

甜菜多倍体品种和亲本的生物育种及
漆酶基因克隆

路运才 著



哈尔滨地图出版社

甜菜多倍体品种和亲本的生物 育种及漆酶基因克隆

TIANCAI DUOBEITI PINZHONG HE
QINBEN DE SHENGWU YUZHONG JI
QIMEI JIYIN KELONG

路运才 著

哈尔滨地图出版社

· 哈尔滨 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

甜菜多倍体品种和亲本的生物育种及漆酶基因克隆 /
路运才著. — 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2009.7

ISBN 978-7-5465-0106-2

I. 甜… II. 路… III. ①甜菜—多倍体育种—研究②甜
菜—亲本—遗传育种—研究③甜菜—基因工程 IV.
S566.303

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 123203 号

哈尔滨地图出版社出版发行

(地址: 哈尔滨市南岗区测绘路 2 号 邮政编码: 150086)

哈尔滨天兴速达印务有限责任公司印刷

开本: 850 mm×1 168 mm 1/32 印张: 5.25 字数: 130 千字

2009 年 7 月第 1 版 2009 年 7 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5465-0106-2

印数: 1~1 000 定价: 16.00 元

前 言

甜菜是我国主要的糖料作物之一。新中国成立以来，特别是改革开放以后，中国糖业发展迅猛。其中，我国甜菜种植面积从 1.59 万公顷增加到 24.8 万公顷，最高年份为 1998 年的 78.4 万公顷，为我国制糖工业的稳步发展发挥了重要作用。不容乐观的是近 10 年来，我国甜菜种植面积严重萎缩，主要原因在于近年甜菜比较效益逐年下降。许多糖农改种其他作物，甜菜糖厂很难征到订单，闲置了很多压榨能力。当然，如果甜菜种植比较效益上升，甜菜种植面积还有恢复的空间。因为，目前我国甜菜单产一直保持平均 1.5~2.0 吨，远远低于欧美国家甜菜单产的 5.0 吨。

新中国的甜菜育种历史较短，迄今也仅有 50 年。我国甜菜多倍体育种，始于 20 世纪 50 年代后期，当时主要是通过引入国外多倍体商业品种和四倍体品系来进行多倍体品种选育。进入 20 世纪 60 年代以后，我国开始自育四倍体，通过人工诱变、染色体加倍以及四倍体品系间人工杂交等方法育成了一批优良的四倍体品系，并广泛用于多倍体制种中。从 1973 年我国育成第一个甜菜多倍体品种双丰 303 至今，在生产上推广的甜菜多倍体品种已有几十个，仅甜研系列、双丰系列多倍体品种就接近 30 个。多倍体品种在我国甜菜栽培中也越来越显示出巨大的优越

性。据不完全统计,目前多倍体品种的种植面积占甜菜种植总面积的 80%以上,为提高我国甜菜单位面积产量和发展甜菜制糖产业作出了突出的贡献。目前,开展甜菜多倍体杂交育种方面的研究已有许多报道,并取得了较显著的成果。近年来,在分子水平上进行野生甜菜的遗传多样性和亲缘关系的分析和研究也取得了一定的进展,但在分子水平上针对我国生产上应用的多倍体品种及亲本的系统研究至今还未见报道。

饲用甜菜属于藜科甜菜属,是一种营养和利用价值都较高的新型多汁饲料作物。主要具有根体生长快、产量高、含糖率适中,营养价值丰富、适口性好以及消化率高等优点。我国很多地区长期以来就有种植饲用甜菜作为家畜家禽饲料的传统习惯。饲用甜菜作为草食动物的一种新型能量来源,具有广阔的应用前景和重要的学术价值,对于我国农业种植结构调整和畜牧业的可持续发展将起到极大的促进作用。而且,目前从基因水平上进行饲料甜菜的研究,在国内外尚属首创,对于我们领先世界水平具有极为重要的意义。

生物育种是利用遗传学、细胞生物学、现代生物工程技术等方法培育生物新品种的过程。生物育种的技术和方法主要包括杂交育种、诱变育种、单倍体育种、多倍体育种、转基因育种和细胞工程育种等。生物育种是提高农作物产量和品质的主要途径,随着现代生命科学研究的不断深入、农作物育种的方法的创新,必将促进开发新品种繁育技术,加速新品种的推广应用进程。

日前,农业部正式批准启动第二批现代农业产业技术体系建设项目,甜菜产业作为我国农业结构调整和制糖工业的重要组成部分,在农业部、财政部的大力支持下成为农业部第二批启动的现代农业产业技术体系建设项目之一。依据国家现代甜菜产业技术体系五年规划,我国甜菜科研人员将在不打破现有管理体制的前提下,依托具有创新优势的现有中央和地方科研力量和科技资源,围绕甜菜产业发展需求建设的服务国家目标,从育种与良种繁育、甜菜栽培技术和甜菜病虫害防治等环节入手,建立一套较为系统的甜菜育、繁、推一体化产业体系并加以推广示范,以此改变我国甜菜研究的传统和现状,提升我国甜菜产业科技创新能力,增强我国甜菜产业的综合竞争力。

因此,我们当前迫切的任务是应在各级部门的支持下,在理论上深入探讨甜菜杂种优势及多倍体形成的生物学机制,加大甜菜生物育种的力度和深度。在育种材料上,应通过引进、鉴定、评价和利用等途径发掘优良种质资源。在方法上,应在田间和实验室,综合利用杂交育种、诱变育种、多倍体育种、单倍体育种、基因工程育种以及细胞工程育种等生物育种手段和分子标记辅助选择等开展研究。

本书是黑龙江省教育厅科学技术研究项目“基于饲用品质的甜菜漆酶基因克隆与初步鉴定(编号 11511278)”的阶段性的成果。黑龙江省普通高等学校甜菜遗传育种重点实验室为本书的顺利完成提供了科研平台。黑龙江省农垦科学院九三科研所、吉林省

甜菜糖业研究所、内蒙古甜菜制糖工业研究所、哈尔滨工业大学糖业研究院、吉林省洮南甜菜育种研究所、中国农业科学院甜菜所甜菜育种研究室等单位提供了试验材料。孙阎博士、张文彬副研究员、刘娜助理研究员、周芹助理研究员等参加了本书中第 6 章饲用甜菜漆酶基因的克隆与分析的研究工作。王华忠研究员参加了本书中第 2~5 章的研究工作。谨在此一并表示衷心的感谢。

全书共分 7 章, 分别对甜菜多倍体品种及亲本的形态学标记、经济性状和 RAPD 分子标记以及与饲料甜菜饲用品质相关的漆酶基因的克隆等方面进行了系统研究和阶段性总结, 旨在为甜菜生物育种研究提供理论和实践指导。

本书可作为甜菜育种、生物技术等领域的专家、学者和研究生的参考书。由于写作时间仓促, 作者写作水平所限, 书中难免存在不妥之处, 敬请有关专家和读者批评指正。

作 者

2009 年 4 月

目 录

第 1 章 概 论	(1)
1.1 甜菜育种的兴起与发展	(3)
1.1.1 世界甜菜育种研究概述	(3)
1.1.2 德国甜菜育种.....	(5)
1.1.3 法国甜菜育种.....	(5)
1.1.4 美国甜菜育种.....	(6)
1.1.5 我国甜菜育种回顾与研究进展.....	(7)
1.2 甜菜生物育种.....	(11)
1.2.1 杂交育种.....	(11)
1.2.2 诱变育种	(12)
1.2.3 单倍体育种.....	(13)
1.2.4 多倍体育种.....	(14)
1.2.5 转基因育种	(18)
1.2.6 细胞工程育种	(21)
1.3 分子标记辅助育种	(22)
1.3.1 限制片段长度多态性	(23)
1.3.2 随机扩增多态性 DNA.....	(24)
1.3.3 扩增片段长度多态性.....	(25)
1.3.4 简单序列重复.....	(26)

1.3.5 RAPD 技术在甜菜上的应用进展.....	(27)
1.4 饲料甜菜研究进展.....	(28)
1.5 植物基因克隆技术进展	(29)
1.5.1 同源序列克隆技术	(30)
1.5.2 图位克隆技术.....	(31)
1.5.3 转座子标签技术.....	(31)
1.5.4 差异显示 PCR 克隆技术.....	(32)
1.5.5 基于基因表达序列标签克隆技术.....	(32)
1.5.6 差减杂交技术.....	(33)
1.6 植物漆酶及漆酶基因的研究进展	(33)
1.6.1 漆酶的发生与特征	(34)
1.6.2 漆酶活性位点结构及反应机理.....	(37)
1.6.3 漆酶的功能.....	(38)
1.6.4 漆酶的应用.....	(40)
1.7 分子系统发育的研究进展	(41)
1.8 甜菜生物育种研究的科学意义	(43)
第 2 章 甜菜多倍体品种及亲本的形态学鉴定.....	(45)
2.1 材料与方法.....	(46)
2.1.1 供试材料	(46)
2.1.2 试验方法	(47)
2.1.3 形态鉴定结果数据处理与分析.....	(52)
2.2 结果与分析.....	(52)

2.2.1 幼苗期调查结果.....	(52)
2.2.2 叶丛形成期形态特征	(55)
2.2.3 生长动态及抗病性调查结果	(56)
2.2.4 根部调查结果.....	(57)
2.2.5 种子性状调查结果.....	(57)
2.2.6 甜菜形态调查结果分析	(57)
2.3 讨论	(62)
2.4 小结.....	(63)
第3章 甜菜多倍体品种的主要经济性状鉴定	(64)
3.1 材料与方法.....	(67)
3.1.1 供试材料	(67)
3.1.2 试验方法	(68)
3.2 结果与分析.....	(68)
3.2.1 甜菜多倍体品种主要经济性状的鉴定结果.....	(68)
3.2.2 甜菜多倍体品种重要农艺性状的鉴定结果分析.....	(69)
3.3 讨论.....	(72)
3.3.1 甜菜多倍体品种综合经济性状表现差异	(72)
3.3.2 甜菜多倍体品种主要经济性状的相关性	(74)
3.4 几点建议	(74)
3.5 小结.....	(75)
第4章 甜菜多倍体品种亲本品系的经济性状研究.....	(77)
4.1 材料与方法.....	(78)

4.1.1 供试材料	(78)
4.1.2 试验方法	(78)
4.2 结果与分析	(80)
4.2.1 骨干亲本的主要经济性状鉴定结果	(80)
4.2.2 骨干亲本的主要经济性状鉴定结果分析	(80)
4.3 讨论	(84)
4.3.1 甜研多倍体品种亲本品系的综合表现.....	(84)
4.3.2 加强四倍体材料的选育.....	(84)
4.3.3 亲本材料的主要经济性状的相关性.....	(85)
4.4 小结.....	(85)
第5章 甜菜多倍体品种及亲本的 RAPD 鉴定	(86)
5.1 材料与方法.....	(88)
5.1.1 实验材料	(88)
5.1.2 实验器材	(88)
5.1.3 主要试剂及使用液的配制	(88)
5.1.4 实验方法.....	(90)
5.2 结果与分析.....	(94)
5.2.1 试验材料基因组总 DNA 的提取结果.....	(94)
5.2.2 实验材料的 RAPD 多态性.....	(95)
5.2.3 RAPD 扩增对供试材料的区分结果.....	(96)
5.2.4 甜菜多倍体品种及亲本间的聚类分析.....	(98)
5.2.5 杂种优势与遗传距离的关系	(99)

5.3 讨论.....	(101)
5.3.1 RAPD 标记的可靠性.....	(101)
5.3.2 RAPD 标记在甜菜种质资源遗传关系上的应用...	(102)
5.3.3 杂种优势与遗传距离的关系.....	(103)
5.4 小结	(103)
第 6 章 饲料甜菜漆酶基因的克隆与分析	(104)
6.1 材料与方法	(105)
6.1.1 实验材料.....	(105)
6.1.2 实验方法.....	(106)
6.2 结果与分析.....	(116)
6.2.1 基因组 DNA 的质量与浓度检测结果	(116)
6.2.2 退火温度优化.....	(117)
6.2.3 漆酶目的片段的扩增与纯化.....	(119)
6.2.4 饲料甜菜漆酶基因的克隆与序列分析.....	(120)
6.3 小结	(124)
6.3.1 引物设计	(125)
6.3.2 PCR 退火温度的选择	(125)
6.3.3 PCR 反应增效剂	(125)
6.3.4 Advantage 2 PCR	(126)
第 7 章 结论.....	(127)
附录一 9 个形态学性状间的遗传距离	(130)
附录二 RAPD 引物扩增条带数目及大小分布表	(131)

附录三 主要试剂及培养基配方	(135)
附录四 凝胶电泳中凝胶浓度的分离范围.....	(138)
参考文献	(139)

第 1 章 概 论

甜菜属藜科 (*Familia Chenopodiaceae*) 甜菜属 (*Genus Beta*), 是我国北方主要的糖料作物之一。甜菜是 2 年生草本植物, 第 1 年进行营养生长, 在块根中积累蔗糖等营养物质, 第 2 年以生殖生长为主, 甜菜母根经过低温春化、抽薹、开花和授粉等过程形成种子。

甜菜栽培种包括糖用甜菜、叶用甜菜、根用甜菜、饲用甜菜等 4 个变种。甜菜作为糖料作物栽培始于 18 世纪后半叶, 至今仅 200 年左右历史。糖甜菜是世界两大糖料作物之一, 种植面积占糖料作物的 35%~40%。糖用甜菜由起源于地中海沿岸的野生种 (*B.maritima*) 演变而来。1747 年, 德国研究人员 F.C.阿哈德通过人工选择, 于 1786 年培育出块根肥大、含糖率较高的甜菜品种, 是世界上第一个糖用甜菜品种。

糖用甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 起源于地中海沿岸, 野生种滨海甜菜是栽培甜菜的祖先。在我国, 叶用甜菜种植历史悠久, 而糖用甜菜是在 1906 年才引进的。甜菜主产区主要分布在我国东北 (黑龙江、吉林和辽宁)、西北 (新疆、甘肃和宁夏) 和华北 (内蒙古、河北和山西) 地区。

饲用甜菜是一种营养和利用价值较高的新型多汁饲料作物。具有根体生长快，产量高，含糖率适中，营养价值丰富，适口性好，消化率高等特点。我国很多地区长期以来就有种植饲用甜菜作为家畜家禽饲料的传统习惯，但由于没有优良的品种供生产应用，生产中使用的品种多是地方农家种，经过长期的自繁自用，混杂退化现象严重，产量低、品质差、病害重，远不能满足养殖业的需要。因此，饲用甜菜作为草食动物的一种新型能量来源，具有广阔的应用前景和重要的学术价值，对于我国农业种植结构的调整和畜牧业的可持续发展将起到极大的促进作用。

叶用甜菜俗称厚皮菜，其叶片肥厚、叶部发达、叶柄粗长、抗逆性强，可作为蔬菜食用或作为草药及饲料。

食用甜菜俗称红甜菜。根和叶为紫红色，块根可食用。在前苏联等许多国家作为一种蔬菜仍有较大面积的种植。此外还可作为观赏植物。

近 50 年来，甜菜育种家们围绕不同时期农业生产的发展需求，在东北、西北和华北甜菜主产区，利用品种或品系进行杂交，从分离后代中通过表现型选择目标重组基因型，培育出了一批丰产、高糖、抗病虫和抗逆性强的优良甜菜品种。与世界发达国家相比，我国的甜菜生产及制糖工业都还比较滞后。我国已育成的品种，绝大多数是利用 20 世纪 50~60 年代从国外引进的材料培育而成的。目前，我国的育种工作正处于“瓶颈”阶段。普通多倍体品种在我国甜菜生产上仍然起着主导作用，雄性不育杂交种

也并未表现出人们所期待的优势效应。甜菜杂交种的块根产量及含糖率一直徘徊不前，杂交育种过程中的重复性、盲目性日益突出。

因此，如何运用诱变育种、杂交育种、多倍体育种、单倍体育种和细胞工程等生物育种方法与技术以及分子标记辅助育种手段，创制和发掘优良亲本资源，育成产量、品质、抗性等重要农艺性状均能满足农业生产需求的甜菜新品种，是当前甜菜科研工作者面临的严峻课题。

1.1 甜菜育种的兴起与发展

1.1.1 世界甜菜育种研究概述

甜菜作为糖料作物栽培始于 18 世纪后半叶，至今仅有 200 多年的历史。1786 年，德国科研工作者 F.C.阿哈德通过人工选择育成了世界上第一个糖甜菜品种“西里西亚”（张木清等，2006）。提高含糖率是甜菜育种的重要目标之一，而在甜菜研究起步阶段，含糖率仅有 1.3%，经过选育达到 4%。1862 年，随着旋光计的发明和使用，含糖率才有所突破。20 世纪 30 年代，甜菜含糖率为 9%左右，20 世纪中期作为制糖工业的原料甜菜含糖率为 14%左右，20 世纪后期提高到 17%~18%。

甜菜是 2 年生异花授粉作物，这无疑加大了育种难度。选择

育种是 19 世纪甜菜育种初期普遍运用的育种方法, 研究人员依据个体或后代的表现型 (Phenotypes) 进行选择 and 淘汰, 获得了差异明显的基因型 (Genotypes)。进入 20 世纪, 最初采用母根选择法进行品种改良, 之后通过系谱育种法, 依据后代块根产量和含糖率等性状鉴定结果选择优良品系。随后, 德国 KWS 公司开展了商业育种, 利用轮回选择等途径育成了综合甜菜品种。

20 世纪 30 年代前后, 通过控制甜菜抽薹性状, 大大地延长了生育期, 使块根产量大幅度提高。同时, 多倍体育种技术的使用, 使得同一品种内的根产量与含糖率均得以增加。伴随着机械化程度的提高和栽培技术及田间管理措施的改进, 甜菜单粒种应运而生。1966 年, 欧洲育成第 1 个甜菜单粒品种, 使甜菜种植业产生了“革命性”变革。

目前, 世界甜菜育种工作已经进入了杂种优势育种的阶段, 将自交系、雄性不育系、遗传单粒种等单一的选种技术予以配套, 构成了杂种优势育种的系统概念, 同时又结合了倍数性育种方法, 为甜菜生产机械化创造了条件。

随着甜菜育种研究的不断深入, 人们开始使用物理、化学、基因工程等方法创制甜菜新种质。1937 年, 美国科学家 A.Blakeslee 发现秋水仙碱对细胞分裂的作用, 于 1953 年在欧洲开始开展秋水仙碱诱变多倍体研究。1965 年开始生产三倍体甜菜单胚品种 (王燕飞等, 2008)。1976 年, B.E.Eopmotob 提出选用经济性状优良的二倍体甜菜品系诱导四倍体甜菜。生产上, 用四