

分子育种及其在海带育种中的研究进展

Molecular breeding and its research advances and prospects in *Laminaria japonica* breeding

刘福利, 王飞久, 孙修涛, 汪文俊, 梁洲瑞

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)09-0128-07

海带是一种重要的大型经济海藻, 具有重要的经济和生态价值。我国海带大规模人工养殖始于 20 世纪 50 年代, 经过半个多世纪的发展, 现已形成了较为成熟的养殖技术体系和较为完善的产业链。目前, 我国海带养殖面积约 37 625 ha, 养殖产量约 827 965t, 占海藻总产量的 60%左右, 产量、规模位居世界第一^[1]。品种决定着养殖海带的产量和质量, 是海带养殖及其相关产业健康、可持续发展的基础和前提, 良种培育是海带科技工作者的核心任务, 贯穿养殖、加工和销售整个海带产业链。应用传统的育种方法如基于群体水平的选择育种、杂交育种等, 培育出了一系列的优良品系或品种, 推动了我国海带养殖业的发展。然而, 传统海带育种也存在一些不足。首先, 由于海带经济性状大多为微效多基因控制的数量性状, 易受环境影响^[2-5], 导致传统的表型选择效率较低; 其次, 由于海带群体的杂合度较高^[2], 为得到稳定遗传的纯合系需要多代自交, 导致育种周期延长^[6]。随着海带产业的发展, 对良种的需要更为迫切和多元化, 不仅要求产量高、质量优, 还要抗逆性高(耐高温)、易于加工(叶片宽大、平直)、收获期灵活可控(早熟和晚熟品种相搭配)等, 使得传统育种方法已渐渐不能满足海带产业的良种需求。近 20 年来, 随着分子生物学和基因组学等新兴学科的飞速发展, 使育种理论和技术发生了重大变革, 分子育种应运而生。分子育种即在经典遗传学和分子生物学等理论指导下, 将现代生物技术手段整合于传统育种方法中, 将表现型和基因型选择有机结合, 从而实现基因的选择、转移和聚合, 大幅度提高育种效率, 缩短育种周期, 在提高产量、改善品质、增强抗性等方面已显示出巨大潜力, 是一种崭新的遗传改良的理论和方法体系, 已成为现代育种的

主流方向。

本文将简单介绍分子育种的概念、内涵及主要内容, 综述当前海带分子育种领域的研究进展、存在的问题, 指出海带下一步的研究重点和方向, 最后展望分子育种在海带遗传育种中的应用前景。

1 分子育种概述

分子育种(Molecular breeding)是分子生物学与传统育种学相结合而产生的崭新育种理论和方法体系。它在经典遗传学和分子生物学等理论指导下, 将现代生物技术手段整合于传统育种方法中, 在人为设计和操控下, 或通过标记辅助选育, 或通过转基因手段, 实现优良基因转移和聚合, 得到优良基因型组合, 从而培育出优良新品种^[7]。一般认为, 分子育种包括分子标记辅助选择育种、转基因育种和分子设计育种三个方面, 其中分子标记辅助选择和转基因育种是分子育种的两大基本模块, 分子设计育种将分子标记辅助选择和转基因育种有机结合, 是分子育种的高级阶段, 三者共同构成了分子育种的完整体系。

1.1 分子标记辅助选择

借助分子标记对目标性状基因型直接选择的方法称为分子标记辅助选择(Molecular Assisted Selection, MAS), 包括对目标基因的选择即前景选择

收稿日期: 2011-11-10; 修回日期: 2011-12-10

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A406); 公益性行业(农业)专项(200903030); 中国水产科学研究院黄海水产研究所 2012 年度基本科研业务费项目(20603022012014)

作者简介: 刘福利(1983-), 男, 山东济宁人, 博士, 主要从事经济海藻遗传育种和生态养殖研究, 电话: 0532-85838673, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn; 王飞久, 通信作者, 研究员, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

(Foreground selection)或称正向选择和对遗传背景的选择(Background selection)也称负向选择^[8]。分子标记辅助选择是一种新的遗传改良方法,主要是利用分子标记与需要改良的目的基因紧密连锁或共分离的关系,用标记对育种材料进行目标基因组区域选择,同时对全基因组进行筛选,大大提高选择的精度,从而提高选择育种效率。目前,分子标记辅助选择育种主要应用于质量性状,涉及的基因多为单基因或少数几个基因^[9]。对于数量性状来说,由于 QTL 表达常与环境 and 遗传背景密切相关,当前检测到的 QTL 稳定性差、精度不高,降低了分子标记辅助选择育种的效率^[10-11]。针对这个问题一些新的对策被提出,例如,利用近等基因系进行育种^[10],或利用高代回交系同时进行 QTL 分析和遗传改良^[12],或用全基因组选择技术(Genomic selection)来解决多基因控制的低遗传力性状的改良问题^[13]。

1.2 转基因育种

转基因育种是根据育种目标,将从供体生物中分离出的目的基因导入受体作物中,经过筛选获得稳定表达的重组子,并经过田间实验与大田选择育成转基因新品种。转基因育种的优点是可打破生殖隔离,实现不同种间的遗传物质交流,可对目标性状进行定向变异和选择,从而提高选择效率、加快育种进程。目前,多种农作物或经济作物中已建立起成熟的遗传转化技术体系,如农杆菌介导法、花粉管通道法、基因枪法、超声波介导法等等,为外源基因的导入奠定了坚实基础。自 1983 年获得第一例转基因植物至今,主要农作物转基因研究取得了较大进展,将一些与重要性状如抗虫、抗病、抗除草剂、抗逆、品质改良、发育调控、营养吸收等外源基因转入了主要农作物。全球已有 35 科 120 种植物转基因成功,目前已有 30 个国家先后批准了 3 000 多例转基因植物进入田间试验,所涉及的植物有 40 多种,主要是玉米、油菜、马铃薯、番茄、大豆和棉花,其中有 50 多个农作物转基因的品种投入商业化生产^[14]。尽管转基因技术在应用上存在安全性问题,但值得肯定的是,它是一项非常有用的生物技术,在作物育种方面有着非常广阔的应用前景。

1.3 分子设计育种

分子设计育种的概念最早是由荷兰科学家 Peleman 和 van der Voort 提出的^[15]。它通过多种技术的集成与整合,在育种家的田间试验之前,对育种

程序中的各种因素进行模拟、筛选和优化,确立目标基因型及获得目标基因的手段和途径(如最佳的亲本选配,后代选择策略,或转基因体系),提高育种过程中的预见性,从而实现高效率育种。分子设计育种的核心是基于对控制作物各种重要经济性状的主效基因或 QTL 功能及其等位变异的深刻认识,需要找到育种目标性状的基因/QTL 或其紧密连锁标记,充分了解 QTL 位置、遗传效应、QTL 之间的互作、QTL 与环境之间的互作等信息,需要综合利用遗传学、育种学、统计学、生理学和生物信息学等多方面信息和手段^[16]。据此,要开展作物分子设计育种必需具有以下基本条件:高密度遗传图谱和高效的分子标记检测技术;定位重要经济性状的调控基因或 QTL 并对其进行遗传解析;建立并完善遗传信息数据库;开发并完善进行作物设计育种模拟研究的统计分析方法及相关软件;掌握可用于设计育种的种质资源与育种中间材料^[16]。总之,作物分子设计育种是以基因组学、蛋白质组学和生物信息学等为基础而发展起来的一个综合性的新兴研究领域,可大幅度提高育种效率,缩短育种年限。尽管分子设计育种的概念已提出多年,但其实质的研究工作才刚刚起步^[17],当前应该大力加强这方面的基础理论研究和平台建设,为真正实现分子设计育种的目标提供理论与技术支撑。

2 海带分子育种的研究进展

2.1 海带分子标记辅助选育

分子标记技术应用于海带遗传育种研究领域的时间较晚,目前主要用于海带群体遗传学研究(如群体遗传多样性和遗传结构分析、亲缘关系分析等)、种质鉴定等方面,也有少量应用分子标记对海带进行杂种优势预测、遗传图谱绘制及基因或 QTL 定位分析的研究报道。

(1)海带分子群体遗传学研究进展。应用不同的分子标记,分析评价海带及其近缘种的群体遗传多样性和遗传结构的研究报道较多。夏鹏等^[18]以海带优良品种“901”为材料在海带中建立起 RAPD 技术;He 等^[19]应用 RAPD 技术分析了海带、奥霍海带和长海带共 18 个配子体的遗传多样性。周志刚等^[20]应用同功酶和 RAPD 技术对中国海区海带不同栽培品系及长海带的配子体无性繁殖系进行了遗传多样性分析。Wang 等^[21]应用 ISSR 标记方法,对 10 对海带配子体的遗传多样性进行了研究。另外 Shi 等^[22]、尚

书等^[23]、Li 等^[24]、石媛媛等^[25]、张全胜等^[26]、Shan 等^[27]、Bi^[28]和汪文俊等^[29]应用 RAPD, ISSR, SSR, AFLP 和 ITS 标记技术对海带及长海带进行了遗传多样性分析和系统进化分析。这些工作研究了海带种质材料的遗传信息,为海带遗传育种打下了基础。然而,当前海带群体遗传学分析主要是以养殖品种的配子体为研究对象,少有海带的近缘种和野生种的孢子体信息,下一步的工作应该将海带的近缘种和不同野生类群纳入海带的种质资源研究范畴,整合分子水平上的数据和性状表型数据,对海带种质和育种材料进行综合分析评价,为海带种质资源的有效保护和高效利用奠定基础。

(2)分子标记在海带种质鉴定中的应用。He 等^[19]应用 RAPD 技术评价了海带种质;Wang 等^[30]运用 RAPD 分析技术,对 33 个海带配子体进行了种质鉴定,构建了 33 个配子体的指纹图谱;张全胜等^[26]应用 AFLP 技术构建了包括海带、长海底、利尻海带和掌状海带共 11 个野生品系或品种的种质指纹图谱。海带不同种质材料的指纹图谱构建,为它们在海带种质改良和品种培育高效利用奠定了基础。

(3)应用分子标记预测海带杂种优势。杂种优势(Heterosis)是指两个遗传组成不同的亲本杂交产生的杂种在生活力、生长势、适应性、抗逆性和繁殖能力等方面优于双亲的现象。杂种优势是生物界普遍存在的一种现象,已经在农业生产上得到广泛应用。对杂种优势的预测一直是育种学的难题。传统方法主要通过性状的配合力分析和聚类分析进行预测,需要配合大量的杂交组合和大量繁琐的田间性状调查。用分子标记的方法进行杂种优势的预测,并以此来选择理想亲本和辅助育种,是解决上述问题的有效途径^[31-32]。在海带中, Li 等^[32]利用微卫星 DNA 标记技术对 27 个配子体杂交亲本进行了遗传相似性分析,并对株长、株宽、株厚、株鲜质量、株干质量、产量杂种优势率与配子体亲本之间的遗传距离进行了回归分析。建立了配子体克隆亲本遗传相似度与杂种优势之间的量化关系,用以预测杂交子代的杂种优势。利用该预测体系对可能产生优势的组进行了预测并在生产中验证,可减少亲本配组的盲目性,实现海上评价组合数的科学减量,从而提高育种效率。

(4)海带遗传图谱构建的研究进展。遗传图谱(genetic map)是指通过遗传重组分析得到的基因或遗传标记在染色体上的线性排列顺序图。遗传图谱反映了遗传标记与少数功能基因之间的相对关系,

它不仅是遗传学研究的重要内容,又是种质资源、育种及基因克隆等许多应用研究的理论依据和基础。海带的遗传图谱工作还刚刚起步。Li 等^[33]采用 AFLP 分子标记对“长海带×真海带”杂交 F₁ 代群体 60 个个体进行遗传分析,根据“双向拟测交”策略分别构建了长海带和真海带的遗传连锁图谱。该图谱是海带的第一张遗传连锁图谱,定位了 81 个 AFLP 标记,其平均标记密度为 8 cM。Yang 等^[34]应用 AFLP 和 SSR 标记,以 40 个配子体克隆为作图群体构建了海带雌、雄配子体的遗传图谱,该遗传图谱的标记密度为 7.91 cM,基因组覆盖率为 66%。Liu 等^[35]利用海带的两个品系杂交后的 F₂ 代作为作图群体(两亲本特征为:一个叶片宽而薄,一个叶片长而窄),构建了一个包含 28 个连锁群的遗传图谱,定位了 142 个 AFLP 标记,标记平均兼具为 9.4 cM,基因组覆盖率为 68.4%。总体来说,虽然目前海带遗传作图还存在作图群体较小、饱和度和基因组覆盖率较低等问题,但它们为海带分子标记连锁图谱的构建做了有益的尝试,初步得到了海带遗传框架图,探讨了海带遗传图谱构建中一些技术和理论问题,为将来更高饱和度和基因组覆盖率图谱的构建打下了基础。

(5)海带性状相关基因或 QTL 定位和分析。所谓基因定位即确定基因在染色体上的位置和排列顺序的过程。应用分子标记技术构建遗传连锁图谱,并在图谱基础上通过连锁分析确定基因的染色体座位,是基因定位的一种常用方法。在海带中, Yang 等^[34]应用 AFLP 和 SSR 标记,将海带的性别看作一个标记,通过连锁分析把可能控制海带性别的基因定位到海带遗传图谱的 LG2 连锁群上。Liu 等^[36]鉴定得到一个与海带雌性配子体相连锁的 SCAR 标记 FRML-494,并证明该标记仅存于海带雌配子体中,可用于海带的雌、雄配子体鉴定。Liu 等^[37]应用 BSA 法,筛选出与海带叶片长度连锁的标记 FL-569,遗传作图和连锁分析证明该标记与控制海带长度的主效 QTL 相连锁,验证结果表明该标记对长叶片海带的选择成功率在 80%以上。Liu 等^[38]在构建遗传图谱的基础上,定位到 3 个与叶长相关的 QTL、2 个与叶宽相关的 QTL。

总体来说,海带分子标记辅助选择育种还处于起步阶段,主要工作集中在育种群体材料的遗传多样性和遗传结构分析、亲缘关系分析和种质鉴定上,这些工作可对育种亲本材料选择提供参考信息。然而,与目标经济性性状紧密连锁或共分离的分子标记

却罕有报道,而连锁标记是分子标记辅助选择的基础和前提,这就限制了分子标记辅助选择在海带育种中的应用。

2.2 海带转基因育种研究进展

大型经济海藻转基因育种研究始于 20 世纪 90 年代初,研究内容主要集中在载体组件(含启动子、报告基因)筛选和载体构建、有效转化方法优化和建立、转化子的筛选(选择标记)、基因整合及表达的检测、受体与植株再生途径探索等方面。载体组件(含启动子、报告基因)筛选和载体构建方面,一系列启动子如 CaMV 35S 启动子、SV40 启动子、FCP 启动子、AMT 启动子被证明可用作海带基因工程载体的启动子元件,并且发现 FCP 启动子与 CaMV 35S 启动子的效率较高,通过转化海带雌配子体,FCP 启动子-GUS 基因能在孤雌生殖海带中实现稳定表达^[39];一些报告基因如 *lacZ* 基因、*gus* 基因、*cat* 基因、*bar* 基因等在海带中被瞬间或稳定表达^[40]。在遗传转化方面,海带的转化方法主要是采用基因枪法,其基本原理是利用高压气体或火药作驱动力,将吸附或包裹有 DNA 的金粉微粒高速发射,击中并穿透受体的细胞壁及膜系统,达到导入外源 DNA 的目的。多年研究结果表明,基因枪法对海带组织切块、雌配子体、雄配子体以及孢子体幼苗均有效,而且未发现粒子轰击对雌配子体孤雌生殖有抑制作用^[41-43];另外,病毒可作为褐藻基因工程的载体,为褐藻基因工程提供了新途径^[44]。在转化子筛选方面,建立起了采用氯霉素-*cat* 基因的选择系统。受体与植株再生途径探索方面,目前大型海藻原生质体和愈伤组织再生方法尚不稳定,可借助海带自身异型世代交替生活史的特点,将单倍的配子体作为转化对象,转化后通过孤雌或受精发育而生成孢子体,从而完成整个转基因操作^[45]。

总之,20 世纪 90 年代初起,初步建立了海带模式转化系统,即以 SV40 为启动子,*cat* 基因为选择标记,用基因枪转化,以雌配子体为转化受体,孤雌生殖作为植株再生方式,经氯霉素筛选,获得转基因海带。目前已获得转外源报告基因植株并获得国家发明专利(秦松等,ZL96120235.1)。展现出构建高产、优质和抗逆的海带良种的广泛前景,也证明了海带作为廉价的生物反应器,通过构建表达系统生产大量的蛋白、药物或天然活性物质的可行性和巨大潜力。然而,目前海带基因工程还处于探索阶段,其遗

传转化模型的有效性和安全性还有待于进一步的改进或验证,尚未真正应用到转基因育种中来。

2.3 海带分子设计育种

随着基因组测序等多种技术实现突破,基因组学、蛋白组学等多门“组学”及生物信息学得到迅猛发展,极大地促进了水稻、玉米、小麦等农作物遗传育种在分子水平上的发展,基于此荷兰科学家 Peleman 和 van der Voort 最早提出分子设计育种的概念^[15]。由于海带的总体研究基础较为薄弱,目前分子设计育种在海带遗传育种领域还仅仅停留在引入概念的阶段,实质性的工作还没有开展。但是,经济海藻遗传育种领域的一些科研工作者,已意识到分子设计育种将是海带遗传育种的重要发展方向,一些基础性工作已有报道,如 Liu 等^[38]利用 F₂ 代作为作图群体构建了中高密度的海带遗传图谱(标记密度为 6.7cM),定位到 3 个与叶长相关的 QTL,能解释海带叶片长度变异的 42.36%,表现为部分显性效应或加性效应;定位了 2 个与叶宽相关的 QTL,可以解释叶宽变异的 36.39%,表现出部分显性效应。另外,海带基因组和转录组测序工作也将展开。

3 海带分子育种研究方向和前景展望

分子育种将是海带现代遗传育种的主流方向,鉴于海带当前的总体研究现状,为推动海带分子育种的发展,必须做好以下五点工作:

3.1 研发海带分子育种的各项技术

在作物分子育种中,从种质资源到新基因发掘,再到品种培育及其产业化,是一个完整的链条。通过提高育种效率来高效培育突破性新品种并实现产业化的目标贯穿始终,各环节间实现无缝链接,形成了“基础研究、标记开发、基因克隆、遗传转化、品种培育、产品推广”的完整产业技术研发体系^[6]。为推动海带分子育种的发展,应该加快研发适用于海带研究的相关技术体系,如规模化开发成本低廉、可实现自动化操作的分子标记,推动海带分子标记由随机性、显性标记(如 RAPD、ISSR 和 AFLP 标记)向特异性、共显性和功能性标记(SSR、SNP 标记)转变;提高海带具有重要价值的功能基因(高产基因、抗逆基因等)的发掘能力;构建起稳定的载体系统和高效的转化体系,建立起有效的海带表达系统;开发用于设计育种模拟研究的统计模型和相关软件;探索和建立高效的良种推广和产业化技术。

3.2 保存和丰富海带种质资源和育种中间材料

种质资源(Germplasm resources)积累了由自然和人工引起的遗传变异,蕴藏着具有重要价值的基因,是进行新品种选育和发展农业生产的物质基础。海带种质资源的重要性已引起重视,并已建立起合适的种质保存技术且种质库初具规模,但是仅停留在种质收集、保存和评价的初级阶段,缺少高效构建核心种质及其有效评价的技术方法,下一步应构建海带核心种质,提高整个种质资源库的管理和利用水平,促进对种质资源中蕴藏的具有重要价值基因的发掘。另外,目前海带中虽有一些重组自交系,但是总体上还缺乏多种作图群体或育种中间材料,如近等位基因系、回交群体、高代回交系、导入系、染色体片段代换系等。这些群体是绘制遗传图谱和性状 QTL 定位和分析的前提,也是品种培育重要中间材料,下一步工作应该重视这些群体和育种中间材料的构建和保存工作。

3.3 发掘海带的性状连锁标记、QTL 和功能基因

我国已初步建立起了海带的种质资源库,但缺乏对种质资源的遗传多样性分析、表型和基因型鉴定,每份种质资源中所含的基因和等位基因变异尚不清楚,不同等位基因的频率、分布和效应更无从得知,这已成为开发标记、克隆基因和设计品种的瓶颈。尽管种质资源不能申请专利保护,但从中获得的基因、调控元件和标记可以具有知识产权。因此,世界各国尤其是发达国家的跨国公司利用其技术优势抢先注册知识产权,给自身的分子育种保驾护航。因此,海带分子育种也要加强海带的性状连锁标记、QTL 和功能基因的挖掘,应用大规模、高通量的基因鉴定技术,获得一批重要性状基因标记,快速克隆一批具有自主知识产权的功能基因,通过目的基因的转移、转化和聚合从而获得优良基因型组合的新品种。

3.4 深度解析海带重要经济性状的形成机制

海带很多经济性状都是数量性状,由微效多基因控制且易受环境影响,有着复杂的形成机制和遗传基础。为阐明海带复杂经济性状的遗传基础和生理、生化机制,用综合基因组学、转录组学、蛋白组

学、代谢组学和表型组学等的研究理论和方法,阐明性状基因/QTL 的座位、数量和效应,性状基因/QTL 之间的和基因/QTL 与环境之间的互作关系,建立重要经济性状的 GP(Genotype to phenotype)模型,解析性状形成的发育过程、信号调控途径和代谢网络,从系统生物学的角度、在不同层次上(分子、细胞、组织器官、个体甚至群体水平)上深度解析海带重要经济性状的形成机制,为分子设计和人工操作奠定基础。

3.5 推动分子育种与传统育种相结合

由于分子生物学的研究主要是在实验室进行,而育种研究主要的工作需要在室外完成,两方面研究人员由于受研究条件、原有知识的惯性导向和现有评价体系上存在的差别,容易导致两方面工作脱节。因此,下一步应创新分子育种的组织体系和实施机制,一方面倡导分子育种工作走出实验室,吸收和借用传统育种理论和技术,另一方面引导传统育种工作者借力分子育种的高效性和先进性,通过整合资源、优势互补,实现育种链上中下游的紧密结合,实现分子手段与常规育种的紧密结合。

总之,分子育种是在分子生物学和各种组学跨越式发展的时代背景下产生的,是一种崭新的遗传育种的理论和技术体系,将是海带遗传育种的发展方向。伴随着海带分子育种研究和实践的深入,并结合传统育种理论和方法,海带遗传育种必将出现跨越式发展,从而推动海带养殖及其相关产业的发展。

参考文献:

- [1] 刘增胜,柳正.中国渔业年鉴[M].北京:中国农业出版社,2010.
- [2] 方宗熙,蒋本禹,李家俊.海带柄长的遗传[J].植物学报,1962,10(4):327-335.
- [3] 方宗熙,蒋本禹,李家俊.海带叶片长度遗传的进一步研究[J].海洋与湖沼,1965,7(1):59-66.
- [4] 张景镛,方宗熙.海带叶片厚度遗传的初步研究[J].遗传学报,1980,7(3):257-262.
- [5] 王清印.海带几个经济性状遗传力和遗传相关的研究[J].山东海洋学院学报,1984,14(3):65-76.
- [6] 冯蕾,唐学玺,张培玉.海带育种育苗技术研究进展[J].科学技术与工程,2005,5(8):491-495.
- [7] 黎裕,王建康,邱丽娟,等.中国作物分子育种现状与发展前景[J].作物学报,2010,36(9):1425-1430.

- [8] Hospital F, Charcosset A. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 1997, 147: 1469-1485.
- [9] Xu Y, Crouch J H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice [J]. *Crop Science*, 2008, 48: 39-407.
- [10] Stuber C W, Polacco M, Senior M L. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential [J]. *Crop Science*, 1999, 39:571-1583.
- [11] Bernardo R. Molecular marker and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years [J]. *Crop Science*, 2008, 48:1649-1664.
- [12] Tanksley S D, Nelson J C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 191-203.
- [13] Heffner E L, Sorrells M E, Jannink J L. Genomic selection for crop improvement [J]. *Crop Science*, 2009, 49: 1-12.
- [14] 马忠强, 尹航. 转基因技术在作物育种中的应用 [J]. *现代化农业*, 2009, 363: 25-26.
- [15] Peleman J D, van der Voort J R. Breeding by design [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8: 330-334.
- [16] 顾铭洪, 刘巧泉. 作物分子设计育种及其发展前景分析 [J]. *扬州大学学报*, 2009, 30(1): 64-67.
- [17] 黎裕, 王建康, 邱丽娟, 等. 中国作物分子育种现状与发展前景 [J]. *作物学报*, 2010, 36(9): 1425-1430.
- [18] 夏鹏, 杨迎霞, 刘升平, 等. 海带“901”配子体 DNA 随机扩增反应条件的优化 [J]. *海洋科学*, 2003, 27(5): 22-26.
- [19] He Y J, Zou Y P, Wang X D, et al. Assessing the germplasm of *Laminaria* (Phaeophyceae) with random amplified polymorphic DNA(RAPD) method [J]. *Chinese Journal of Oceanology Limnology*, 2003, 21: 141-148.
- [20] 周志刚, 史西志, 胡远皆, 等. 中国海区不同养殖品系海带与长海带之间的遗传关系 [J]. *中国水产科学*, 2003, 10(6): 474-480.
- [21] Wang X L, Liu C L, Li X J, et al. Assessment of genetic diversities of selected *Laminaria* (Laminariales, Phaeophyta) gametophytes by Inter-Simple Sequence Repeat Analysis [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(6): 753-758.
- [22] Shi C J, Hu Z M, He Y J, et al. Identification and assessing the cultivars of *Laminaria* Lamx. (Phaeophyceae) with molecular markers [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(3): 283-291
- [23] 尚书, 石媛媛, 杨官品. 我国引种海带 (*Laminaria japonica*) 和长海带 (*L. longissima*) 配子体克隆随机扩增多态性 DNA 分析 [J]. *海洋湖沼通报*, 2007, 增刊: 142-146.
- [24] Li B J, Shi Y Y, Yang G P, et al. Microsatellite DNA variation of the gametophyte clones isolated from introduced *Laminaria japonica* (Phaeophyta) and *L. longissima* of China and varieties derived from them [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008a, 50 (3): 352-59.
- [25] 石媛媛, 杨官品, 廖梅杰, 等. 海带和长海带配子体无性繁殖系微卫星 DNA 多态性比较分析 [J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(1): 303-308.
- [26] 张全胜, 石媛媛, 丛义周, 等. 我国引种海带和栽培品种(系)来源配子体克隆的 AFLP 分析 [J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(3): 429-435.
- [27] Shan T F, Pang S J, Zhang Y R, et al. An AFLP-based survey of genetic diversity and relationships of major farmed cultivars and geographically isolated wild populations of *Saccharina japonica* (Phaeophyta) along the northwest coasts of the Pacific [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, DOI 10.1007/s10811-010-9530-x.
- [28] Bi Y H, Hu Y J, Zhou Z G. Genetic variation of *Laminaria japonica* (Phaeophyta) populations in China as revealed by RAPD markers [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30: 103-112.
- [29] 汪文俊, 王广策, 张宝玉, 等. 海带栽培品系和长海带 ITS 区的扩增及序列分析 [J]. *高技术通讯*, 2005, 15 (4): 95-101.
- [30] Wang X L, Yang Y X, Cong Y Z, et al. DNA fingerprinting of selected *Laminaria* (Phaeophyta) gametophytes by RAPD markers [J]. *Aquaculture*, 2004, 238: 143-153.

- [31] Zhang L S, Yang C G, Zhang Y, et al. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates [J]. *Genetica*, 2007, 131: 37-49.
- [32] Li X J, Yang G P, Shi Y Y, et al. Prediction of the heterosis of *Laminaria* hybrids with the genetic distance between their parental gametophyte clones [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008b, 20:1097-1102.
- [33] Li Y H, Yang Y X, Liu J D, et al. Genetic mapping of *Laminaria japonica* and *L. longissima* using amplified fragment length polymorphism markers in a “two-way pseudo-testcross” strategy [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49:392-400
- [34] Yang G P, Sun Y, Shin Y Y, et al. Construction and characterization of a tentative Amplified Fragment Length Polymorphism-Simple Sequence Repeat linkage map of *Laminaria* (Laminariales, Phaeophyta) [J]. *Journal of phycology*, 2009, 45:873-878.
- [35] Liu F L, Wang X L, Liu J D, et al. Genetic mapping of the *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta) using amplified fragment length polymorphism markers [J]. *Journal of Phycology*, 2008, 45:1288-1233.
- [36] Liu Y S, Li L H, Wu W K, et al. A SCAR molecular marker specifically related to the female gametophytes of *Saccharina (Laminaria) japonica* (Phaeophyta) [J]. *J Phycol*, 2009, 45:894-897
- [37] Liu F L, Yao J T, Wang X L, et al. Identification of SCAR marker linking to longer frond length of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) using bulked-segregant analysis [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, DOI: 10.1007/s10811 -010-9567-x.
- [38] Liu F L, Shao Z R, Zhang H N, et al. QTL Mapping for Frond Length and Width in *Laminaria japonica* Aresch (Laminariales, Phaeophyta) Using AFLP and SSR Markers [J]. *Marine Biotechnology*, 2010a, 12: 386-394.
- [39] Qin S, Jiang P, Tseng C K. Transforming kelp into a marine bioreactor [J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(5): 264-268.
- [40] Jiang P, Qin S, Tseng C K. Expression of hepatitis B surface antigen gene(HBsAg) in *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta) [J]. *Chinese Science Bulletin*. 2002, 47: 1438-1440.
- [41] 武建秋, 王希华, 秦松, 等. 海带基因工程选择标记的研究[J]. *海洋科学*, 1995, 19(5): 42-44.
- [42] 秦松, 王希华, 曾呈奎. 藻类的遗传转化[C]//植物遗传转化技术. 中国科学技术出版社,1994:79-82 .
- [43] Qin S, Jiang P, Li X P, et al. A transformation model for *Laminaria japonica*(Phaeophyta, Laminariales) [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1998, 16 (Suppl.): 50-55.
- [44] Jiang P, Qin S, Tseng C K. Expression of the lacZ reporter gene in sporophytes of the seaweed *Laminaria japonica* (Phaeophyceae)by gametophyte-targeted transformation [J]. *Plant Cell Report*, 2003, 12:1211-1216.
- [45] 秦松, 严小军, 曾呈奎. 藻类分子生物技术两年评: 基因工程及其上游—分子遗传学[J] . *海洋与湖沼*, 1996, 27: 103-111.

(本文编辑: 张培新)