

DNA 分子标记技术在 DUS 测试中的应用探讨

韩瑞玺 张 晗 赵艳杰 马莹雪 李汝玉 唐 浩

(农业农村部科技发展中心,北京 100125)

特异性(Distinctness)、一致性(Uniformity)和稳定性(Stability)测试(简称 DUS 测试)以形态标记为基础,实现对品种的描述、三性判定和定义品种,是国际植物新品种保护联盟(UPOV)确定的授予品种权的依据。DNA 分子标记技术鉴定,又称 DNA 指纹鉴定,是以一组遗传标记的基因型为基础,实现对品种的遗传多样性分析以及指纹信息的检测。旨在探讨 DNA 分子标记技术在 DUS 测试中应用的“是”与“非”,提出优化 DNA 分子标记技术应用的建议,以期在保证科学性的基础上提高 DUS 测试效率,服务现代种业管理。

1 传统特异性测试中面临的现实困难

DUS 测试是品种权授权的技术依据,其中特异性测试在界定权属中尤为重要。特异性测试需要将待测品种与已知品种库中所有的品种进行表型性状比较(通过数据库或图片等方法比对),与待测品种

有明显差异的品种不需要田间种植;不能确定与待测品种有明显差异的,作为近似品种与待测品种进行田间种植比较,通过表型性状在品种间是否存在明显差异进行特异性评价。因此,构建已知品种表型数据库是做好特异性评价的基础,也是世界各国的通行做法。而 DUS 测试实践中,特异性评价仍然面临一些困难:一是申请人提供的近似品种不准确,甚至故意提供表型差异大的品种;二是申请人在技术问卷中提供的性状描述不准确,无法用于精确筛选近似品种;三是玉米、水稻、小麦等主要农作物生态区较广,不同测试分中心的表型数据直接比较时存在环境误差。

2 DNA 分子标记技术在 DUS 测试中应用的前提和模式

UPOV 对 DNA 分子标记技术在 DUS 测试中的应用采取了积极而审慎的态度,UPOV 技术委员会下成立了生化和分子标记技术(BMT)工作组,专门研究

牢把握住先机。所以,不管是个人还是单位,都要非常重视品种权保护工作,树立起保护意识,把能保护的成果都保护起来。目前,科研单位要特别重视育种材料的品种权保护,为成果确权和转化打下基础。

3.3 政策导向鼓励品种权保护 任何事物的发展都是内外因共同作用的结果。如果说创新育种思路和重视品种权保护主要是看育种家自身的意识和功力的话,那么政策导向和激励机制则是不可或缺的外力作用。目前,科研的氛围已经非常宽松,从上到下都不缺鼓励创新、成果确权、让科研人员“名利双收”的激励政策,关键是要坚定地推进国家的好政策落地生根,并不断修正完善实施细则、落实具体措施,从健全制度保障、设立专项基金等方面给品种权保护以实质性的鼓励。

3.4 加大品种权成果的转化和维权力度 成果转化部门要真心爱护所有的好品种,将具有品种权的品种逐个分析、深挖潜力,给每个品种都找到一个

好的归宿,让每个品种都发挥应有的作用和效益,从推广应用和转化收益方面倒逼品种权保护。同时,还要充分发挥品种权的法律功能依法维权,结合品种的分子标记指纹身份证,鉴别种子侵权行为,让旁门左道的侵权行为无处遁形,让授权企业心无旁骛地用心经营品种,让授权品种光明正大地绽放应有的光彩,实现水稻品种权应用价值最大化。

参考文献

- [1] 李黎红,倪建平. 杂交稻不育系“中 9A”知识产权的市场开发与维护. 中国稻米,2006(6): 51-52
- [2] 陈红. 加强我国植物新品种权行政执法的建议. 中国种业,2017(7): 6-9
- [3] 李静,解保胜,袁亚莉,王贺. 植物新品种保护发展现状分析. 北方水稻,2014(4): 78-80
- [4] 朱岩,周绪晨,宋敏. 中国农业植物新品种保护进展及影响研究. 农业科技管理,2017,36(6): 1-7

(收稿日期: 2018-12-10)

DNA 分子标记技术的应用模式。在 2010 年 UPOV 先后发布了 INF17 (标记的选择及数据库构建)、INF18 (分子标记在 DUS 测试中的可能应用) 以及 TGP15 (生化和分子标记在 DUS 测试中的应用指南) 文件。经过多个成员多年的实践,总结出两种应用模式。

2.1 利用与传统性状紧密连锁的分子标记进行性状测试 抗病、抗除草剂等性状在田间观测时,或观测结果不稳定,或需要特殊条件。对于这类性状的测试,可采用分子标记方法。但其应用前提是分子标记与性状之间有可靠的连锁关系,即有标记则有抗性,无标记则无抗性。测试实践中,务必慎重评价连锁的可靠性,因为有时会出现反常案例。2018 年在乌拉圭举办的 BMT17 次会议上,荷兰专家报告了 *I2* 基因在番茄镰刀菌抗性中的特殊情况,即所有含有 *I2* 基因的品种都具有镰刀菌抗性,但某些品种不含 *I2* 基因也具有镰刀菌抗性。

2.2 综合利用表型距离和分子距离管理品种库 该模式将那些与待测品种的表型距离和分子距离低于一定阈值的已知品种作为近似品种与待测品种在田间相邻种植,进行特异性评价。其应用前提在于确立分子距离与表型距离的关联程度,确定一个安全的分子阈值,保证高于该分子距离阈值的已知品种与待测品种存在明显差异(高于特异性判定的表型距离) 从而无需进行田间比较。该模式在法国、荷兰等国的 DUS 测试领域中广泛应用并取得了显著成效。荷兰、法国、韩国不仅构建了覆盖 SSR 和 SNP 标记的品种 DNA 指纹库,还将应用范畴从 DUS 测试近似品种筛选,已知品种库样品更新时的复验,杂交公式的验证等拓展到其他领域,如种子纯度检测、品种权纠纷的辅助证据等。

3 DNA 分子标记技术在我国 DUS 测试中的应用及成效

2002 年以来,农业农村部科技发展中心牵头研制了玉米、水稻、小麦、辣椒等 20 多种作物 DNA 指纹鉴定标准,并逐步构建了玉米、小麦、水稻、大豆等作物的 DNA 指纹数据库。目前,在申请量大、已知品种数量多、生态适应区广的玉米、小麦、水稻、大豆、油菜等作物的 DUS 测试中,利用 DNA 指纹数据管理已知品种库,辅助筛选近似品种,取得了明显成效。农业农村部植物新品种测试(济南) 分中心建立了覆盖全国小麦产区已知品种的 DNA 指纹数据

库,对 2013–2017 年总计 319 份小麦待测品种,利用“表型距离 + 分子距离”结合的方式筛选近似品种,通过田间种植评价,共检测出特异性不合格品种 38 份,占全部申请品种总数的 11.9%,有力地打击了修饰育种或者剽窃品种。此外,农业农村部植物新品种测试中心还组织针对集中测试、申请量较大的大白菜、辣椒、番茄、西瓜、甜瓜等作物构建 DNA 指纹库,用于近似品种筛选、真实性鉴定等工作。

4 正确认识 DNA 分子标记技术应用中的几个问题

我国以及其他 UPOV 成员的 DUS 测试实践证明,DNA 分子标记技术的应用应注意以下几点。

4.1 DUS 测试是品种确权的依据,DNA 分子标记方法不是 从科学性的角度看,性状是基因与基因互作、基因与环境互作的结果。DUS 测试不仅包含了这些互作,还综合了基因表达时空特性,在不同生育期进行观测并做出科学的判定。尽管 ISTA、ISF 和 OECD 等国际组织鼓励 DNA 分子方法在品种鉴定中的应用,但与基于表型性状的品种鉴定方法有根本不同。DUS 测试对植物群体进行定义,判定一个植物群体是否是品种(具备一致性和稳定性)、是否有别于其他品种(具备特异性,即可区别性),主要针对未知的植物群体;基于 DNA 分子方法的品种鉴定是对已定义为品种的代表性种子批进行符合性检验,判断是否相符于品种的标准样品,针对已定义的品种标准样品。由于有限的分子标记数量和表型性状表达的复杂性,即使种子批样品基因型与标准样品相符,也并不意味着二者表型性状完全一致。

4.2 DNA 分子标记技术在 DUS 测试中应用的主要目的并非加快授权 2016 年实施的新修订《种子法》规定,申请品种权保护、品种审定和品种登记的品种均应符合特异性、一致性和稳定性的要求。新形势下 DUS 测试量快速增加,2017 年已突破 1 万件。为此,有人提议用 DNA 分子标记检测的方法替代 DUS 测试以加快授权。DUS 测试是基于表型性状的测试,由于表型性状表达的复杂性,分子距离并不等同于表型距离。基于分子距离的特异性测试并不可靠。另外,DUS 测试还包括对一致性和稳定性的测试,基于分子性状的一致性和特异性评价方法不仅存在严谨性的问题,其测试成本和效率也远高于传统方法。正是由于上述原因,UPOV 体系内 DNA

分子技术应用的主要目的是管理已知品种库,以便在特异性评价时尽可能多地排除那些需要田间种植的品种,从而降低人力和物力投入。

4.3 遗传相似度高低与表型距离无严格线性关系 以济南小麦 DUS 测试为例,对遗传相似度 90%~95% 的 15 对品种进行田间种植,7 对品种间无明显表型差异(不具备特异性),8 对品种间有明显

表型差异(具备特异性);遗传相似度 95%~100% 的 35 对品种中,26 对品种不具备特异性,9 对具备特异性。此外,遗传相似度的高低与差异性状数量多少也无严格线性关系(图 1)。科技发展中心近年来接到因分子位点差异数少于审定要求,育种者主动提出复检的田间种植比对鉴定结果也表明,分子检测判定“极近似”或“疑同”品种,半数以上有明显性状差异。

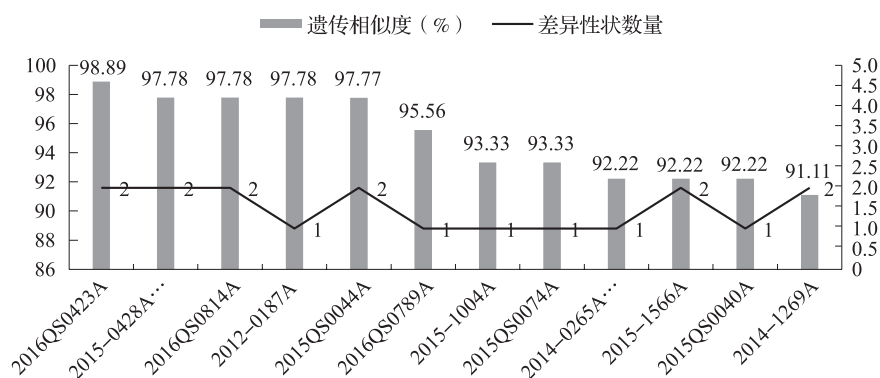


图1 具备特异性的样品中,待测品种与近似品种的遗传相似度与差异性状比较

4.4 DNA 分子标记技术不能用于一致性评价 由于基因型和表型的对应关系尚未解决,现行技术标准所用的有限的标记无法关联表型性状,因此只能反映品种内个体间在这些位点上的一致程度,并非表型上的一致性。加之品种内个体之间在遗传背景上比较接近,现有标准在区分异型株方面显得无力。由于表型调控的复杂性,不仅涉及基因型,还涉及基因与基因互作、基因与环境的互作,即使增加分子标记也无法判定品种一致性。在 2018 年 BMT17 次会议上,以往呼声最为强烈的美国代表也理性地回归到 UPOV 的应用模式。

5 建议

UPOV 成员和我国的实践表明,DNA 分子标记技术可以在 DUS 测试中有用武之地。关键取决于如何应用,要达到的目标是什么。为进一步提高 DNA 分子标记技术的应用成效,提出以下建议。

5.1 考虑作物类型 对于申请量大、生态区广、已知品种数量多的作物,DNA 分子标记技术作用非常明显。但对于存在芽变(部分果树)、回交(部分水稻等)或高世代分离选种等育种方式的作物,后代与亲本遗传背景非常接近,DNA 分子标记技术作用有限。

5.2 标记方法的选择 2018 年在 BMT17 次会议上,与会代表对 INF17 和 TGP15 文件进行了修订,

新版本充分考虑了新技术,例如 GBS (Genotyping by sequencing) 等基于测序的基因分型方法。选择 SSR、SNP 还是 GBS 应综合考虑标记的可获取性、技术经验、成本、数据共享性等多个因素。从 UPOV 成员的实践看,一些标记方法可能在同一个实验室的重复性相对较好,在不同实验室之间的重现性会因检测平台不同而不同,标记选择应以满足需求为评价标准。

5.3 技术标准的有效性至关重要 DNA 分子标准的核心是一套分子标记位点,它是在研制时基于一组(小样本)表型有差异的品种确定,用于已知品种库(大样本)管理。因此,分子标记技术标准研制时的品种样本数量、表型多样性以及标记的评价决定了分子标准最终的有效性。

5.4 加强合作 从国内水平看,DNA 分子标记技术标准应整合技术实力强的单位,联合品种资源、品种测试单位共同研制,一种作物只出一个高质量的标准,标准应进行有效性验证;一种作物只构建一个统一共享的品种指纹数据库,用于品种测试和品种管理。国际方面,荷兰、韩国、法国等都希望能够加强合作,共同研制一批国际分子标记技术标准,克服当前不同的国家因采取不同的分子标记技术标准,导致同一品种指纹数据无法比对的困难。

(收稿日期:2018-11-02)