

# DNA 指纹技术研究进展及其在小麦品种区域试验中的应用

刘丽华 刘阳娜 张明明 赵昌平 杨国航 张月坤 魏南南  
贾松羽 刘彩霞 徐映 焦爱通 李宏博 庞斌双

(北京市农林科学院杂交小麦研究所/农业农村部农作物 DNA 指纹创新利用重点实验室(部省共建)/  
作物分子设计与智慧育种北京市重点实验室/杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 100097, 北京)

**摘要** DNA 指纹技术在小麦区域试验管理中具有不可替代的重要作用。自 2004 年起, 我国开始系统性开展小麦区域试验品种的 DNA 指纹技术与检测工作, 检测内容涵盖品种疑似性、真实性、纯度以及 DNA 位点纯合率等多个方面。经过 20 年发展, 该技术已从探索阶段逐步迈向完善阶段。其检测规模持续扩大, 检测项目日益丰富, 检测能力显著提升, 为小麦品种的真实性、特异性和纯度提供了有力保障, 也为小麦品种审定和管理奠定了坚实的技术基础。本文系统梳理了小麦 DNA 指纹技术的研发思路与历史进程, 全面对比分析了 SSR 和 SNP 指纹技术的优缺点, 归纳了 DNA 指纹技术在区域试验中的应用趋势与实际成效, 并针对未来发展方向提出若干建议, 以期为我国小麦种业的持续健康发展提供理论依据。

**关键词** 小麦; DNA 指纹技术; 区域试验; 品种管理

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 作为我国农业发展的重要作物之一, 不仅是主要的粮食作物, 还在全球贸易中占有重要地位, 对保障我国粮食安全和促进农产品贸易具有重要作用。《中华人民共和国种子法》<sup>[1]</sup>规定主要农作物品种在推广应用前应通过国家或者省级审定, 配套实施的《主要农作物品种审定办法》<sup>[2]</sup>明确要求品种获得审定需完成同一生态区 2 年区域试验和 1 年生产试验, 但第 1 年区域试验综合性状突出的品种可同时参加第 2 年区域试验和生产试验。在区域试验环节中对参试品种进行疑似品种筛查, 以及真实性、品种纯度和 DNA 位点纯合率等项目检测, 可有效遏制低世代品系参试、不同年度或区组更换品种、使用已审定品种冒充参试、一品多名重复申请审定、以劣质品种冒充优质品种参试等现象发生, 从而提升审定品种的整体水平。传统的品种鉴定主要依靠田间表型鉴定或醇溶蛋白法, 其中传统田间测试不仅周期长且易受环境干扰, 加之疑似品种筛查和真实性检测涉及大量已知审定品种及多渠道参试样品, 跨越不同年份和区组, 使得田间相邻种植鉴定和跨年度、跨区组比对变得尤为困难。醇溶蛋白法虽具备速度快、成

本低和操作简便等优势, 但其多态性不足、准确性欠佳且通量有限。以上 2 种方法给管理者带来了巨大挑战, 但 DNA 指纹技术的出现有效地解决了以上问题。

DNA 指纹是指具有完全个体特异的 DNA 多态性 (生物的不同个体或不同种群在 DNA 结构上的差异), 因其个体识别能力足以与手指指纹相媲美而得名。不同品种农作物的基因组存在着能够世代稳定遗传的序列长度、碱基组成和排列方式差异, 这种差异可以通过从抽取有代表性的检测样品中提取 DNA, 用特异引物 (探针) 进行扩增和基因分型 (测序), 从而通过其基因型 (序列) 的不同而加以区分。以简单重复序列标记 (simple sequence repeats, SSR) 和单核苷酸多态性标记 (single nucleotide polymorphism, SNP) 为代表的 DNA 指纹检测技术因具备共显性、在基因组上均匀分布、准确性高、重复性好、通量高、易实现自动化和检测周期短等优点, 相继被国际植物新品种保护联盟 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)、国际种子联盟 (International Seed Federation, ISF) 和国际种子检

作者简介: 刘丽华, 主要从事小麦分子育种与品种鉴定技术研究, E-mail: llh216@163.com; 刘阳娜为共同第一作者, 主要从事品种鉴定技术研究, E-mail: lyn8705i817@163.com

李宏博为通信作者, 主要从事品种鉴定技术研究, E-mail: li-hb1208@163.com; 庞斌双为共同通信作者, 主要从事小麦分子育种与品种鉴定技术研究, E-mail: pangbinshuang1122@aliyun.com

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项 (2022ZD0401902); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (KJCX20230301, KJCX20230307)

收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-04-15; 网络出版日期: 2025-10-14

验协会 (International Seed Testing Association, ISTA) 推荐作为作物品种鉴定和指纹数据库构建的优选标记。我国也陆续开展了玉米 (*Zea mays* L.)<sup>[3-7]</sup>、水稻 (*Oryza sativa* L.)<sup>[8-9]</sup>、小麦<sup>[10-12]</sup>、棉花 (*Gossypium herbaceum* L.)<sup>[13-15]</sup>、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.]<sup>[16-17]</sup> 及油菜 (*Brassica campestris* L.)<sup>[18-19]</sup> 等作物 SSR 和 SNP 指纹技术的研发工作。2007 年以来, 制定了玉米<sup>[20]</sup>、水稻<sup>[21]</sup>、小麦<sup>[22]</sup>、向日葵<sup>[23]</sup>、棉花<sup>[24]</sup> 和大豆<sup>[25]</sup> 等 10 余种作物的真实性 SSR 检测标准; 2020 年制定了玉米<sup>[26]</sup>、小麦<sup>[27]</sup> 和水稻<sup>[28]</sup> 品种纯度的 SSR 检测标准; 2021 年制定了玉米<sup>[29]</sup>、小麦<sup>[30]</sup> 和水稻<sup>[31]</sup> 三大粮食作物的 SNP 真实性检测标准。构建了包含 2 万余份玉米、水稻、小麦和向日葵等作物信息的 DNA 指纹数据库 (全国农作物品种 DNA 指纹库公共平台: <https://202.127.44.15/Login/Index>)。《中华人民共和国种子法》<sup>[1]</sup> 第四十六条: 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, 进一步明确了 DNA 指纹鉴定技术的法律地位。《主要农作物品种审定办法》<sup>[2]</sup> 也明确规定区域试验应当对品种进行 DNA 指纹检测。

小麦区域试验中, 通过构建参试品种与已知审定标准样品的 DNA 指纹图谱, 能够迅速且准确地识别出不良现象及违法行为, 从而为品种区域试验和审定等环节提供坚实的科技保障。这些结果可直接作为淘汰不合格品种、继续试验或推荐审定的关键依据。我国从 2004 年开始启动小麦区域试验品种真实性、疑似性、品种纯度和 DNA 位点纯合率等 DNA 指纹技术的研究和检测工作<sup>[32]</sup>, 较玉米<sup>[33]</sup> 和水稻<sup>[8]</sup> 稍晚。经过 20 年的发展, DNA 指纹技术日益成熟和完善, 小麦区域试验的检测规模持续扩大, 检测项目不断增加, 检测能力显著提升, 有效保证了品种真实性、特异性和纯度等。截至 2024 年, 已经累计检测国家及各省、市的区域试验或联合体样品 1.6 万余份, 并构建了区域试验和审定品种 DNA 指纹数据库, 为小麦区域试验管理提供了有力的技术支撑。全面梳理 DNA 指纹技术的研究进展, 并深入探究其在小麦品种区域试验中的应用, 不仅有助于推动该技术的进一步发展, 还能小麦品种管理和育种实践以及其他作物 DNA 指纹技术的研发提供重要的理论依据。

## 1 小麦 DNA 指纹技术研究

### 1.1 DNA 指纹技术研究思路

近二十年来, 研发单位以快速、稳定和准确为目标, 以市场需求为导向, 开展小麦品种 DNA 指纹检测技术的研发。总体思路分为 4 个部分, 第 1 部分为理论基础研究, 包括鉴定模式、平台选择、位点确定、取样策略、非纯合位点判断、位点纯合率与稳定性和一致性的关系、指纹构建方法、数据采集方式、数据记录方法、鉴定意见确定、分子与表型一致性等。值得注意的是, 小麦作为多倍体作物, 与二倍体作物不同, 准确、有效且快速的基因分型是瓶颈, 因此创新性地提出了多倍体作物在进行位点筛选时, 应筛选单拷贝位点。第 2 部分聚焦于理论技术化研究, 涵盖了 DNA 指纹检测技术体系的搭建、标准样品库 DNA 指纹的构建, 以及 DNA 指纹数据库管理系统的开发等方面。第 3 部分是技术标准化, 包括与现行检测方法比较、多平台验证、内外部实验室验证、建立真实性、特异性、品种纯度和 DNA 位点纯合率等相关标准。第 4 部分是技术方法的推广应用, 包括在品种区域试验监测、市场监管、品种权保护、种子认证、司法鉴定和粮食贸易等领域的大规模应用。

### 1.2 DNA 指纹技术研究历程

小麦 DNA 指纹技术的研究历程可分为 2 个阶段, 自 2004 年起专注于 DNA-SSR 指纹检测技术的研发, 而自 2014 年后转向 DNA-SNP 指纹检测技术的探索。2004 年首先开展的是基于垂直板电泳技术平台的 SSR 指纹检测技术研究与应用工作, 确定了适用于品种鉴定的 42 对 SSR 普通引物<sup>[30]</sup>, 建立了基于垂直板电泳平台的 DNA 指纹构建方法<sup>[34]</sup> 和体系<sup>[32,35-38]</sup>, 以及 400 余份小麦审定品种 SSR 指纹数据库。

2011 年开始开展基于毛细管荧光电泳平台的研究与应用工作, 确定了适于品种鉴定的 42 对 SSR 荧光引物<sup>[22]</sup>, 建立了高通量 SSR 基因分型平台, 构建了我国 1800 余份审定品种标准样品指纹数据库 (全国农作物品种 DNA 指纹库公共平台: <https://202.127.44.15/Login/Index>) 和小麦 SSR 指纹分析系统, 形成了 5 个系列标准报批稿、《主要农作物品种真实性 SSR 分子标记检测 普通小麦》(NY/T 2859-2015)<sup>[22]</sup> 和《普通小麦品种纯度鉴定

SSR 分子标记法》(NY/T 3749-2020)<sup>[27]</sup>行业标准颁布稿,并在小麦区域试验中应用。

2014 年开始进行 SNP 指纹检测技术研究,确定了系列小麦品种鉴定核心和扩展 SNP 专利位点,开发了首款集分子育种和品种鉴定为一体的小麦高质量 BAAFS Wheat 90K SNP 芯片<sup>[13]</sup>和国产拉索 65K SNP 芯片,建立了 KASP 技术样本高通量 SNP 分型平台和位点高通量 SNP 分型平台,建立了 3819 份小麦审定标准样品和 96 个新品种保护核心 SNP 指纹的数据库,开发出实体库、表型库和分子指纹数据库综合管理系统,形成了《小麦品种真实性鉴定 SNP 标记法》(NY/T 4021-2021)<sup>[30]</sup>行业标准颁布稿。

### 1.3 SSR 和 SNP 指纹检测技术比较

SSR 是目前我国验证最充分、技术最为成熟且应用最广泛的 DNA 指纹技术。较 SNP 具有区分能力强(目前多态性最高的一种分子标记)、仪器成本相对较低、样品灵活度高、操作方便、实用性强和易推广等优点,但其缺点为位点检测通量较低

(普通聚丙烯酰胺凝胶电泳通量最多可达 2 重,毛细管电泳最多可达 11 重),适合少量位点的检测,难以实现成千上万个 SSR 同时检测的需求。在实践中,可采用低通量检测平台(聚丙烯酰胺凝胶电泳)和中通量检测平台(毛细管电泳)开展品种真实性验证、疑似品种筛查、品种纯度和 DNA 位点纯合率检测。SNP 一般为二态分子标记,较 SSR 具有数据统计简单准确、数据兼容性强、易于共享、流程易于自动化和规模化以及兼容多平台等优势,然而,其不足之处在于单个位点对品种的区分能力较弱。在实践中,可采用低通量位点检测平台[如实时荧光定量 PCR 和竞争性等位基因特异性 PCR (kompetitive allele-specific PCR, KASP) 等]开展品种真实性身份验证和纯度检测工作;采用高通量位点检测平台(以 SNP 芯片技术为主,一次性可检测万级以上的 SNP 位点)开展品种真实性身份验证、特异性和实质性派生品种鉴定。SSR 和 SNP 检测技术具体见表 1。SSR 和 SNP 各有优劣势,应针对不同的应用场景选择不同的指纹技术开展品

表 1 SSR 和 SNP 检测技术的比较  
Table 1 Comparison of SSR and SNP molecular marker techniques

项目 Item	SSR	SNP
检测平台 Detection platform	聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳	实时荧光定量 PCR、竞争性等位基因特异性 PCR 和芯片等
检测通量 Detection throughput	低、中	低、中、高
仪器成本 Instrument cost	10 万~300 万元	50 万~1000 万元
检测成本 Testing cost	1~2 元/数据点	0.001~0.800 元/数据点
技术优势 Technical advantage	品种区分能力强、设备成本低、易于推广	自动化和规模化程度高、数据易统计共享
技术劣势 Technical disadvantage	位点通量低	单个位点区分能力较弱
应用领域 Application area	少/中量样品、少量位点检测	中/大量样品或中/大量位点集中检测
应用方向 Application direction	真实性身份验证、特异性筛查和 DNA 位点纯合率检测等	真实性身份验证、真实性身份鉴定、特异性筛查、实质性派生品种鉴定和纯度检测等

种鉴定工作。

## 2 DNA 指纹检测技术在小麦区域试验中的应用

### 2.1 小麦区域试验 DNA 指纹检测

2.1.1 检测规模持续扩大 2004 年农业农村部率先在冬小麦区域试验中引入指纹检测,2010 年该检测范围扩展至春麦品种。2008 年起逐步将检测范围由国家扩大到河北和北京,2009 年扩大到河南和江苏,2010 年扩大到湖北和黑龙江,2016 年扩大到山西,2017 年扩大到四川和陕西,2019 年扩大到天津,2021 年扩大到山东、安徽和重庆,2022 年扩大到宁夏、内蒙古和甘肃,2023 年扩大到西藏。

截至目前,至少有 17 个省、市和区开展小麦 DNA 指纹检测,基本实现了我国小麦区试品种 DNA 指纹检测的全覆盖。

随着我国小麦品种审定制度的改革,自 2016 年起 DNA 指纹检测逐渐扩大到国家良种联合攻关、国家联合体、省级联合体和特色组试验等试验渠道。自 2009 年起,指纹研发和检测单位开始承担国家区试标准样品库的建设以及标准样品中长期储存工作。截至 2024 年,累计区域试验检测品种数量为 1.6 万余份,其中国家区域试验或联合体 0.7 万余份,省市区域试验或联合体约 0.8 万余份。图 1 列出了国家试验、省市试验和所有区域试验的检测样品数。从图 1 中可以看出,检测数量逐年增

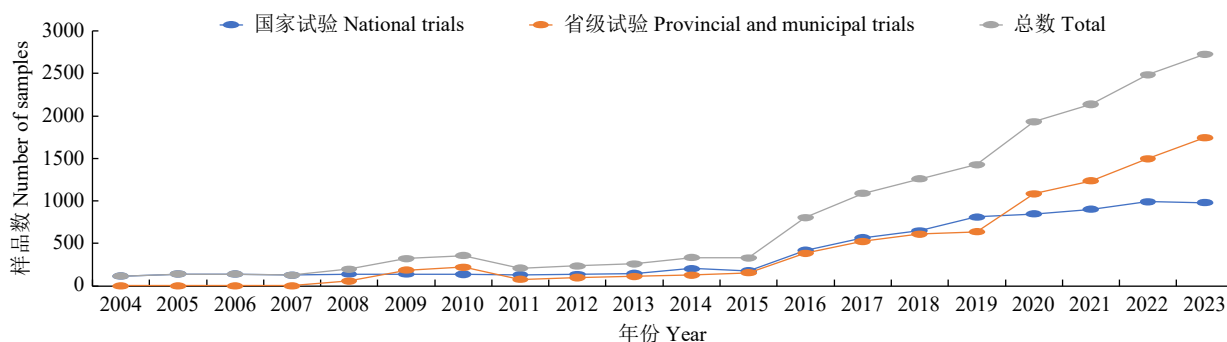


图 1 小麦区域试验检测样品数

Fig.1 Number of samples tested in wheat regional trials

加, 2016 年开始大幅度增加, 主要与试验渠道增加有关。

**2.1.2 检测项目不断增加** 在小麦区域试验 DNA 指纹检测中, 一致性和稳定性检测主要检测参试品种的品种纯度和 DNA 位点纯合率; 特异性检测主要检测参试品种与已知审定品种是否具有特异性; 真实性检测主要检测参试品种在不同年份或区组有无更换种子。从检测项目看, 2004 年仅做纯度检测, 2005 年开始做疑似品种筛查、真实性和品种纯度检测, 2006 年技术基本完善, 开始做疑似品种筛查、真实性、品种纯度和 DNA 位点纯合率检测。由于审定保护统一, 一致性和稳定性鉴定放入 DUS 测试中心, 自 2015 年起检测项目恢复为真实性检测和疑似品种筛查。在检测力度上, 2024 年开始由以前的各个试验渠道检测转变为国家统一试验、国家良种联合攻关试验、国家联合体试验、自主试验和绿色通道的联合检测; 2023 年以前, 申请审定品种与已知品种 DNA 指纹检测遗传相似系数大于 0.900 (差异位点数 $\leq 3$ ) 时, 进行田间测试; 但从 2024 年开始, 申请审定品种与已知品种 DNA 指纹检测差异位点数=3 时, 需进行田间小区种植鉴定以证明有重要农艺性状差异, 差异位点数 $\leq 2$  时直接淘汰。

**2.1.3 检测能力显著提升** 2004 年启动小麦区域试验工作时, 采用的是 SSR 标记技术, 但当时的检测平台仅有变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (垂直板电泳技术), 构建指纹图谱时需每对引物各等位变异的代表样品, 对制胶人员能力要求高, 过程复杂繁琐, 时效差且准确性低。至 2011 年, 建立了多重毛细管电泳高通量检测平台, 构建指纹图谱时仅需 1~2 个参照样品, 无需制胶, 且每个样品孔可实现多重产物检测, 检测通量和效率提高了 6~11 倍, 自此小麦指纹检测进入 SSR 高通量检测时代, 并沿

用至今。随着 2022 年 SNP 指纹检测技术标准的颁布, 样本和位点检测通量进一步提升, 仅需数天即可高效完成 1536 份样品的指纹图谱构建, 相较于 SSR 毛细管检测平台, 其检测通量和效率实现了数百倍的提升, 为小麦区域试验监管提供了有效的技术支撑。

**2.1.4 检测效果逐步显现** 从真实性检测项目来看, 更换样品主要是选育单位的主观行为, 因此指纹检测效果比较明显。分析 2014~2023 年国家区域试验参试样品的真实性检测情况 (图 2), 问题品种平均占比 1.77%, 变化范围在 0.00%~5.00%。年度间差异较大, 其中 2014 年问题品种占比最大 (5.00%), 2016、2018 和 2020 年未检测出问题品种。整体上看, 近 8 年问题品种数量比之前减少较多, 呈现偶然现象。从更换类型上来看, 由差异较大的品种更换转为同一组合不同后代的更换以及高度相似姊妹系的更换, 不同年份间更换转向不同区组更换或不同试验渠道的更换, 以及已审定品种参加其他区域试验时同名更换等。

在疑似品种筛查项目中, 疑似品种的检出能力得到了显著提升, 从而进一步控制了育种的同质化现象。分析 2014~2023 年国家区域试验参试样品的疑似品种筛查情况 (图 2), 筛查出有疑似品种平均占比 18.85%, 变化范围在 9.09%~25.00%。年度间差异较大, 其中 2018 年筛查出的疑似品种数最多, 占比 25.00%, 2022 年最少, 占比仅为 9.09%, 与前几年相比有明显下降, 已跌至 10.00% 以下的水平。分析疑似品种产生的原因, 主要包括同一单位育成的多个品种参与试验、同一单位将同一组合的姊妹系通过不同渠道进行参试以及将同一组合转让给多家单位并以不同名称进行参试等情况。随着后期全国参试品种指纹数据库联网, 这种情况将逐步减少; 并且在主要推广品种和核心骨干基础上

开展诱变育种或提纯系选等（“修饰性育种”），形成新品种参试；以主要推广品种和核心骨干为亲

本，采用回交或者系统选育的方式开展育种（“模仿育种”），形成新品种参试。

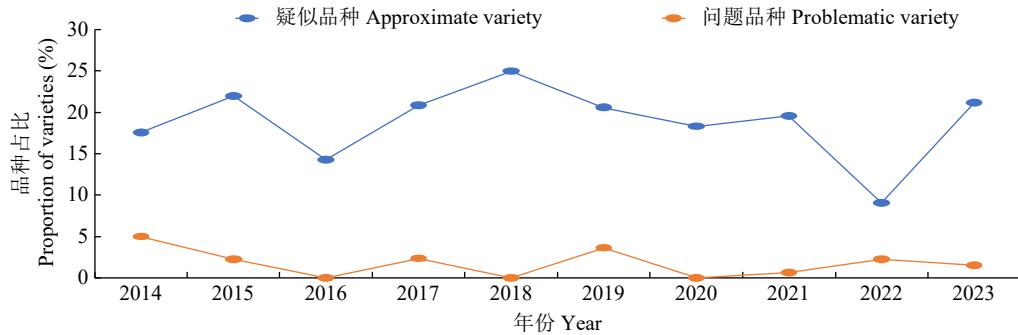


图 2 国家区试中检测出的疑似品种和问题品种占比情况

Fig.2 Proportions of approximate and problematic varieties detected in national regional trials

从品种纯度和 DNA 位点纯合率检测项目来看，共持续检测了 10 年，整体效果较好。品种纯度主要是由于机械混杂引起，DNA 位点纯度主要是因为遗传未稳定造成。共检测出品种纯度和 DNA 位点纯合率较差的品系 120 个，后 3 年检测出的问题品系相对较少，DNA 指纹检测技术的引入对低世代不稳定材料的提前参试形成了明显的遏制作用。

## 2.2 小麦区域试验品种的遗传基础分析

DNA 指纹检测技术可有效揭示小麦区域试验品种的遗传基础、了解我国小麦的育种水平和发展趋势等。DNA 指纹检测单位前期分析了 2009–2014 年参加国家冬小麦区域试验的 430 个品系的遗传多样性和群体结构<sup>[39]</sup>，结果表明平均基因多样性和多态性信息量分别为 0.73 和 0.70；从不同年份分析，参试材料的遗传多样性从 2012 年开始略有下降；从不同生态种植区域分析，参试品系的遗传多样性自北向南（北部冬麦区组至长江流域冬麦区组）呈明显下降趋势；聚类、主坐标和群体结构分析均表明长江上游和长江中下游组的参试品系与其他区组的参试品系明显分开，且分别归属于不同亚类，显示出独特的生态区域类型；群体结构分析结果揭示 71.9% 的参试品系群体结构比较单一，其中长江流域组的参试品系最为单一。为了提升小麦区域试验品系的遗传结构，我们应积极促进国内外种质交流，引入优异基因，同时利用各种先进的育种手段进行改良，以拓宽其遗传基础。同时，DNA 指纹检测单位也分析了 2009–2015 年北京参试品种的遗传多样性<sup>[40]</sup>，结果显示，小麦参试品系的平均多态性信息含量和平均基因多样性分别为 0.69 和 0.73。

总体上北京市参试品系不同年度间的遗传多样性无明显变化，说明近些年北京区域试验品系在育种资源、育种模式以及育种方向上变化较小。

## 3 问题与展望

### 3.1 加强不同区域试验渠道之间的协调

同一渠道内真实性问题品种检出数量有限，然而，国家和省际间的问题品种却日益增多。针对不同渠道间真实性问题的品种，需国家与各省管理部门协同合作，出台统一的管理措施，确保对同一品种处理结果的一致性。

同一渠道内参试品种之间以及参试品种与标准样品指纹进行比较，发现疑似品种时（品种间遗传相似系数大于 0.900），可根据品种参试的先后顺序确定原始品种或者特异性，处理起来比较简单。但当不同渠道的参试品种间出现疑似现象时，如何确定原始品种显得较为困难。另外在进行不同渠道参试品种的指纹比对应时，由于存在送样时间不一致的问题，如果不掌握好比对顺序和范围易导致部分疑似品种漏检。即使同步送样，在构建好指纹数据库后，如果不把握好指纹比对顺序（如国家试验优先级高于省市试验，统一试验高于联合体和绿色通道试验等），同样导致部分疑似品种漏检。这些问题需要国家和各省级管理部门联动，制定管理办法，加大国家联合体、联合攻关、国家区域试验以及省级区域试验的联动检测，规范送样时间，按照一定的顺序原则进行比对，防止相似品种在不同渠道审定。

### 3.2 解决参试品种趋同化严重的问题

我国研发出来的品种鉴定专用标记，无论是低

密度的 SSR 标记, 还是高密度的 SNP 标记均展现出卓越的分辨能力, 能够区分大多数品种, 但仍有少数品种呈现相似性。如分析 2014–2023 年筛查出的疑似品种, 约占参试品种的 20%, 说明参试品种与已知审定品种趋同化比较严重, 原始创新力度不够大, 高效鉴别同质化严重的品种已成为品种鉴定工作中的重点和难点。2021 年 12 月修订《中华人民共和国种子法》<sup>[1]</sup>增设了实质性派生品种制度, 为激励和保护原始创新以及加强种业知识产权保护提供了重要的法律保障。建立快速、准确且科学的小麦实质性派生品种指纹鉴定技术标准是确保我国小麦种业创新不可缺少的技术保障。

### 3.3 提高品种审定门槛

在区域试验样品实际检测过程中, 当筛查出近似品种后, 管理部门处理方式经历了 5 个阶段。第 1 个阶段是 2010 年前的初期研发阶段, 对 DNA 指纹检测与现有品种遗传相似系数  $\geq 0.950$ , 且田间未观察到明显差异的参试品种进行田间比对, 决定参试品种是否具有特异性。第 2 个阶段是 2010–2017 年, 对 DNA 指纹检测与现有品种遗传相似系数  $> 0.900$ , 且田间未观察到明显差异的参试品种进行密码编号后, 进行疑似品种田间相邻种植鉴定, 组织小麦品种审定委员会在田间进行盲评, 决定参试品种是否具有特异性。第 3 个阶段是 2017–2022 年, 由于审定保护统一, 疑似品种不再进行田间种植鉴定, 而是由试验组织单位统一向农业农村部科技发展中心提供疑似品种清单及疑似品种种子样品, 并通知育种单位自行联系进行 DUS 测试, 育种单位在品种完成试验程序后及时提交 DUS 测试报告。第 4 个阶段是 2023 年, 由于 DUS 测试中特异性关注的是生物学性状上的显著差异, 不适用于品种审定 (更关注经济性状) 制度, 要求对 DNA 指纹检测与现有品种遗传相似系数  $> 0.900$  的疑似品种进行田间相邻种植, 并制定了适宜品种审定的鉴定方案。第 5 个阶段是 2024 年至今, 面对审定品种的同质化问题, 国家农作物品种审定委员会更新了《国家级小麦品种审定标准 (2024 年修订)》<sup>[41]</sup>, 新标准规定申请审定的品种必须与已知品种在 DNA 指纹检测上至少有 4 个差异位点; 若差异位点数为 3 个, 则需通过田间小区种植鉴定来证明存在显著的农艺性状差异。若品种与已知品种的 DNA 指纹检测差异位点数不超过 2 个, 则该品种将被直接淘汰。

这一措施显著提高了审定过程的创新性门槛, 有效防止了缺乏创新性的品种通过审定。由于目前指纹检测单位在开展国家级区域试验的近似品种筛查时, 纳入疑似品种比对范围的品种为小麦审定品种和同年国家级试验参试品种, 未延伸至所有参试品种, 存在同质化品种分别参加不同级别试验渠道的现象, 直接导致部分同质化品种进入审定程序, 建议除了修订规定差异位点的要求外, 还应将国家区域试验筛查近似品种的比对范围扩大至小麦审定品种和所有区域试验品种, 防止过多缺乏创新性的品种通过审定, 提高品种审定门槛。

### 3.4 加强参试品种一致性的监控

品种纯度和 DNA 位点纯合率是决定小麦品种一致性的重要因素。分析每年区域试验样品的 DNA 指纹数据, 发现 DNA 位点纯合率低于 90% 的参试品种占 5%~10%。位点纯合率低的参试品种存在严重的性状分离现象, 导致其他育种家能轻易通过提纯复壮手段筛选出新品种, 这不利于原始品种权的保护, 同时也给市场监管和司法鉴定工作带来了诸多困难。因此, 为了保护育种者的品种权, 建议小麦品种高世代参试。

分析每年区域试验样品的 DNA 指纹数据, 发现品种纯度低于 90% 的参试品种约占 5%。对于参加第 1 年和第 2 年的区域试验品种, 其纯度检测可以与田间试验同步进行。然而, 一旦进入生产试验阶段, 这些品种的种子就已初步锁定, 品种审定后, 会提交至中国农业科学院种质资源库作为标准样品永久保存。实物种子与其对应的指纹图谱是维权打假的基础, 若种子样品的纯度无法得到保障, 那么标准指纹的采集工作必将受到影响, 进而对后期的维权打假工作产生较大的负面影响, 因此权衡经济和准确性等因素, 建议加大生产试验纯度检测。

### 3.5 做好品种端、保护端和市场端的衔接

目前新品系在参加区域试验时, 同步做 DUS 测试可使审定和保护基本同步, 但标准样品并未同步。审定品种的标准样品来源于区域试验样品留样, 品种权保护的标准样品来源于 DUS 测试样品, 存在部分品种既审定又获得保护权后标准样品指纹不一致的问题, 在市场上维权打假时易出现纠纷。尽管近年来国家已出台规定, 要求统一管理审定保护标准样品库, 并明确库中存在同名品种标准

样品时不再接纳待送样品,但审定保护样品的一致性问题仍未得到根本解决。建议对标准样品库中的同名品种进行核实和清理,审定和保护品种标准样品均采用区试中的同一份留样,确保“一品种、一名称、一标样、一指纹”。

### 3.6 统一国内国际检测标准

在标准制定方面,目前ISTA发布的国际标准中列入了小麦品种DNA分子检测方法<sup>[42]</sup>,该方法规定利用14对SSR引物(其中8对引物为必用引物)进行小麦品种鉴定,主要解决品种真实性身份验证问题;UPOV正在探索解决小麦品种特异性鉴定、无相应的分子鉴定标准的难题;在指纹库构建方面,德国建立了502份欧洲小麦品种SSR指纹<sup>[43]</sup>。经研发单位测试,国际标准中的14对SSR引物无法完全区分我国的育成品种,不适合我国小麦品种鉴定。建议加强国际合作,共同研制通用的国际分子标记技术标准,克服当前不同国家因采取不同的分子标记技术标准,导致同一品种的指纹数据无法比对的困难。目前,国内同一作物存在同一类型不同标准的情况,建议同种作物同一个标准,由DNA指纹技术研发优势单位和作物育种优势单位等联合进行研发,开展多平台、多实验室内外部验证,并利用统一的标准构建统一共享的资源 and 品种指纹数据库,用于品种选育和管理。

#### 参考文献

- [1] 种业管理司. 中华人民共和国种子法. (2023-04-23)[2025-03-28]. [https://zys.moa.gov.cn/flfg/202304/t20230423\\_6426120.htm](https://zys.moa.gov.cn/flfg/202304/t20230423_6426120.htm).
- [2] 农业农村部. 主要农作物品种审定办法. (2021-01-21)[2025-03-28]. [https://www.gov.cn/zhengce/2022-01/21/content\\_5721398.htm](https://www.gov.cn/zhengce/2022-01/21/content_5721398.htm).
- [3] 王风格, 易红梅, 赵久然, 等. DNA指纹技术在玉米区域试验品种真实性及一致性检测中的应用. 分子植物育种, 2016, 14(2): 456-461.
- [4] 王风格, 杨扬, 易红梅, 等. 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): 1-14.
- [5] Tian H L, Yang Y, Yi H M, et al. New resources for genetic studies in maize (*Zea mays* L.): a genome-wide Maize6H-60K single nucleotide polymorphism array and its application. The Plant Journal, 2021, 105(4): 1113-1122.
- [6] 田红丽, 张如养, 范亚明, 等. Maize 6H-60K芯片在玉米实质性派生品种鉴定中的应用分析. 作物学报, 2023, 49(11): 2876-2885.
- [7] 田红丽, 杨扬, 范亚明, 等. 用于玉米品种真实性鉴定的最优核心SNP位点集的研发. 作物学报, 2024, 50(5): 1115-1123.
- [8] 程本义, 施勇烽, 沈伟峰, 等. 南方稻区国家水稻区域试验品种的微卫星标记分析. 中国水稻科学, 2007, 21(1): 7-12.
- [9] 郑向华, 叶俊华, 程朝平, 等. 利用SNP标记进行水稻品种籼粳鉴定. 作物学报, 2022, 48(2): 342-352.
- [10] 王立新, 常利芳, 李宏博, 等. 小麦区试品系DUS测试的分子标记. 作物学报, 2010, 36(7): 1114-1125.
- [11] 刘丽华, 苑少华, 冯树英, 等. 小麦F型雄性不育系和恢复系SSR指纹图谱构建及遗传差异分析. 作物杂志, 2017(6): 30-36.
- [12] 刘丽华, 庞斌双, 刘阳娜, 等. 基于SNP标记的小麦高通量身份鉴定模式. 麦类作物学报, 2018, 38(5): 529-534.
- [13] Liu L H, Qu P P, Zhou Y, et al. Consensus linkage map construction and QTL mapping for eight yield-related traits in wheat using the BAAFS Wheat 90K SNP array. Journal of Integrative Agriculture, 2024, 23(11): 3641-3656.
- [14] 匡猛, 王延琴, 周大云, 等. 棉花DUS测试标准品种的SSR指纹数据库构建. 棉花学报, 2015, 27(1): 46-52.
- [15] 孙正文, 匡猛, 马峙英, 等. 利用CottonSNP63K芯片构建棉花品种的指纹图谱. 中国农业科学, 2017, 50(24): 4692-4704.
- [16] 关荣霞, 方宏亮, 何艳琴, 等. 国家大豆区域试验品种(系)SSR位点纯度分析. 作物学报, 2012, 38(10): 1760-1765.
- [17] 魏中艳, 李慧慧, 李骏, 等. 应用SNP精准鉴定大豆种质及构建可扫描身份证. 作物学报, 2018, 44(3): 315-323.
- [18] 陆光远, 伍晓明, 张冬晓, 等. SSR标记分析国家油菜区试品种的特异性 and 一致性. 中国农业科学, 2008, 41(1): 32-42.
- [19] 赵仁欣, 李森业, 郭瑞星, 等. 利用SNP芯片构建我国冬油菜参试品种DNA指纹图谱. 作物学报, 2018, 44(7): 956-965.
- [20] 中华人民共和国农业农村部. 玉米品种鉴定技术规程SSR标记法: NY/T 1432-2014. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014.
- [21] 中华人民共和国农业农村部. 水稻品种鉴定技术规程SSR标记法: NY/T 1433-2014. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014.
- [22] 中华人民共和国农业农村部. 主要农作物品种真实性SSR分子标记检测 普通小麦: NY/T 2859-2015. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2015.
- [23] 中华人民共和国农业农村部. 向日葵品种真实性鉴定SSR分子标记法: NY/T 3752-2020. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2020.
- [24] 中华人民共和国农业农村部. 棉花品种真实性鉴定SSR分子标记法: NY/T 2634-2022. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2022.
- [25] 中华人民共和国农业农村部. 大豆品种真实性鉴定SSR分子标记法: NY/T 2595-2025. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2025.
- [26] 中华人民共和国农业农村部. 玉米品种纯度鉴定SSR分子标记法: NY/T 3750-2020. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- [27] 中华人民共和国农业农村部. 普通小麦品种纯度鉴定SSR分子标记法: NY/T 3749-2020. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- [28] 中华人民共和国农业农村部. 水稻品种纯度鉴定SSR分子标记法: NY/T 3748-2020. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- [29] 中华人民共和国农业农村部. 玉米品种真实性鉴定SNP标记法: NY/T 4022-2021. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- [30] 中华人民共和国农业农村部. 小麦品种真实性鉴定SNP标记法: NY/T 4021-2021. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- [31] 中华人民共和国农业农村部. 水稻品种真实性鉴定SNP标记法: NY/T 2745-2021. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- [32] 王立新, 李宏博, 廖琴, 等. 利用分子标记筛查小麦相似品种(系). 作物学报, 2010, 36(9): 1490-1497.
- [33] 孙世贤, 王风格, 赵久然, 等. 玉米品种试验中DNA指纹检测进展和品种管理对策. 玉米科学, 2009, 17(6): 127-131.
- [34] 王立新, 李云伏, 常利芳, 等. 建立小麦品种DNA指纹的方法研究. 作物学报, 2007, 33(10): 1738-1740.
- [35] Wang L X, Li H B, Gu T C, et al. Assessment of wheat variety stability using SSR markers. Euphytica, 2014, 195(3): 435-452.

- [36] Wang L X, Liu L H, Zhang F T, et al. Detecting seed purity of wheat varieties using microsatellite markers based on eliminating the influence of non-homozygous loci. *Seed Science and Technology*, 2014, 42(3): 393-413.
- [37] Wang L X, Qiu J, Chang L F, et al. Assessment of wheat variety distinctness using SSR markers. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(10): 1923-1935.
- [38] Wang L X, Pang B S, Liu L H, et al. Assessment of wheat variety uniformity using SSR markers. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 21: 1-17.
- [39] 刘丽华, 庞斌双, 刘阳娜, 等. 2009-2014 年国家冬小麦区域试验品系的遗传多样性及群体结构分析. *麦类作物学报*, 2016, 36(2): 165-171.
- [40] 刘丽华, 庞斌双, 李宏博, 等. 2009-2015 年北京市冬小麦区域试验品系的 DNA 指纹分析. *作物杂志*, 2016(5): 13-18.
- [41] 国家农作物品种审定委员会. 国家农作物品种审定委员会关于印发《国家级小麦品种审定标准(2024 年修订)》的通知. (2024-12-26)[2025-03-28]. [https://zys.moa.gov.cn/gsgg/202412/t20241231\\_6468747.htm](https://zys.moa.gov.cn/gsgg/202412/t20241231_6468747.htm).
- [42] 国际种子检验协会. 国际种子检验规程. 巴瑟斯多夫: 国际种子检验协会, 2017.
- [43] Röder M S, Wendehake K, Korzun V, et al. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 106: 67-73.

## DNA Fingerprinting Technology Progress and Its Application in Regional Trials of Wheat Varieties

Liu Lihua, Liu Yangna, Zhang Mingming, Zhao Changping, Yang Guohang, Zhang Yuekun, Wei Nannan, Jia Songyu, Liu Caixia, Xu Ying, Jiao Aitong, Li Hongbo, Pang Binshuang

(Institute of Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Crop DNA Fingerprinting in Innovation and Utilization of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Co-Construction by Ministry and Province)/Beijing Key Laboratory of Crop Molecular Design and Intelligent Breeding/Beijing Key Laboratory of Molecular Genetics in Hybrid Wheat, Beijing 100097, China)

**Abstract** DNA fingerprinting technology plays an irreplaceable and important role in the management of wheat regional trials. Since 2004, China has systematically carried out research and testing of DNA fingerprinting technology for wheat varieties in regional trials, covering multiple aspects such as identification of approximate varieties, authenticity, purity, and DNA locus homozygosity rate. After 20 years of development, this technology has gradually progressed from the exploration stage to the mature stage. Its testing scale has continuously expanded, testing items have become increasingly diverse, and testing capabilities have significantly improved, providing a strong guarantee for the authenticity, distinctiveness, and purity of wheat varieties, and laying a solid technical foundation for wheat variety approval and management. This paper systematically reviews the research ideas and historical process of wheat DNA fingerprinting technology, comprehensively compares and analyzes the advantages and disadvantages of SSR and SNP fingerprinting technologies, summarizes the application trends and practical results of DNA fingerprinting technology in regional trials, and offers several suggestions for future development, aiming to provide a theoretical basis for the sustainable and healthy development of China's wheat seed industry.

**Key words** Wheat; DNA fingerprinting technology; Regional trials; Variety management