

ZHONGGUO CAO XUE HUI MU CAO YU ZHONG WEI YUAN HUI

DI QI JIE DA BIAO DA HUI

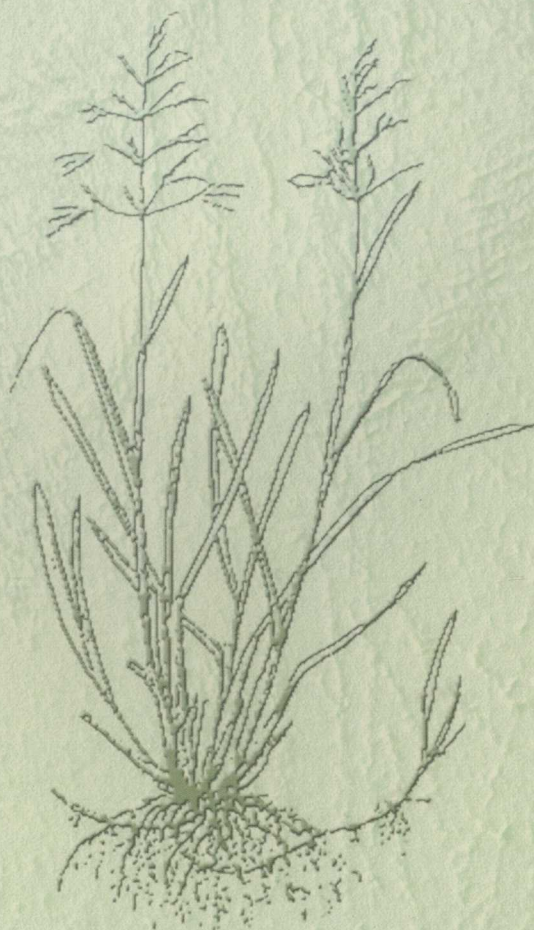
LUN WEN JI

(2009年9月)

中国草学会牧草育种委员会第七届代表大会

论文集

中国草学会牧草育种委员会 编



云南出版集团公司
云南科技出版社

中国草学会牧草育种委员会
第七届代表大会

论文集

中国草学会牧草育种委员会 编

云南出版集团公司

云南科技出版社

·昆明·

图书在版编目 (C I P) 数据

中国草学会牧草育种委员会第七届代表大会论文集/
编委会编. —昆明: 云南科技出版社, 2009. 8
ISBN 978 - 7 - 5416 - 3367 - 6

I. 中… II. 中… III. 牧草—育种方法—文集 IV.
S540.41

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 142757 号

云南出版集团公司

云南科技出版社出版发行

(昆明市环城西路 609 号云南新闻出版大楼 邮政编码:650034)

昆明理工大学印务包装有限公司印刷 全国新华书店经销

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 27.75 字数: 700 千字

2009 年 9 月第 1 版 2009 年 9 月第 1 次印刷

印数: 1 ~ 1000 册 定价: 70.00 元

编写委员会

主 任：云锦凤 张泽军

副主任：黄必志 曹致中 李 聪 米福贵 卢小良 顾洪如

委 员：（以姓氏笔画为序）

马兴跃 王跃东 石凤翎 毕玉芬 匡崇义 杨国荣
段 纲 段新慧 钟 声 袁希平 徐祖林 薛世明

主 编：黄必志 毕玉芬

副主编：薛世明 姜 华 马向丽

编 委：钟 声 匡崇义 段新慧 赵 雁 罗富成 陈 功

序

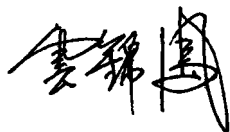
当今世界在“可持续发展”思想指导下，实现经济、社会和环境的协调发展已成为世界各国所共同追求的目标。随着我国市场经济的快速发展，草业在国家经济建设和可持续发展中的作用已引起全社会的广泛关注，也得到了国家和各级地方政府的高度重视。“立草为业”的观念正逐步得到社会的广泛认识，社会对草品种的需求也发生了重大变化。不仅对草品种的数量需求日益增多，而且对草品种的要求越来越高，需求草品种的范围也越来越广。传统畜牧业的改造和现代集约化畜牧业体系的建立，需要更多适应不同生态条件和不同饲养需要的优质饲用草品种，如刈用型、放牧型草品种等；生态建设中的植被恢复、水土保持、防风固沙等需要适于不同生态条件和具有不同生态功能的生态草品种；环境整治与城乡绿化中需要多样化的地面覆盖和美化观赏草品种，如各类草坪草品种和护坡草品种；建立“粮、经、料（草）”三元种植结构急需适于不同种植条件下草田轮作和饲料轮作的饲草料品种；我国奶业迅猛发展，奶牛养殖业规模急剧扩大，迫切需要适于奶牛饲养的高标准牧草、青贮和多汁青饲料品种；水产养殖和快速发展的多样化经济动物养殖业需求各类专用饲草饲料品种等等。因此，牧草育种工作是我国草业发展的重要基础，与国家的经济建设和可持续发展密切相关，培育草品种的数量和质量已成为我国草业科学研究和产业发展水平的重要标志。

自1979年中国草学会成立以来，全国牧草育种科技工作者团结协作，经过30年的艰苦创业和不懈奋斗，我国牧草育种工作取得了可喜的成绩，登记品种的数量大幅增加，育种技术水平也不断提高。在运用现代生物技术和传统育种技术相结合，开展牧草育种技术创新方面的研究和探索取得了突破性进展，这标志着我国牧草育种研究已开始进入一个新的技术创新阶段。传统育种已取得了辉煌的成绩，新技术育种正在展现出无穷的魅力，两者的有机结合无疑将会创造新的奇迹，展现出我国牧草育种发展的美好前景。

学术交流是自主创新的源头之一，营造良好的学术交流氛围，提高学术交流的质量是推动牧草育种科技创新不可忽视的重要手段。为了推动我国牧草育种技术的创新研究和成果应用，促进全国牧草育种科技工作者之间的学

术交流,提高牧草育种的科研水平,第七届中国草学会牧草育种委员会于2009年9月,在云南省昆明市召开了中国草学会牧草育种委员会会员代表大会暨第九次学术研讨会。本次会议的主题是“牧草种质资源、育种与草业发展”,与会代表在牧草种质资源、草品种选育、生物技术、生物多样性、种子生产等多方面进行了研讨和交流。会议收到相关论文56篇,论文摘要10篇。经过组委会和有关专家评审,编辑出版了本书,旨在加强广大牧草育种工作者的学术交流,展示国内牧草育种领域近年来的最新研究成果,创造有利于增强创新意识、孕育创新思想、提高创新能力和激发创新欲望的学术环境。期望国内牧草育种科技工作者能够从中得到启发和借鉴,团结协作,共同携手推进我国牧草育种的科技创新和快速发展!

中 国 草 学 会 理 事 长
中国草学会牧草育种委员会 主任委员



2009年9月19日于昆明

前 言

优良的草品种是发展草业的物质基础。选育优良的草品种、探索育种理论和技术、加速优良草品种的推广和应用,对于促进我国现代化畜牧业发展,改善生态环境,提高人民的生活水平和加快社会主义新农村建设等方面具有重要意义。

自中国草学会成立以来,我国牧草和草坪草育种工作发展较快。截止2009年,我国共审定登记草品种388个,其中育成品种144个。这些草品种在我国畜牧业生产、生态环境建设和保护等方面发挥了极大的作用,但与生产发展需要还相距甚远。为了促进牧草和草坪草育种工作的开展,加强育种理论和技术研究成果的交流,中国草学会牧草育种委员会于2009年9月在昆明召开了“中国草学会牧草育种委员会第七届会员代表大会暨学术研讨会”。全国牧草育种工作者、草业生产与科研人员、专家学者代表参加了会议。会前,代表们以科学发展观为指导,结合实际,认真撰写并提交论文,其中不乏真知灼见。为了更好地促进学术交流,展现中国草学会牧草育种委员会会员的劳动成果,经中国草学会牧草育种委员会同意,将这些论文汇编成本书,公开出版。

本书编辑了学术论文56篇,论文摘要10篇,涉及牧草种质资源、草品种选育、生物技术、生物多样性、种子生产等多方面内容,具有一定的理论水平和实用价值,可以为科研、教学和生产单位的草业工作者了解草品种育种现状和发展趋势提供一定的参考;也可有关部门制定草业发展规划与产业发展战略提供理论和技术依据,期望国内牧草育种科技工作者能够从中得到启发和借鉴。

本书的出版,得到了中国草学会牧草育种委员会、云南草地动物科学研究院、云南农业大学、云南省草山饲料工作站、云南绿盛美地科技实业有限公司和云南生态技术有限公司等单位的重视和支持。在稿件编辑和整理过程中,云南农业大学动物科学技术学院草业科学系和云南草地动物科学研究院做了文稿修订工作,在此一并表示衷心的感谢。

由于时间紧迫,在论文筛选、文字加工等方面难免有疏漏和欠妥之处,敬请读者批评指正。

中国草学会牧草育种委员会
第九次学术研讨会 组委会
2009年9月

目 录

荧光原位杂交技术及其在植物染色体基因定位中的应用

..... 石凤敏,云锦凤,赵 彦(1)

欧洲牧草、草坪草与饲料作物遗传育种研究进展 米福贵(6)

苜蓿杂交育种研究进展 于洪柱,王志锋,金春花,徐安凯(11)

ISSR 分子标记及其在牧草研究中的应用 魏小兰,张蕴薇(16)

牧草叶蛋白的利用及研究进展..... 沈紫薇,张蕴薇,陈本建(22)

牧草空间诱变研究进展 任卫波,王 蜜,陈立波,徐 柱(27)

蒙古冰草 LEA3 基因 RNAi 植物表达载体的构建

..... 赵 彦,云锦凤,石凤敏,刘亚玲,王俊杰,张 众(33)

青藏高原老芒麦种质基于 SRAP 标记的遗传多样性研究

..... 鄢家俊,白史且,张昌兵,游明鸿,李达旭,张新全(40)

NaCl 对高羊茅萌发的胁迫效应研究 沈 艳,兰 剑,谢应忠(54)

聚乙二醇 6000 对高羊茅萌发胁迫效应的研究 兰 剑,沈 艳,谢应忠(62)

凉山圆根结实性状的相关通径分析

..... 王同军,傅 平,教学成,周 潇,卢寰宗(69)

不同激素配比对草地早熟禾愈伤组织形成的影响

..... 张文君,杨春华,刘 帆,陈灵莺,刘志波(75)

鸭茅资源遗传多样性的 SSR 分析 谢文刚,张新全,马 啸,彭 燕,陈永霞(81)

西南区扁牛鞭草遗传多样性 RAPD 分析 陈永霞,张新全,马 啸,谢文刚(93)

6 个决明牧草辐射变异后代的品比试验..... 郑向丽,徐国忠,叶花兰(100)

干旱胁迫下 12 份扁穗牛鞭草叶绿素含量和原生质膜相对透性比较研究

..... 曾 兵,张新全,兰 英,李林祥(109)

杂交狼尾草母本柱头可授性和父本花粉活力研究 穆少杰,钟小仙,顾洪如(120)

高粱与苏丹草远缘杂交 F_1 的生物学性状遗传分析

..... 赵海明,李 源,谢 楠,刘贵波(127)

航天不育材料高丹草扦插繁殖方法研究 朱永群,杜周和,左艳春,陈永霞(135)

15 个紫花苜蓿品种抗旱性评价 刘 卓,王志锋,耿 慧,于洪柱,徐安凯(142)

象草不同品种木质素含量的动态变化研究 赵燕慧,解新明(149)

热带豆科牧草 15 个品质组成因子的相关性研究

..... 潘伟彬,陈志彤,陈 恩,黄毅斌,翁伯奇,郑金贵(159)

- 草地早熟禾不同品种的耐盐性研究 赵黎明, 李克途, 罗富成(166)
- 狼尾草属牧草 rDNA 的 ITS 序列分析 陈志彤, 黄勤楼, 潘伟彬, 黄毅斌(174)
- 紫花苜蓿品种浸提液对受体牧草种子发芽的影响 海 棠, 贾鲜艳, 张晓峰(181)
- 干旱对假俭草生理特性的影响 任 健, 代微然, 毕玉芬, 朱映安(188)
- 几个饲用燕麦(*Avena sativa* L.)品种比较试验研究
..... 刘 刚, 李达旭, 朱永群, 游明鸿, 樊利兵, 白史且(198)
- 高州普通野生稻饲料营养含量的 QTL 定位
..... 范传广, 张向前, 张建国, 刘向东, 卢永根(203)
- 四龄和五龄紫花苜蓿种植地土壤全氮的分布规律
..... 魏 微, 毕玉芬, 周 璐(210)
- 农杆菌介导的 γ -zein 基因导入菊苣的研究
..... 张 玉, 李 聪, 白史且, 关 宁, 王涌鑫, 张文娟(215)
- 小哨鸭茅与宝兴鸭茅生物特性比较研究
..... 黄梅芬, 钟 声, 余 梅, 段新惠, 戴聪莉, 王红仙, 徐 驰(223)
- 紫花苜蓿幼苗抗旱性的模糊隶属函数及系统聚类分析
..... 张鸭关, 吴丽芳, 刘六艳, 薛世明, 匡崇义(228)
- 杜尔伯特扁穗冰草生产性能试验研究
..... 李 红, 罗新义, 杨伟光, 高海娟, 黄新育(238)
- 亚热带高湿地区柱花草品种比较试验 罗富成, 毕玉芬, 王玉梅, 周冬梅(245)
- 紫花苜蓿(*Medicago sativa* Linn.)不同品种的抗旱性研究
..... 吴 昊, 赵 玲, 袁中华, 罗富成(253)
- 用电导法配合 Logistic 方程鉴定 4 个紫花苜蓿品种的抗寒性
..... 张文娟, 邓 波, 陈本建, 张蕴薇(261)
- 赤霉素和聚乙二醇对非洲狗尾草种子萌发的效应
..... 马向丽, 毕玉芬, 刘 倩, 樊 梅(266)
- 披碱草与野大麦杂交种 BC₁F₂ 代同工酶分析 李造哲, 马青枝(273)
- 行距对蒙农红豆草种子产量及产量构成因子的影响 张银敏, 李 聪, 苗丽宏(281)
- 决明属牧草辐射诱变育种研究 徐国忠, 郑向丽, 叶花兰, 詹 杰, 翁伯琦(287)
- 紫花苜蓿杂种后代的同工酶分析 周俊伊, 毕玉芬, 张凤仙(293)
- 扁穗雀麦(*Bromus cartharticus* Vahl)种子萌发吸水特性和萌发温度的研究
..... 田 宏, 刘 洋, 张鹤山, 李晓峰, 陈明新(306)
- 威宁芜菁甘蓝区域试验报告 熊先勤, 李富祥, 刘龙邦(314)
- 紫花苜蓿光合特性遗传变异的研究 姜 华, 毕玉芬(324)
- 波特鸭茅的引种试验报告 钟 声, 段新慧, 匡崇义, 薛世明, 黄必志(329)
- 体细胞突变体筛选法获得象草耐盐植株 钟小仙, 余建明, 蔡小宁, 张建丽(335)

不同贮藏时间对串叶松香草种子活力特性的影响

..... 伏兵哲,米福贵,刘瑞芳,包 娜(342)

云南画眉草属植物种质资源的研究

尹 俊,蒋 龙(348)

驼绒藜灌溉施肥试验研究与探讨

..... 付爱良,杨 刚,郑晓红,张荟荟,沙吾列·沙比汗(357)

大兴安岭野生三叶草生态生物学特性研究

..... 王俊杰,刘红梅,高雪芹,吕世杰,云锦凤,朝克图(363)

蒙农4号新麦草幼苗耐盐生理特性研究

王 勇,徐春波,王 华(371)

公农1号苜蓿组培再生体系的建立和优化

徐春波,王 勇,李兴酉,赵海霞(380)

几种野豌豆属牧草抗旱性鉴定

..... 段新慧,李鸿雁,师文贵,李乔仙,邓海琼,李志勇(388)

秋水仙素诱导直立型扁蓿豆多倍体的研究

李 洁,石凤翎,卞晓燕,高翠萍(398)

几丁质酶与苜蓿抗病性研究

张文娟,李 聪,王步云(405)

植物蛋白质育种研究进展

..... 范润钧,邓 波,陈本建,柴小琴(412)

假俭草种质遗传多样性研究和遗传图谱构建与 QTL 定位 ...

郑轶琦,刘建秀,王秀娥(419)

The Construction of Genetic Linkage Map and QTL Analysis in Centipedegrass

..... ZHENG Yi - qi et al(421)

黄花苜蓿 MfPRP 基因的克隆、表达特性及功能研究

谭嘉力,郭振飞(423)

利用 454 测序技术大规模挖掘羊草抗逆转录因子的研究

李晓峰,刘公社(424)

几个黄花苜蓿耐寒相关基因的功能验证

郭振飞(425)

刈割诱导水稻幼苗早期响应基因和途径

刘公社,陈双燕(427)

假俭草抗冷生理机制

陈晶晶,卢少云,郭振飞(428)

苜蓿雄性不育材料的新成员——MS - GN

于洪柱,王志锋,金春花,徐安凯(429)

国内外苜蓿品种主要性状的分析研究

..... 耿 慧,徐安凯,刘 卓,金春花,庞建国,王志锋(430)

内蒙古草产业发展及新技术应用

赵景峰(431)

我国草业航天育种研究进展及应用前景

左艳春,杜周和,朱永群(432)

荧光原位杂交技术及其在植物染色体 基因定位中的应用*

石凤敏¹, 云锦凤^{1**}, 赵彦^{1,2}

(1. 内蒙古农业大学生态环境学院, 内蒙古呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古呼和浩特 010031)

摘 要: 荧光原位杂交技术 (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH) 是 20 世纪 80 年代末由放射性原位杂交发展起来的一种非放射性原位杂交技术。FISH 综合应用细胞遗传学和分子生物学的原理, 成为连接两者的重要桥梁, 目前已广泛应用于植物研究的各个方面。本文就 FISH 的基本原理与方法及其在植物染色体基因定位中的应用进行了综述。

关键词: 荧光原位杂交; 染色体; 基因定位

Fluorescence in Situ Hybridization and Application to Chromosomal Location of Plant genes

SHI Feng - min¹, YUN Jin - feng¹, ZHAO Yan^{1,2}

(1. College of Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a non - radioactive in situ hybridization which was developed from radioactive in situ hybridization in the 80' s at the end of the 20th century. FISH applied the principles of cytogenetics and molecular biology synthetically?? and it has been the bridge which connected cytogenetics and molecular biology. It has been widely adopted in all the respects of plant research. The paper summarizes the basic principles and methods, and applications of FISH in chromosomal location of plant genes.

Key words: FISH; chromosome; gene location

1969 年 Gall 和 Pardue^[1]利用放射性同位素标记的 RNA 探针成功地定位细胞制片上非洲爪蟾细胞核内的靶 DNA 序列。同年, Pardue 等又以小鼠卫星 DNA 为模板, 利用体外合成的含 3H 的 RNA 为探针成功地与中期染色体标本进行原位杂交, 开创了 RNA - DNA 的原位杂交技术, 但同位素探针有高背景缺陷, 不能够对靶序列进行精确定位。1974 年, Evans 首次将染色体显带技术和原位杂交技术联合应用, 使基因定位的准确性大大提高。1977 年 Rudkin^[2]等发明了用间接免疫荧光法检测目的 DNA 的非同位素原位杂交技术

* 基金项目: 973 项目子课题 (2007CB108901 - 1)、国家自然科学基金资助项目 (30760159)。

作者简介: 石凤敏 (1983 ~), 女, 河北省承德市人, 在读博士生, 主要从事牧草分子遗传学研究。

** 通讯作者: 云锦凤 (1941 ~), 女, 内蒙古呼和浩特市人, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草遗传育种研究。

Author for correspondence (E - mail: csgrass@vip. 163. com) .

(non-isotopic in situ hybridization, NISH)。1982 年 Langer^[3] 等首次采用生物素标记的核苷酸探针成功地进行了染色体原位杂交。在此基础上, 非放射性原位杂交技术即以荧光标记探针进行基因原位杂交的技术日趋成熟, 20 多年来随着标记手段、检测试剂及荧光观察等技术的发展, 荧光原位杂交技术已经日臻完善, 并在植物基因定位中得到广泛的应用。

1 FISH 技术的基本原理和方法

荧光原位杂交技术的基本原理是经过将 DNA 或 RNA 探针用荧光染料 (生物素、地高辛、荧光素等) 特殊修饰的核苷酸分子标记。一个探针本身是具有特定序列的 DNA 或 RNA 片段, 当靶 DNA 分子中有与其互补的序列时, 将会在适当的条件下进行杂交, 因此, 探针根据 DNA-DNA 和 DNA-RNA 碱基互补配对原则, 与固定在玻片上的染色体靶序列杂交; 再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异结合, 在荧光显微镜下直接观察抗体-探针分子结合体在染色体或者 DNA 纤维切片上呈现的荧光杂交信号, 从而实现目标序列的定性分析与定位分析。与传统的放射性同位素标记相比, FISH 具有非放射性、实验周期短、探针稳定性高、背景清晰、同一细胞制片上定位不同基因和检测灵敏度高等优点。

1.1 探针标记和染色体制备

染色体制备是 FISH 中非常关键的一步。FISH 研究的靶染色体相主要包括有丝分裂早中期和中期染色体、间期细胞核、减数分裂粗线期染色体和 DNA 纤维^[4] 等。这些模板上的 DNA 包装程度不同, 因而 FISH 的检测灵敏度和空间分辨力有很大的差异^[5], 对染色体的制备要求就不同。如在有丝分裂中期相的 FISH 中, 杂交的效率取决于探针与染色体的靠近程度, 因此必须获得大量背景清晰、染色体分散且形态较好的中期分裂相。在减数分裂前期相的研究中, 需要采用一些技术手段如纤维素酶酶解细胞壁等来促进染色体的扩展, 使其容易识别。

1.2 探针标记

荧光原位杂交探针的类型多样, 为适应不同研究的需要, 探针大致可以分为基因组探针、染色体特异重复探针、染色体文库探针、单一序列探针、RNA 探针、人工合成的寡核苷酸探针等^[6,7]。探针的标记方法主要有两种: 一种是间接荧光标记, 即先用中间分子 (如地高辛配基、生物素、二硝基苯酚、硫化基团等) 标记探针, 杂交后用与荧光分子偶联的亲合物或抗体进行检测的方法。其中, 生物素和地高辛配基是最常用的。另一种是直接荧光标记, 即将荧光分子直接标记于 DNA 或 RNA 探针上, 杂交后直接在荧光显微镜下检测。用于直接荧光标记的常用荧光素有异硫氰酸荧光素、羟基香豆素、罗丹宁等。直接标记的探针经简单的冲洗即可镜检, 可以大大地节省时间。但是其杂交信号较弱, 且不能像间接标记那样进一步放大, 因而灵敏度低于间接标记的探针^[8,9]。但靶较大时 (数百 kb), 还是较可靠, 且探针标记种数不受高亲和力配基能力限制。

具体的探针标记方法主要有缺口平移、随机引物、体外转录和 PCR 扩增^[10] 等方法。使用缺口平移和随机引物法一般能够得到合适的探针 (300bp 左右), 用随机引物法标记

的 DNA 探针或 cDNA 探针的活性显著高于缺口平移法。

1.3 探针与靶序列的变性和杂交

通过加热或碱变性法使双链的探针和靶序列经变性为单链的 DNA，变性的温度和时间随探针和组织类型的不同而变化，变性后的探针加于变性的染色体分裂相标本上，于 37℃、50% 的甲酰胺 2 × SSC 条件下进行杂交。探针和靶序列的杂交最佳杂交条件取决于探针和目标的性质。例如单拷贝基因的杂交，尤其是较长的来自基因组的序列，应该在杂交前进行预复性，使探针中非特异的重复序列被封闭，从而抑制非特异性杂交。

1.4 荧光杂交信号的检测

检测方法包括直接荧光法和间接免疫荧光法。如果用荧光染料直接标记探针，可用直接荧光法进行检测（一般采用荧光标记的卵白素检测）；若用半抗原标记探针，则可通过间接免疫荧光法即荧光标记的相应抗体进行检测，如生物素可用与之强烈结合的抗生素蛋白检测。

2 FISH 技术在植物染色体基因定位中的应用

20 多年来，植物荧光原位杂交技术不断发展，已经在植物细胞学、植物分子细胞遗传学和植物分子生物学等领域研究中占据非常重要的位置。荧光原位杂交技术能够很好地进行基因的染色体定位^[11,12]，它可以直接确定 DNA 分子在染色体上的位置、将单拷贝的 DNA 片段定位到中期染色体的特定带上、直接定位一个特点基因的物理位置等等，这些都为在分子水平上进一步分析提供参考点。

2.1 构建 DNA 物理图谱

应用常规的分子生物技术构建 DNA 分子图谱时，其准确性和分辨率受到染色体减数分裂时 DNA 重组率不均匀因素的影响而发生误差^[13]。而 FISH 技术在构建 DNA 分子图谱时，具有非常高的分辨率^[14]，能快速准确地得到探针序列之间的顺序、方向及真实的物理距离，因而被广泛地应用于 DNA 物理图谱的构建。

2.2 FISH 技术与其他技术的结合应用促进基因定位

目前，荧光原位杂交技术在染色体识别，基因定位，基因重排，染色体易位，亲缘关系以及遗传图谱的建立方面应用较为广泛，其中以基因定位应用最为广泛。FISH 技术与其他技术的结合应用促进了植物染色体基因定位的发展。染色体显带技术与荧光原位杂交技术相结合，即在同一玻片上显带以后再进行荧光原位杂交。这一技术既能确定特定的染色体，又能确定探针所杂交的具体位点，可以更加精确地定位目的基因^[15,16]。染色体分带荧光原位杂交技术对控制农艺性状的基因进行细胞学遗传分析，从而为克隆这些优质基因，应用于植物遗传育种，培育出更多的对人类有益的品种打下坚实的理论应用基础^[17]。Hanson 等（1995）和 Gomez 等（1997）利用 BAC - FISH 和 YAC - FISH 技术成功地将不同低拷贝基因的 BAC 克隆分别定位在棉花和高粱的染色体上。Cuadrado 等（1996）采用

C 显带原位杂交技术,成功地鉴定小麦中黑麦基因的遗传渗透^[18]。Abbo 等(1993)以克隆的小麦 rDNA 为引物,用 PRINS 技术标记和检测到黑麦染色体上的核仁组织区(NOR)^[19]。Uchiuni 等(1998)将原位 PCR 技术与荧光显色系统结合,成功地在菜豆属植物中进行了豆红蛋白基因的定位研究^[18]。

2.3 鉴定转基因植物中外源基因的整合情况

目前,将外源基因转入植物基因组成为创造新品种的常用方法。研究表明转移基因的表达和整合位点有关,整合位点不同,基因的表达有明显差异。转移基因的整合还可能会引起插入突变,产生明显的表型效应^[20,21]。检测转基因的整合位点,对于深入研究转基因的作用及成果是至关重要的。对转基因植株中期染色体的 FISH 分析可以确定外源基因是否整合、整合为点以及对其进行精确的染色体物理定位^[22,23]。Kenton 等将双粒病毒的 DNA 序列定位于烟草 T 基因组一个小染色体上,第一次观察到病毒 DNA 序列整合到植物基因组。另外, FISH 分析可以较简便地鉴别转基因植株是杂合子还是纯合子^[24,25]。

3 结束语

荧光原位杂交(FISH)技术的产生与发展在植物细胞遗传学以植物分子生物学研究方面做出了很大贡献,是现代生物技术的重要组成部分。随着染色体制片技术的不断改进和分子生物学技术的迅速发展,荧光原位杂交技术将得到不断得到改进和完善,新型的荧光原位杂交技术不断涌现,灵敏度和分辨率也将不断的提高,在植物染色体基因定位研究中的应用将更加广泛和深入。此外, FISH 技术与染色体分带技术、RFLP、RAPD、PCR 等其他分子生物技术结合使用,在提高实验的客观性和可信度的同时,也加速植物 DNA 物理图谱的构建和重要功能基因的分离克隆及其定位的进程,为植物的遗传改良提供更为坚实的基础。

参考文献

- 1 Gall JC, Pardue ML. Formation and detection of RNA - DNA hybrid molecules in cytological Preparation [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1969, 63: 378 ~ 383
- 2 Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA - RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence [J]. Nature. 1977, 265: 472 ~ 473
- 3 Langer - Safer, PR Levine M., Ward DC. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1982, 79: 4381 ~ 4385
- 4 钟筱波, Paul F Fransz, 等. 在植物粗线期染色体和 DNA 纤维上的荧光原位杂交技术 [J]. 遗传学报, 1998, 25 (2): 142 ~ 149
- 5 de Jong J H, Fransz P F, Zabel P. High resolution FISH in plants - techniques and applications [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4: 258 ~ 263
- 6 李旋, 忽伟军, 李常宝. 基因组原位杂交中探针长度的优化 [J]. 中国民族大学学报(自然科学版), 2002, 11 (1): 63 ~ 66
- 7 余利岩, 徐平, 姚天爵. 新型 Actinobacteria 荧光原位杂交(FISH)探针的设计和应用 [J]. 中国抗

- 生素杂志, 2002, 25 (6): 401~406
- 8 聂谷华, 廖亮, 向其柏, 等. 荧光原位杂交技术及其在植物研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2006, 26 (12): 2596~2601
 - 9 耿波, 梁利群, 孙效文. 荧光原位杂交概述 [J]. 水产学杂志, 2004, 17 (2): 89~92
 - 10 Schw arzacher T, Heslop - Harrison, J S. In situ hybridization [M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 27~50
 - 11 陈乐真, 张杰. 荧光原位杂交技术及其应用 [J]. 细胞生物学杂志, 1999, 21 (4): 177~180
 - 12 任南, 宋运淳. 玉米 (*Zea mays*) *cdc2* 和 *prh1* 基因的染色体原位杂交物理定位 [J]. 遗传学报, 1998, 25 (3): 271~277
 - 13 杨易, 钟金城. 原位杂交技术及其在动物遗传育种中的应用 [J]. 西南民族学院学报, 2002, 28 (2): 219~222, 238
 - 14 史娟. 染色体原位杂交的发展及其应用 [J]. 作物品种资源, 1999 (1): 232~234
 - 15 Nelson D L, Ledbetter S A, Corbo L et al. Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human specific sequence from complex DNA sources [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989 (86): 6686~6690
 - 16 吴刚, 崔海瑞, 夏英武. 原位杂交技术在植物遗传育种上的应用 [J]. 植物学通报, 1999, 16 (6): 625~630
 - 17 赵丽娟, 李集临. 植物染色体 C-分带和原位杂交的研究应用 [J]. 哈尔滨师范大学学报 (自然科学版), 2004, 20 (5): 86~88
 - 18 吴建国, 朱志玉, 石春海, 樊龙江. 植物染色体原位杂交技术发展现状 [J]. 遗传, 2001, 23 (1): 77~80
 - 19 周琳, 古红梅. 植物染色体原位杂交研究进展 [J]. 2000, 17 (5): 46~50
 - 20 Palmiter R D. Transmission Distortion and Mosaicism in an Unusual Transgenic Mouse Pedigree Cell, 1984, 36: 869~877
 - 21 Wagner EF. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line. Cell, 1983, 35: 647~655
 - 22 TenHooen R, Robbins T P, Fransz P F, Montijn B M, OudO, GeratsAGM, et al. Localization of T-DNA insertions in *Pe - tunia* by fluorescence in situ hybridization: physical evidence for suppression of recombination [J]. PlantCell, 1996, 8: 823~830
 - 23 Pedersen C, Zimny J, Becker D. Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization [J]. TheorApplGenet, 1997, 94: 749~757
 - 24 Choi HW, Lemaux PG, Cho M J. Use of fluorescence gene insertion that we detected following more detailed in situ hybridization for gross mapping of transgenes and screening for homozygous plants in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 106: 92~100
 - 25 Barro F, MartínA, CabreraA. Transgene integration and chromosome alterations in two transgenic lines of tritordeum [J]. ChromosomeRes, 2003, 11: 565~572

欧洲牧草、草坪草与饲料作物遗传育种研究进展*

米福贵

(内蒙古农业大学生态环境学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘 要: 本文主要依据欧洲牧草与饲料作物育种学会学术研讨会的大会报告、Poster、会议相关资料及会下交流等素材, 对欧洲地区近年来在牧草、草坪草和饲料作物遗传育种研究领域所做的一些工作及取得的成果进行了概要性的总结, 其中涉及材料、方法等问题, 同时也简要地介绍了研究的热点及发展趋势。

关键词: 牧草; 草坪草; 遗传育种; 欧洲

Advances in Genetic and Breeding Research of European Forage and Turfgrass

MI Fu - gui

(College of Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: This article mainly basis on the academic seminar's report of European forage and the grass crops breeding academic society, Poster, seminar relative materials and the exchanging source material after meeting. It was outline summary the works and achievements which to the European area in recent years on the forage grass, the lawn grass and the grass crops heredity breeding research areas in this article, which involves the material, method, and so on, simultaneously, also briefly introduced the hot research area and the tendency of development.

Keywords: forage; turf grass; genetic and breeding; European

2009年5月10~14日, 欧洲植物育种研究学会(European Association for Research on Plant Breeding)牧草与饲料作物育种学组在法国海滨城市拉罗舍尔(La Rochelle)举行了第18届会员大会暨学术研讨会, 会议主题为“饲料作物、牧草、草坪草育种材料遗传多样性的可持续利用”。除俄罗斯之外, 各会员国的近百位代表与会, 中、美、日、澳、新、加及少数非洲国家的10余名代表应邀出席了本次会议。会议收到近百篇论文, 议程分为种质资源、草地牧草及草坪草种群遗传变异、农艺性状改良的遗传学进展、分子生物学及生物技术 in 育种中的应用、适宜利用遗传变异的品种类型和结构等5个专题进行。约60多位代表做了大会报告, 其中包括8个特邀报告。诸如牧草和草坪草种质资源收集及就地或异地保护的技术措施与现状、种间变异与遗传的关系、牧草和草坪草农艺性状改良

* 基金项目: 国家科技支撑项目“牧草远缘杂交育种技术研究”(2008BADB3B00)资助。

作者简介: 米富贵(1959-), 男, 内蒙古人, 博士, 教授, 主要从事牧草育种工作。

的遗传学进展、欧洲采用的 DUS 和 VCU 评价方案的历史回顾、牧草和草坪草分子标记辅助育种、目标基因及其连锁群等位基因多样性研究等综合性特邀报告都较为详细地介绍或总结了欧洲各国近年来在牧草、饲料作物和草坪草研究方面所取得的进展、成就及面临的问题，受到了与会代表的一致好评。

根据会议交流与讨论的情况来看，可以总结出如下几个特点：

1 研究材料相对集中

在育种材料的选择上，欧洲各国研究的重点还主要集中在苜蓿、羊茅、黑麦草、三叶草等几个少数属中，其中作为牧草研究最多的是紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 与多花黑麦草 (*Lolium multiflorum*)，几乎从南到北，由东到西的欧洲各国都有这两个草种的研究文章。究其原因，一是在于两种牧草种植范围较广，特别是多花黑麦草几乎广布于欧洲大陆。与欧洲之外的其他大陆不同，除俄罗斯之外的整个欧洲国土面积较小，天然草地面积有限，草地畜牧业只能走高效集约化发展之路，草地类型也以临时草地和永久草地为主。而紫花苜蓿和多花黑麦草则是建植高产优质高效临时草地和永久草地的适宜草种，一直被欧洲各国所重视。二是这两种牧草高产优质，具有优良的农艺价值，符合欧洲国家集约化生产的标准和需要。因此在这一地区将这两种牧草作为育种材料进行遗传改良研究以培育更适于生产需求的优良品种的尝试是不难被理解的。

欧洲地区栽培利用的其他一些牧草还有高羊茅 (*Festuca arundinacea*)、草地羊茅 (*F. pratensis*)、白三叶 (*Trifolium repens*)、鸭茅 (*Dactylis glomerata*)、无芒雀麦 (*Bromus inermis*) 等，但其研究的层面及深度远不及上述两种牧草。在欧洲多年生黑麦草 (*L. perenne*) 是一种利用和研究地位较为特殊的牧草，它可以被作为牧草与三叶草混播建植临时性人工草地，但其主要的用途还在于各种优质草坪的建植，因此在遗传育种改良研究中人们对该种牧草给予了较多的关注与重视。草地早熟禾 (*Poa pratensis*)、紫羊茅 (*F. rubra*) 等亦是欧洲各国建植不同类型草坪常用的草种，但种子大多由其他地区引入，育种的研究并不多。

2 技术手段较为先进

在育种方法的研究与应用方面，常规育种技术手段几乎很少被人们谈及，重点是探讨功能基因的定位与分子标记辅助育种的相关技术和方法。大会报告及所展示的全部 poster 中，除少数报告介绍远缘杂交、杂种优势利用方法等的研究外，其余则部分或全部探讨的是连锁群、遗传作图、分子标记和 QTL 等现代生物技术。应用较为普遍的分子标记为 SSR 和 AFLP，内容涉及高羊茅、梯牧草 (*Phleum pratense*)、三叶草、紫花苜蓿核心种群等相关性状遗传多样性研究、鸭茅系统发育关系及二倍体苜蓿群体遗传结构分析等。QTL 是分子标记辅助育种的主要手段，也是欧洲各国近年来在牧草、草坪草和饲料作物育种工作中研究的重点课题，到目前为止，已对多年生黑麦草、高羊茅、紫花苜蓿、白三叶等主要牧草进行了高密度作图。

辅助育种研究的内容包括苜蓿夏眠性、水分利用效率、耐铝性 QTL 的鉴定与分析，