

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2022.23001

综述

## 应用分子标记技术改进作物品种保护和监管

徐云碧<sup>1,6,\*</sup> 王冰冰<sup>2</sup> 张健<sup>3</sup> 张嘉楠<sup>4</sup> 李建生<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 中国北京 100081; <sup>2</sup>长沙百奥云数据科技有限公司, 中国湖南长沙 410221; <sup>3</sup>先正达集团中国, 中国北京 102206; <sup>4</sup>石家庄博瑞迪生物技术有限公司, 中国河北石家庄 050035; <sup>5</sup>中国农业大学国家玉米改良中心, 中国北京 100193; <sup>6</sup>国际玉米小麦改良中心, 墨西哥特斯科科 56130

**摘要:** 植物品种保护是植物品种知识产权的重要组成部分。品种特异性、一致性和稳定性(distinctness, uniformity, and stability, DUS)检测和实质性派生品种(essentially derived variety, EDV)评价是植物品种保护中的 2 个重要概念。DUS-EDV 评价经历了从形态性状和系谱为主过渡到了综合利用形态、系谱和分子标记信息的阶段, 并将发展到以分子检测为主的阶段。分子标记的主要类型也从 RFLP 发展到 SSR 和 SNP。基于靶向测序-液相捕获的芯片技术, 具有分析成本低、标记组配灵活、适合用于不同植物的 DUS-EDV 评价。利用分子标记检测进行 DUS-EDV 评价有 2 个重要策略, 一是在全基因组范围内进行全局性的比较和分析, 二是利用与重要表型有关的功能位点特异性进行局部性、特异性检测。应该针对 DUS 和 EDV 分别建立各自的评价标准。DUS 可以根据分子标记提供的特殊指纹图谱、单倍型、特有等位基因、特异基因组区段、特异功能标记、最低遗传纯度、品种内单株间的遗传差异作出判断。EDV 的主要评价指标是利用全基因组均匀分布的高密度标记所获得的材料间的遗传相似性, 而不是差异的标记数。所采用的分子标记的数量和基因组覆盖率是决定分子检测效率和可靠性的关键。利用少量标记所获得的品种比较具有较大的抽样误差。区别 EDV 和非 EDV 品种的相似性指标可因作物物种和所需要的品种保护水平而异。本文回顾了世界各国主要的作物品种保护实践, 建议在利用分子标记保护品种知识产权和监管品种中, 建立由各方面专家组成的咨询委员会, 根据分子检测技术的发展和功能标记的开发, 不断完善和加强 DUS-EDV 评价体系, 建立权威的品种保护数据库系统, 有序提供查询和比对服务, 以鼓励种业创新。

**关键词:** 植物品种保护; 特异性-一致性-稳定性(DUS); 实质性派生品种(EDV); 分子标记; 分子检测; 遗传相似性

## Enhancement of plant variety protection and regulation using molecular marker technology

XU Yunbi<sup>1,6,\*</sup>, WANG Bing-Bing<sup>2</sup>, ZAHNG Jian<sup>3</sup>, ZHANG Jia-Nan<sup>4</sup>, and LI Jian-Sheng<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Biobin Data Sciences, Changsha 410221, Hunan, China; <sup>3</sup>Syngenta Group China, Beijing 102206, China; <sup>4</sup>MolBreeding Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, Hebei, China; <sup>5</sup>National Maize Improvement Center of China, China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>6</sup>International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), El Batán Texcoco 56130, Mexico

**Abstract:** Plant variety protection is one of the important approaches for plant intellectual property protection. The distinctness, uniformity and stability (DUS) and essentially derived variety (EDV) are two major concepts in plant variety protection.

本研究由国家重点研发计划项目(2016YFD0101803), 石家庄市科技孵化计划项目(191540089A), 河北省创新能力提升计划项目新型研发机构建设专项(19962911D), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2020PT20), 中国农业科学院农业科技创新计划(CAAS-XTX2016009), 中国农业科学院作物科学研究所中央非公益类基础研究项目, 比尔盖茨基金会和 CGIAR MAIZE 项目资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101803), the Shijiazhuang Science and Technology Incubation Program (191540089A), the Hebei Innovation Capability Enhancement Project (19962911D), the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2020PT20), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP) of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) (CAAS-XTX2016009), the Central Non-public-interest Basic Research Fund of the Institute of Crop Science of CAAS, Bill and Melinda Gates Foundation, and CGIAR Research Program MAIZE.

\* 通信作者(Corresponding authors): 徐云碧, E-mail: xuyunbi@caas.cn; 李建生, E-mail: lijiansheng@cau.edu.cn

Received (收稿日期): 2022-01-05; Accepted (接受日期): 2022-02-22; Published online (网络出版日期): 2022-03-01.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20220228.1214.002.html>

DUS-EDV has been evaluated largely through morphological traits and pedigrees at the very beginning, to an integrated approach using morphological traits, pedigrees and molecular marker information and now to a stage largely driven by molecular diagnostics. Molecular diagnostic technology has been evolved from RFLP to SSR and SNP marker systems. The liquid SNP chip, represented by genotyping by target sequencing through capture in solution, has advantages of low cost, high flexibility in marker combinations and wide suitability for DUS-EDV evaluation across plant species. There are two important strategies in DUS-EDV evaluation, one being examined based on the analysis and comparison at the whole genome level and the other being examined at specific genomic regions for target functional loci associated with important phenotypes. Evaluation criteria should be established separately for DUS and EDV. The former can be evaluated based on the criteria constructed for specific fingerprint maps, haplotypes, unique alleles, genomic regions, target functional markers, minimum genetic homozygosity, and within-variety variation, whereas the latter can be examined by the genetic similarity between the potential EDV and check variety estimated using a large number of molecular markers evenly distributed across the genome, rather than by the number of markers. The number and the genomic coverage of molecular markers are two key factors affecting the efficiency and reliability in DUS and EDV assessment. Using only a small number of markers in such assessment will likely result in a large sampling error for the estimates. The threshold of genetic similarity required for distinguishing EDV and non-EDV can vary greatly across plant species and with the levels of plant variety protection. After reviewed the current status of plant variety protection across countries, the authors proposed that a national consultant expert committee should be established for consistent support to implement and improve DUS-EDV system, and an official database system should be constructed for public service and comparison of variety DNA fingerprint data to facilitate innovative activities in plant breeding.

**Keywords:** plant variety protection; distinctness-uniformity-stability (DUS); essentially derived variety (EDV); molecular marker; molecular diagnostics; genetic similarity

在现代遗传学中, 遗传多态性是全基因组水平上特定遗传位点的相对差异。在传统植物育种中, 遗传变异是通过视觉选择进行鉴定的。随着分子生物学的发展, 遗传变异可以通过 DNA 的变化在分子水平上进行鉴定。DNA 水平的变异可以作为分子标记广泛应用于基因组学、遗传学和育种等领域。通过分子标记分析, 可以确定生物的进化途径和多样性以及群体或个体之间的相互关系。利用分子标记可以构建遗传图谱, 并在此基础上克隆基因。在育种中, 分子标记可应用于后裔鉴定、基因跟踪、基因渐渗和基因累加。在作物新品种监管和知识产权保护方面, 可以利用分子标记进行品种质量监测、品种权保护、转基因成分/基因编辑/伴生生物等的检测<sup>[1]</sup>。本文将重点讨论分子标记技术的发展历程和趋势, 高通量 SNP (single nucleotide polymorphism) 分子标记检测技术的最新进展, 全基因组分子标记差异性分析和功能位点分子标记鉴定的基本原理; 应用分子标记开展植物新品种的特异性、一致性、稳定性(distinctness, uniformity, and stability, DUS)和实质性派生品种(essentially derived variety, EDV)测试和监管作物品种的标准; 提出利用分子标记保护植物品种和知识产权以及监管品种的建议。

## 1 植物品种权保护及其发展

随着农作物种业(seed industry)商业化程度的不断提高, 知识产权(intellectual property rights, IPR)保护对种业的发展变得越来越重要。种业的知识产权

主要包括专利和植物品种保护(plant variety protection, PVP)<sup>[2]</sup>。

1961 年 12 月, 以英国、荷兰、德国等国家为主要发起者缔结了《国际植物新品种保护公约》(International Convention for the Protection of New Varieties of Plants, 法文缩写为 UPOV), 并在此基础上成立了“国际植物新品种保护联盟”。UPOV 公约分别在 1972 年、1978 年和 1991 年经历了 3 次修订, 逐步强化了植物育种者的权利。现在国际上使用比较普遍的 2 个 UPOV 公约文本是其 1978 年文本和 1991 年文本。UPOV 公约 1978 年文本对植物新品种保护的要求相对比较低, 适合育种水平不是太高、知识产权保护制度还不太完善的发展中国家。而 UPOV 公约 1991 年文本对植物新品种保护的保护区大、水平高, 参加公约的条件比较苛刻, 适合法律保护机制比较健全、育种水平高度发达的国家。我国于 1999 年加入 UPOV 公约, 成为该组织的第 39 个成员, 并使用 1978 年文本。1980 年美国最高法院批准了涉及修饰生物体的专利。从那时起, 许多国家和组织开始建立覆盖生物体或它们组成成分的 IPR, 并通过了一些条约, 包括与贸易有关的知识产权协议(Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights, TRIPS)、生物多样性公约(Convention on Biological Diversity, CBD)等。

目前有许多机制可用于保护植物育种者利益, 并有助于培育有竞争力和活力的国家种子部门。除了通过授予植物育种者权利和专利权外, 其他的知

识产权, 还包括生物过程(如杂交品种系统)、种子法、合同法、品牌和商标保护以及商业秘密等。随着越来越多的植物专利被授予, 知识产权将越来越多地影响植物育种的每一个过程, 包括遗传变异的产生、鉴定、转移、选择的方法, 遗传物质(DNA、标记、基因和序列)本身及其相关技术和方法。

DUS 测试是 UPOV 内 PVP 系统的关键组成部分, 同时也是欧盟通用目录中可耕种作物、蔬菜和水果进行登记的强制性要求。此外, 通过多环境试验<sup>[3]</sup>, 农作物品种应表现“栽培利用价值”(value for cultivation and use, VCU)。因此, 用 VCU 流程评估新作物品种的“效用”, 与 DUS 测试的品种描述在形态上应具有“一致性”。

为了加强对初始品种育种者的保护, UPOV 公约提出了 EDV 概念。它是指从一个受保护的原始品种派生出来、虽有不同, 但是还保留着原始品种的本质特征的品种。EDV 必须满足以下条件: (1) 从原始品种中派生出来; (2) 可以明确地与初始品种相区别; (3) 除派生引起的性状有所差异外, 在原始品种基因型或者基因型组合产生的基本特征方面与原始品种相同。如果 3 个条件中的任一条件没有满足, 就不存在实质性派生。自然突变、人工诱变(物理诱变、化学诱变、含太空辐射等)、系统选育、多代回交、转基因、基因编辑等容易产生 EDV。一个新的 EDV 如果符合 DUS 的时候可以得到保护; 但该 EDV 品种商业化时, 育种者必须获得初始品种育种者的同意。从法律上来说, 一个新的品种究竟被认为是 EDV 还是可以获得独立知识产权的品种, 取决于所用原始品种的权利。因此, 在实施包括转基因和基因编辑在内的上述育种计划时, 需要首先考虑被转化或编辑的原始品种的知识产权。

EDV 概念的提出有助于打击剽窃并保护植物育种者权利, 但目前没有大家公认的可以估计原始品种和 EDV 之间遗传符合度的通用标准, 而要把独立的衍生品种和 EDV 区分开来的阈值可能因作物而异。如果把亲缘关系的程度(阈值)设置过高(如 95% 或者更高), 就会鼓励和刺激“修饰性”育种。相反, 如果设置过低(例如 75% 或者更低), 就会极大增加初始品种拥有者对其没有做出贡献的品種的控制。

过去用来评价 EDV 与其原始品种之间遗传符合度的指标主要包括形态学性状、农艺性状和杂种优势。根据分子标记之间的遗传距离可以评估受保护品种与 EDV 之间的遗传符合度。Heckenberger

等<sup>[4]</sup>提出利用标记之间的遗传距离进行 EDV 判别, 并建议在 UPOV 公约中对 EDV 的基本特征进行重新定义, 以反映标记信息的等同作用<sup>[5]</sup>。与表型特征相比, DNA 标记不受环境因素的影响, 因而可以提供 2 个品种之间相关性和相似性的基本无偏估计, 使用大量比较分析的结果更接近于真实的亲缘关系。此外, 尽管传统性状只受少数遗传位点控制, 但仍可以选择 DNA 标记来确保基因组覆盖的均匀性和密集性。目前, SSR (simple sequence repeat) 和 SNP 已被用于确定品种间遗传相似性和 EDV 阈值。

近年来, DNA 分子标记检测的实用性和效率不断提高、成本不断降低, 与形态和蛋白质方法相比更具吸引力, 起到有效补充甚至替代的作用。事实上, 这些方法的探索是 UPOV 工作组在“生物化学和分子生物学, 特别是 DNA 分析”上的重点。迄今为止, “特异性分子标记”和“在品种收集管理中结合表型和分子距离” 2 种模式受到青睐<sup>[6]</sup>。考虑到这个问题的重要性, 欧盟植物新品种办公室(Community Plant Variety Office, CPVO), 负责管理欧盟内的知识产权系统, 而其本身也是 UPOV 公约的成员, 还建立了一个专家智囊团, 负责“将分子数据集成到 DUS 测试”(integration of molecular data into DUS testing, IMODDUS), 并为全欧范围内的“地平线 2020”研究计划确定相关的资助项目<sup>[7]</sup>。

## 2 作物分子标记技术的发展历程及其趋势

### 2.1 遗传标记及其演化

在 19 世纪后半叶, 现代遗传学的鼻祖孟德尔通过对豌豆的研究, 提出了分离和自由组合定律。他所研究的豌豆性状具有明显的差异, 比如种子圆滑与皱缩、种子黄色与绿色、花瓣紫色与白色等。这些差异明显的表型性状就是形态标记。虽然在很多物种中利用形态标记构建了连锁遗传图谱, 但因为这类标记数量有限, 难以构建饱和的遗传图谱。不同物种染色体的形态、数目和结构的变异可以作为细胞学标记用于鉴定特定染色体的连锁群。由于细胞学标记数量有限, 分辨率低, 需要特殊的细胞学设备, 极大地限制其在遗传育种中的应用。生物酶结构变异体导致分子量及电场中的迁移率不同, 也可以作为遗传标记, 其典型的代表是同工酶。对于一些特定的物种, 大约只有 10~20 种同工酶。因此, 同工酶标记难以用来构建完整的遗传图谱。另外, 每一种酶只能用特定的染色方法鉴定, 其应用也受到限制<sup>[8]</sup>。

从 20 世纪 80 年代开始, DNA 水平的变异开始被用作遗传标记。Botstein 等<sup>[9]</sup>将 DNA 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)首次用于构建人类连锁图谱, 开创了以 DNA 多态性作为分子标记的先河。RFLP 片段的产生是用限制性内切酶切割纯化后的 DNA, 产生大量的全基因组酶切片段。然后经过凝胶电泳和 Southern 杂交来鉴定样本间的差异。由于 RFLP 分析要求大量高质量的 DNA, 基因型分析的通量很低, 很难实现自动化。同时由于 RFLP 探针必须以物理方式保存, 因此不同的实验室之间共享的难度比较大。

随着 PCR 技术的应用, RFLP 标记逐渐被以 PCR 为基础的分子标记所取代。这类标记引物设计简单, 扩增程序不涉及 DNA 杂交及其相关步骤, 只需要少量的 DNA 作为模板, 并且整个程序可以自动化<sup>[10-11]</sup>。与 RFLP 标记相比, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)能检测到更高的多态性。标记具有通用性, 一组引物可以适用于任何物种。但是, 这类标记的一个重大缺陷是重复性低。为克服这一缺陷, 发展了扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP<sup>[12-13]</sup>), 以便结合限制性酶切多态性和随机引物扩增的优点。

微卫星标记或简单重复多样性(SSR)是 1~6 个核苷酸为单位的重复序列<sup>[14]</sup>, 根据两侧特异的序列设计引物进行 PCR 扩增, 然后经过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。随后, SSR 检测采用 DNA 测序仪并辅之以荧光标记, 检测的精度和速度显著提高。SSR 标记具有高度可变性、可重复性、共显性、位点特异性和全基因组随机分布的特点。但由于每个 SSR 位点可能存在大量的复等位基因, 而每个等位基因之间的碱基数差异较小而不容易相互区分, 给数据的累加和横向比较造成困难。

近年来广泛采用的分子标记是 SNP, 严格意义上的 SNP 是 2 个 DNA 序列之间的单个核苷酸差异, 由核苷酸的替代、插入或缺失造成。因为一个核苷酸是遗传上的最小单元, 因此 SNP 标记提供了分子标记的最基本形式。广义上讲 SNP 也可以包括由于多个核苷酸的插入和缺失造成的 InDel。目前, SNP 已经取代其他标记, 成为主流分子标记。

## 2.2 作物分子标记检测技术

近 40 年来, 分子检测技术发展日新月异, 各种分子标记技术和检测设备不停地更新换代, 经历了从凝胶电泳、荧光检测、固相芯片到液相芯片的 4G

发展过程(表 1)<sup>[1]</sup>。G1 时代的分子检测技术起始于 20 世纪 80 年代, 基于实验台上和手工操作下的凝胶电泳, 成本极高, 通量极低, 灵活性差, 每天大约能产生 100 左右的数据点。G2 时代以 1990 年代荧光电泳为特征, 利用 DNA 测序仪等进行半自动检测, 成本高, 不太灵活, 日产数据量在 1000 左右。G3 时代是 2000 年以来采用的固相芯片, 利用全自动检测仪器, 能够以较低的成本, 每天完成高达 100 万个数据点的检测。G4 时代从 2010 年代后期开始, 采用极其灵活、以液相芯片为基础的分子检测, 依靠全自动测序仪, 能够以极低的成本, 每天获得 100 万个数据点。从 G1 到 G4 时代, 单纯的测序技术作为分子检测手段, 始终得到不同程度的应用, 但由于测序读长较短, 数据处理和分析难度大, 没有成为主流分子标记检测手段。随着测序技术的进步, 测序成本进一步降低, 特别是测序精度和测序读长的改进, 序列的比对和拼接大大简化, 数据处理和分析实现极大程度的自动化, 分子标记检测将进入其最高阶段——基于全基因组测序的分子检测——G5 时代(表 1)。以 DNA 序列变异为基础的 SNP 标记, 已经接近成为在分子水平检测变异的终极手段。

近年来在玉米中, 从前期研发的玉米 55K SNP 芯片挑选多态性高、缺失率低、染色体上分布均匀的 20K SNP (包括部分 InDel)标记, 结合靶向测序基因型检测(genotyping by targeted sequencing, GBTS)技术, 对标记探针进行液相捕获, 完成了 1K、5K、10K、20K 等一系列液相芯片标记的开发<sup>[15]</sup>。随后, 经过技术优化和改进, 同时每个扩增子扩增多个 SNP (multiple SNP, mSNP), 使单个液相芯片的检测效率在玉米中增加到 40K mSNP、260K SNP、912K 单倍型。根据应用场景对标记密度的需求, 通过控制测序深度就可以从同一标记集获得从 1K 到 40K mSNP 的任意位点(扩增子)以及由此衍生的不同数量的 SNP 标记和单倍型<sup>[16]</sup>。

与常规测序检测和固相芯片分析相比, 靶向测序-液相芯片技术具有平台广适性, 不需要借助于特定的昂贵设备, 可以采用各种可供利用的测序平台。标记定制时没有起始样本量和标记数量的限制, 测序与标记基因型检测可在同一管内完成; 使用时没有单次检测样本量限制; 可随时向体系中加入新的引物或对已有引物进行调整; 根据同一套高密度标记, 可以通过调整测序深度来获得 1K、5K、10K、20K、45K 等不同数量的标记。所有检测试剂均实现

表 1 用于植物品种保护的分子标记检测系统及其发展

Table 1 Evolution of molecular marker diagnostic systems used for plant variety protection

世代 Generation (years)	支撑技术 Support technique	代表分子标记 Representative molecular markers	检测方式 Diagnostics	特征 Characteristics
G1 (1980s)	凝胶电泳 Gel electrophoresis	RFLP, RAPD	琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳, EB 和银染 Agarose and polyacrylamide gel elec- trophoresis with EB and silver staining	手动, 实验室, 极高成本, 不灵活 Manual, exp. laboratory, very high cost, not flexible, 100 DP/D
G2 (1990s)	荧光检测 Florescence electrophoresis	SSR, AFLP, KASP, SNP	聚丙烯酰胺凝胶电泳加荧光检测 Polyacrylamide gel electrophoresis and fiorescence detection	半自动, 实验台, 高成本, 不太灵活 Semi-automatic, exp. station, high cost, little flexible, 1000 DP/D
G3 (2000s)	固相芯片 Solid chips	SNP, 包括 InDel SNP, including InDels	探针杂交和荧光检测 Probe hybridization and florescence detection	自动, 工作站, 低成本, 比较灵活 Automatic, workstation, low cost, less flexible, 1M <sup>+</sup> DP/D
G4 (2010s)	液相芯片 Liquid chips	SNP, 包括 InDel SNP, including InDels	靶向测序基因型检测和液相捕获 Genotyping by target sequencing (GBTS) and captured in solution	自动, 工作站, 极低成本, 非常灵活 Automatic, workstation, very low cost, very flexible, 1M <sup>+</sup> DP/D
G5 (2020s)	全测序 Fully sequencing	SNP 和所有序列变异 SNP and all sequence variations	序列阅读和比较 Sequence reading and comparison	高度自动, 便携式, 几乎零成本, 超灵活 Highly automatic, carry-on, almost no cost, extremely flexible, 1B <sup>+</sup> DP/D

根据徐云碧等<sup>[1]</sup>更新和修改。

This table is revised and updated from Xu et al.<sup>[1]</sup>

了本地化, 从而大大降低了试剂成本, 同时利用现有的测序设备降低了检测设备的维护、管理和运营有关的成本。液相芯片技术具有高度重复性和可靠性, 便于将不同时间、地点和实验所获得的信息进行累加、比较和综合。与固相芯片、全基因组重测序和随机的简化基因组测序等技术相比, 对于平台和支撑系统的要求很低, 不需要借助于额外的检测技术或高度专业化的生物信息团队<sup>[1]</sup>。

基于靶向测序和 mSNP 的液相芯片技术具有广泛的物种适应性, 可以用于所有动植物和微生物的分子检测。目前已经在 13 种主要农作物(水稻、小麦、大豆、棉花)、果树、蔬菜以及部分动物和微生物中开发了基于 GBTS 的液相芯片 50 余套, 并已在上述领域得到广泛应用(张嘉楠, 石家庄博瑞迪生物技术有限公司, 私人通讯)。

### 2.3 分子标记应用于作物品种保护和监管的优点和局限性

分子标记检测不受外界环境影响, 不因外界环境条件的变化而改变检测结果。分子标记的数量巨大, 理论上可以覆盖基因组的任何位点, 从而全面揭示全基因组分子水平的所有变异。在理论上, 采用的分子标记越多, 结果就越可靠。因此从品种保

护的角度来看, 选择合适密度的分子标记检测至关重要。采用大量的分子标记, 可以排除利用少量标记可能产生的基因组低覆盖率导致的抽样误差, 同时可以通过相邻标记的相互验证进行误差校正和缺失填补。从目前的技术来看, 包括 InDel 在内的 SNP 标记检测不受检测平台和影响, 不同实验室、不同平台都能获得同样的检测结果, 因而可以进行跨实验室、跨平台、跨时间的横向和纵向比较、数据累积和共享分析, 其结果可以相互验证。

分子标记应用于品种保护和监管可能存在的问题包括: (1) 分子标记的类型、数量、质量、功能、基因组分布等极大地影响品种间差异的检测结果。(2) 分子水平上所揭示的差异可能无法与表型差异联系起来; 具有重大表型差异的品种, 因为标记的覆盖率和代表性不够, 可能无法检测到足够水平的分子差异。(3) 综合采用表型和分子标记进行品种保护和监管需要考虑 2 个系统在检测中的判断指标及其权重。(4) 判断品种间差异性的临界指标和阈值可能因物种、品种类型和育种方式等而异。(5) 高质量、重复性好的标记系统是不同实验室或检测机构之间测定结果可比性的关键, 目前需要开放类似于靶向测序-液相芯片 SNP 标记等高质量低成本的检测系统。

### 3 全基因组差异和功能位点特异性检测

分子标记技术在品种权保护和品种监管中的应用有 2 种主要形式: 全基因组差异和特殊位点特异性的检测。前者是利用覆盖全基因组的标记比较不同品种全基因组的异同; 后者是利用特定的标记比较基因组特定位点或关联性状的差异。

#### 3.1 全基因组差异检测

就全基因组差异检测而言, 需要从少数标记过度到大量标记。这样可以检测出过去少量标记无法检测到的差异。在分析方法上, 要从简单的标记分析过度到标记簇、单倍型、标记区段和血缘同一性 (identity by descent, IBD) 等相结合的综合分析。全基因组差异检测就是要利用覆盖全基因组的标记、多聚标记及其单倍型来进行 DUS 和 EDV 判别、揭示相似品种的全基因组差异。

因为遗传重组的原因, 一个亲本基因组在新品种中的贡献是按区段分布在染色体上的, 区段内的遗传组成完全等同。比如 A 品种贡献了 1000 个小片段, 这 1000 个小片段都来自 A, 这样就很容易挑

选出来了。只要有足够密度的标记, 亲本之间差异足够大, 一个小片段上就会有足够多的差异性标记。当然少数区域由于亲本间的高度相似性, 可能无法正确区分, 但这不影响全基因组分析的大局, 可以只考虑有差异的区域, 比如一条染色体上有一个比较大的特定亲本的片段就可以了。根据单个染色体上交换重组发生的有限性, 可以在很大程度上进一步推断两两之间、多个亲本之间没有差异区域片段究竟来自哪个亲本。植物品种间的差异和遗传相似系取决于与品种有关的育种程序和方法, 包括每一轮只涉及 2 个亲本的多轮杂交(图 1)和涉及多个亲本的复合杂交(图 2)。多态性比较高的作物, 可以比较精准地确定复杂的亲本来源。在亲本未知的情况下, 比对新育成品种与保护品种的标记数据, 就可以找出相应的亲本来源, 当然前提是数据库或综合分析能够提供足够完整的信息, 且用于分析的标记密度足够高。首先, 将相同片段按大小排队, 利用较大的片段挑出候选亲本, 然后在全基因组范围进行比对。比如, 某作物的基因组有 2.4 Gb, 即使某一轮育种中用了 100 个亲本, 每个亲本也可以

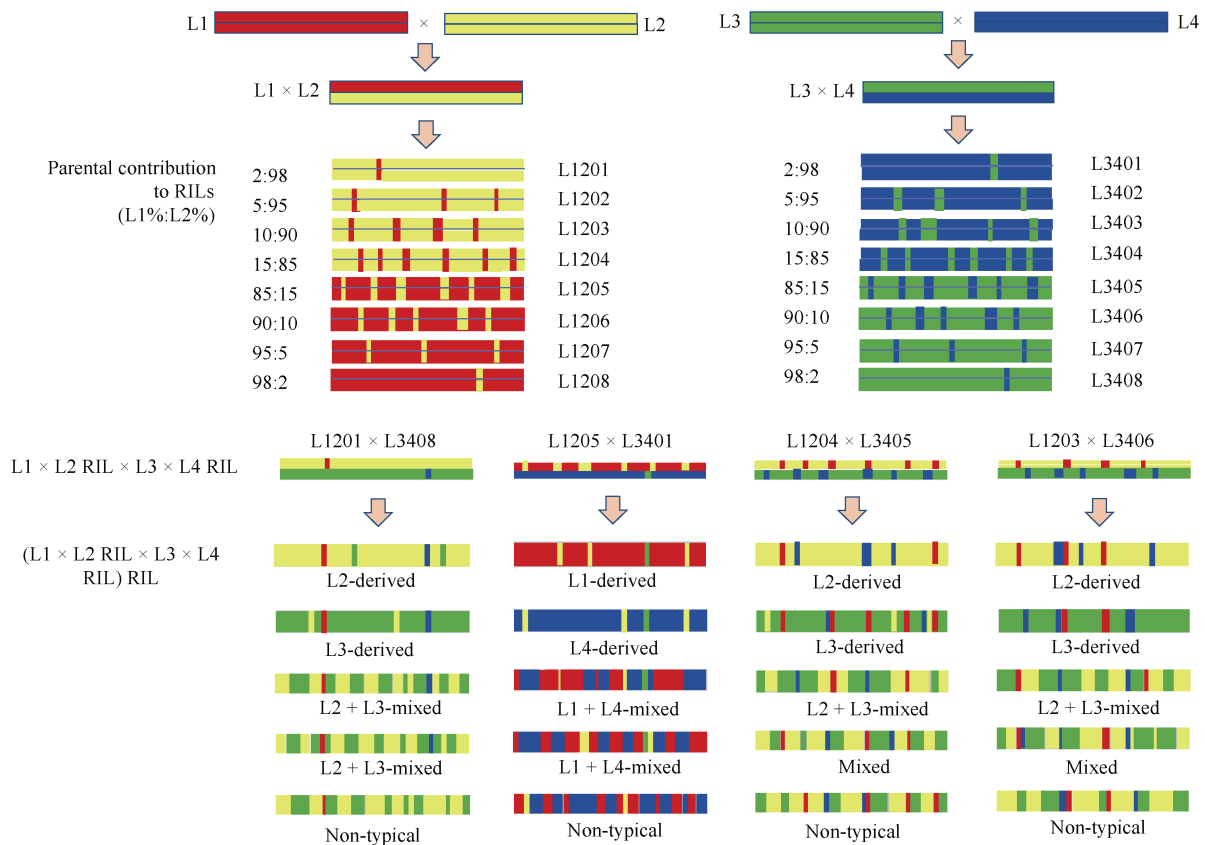


图 1 四个亲本对后代的贡献及其检测——逐步改良杂交法: (L1×L2 RIL × L3×L4 RIL)重组近交系  
 Fig. 1 Contribution of four parental lines to their progeny and its detection—stepwise improvement through hybridization, (L1×L2 RIL × L3×L4 RIL) RILs

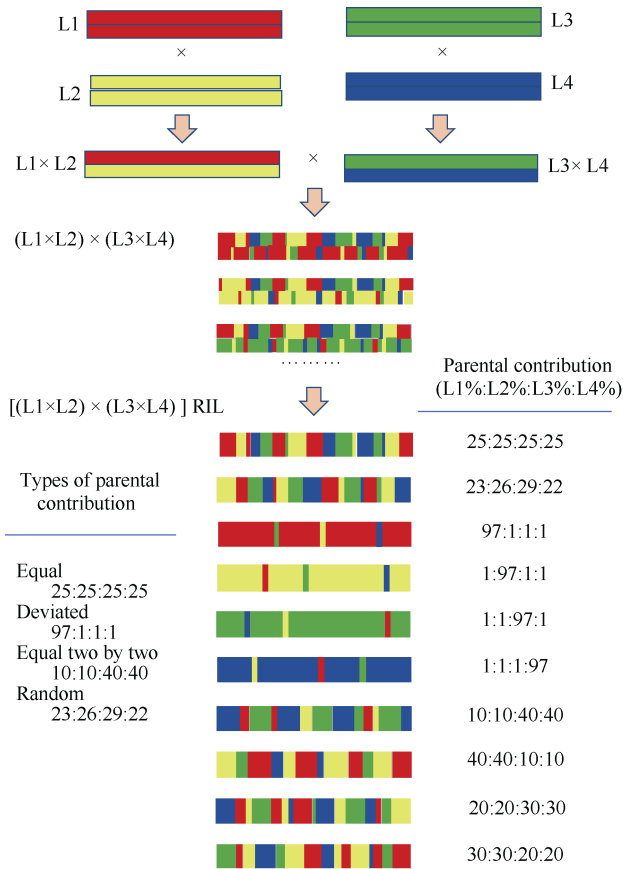


图 2 四个亲本对后代的贡献及其检测——MAGIC 式杂交法 [(L1×L2) × (L3×L4)] 重组近交系  
 Fig. 2 Contribution of four parental lines to their progeny and its detection—improvement through MAGIC hybridization, [(L1×L2) × (L3×L4)] RILs

平均贡献 24 Mb, 每个片段的长度可能高达成百上千 kb。用分子标记来检测品种间的遗传差异, 是点带面, 因此标记数越多, 覆盖面就越广, 结果越

可靠。生物个体间的遗传差异是相对的, 因为突变或剩余杂合性等, 任何 2 个个体之间都可能存在某种程度的遗传差异。

分子标记检测可以用于品种亲缘关系的溯源, 确定未知亲本数量及其遗传贡献。采用高密度的分子检测, 可以准确区分多个亲本对所选后代或新品种的遗传贡献(图 1 和图 2)。未来的品种权保护应该可以鉴别出来自受保护的多个亲本及其各自的贡献大小。EDV 的定义只是判别与某个品种的差别程度。一般品种的选育过程中只是经历了有限次数的交配, 产生重组的机会有限。例如, 在一条染色体组来源于 4 个亲本, 一轮重组后每条染色体上只会出现 3~5 个左右的某一亲本的片段。在高密度标记的检测下, 每个片段上可以有上千个标记, 而该片段上任意 2 个亲本间有差异的标记可能有数十个甚至更多。对于不同染色体, 都是同一套亲本的不同嵌合体, 每个亲本的片段一般都会出现在任何一条染色体上。多个染色体的比较和综合分析就可以把大量模棱两可的潜在亲本去除掉。采用高密度的分子标记, 可以判别是否未经许可就利用了别人受保护的 material 作为亲本, 哪怕某个材料在育成后代中只贡献了 1% 的基因组。所以, 未经许可把多个受保护材料进行复合杂交, 从中选育的品种或自交系, 也是可以通过分子标记准确检测出来的。李建生实验室团队利用 5.6 万个高密度 SNP 标记, 揭示了我国推广面积最大的杂交种郑单 958 的母本自交系郑 58 的系谱之谜, 包括各个祖先亲本的遗传贡献大小及其在染色体上的精细分布(图 3)<sup>[17]</sup>。

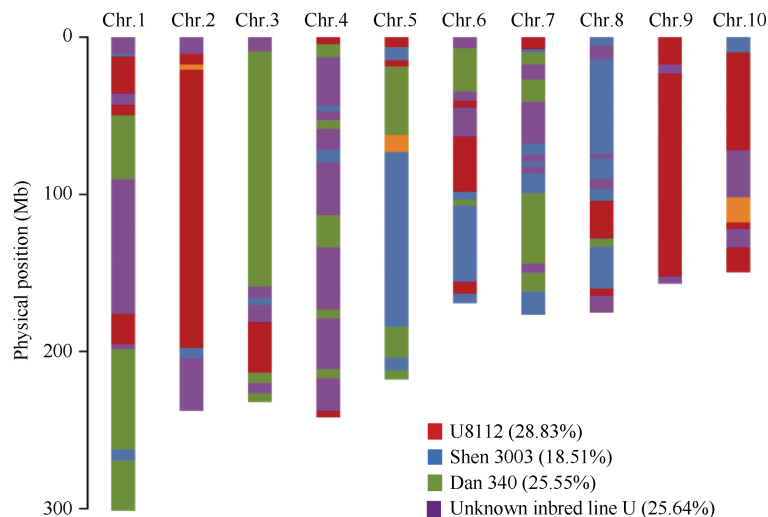


图 3 玉米自交系郑 58 的亲缘关系组成及其遗传贡献  
 Fig. 3 Maize inbred line Zheng 58 and its parents and their genetic contribution  
 根据张人予等<sup>[17]</sup>更新和修改。 This figure is revised and updated from Zhang et al. <sup>[17]</sup>

### 3.2 功能位点特异性检测

在知识产权审理过程中,表型特异性可能作为最终的判断标准,独立于分子检测而起作用。2021年7月5日,最高人民法院发布《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)》(法释[2021]14号),其中第24条规定“田间观察检测与基因指纹图谱等分子标记检测的结论不同的,人民法院应当以田间观察检测结论为准”。司法解释直接明确了在有争议的情况下,表型性状(表型特异性或差异)作为品种鉴定的最终依据。随着分子标记的广泛应用,愈来愈多的与表型相关联的特异性位点被挖掘。遗传学上把控制表型差异的基因标记(位于基因内、具有控制性状表型的标记)称为功能标记。功能标记被认为是可以用于主基因性状标记辅助选择的最佳标记,同时应该也是评价和鉴定主基因性状、根据其控制的表型测试 DUS 和 EDV 的最佳选择。因为根据功能标记可以很好地预测性状表达,克服了连锁标记与目标基因容易发生重组而导致标记与性状检测不符的问题。此外,连锁标记在不同的遗传背景下可能表现并不一致<sup>[18]</sup>。

随着作物基因组研究的进展,大量控制重要农艺性状的基因被克隆,利用相关信息开发的功能标记,可以作为形态学 DUS 和 EDV 测试的补充。在小麦等主要粮食作物的农艺性状、品质性状、抗病性和非生物胁迫耐逆性等方面已经开发了大量的功能标记<sup>[19-20]</sup>。在玉米中,已开发了控制玉米籽粒含油量和油酸组分含量的关键数量性状位点的功能标记<sup>[21]</sup>。在水稻中,已经列入 DUS 测试目录中的育种相关性状,如籽粒长度(短与长)、胚乳类型(糯与非糯)、胚乳直链淀粉含量(不同种类)、糊化温度(低与高)、大米香味(芳香与非芳香)<sup>[22]</sup>,其测量值取决于检查员或昂贵的设备,现在已经开发出相应的功能标记。在番茄中,从番茄花叶病毒抗性基因(*Tm1*)和镰刀菌抗性基因(*I*)发现紧密连锁特异性片段扩增区域(SCAR)标记<sup>[23]</sup>。番茄黄萎病(*Ve1*, *Ve2*)、镰刀菌(*I2*)、番茄花叶病毒(*Tm2*, *Tm22*)和根结线虫(*Mil-2*)的 CAPS 标记也已经被开发,而这些性状均是番茄候选品种 DUS 评价的必选性状,其标记检测与田间测定之间存在高度相关性。在大麦中,采用由约 500 个英国大麦品种组成的群体,将 32 个 DUS 性状与 1536 个 SNP 进行全基因组关联分析,发现其中 15 个性状之间存在显著的关联关系<sup>[24]</sup>。然后,使用

KASP 基因型鉴定平台对 169 个英国大麦品种进行了验证,提供了一套 25 个基因标记,可用于预测这 15 个 DUS 性状的表型<sup>[25]</sup>。

与控制重要农艺性状的主基因差异相类似,转基因和基因编辑所育成的品种以及经过诱变、系统选择、饱和回交转育等所育成的品种一般主要涉及少数基因及其位点的改变。因此相关衍生品种的保护和监管,可以在田间观察重要农艺性状的改变。与传统的诱变和系统选择相比,转基因、基因编辑和饱和回交转育的品种都有已知发生改变的特定基因或基因组区域,可以通过设计功能性特异位点进行判断。

## 4 作物品种保护中的 DUS 和 EDV 评价标准

UPOV 的生物化学和技术分子工作小组提出了 3 种将分子标记技术引入 UPOV 系统的方案:利用基因特异的标记来识别表型特征,应用分子标记管理参照基因数据库,使用无限数量的标记找到品种之间的差异。

### 4.1 分子标记在 DUS 评价中的应用

在 UPOV 的 PVP 体系中,新品种必须满足 3 个技术标准才能获得保护。在至少一种形态性状上,与任何其他对照品种存在差异(distinctness, D);在相关性状上,根据物种的繁殖系统,它们应足够一致(uniformity, U);在 2 个独立的生长周期,它们在性状表达上应稳定(stability, S)。这就是常说的 DUS。截至 2019 年 2 月,在不同植物物种中,用于此类 DUS 试验的测试指南共有 325 个性状<sup>[7]</sup>。本节讨论利用分子标记开展 DUS 评价的各种可能途径。

特异性:品种的特异性可以通过全基因组分子标记分析提供的以下特征进行鉴别:(1)全基因组特异性指纹图谱;(2)大量分子标记构建的、反映全基因组变异的特异性单倍型图谱;(3)某一品种特有的、不同于其他品种的等位基因特异序列;(4)特异性基因组区段;(5)控制特定性状的特异性功能标记及其单倍型。在玉米中,通过大规模重测序,利用大量玉米材料的遗传多样性,发展了不同版本的单倍型图谱<sup>[26-28]</sup>,可用于开发上述(1)~(4)种鉴定品种特异性的方法。已在许多作物中构建了高质量的单倍型图谱,包括小麦<sup>[29]</sup>、水稻<sup>[30]</sup>、大豆<sup>[31]</sup>、番茄<sup>[32]</sup>等。通过比较品种间的分子标记,可以发现某一类或某个品种特有的分子标记等位基因。采用的分子标记越多,就越有可能找到某一品种不同于其他品种的



特有指纹图谱。利用第一代 SNP 芯片(含 1536 个 SNP 标记),通过比较分析 770 份玉米自交系,发现了一部分 CIMMYT 和中国自交系中特有的 SNP 等位基因<sup>[33]</sup>。除了上述讨论的与表型性状挂钩的功能标记外,也存在可以区分不同品种、位点特异但不与表型性状相关联的品种特异性分子标记。例如,非洲高粱的全基因组测序显示了具有地方品种特异性的 SNP 等位基因,表明它们可能用于区分现代种和地方种<sup>[34]</sup>。这些特异性标记除了可以用于保护地方品种免受生物剽窃、走私和欺诈性营销外,也可用于品种的特异性鉴定。如前节所述,转基因、基因编辑、诱变、系统选择、针对质量性状的饱和回交转育等所育成的品种需要特别考虑其特异性的检测问题。

一致性和稳定性:田间检测的表型一致性和稳定性本身就是品种分子水平差异的反映。品种由于没有达到足够的纯合度以及由于混杂所导致的不一致和非稳定状态,都可以通过分子标记来揭示。遗传纯合度越高,材料越稳定,上下代之间的差异就越小,品种内单株间的差异也越小。大规模的种质资源多样性分析揭示了不同物种存在的遗传杂合度<sup>[2,33]</sup>。在 CIMMYT 的玉米种质资源中发现 1%~5% 的 SNP 位点存在遗传杂合性。根据大量材料的分析,可以确定新品种审定所需要达到的最低遗传纯合度标准,以此作为一致性和稳定性的判断标准之一。品种内单株间的遗传差异可以作为一致性和稳定性的判断标准之二。早期利用 SSR 和 RFLP 分子标记对水稻品种内的遗传变异分析表明,农家种比现代品种表现出更高的品种内多样性,SSR 能够比 RFLP 揭示更大的品种内异质性,可以区分关系非常紧密的个体间的差异<sup>[35]</sup>。与此相反,从 5 种来源(原种、育种家种子、基础种子、认证种子和农民保留种子)的水稻品种,各取 20 植株,利用 55 个 SSR 标记进行分析,发现此 100 植株之间没有变异<sup>[36]</sup>。利用 AFLP 分析形态有差异的油菜自交系时,PCA 和 Rogers 距离揭示了与田间表型相似的异质型<sup>[37]</sup>。利用 15 个 SSR 对 10 个油菜品种进行一致性评价,检测到不同品种内的差异<sup>[38]</sup>。使用 SSR 评估小麦和番茄品种的一致性,45 个小麦品种中有 24 个,使用 7~9 个 SSR 位点即达到一致性标准;利用 6 个 SSR 检测 10 个番茄品种,其中 9 个品种是一致的<sup>[39]</sup>。对 4 个杂交油菜品种进行分析,发现其中 3 个品种的 SSR 检测表现出比形态学性状更高的一致性<sup>[40]</sup>。利用 9 个多态性

SSR 评价葡萄品种的 DUS,发现 171 个品种-SSR 组合中只有一个不符合一致性标准<sup>[41]</sup>。在小麦稳定性研究中,采用 SSR 数据参数替代田间稳定性试验,纯合 SSR 位点比例(SSR-HLR)大于 95% 或小于 91% 的品种分别被认为是稳定的和不稳定的,而这 2 个阈值之间的品种则需要进行形态学评估。以 SSR-HLR 为基础,采用 80 个多态性标记对 633 个小麦区试品种进行了稳定性检测<sup>[42]</sup>。

大量玉米 SNP 分析表明,同一自交系内的不同单株间一般可能存在 1% 以上的遗传差异。也就是说,随机选择 100 个标记,理论上只能找到一个有差异的标记位点,但这个差异标记可能会因为机会的原因而检测不出。而采用 1000 个标记时,理论上就会有 10 个有差异的标记位点;采用 10,000 个标记时,理论上就有 100 个有差异的标记位点,而实际上能够检测到的差异标记数基本上就是围绕 100 上下波动了。因此,从每个测试材料随机选择 3~5 个单株进行大量分子标记的分析,即可准确判断材料的一致性和稳定性,并提供精准的可比性结果。目前关于采用分子标记分析测定品种杂合性(纯度)和品种内变异来进行 DUS 测定的报道和建议十分有限。最近在苜蓿<sup>[43]</sup>、大豆<sup>[44]</sup>和 大麦<sup>[45]</sup>中的有关工作证实分子标记可以用于测试 DUS 及其品种特征,包括通过混样分析进行异常植株的鉴定<sup>[45]</sup>。过去 20 年,我国的植物新品种保护工作取得了长足的进展。在全国主要农业生态区建立了 1 个植物新品种测试中心和 27 个测试分中心,发布了 200 多种植物新品种 DUS 测试指南和 18 种农作物新品种 DNA 指纹图谱鉴定技术标准,建成了测试品种的表型、图像和 DNA 指纹图谱的品种数据库。2016 年还建立了育种者自主开展自有品种 DUS 测试的新机制,鼓励有条件和能力的申请者自行开展 DUS 测试(崔野韩,私人通讯)。

#### 4.2 分子标记在 EDV 评价中的应用

关于一个品种是否派生于原始品种的问题,业界已经在某些物种的遗传相似性阈值方面达成了共识。如果达到该阈值,则证明该品种不是 EDV 的举证责任会转到被指控的 EDV 育种者。按照各种植物的特异性,可以利用分子标记来评判植物新品种是否属于 EDV。在系谱原则中,EDV 的判断阈值可以根据观察到的遗传相似性与 IBD 之间的相关来确定。因此,已知图谱位置的全基因组标记可应用于阈值的确定。EDV 阈值的确定要考虑以下几个方面:(1) 适合的种质资源群体,具有清晰的遗传系谱;

(2) 公共的分子标记; (3) 遗传相似性分析方法; (4) 评价遗传相似性和验证育种系谱; (5) 识别或者采纳所测试的阈值; (6) 设立 EDV 指导原则或者采纳已建立的指导原则。EDV 是根据 DNA 距离或者遗传相似度阈值, 通过科学分析针对每个作物设置, 并通过国际种业联盟(International Seed Federation, ISF)达成业界共识。

鉴定 EDV 时所用的分子标记, 应该根据无偏性、精确性和基因组覆盖率进行选择<sup>[46]</sup>。为了确定标记是否应该在整个基因组中均匀分布还是局限于控制特性差异的特定区域, 利用 F<sub>2</sub>代和不同回交群体模拟了玉米亲本自交系及其后代之间遗传相似性的分布。结果表明, 随着染色体数目和长度的增加, 采用密集均匀分布的标记时, 材料的标准差和重叠现象都有所降低。根据对40个已登记大麦品种 AFLP、SSR、反转录转座子扩增多态性(IRAP)和序列特异性扩增多态性(S-SAP)标记的比较分析, 在建立 EDV 阈值时, 应根据作物的种类来指定标记系统和统计方法<sup>[47]</sup>。

基于定义阈值的 3 个原则, 即“尾部”、“校准”和“系谱”原则<sup>[46,48]</sup>, ISF 确定了多年生黑麦草、玉米、油菜、棉花和莴苣的阈值。基于“尾部”原理, 在参考群体相似度分布的尾部选取一个百分点作为阈值。将该方法应用于生菜中, 引入了 0.96 的阈值。在另

一项研究中, 利用 13 个 AFLP 引物组合和 109 个 SSR 位点对 60 个不同亲缘程度的硬粒小麦进行了 EDV 鉴定。基于“尾部”原理, 利用 AFLP 数据计算出 Jaccard 相似度阈值也为 0.96<sup>[49]</sup>。这一阈值也被应用于盆栽植物石楠愈伤组织的 EDV 鉴定<sup>[50]</sup>。利用 68 个 SSR、217 个 AFLP 标记比较了 134 个硬粒小麦品种的家系信息, 建立了 EDV<sup>[51]</sup>。发现其中 58 份登记材料与父母系谱信息不匹配, 但 SSR 可以识别该种质的“育种系谱”。

建立有效的技术评判机制将有利于 EDV 制度在全球的实施。在玉米中根据物理图谱和遗传图谱各选出 1536 个 SNP 标记, 3072 SNP 标记检测的结果可以达到 99%的可信度, 384 SNP 标记则可以达到 95%的可信度。根据确定的品种间遗传一致性阈值, 可以将玉米品种分为 3 类, 这与交通信号灯类似(图 4), 包括: “非明显或无可争辩的实质性派生”(红色)、“不确定”(橙色或黄色)和“非派生或独立性”(绿色)。ISF 将基于 SSR 的阈值(相似性<82%, 绿色; 82%~90%, 橙色; >90, 红色)更新为 SNP 的阈值: 遗传相似性<91%和 95%分别被认为是非派生(绿色)和绝对派生(红色), 而 91%~95%则位于橙色区<sup>[52-53]</sup>。ISF 认定可以通过 DNA 分子标记鉴定潜在派生品种与原始品种之间的遗传相似度, 来确定玉米的 EDV。ISF 网站提供了玉米指南中使用的 3072 个 SNP 标记。

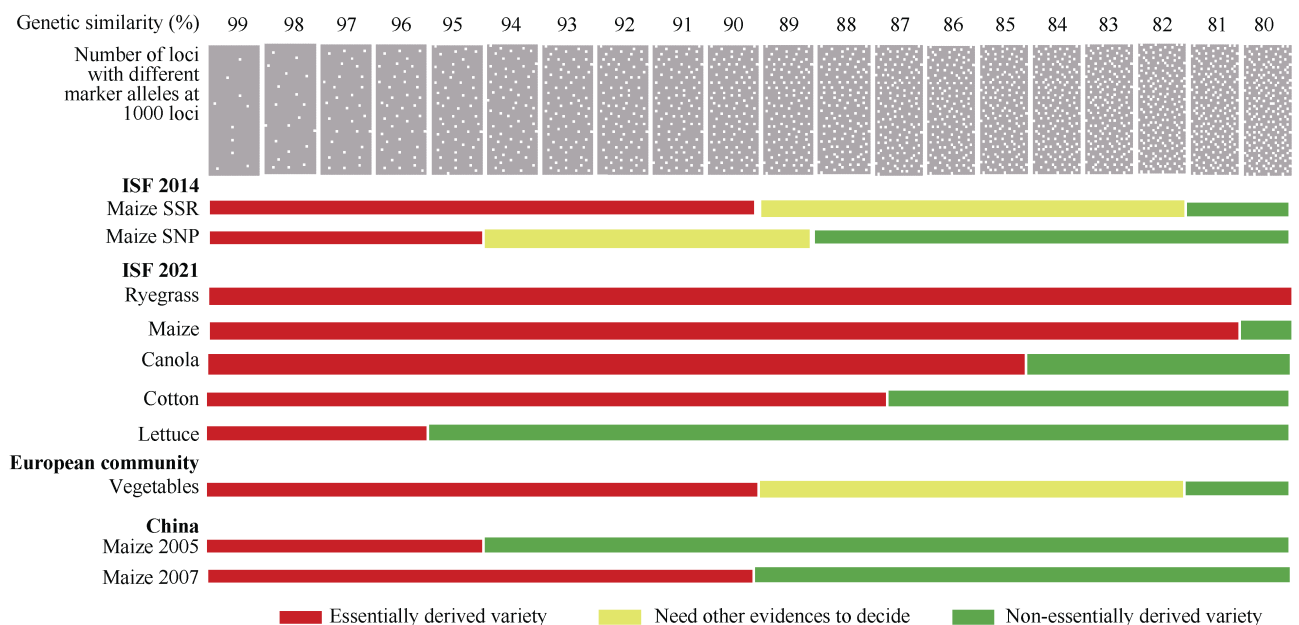


图 4 根据分子水平的遗传相似性所确定的 EDV 判断标准及其实例

Fig. 4 Discriminant criteria of Essentially Derived Variety (EDV) and examples using genetic similarity at the molecular level

什么比率可以作为 EDV 的阈值一直是一个有争议的问题。ISF 于 2004 年、2007 年发布了生菜、棉花、玉米、油菜的《实质性派生品种判定准则》, 分别规定遗传相似系数应大于等于 96%、87.5%、82% 和 85%。ISF 于 2021 年 4 月发布了包括黑麦草(60%)、玉米(91%)、油菜(85%)、棉花(87.5%)、莴苣(96%)及蘑菇 6 种作物的阈值标准(图 4)。在欧盟(法国), 采用 200 个标记鉴定蔬菜品种间的实质性派生关系, 若遗传相似度大于 90%可以判定为实质性派生品种; 若小于 82%, 可以判定非实质性派生品种。若为 82%~90%, 则需根据育种记录和 DUS 测试结果等进行辅助判定。国际无性繁殖观赏植物与果树育种家协会(International Community of Breeders of Asexually Reproduced Horticultural Plants, CIOPORA)建议遗传相似系数 0.9 作为证据责任转移的标准。有关成员均非常重视运用这些标准通过协商的方式解决 EDV 纠纷。

在分子阈值未能得到确定结论的情况下, 还可以利用其他方式来鉴定, 包括育种和育种系谱记录、杂交优势以及形态学。其中一个例子是 Danziger 起诉由 Astée Flowers 培育的满天星品种“Blancanieves”。2 位育种家独立进行了遗传相似性评估, Danziger 发现原始品种“Million Stars”与假定的 EDV “Blancanieves”之间的遗传相似性达 97.7% (在检测的 214 个标记中, 有 209 个相同)。然而, 第 2 个育种家通过对 133 个标记的分析, 发现了较低的遗传相似性(91%)。因此法院拒绝使用基因型数据, 而是采用了表型差异的证据<sup>[54]</sup>。

在澳大利亚, 表型性状的重要性受到重视。因为重要性状的改变, 不仅仅是简单的修饰, 而是影响了品种的重要特征、表型或价值。例如, 育种家证明某茅草品种的节间长度是十分重要的性状, 能够影响茅草质量和耐受力, 节间长度缩短之后的品种不应该被判定为 EDV, 而应该受到原始品种权利人的权利控制。CIOPORA 建议遗传相似系数 0.9 作为责任转移的标准, 因为这些作物品种, 遗传系数 0.9 就可以很好地区分变异株、转基因生物和单性繁殖植物与通过杂交和选择获得的品种。

#### 4.3 分子标记数目和基因组覆盖率对品种保护和监管的影响

在品种保护和监管过程中, 所采用的标记数目及其基因组覆盖率是影响检测结果精确性的重要因素。标记数越少, 结果的精确性越低。比如, 采用

50 个标记, 一个标记的差异就代表了 2%的标记有差异, 2 个标记的差异就是 4%; 而 2%和 4%之间的其他差异是无法区别的。也不可能对小于 2%的差异进行测定。要检测出 1%的差异, 就至少要把标记数增加到 100 个。另一方面, 不是说采用了 100 个标记, 就刚好能检测出 1%的差异, 还需要有一个可以有效检测的置信区间。统计学上, 样本的抽样误差与样本的大小成反比。所用标记数(样本)越少, 所得结果的抽样误差就越大; 而标记数量越多, 结果越准确, 越能反映不同品种全基因组的特征。也就是说, 当所用标记数较少时, 对同一对品种进行比较, 采用不同套的标记所得的结论可能完全不一样; 而对于遗传差异水平相同的不同对品种间的比较, 由于抽样误差, 采用同一套标记, 可能得到完全不同的结论。因此, 采用数目较少的同一套标记去检测和比较千差万别的品种(系), 由于抽样误差的原因很难做到结论正确与公平合理。所以, 在理论上, 提高不同品种对之间差异检测的可比性, 就需要增加代表全基因组差异的标记数; 标记数越多, 所得到的遗传相似性的估值就越准确。

由于标记类型、检测平台和成本的限制, 在 DUS 测试和品种监管中, 一直以来只是采用数目极其有限的分子标记, 且没有考虑抽样误差的影响。比如, 在玉米中一直采用采用 40 对引物扩增的 SSR 位点进行待测品种与对照或原始品种的比较。这些标记也仅仅涉及到 40 个位点。玉米基因组大小一般在 2200~2300 Mb。根据最近对 26 个玉米自交系的测序表明: 玉米基因组共有 103,033 个基因, 其中只有大约 1/3 基因存在于所有基因组中<sup>[55]</sup>。这 40 对引物所能代表的位点仅仅是玉米全基因组序列的极少一部分。因此, 用这些位点的差异去判别杂交种的异同, 存在很大的局限性。往往存在 2 种典型的误判, 一是 40 对引物的标记结果完全相同, 但是杂交种性状有较大的差别。这种误判会挫伤了育种人员的创新积极性。二是 40 对引物的标记结果有 4 个位点(10%)以上的差异, 但是杂交种性状基本一样。这种误判为剽窃别人的成果制造了机会。当然任何技术都有其历史的局限性, 应该充分肯定以 40 对 SSR 引物作为品种真实性鉴定的标准, 在特定历史时期发挥了积极作用。但是, 随着分子标记技术的发展, 标记检测成本大大降低, SNP 标记成为主流, 需要与时俱进, 改进和完善现有方法, 真正让先进技术保护先进生产力。

过去很长一段时间以几十个 SSR 标记作为区分品种的标准,那是因为当时标记数目有限,标记分析成本很高。而 SSR 标记每个位点的等位基因数目相对比较多,一般可高达 20~30,这样可以通过少数标记位点获得较多的等位基因差异。但 SSR 和 SNP 所揭示的差异本质上是不一样的,前者的等位性差异由碱基重复次数决定,而后的等位性差异由核苷酸差异所揭示。同样数目的等位基因,当然还是位点数多一点的更好,因为可以覆盖更广泛的基因组。现在所用的 SNP 标记,数量巨大,分析成本低廉,等位基因判断非常清楚且可以自动识别。为了品种保护数据的连续性和累加性,过去所用的 SSR 也可以转换为 SNP 标记继续使用。简言之,采用数目较多的分子标记,同时考虑有差异的分子标记所占的比例,而不仅仅是绝对的差异个数,是未来应用分子标记进行品种权保护的重要指标。采用差异标记所占比例(遗传相似系数)的一个巨大优势,就是可以横向比较不同标记系统或不同标记数目的结果,当标记数目足够大时,差异标记所占比例(遗传相似系数)就会在所有标记系统中趋于一致。因此在理论上,采用不同标记类型和不同数目标记的评价系统,都可以在遗传相似系数这一共同指标下进行比较,这就大大地简化了 DUS 和 EDV 的测试和评价。尽管在理论上我们可以探讨进行品种鉴别所需的最小标记数并寻找最佳的标记组合<sup>[56-57]</sup>,但随着标记检测成本的大幅度降低,用于 DUS-EDV 评价的标记数目可能是不再需要考虑的一个限制因素。

## 5 利用分子标记保护作物品种的实践

### 5.1 欧美国家植物品种保护

在欧洲,法国国家品种与种子检测中心(Variety and Seed Study and Control Group, 法文缩写为 GEVES)以及英国环境、食品和农村事务部已经使用了分子技术进行 DUS 测试。GEVES 使用了分子指纹和基因(转基因生物、物种特异性的参考基因或抗性基因)的测试。国家农业植物研究所(National Institute of Agricultural Botany, NIAB, 英国剑桥)在 DUS 测试中已经充分使用了分子标记。NIAB 已进行的研究涉及 3 个国际植物新品种保护联盟 BMT 的方案。例如,通过项目资助来建立独立的检测平台,可用于小麦 SSR 引物的开发。相关的分子技术研究表明,分子标记在品种鉴别、品种身份识别和多样性的度量等方面有很大的潜力,尤其是在确定独

特性和一致性的 PBR 过程中。在一些物种中,同工酶(向日葵、大豆和玉米)或贮藏蛋白(麦谷蛋白和大麦醇溶蛋白)曾作为附加特征被纳入 DUS 测试指南。欧盟和各成员国没有统一制定必须遵守的 EDV 判定规则。根据具体案情由法院来决定由哪方承担多大程度上的举证责任。CPVO 只判断品种是否符合授权条件,不判断其授权品种是否是另一个品种的 EDV。如出现争议,通常由原始品种权利人证明被控品种是 EDV。如果被控方不承认,可以请求法院进行裁决。

在美国,植物知识产权通过植物专利、植物品种保护和实用新型专利得到保护。植物专利为无性繁殖的品种包括薯类作物提供保护。植物品种保护为两性(种子)繁殖的品种(包括薯类作物、F<sub>1</sub>杂交种和 EDV)提供保护。目前,实用型专利可以为任何植物类型或植物器官提供保护。植物品种可以同时得到双重保护。美国植物品种保护办公室负责管理植物品种保护法案。这种保护要求该品种满足 DUS 的要求,有别于其他的品种。植物品种保护法案规定,当一个品种具有“一个或多个识别的形态、生理或其他特征,不同于以前所有品种的共有特征”时,就被认为是不同的。植物品种保护适用于有性(种子)繁殖或块茎繁殖的品种和 F<sub>1</sub>杂交种。申请保护的品种在美国销售或使用不得超过 1 年,在国外使用不得超过 4 年。无性繁殖作物得到美国专利局的保护。从签发之日起,保护证书 20 年有效,对于藤蔓和树木是 25 年有效。新品种被授予 2 种豁免权:一是允许农民在自己农场里保存种子。另一种是允许使用该品种进行研究。美国历史上有关植物和农业知识产权的重大事件包括:(1) 杂交种品种可以通过商业秘密(20 世纪 30 年代)而得到保护;(2) 美国专利局制定的“植物专利法”(1930 年),为无性繁殖的园艺作物和苗木提供保护,但马铃薯不被包含在内;(3) “植物品种保护法”(1970 年)为种子生产的植物提供像专利一样的保护;(4) “活体生物”的实用专利(1980),包括对生物和植物品种、性状、器官和工艺流程的所有权。

加拿大的植物育种者权利法于 1990 年 8 月 1 日生效,以保护植物育种者的新品种。作物品种可以得到 18 年的法律保护。所有植物物种都有受保护的资格。被“授予权利”的新品种业主在该品种的使用上具有独家权利。受保护的品种必须具 DUS 的特点。植物育种者权利办公室的职能是通过对新品种提供

保护来确保植物育种者的权利。

## 5.2 发展中国家植物品种保护

知识产权制度虽已确立一个多世纪,但是直到最近,知识产权还未得到大多数发展中国家植物育种和种子部门的重视。大多数发展中国家正处于实施和执行有关植物品种知识产权的初期阶段,只在少数发展中国家受到重视。在中国和印度,植物品种保护是以亲本和杂交种为重点。在一些国家,观赏植物在品种保护中占有主导地位。在发展中国家,转基因作物的保护遭遇特别困难。大多数转基因作物围绕着解决草甘磷(Roundup Ready)大豆和 *Bt* 棉问题。在植物育种中加强知识产权保护的压力向决策者和投资者双方都提出了挑战。眼前的挑战是制定和实施与 TRIPS 相一致的法规,并支持各个国家的农业发展目标。

## 5.3 我国现行的作物品种保护制度中分子标记技术的应用

2015 年,国家标准委将 DNA 测试与田间小区种植测试并列为品种真实性鉴定的可靠方法之一。2015 年 5 月 29 日,国家标准化管理委员会批准发布 GB/T3543.5-1995《农作物种子检验规程真实性和品种纯度鉴定》第 1 号修改单,确定了 DNA 分子标记检测方法在品种真实性验证和身份鉴定中的法律地位:第一,GB/T3543.5-1995《农作物种子检验规程真实性和品种纯度鉴定》第 6 条增加 1 款(第 6.2.4 条),“品种真实性验证或身份鉴定,允许采用简单重复序列(简称 SSR)和单核苷酸多态性(简称 SNP)分子标记方法。检测采用抽取有代表性的检测样品与标准样品、DNA 指纹数据库比较的方式。”第二,规定田间小区种植和 DNA 指纹测试均是鉴定品种真实性的可靠方法,将第 6.4 条“田间小区种植是鉴定品种真实性和测定品种纯度的最为可靠、准确的方法”修改为“田间小区种植是鉴定品种真实性和测定品种纯度的可靠方法之一。”

2015 年,中国通过全国人民代表大会立法将 DNA 等快速检测方法确定为判定品种侵权的依据:新修订的《种子法》第 47 条第 2 款,“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。”2020 年 12 月 17 日,国家水稻良种攻关率先试行实质性派生品种制度,36 家攻关单位约定 EDV 判定阈值为遗传相似

系数 92%且品种也已获得授权的,鉴定方法为《植物品种鉴定 MNP 标记法》,派生品种权利人将与原始品种权利人分享获益分成。2021 年 8 月 17 日,种子法修正草案提请十三届全国人大常委会第三十次会议审议。本次修订拟建立实质性派生品种(EDV)制度,并进一步完善侵权赔偿制度,完善法律责任,引发行业上下的高度关注。

## 5.4 我国作物品种监管和检测中分子标记的应用

玉米和水稻作为杂种优势利用作物,在分子标记检测、EDV 测试和品种监管中极具代表性,我国水稻和玉米品种监管和 DNA 测试技术的发展,大致可以简单划分为 3 个时期。

DNA 测试技术引进、研究和发展期(2004 年及以前):2003 年 3 月 17 日《全国农技中心 2003 年重点工作落实意见》“继续开展 DNA 指纹法快速鉴定玉米种子品种真实性的分子检验技术攻关研究,制作全国主要杂交玉米品种 DNA 指纹图谱。”2004 年 6 月 11 日《农业部实施<植物新品种保护条例>五周年座谈会》“已经组织研制新品种测试指南、DNA 检测方法和技术规程”。

玉米和水稻品种 DNA 技术测试标准开始制定期(2005—2007 年):2005 年《国家区试玉米品种一致性及其真实性 DNA 指纹检测技术(试行稿)》第 7.3 条(在使用 40 个 SSR 标记位点时)指出,样品间差异位点 2,判定为“不同”;差异位点=1,判定为“近似”;差异位点=0,判定为“相同或极近似”。2007 年《国家玉米品种试验 DNA 指纹鉴定管理办法》(试行)第 1 条,“为了加强玉米品种试验管理,完善国家品种试验玉米品种的一致性和真实性鉴定,根据《主要农作物品种审定办法》,制定本办法。”第 9.2 条,“发现试验品种与已知品种在遗传上差异微小,即相同或高度近似(差异位点数 3)的停止试验。根据农业部玉米品种鉴定 DNA 指纹标准,样品间差异位点数 4,判定为“不同”;差异位点=2,判定为“相同或极近似”。同一时期,农业部制订了《水稻品种鉴定 DNA 指纹鉴定方法》(NY/T 1433-2007)。

玉米和水稻等作物 DNA 测试技术应用期,其他作物 DNA 测试技术进入大力推广期(2008—2015 年):2009 年 4 月 7 日,农业部办公厅发布《农业部办公厅关于印发农业植物品种权执法专项行动检查的通知》,各地农业执法部门可以选择以玉米、水稻等,采取 DNA 指纹图谱鉴定技术鉴别品种的真实性,及时准确地打击“伪”品种和侵权行为。2010 年 7 月

23 日,农业部种植业管理司《农业部关于加强种子管理工作的意见》“要求增加对参试品种的 DNA 指纹检测和转基因检测,提高品种区试对照标准,严格试验程序。2013 年《主要农作物品种审定办法》第 17 条规定,“区域试验应当对品种丰产性、稳产性、适应性、抗逆性和品质等农艺性状进行鉴定,并进行 DNA 指纹检测。”2016 年《主要农作物品种审定办法》第 18 条作了同样规定。2014 年 3 月 24 日,农业部标准《NY/T 1432-2014 玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》取代《NY/T1432-2007 玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》,判定标准与 2007 年版一致。采用 40 个 SSR 位点,样品间差异位点数 2,判定为“不同”;差异位点=1,判定为“近似”;差异位点=0,判定为“相同或极近似”。同一年,制订了《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》(NY/T 1433-2014, 2014-6-1 实施)。2015 年 1 月 19 日《农业部关于进一步加强种子市场监管工作的通知》指出,“建立品种 DNA 身份信息数据库和全国统一查询平台,推行标签标识品种 DNA 身份信息,将监管重心由事前许可向事中、事后全程监管转移,便于农民识假和企业打假。”2020 年 5 月 22 日,农业农村部种业管理司制定了《2020 年自主开展农业植物新品种特异性一致性稳定性测试管理工作方案》,要求抓好落实,推进自主开展农业植物新品种特异性、一致性、稳定性测试。在现场检查过程中,要求随机抽取 10%~20%的品种,采集田间样品进行 DNA 指纹检测,与区试样品进行比对。根据最新的国家级稻、玉米品种审定标准(2021 年修订),国家级稻、玉米品种审定标准重点针对 3 个方面的内容进行了修订。一是明确品种 DNA 指纹差异要求。将稻、玉米审定品种与已审定品种 DNA 指纹检测差异位点数由 2 个分别提高至 4 个、3 个;如果拟审定的稻或玉米品种与已审定品种 DNA 指纹检测差异位点数只有 2 个或 3 个,须通过田间种植鉴定证明其与已审定类似品种具有重要农艺性状差异。根据产业发展和品种创新的需要,国家将在充分调查研究和听取各方面意见的基础上,适时修订国家级小麦、大豆、棉花等作物的品种审定标准。新的审定标准将有利于强化种业知识产权保护,激励育种原始创新,引导培育突破性品种。

### 5.5 作物品种 DNA 指纹图谱数据库及软件系统

目前我国玉米和水稻等农作物已建立了以 SSR 标记技术为基础的 DNA 指纹鉴定标准,并针对主要

品种建立了相应的指纹图谱数据库。王凤格等对我国近 4000 份玉米审定品种建立了标准的 SSR 指纹库,搭建了服务平台网站,便于与已有的审定品种 DNA 指纹进行比对<sup>[58]</sup>。在水稻<sup>[59]</sup>、小麦<sup>[60]</sup>、大豆<sup>[61]</sup>和油菜<sup>[62]</sup>等作物中,也建立了相应的 DNA 指纹图谱或分子身份证体系。随着新一代分子标记技术的兴起与应用,应用 SNP 技术进行品种标准 DNA 指纹库的研究迅速发展起来。赵久然等开发了多款玉米 SNP 芯片,并构建近 2 万份玉米品种的 SNP 指纹库(<http://beijing.qianlong.com/2021/1018/6411998.shtml>)。水稻中也应用基因芯片技术对近 5000 份审定品种开展了类似研究。以测序作为检测手段的液相芯片技术,因其成本低、检测位点数多和结果稳定可靠等特点,将可能成为品种分子鉴定的主流技术。2021 年发布的国家标准 GB/T38551-2020《植物品种鉴定 MNP 标记法》应用多重 PCR 扩增加测序方法可进行玉米和水稻等十多种植物品种的原品种鉴定、EDV 鉴定和品种真实性鉴定。与传统的单个 SNP 位点检测相比,MNP 方法可以在同一个 PCR 扩增片段内检测多个 SNP,因此可检测的多态性较高,能以数百到 1000 个左右的位点区别大部分生产中常见的品种。

随着测序技术的发展,包括水稻和玉米在内的主要农作物均有大规模全基因组测序和泛基因组的数据,并建立了相应的数据库。这类变异位点数据库虽然不能直接用于品种鉴定,但对其中的 SNP 位点进行深入分析和筛选,可用于构建相应的检测位点集合。以水稻为例,Yan 等<sup>[63]</sup>对 5000 多份水稻材料的 1800 万 SNP 进行筛选,构建了 4 个不同层次的 SNP 集合,不同的 SNP 集合适合不同的应用场景,其中 barcodeSNPs 集合仅用 38 个 SNP 即可区分 2500 多份水稻材料,相应数据存放在 IC4R 数据库(<http://variation.ic4r.org/>),可供用户查询。

随着 DNA 指纹的数据积累越来越多,专业的数据管理系统和应用软件在未来的品种鉴定和保护中将成为必不可少的工具。对于 SSR 标记,已开发了一款名为 PIDS 的软件系统,可有效管理和分析 SSR 等微卫星指纹数据,包括识别毛细管电泳图片,进行遗传分析等<sup>[64]</sup>,适应于玉米、水稻、小麦、大豆等主要农作物。SNP 数据的体量是巨大的,每个品种都有成千上万甚至几十万个 SNP 数据点,而检测成本的降低也将使得每个机构或种业公司每年都可检测万份以上的品种和育种材料。Groeneveld 和 Lichtenberg 开发了一款基于 PostgreSQL 数据库的软

件——SNPpit, 用于高效管理大量的 SNP 数据<sup>[65]</sup>。百奥云基于分布式数据库系统开发了一款可高效管理和分析海量 SNP 标记数据的软件——基因型大数据系统(GBDS), 不仅可轻松管理数十亿条 SNP 数据, 还整合了生物信息分析工具, 用户通过界面进行鼠标点击操作即可进行品种比较、相似性品种鉴定、遗传距离和聚类以及群体结构分析等专业的数据分析工作(<https://breeding.biobin.com.cn/genotype/index.html>)。GBDS 系统可弹性扩展, 通过增加服务节点等方式来管理不断增加的数据, 同时保证系统各项功能的使用速度不变, 从而可满足不同层次用户对品种 SNP 基因型数据管理和分析的需求。

## 6 利用分子标记保护品种知识产权和监管品种的建议

中国的作物品种保护正处在一个历史发展的关键时期。与品种保护和知识产权有关的理论和实践问题已经引起专业团体和管理部门的极大重视。种业的创新发展需要保护知识产权, 保护创新性品种的育种和推广。综合本文有关作物品种保护的讨论和评述, 我们就利用分子标记保护品种知识产权和监管品种提出如下建议:

第一, 建议组织国内作物分子标记技术的优势团队共同研究建立适合我国种业发展国情, 又符合现代种业技术发展方向的植物品种知识产权保护和品种监管的分子标记技术体系。该体系要以广义的 SNP 标记为主, 逐步增加用于品种保护和监管的分子标记的数目, 并根据种业发展的需要和功能基因挖掘的进展定期更新分子标记。

第二, 建议主管部门以作物为基本单元, 组织种业内不同部门、不同单位、不同学科的管理人员和专家组成我国作物品种知识产权保护和品种监管的分子标记技术标准制定咨询委员会。集思广益, 发挥全行业各个方面的积极性, 讨论和提出建立我国作物品种知识产权保护和品种监管的分子标记技术标准的原则, 为鼓励种业科技创新、提高种业的核心竞争力、打好种业翻身仗出谋划策。

第三, 建议国家或各地方按照相应标准, 尽快建立主要品种的分子指纹图谱数据库系统, 把品种审定标准样品的 SSR 和 SNP 指纹图谱数据集中起来, 搭建服务国内种业的分子标记公共服务平台。对外提供查询和比对的数据接口, 允许育种或检测单位调用相应接口进行查询。系统可以只返回查询和比

对各自单位和个人的结果, 如品种之间的遗传相似度, 是否属于 EDV, 近似品种名称等。这样既能满足不同用户的比对要求, 又可保护品种数据安全, 推进我国品种知识产权保护进程。

第四, 关于鉴定标准制定, 对标国际: 相似度不宜过低, 排除一般性杂交育种情形, 以保证 EDV “保留受原始品种基因控制的基本性状表达”; 团结多数: “绿区”品种占多数, “红区” EDV 和“黄区”争议品种不宜过多, 甚至无争议; 便于操作: 平衡科学和效率, 主要采用分子鉴定法。可能有争议, 但标准一旦确定, 就会大大减少争议; 循序渐进: 逐步严格标准, 逐步修订和不断完善鉴定标准, 以保护育种原始创新, 提升产业创新能力。

## References

- [1] 徐云碧, 杨泉女, 郑洪建, 许彦芬, 桑志勤, 郭子锋, 彭海, 张丛, 蓝昊发, 王蕴波, 吴坤生, 陶家军, 张嘉楠. 靶向测序基因型检测(GBTS)技术及其应用. 中国农业科学, 2020, 53: 2983–3004.  
Xu Y B, Yang Q N, Zheng H J, Xu Y F, Sang Z Q, Guo Z F, Peng H, Zhang C, Lan H F, Wang Y B, Wu K S, Tao J J, Zhang J N. Genotyping by target sequencing (GBTS) and its applications. *Sci Agric Sin*, 2020, 53: 2983–3004 (in Chinese with English abstract).
- [2] Xu Y B. *Molecular Plant Breeding*. Oxfordshire, UK: CABI Publishing House, 2010.
- [3] Cooke R J, Reeves J C. Plant genetic resources and molecular markers: variety registration in a new era. *Plant Genet Resour*, 2003, 1: 81–87.
- [4] Heckenberger M, Bohn M, Melchinger A. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines. *Crop Sci*, 2005, 45: 1120–1131.
- [5] Heckenberger M. Identification of Essentially Derived Varieties in Maize (*Zea mays* L.) Using Molecular Markers, Morphological traits, and Heterosis. PhD Dissertation of University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 2004.
- [6] UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS), TGP/15. [https://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_15.pdf](https://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf). 2013.
- [7] Jamali S H, Cockram J, Hickey L T. Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. *Theor Appl Genet*, 2019, 132: 1911–1929.
- [8] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传. 北京: 中国农业出版社, 1994.  
Xu Y B, Zhu L H. *Molecular Quantitative Genetics*. Beijing: China Agriculture Press, 1994 (in Chinese).
- [9] Botstein D R, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Human Genet*, 1980, 32: 314–331.

- [10] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7231–7238.
- [11] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531–6535.
- [12] Zabeau M, Voss P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application. 92402629.7 (Publ. Number 0 534 858 A1). 1993.
- [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman H, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407–4414.
- [14] Tausz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12: 4127–4138.
- [15] Guo Z, Wang H, Tao J, Ren Y, Xu C, Wu K, Zou C, Zhang J, Xu Y. Development of multiple SNP marker panels affordable to breeders through genotyping by target sequencing (GBTS) in maize. *Mol Breed*, 2019, 39: 37.
- [16] Guo Z, Yang Q, Huang F, Zheng H, Sang Z, Xu Y, Zhang C, Wu K, Tao J, Prasanna B M, Olsen M S, Wang Y, Zhang J, Xu Y. Development of high-resolution multiple-SNP arrays for genetic analyses and molecular breeding through genotyping by target sequencing and liquid chip. *Plant Commun*, 2021, 2: 100230.
- [17] Zhang R, Xu G, Li J, Yan J, Li H, Yang X. Patterns of genomic variation in Chinese maize inbred lines and implications for genetic improvement. *Theor Appl Genet*, 2018, 131: 1207–1221.
- [18] Collard B, Jahufer M, Brouwer J, Pang E. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 2005, 142: 169–196.
- [19] Liu Y, He Z, Appels R, Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 1–10.
- [20] Kage U, Kumar A, Dhokane D, Karre S, Kushalappa A C. Functional molecular marker for crop improvement. *Crit Rev Biotechnol*, 2015, 16: 1–14.
- [21] Chai Y C, Hao X M, Yang X H, Allen W B, Li J M, Yan J B, Shen B, Li J S. Validation of DGAT1-2 polymorphisms associated with oil content and development of functional markers for molecular breeding of high-oil maize. *Mol Breed*, 2012, 29: 939–949.
- [22] UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability, rice (*Oryza sativa* L.). TG/16/8. <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg016.pdf>, 2004.
- [23] Arens P, Mansilla C, Deinum D, Cavellini L, Moretti A, Rolland S, van der Schoot H, Calvache D, Ponz F, Collonnier C, Mathis R, Smilde D, Caranta C, Vosman B. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theor Appl Genet*, 2010, 120: 655–664.
- [24] Cockram J, White J, Zuluaga D L, Smith D, Comadran J, Macaulay M, Luo Z, Kearsley M J, Werner P, Harrap D, Tapsell C, Liu H, Hedley P E, Stein N, Schulte D, Steuernagel B, Marshall D F, Thomas W T B, Ramsay L, Mackay I, Balding D J, Waugh R, O’Sullivan D M. Genome wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 21611–21616.
- [25] Cockram J, Jones H, Norris C, O’Sullivan D M. Evaluation of diagnostic molecular markers for DUS phenotypic assessment in the cereal crop, barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 1735–1749.
- [26] Gore M A, Chia J M, Elshire R J, Sun Q, Ersoz E S, Hurwitz B L, Peiffer J A, McMullen M D, Grills G S, Ross-Ibarra J, Ware D H, Buckler E S. A first-generation haplotype map of maize. *Science*, 2009, 326: 1115–1117.
- [27] Chia J M, Song C, Bradbury P J, Costich D, de Leon N, Doebley J, Elshire R J, Gaut B, Geller L, Glaubitz J C, Gore M, Guill K E, Holland J, Hufford M B, Lai J, Li M, Liu X, Lu Y, Richard McCombie R, Nelson R, Poland J, Prasanna B M, Pyhäjärvi T, Rong T, Sekhon R S, Sun Q, Tenaillon M I, Tian F, Wang J, Xu X, Zhang Z, Kaeppler S M, Ross-Ibarra J, McMullen M D, Buckler E S, Zhang G, Xu Y, Ware D. Maize HapMap2 identifies extant variation from a genome in flux. *Nat Genet*, 2012, 44: 803–807.
- [28] Bukowski R, Guo X, Lu Y, Zou C, He B, Rong Z, Wang B, Xu D, Yang B, Xie C, Fan L, Gao S, Xu X, Zhang G, Li Y, Jiao Y, Doebley J F, Ross-Ibarra J, Lorant A, Buffalo V, Romay M C, Buckler E S, Ware D, Lai J, Sun Q, Xu Y. Construction of the third-generation *Zea mays* haplotype map. *GigaScience*, 2018, 7: 1–12.
- [29] Jordan K W, Wang S, Lun Y, Gardiner L J, MacLachlan R, Huel P, Wiebe K, Wong D, Forrest K L, Sharpe A G, Sidebottom C H, Hall N, Toomajian C, Close T, Dubcovsky J, Akhunova A, Talbert L, Bansal U K, Bariana H S, Hayden M J, Pozniak C, Jeddloh J A, Hall A, Akhunov E. A haplotype map of allohexaploid wheat reveals distinct patterns of selection on homoeologous genomes. *Genome Biol*, 2015, 16: 48.
- [30] Wang C C, Yu H, Huang J, Wang W S, Faruquee M, Zhang F, Zhao X Q, Fu B Y, Chen K, Zhang H L, Tai S S, Wei C, McNally K L, Alexandrov N, Gao X Y, Li J, Li Z K, Xu J L, Zheng T Q. Towards a deeper haplotype mining of complex traits in rice with RFG v2.0. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 14–16.
- [31] Torkamaneh D, Laroche J, Valliyodan B, O’Donoghue L, Cober E, Rajcan I, Abdelnoor R V, Sreedasyam A, Schmutz J, Nguyen H T, Belzile F. Soybean (*Glycine max*) Haplotype Map (GmHapMap): a universal resource for soybean translational and functional genomics. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 324–334.
- [32] Ye J, Wang X, Wang W, Yu H, Ai G, Li C, Sun P, Wang X, Li H, Ouyang B, Zhang J, Zhang Y, Han H, Giovannoni J J, Fei Z, Ye Z. Genome-wide association study reveals the genetic architecture of 27 agronomic traits in tomato. *Plant Physiol*, 2021, 186: 2078–2092.
- [33] Lu Y, Yan J, Guimarães C T, Taba S, Hao Z, Gao S, Chen S, Li J, Zhang S, Vivek B S, Magorokosho C, Mugo S, Makumbi D, Parentoni S N, Shah T, Rong T, Crouch J H, Xu Y. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms. *Theor Appl Genet*, 2009, 120: 93–115.
- [34] Mace E S, Tai S, Gilding E K, Li Y, Prentis P J, Bian L, Campbell B C, Hu W, Innes D J, Han X, Cruickshank A. Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa’s indige-



- nous cereal crop sorghum. *Nat Commun*, 2013, 4: 2320.
- [35] Olufowote J O, Xu Y, Chen X, Park W D, Beachell H M, Dilday R H, Goto M, McCouch S R. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome*, 1997, 40: 370–378.
- [36] Singh R K, Sharma R K, Singh A K, Singh V P, Singh N K, Tiwari S P, Mohapatra T. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica*, 2004, 135: 135–143.
- [37] Lombard V, Tireau B, Blouet F, Zhang D, Baril C P. Usefulness of AFLP markers to estimate varietal homogeneity of rapeseed inbred line varieties in the context of plant registration and protection. *Euphytica*, 2002, 125: 121–127.
- [38] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, Cooke R J, Donini P, Lee D, Law J R, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards K J. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1091–1101.
- [39] Cooke R J, Bredemeijer G M M, Ganal M W, Peeters R, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Roder M S, Korzun V, Wendehake K, Areshchenkova T, Dijcks M, Laborie D, Bertrand L, Vosman B. Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci. *Euphytica*, 2003, 132: 331–341.
- [40] Yim G R, Ding D R, Wang C P, Leong W H, Hong Y. Microsatellite markers to complement distinctness, uniformity, stability testing of *Brassica chinensis* (Xiaobaicai) varieties. *Open Hort J*, 2009, 2: 54–61.
- [41] Vélez M D, Ibáñez J. Assessment of the uniformity and stability of grapevine cultivars using a set of microsatellite markers. *Euphytica*, 2012, 186: 419–432.
- [42] Wang L X, Li H B, Gu T C, Liu L H, Pang B S, Qiu J, Zhao C P. Assessment of wheat variety stability using SSR markers. *Euphytica*, 2013, 195: 435–452.
- [43] Julier B, Barre P, Lambroni P, Delaunay S, Thomasset M, Lafaillette F, Gensollen V. Use of GBS markers to distinguish among lucerne varieties, with comparison to morphological traits. *Mol Breed*, 2018, 38: 133.
- [44] Achard F, Butruille M, Madjarac S, Nelson P T, Duesing J, Laffont J L, Nelson B, Xiong J, Mikel M A, Smith J S C. Single nucleotide polymorphisms facilitate distinctness-uniformity-stability testing of soybean cultivars for plant variety protection. *Crop Sci*, 2020, 60: 2280–2303.
- [45] Saccomanno B, Wallace M, O'Sullivan D M, Cockram J. Use of genetic markers for the detection of off-types for DUS phenotypic traits in the inbreeding crop, barley. *Mol Breed*, 2020, 40: 13.
- [46] Van Eeuwijk F, Law J. Statistical aspects of essential derivation, with illustrations based on lettuce and barley. *Euphytica*, 2004, 137: 129–137.
- [47] Leigh F, Law J R, Lea V J, Donini P, Reeves J C. A comparison of molecular markers and statistical tools for diversity and EDV assessments. In: *The Wake of the Double Helix: from the Green Revolution to the Gene Revolution*. Proceedings of an International Congress, Bologna, Italy, 2003. pp 349–363.
- [48] Noli E, Teriaca M S, Conti S. Criteria for the definition of similarity thresholds for identifying essentially derived varieties. *Plant Breed*, 2013, 132: 525–531.
- [49] Noli E, Teriaca M S, Conti S. Identification of a threshold level to assess essential derivation in durum wheat. *Mol Breed*, 2012, 29: 687–698.
- [50] Borchert T, Krueger J, Hohe A. Implementation of a model for identifying essentially derived varieties in vegetatively propagated *Calluna vulgaris* varieties. *BMC Genet*, 2008, 9: 1.
- [51] Maccaferri M, Sanguineti M C, Xie C, Smith J S C, Tuberosa R. Relationships among durum wheat accessions. II: A comparison of molecular and pedigree information. *Genome*, 2007, 50: 385–399.
- [52] ISF, International Seed Federation. Guidelines for the handling of a dispute on essential derivation in maize lines. [https://www.worlseed.org/wp-content/uploads/2015/10/ISF\\_Guidelines\\_Disputes\\_EDV\\_Maize\\_2014.pdf](https://www.worlseed.org/wp-content/uploads/2015/10/ISF_Guidelines_Disputes_EDV_Maize_2014.pdf). 2014.
- [53] UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Identification of SNP markers to aid assessment of essential derivation in maize. BMT/14/7 Rev. [https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/bmt\\_14/bmt\\_14\\_7\\_rev.pdf](https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/bmt_14/bmt_14_7_rev.pdf). 2014.
- [54] Janis M D, Smith S. Technological change and the design of plant variety protection regimes. *Chicago-Kent Law Rev*, 2007, 82: 1557–1615.
- [55] Hufford M B, Seetharam A S, Woodhouse M R, Chougule K M, Ou S, Liu J, Ricci W A, Guo T, Olson A, Qiu Y, Coletta R D, Tittes S, Hudson A I, Marand A P, Wei S, Lu Z, Wang B, Tello-Ruiz M K, Piri R D, Wang N, won Kim D, Zeng Y, O'Connor C H, Li X, Gilbert A M, Baggs E, Krasileva K V, Portwood II J L, Cannon E K S, Andorf C M, Manchanda N, Snodgrass S J, Hufnagel D E, Jiang Q, Pedersen S, Syring M L, Kudrna D A, Llaca V, Fengler K, Schmitz R J, Ross-Ibarra J, Yu J, Gent J I, Hirsch C N, Ware D, Dawe R K. *De novo* assembly, annotation, and comparative analysis of 26 diverse maize genomes. *Science*, 2021, e373: 655–662.
- [56] Liu Z, Li J, Fan X, Htwe N M P S, Wang S, Huang W, Yang J, Xing L, Chen L, Li Y, Guan R, Chang R, Wang D, Qiu L. Assessing the numbers of SNPs needed to establish molecular IDs and characterize the genetic diversity of soybean cultivars derived from *Tokachi nagaha*. *Crop J*, 2017, 5: 326–336.
- [57] Yang Y, Tian H, Wang R, Wang L, Yi H, Liu Y, Xu L, Fan Y, Zhao J, Wang F. Variety discrimination power: an appraisal index for loci combination screening applied to plant variety discrimination. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 566796.
- [58] 王凤格, 杨扬, 易红梅, 赵久然, 任洁, 王璐, 葛建镛, 江彬, 张宪晨, 田红丽, 侯振华. 中国玉米审定品种标准 SSR 指纹库的构建. *中国农业科学*, 2017, 50: 1–14.  
Wang F G, Yang Y, Yi H M, Zhao J R, Ren J, Wang L, Ge J R, Jiang B, Zhang X C, Tian H L, Hou Z H. Construction of an SSR-based standard fingerprint database for corn variety authorized in China. *Sci Agric Sin*, 2017, 50: 1–14 (in Chinese with English abstract).
- [59] 陆徐忠, 倪金龙, 李莉, 汪秀峰, 马卉, 张小娟, 杨剑波. 利用 SSR 分子指纹和商品信息构建水稻品种身份证. *作物学报*, 2014, 40: 823–829.  
Lu X Z, Ni J L, Li L, Wang X F, Ma H, Zhang X J, Yang J B.

- Construction of rice variety based on ID used SSR fingerprint and commodity information. *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 823–829 (in Chinese with English abstract).
- [60] 王立新, 李云伏, 常利芳, 黄岚, 李宏博, 葛玲玲, 刘丽华, 姚骥, 赵昌平. 建立小麦品种 DNA 指纹的方法研究. *作物学报*, 2007, 33: 1738–1740.  
Wang L X, Li Y F, Chang L F, Huang L, Li H B, Ge L L, Liu L H, Yao J, Zhao C P. Method of ID constitution for wheat cultivars. *Acta Agron Sin*, 2007, 33: 1738–1740 (in Chinese with English abstract).
- [61] 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 李文福, 蒋洪蔚, 李灿东, 姚丙晨, 胡国华, 陈庆山. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建. *作物学报*, 2009, 35: 211–218.  
Gao Y L, Zhu R S, Liu C Y, Li W F, Jiang H W, Li C D, Yao B C, Hu G H, Chen Q S. Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang. *Acta Agron Sin*, 2009, 35: 211–218 (in Chinese with English abstract).
- [62] 马琳, 刘海珍, 陆徐忠, 倪金龙, 张小娟, 杨剑波. 130 份甘蓝型油菜种质分子身份证的构建. *中国油料作物学报*, 2013, 35: 231–239.  
Ma L, Liu H Z, Lu X Z, Ni J L, Zhang X J, Yang J B. Molecular identity of 130 *Brassica napus* varieties. *Chin J Oil Crops Sci*, 2013, 35: 231–239 (in Chinese with English abstract).
- [63] Yan J, Zou D, Li C, Zhang Z, Song S, Wang X. SR4R: an integrative SNP resource for genomic breeding and population research in rice. *Genom Proteom Bioinform*, 2020, 18: 173–185.
- [64] Jiang B, Zhao Y, Yi H, Huo Y, Wu H, Ren J, Ge J, Zhao J, Wang F. PIDS: a user-friendly plant DNA fingerprint database management system. *Genes*, 2020, 11: 373.
- [65] Groeneveld E, Lichtenberg H. The SNPpit—a high performance database system for managing large scale SNP data. *PLoS One*, 2016, 11: e0164043.