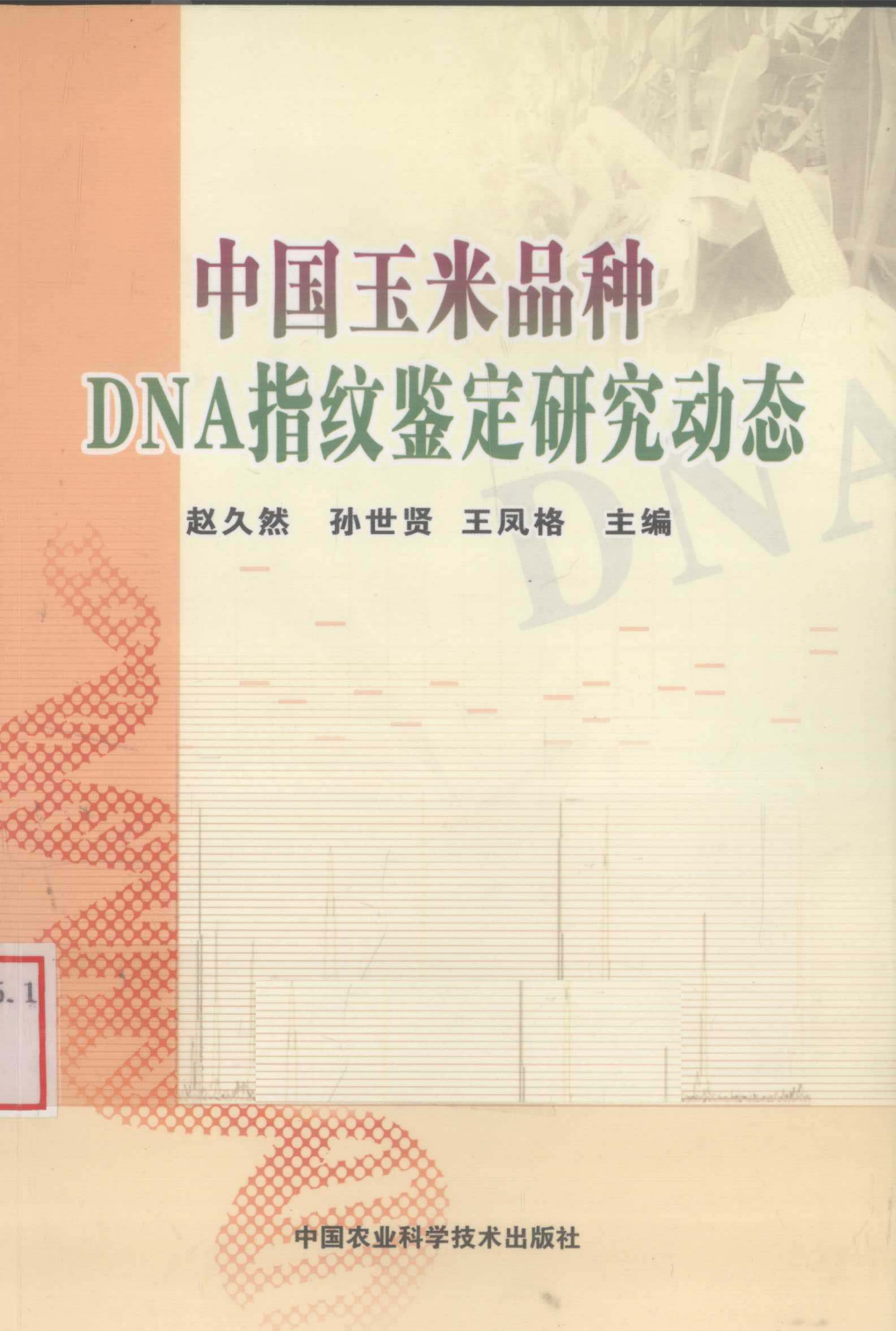
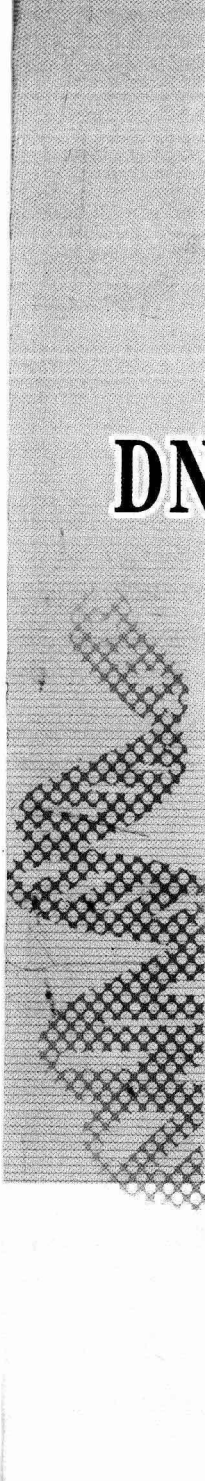




中国玉米品种 DNA指纹鉴定研究动态

赵久然 孙世贤 王凤格 主编

中国农业科学技术出版社



中国玉米品种 DNA指纹鉴定研究动态

赵久然 孙世贤 王凤格 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

中国玉米品种 DNA 指纹鉴定研究动态/赵久然等主编. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2008. 8

ISBN 978 - 7 - 80233 - 670 - 4

I. 中… II. 赵… III. 玉米 - 品种 - 鉴定 - 研究 - 中国
IV. S513.037

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 114941 号

责任编辑 冯凌云

责任校对 贾晓红 康苗苗

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106630(编辑室) (010)82109704(发行部)
(010)82109703(读者服务部)

传 真 (010)82106636

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京科信印刷厂

开 本 850 mm × 1 168 mm 1/32

印 张 9.5

字 数 250 千字

版 次 2008 年 8 月第 1 版 2008 年 8 月第 1 次印刷

定 价 60.00 元

————— 版权所有 · 翻印必究 —————

《中国玉米品种 DNA 指纹鉴定 研究动态》编辑委员会

主 任：李立秋 郑用璉 廖 琴

副主任：吕 波 季广德 赵久然

主 编：赵久然 孙世贤 王凤格

副主编：王守才 杨俊品 陆卫平

编 委（按姓氏笔画排列）：

王凤格	王守才	王美国	王 璐
白琼岩	吕 波	刘存辉	孙世贤
杨国航	杨俊品	李俊芳	李 锋
李磊鑫	肖小余	宋 伟	宋国栋
张雪原	陆大雷	陆卫平	陈学军
林 勇	易红梅	周进宝	周彦春
赵久然	赵青春	郭丽芳	常学文
谭 君			



前 言

在全国农业技术推广服务中心的直接领导下,在各有关省级种子管理部门的大力支持下,在承担国家玉米品种试验 DNA 指纹鉴定的各检测单位的共同努力下,国家及省级玉米试验品种的一致性及真实性 DNA 指纹鉴定工作自 2002 年起已实施 7 年时间,取得了很大进展,现已进入全面推进阶段。农业部行业标准《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》经过 2 年的制定,于 2007 年 9 月 14 日颁布并于 2007 年 12 月 1 日正式实施,该标准的实施为规范玉米种子市场、维护育种家权益提供了强有力的技术支撑。北京市农林科学院玉米研究中心主持的北京农业育种基础研究创新平台“超级玉米种质创新及中国玉米品种标准 DNA 指纹库构建”重大项目自 2005 年启动以来,通过 3 年的不懈努力已取得了显著成效,2008 年将进行一期项目验收和二期项目启动。

值此玉米试验 DNA 指纹鉴定工作全面推进、DNA 指纹鉴定方法正式发布实施和北京市平台项目一期验收及二期启动之际,为了进一步强化 DNA 指纹技术在品种管理中的作用和提升品种管理水平,根据国家玉米品种试验工作部署,全国农业技术推广服务中心品种管理处和北京市农林科学院玉米研究中心于 2008 年 8 月 5 日至 8 日在哈尔滨市联合举办国家玉米品种 DNA 指纹鉴定技术培训班。

本次培训班的主要目的是组织各省种子管理部门、各相关科研育种和教学单位、种子企业等方面的专家,就玉米品种 DNA 指纹鉴定技术进行培训和研讨,帮助相关单位了解国内外分子技术在品种管理及品种权保护上的应用情况进展,交流探讨在国家及省级玉米品种试验过程中,如何利用分子技术有效监控品种的真实性和一



致性，在企业维护品种权和种子管理部门查处侵权的过程中，如何利用分子技术快速鉴定玉米品种真实身份，研讨中国玉米 DNA 指纹库构建及应用项目的合作事宜等。为便于交流、学习和了解相关内容和资料，特汇编成册，书中文章的内容仅代表专家个人观点。

本书编写过程中得到了有关领导、专家和具体试验人员的积极支持，在此表示诚挚的感谢。

本书可作为玉米品种管理、品种权保护、侵权案司法鉴定、品种选育、农业科研教学等从业人员的参考书籍。由于时间仓促，难免有遗漏和不足之处，敬请专家和读者批评指正。

编辑委员会

2008 年 7 月 20 日



目 录

玉米品种试验中 DNA 指纹检测进展和近期品种

管理对策 孙世贤 (1)

中国玉米标准 DNA 指纹库的构建及其

应用 赵久然等 (17)

利用 DNA 指纹图谱技术进行品种鉴定、已知品种

数据库建设研制工作规划 吕 波等 (28)

玉米 DNA 指纹检测技术平台的建立 王风格等 (53)

中国玉米 DNA 指纹数据库管理系统的建立 王风格 (71)

2004 ~ 2007 年国家玉米预试 DNA 指纹检测

工作总结 王守才 (100)

杂交玉米种子 DNA 指纹图谱鉴定技术 杨俊品 (118)

中国甜、糯玉米品种 DNA 指纹库构建及其在区

试中的应用 陆卫平 (153)

Translating Genomics to Maize Improvement

——美国玉米遗传学大会 50 周年概况

及点滴感想 郑用琏 (161)

辽宁省玉米品种试验管理中 DNA 指纹技术

的应用 李磊鑫 (165)

内蒙古自治区玉米 DNA 指纹技术应用 宋国栋 (168)

文件汇编

中华人民共和国种子法 (171)

中华人民共和国植物新品种保护条例实施细则

(农业部分) (185)



农业转基因生物安全管理条例	(199)
最高人民法院关于审理侵犯植物新品种权纠纷案件具体 应用法律问题的若干规定	(209)
北京市高级人民法院关于印发《北京市高级人民法院关于 知识产权司法鉴定若干问题的规定(试行)》的通知.....	(212)
农业植物新品种权侵权案件处理规定	(217)
主要农作物品种审定办法	(221)
农业植物品种命名规定	(229)
国家区试玉米品种一致性及真实性 DNA 指纹检测 技术(试行)	(231)
玉米品种鉴定 DNA 指纹方法 NY/T 1432—2007	(246)
农作物品种审定规范 玉米 NY/T 1197—2006	(263)
农作物品种试验技术规程 玉米 NY/T 1209—2006	(275)
主要农作物品种试验管理办法	(282)
国家玉米品种试验 DNA 指纹鉴定管理办法	(287)
DNA 指纹图谱测试指南: 分子标记选择和数据库 构建(概要)	(289)
农作物品种审定委员工作守则	(294)
农作物品种试验人员工作守则	(295)



玉米品种试验中 DNA 指纹检测 进展和近期品种管理对策

孙世贤

(全国农业技术推广服务中心, 北京 100125)

根据全国农业技术推广服务中心玉米品种区域试验计划安排, 自 2002 年起, 由北京市农林科学院玉米研究中心牵头并已连续六年先后组织中国农业大学国家玉米改良中心、四川省农业科学院作物研究所、扬州大学农学院等有关单位, 在单位的积极配合下, 组织实施了“国家玉米区试品种一致性和真实性检测”工作, 从源头上在分子水平下给每个参加国家级试验的玉米品种一个特有的身份标志, 即 DNA 指纹。

鉴于目前每年参加国家及省级试验的玉米品种几千个、通过审定品种几百个的情况下, 利用 DNA 指纹技术进行玉米品种一致性和真实性检测, 一方面给种子管理部门、品种保护部门、品种选育者以及广大的种子生产者、经营者和种植者提供了鉴定品种真伪最可靠快捷的方法; 另一方面可快速有效地识别一些单位和个人经常以甲品种充当乙品种、以未审定品种充当审定品种、随意更换杂交种亲本、或窃取他人亲本组合等不法现象和行为, 有效地解决同种异名、同名不同质和疑似、近似品种的管理问题, DNA 指纹测试技术在品种管理中的广泛应用, 提升了国家和省级农作物品种管理工作, 促进了我国品种权保护工作的开展, 为规范我国种子产业的健康发展奠定了基础。



1 玉米试验品种 DNA 指纹检测历程

2002 年：开始启动国家区试部分区组（4 个）的玉米品种 DNA 指纹检测工作，指定北京市农林科学院玉米研究中心和四川省农业科学院作物研究所承担检测任务，其中由北京市农林科学院负责国家区试京津唐和黄淮海夏玉米组、四川省农业科学院作物研究所负责西南和武陵山区组品种的检测工作。

2003 年：将国家区试玉米品种检测范围由 4 个区组扩大到 5 个区组，包括京津唐和黄淮海夏玉米、西南、武陵山区和东华北春玉米组。

2004 年：将国家区试玉米品种检测范围从 5 个区扩大到 8 个区，由区试扩展到预试，包括京津唐、黄淮海、西南、武陵山区、东华北、东北早熟、极早熟、西北区试和主产区预试。同时将检测单位由 2 家增加到 3 家，包括北京市农林科学院玉米研究中心、四川省农业科学院作物研究所、中国农业大学国家玉米改良中心。

2005 年：将国家玉米品种试验检测范围从国家区试扩大到省区试，开始启动辽宁省区试玉米品种检测工作。同时，要求检测承担单位着手并加快制定 DNA 指纹检测标准及管理办法，并于 2005 年底国家玉米品种区试年会上试行。此外，要求国家区试所有参试玉米品种均入库长期储存，由北京市农林科学院负责入库保存工作，为审定后的玉米品种管理提供标准样品。

2006 年：将国家区试玉米品种检测范围扩大到青贮、甜糯，增加扬州大学农学院作为甜糯玉米品种 DNA 检测单位，将省区试范围从辽宁 1 个省扩大到辽宁、吉林、宁夏、北京 4 个省（区、市）；国家区试开始全面实行密码编号。

2007 年：将省区试的检测范围继续扩大到内蒙古、山东等共 6 个省。累计入种质库材料 4 818 份，其中杂交种 3 883 份，包括国家区试杂交种 2 128 份。



2008 年：按照全国农技中心品种管理处的总体规划，将继续扩大检测范围到各主要玉米省份，逐步实现国家区试与各省区试的联合检测，共同搭建品种管理的基础平台。

2 玉米试验品种 DNA 指纹检测特点

2.1 检测品种数量不断增加

自 2002 年以来，国家区试玉米品种检测数量情况明显增加（表 1）。截止到 2008 年，累计检测国家试验品种数量 2 520 份，由四家检测单位共同完成，北京市农林科学院玉米研究中心负责除西南和武陵山区以外的普通玉米和青贮玉米区域试验品种的检测，自 2002 年起累计检测 1 274 份；四川省农业科学院作物研究所负责西南和武陵山区玉米试验品种的检测，从 2002 年起累计检测 304 份；中国农业大学国家玉米改良中心负责国家主产区预备试验检测，从 2004 年起累计检测 707 份；扬州大学农学院负责国家甜糯玉米试验品种和东南玉米试验品种的检测，从 2006 年起已累计检测 235 份。

表 1 历年国家试验检测玉米品种数量

年份	全部	北京农林科学院	四川省农业科学院	中国农业大学	扬州大学
2002	75	52	23		
2003	169	131	38		
2004	364	213	53	98	
2005	437	282	58	97	
2006	588	265	55	167	101
2007	495	185	35	213	62
2008	392	146	42	132	72
共计	2 520	1 274	304	707	235



表 2 汇总了 2002 年以来, 国家及有关省试验玉米品种累计检测数量情况。截止到 2008 年, 累计检测玉米品种 4 094 份, 且每年的检测数量均呈上升趋势, 2005 年是从国家区试向省区试扩展的重要转折点, 自该年度开始, 检测数量的增加主要依赖于省区试范围的扩大, 而国家区试品种数量趋于稳定。

表 2 历年国家及各省区试检测玉米品种数量

年份	全部	国家	辽宁	吉林	宁夏	北京	内蒙古	山东	河北
2002	75	75							
2003	169	169							
2004	364	364							
2005	561	437	124						
2006	982	588	169	197	7	21			
2007	1 016	495	168	159	8	34	121	31	
2008	927	392	167	74	5	40	130	16	103
共计	4 094	2520	628	430	20	95	251	47	103

2.2 检测作物、类型、组别逐步扩大

全国农技中心品种管理处从品种管理的实际需要出发, 根据国内外 DNA 指纹技术研究进展和发展趋势, 从 2002 年起先后、全面启动了玉米、水稻、小麦、大豆、油菜的参试品种 DNA 指纹检测工作, 2008 年起又在棉花品种试验中进行探索; 各省也陆续开展了相关工作, 推进步伐加快、进展顺利。

以国家玉米品种试验为例: 区域上先后从 2002 年的普通玉米 4 个组别的区试逐步推进到全部 9 个组别区试; 从层次上看已经从区试逐步推进到包括全部试验 (预试、区试和生试) 的参试品种的检测; 从类型上看已经从普通玉米逐步推进到包括普通、青贮、甜糯在内的所有类型; 从两级管理看已经国家试验推进到部分省级试验。从而实现了对国家玉米试验参试品种的全面检测。采用这种逐级推进方式, 保证了在应用中随时研究新情况、总结新经验、解



决新问题。

从各省区试看, 2005 年从国家区试首先推进到条件比较成熟、市场比较活跃、参试品种比较多的辽宁省区试, 并随着各省条件的逐步成熟, 逐步扩大检测省份的范围, 从而逐步实现对国家和各省官方玉米试验品种的联合检测。在这一阶段的推进过程中, 主要是加快推进并积极探索规则、程序、办法、标准的起步阶段, 同时, 积极引导各省管理部门从源头开始在分子水平上探索品种管理。

2.3 检测力度逐步加大

自 2002 年开始区试 DNA 指纹检测以来, 随着检测范围的扩大和检测技术的提高, 检测出区试中发生一致性差、同名品种在不同区组不同年份发生组合更换、与已知品种雷同品种的数量逐年递增(表 3)。截止到 2007 年, 国家及各省检测有问题的品种累计达到 212 份, 其中国家区试检测出有上述问题的品种数量累计 136 份, 其他省份因启动检测的时间短、且没有检测一致性, 数量略少。从每个鉴定项目所检测出的问题品种数量年度变化看, 一致性鉴定由于仅面向国家区试、并进一步缩减到以检测续试品种为主以及检测的威慑作用, 因此检测出的问题品种数量呈下降趋势; 同名更换和仿冒雷同品种数量则从 2005 年以来, 随着检测省份数量的增加, 上升较快, 特别是仿冒雷同品种, 呈倍数上升趋势。

表 3 历年国家及各省区试检测出有问题的玉米品种数量汇总表

省份	检测项目	2003 年	2004 年	2005 年	2006 年	2007 年	按项目汇总	按省份汇总
国家	一致性	2	20	31	36	17	106	136
	同名更换		4	6	3	5	18	
	仿冒雷同	1		1	2	8	12	
辽宁	一致性			2			2	24
	同名更换			2		5	7	
	仿冒雷同				3	12	15	



续表 3

省份	检测项目	2003 年	2004 年	2005 年	2006 年	2007 年	按项目 汇总	按省份 汇总
吉林	同名更换				18	7	25	
	仿冒雷同				2	8	10	35
北京	同名更换				1	3	4	
	仿冒雷同				2	3	5	9
宁夏	仿冒雷同				1	1	2	2
内蒙古	仿冒雷同					1	1	1
山东	仿冒雷同					5	5	5
按项目 汇总	一致性	2	20	33	36	17	108	
	同名更换		4	8	22	20	54	212
	仿冒雷同	1		1	10	38	50	
按年份汇总		3	24	42	68	75	212	212

对于这些有问题的品种如何处理,是区试管理部门面临的关键问题。适应形势的需要,国家区试管理部门 2005 年起组织检测单位、品种审定委员会委员编写了《国家玉米品种试验 DNA 指纹鉴定管理办法》,并于 2005 年底的区试年会上首次试行,在试行办法中规定:对一致性差(5 级)的品种予以停试和不予推荐报审;对一致性较差(4 级)的品种,需加试一年,并对品种参试单位提出警告,督促其尽快予以改善提高,如下年度仍不能达到 1~3 级水平,应对该品种予以停试和不予推荐报审。发现同一品种在不同区试年份或不同区试组别中遗传差异较大(差异位点数 ≥ 2)的情况,则对该品种予以停试和不予推荐报审。发现参试品种与已有品种在遗传上相同或高度近似(差异位点数 ≤ 1),判定该品种为已有品种的仿冒雷同品种,对该品种予以停试和不予推荐报审。

通过几年的试用和完善,管理办法对品种的监管力度在加大:对于一致性较差的品种,2005 年试行办法允许加试 1 年,而自 2006 年以来的新办法则对所有一致性差和较差的品种均予以停试和不予推荐报审;为鼓励创新,抑制仿冒,正在研讨加大对模仿程度的限制,如是否将遗传差异 $\leq 10\%$ 的品种均作为派生模仿品种



处理。

2.4 检测标准化和规范化逐步推进

从 2002 年启动检测工作时没有标准可供参考,到逐步制定并完善相应的管理办法和检测标准,从而使 DNA 检测工作步入科学化、规范化和标准化。主要工作有:

(1) 从 2005 年起,由全国农技中心负责组织相关单位编写了《国家区试玉米品种一致性及其真实性 DNA 指纹检测技术》标准,同时组织国家农作物品种审定委员会玉米专业委员会和品种 DNA 指纹检测单位共同制定了《国家玉米品种试验 DNA 指纹检测管理办法》,由玉米专业委员会负责解释并在国家玉米品种试验中试行;

(2) 北京市农林科学院玉米研究中心负责编写的农业部行业标准《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》于 2007 年 9 月 14 日正式颁布,并于 2007 年 12 月 1 日正式实施^[1];

(3) 从 2005 年起,北京市农林科学院玉米研究中心派研究人员参加了 4 次 UPOV 相关会议,包括 BMT (2005, Washington)、TWC (2005, Ottawa)、TWA (2006, Beijing)、BMT-MAIZE subgroup (2007, Chicago) 等,在会上做大会报告并参与修订《BMT 分子测试指南》。

2.5 检测内容逐步丰富

从开始启动时仅进行真实性检测增加了一致性检测,并逐步完善了一致性检测程序;真实性检测从仅进行不同区组同名品种比较增加到与已知品种库所有品种比较,实现了国家试验与省级试验的联合检测、区试与品种权保护联合检测;正在探索从杂交种之间的两两比较向亲子鉴定扩展,以进一步杜绝编造系谱和冒用他人亲本的问题。此外,将所有试验品种全部入种质库进行长期保存,同时建立快速检索系统,为参试品种和审定后的市场管理提供标准样



品,从而为实现试验、审定、推广品种的全程监管奠定了基础。

2.6 检测难度不断加大

为了保证区试工作的客观公正性,自 2005 年起,国家玉米区试品种开始实行密码编号,与以前提供实名相比,加大了真实性检测工作的难度和工作量,对检测技术的精度提出了更高的要求;随着检测品种数量剧增,工作任务加大,迫切需要通量更高的检测技术,以适应大规模样品检测的要求。普通变性 PAGE 电泳已不能满足需要,必须采用高通量的荧光毛细管电泳检测系统,北京市农林科学院为此购进了遗传分析仪 ABI3030XL,该系统可以在 30min 内得到 $96 \times 10 = 960$ 个电泳数据,并且数据统计简单,适合大规模建库的需要。

随着入库品种数量剧增,品种 DNA 指纹查询比较的工作量剧增,在目前的数据库规模下(4 000 个品种 * 40 个引物),每个品种与整个数据库进行比较,均需要比较 160 000 次,运行一次整库比较,就需要至少 10h,对软件开发提出了更高的要求。北京市农林科学院从 2005 年开始玉米 DNA 指纹数据库管理系统开发工作,目前已完成网络版软件的主体功能,已在内部试行。

2.7 协作单位数量和规模不断扩大

2002 年开始启动国家试验玉米品种 DNA 指纹检测工作时,只有北京市农林科学院玉米研究中心和四川省农业科学院作物研究所两家检测单位。2004 年起,为适应国家区试检测范围从区试扩大到预试的需要,增加中国农业大学国家玉米改良中心,共三家检测单位。到 2006 年,为适应国家区试检测范围从普通玉米扩大到甜糯玉米的需要,又增加了扬州大学农学院,共四家单位共同承担了国家区试全部玉米品种的检测任务。2000 年以来国家和省级审定品种的入库工作是今年的重点,各省各自建立的指纹库往往因技术、经费、仪器、人员、资料等限制难以发挥应有的检测、监督、



管理的作用。

为了保证不同单位合作开展大规模的玉米 DNA 指纹库构建,实现检测的标准化,北京市农林科学院玉米研究中心从建库标记、检测平台、试剂、样品、评估程序、数据整合、模式库、扩展库、随机盲测等 9 个方面进行了全面的规范^[2]。

3 DNA 指纹监控工作值得思考的几个问题

3.1 国家区试和省级区试、省间区试的协调

当检测出的有问题品种(主要是发生同名更换的品种和仿冒雷同品种)发生在国家区试和省级区试品种之间、或发生在不同省区试之间时,必然涉及到不同试验管理部门之间的工作协调问题,需要建立起全国一致的品种试验管理制度。从实际检测的结果看,历年检测出的 54 对同名更换品种中,9 对发生在国家试验与省级试验之间或不同省试验之间,而检测出的 50 对仿冒雷同品种中,高达 36 对发生在国家试验与省级试验之间或不同省试验之间(表 3),对这类问题品种的处理难度远远高于对发生在国家或各省内部的品种,需要对问题品种所涉及的不同管理部门共同协商并形成共同遵守和贯彻的管理办法和处理意见。

由于同一品种在不同省份的参试和审定的进程往往不一致,一般理解,应以最早审定的省份所留样品作为该品种的标准样品,如果一个品种通过一个省级的审定,品种管理部门尚未留存试验过程中的样品如何处理;该品种在另一个省参试未通过审定,品种管理部门留存了试验过程中的样品,这份留存样品是否可以作为该品种的标准样品,这一问题其实还涉及到品种的身份从什么时候开始确定的问题,如果品种自参试之日起就视为正式登记在册品种,则即使该品种没有通过审定,仍纳入已知品种库范围内,则区试存留样品应视为该品种的标准样品;但是,如果品种自正式审定之日方视