

# 植物品种管理体系及分子标记应用的相关建议

杨 坤<sup>1,\*</sup>, 许 帅<sup>1</sup>, 唐 浩<sup>2</sup>, 律保春<sup>3</sup>, 徐东辉<sup>1</sup>, 孙日飞<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 农业部科技发展中心, 北京 100122; <sup>3</sup> 北京市种子管理站, 北京 100088)

**摘 要:** 介绍了品种管理的基本概念以及分子标记技术在品种测试中的应用模式。根据对资料的分析 and 讨论, 得出两点结论: (1) 分子标记技术不能独立应用于 DUS 测试, 必须与表型观测相结合; (2) 分子标记技术在育种中的应用水平将会加强其在品种检测领域中的应用。同时, 为了更好地促进分子标记技术在品种管理中的应用, 提出建立统一标准样品库、建立统一品种管理平台、完善已知品种表型图像分子数据库、SSR 技术以指导性标准发布、SNP 技术以推荐性标准发布等 5 条政策建议。

**关键词:** 品种管理; 品种测试; 分子标记技术

**中图分类号:** S 338

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2016) S2-2845-06

## Introduction of Plant Variety Management System and Suggestions for Application of Molecular Marker

YANG Kun<sup>1,\*</sup>, XU Shuai<sup>1</sup>, TANG Hao<sup>2</sup>, Lü Bao-chun<sup>3</sup>, XU Dong-hui<sup>1</sup>, and SUN Ri-fei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> *Institute of Flowers and Vegetables, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;* <sup>2</sup> *Development Center of Science and Technology of Ministry of Agriculture, Beijing 100122, China;* <sup>3</sup> *Beijing Seed Management Bureau, Beijing 100088, China*)

**Abstract:** Introduce the basic conception of variety management, and the application pattern of molecular marker technology in variety testing. On the basis of the analysis and discussion, we get two conclusions: (1) The molecular marker technology can not be the gist for variety judgment independent, it should be combined with the phenotypic observation; (2) The application of molecular marker technology in breeding will reinforce its application in variety testing. At the same time, we propose 5 relevant policy suggestions in order to promote the application of molecular marker technology in variety management.

**Key words:** variety management; variety testing; molecular marker technology

2016 年 1 月 1 日新的《中华人民共和国种子法》(以下简称新种子法)正式实施, 一方面完善了品种管理的内容和手段, 另一方面促进了品种交易和依法维权。虽然新种子法第一次将品种资源、审定、登记、保护等相关品种管理制度作为一个整体考虑, 但由于配套规章制度还没有修改到位, 审定、登记和保护之间缺乏统一的技术体系和操作流程, 影响了该法的贯彻落实。特别是新种子法提到的快速检测方法有哪些, 如何用, 与表型数据不一致时如何判断等问题并没有一个权威系统的解释。作者收集整理了国内外与品种管理和检测相关的官方文件、论文、著作和评论等, 梳理了品

**收稿日期:** 2016-12-07; **修回日期:** 2016-12-26

**基金项目:** 农业部物种品种资源保护(种子)项目(2130135)

\* E-mail: yangkun@caas.cn

种管理的基本概念和方法,得出品种测试以“表型为主,分子为辅”的结论,并提出建立统一标准样品库、建立统一品种管理平台、完善已知品种表型图像分子数据库、SSR 技术以指导性标准发布、SNP 技术以推荐性标准发布等 5 条政策建议。

## 1 品种定义及基本管理制度

### 1.1 品种定义

国际植物新品种保护联盟(UPOV)在其公约 1991 年文本第 1 章第 1 条第 6 款给品种作了完整的定义:“已知最低一级的植物分类单位内的一个植物类群,该植物类群能够通过由某一特定基因或基因型组合决定的性状表达进行区分,并至少在一个性状上与任何其他植物类群相区别,且具备繁殖后整体特性保持不变的特点。”(杨坤 等, 2011),并在第 3 章第 5~9 条进一步规定:“品种获得批准的必备条件只有新颖性、特异性、一致性和稳定性 4 个。其中后 3 项是技术条件”。“特异性是指一个植物品种有一个以上性状明显区别于已知品种;一致性是指一个植物品种的特性除可预期的自然变异外,群体内个体间相关的特征或者特性表现一致;稳定性是指一个植物品种经过反复繁殖后或者在特定繁殖周期结束时,其主要性状保持不变。”在随后的《植物新品种特异性、一致性和稳定性审查及性状统一描述总则》及其附属系列技术文件中详细规定了审查必须基于品种种植试验或者其他必要的测试。选择观测性状时,不以经济价值作为指标,只要符合 6 个条件即可:(1)是特定基因型或者基因型组合作用的结果;(2)在特定环境条件下是充分一致和可重复的;(3)在品种间表现出足够的差异,能够用于确定特异性;(4)能够准确描述和识别;(5)能够满足一致性的要求;(6)能够满足稳定性的要求。UPOV 关于品种和 DUS 测试的有关定义得到国际种子检验协会(ISTA)和经济合作与发展组织(OECD)的认可和支 持,认为这是最科学的定义。新《种子法》中的品种概念完全采纳了 UPOV 的定义,并要求申请审定、登记和保护 的品种都必须符合 DUS 要求(<http://www.seed.gov.cn>)。

### 1.2 品种管理制度

#### 1.2.1 品种审定

新种子法涉及的基本品种管理制度包括品种审定、登记、保护和备案及种子监督等 5 项(刘平和陈超, 2011)。

品种审定是指品种审定委员会对新育成的品种或新引种的品种进行区域试验和生产试验的鉴定,按规定程序进行审查,决定该品种能否推广并确定推广范围的过程(洪青梅 等, 2015)。品种审定的目的是防止盲目引进和任意推广不适宜本地区种植的品种,避免给农业生产和农民利益造成损失。1982 年 5 月 22 日原国家农牧渔业部发布《全国农作物品种审定试行条例》,标志着中国品种审定制度的建立。历经多次修改,新种子法将审定范围缩减为稻、玉米、小麦、棉花、大豆 5 种主要农作物。

#### 1.2.2 品种登记

品种登记是指由种子企业和育种单位对新育成的品种进行自行或委托的方式安排品种测试,取得满意的数据,报农作物品种管理部门登记后即可进入市场,而不通过行政管理部门组织试验和进行实质审查的品种管理制度。新种子法第一次提出品种登记制度,这项制度取代了原先国家和省级实施的除了稻等 5 种之外的其他作物审(鉴)定制度,品种登记范围以国家正式发布的名录为准(焦莉萍, 2015)。

### 1.2.3 品种保护

品种保护是指品种保护办公室对经过人工培育的, 或者对野生植物加以开发的, 具备新颖性、特异性、一致性和稳定性并有适当命名的植物品种, 授予完成育种的单位或者个人享有排他的独占权。任何单位或者个人未经植物新品种权所有人许可, 不得生产、繁殖或者销售该授权品种的繁殖材料, 不得为商业目的将其重复使用于生产另一品种的繁殖材料。中国于 1997 年 3 月 20 日正式发布了《中华人民共和国植物新品种保护条例》, 并于 1997 年 4 月 23 日正式加入了国际植物新品种保护公约 1978 年文本, 正式实施品种保护制度。品种保护范围以国家正式发布的名录为准。

### 1.2.4 品种备案

品种备案是指通过省级审定的农作物品种和林木良种由省、自治区、直辖市人民政府农业、林业主管部门公告, 可以在本行政区域内适宜的生态区域推广; 其他省、自治区、直辖市属于同一适宜生态区的地域引种的, 引种者应当将引种的品种和区域报所在省、自治区、直辖市人民政府农业、林业主管部门备案。新种子法用品种备案制度替代了之前复杂的引种制度。

### 1.2.5 种子监督

种子监督是指农业、林业主管部门和有关部门依法对种子质量进行监督检查, 委托有资质单位采用国家颁布的种子质量管理办法、行业标准和检验方法对生产经营的种子品种进行检测, 以打击生产经营假、劣种子的违法行为, 保护农民合法权益, 维护公平竞争的市场秩序。新种子法提出农业、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。被检查人对检测结果有异议的, 可以申请复检, 复检不得采用同一检测方法。因检测结果错误给当事人造成损失的, 依法承担赔偿责任。

## 1.3 品种检测技术

5 种管理制度的实施都是建立在品种检测技术的基础上。品种检测技术类型多样, 从内容上来分, 有特异性、一致性和稳定性 (DUS) 测试, 栽培与使用价值 (VCU) 测试 (中国国内称之为区域试验), 种子质量检测 (纯度、净度、含水量、发芽率等); 从性状上来分, 有外观形态或生理特性、外部因素诱发性状 (如抗病虫或抗除草剂性状)、化学组分 (如蛋白质电泳)、组合性状 (如长宽比、最宽处位置)、新性状 (生化和分子标记)、产量等; 从数据类型上来分, 有表型数据、图像数据和分子数据等; 从试验场所上来分, 有田间和实验室。中国品种审定和备案要求 DUS 和 VCU 测试结果都合格, 品种登记和保护只要求 DUS 结果合格, 种子监督则根据目的不同分别验证种子质量、DUS 和 VCU 结果。实际上, 前 4 项工作中也有种子质量检测环节。

## 1.4 DUS 测试和 VCU 测试的区别

从目的上看, DUS 测试是定义和区别品种, VCU 测试是评价和选择品种; 从性状上看, DUS 选择那些容易区分品种的性状, 不管其是否具有商业价值 (没有产量性状, 但会分解为每穗粒数、籽粒大小等相关性状), 而 VCU 测试重点选择那些具有经济价值的性状 (产量、品质、抗性); 从试验方法上看, DUS 测试强调集中测试, 以消除环境影响, 而 VCU 测试强调分散测试以评价环境影响 (品种适应性); 从对照品种看, DUS 测试需要与所有已知品种进行比较并选择与之最近似的品种安排种植比较以区别品种, 同时需要种植一套标准品种以校准性状分级, 而 VCU 测试只选择当地主栽品种作为对照, 以评价品种好坏。可形象地比喻为, 通过 DUS 测试的品种, 发放“身份证”; 通过 VCU 测试的品种, 发放“上岗证”。

## 2 分子标记技术的主要类型及特点

### 2.1 蛋白质指纹图谱技术

利用不同品种的蛋白质或同工酶等特性的差异,应用生化技术以电泳图谱的形式将这些差异显现出来,就可以鉴别不同的品种。这些电泳图谱就像人的指纹一样,具有高度的个体差异性和环境稳定性,被称为“指纹图谱”。指纹图谱技术对于品种审定、假种子鉴定、产权纠纷解决都具有重要的作用。研究者通过对同工酶谱和田间种植品种纯度进行相关分析,可以用测定出的酶谱计算品种纯度(贾希海, 2008)。蛋白质指纹图谱技术主要包括同工酶电泳、蛋白质电泳、高效液相色谱和抗体反应等技术,其中同工酶和蛋白质电泳最经济方便、简单快速。但由于能够利用的同工酶位点有限,且技术上有一定的难度,故用同工酶分析鉴别品种受到一定的限制。

### 2.2 DNA 指纹图谱技术

DNA 指纹图谱技术使品种真实性和纯度的鉴定由大田和生化水平进入了分子水平。常用鉴定品种 DNA 的分子标记检测方法有:以分子杂交为核心的分子标记技术;以 PCR 反应为核心的分子标记技术;第三代新型分子标记;高通量测序等。目前国际上普遍应用的有: Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 扩增片段长度多态性, Simple Sequence Repeats (SSR) 简单重复序列, Single nucleotide polymorphism (SNP) 单个核苷酸的变异(吴金凤, 2014)。

AFLP 技术由于已申请专利,受专利权保护限制了在商业及生产上的应用,同时由于对 DNA 高纯度的要求,操作程序长、步骤多,需求较高的实验技能而难以在作物品种真实性鉴别上普及使用。欧洲一些国家将其作为判定两个品种相似度的重要方法,中国还没有该方法标准发布。

SSR 标记技术自 1989 年产生以来已被广泛应用于番茄、大豆、水稻、玉米等品种指纹库构建(王风格等, 2009)。中国目前已发布 15 个主要农作物品种 SSR 分子标记鉴定标准,并相应建立了指纹数据库,其中玉米、水稻、小麦的入库品种信息较为丰富,部分蔬菜作物已经用此方法建立了核酸指纹数据库并用于品种登记。但由于 SSR 标记与功能基因没有直接关系,其差异与表型之间也没有直接关联(王风格等, 2014)。

SNP 标记作为第三代分子标记,与其他标记技术相比,具有分布密度高、与功能基因的关联度高、遗传稳定性强、易实现自动化分析的优势。因此,SNP 标记目前被公认为是极具应用前景的分子标记技术。目前中国还没有 SNP 分子鉴定标准发布。

## 3 分子标记技术应用于品种测试的几种模式

### 3.1 国际植物新品种保护联盟对分子标记技术的态度

分子标记技术的发展引起国际植物新品种保护联盟(UPOV)的高度重视。1993 年 4 月 19 日,UPOV 在日内瓦成立“生物化学、分子标记技术和 DNA 片段技术工作组(BMT)”,最初目的是研究分子标记技术在品种权保护中的应用,统一成员间的分子标记技术。在大量成员实践的基础上,BMT 先后起草了 3 个相关文件被 UPOV 采纳,即“TGP/15 生物化学和分子标记在特异性、一致性和稳定性(DUS)测试中的应用原则”(http://www.upov.int),“UPOV/INF/17/1 DNA 片段指南:分子标记选择和数据库构建(BMT 指南)”和“UPOV/INF/18 分子标记在 DUS 测试中可能的用法”。在这 3 个文件中提出分子标记技术应用的 3 个模式(http://www.upov.int; 王风格等, 2009)。

模式 1: 特殊性状的分子标记。该模式下, 分子标记与性状之间有严格的对应关系, 分子标记等同于性状。另外还需注意: (a) 标记检测需采用与对应性状测试一样数量的植株来分析特异性、一致性和稳定性; (b) 标记和性状关联明确; (c) 不同标记关联同个性状视为该性状的不同测试方法; (d) 多个标记关联多个基因共同决定一个性状表达仍视为同个性状的不同测试方法; (e) 标记关联一个基因的多个规范条带共同决定一个性状表达仍视为测试同个性状的不同测试方法。

模式 2: 表型距离和分子距离相结合用于品种库管理。该模式主要应用于近似品种筛选, 即在 DUS 生长试验之前设定一个分子水平上的安全距离来排除品种库中差异大的品种, 这个安全距离要大到足够保证被排除的品种即使安排种植比较试验仍能够被明确排除。所以必须具备 3 个条件: (a) 有可靠的信息证明分子距离足够关联表型差异; (b) 这个方法用于从品种库中筛选与待测品种相近似的品种。(c) 所用的阈值大到足够保证被排除的品种无需再安排种植试验进行比较。

模式 3: 分子标记技术作为独立的新系统使用。即用分子标记技术直接评价品种 DUS 结论, 其结果不需要与表型结果验证而直接被采纳。

目前 UPOV 同意模式 1 和模式 2 的用法, 明确反对模式 3, 并且在其网站上反复强调。从技术角度看, 分子标记技术作为一个独立的系统使用确实有很多风险。例如目前应用最广泛的 SSR 标记, 其本身只是无功能的重复序列, 与表型之间没有直接联系, 用来区别未知品种就没意义。新的 SNP 标记虽然具有与功能基因关联的优势, 但基因与表型并不是一一对应的关系, 从基因到表型涉及复杂的分子调控和表达途径, 完全破解需要很长时间。新的基因组学研究也发现基因甲基化、异染色质化以及位置效应等因素造成的基因沉默现象, 而常规分子标记技术并不能发现这种基因差异。

### 3.2 国际种子协会对分子标记技术的态度

国际种子协会 (ISF) 于 2006 年 5 月在哥本哈根“DNA 标记用于 DUS 测试, 实质性派生品种和品种鉴定”(Use of DNA markers for DUS testing, Essential Derivation and Identification) 中写到:

“ISF 已申明, 反对单独使用 DNA 标记进行 DUS 测试, 除非诸如以下重要问题得到充分解决: (1) 是否已经定义特异性的最小距离; (2) 是否会影响一致性和稳定性的概念, 能否评估出这些标准;

(3) 公众是否能够获得标记的具体信息。……(在上述问题未充分回答前) 利用 DNA 标记作为授权性状会造成育种者权利本质混乱。……相反, ISF 认为 DNA 标记能用于已保护品种的鉴定……DNA 标记也可用于确定实质性派生品种的基因相似阈值, 或用于确定决定性状的基因有无或是否表达。”2012 年, ISF 在“ISF 对于知识产权的观点”(ISF View on Intellectual Property) 中亦阐明: “ISF 完全支持 UPOV 关于能用于 DUS 测试性状的原则”, “基于现有技术, 单独使用基于 DNA 的标记建立 DUS 测试体系, 会显著降低品种保护的范围, 因此不应被接受”, “ISF 认为在以下条件下, 基于 DNA 的分子标记能用于 DUS 测试和审查过程中: (1) 基于 DNA 的分子标记能完全预测表型 DUS 性状的表达时(注: 即基因型与表现型能够完全对应); (2) 在管理参照品种及安排 DUS 试验中, 校准 DNA 分子标记与表型性状表达的关系时(注: 即用于辅助筛选近似品种)”, “ISF 强烈赞同基于品种鉴定目的使用基于 DNA 的分子标记”, “ISF 强烈赞同使用 DNA 分子标记进行品种鉴定, 并用于确定品种间的基因相似性以帮助解决实质性派生争议……”。

### 3.3 最新发展

国际植物新品种保护联盟 (UPOV) 与经济合作与发展组织 (OECD)、国际种子检验协会 (ISTA) 和美国官方种子分析协会 (AOSA) 达成合作协议, 共同研究生物化学和分子标记技术在品种测试中的应用。2016 年 5 月在莫斯科召开了第 15 届 BMT 会议, 交流了分子标记技术在各种作物上的应

用与研究结果,还对新的基因和基因组编辑技术 CRISPR-cas9 的应用进行了交流与研讨(<http://www.upov.int>)。包括 BMT 主席在内的一些专家认为未来分子标记技术的应用范围可以扩大,特别是找到足够多的标记(尤其是 SNP)或采用全基因组测序的方法,可以为派生品种(EDV)的检测提供依据。

## 4 结论与建议

结论:(1)分子标记技术不能作为品种 DUS 判定的独立依据,分子标记技术的应用需要以表型结果作为验证基础。(2)品种检测技术始终与育种技术相适应,随着分子标记技术在育种中应用的深入,其在品种检测技术中应用也将不断深入。

建议:(1)尽快完成植物品种标准样品库的建设。建立统一的国家级已知品种种子繁殖标准样品库和按生态区域分布的无性繁殖标准样品保藏圃,省级标准样品库作为国家库的一部分,同名品种必须以最新入库的材料为准,申请人提交申请材料时必须注明其繁殖材料的提交情况。(2)尽快建立全国统一的品种管理信息平台。该平台始终以植物种类与品种名称为核心检索字段,有效整合现有的品种审定、登记、保护、备案和种子监督信息,确保审批和市场活动的有效监管。(3)加强已知品种表型、图像和分子信息数据库构建,整合 DUS 和 VCU 性状,扩大表型性状的数量,加强田间种植试验、分子鉴定实验、数据采集处理分析、拍照等过程的质量控制,确保各类数据准确、丰富、可用。(4)与功能基因没有直接关联的 SSR 技术,建议以农业部种子管理局或农业部植物新品种保护办公室名义发布,作为指导性标准用于建立品种指纹身份识别、近似品种筛选、品种真实性鉴定、品种纯度鉴定等方面,解决当前品种多、乱、杂、套牌、假冒等问题。(5)开展新的分子标记技术,特别是全基因组测序方法(简化基因组测序技术)的研究工作,选取与表型相关性较强的方法以行业标准或国家标准形式发布,作为推荐性标准用于派生品种鉴定、侵权品种鉴定等方面,供有关方自由选择,以促进品种权交易和品种维权。

## References

- 洪青梅,何云,李洪立,李琼. 2015. 浅谈植物新品种保护与品种审定. 中国科技纵横, (22): 235 - 236.
- 贾希海. 2008. 杂交玉米品种 SSR 分子图谱. 北京: 中国农业科学技术出版社.
- 刘平,陈超. 2011. 植物新品种保护通论. 北京: 中国农业出版社: 1 - 10.
- Qiao Li-ping. 2015. Exploration on varieties registration system of non staple crops. Seed, 34 (7): 124 - 126. (in Chinese)
- 譙莉萍. 2015. 非主要农作物品种登记制度的探索. 种子, 34 (7): 124 - 126.
- Wang Feng-ge, Zhao Jiu-ran, Yi Hong-mei, Song Wei. 2009. Application of DNA fingerprint technology on maize varieties protection. Journal of Maize Sciences, 17 (6): 136 - 139.
- 王风格,赵久然,易红梅,宋伟. 2009. DNA 指纹技术在玉米品种权保护中的应用. 玉米科学, 17 (6): 136 - 139.
- 王风格,易红梅,赵久然,刘平,张新明,田红丽,堵苑苑. 2014. NY/T 1432-2014. 玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法. 北京: 中国农业出版社.
- Wu Jin-feng. 2014. Study on genetic diversity of maize inbred lines by SSR and SNP markers[M. D. Dissertation]. Changchun: Jilin Agricultural University. (in Chinese)
- 吴金凤. 2014. 利用 SSR 和 SNP 标记研究玉米自交系的遗传多样性[硕士论文]. 长春: 吉林农业大学.
- Yang Kun, Zhang Xin-ming, Liu Ping, Lü Bo, Rao Zhi-hong, Wang Feng-ge, Zhao Jiu-ran, Shi Ya-xing, Zhang Jun, Wang Shi-liang, Liu Peng. 2011. Study on construction of database of plants varieties of common knowledge. Chinese Agricultural Science Bulletin, 27 (33): 283 - 287. (in Chinese)
- 杨坤,张新明,刘平,吕波,饶智宏,王风格,赵久然,史亚兴,张俊,王世亮,刘鹏. 2011. 植物已知品种数据库构建方法的研究. 中国农学通报, 27 (33): 283 - 287.