）当待测品种与对照品种的遗传相似度（GS）大于或等于92%时，在符合表型相似性要求的前提下，判定待测品种符合实质性派生品种特征，需进一步结合其他证据综合判定是否存在实质性派生关系。

注：必要时，可结合GB/T 19557.24相关特异性检测结果、转基因品种转化体鉴定结果、育种档案等资料，综合判定待测品种与对照品种之间是否存在实质性派生关系，或是否为同一品种。

12.2 结果表述

 利用全基因组测序法，送检品种 与对照品种 （或数据库中 品种）采用 检测平台进行检测，检测位点数为 ，GS值为 。判定为 。

**附 录 A**

**（规范性）**

**主要仪器设备及试剂**

A.1 主要仪器设备

A.1.1 高速冷冻离心机：转速不低于12 000 rpm/min。

A.1.2 微量移液工作站或微量移液器。

A.1.3 水浴锅或干式恒温金属浴：20 ℃~100 ℃。

A.1.4 紫外分光光度计：波长定点扫描230 nm、260 nm和280 nm。

A.1.5 组织研磨仪。

A.1.6 分析天平：感量为0.01 g。

A.1.7 pH计。

A.1.8 涡旋混合器。

A.1.9 高压灭菌锅。

A.1.10 芯片扫描仪及其配套相关仪器设备（能检测5万个及以上位点）。

A.1.11 杂交炉（20 ℃~100 ℃）。

A.1.12 板式离心机（4 ℃，3 500 g）。

A.1.13 涡旋混合器。

A.1.14 微量移液器。

A.1.15 摇床。

A.1.16 PCR仪（使用96孔或384孔PCR板）。

A.2 主要试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯试剂。

A.2.1 CTAB（C16H33(CH3)3NBr，CAS号：57-09-0）。

A.2.2 三氯甲烷（CHCl3，CAS号：67-66-3）。

A.2.3 异戊醇（C5H12O，CAS号：123-51-3）。

A.2.4 异丙醇（C3H8O，CAS号：67-63-0）。

A.2.5 乙二胺四乙酸二钠（C10H14N2Na2O8，CAS号：139-33-3）。

A.2.6 三羟甲基氨基甲烷（NH2C(CH2OH)3，CAS号：77-86-1）。

A.2.7 氢氧化钠（NaOH，CAS号：1310-73-2）。

A.2.8 氯化钠（NaCl，CAS号：7647-14-5）。

A.2.9 无水乙醇（CH3CH2OH，CAS号：64-17-5）。

A.2.10 盐酸（HCl，CAS号：7647-01-0）。

A.2.11 β-巯基乙醇（C2H6OS, CAS号:60-24-2）。

A.2.12 SDS（C12H25NaSO4, CAS号: 151-21-3）。

A.2.13 RNase A（CAS号:9001-99-4）。

A.2.14 定制SNP芯片及配套试剂。

附录B
（规范性）
溶液配制

试剂配制用水需符合标准GB/T 6682的要求。

B.1 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取186.1 g Na2EDTA • 2H2O溶于800 mL水中，加固体NaOH调pH至8.0，加水定容至1 000 mL，121 ℃高压灭菌20 min。

B.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取60.55 g Tris碱溶于适量水中，加HC1调pH至8.0，加水定容至500 mL，121℃高压灭菌20 min。

B.3 5 mol/L NaCl 溶液

称取146.1 g固体NaCl，加水定容至500 mL，121 ℃高压灭菌20 min。

B.4 CTAB 提取液

5 mol/L NaCl 280 mL、β-巯基乙醇（C2H6OS）10 mL、CTAB 20 g、1 mol/L Tris-HCl 100 mL、0.5 mol/L EDTA 40 mL，加水定容至1 000 mL，4 °C贮存。

B.5 SDS提取液

1 mol/L Tris-HCl 50 mL、0.5 mol/L EDTA 50 mL、5 mol/L NaCl 50 mL和SDS7.5 g混合，加水定容至500 mL。

B.6 TE缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 5 mL和0.5 mol/L EDTA 1 mL，加HCl调pH至8.0，加水定容至500 mL。

附录C
（规范性）
SNP位点名单及相关信息

表C.1列出了推荐核心SNP位点的部分位点物理位置、参考序列的基因型和群体基因型频率。

表C.1SNP位点信息

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 位点编号 | 染色体 | 物理位置 | NIP基因型 | ALT基因型 | ALT基因型频率(3K水稻) |
| SNPChr01\_31478 | Chr01 | 31478 | C | T | 24.68% |
| SNPChr01\_48810 | Chr01 | 48810 | A | T | 99.38% |
| SNPChr01\_99630 | Chr01 | 99630 | T | C | 96.08% |
| SNPChr01\_127321 | Chr01 | 127321 | C | T | 99.74% |
| SNPChr01\_130486 | Chr01 | 130486 | G | C | 98.42% |
| SNPChr01\_131744 | Chr01 | 131744 | T | C | 90.40% |
| SNPChr01\_132705 | Chr01 | 132705 | C | T | 99.42% |
| SNPChr01\_133537 | Chr01 | 133537 | T | C | 3.15% |
| SNPChr01\_137002 | Chr01 | 137002 | A | G | 26.31% |
| SNPChr01\_158319 | Chr01 | 158319 | C | T | 79.13% |
| SNPChr01\_159037 | Chr01 | 159037 | G | A | 97.72% |
| SNPChr01\_159652 | Chr01 | 159652 | T | C | 99.50% |
| SNPChr01\_163757 | Chr01 | 163757 | C | T | 99.32% |
| SNPChr01\_195136 | Chr01 | 195136 | A | G | 0.06% |
| SNPChr01\_227825 | Chr01 | 227825 | C | T | 97.95% |
| SNPChr01\_230783 | Chr01 | 230783 | C | T | 92.46% |
| SNPChr01\_231533 | Chr01 | 231533 | C | T | 96.63% |
| SNPChr01\_235911 | Chr01 | 235911 | A | C | 99.81% |
| SNPChr01\_255067 | Chr01 | 255067 | G | A | 97.57% |
| SNPChr01\_284605 | Chr01 | 284605 | T | C | 23.84% |
| SNPChr01\_293490 | Chr01 | 293490 | T | G | 95.59% |
| SNPChr01\_333157 | Chr01 | 333157 | G | A | 80.33% |
| SNPChr01\_398076 | Chr01 | 398076 | A | T | 35.85% |
| SNPChr01\_405830 | Chr01 | 405830 | C | T | 89.22% |
| SNPChr01\_410332 | Chr01 | 410332 | C | G | 99.32% |
| SNPChr01\_437029 | Chr01 | 437029 | C | T | 96.10% |
| SNPChr01\_437050 | Chr01 | 437050 | T | C | 27.27% |
| SNPChr01\_464906 | Chr01 | 464906 | T | C | 27.96% |
| SNPChr01\_466318 | Chr01 | 466318 | T | G | 98.04% |
| SNPChr01\_466396 | Chr01 | 466396 | G | A | 94.08% |
| SNPChr01\_466762 | Chr01 | 466762 | G | A | 98.62% |
| SNPChr01\_466791 | Chr01 | 466791 | A | G | 97.64% |
| SNPChr01\_469597 | Chr01 | 469597 | G | A | 56.30% |
| SNPChr01\_487893 | Chr01 | 487893 | C | T | 98.75% |
| SNPChr01\_501334 | Chr01 | 501334 | A | G | 89.61% |
| SNPChr01\_606217 | Chr01 | 606217 | T | C | 28.19% |
| SNPChr01\_620305 | Chr01 | 620305 | C | T | 70.34% |
| SNPChr01\_658139 | Chr01 | 658139 | C | T | 99.37% |
| SNPChr01\_723787 | Chr01 | 723787 | G | C | 99.36% |
| SNPChr01\_741058 | Chr01 | 741058 | C | G | 99.28% |
| SNPChr01\_767208 | Chr01 | 767208 | C | T | 56.75% |
| SNPChr01\_792173 | Chr01 | 792173 | T | C | 99.16% |
| SNPChr01\_834782 | Chr01 | 834782 | A | G | 99.55% |
| SNPChr01\_834793 | Chr01 | 834793 | G | A | 99.37% |
| SNPChr01\_835634 | Chr01 | 835634 | A | G | 93.19% |
| SNPChr01\_837374 | Chr01 | 837374 | G | A | 97.28% |
| SNPChr01\_846006 | Chr01 | 846006 | C | T | 23.84% |
| SNPChr01\_936621 | Chr01 | 936621 | A | G | 64.98% |
| SNPChr01\_948727 | Chr01 | 948727 | C | A | 74.64% |
| SNPChr01\_951459 | Chr01 | 951459 | T | C | 76.99% |
| SNPChr01\_951545 | Chr01 | 951545 | C | T | 81.79% |
| SNPChr01\_952199 | Chr01 | 952199 | T | C | 99.67% |
| SNPChr01\_954041 | Chr01 | 954041 | G | A | 91.83% |
| SNPChr01\_958529 | Chr01 | 958529 | G | A | 98.71% |
| SNPChr01\_1000322 | Chr01 | 1000322 | A | G | 28.03% |
| SNPChr01\_1035345 | Chr01 | 1035345 | T | C | 74.47% |