

麦类作物育种技术发展方向探讨

于明寨,德青卓嘎*

(省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室/西藏自治区农牧科学院农科研究所,西藏 拉萨 850032)

摘要:育种是通过发现自然变异、人为创造变异,进而获得稳定遗传材料的过程。目前,国内麦类作物育种仍然以常规育种方法为主,对分子标记辅助选择、转基因和基因编辑等分子育种技术的利用还较少。在植物育种方面,分子技术育种具有育成品种时间短、育种目标更明确的巨大的优势,是未来育种工作的大势所趋。因此,熟练的应用分子技术对推动育种工作的高效发展具有重要意义。

关键词:青稞;育种技术;分子育种

中图分类号:S512

文献标志码:A

Discussion on the Development Direction of Wheat Crop Breeding Technology

YU Mingzhai, Deqingzhuoga*

(State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement/ Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract: Breeding is the process of discovering natural variation, artificially created variation, and then obtaining stable genetic material. At present, the breeding of wheat crops in China is still dominated by conventional breeding methods, and the use of molecular breeding technologies such as molecular marker-assisted selection, transgenesis and gene editing is still relatively small. In terms of plant breeding, molecular technology breeding has the great advantages of short breeding time and clearer breeding goals, which is the general trend of future breeding work. So, the skilled application of molecular technology is of great significance to promote the efficient development of breeding work.

Key Words: highland barley; breeding technology; molecular breeding

育种是通过发现自然变异、人为创造变异,进而获得稳定遗传材料的过程。这一过程涉及人工杂交,选择与育种方向一致的变异类型,并通过定向培育等手段创制新品种。现今麦类作物育种流行的方法多种多样,主要包括以传统的系谱法为主的系统育种、以改良单一性状或者抗病性为主的回交育种、以降倍升倍方法达到快速纯合缩短育种年限的单倍体育种、以利用超亲优势为主的杂种优势利用和以利用现代分子技术为主的分子育种等多

种育种途径。本文从传统育种方法和分子育种方法两个方向,系统地综述了现行麦类作物育种方法,为麦类作物育种工作者选择合适的育种方法提供帮助。

1 传统育种方法

1.1 系统育种法

系统育种法又叫常规育种,是一种主要利用杂交过程中产生的基因重组、基因互作和基因累加来综合优良变异的育种方法。这种方法能够产生新性状和产生超亲性状,是麦类作物常用的育种手段。

在目前的育种工作中,系统育种法被普遍采用,且取得了显著的成果。它是育种工作中采用时间最久且产生成果最多的育种方法之一。通过杂交和基因重组,然后筛选符合目标的材料,经过分

收稿日期:2024-08-22

基金项目:西藏自治区科学技术厅自然科学基金项目(XZ202401ZR0123),西藏自治区农牧科学院农业研究所统筹课题(NYSTC202402)。

作者简介:于明寨(1986-),男,助理研究员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:fengyouyuht@126.com;*为通信作者,德青卓嘎(1987-),女,副研究员,主要从事青稞育种与推广工作,E-mail:dqzhg99@163.com。

离纯合形成品种。系统育种法是麦类作物育种中的主要方法,目前,育成的绝大多数小麦和大麦品种都是应用系统育种法育成的。

1.2 远缘杂交

随着育种工作的长期开展,不可避免的面临遗传背景越来越逼仄,迫切需要寻找新的变异来源。为此,小麦品种选育已经广泛探索了与近缘植物杂交的方法。如小麦种间以及小麦与黑麦属、山羊草属、冰草属、簇毛麦属、偃麦草属等属的物种异染色体系成功创造的报道层出不穷。

李振声院士在小麦育种工作中取得了里程碑式的成就,他通过将小麦与偃麦草远缘进行杂交,成功育成了“小偃”系列品种。李院士以小麦为母本、长穗偃麦草为父本进行杂交,成功育成小偃系列,成功地将长穗偃麦草的抗条锈病基因导入到小麦中,显著提高了小麦的产量,成为远缘杂交育种工作的典范^[1]。

我国在小麦远缘杂交领域的研究一直走在世界的前列。翁跃进等^[2]相继报道了小麦与旱麦草属、赖草属、披碱草属、新麦草属、大麦属等物种远缘杂交取得的成功结果。这些研究成果不仅丰富了小麦的遗传资源,也为小麦育种工作提供了新的思路和方法。

1.3 回交育种

回交育种是一种主要运用传统育种方法来改良作物单个不良性状的常用手段。它特别适用于在生产上表现优良,但在某个性状上有缺陷的品种。通过选择这些品种作为轮回亲本,回交育种可以快速改良旧有品种,使其适应不断变化的新环境,是育种工作的重要方法之一。

回交育种的方法最早被用来改良小麦品种在锈病抗性中的短板^[7]。通过回交育种,不仅能保留轮回亲本中大部分优良性状基因,而且能有效聚合供体亲本优良微效基因。经过多次回交,既能最大程度恢复轮回亲本的遗传背景,又能成功导入供体基因。

回交育种还能与分子标记相结合,通过摸清楚改良性状的遗传背景,利用分子标记进行鉴定,从而提升简单回交转育一个或两个主基因的效率^[3-5]。这种结合应用使得回交育种在改良作物的抗病性方面具有重要作用。

1.4 倍性育种

系统育种法在杂交之后会经历一个分离纯合的过程,这个过程所需的时间随着基因组复杂程度的增加而增加。以小麦为例,通常需要4~6年;大麦相对较少,也需要3~5年的时间。而且随着分离纯合的开展,不免会造成优良的等位基因的丢失。通过单倍体加倍技术,将优良基因的筛选工作放在配子体水平,可以大大缩短筛选的时间。在技术成熟的条件下,纯合的过程仅需一个生长季就可以完成,也能将隐性性状表现出来,极大提高了育种效率。

花药和小孢子离体培养是作物倍性育种中广泛被使用的方法。在麦类作物上应用花药培养技术难点在于遗传转化体系的建立以及遗传转化的效率。由于单子叶植物遗传转化困难,基因型依赖严重,遗传转化只能在个别材料中成功。小孢子是植物花药中花粉母细胞减数分裂后的早期花粉粒细胞,是一类特殊的单倍体生殖细胞。小孢子保留了继续分裂的潜力,在适当的条件下可发育分化成植株,通过自然或者人工加倍获得纯合可育的双单倍体^[6]。有研究表明,相比花药培养,小孢子培养在大麦中获得的再生绿苗是其9.3倍^[7]。小孢子培养相比花药培养,优势明显;小孢子培养没有花药壁,去除了在形成愈伤组织时体细胞的干扰;小孢子培养期间可对其进行操作,短时间内可以处理更大的群体,从而增加绿苗产量^[8]。

自1993年Mejza等^[9]以及Turesson等^[10]首次利用小麦小孢子成功培育出再生植株以来,经过20余年的研究与技术的不断革新,游离小孢子培养技术在小麦领域已取得显著进展。国内黄剑华等^[11-12]和孙月芳等^[13]发现,在诱导培养基中适当加入水解酪蛋白(casein acid hydrolysate, CH)、麦穗和花蕾提取液、脯氨酸等,以及适时提高生长素浓度,能都达到提高迟钝基因型花药培养的效果。黄剑华等^[14]又以100多份大麦材料,获得平均绿苗分化率为5%的结果,之后又将大部分供试材料的绿苗率提高至10%以上,其中,部分材料的花药培养绿苗率达到50%以上^[15]。又有研究利用甘露醇预处理大麦花药,再进行诱导培养和再生成苗培养,可提高分化绿苗成苗率^[16]。

2 分子育种方法

2.1 分子标记辅助选择育种

分子标记辅助选择育种是一种通过分子标记技术辅助常规育种的新型育种方式。其前提是要摸清楚性状的遗传背景,找到控制性状的基因,设计引物鉴定后代材料中存在目的基因的材料,从而辅助筛选,缩短育种时间。此外,这种方法还可以达到精准筛选,避免性状在作物生长过程中受到环境因素的影响,继而稳定地获得携带目的基因的材料^[17-19]。

目前,常用的分子标记辅助选择标记方法有基于单核苷酸多态性(SNP)的基因芯片和简单重复序列(SSR)^[20]。四川农业大学在小麦品种大红袍的2BS染色体上发现了抗性位点Yr.DHP-2BS,该位点纯合时能抑制Yr81。同时,他们开发了KASP标记KP6A_1.99和KP6A_5.22,有助于Yr81的分子辅助育种^[21]。

2019年,研究者在澳大利亚小麦品种Aus27430的6AS染色体上发现Yr81基因,并识别了另一个条锈病抗性基因Yr18。Yr18与Yr81共同作用,增强了抗性。研究中使用的标记gwm459和KASP_3077可用于辅助选择^[22]。

2.2 转基因技术

转基因技术是作物育种工作中一项突破性技术,在摸清楚目标性状基因调控机制的前提下,通过克隆基因、构建表达载体、遗传转化形成植株,继而进行筛选的育种过程。转基因技术已经成熟地应用于棉花、木瓜、玉米等作物,并取得了显著的效果。

长期以来,小麦、大麦因其遗传转化体系构建困难、基因型依赖严重等问题,研究进展缓慢。2022年1月,叶兴国与日本烟草公司等单位合作,在《Nature Plants》上发表了关于小麦遗传转化的重要研究成果^[23]。他们发现了TaWOX5基因,该基因可降低小麦遗传转化过程中的基因型依赖性,显著提升了小麦遗传转化效率。鉴于在小麦转化中的重要作用,研究团队进一步验证了TaWOX5基因在其他单子叶植物中的作用,发现在波兰小麦、栽培一粒小麦、黑麦、小黑麦、大麦以及玉米等植物遗传转化中均显著提升了转化效率。

2.3 基因编辑技术

基因编辑技术是利用基因编辑技术对生物体

基因组特定位置进行插入、删除或者替换操作,从而改变遗传信息继而影响性状的技术。基因编辑技术最先被利用的是锌指核酸酶技术(ZFN),它是在非洲爪蟾中发现的转录因子,经过人工改造后发展成为锌指核酸酶技术编辑技术。TALEN技术即转录激活因子样效应核酸酶,是基因编辑领域精准、灵活的编辑工具之一。

成簇规律间隔的短回文重复序列被称为CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)。Doudna和Charpentier凭借CRISPR研究拿下诺贝尔化学奖。CRISPR编辑技术是由single-guide RNA介导的核酸酶系统,通过特异的CRISPR序列与靶序列进行碱基配对,从而引导Cas9蛋白至特定的切割位点进行切割,通过细胞修复,从而实现小片段的插入、缺失和替换,实现基因编辑。

CRISPR-Cas9与其他基因编辑系统相比,具有操作简便、快速、高效等优点,用于植物基因敲除,可以加速农作物的改良。随着CRISPR-Cas9基因编辑技术持续在生物体中得到应用,CRISPR-Cas9技术逐渐优化,并广泛应用于各种植物中,如拟南芥^[24-25]、高粱^[26]、水稻^[27-28]、小麦^[29]、玉米^[30]、烟草^[31]、番茄^[32]等不同植物基因组的定向编辑研究中。

Mao等^[33]以及Feng等^[24]在国内率先运用CRISPR-Cas9技术成功实现了对拟南芥和水稻中特定基因的精确编辑。Miao等^[27]针对水稻的分蘖夹角控制基因LAZY1以及叶绿素合成基因CAO1进行了定点突变实验,以实现Cas9在水稻中的高效表达。Liang等^[30]首次在玉米中构建了CRISPR-Cas9基因定向编辑系统,并在原生质体中对CRISPR-Cas9与TALENs技术在诱导ZmIPK同一靶点突变效率方面进行了比较研究。研究结果显示,CRISPR-Cas9技术在诱导突变方面的效率显著高于TALENs技术。

Zhang等^[34]利用CRISPR-Cas9技术,通过粒子轰击将DNA或RNA介导的瞬时表达引入面包小麦和硬粒小麦的愈伤组织,成功获得了千粒重显著增加的突变体。Sánchez-León等^[35]使用CRISPR-Cas9技术,通过靶向小麦谷蛋白免疫显性表位附近的保守区域,成功降低了小麦中的谷蛋白含量,培育出低谷蛋白非转基因小麦。

华中农业大学孙东发研究团队采用农杆菌介

导的方法,借助 CRISPR-Cas9 技术对大麦的稃型 *Vrs1* 基因和皮裸基因 *Nud* 进行了精确的基因组编辑。通过潮霉素作为筛选标记,他们成功培育出若干不同品种大麦的转基因阳性植株^[36]。

3 小结与展望

分子标记辅助选择在育种工作中是以杂交为主,分子标记只是检测后代是否含有目标基因。这种方法在兼顾效率的同时有效避免了广大群众对粮食作物转基因的疑虑,是育种工作从传统育种到分子育种的一种过渡形式。分子标记辅助选择是对常规育种的一种补充,但在多基因控制的性状选择方面,相比基因编辑技术环节较多、步骤繁琐、花费时间较多,优势不明显。在小麦品种选育方面,分子标记辅助选择已经得到广泛的应用,对提升小麦的品质、丰产性及抗病性和抗逆性以及缩短育种周期具有重要意义。

转基因技术目前已经成熟地应用在作物育种方面,其前提是要摸清目标基因的遗传表达背景,背景清楚才能做到有的放矢,针对性地应用于作物育种中去。转基因技术还面临一个随着子代繁育性状丢失的问题。转基因技术发展到目前,在非粮食作物中的应用非常广泛,例如棉花的转基因就占绝大多数。但在粮食作物上仍然谨慎开展。

基因编辑技术的前提也是摸清目标基因的遗传表达背景,是育种工作中的优质工具。相比分子标记辅助选择和转基因技术来说优势明显。随着基因调控规律的不断完善,基因编辑技术必将引来大发展。

育种工作归纳起来只有两步,首先是要发现变异,其次就是利用变异,也就是将发现的变异整合到材料中去最终形成品种。无论是发现变异还是整合变异形成品种,分子技术都具有巨大的优势,是以后育种工作的大势所趋,熟练应用分子技术对推动育种工作的高效发展具有重要意义。麦类作物育种技术仍是以传统的育种方法为主,缺乏对现代育种技术的应用。在今后的育种工作中更应加强对分子育种技术的学习和应用。

参考文献:

[1]井金学,徐智斌,王殿波,等.小偃6号抗条锈性遗传分析[J].中国农业科学,2007,40(3):499-504.
[2]翁跃进,董玉琛.普通小麦—顶芒山羊草异源附加系的创建和鉴定——I.小麦花药培养对创建普通小麦—顶芒山羊草异源附加系的作用[J].作物学报,1995,21(1):39-44.

[3]RIBAUT J M, BÄNZIGER M, BETRAN J, et al. Use of Molecular Markers in Plant Breeding: Drought Tolerance Improvement in Tropical maize [M]//Quantitative genetics, genomics and plant breeding. UK: CABI Publishing, 2002: 85-99.
[4]FRISCH M, MELCHINGER A E. The Length of the Intact Donor Chromosome Segment Around a Target Gene in Marker-assisted Backcrossing[J]. Genetics, 2001, 157(3): 1343-1356.
[5]BREGITZER P, DAHLEEN L S, NEATE S, et al. A Single Back-cross Effectively Eliminates Agronomic and Quality Alterations Caused by Somaclonal Variation in Transgenic Barley [J]. Crop Science, 2008, 48(2): 471-479.
[6]EUDES F, SHIM Y S, JIANG F Y. Engineering the Haploid Genome of Microspores[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(1): 20-23.
[7]LI H C, DEVAUX P. Isolated Microspore Culture Overperforms Anther Culture for Green Plant Regeneration in Barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, 27(4): 611-619.
[8]FERRIE A M R, CASWELL K L. Isolated Microspore Culture Techniques and Recent Progress for Haploid and Doubled Haploid Plant Production [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2011, 104(3): 301-309.
[9]MEJZA S J, MORGANT V, DIBONA D E, et al. Plant Regeneration from Isolated Microspores of *Triticum aestivum* [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(3): 149-153.
[10]DUE TUVESSON I K, VIKTORIA ÖHLUND R C. Plant Regeneration Through Culture of Isolated Microspores of *Triticum aestivum* L [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 34(2): 163-167.
[11]黄剑华,陆瑞菊,王亦菲,等.提高迟钝型大麦花培反应率的因素[J].上海农业学报,2000,16(4):15-17.
[12]黄剑华,陆瑞菊,张玉华,等.大麦花药培养反应迟钝基因型的胚状体诱导和绿苗再生[J].上海农业学报,1993,9(4):19-22.
[13]孙月芳,陆瑞菊,王亦菲,等.大麦幼穗和油菜花蕾提取液对大麦花药培养反应的影响[J].麦类作物学报,2003,23(2):19-22.
[14]黄剑华,陆瑞菊,张玉华,等.大麦花培育种的绿苗高效再生[J].上海农业学报,1991,7(3):2.
[15]黄剑华,陆瑞菊,孙月芳,等.大麦高效双单倍体技术与品种改良[J].上海农业科技,1998(1):33-48.
[16]华为,尚毅,贾巧君,等.大麦花药快速培养法及不同基因型对花药培养的影响[J].浙江农业学报,2013,25(3):425-430.
[17]刘文.优质花生良种及栽培关键技术浅析[J].南方农业,2017,11(29):39-40.
[18]崔成健,王培祥,孙旭亮,等.加强花生良种繁育推广工作的作法[J].种子世界,2000(3):9-10.
[19]SINGH R P, HUERTA-ESPINO J, RAJARAM S. Achieving Near-immunity to Leaf and Stripe Rusts in Wheat by Combining Slow Rusting Resistance Genes [J]. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 2000, 35(1): 133-139.
[20]朱冠鸿.小麦地方品种的条锈病抗性及其常用分子标记的研究进展[J].麦类作物学报,2024,44(9):1125-1132.

- [21] JIN H L, ZHANG H P, ZHAO X Y, et al. Identification of a Suppressor for the Wheat Stripe Rust Resistance Gene Yr81 in Chinese wheat Landrace Dahongpao[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2023, 136(4):67.
- [22] GESSESE M, BARIANA H, WONG D, et al. Molecular Mapping of Stripe Rust Resistance Gene Yr81 in a Common Wheat Landrace Aus27430[J]. Plant Disease, 2019, 103(6):1166–1171.
- [23] WANG K, SHI L, LIANG X N, et al. The Gene TaWOX5 overcomes Genotype Dependency in Wheat Genetic Transformation[J]. Nature Plants, 2022, 8(2):110–117.
- [24] FENG Z Y, ZHANG B T, DING W N, et al. Efficient Genome Editing in Plants using a CRISPR/Cas System[J]. Cell Research, 2013, 23(10):1229–1232.
- [25] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and Homologous Recombination-Mediated Genome Editing in Arabidopsis and Nicotiana Benthamiana using Guide RNA and Cas9[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8):688–691.
- [26] JIANG W Z, ZHOU H B, BI H H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated Targeted Gene Modification in Arabidopsis, Tobacco, Sorghum and Rice[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(20):e188.
- [27] MIAO J, GUO D S, ZHANG J Z, et al. Targeted Mutagenesis in Rice using CRISPR-Cas System[J]. Cell Research, 2013, 23(10):1233–1236.
- [28] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, et al. Targeted Genome Modification of Crop Plants using a CRISPR-Cas system[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8):686–688.
- [29] UPADHYAY S K, KUMAR J, ALOK A, et al. RNA-guided Genome Editing for Target Gene Mutations in Wheat[J]. G3 Genes/Genomes/Genetics, 2013, 3(12):2233–2238.
- [30] LIANG Z, ZHANG K, CHEN K L, et al. Targeted Mutagenesis in Zea Mays using TALENs and the CRISPR/cas System[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2014, 41(2):63–68.
- [31] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, et al. Targeted Mutagenesis in the Model Plant Nicotiana Benthamiana using Cas9 RNA-guided Endonuclease[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8):691–693.
- [32] BROOKS C, NEKRASOV V, LIPPMAN Z B, et al. Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated9 System[J]. Plant Physiology, 2014, 166(3):1292–1297.
- [33] MAO Y F, ZHANG H, XU N F, et al. Application of the CRISPR-cas System for Efficient Genome Engineering in Plants[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6):2008–2011.
- [34] ZHANG Y, LIANG Z, ZONG Y, et al. Efficient and Transgene-Free Genome Editing in Wheat through Transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA[J]. Nature Communications, 2016, 7:12617.
- [35] SÁNCHEZ-LEÓN S, GIL-HUMANES J, OZUNA C V, et al. Low-gluten, Nontransgenic Wheat Engineered with CRISPR/Cas9[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(4):902–910.
- [36] 宋晓伟.应用CRISPR-Cas9技术对大麦稜型皮裸基因进行基因编辑的初步研究[D].武汉:华中农业大学,2017.