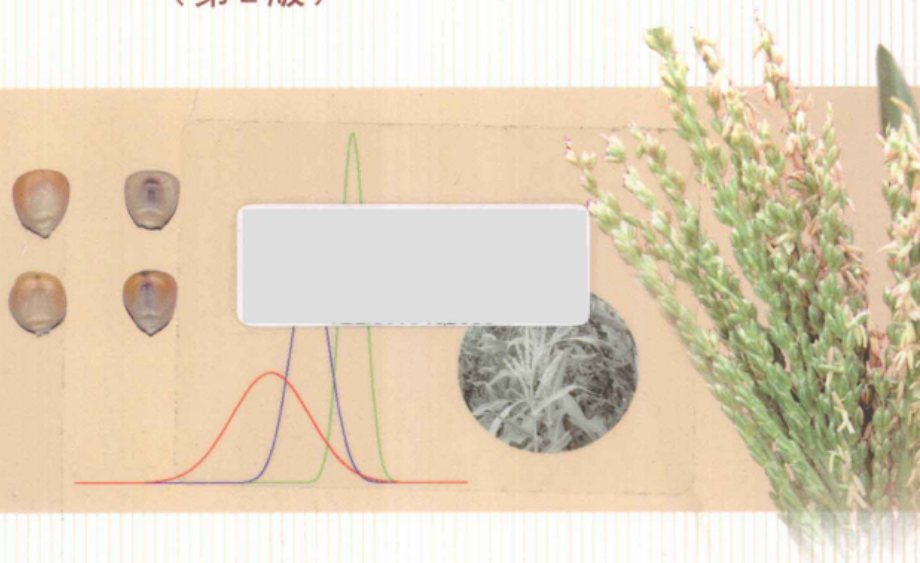


玉米单倍体 育种技术

陈绍江 黎 亮 李浩川 徐小炜 编 著

(第2版)



中国农业大学出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

策划编辑：席 清 梁爱荣

责任编辑：梁爱荣

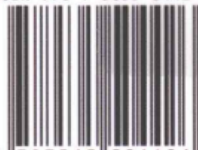
封面设计：郑 川

玉米单倍体育种技术

Maize Haploid Breeding

定价：18.00元

ISBN 978-7-5655-0442-6



9 787565 504426 >

Maize Haploid Breeding

玉米单倍体育种技术

(第2版)

陈绍江 黎 亮 李浩川 徐小炜 编著

中国农业大学出版社

· 北京 ·

内 容 简 介

近年来,以生物诱导为基础的玉米单倍体育种技术已逐步成为玉米育种的关键性技术之一。国内外许多研究机构和种业公司均已实现单倍体育种的规模化应用,成为现代玉米育种的核心技术。本书系统介绍了玉米单倍体育种的基本原理和应用方法,内容涉及单倍体育种技术的发展历史,单倍体诱导程序和特点,单倍体鉴别与加倍,DH系管理,系统化与工程化构建等。本书力求兼顾科学性和创新性,为玉米育种者在阅读和应用时提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

玉米单倍体育种技术(第2版)/陈绍江,黎亮,李浩川,徐小炜编著. —北京:中国农业大学出版社,2011.12

ISBN 978-7-5655-0442-6

I. ①玉… II. ①陈… ②黎… ③李… ④徐… III. ①玉米-单倍体育种 IV. ①S513.035.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 237158 号

书 名 玉米单倍体育种技术(第2版)

作 者 陈绍江 黎 亮 李浩川 徐小炜 编著

策划编辑 席 清 梁爱荣

责任编辑 梁爱荣

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤 陈 莹

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62818525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail cbsszs @ cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2012年3月第2版 2012年3月第1次印刷

规 格 850×1168 32开本 4.5印张 112千字 彩插2

定 价 18.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

第1版前言

近年来,以生物诱导为基础的玉米单倍体育种技术已逐步成为玉米育种的关键性技术。国外许多种业公司均已实现单倍体育种的规模化应用,成为可与转基因技术、分子标记辅助育种技术相媲美的现代玉米育种三大核心技术之一。

单倍体(Haploid)是指只具有配子染色体数目的细胞或个体。单倍体可以自然发生,也可以通过诱导产生。目前,玉米单倍体育种普遍采用孤雌生殖诱导系诱导产生单倍体。单倍体一般比较弱小,且表现高度不育,因此只有加倍成为二倍体才能恢复育性获得种子。加倍后所形成的系称为DH(Doubled Haploid)系,DH系表现整齐一致,可以直接用于育种,因此国际上称这一育种方法为DH育种(DH Breeding)技术。但鉴于国内习惯,本书仍然称之为单倍体育种(Haploid Breeding)技术。

本书系统介绍了单倍体育种的基本原理和应用方法,内容及单倍体育种技术的发展历史、单倍体诱导程序和特点、单倍体的鉴别与加倍、DH系管理、单倍体育种技术体系构建与优化等。

工程化育种是国际上大规模商业化玉米育种的主要方式,也是我国玉米育种方式变革的重要方向之一。单倍体育种技术既可提高育种速度,又易于规模化操作,其普及应用必将加快我国玉米育种的工程化进程,推进育种方式的变革。

目前,生物诱导的玉米单倍体育种技术发展迅速,编者在本书编写过程中也力求反映国内外最新相关研究进展。但由于时间和水平所限,书中难免遗漏抑或不妥之处,希望读者及时提出批评,

以便修改订正。

本书得到国家自然科学基金、国家科技支撑计划和现代玉米产业技术体系的支持,在此表示衷心的感谢!

编 者

2009 年 7 月 26 日

第 2 版前言

自本书第 1 版出版以来,玉米单倍体育种技术在国内迅速发展,规模化应用和工程化育种模式业已显现。在此背景下,传统育种模式将难以适应日益复杂多元的商业化育种发展趋势。如何更新模式、优化系统、提高整体效率已经成为亟待解决的问题。而其效率的提高不仅需要关键技术的突破,而且也需要观念的更新。从当代国内外规模化育种实践来看,育种系统的先进性直接影响着育种体系的竞争力。因此,很有必要借鉴国外种业先进的研发模式和我国航天科技创新发展的经验,依托系统科学理论构建适于国内育种实践的新型育种体系,以此提升创新能力。

玉米单倍体育种技术本身尚处于发展之中,系统的创新与发展空间仍然很大。以先进的科学理论为指导,运用系统设计以及工程管理方法,深化育种系统工程研究与应用,将是该技术未来拓展创新的重要方向。基于这一思路,修订内容增加了单倍体育种系统化与工程化一章,以期促进系统科学在国内育种研究上的发展和应用,进而为从学科层面熟化育种工程学及相应育种工程人才培养提供一定的理论和实践基础。此次修订还提出了单倍体育种中可育单倍体与不育单倍体多重利用的思路,旨在融合主要传统育种方法于单倍体育种技术之中,形成以 DH 为核心,以 BH、CH、EH 等为补充的技术系统,充分发挥单倍体育种优势和整体效能。除此之外,还增补了近年来在单倍体诱导系和杂交种选育,自动化鉴别技术,生物学机理和遗传理论以及 DH 系分类管理方法等方面的研究进展,并由此进一步提出了新的探索性概念。其他章节也根据现实发展的需要进行了必要的补充,特别是进一步

强调了单倍体技术在亲本纯化和玉米生产中的应用价值。

育种是种子产业转型发展的关键支撑点,单倍体育种能否成为玉米种业转型发展的重要技术突破口尚需在实践中不断探索。再版修订所提出的一些不成熟观点虽难触理窥道,然亦望能发微启新,为实践者提供新思考,为思考者提供新借鉴。同时,也希望读者能一如既往地书中不妥之处提出批评建议。

此次修订得到了国家玉米产业技术体系、国家 863 计划等项目的支持,得到了全国玉米育种界同仁的关注以及实验室各位同学的协助,在此表示衷心感谢!

编 者

2011 年 10 月

目 录

第一章 单倍体的相关概念及产生途径	(1)
第一节 无融合生殖与单倍体的来源.....	(1)
第二节 玉米单倍体产生的主要途径.....	(5)
第二章 单倍体诱导系的诱导原理与方法	(14)
第一节 孤雌生殖诱导系的发展历史.....	(14)
第二节 诱导系及诱导杂交种选育.....	(20)
第三节 单倍体的诱导程序.....	(24)
第四节 提高诱导效率的方法.....	(26)
第五节 单倍体诱导性状的遗传及生物学机理.....	(32)
第三章 单倍体的鉴定方法	(40)
第一节 细胞遗传学方法.....	(40)
第二节 形态学方法.....	(42)
第三节 放射性方法.....	(44)
第四节 遗传标记法.....	(45)
第五节 油分标记鉴定法与自动化鉴别.....	(49)
第六节 其他鉴定方法.....	(50)
第四章 单倍体的加倍方法	(53)
第一节 自然加倍法.....	(53)
第二节 秋水仙素加倍法.....	(56)
第三节 其他细胞分裂抑制剂.....	(59)
第四节 组培加倍及其他加倍技术.....	(60)
第五节 影响化学加倍的因素.....	(61)
第六节 加倍材料的表现与管理.....	(63)

第五章 DH 系表现与应用	(69)
第一节 DH 系世代数标示	(69)
第二节 DH 系与常规自交系比较	(70)
第三节 DH 系的遗传分离	(77)
第四节 DH 系在育种实践中的应用	(80)
第六章 单倍体育种技术体系的优化	(88)
第一节 基础材料的选择	(89)
第二节 不同育种方法分析	(92)
第三节 DH 系评价体系的优化	(97)
第七章 单倍体育种系统化与工程化	(106)
第一节 系统化的技术基础	(107)
第二节 系统分析	(109)
第三节 系统优化与应用创新	(112)
第四节 单倍体育种技术展望	(114)
参考文献	(117)
附件	(131)
附件 1 植物染色体根尖压片法	(131)
附件 2 秋水仙素加倍实验中的安全注意事项	(135)

第一章 单倍体的相关概念及产生途径

第一节 无融合生殖与单倍体的来源

在植物界中存在着有性生殖、无性生殖和无融合生殖三大生殖体系。其中无融合生殖(Apomixis)是针对两性融合生殖而言的,指的是不通过受精而产生胚和种子的生殖方式。与有性生殖不同,无融合生殖没有实质性的两性融合过程;但也不是无性生殖,因为它通过种子或胚而不是以营养器官进行繁殖。现已在被子植物的 29 目 35 科 400 多种植物中发现了无融合生殖现象(Hanna,1987),但直到 20 世纪 70 年代,这项研究才逐渐转向应用。无融合生殖研究主要集中在三个方面,一是在无融合生殖植物(主要是禾本科牧草)中寻找有性生殖的基因型;二是在有性植物或近缘野生种中寻找无融合生殖材料;三是对无融合生殖进行遗传操作和育种应用研究(时光春,1995)。依据无融合生殖的来源及倍性,其分类见图 1-1。

孤雌生殖(或雌核发育)是玉米孤雌生殖诱导单倍体育种技术的生物学基础,孤雌生殖产生的原因主要与被子植物生殖过程中的雌雄配子体的双受精失败有关。所谓双受精是指一个雄配子与雌配子结合而另一个雄配子与极核结合的生殖过程,雌雄配子结合形成胚,雄配子与极核结合形成胚乳。如果雌雄配子没有结合或结合失败,雌配子(或助细胞等)就可能单独发育成胚形成孤雌生殖。

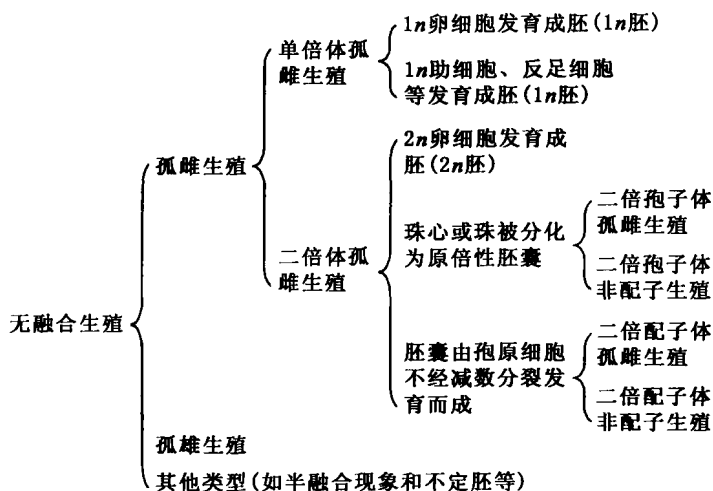


图 1-1 无融合生殖的分类(刘飞虎等,1996)

为进一步理解双受精过程,首先了解一下雌雄配子发育过程。其形成过程如图 1-2 所示。

雄配子的形成基本过程是花药中的造孢细胞可以先行分裂几次,成为小孢子母细胞即花粉母细胞。小孢子母细胞减数分裂产生 4 个染色体数减半的小孢子。每个小孢子再进行两次有丝分裂形成雄配子体。其中第一次分裂形成一个营养细胞和一个生殖细胞。生殖细胞再行分裂一次,产生出两个精核,这时,小孢子才成为成熟的雄配子体。在玉米等禾本科植物中,生殖核分裂发生在花粉散落之前,而大部分双子叶植物却发生在花粉管中。因此,花粉粒从花药中散出时,可能含有两个细胞,也可能含有 3 个细胞。花粉发芽时,营养细胞和两个精核随即移动到花粉管的顶端。

雌配子来源于大孢子母细胞,通常大孢子母细胞来自于珠心

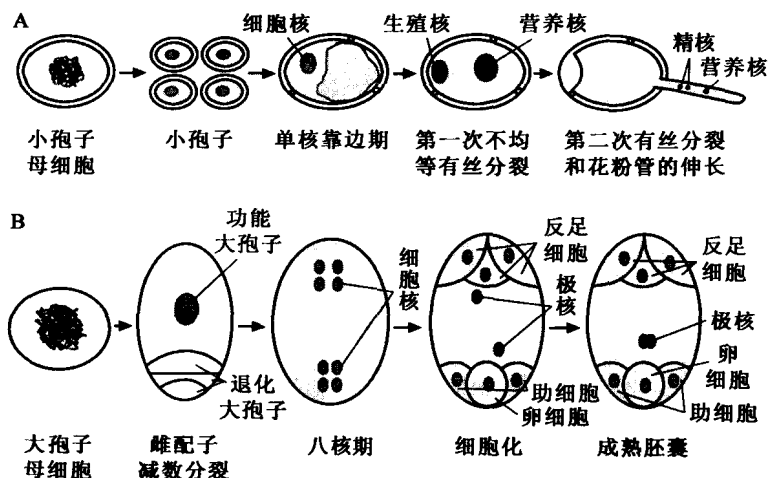


图 1-2 雌雄配子发育过程(Li and Ma, 2002)

A. 雄配子的发育; B. 雌配子的发育

组织靠近珠孔的细胞, 减数分裂后形成 4 个大孢子。其中最里面靠近合点处的大孢子继续发育, 成为胚囊, 其余 3 个退化。胚囊再连续进行 3 次有丝分裂, 产生 8 个单倍体的细胞核, 处在共同的胞质中, 成为雌配子体。其中 6 个核形成细胞膜, 3 个移向与珠孔方向相反的一端, 成为反足细胞; 另外 3 个移向珠孔一端, 组成卵器, 中间的一个为卵细胞或雌配子, 两边的为助细胞。处在胚囊中心的两个核为极核。

双受精的过程如图 1-3 所示。花粉在雌蕊柱头上萌发形成花粉管, 并沿花柱生长穿过珠孔而进入胚囊。花粉管在胚囊破裂, 释放出两个精核, 一个与卵融合, 形成 $2n$ 的受精卵, 将来发育为胚; 另一个与两个极核结合, 形成具有 3 个染色体组 ($3n$) 的初生胚乳核。

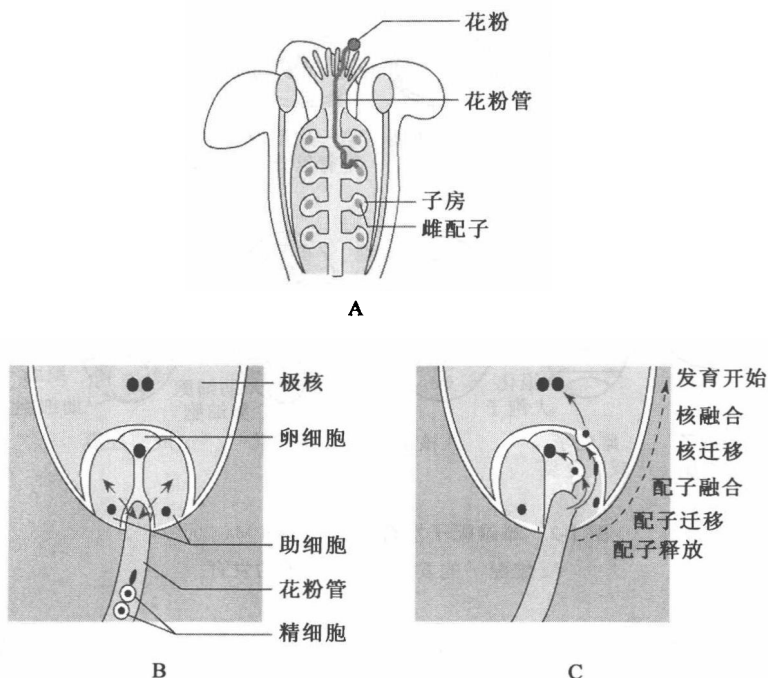


图 1-3 双受精过程(Berger *et al.*, 2008)

A. 花粉在雌蕊上萌发; B. 花粉管进入胚囊; C. 花粉管释放出精核并分别与卵细胞和极核融合

孤雌生殖按照胚囊的不同来源可以分为单倍体和二倍体孤雌生殖。单倍体主要来自于已减数的卵细胞单独发育成胚,但也可能来自于助细胞、反足细胞的发育。二倍体孤雌生殖主要指未减数的卵细胞($2n$)发育成胚和二倍孢子体等。

需要指出,实际的双受精过程也会产生孤雄生殖(雄核发育)现象,正常有性胚囊中的卵细胞,因某种原因丧失功能,未能和精

子结合,进入胚囊的一个精子占据卵细胞的位置,雄核单独发育形成单倍体的胚,玉米中的 *ig* 基因可以诱导孤雄生殖的发生。

第二节 玉米单倍体产生的主要途径

一、生物诱导途径产生生活体单倍体

1. 品种间杂交产生单倍体

早期的玉米单倍体主要是从品种间、自交系间或品种与自交系杂交产生的孤雌生殖单倍体。对品种间杂交产生单倍体的研究与后来诱导系的选育有很大的关系,而且孤雌生殖以及孤雄生殖诱导单倍体也属于品种间杂交诱导单倍体的范畴,具体的诱导过程将在本书第二章介绍。这里只介绍如何利用颜色标记鉴定单倍体以及品种间杂交诱导早期的一些研究情况。

由于单倍体的发生频率很低,在田间大群体中直接鉴别单倍体植株是不现实的,所以单倍体的鉴别需要借助于特定的遗传标记系统,称之为遗传标记法,该标记法最早由 Chase 提出。由 A1A2BP1CRgPr 基因系统控制的紫色糊粉层、紫色胚根和紫色植株性状是非常明显的形态性状。以具有该遗传系统的材料为授粉者,以无色糊粉层、绿色植株材料为母本,所有的杂交子粒都具有紫色糊粉层,将子粒在避光下萌发后,杂合二倍体表现为紫色胚根,凡胚根为白色的都有极大的可能是单倍体,再经过田间植株鉴定即可予以确定。利用标记幼苗的方法来发现单倍体比较困难。考虑到这种方法的缺点,Chase 后来又提出了对子粒进行遗传标记的构想。

由 Nanda 等(1966)所提出的 PEM(Purple Embryo Marker)标记基因系统 BP1A1A2C1C2R-nj 在单倍体的鉴别中具有更加明

显的优势,这一标记系统能够在子粒胚乳顶冠糊粉层和盾片同时合成花青素,因而是子粒色素双标记性状。以具有这一标记系统的材料为授粉者与普通材料杂交所获得的子粒中,胚乳糊粉层有色而盾片无色的类型即可能为单倍体。利用这种方法可以在萌发前淘汰 98% 的杂合子粒,使单倍体的鉴别效率大为提高。国内陈绍江等在 PEM 标记系统的基础上提出了包括胚油分标记的 PEM Plus 标记系统。另外,母本带有无叶舌(*lg*)或光叶(*gl*)等幼苗期容易观察的隐性性状也可以用来鉴别孤雌生殖单倍体,但具有这些突变基因的材料很少,且需苗期以后才易于识别,因而,它的应用范围有限。

借助于遗传标记系统,Nanda 等(1966)指出不同杂交组合中孤雌生殖单倍体的发生频率平均为 0.1%~0.54%,这与 Randolph(1940)所报道的 0.064% 的平均单倍体诱导率比较接近。许多研究(Randolph, 1940; Chase, 1952; Seany, 1955)均表明,单倍体的发生频率与杂交组合的双亲都有关系,不同授粉者杂交所产生的单倍体频率以及不同母本接受同一花粉所产生的单倍体频率都存在着显著差异,用经过改良的材料作母本所产生的单倍体频率要高于未改良的材料。在授粉者材料中,Chase(1949)发现当用一个甜玉米单交种作母本时,38-11 诱发孤雌生殖单倍体的频率可达 0.78%,比 A385 高 20 倍。尽管如此,单倍体的发生频率还是很低,难以满足科研和育种的需要。

2. 不定配子体基因诱导的孤雄生殖单倍体

孤雄生殖单倍体在玉米中发生的频率极低,据 Sarkar 等(1972)报道仅为 0.0026%。但是 Kermicle(1969)所发现的一个不定配子体(Indeterminate Gametophyte)突变体 W23(*ig*)则可以增加后代中孤雄单倍体的发生频率,频率为 1%~2%。

不定配子体(*ig*)基因是从 W23 自交系中发现的一个自然突

变基因,已经被定位于第3染色体的长臂上。*ig* 基因具有以下遗传效应:*ig* 基因纯合体是雄性不育的;在 *igig* 纯合植株果穗上有 50% 的败育或缺陷子粒;在 *Igig* 杂合植株果穗上有 25% 的败育或缺陷子粒;在具有 *ig* 基因的雌配子体发育而成的正常胚乳子粒中,有 6% 具有双胚,少数情况下具有三胚或多胚;以 *igig* 纯合体为母本,杂交可以产生 2.6% 的孤雄生殖单倍体和 0.6% 的孤雌生殖单倍体。*Ig* 是配子体表达的基因,因此只有在母本中才会产生上述效应,并且杂合状态下其作用减半。*Ig* 基因导致的不育性和子粒败育是鉴定杂交后代中是否具有该基因的重要依据。

从细胞学来看,*ig* 基因的作用是在胚囊减数分裂后的多核细胞时期干扰了把细胞核拉向两极的细胞骨架的功能(Enaleeva *et al.*, 1995),造成了细胞分裂的紊乱。在所形成的超二倍极核中, $3n$ 极核与 $1n$ 精核结合形成胚乳缺陷型子粒, $4n$ 以上极核与 $1n$ 精核结合则胚乳不育(Lin, 1984)。经过不正常分裂所产生的多个卵细胞或助细胞受精后形成双胚或多胚。另外,由于异常分裂大孢子中有的细胞核会发生退化(Lin, 1981),受精后的精核即占据了退化核的位置,从而可以发育为孤雄生殖单倍体。

由于 *ig* 纯合体是雄性不育的,所以 *ig* 基因必须在杂合状态下才能保持,通常杂合体自交只能产生 25% 的 *igig* 纯合体(Kermicle, 1971),这给 *ig* 基因的应用带来了很大的不便。B-A 易位系 TB-3Ld 在 3L 上的易位断点与 *Ig* 基因位点紧密相连,并处在 *Ig* 与着丝粒之间,于是 Kindiger 等(1993)利用该易位系与 W23 (*ig*) 杂交,育成了一个三级三体保持系 $3(ig)3(ig)B-3Ld(Ig)$ 。由于三体 TB-3Ld 通过花粉传递的概率只有 2%,所以保持系与 *ig* 纯合体不育系授粉所产生的后代仍然有 98% 是纯合体。

孤雄生殖为细胞质的转移带来了便利,如以具有雄性不育胞