黑龙江农业科学 2012(2):142～145
Heilongjiang Agricultural Sciences

综述

水稻分子标记辅助育种研究进展

王彤彤
(黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为充分挖掘水稻分子标记辅助育种的潜质,分析了分子辅助育种较常规育种方法的优点,常用的分子辅助育种技术(RFLP、RAPD、AFLP、ISSR)及优点和不足,同时阐述了通过分子标记辅助选择育种方法培育或改良现有水稻品种的产量、品质以及抗病虫性等成果。

关键词:水稻;分子辅助育种;品种改良;现状
中图分类号:S511.035.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-2767(2012)02-0142-04

水稻作为中国粮食作物之首,其稳定的产量,是保证国家粮食安全的重要指标之一。自改革开放以来,城市化建设的成绩是有目共睹的,然而所带来的问题也层出不穷,农业可以说是受到影响最大的,气象灾害频发、耕地面积下降、环境污染加剧、农村人口骤然减少,都成为了国家粮食安全的隐患,所以提高单产,有效地利用有限的耕地、人力、生物等资源,实为第二次绿色革命的根本宗旨。转基因技术可以说是人类现代史的一个里程碑,然而,社会各界对其安全性始终表示怀疑,虽然欧美很多国家已经允许转基因农业产品在有效的监管控制下商业化运营,但更多国家依然保持观望态度。如何将新型的生物技术更加有效又十分安全地应用到育种上去成为了新的课题。分子标记辅助育种(Molecular maker assisted breeding)即有这种潜质。

1　分子标记辅助育种技术的四大优点

1.1　针对质量性状的选择

常规杂交育种通过对其表现型常年多次重复的观察是可以获得其纯合植株的。但周期一般要七八年甚至是十多年。在常规育种的基础上借助分子技术的辅助手段可以将质量性状准确地定位,大大地降低了回交的次数,也缩减了所需要的年限。

1.2　针对数量性状的选择

常规杂交育种仅仅是透过对表现型的观察来选择基因型,在此过程中环境等因素会引发极大的误差,而且是完全不能避免的。而借助分子标记辅助手段,是直接对基因型进行选择,不但精准而且效率高。植物大多数的农艺性状都是由多个基因联合调控的,所以单纯的常规育种在针对数量性状的选择上已经达到了瓶颈。

1.3　分子标记辅助育种不存在安全隐患

因为在整个育种过程当中完全不需要引入外源基因。与转基因育种有本质的区别。这项技术极大地发挥了种群内部遗传多态性的优势,是将种群内部优良性状整合的一个过程。

1.4　分子标记辅助育种是直接在 DNA 水平上选择差异

是 DNA 遗传变异的直接反映,它能够根据植物体的各个时期进行选择,不受环境及表达的限制,数量多,多态性高,并且遗传稳定。

2　几种常用的分子辅助技术

2.1　RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP 是 Botstein 等于 1980 年提出的分子生物学最早的遗传标记技术。它指的是基因型之间限制性片断长度的差异,这种差异是由限制性酶切位点上碱基的插入、缺失、重排或者点突变引起的。1994 年沈革志等[1]利用 28 个 RFLP 标记为探针测定了 IR8 及其亲本在 9 种限制性核酸内切酶酶切条件下的反应,从中寻找到很多标记所在染色体片段的来源。2006 年王松文等[2]通过对 19 个水稻品种的 RFLP 分析又以 RZ906 为例进行了籼粳特异性及其序列分子生物学解析,为全面揭示水稻籼粳分化奠定了新的基础。同时对研究籼粳分化和开展籼粳品种分类研究具有方法学意义。

收稿日期:2011-08-08
作者简介:王彤彤(1983-),男,黑龙江省哈尔滨市人,学士,研究实习员,从事水稻生物技术研究。E-mail:acierwang@hotmail.com。

2.2 RAPD（Random Amplified Polymor-Phic DNA）

RAPD 是 1990 年由 Williams[3] 和 Welsh[4] 领导的 2 个研究小组发展起来的，建立在 PCR 基础之上的一种 DNA 分子标记技术。它采用任意的非特异性单一引物，对研究对象基因组 DNA 进行 PCR 扩增，扩增产物通过电泳、染色来显示扩增 DNA 片断的多态性。2000 年李云海等[5] 应用 RAPD 技术对 24 个籼稻不育系 3 个保持系和 3 个恢复系，从 100 个 RAPD 引物中筛选出了 14 个重复性比较好的引物。它可以区分遗传背景极为相近的不育系，以此手段解决重大种子纠纷案的技术积累。2001 年刘俊峰等[6] 在对稻瘟病毒性研究中应用 RAPD 技术获得了一个大小约为 1 000 bp 与基因连锁的 RAPD 标记，且两者的遗传距离为3.7 cM。2002 年高东迎等[7] 在以 RAPD 对抗水稻白叶枯病基因（Xa-25）的研究中获得了两个新的 RAPD 连锁标记 Sl269 和 Sl327。2011 年黄雯雯等[8] 在对安徽省的 32 个水稻纹枯病和立枯丝核菌的 RAPD 分析表明其 DNA 的多态率高达 98.2%。

2.3 AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）

AFLP 由荷兰科学家 Vos 等[9] 人创建，并于 1993 年获得了欧洲专利局专利，1995 年以论文的形式发表出来。AFLP 是在 RFLP 和 PCR 的基础上发展起来的，利用了 RFLP 的可靠性和 PCR 的高效性。高风华等应用 cDNA-AFLP 技术调查了干燥胁迫条件下全基因组转化的转录本调控，表明 90%的基因在两种稻作基因型中不受干旱胁迫的影响[10]。姬生栋等以 19 对引物对具有不同表现型的 4 种 T_5 代变异株系及其对照进行 AFLP 分析，结果表明，变异株系基因组较香稻 1 号发生了明显的变化[11]。近期还有很多试验证明了 AFLP 技术在特异基因克隆中具有广阔前景

2.4 ISSR（Inter-simple Sequence Repeat）

ISSR 由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewics 等[12] 于 1994 年提出来的。它是利用 PCR 扩增进行检测的一种 DNA 标记，所用引物根据简单序列重复设计而成，长度一般为 14～20 个碱基的寡核甘酸引物，用来检测两个 SSR 之间的一段短 DNA 序列的差异。具有重复性好、稳定性高、多态性丰富等优点。李进波等利用 ISSR 和 SSR 技术建立了 24 个水稻温敏核不育系的 DNA 指纹图谱，平均每个 ISSR 引物检测到 13.38 个多态性片段，远远高于 SSR 引物的频率[13]。王金花等利用 36 个 ISSR 引物分析了 33 个来源亚洲 10 个国家的香稻品种的遗传多样性，获得了 181 个多态性片段[14]。

此外，还有很多种分子标记技术在水稻的亲缘关系鉴定、优良的农艺性状识别以及抗病抗逆基因指示上发挥着重要的作用。然而，各种分子标记技术都不是十分完美的。陈宏等[15] 在对 RAPD 稳定性的研究中指出，DNA 模版的质量、DNA 的浓度、引物的选择，甚至是稳重熟练的操作技术才能保证 RAPD 扩增产物的重复性以及稳定性。武波等[16] 在对抗稻飞虱的研究中，先应用 RAPD 技术进行标记，之后再转成 SCAR（Sequence-characterized Amplified Region）标记大大地提高了标记的稳定性。樊颖伦等[17] 在对抗白叶枯病基因 Xa23 中指出虽然 RFLP 的标记数量大可以区分纯合还是杂合，但是其工作量大、费用高。而在 RFLP 测序后根据序列信息设计引物将 RFLP 转化成 STS 标记确实解决了这个问题。由此可见，各种分子标记技术之间的互相协作才能使水稻育种真正达到高效率、低成本、容易操作的最终目的。

3 借助分子标记辅助育种手段培育的水稻品种（系）

3.1 增加产量

由国家杂交水稻工程技术研究中心[18] 以超级稻亲本 9311 为受体和轮回亲本，与马来西亚普通野生稻杂交和连续回交，利用分子标记辅助选择，育成了携带野生稻增产 QTL yld1.1 和 yld2.1的新亲本 R163，与自选广适性光温敏不育系Y58S 配组，育成两系杂交中稻新组合 Y 两优 7 号，生育期限 35 d 左右，有效穗数 225 万株·hm^{-2}，穗粒数 180～220 粒·$穗^{-1}$，结实率 80%以上，千粒重 26～29 g，中低水肥条件下产量达 9.75～10.50 t·hm^{-2}，超高产条件下产量达 12 t·hm^{-2}。并于 2008 年通过了湖南省农作物品种审定委员会的审定。

3.2 改良品质

通过分子辅助育种着重改良杂交稻的食味品质。由浙江大学原子核农业科学研究所[19] 培育

的不育系浙农3A于2009年通过浙江省品种审定委员会审定，大大降低了直链淀粉含量，稻米品质得到了改良。在向明恢63品种导入来自中国香稻的alk和fgr等位片段中，获得的改良品系，其稻米糊化温度显著降低，胶稠度升高，具有了香味，并且心白粒率得到了降低[20]。外观品质、蒸煮食味品质得到了显著的改善。在改良特青、汕优63等超高产品种的品质中都采用了分子标记辅助手段并且取得了良好的效果[21-22]。

3.3 提高抗病虫性

由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室、国家农作物分子育种中心[23]通过分子标记辅助选择的方法将稻瘟病抗性基因*Pi*-1、*Pi*-2从供体BL6中回交聚合到在我国广泛应用的两系杂交稻光温敏核不育系培矮64S中，并筛选得到10株改良株系，既改良了该系的抗瘟性，又保存了长日低温条件下的高不育率。官化忠等[24]利用与*Pi*-9紧密连锁的分子标记SRM22为选择标记，也成功地将水稻品系75-1-127中的稻瘟病抗性基因*Pi*-9导入优质水稻雄性不育系金山B-1，显著提高了该不育系对稻瘟病的抗性。李仕贵等[25]利用与稻瘟病抗性基因*Pi-d(t)*紧密连锁的分子标记RM262对含有稻瘟病抗性基因*Pi-d(t)*的地方品种地谷与江南香糯及8987的F_2群体进行辅助选择，选择准确率达98%以上。Liu等[26]利用*Pi*-1的连锁标记对珍汕97B进行稻瘟病抗性改良，获得17株含*Pi*-1的“珍汕97B”近等基因系纯合株系。陈学伟等利用该技术将3个抗稻瘟病基因*Pi-d(t)*1、*Pi-b*、*Pi-ta*2聚合到优良保持系冈46B[27]。Hittamani等将稻瘟病抗性基因*Pi*-5、*Pi*-1和*Pi-ta*聚合到同一品系BL124中。倪大虎等利用分子标记辅助选择技术将白叶枯病抗性基因*Xa*21和稻瘟病抗性基因*Pi*-9聚合到同一水稻品系，获得了同时高抗稻瘟病和白叶枯病的稳定株系[28]。陈英之等[29]对来源于普通野生稻的5个抗稻褐飞虱(BPH)基因通过杂交、回交和分子标记辅助选择，转育和聚合BPH抗性基因到杂交水稻亲本中，获得了与抗BPH基因紧密或较紧密连锁的SSR分子标记，成功地获得5个杂交水稻亲本抗性基因聚合系。其苗期和成株期表现对BPH高抗性。杨子贤等[30]利用分子标记辅助选择改良93-11恢复系对白叶枯病和螟虫的抗性取得了良好的效果。在回交的后代家系中筛选得到了抗白叶枯病的*Xa*21基因和*Bt*基因。

4 展望

自20世纪80年代分子生物学起步经历了90年代的快速发展，直到21世纪分子生物学时代的飞速发展。人们可以从对植物原始的表象观察深入到分子水平的本质差异。这其中不单单激发了人类与生俱来的好奇心，同时隐藏的巨大经济利益也是不能忽略的。转基因大豆、转基因玉米早已不是什么新鲜的话题。2009年中国生物安全网上公布了华恢1号和Bt汕优63两个转*Bt*基因水稻品种获得了安全证书。至今为止通过分子手段商业化的品种都是以转基因的方式引入外援基因，为该品种增加额外的优良性状。转基因是为物种导入外源基因，而分子标记辅助选择技术则是充分地发挥了物种内部基因多态性的资源，将优良性状标记整合的一个过程。可以说不存在安全隐患问题，但是随着科学、经济、法律和意识形态的发展变更，以分子标记技术整合的优良性状，培育出的完美品种是否和转基因品种一样存在专利权的问题？由于水稻很多优良性状是由多基因控制，在通过分子辅助手段整合多个大片断基因来改良水稻性状对提高水稻生产水平将起到非常重要的作用。使水稻育种进入一个由表及里、由里及表的崭新时代。也可以说是生物技术时代的一个光辉里程碑，它将在遗传育种的历史上留下不可磨灭的印记。

参考文献：

[1] 沈革志，寇家瑞.用RFLP技术检测水稻染色体片段的来源[J].中国农业科学，1994，27(4)：75-82.

[2] 王松文，刘霞，王勇，等.RFLP揭示籼粳基因座多态性[J].中国农业科学，2006，39(5)：1038-1043.

[3] Williams J G，Kubelik A R，Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research，1990，18 (22)：6531-6535.

[4] Welsh J，Mcclelland M O. Finger-printing genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research，1990，18(24)：7213-7218.

[5] 李云海，钱前，曾大力.我国主要杂交水稻亲本的RAPD及遗传相关研究[J].生物学报，2000，26(2)：171-176.

[6] 刘俊峰，董宁，侯占军.稻瘟菌对水稻品种梅雨明的无毒性的遗传分析和分子标记[J].植物病理学报，2001，31(1)：10-15.

[7] 高东迎，向阳海，孙立华，等.抗水稻白叶枯病新基因Xa-25(t)的RAPD分析[J].中国水稻科学，2002，16(2)：

179-181.
[8] 黄雯雯，王玲，刘联盟，等. 安徽省水稻纹枯病菌致病力分化遗传多样性[J]. 浙江农业学报，2011，23(1)：111-116.
[9] Vos P，Hogers R，Bleeker M A. New technique for DNA finger printing [J]. Nucleic Acids Research，1995，23：4407-4414.
[10] 高凤华，张洪亮，王海光，等. 应用 cDNA-AFLP 比较干燥胁迫条件下水稻和旱稻转录本表达图谱[J]. 科学通报，2009，54(16)：2305-2319.
[11] 姬生栋，陈鹏，焦浈，等. T_5 代水稻变异株系的 AFLP 分析和特异片段序列分析[J]. 河南农业科学，2009(4)：22-25.
[12] Zietkiewicz E，Rafalski A，Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics，1994，20：176-183.
[13] 李进波，江良荣，李春海，等. 水稻光温敏核不育系的 ISSR 和 SSR 遗传分析比较[J]. 分子植物育种，2003，1(1)：42-47.
[14] 王金花，罗文永，陈建伟，等. 应用 SSR 和 ISSR 标记分析栽培香稻品种的遗传多样性[J]. 分子植物育种，2005，3(1)：37-42.
[15] 陈宏，孙维斌，雷初朝，等. RAPD 稳定性的影响因素探讨[J]. 西北农林科技大学学报，2003，31(5)：139-141.
[16] 武波，韦东，欧倩. 水稻抗褐稻飞虱基因 SCAR 标记的获得[J]. 广西植物，2006，26(6)：617-620.
[17] 樊颖伦，陈学伟，王春连，等. 水稻抗白叶枯病基因 Xa23 的 RFLP 标记定位及其 STS 标记转化[J]. 作物学报，2006，32(6)：931-935.
[18] 吴俊，庄文，熊跃东，等. 导入野生稻增产 QTL 育成优质高产杂交稻新组合 Y 两优 7 号[J]. 杂交水稻，2010，25(4)：20-22.
[19] 周屹峰，赵霏，任三娟，等. 具中等直链淀粉含量的籼型优质不育系浙农 3A 的选育[J]. 杂交水稻，2010，25(4)：14-17.
[20] 王岩，付新民，高冠军，等. 分子标记辅助选择改良优质水稻恢复系明恢 63 的稻米品质[J]. 分子植物育种，2009，7(4)：661-665.
[21] 刘巧泉，蔡秀玲，李钱峰，等. 分子标记辅助选择改良特青及其杂交稻米的蒸煮与食味品质[J]. 作物学报，2006，32(1)：64-69.
[22] 江良荣. 分子标记辅助渗入佳辐占基因组约 800 kb 区间定向改良珍汕 97B 外观品质[J]. 分子植物育种，2004，2(3)：453-454.
[23] 董巍，李信，晏斌，等. 利用分子标记辅助选择改良培矮 64S 的稻瘟病抗性[J]. 分子植物育种，2010，8(5)：853-860.
[24] 官华忠，陈志伟，潘润森，等. 通过标记辅助回交育种改良优质水稻保持系金山 B-1 的稻瘟病抗性[J]. 分子植物育种，2006，4(1)：49-53.
[25] 李仕贵，王玉平，黎汉云，等. 利用微卫星鉴定水稻的稻瘟病抗性[J]. 生物工程学报，2000，16(3)：324-327.
[26] LIU Shiping，LI Xin，WANG Chaoyang，et al. Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan97 by molecular marker aided selection [J]. Acta Botanica Sinica，2003，45 (11)：1346-1350.
[27] 陈学伟，李仕贵，马玉清，等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-d(t)*1、*Pi-b*、*Pi-ta*2 的聚合及分子标记选择[J]. 生物工程学报，2004，20(5)：708-714.
[28] 倪大虎，易成新，李莉，等. 利用分子标记辅助选择聚合水稻基因 *Xa*21 和 *Pi*9(*t*)[J]. 分子植物育种，2005，3(3)：329-334.
[29] 陈英之，陈乔，孙荣科. 改良水稻对稻褐飞虱的抗性研究[J]. 西南农业学报，2010，23(4)：1099-1106.
[30] 杨子贤，姜恭好，徐才国，等. 利用分子标记辅助选择改良 93-11 恢复系对白叶枯病和螟虫抗性[J]. 分子植物育种，2004，2(4)：473-480.

Progress of Rice Molecular Maker-Assisted Selection

WANG Tong-tong

(Crop Tillageand Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences，Harbin，Heilongjiang 150086)

Abstract：In order to detect potential of molecular maker-assisted selection in rice breeding，the merit of molecular maker-assisted selection comparing with conventional breeding was analyzed. Four Common molecular marker techniques (RFLP，RAPD，AFLP and ISSR) had been summarized including their advantages and shortcomings. In the mean time，the achievement of cultivars and lines bred or improved by molecular maker-assisted selection were summarized on yield，quality，disease resistance and insect resistance.

Key words：rice；molecular maker-assisted selection；varieties improvement；situation

欢迎订阅　欢迎刊登广告