



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104756876 B

(45)授权公告日 2016.07.20

(21)申请号 201510064512.9

C12Q 1/68(2006.01)

(22)申请日 2015.02.06

(56)对比文件

(83)生物保藏信息

CN 101760545 A, 2010.06.30, 全文.

CCTCC NO: P201501 2015.01.06

陈全战等.利用离果山羊草3C染色体诱导簇毛麦2V染色体结构变异.《中国农业科学》.2008,第41卷(第2期),第368页右栏第1段.

(73)专利权人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇  
国家农业科技园南京农业大学基地

zhang wei等.Distribution of highly repeated DNA sequences in Haynaldia villosa and its application in the identification of alien chromatin.

(72)发明人 张瑞奇 冯祎高 陈佩度

《Chinese Science Bulletin》.2013,第58卷(第8期),890-897.

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任  
公司 32218

代理人 傅婷婷 徐冬涛

审查员 吴涛

(51)Int.Cl.

A01H 5/10(2006.01)

A01H 1/02(2006.01)

A01H 1/04(2006.01)

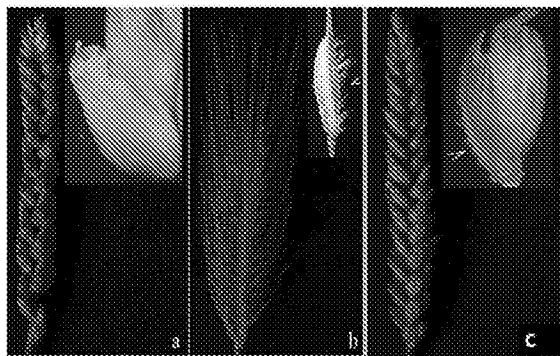
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的  
育种方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的育种方法。普通小麦中国春-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422是补偿性整臂易位系,遗传稳定,携带颖脊毛形态标记Bgr-V1,将其用于分子育种,能够显著提高普通小麦的小穗数和穗粒数,便于培育出小麦高产新品系。



1. 多小穗种质NAU422在提高小麦穗粒数的分子育种中的应用,其特征在于所述的多小穗种质NAU422保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2015.1.6,保藏编号为CCTCC P201501。

2. 多小穗种质NAU422在提高小麦产量的分子育种中的应用,其特征在于所述的多小穗种质NAU422保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2015.1.6,保藏编号为CCTCC P201501。

3. 一种利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的育种方法,其特征在於以所述的多小穗种质NAU422为亲本,与生产上的丰产品种1杂交,F1代再与生产上的另一丰产品种2杂交,获得BC1F1种子,分单株种植BC1F1,在籽粒灌浆期,根据颖壳脊部是否有颖脊毛形态标记Bgr-V1对BC1F1植株进行选择,保留有颖脊毛形态标记Bgr-V1的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F2种子;分单株种植BC1F2,分别在籽粒灌浆期、落黄期,根据Bgr-V1对BC1F2植株进行选择,选取颖壳脊部有颖脊毛、籽粒灌浆饱满且落黄正常的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F3种子;分单株种植BC1F3,分别在籽粒灌浆期、落黄期,先选择株高、株型及病害综合抗性均优于丰产品种1和2的株系,再在株系内选择有Bgr-V1的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F4种子;分单株种植BC1F4,分别在籽粒灌浆期、落黄期,先选择株高、株型及病害综合抗性均优于丰产品种1和2的株系,再在株系内选择有颖脊毛形态标记Bgr-V1植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F5种子;分单株种植BC1F5,在拔节期分别取BC1F5株系内不同单株叶片混合提取叶片DNA,利用追踪NAU422的1个共显性分子标记Xcinau2VS-1的引物进行PCR扩增,保留能扩增出2VS 750 bp的特异条带,同时又缺少小麦2DS 900 bp特异条带的株系,并混收其籽粒,获得BC1F6种子;分小区种植BC1F6种子,同时种植丰产品种1和2,混收BC1F6种子,晒干后称量重量,保留产量显著高于丰产品种1和2的家系,即可获得通过提高穗粒数从而提高小麦品种产量的新品系;其中,所述的共显性分子标记Xcinau2VS-1的引物为XCINAU2VS-1F:SEQ ID NO.1,XCINAU2VS-1R: SEQ ID NO.2;利用该分子标记引物对T2VS·2DL染色体易位系进行PCR扩增,能够扩增出2VS 750 bp的特异条带,而缺少小麦2DS 900 bp的特异条带。

4. 根据权利要求3所述的育种方法,其特征在於所述的丰产品种1选自扬麦15;所述的丰产品种2选自南农0686。

5. 权利要求3中所述的分子标记Xcinau2VS-1在辅助选择育种中的应用,该分子标记引物为XCINAU2VS-1F:SEQ ID NO.1,XCINAU2VS-1R: SEQ ID NO.2;利用该分子标记引物对T2VS·2DL染色体易位系进行PCR扩增,能够扩增出2VS 750 bp的特异条带,同时缺少小麦2DS 900 bp的特异条带。

## 一种利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的育种方法

### 技术领域

[0001] 本发明公开一个利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的育种方法,属于植物育种技术领域。

### 背景技术

[0002] 小麦是世界上重要的粮食作物,对其产量性状的遗传改良一直受到各小麦主产国的重视。单位面积穗数、每穗穗粒数和千粒重是构成小麦单位面积产量的基本要素,长期育种实践表明,增加每穗穗粒数比较容易实现产量水平的提升。然而,经过近百年的遗传改良,栽培小麦的遗传基础日益狭窄,成为小麦产量进一步提高的主要瓶颈。小麦的近缘属种中蕴藏着许多对产量有益的基因位点,将这些基因位点转移到栽培小麦,或许可以使小麦产量改良取得突破性进展。簇毛麦(*Dasypyrum villosum*(L.)Schur)( $2n=2x=14, VV$ )是原产于地中海沿岸东北部和西南亚地区的普通小麦二倍体亲缘物种,具有多小穗、多小花等优良产量性状,是小麦品种遗传改良重要的三级基因资源(见参考文献:Agnieszka Gradzielewska.The genus *Dasypyrum*-part 2.*Dasypyrum villosum*-a wild species used in wheat improvement.*Euphytica*,2006,152:441-454)。南京农业大学细胞所利用从英国剑桥植物园引进的簇毛麦91C43为供体,选育了一套普通小麦-簇毛麦1V-7V异附加系(见参考文献:Zhang W,Zhang RQ,Feng YG,Bie TD,Chen PD.Distribution of highly repeated DNA sequences in *Haynaldia villosa* and its application in the identification of alien chromatin.*Chin Sci Bull*,2013,58:890-897),为进一步转移利用簇毛麦优良基因提供了中间材料。

[0003] 经过近30年的努力,我们在异附加系的基础上,利用电离辐射及中国春ph1b1b突变体等方法,创制了大量的小麦-簇毛麦易位系,并将簇毛麦多种优良基因转移到普通小麦包括:簇毛麦的贮藏蛋白基因Glu-V1、Glu-V3及Gli-V1通过T1VS.1BL易位系转育到普通小麦(见参考文献:Zhang Ruiqi,Zhang Mingyi,Wang Xiue,Chen Peidu.Introduction of chromosome segment carrying the seed storage protein genes from chromosome 1V of *Dasypyrum villosum* showed positive effect on bread-making quality of common wheat.*Theor Appl Genet*,2014,127:523-533.);簇毛麦的籽粒软质基因Dina/Dinb通过T5VS.5DL易位系转育到普通小麦(见参考文献:Zhang Ruiqi,Cao Yaping,Wang Xiue,Feng Yigao,Chen Peidu.Development and Characterization of a *Triticum aestivum*-*H.villosa* T5VS•5DL Translocation Line with Soft Grain Texture.*Journal of Cereal Science*,2010,51:220-225.);簇毛麦的抗黄花叶病基因Wss1通过T4VS.4DL易位系转育到普通小麦(见参考文献:Zhang QP,Li Q,Wang XE,Wang HY,Lang SP,Wang Y,Wang SL,Chen PD,Liu DJ.Development and characterization of a *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line T4VS/4DL conferring resistance to wheat spindle streak mosaic virus.*Euphytica*,2005,145:317-320)以及簇毛麦抗白粉病基因Pm21通过T6VS.6AL易位系转育到普通小麦(见参考文献:Chen PD,

Qi LL,Zhou B,Zhang SZ,Liu DJ.Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-Haynaldia villosa 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew.Theor Appl Genet,1995,91:1125-1128)。这些新种质及其利用方法为小麦遗传改良提供了宝贵的材料。

[0004] 经过对比簇毛麦1V-7V异附加系,我们发现簇毛麦的2V异附加系的小穗数显著多于其他簇毛麦异附加系,推测簇毛麦2V染色体上携带有多小穗性状的基因。通过电离辐射普通小麦-簇毛麦2V染色体与2D染色体的异代换系DS2V(2D)(见参考文献:李淑梅,徐川梅,周波,陈佩度.普通小麦-簇毛麦2V染色体端体异附加系的选育与鉴定.南京农业大学学报,2009,32(1):1-5。)的花粉授于中国春,并利用中国春进行多次回交,在辐射的回交后代中利用追踪2V染色体特异分子标记、基因组原位杂交(GISH)及FISH鉴定,选育出1个中国春背景普通小麦-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422。通过农艺性状分析,发现易位系NAU422与其轮回亲本中国春相比具有较多的小穗数和穗粒数,同时该易位系还有颖脊毛形态标记,为小麦产量改良提供了新的种质。本发明专利在此基础上,公开一个利用该易位系改良小麦穗粒数从而提高产量的育种方法。

#### 发明内容

[0005] 本发明的目的是公开一个利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的育种方法,即以NAU422为亲本之一,在滚动回交的基础上,利用共显性分子标记Xcinau2VS-1及颖脊毛形态标记Bgr-V1辅助选择T2VS·2DL易位染色体,通过品比试验,获得小麦高产新品系。

[0006] 多小穗种质NAU422在提高小麦穗粒数的分子育种中的应用,所述的多小穗种质NAU422保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2015.1.6,保藏编号为CCTCC P201501。

[0007] 多小穗种质NAU422在提高小麦产量的分子育种中的应用,所述的多小穗种质NAU422保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2015.1.6,保藏编号为CCTCC P201501。

[0008] 一种利用多小穗种质NAU422改良小麦产量的育种方法,以NAU422为亲本(父本或母本),与生产上的丰产品种1(比如扬麦15)杂交,F1代再与生产上的另一丰产品种2(比如南农0686)杂交(即滚动回交),获得BC1F1种子1000粒左右,分单株种植BC1F1,在籽粒灌浆期,根据颖壳脊部是否有颖脊毛形态标记Bgr-V1对BC1F1植株进行选择,保留有Bgr-V1的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F2种子;分单株种植BC1F2,分别在籽粒灌浆期、落黄期,根据Bgr-V1对BC1F2植株进行选择,选取颖壳脊部有颖脊毛、籽粒灌浆饱满且落黄正常的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F3种子;分单株种植BC1F3,每隔10个BC1F3株系种植对照亲本1(扬麦15)和2(南农0686),分别在籽粒灌浆期、落黄期,先选择株高、株型及病害综合抗性均优于对照亲本1和2的株系,再在株系内选择有Bgr-V1的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F4种子;分单株种植BC1F4,每隔10个BC1F4株系种植对照亲本1(扬麦15)和2(南农0686),分别在籽粒灌浆期、落黄期,先选择株高、株型及病害综合抗性均优于对照亲本1和2的株系,再在株系内选择有Bgr-V1植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F5种子;分单株种植BC1F5,每隔10个BC1F5株系种植对照亲本1(扬麦15)和2(南农0686),在拔节期分别取BC1F5株系内5个单株的叶片混合提取叶片DNA,利用共显性分子标记Xcinau2VS-1进行PCR扩增,

保留扩增出2VS 750bp的特异条带,而缺少小麦2DS900bp的特异条带的株系,并混收其籽粒,获得BC1F6种子;分小区种植BC1F6种子,三次重复,并同时种植对照亲本1(扬麦15)和2(南农0686),混收BC1F6种子,晒干后称量重量,保留产量显著高于对照亲本1(扬麦15)和2(南农0686)家系,即可获得通过提高穗粒数从而提高小麦品种产量的新品系。

[0009] 用于追踪本发明所述普通小麦-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422的1个共显性分子标记Xcinau2VS-1,该分子标记引物为XCINAU2VS-1F:AGAAACTGGTGCTCAACCTA(SEQ ID NO.1),XCINAU2VS-1R:AACTTTTGCTTCTCATCTCG(SEQ ID NO.2);利用该分子标记引物对T2VS·2DL染色体易位系进行PCR扩增,能够扩增出2VS 750bp的特异条带,同时缺少小麦2DS 900bp的特异条带。

[0010] 所述的颖脊毛形态标记Bgr-V1在辅助选择育种中的应用,该形态标记在杂合T2VS·2DL易位染色体也能表现,为显性标记,通过该形态标记可以有效追踪T2VS·2DL易位染色体。

[0011] 有益效果:

[0012] 普通小麦中国春-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422(图1)是补偿性整臂易位系,遗传稳定,携带颖脊毛形态标记Bgr-V1(图3),将其用于分子育种,能够显著提高普通小麦的小穗数和穗粒数(表2),便于培育出小麦高产新品系。

[0013] 本发明公开的1个共显性分子标记Xcinau2VS-1(图2,表1)可有效地区分T2VS.2DL易位染色体是纯合还是杂合,便于分子标记辅助选择育种。利用该标记扩增的产物经凝胶电泳后,750bp的条带为2VS染色体臂特异带,810bp条带为2AS染色体臂特异带,870bp条带为2BS染色体臂特异,900bp条带为2DS染色体臂特异带。利用该引物进行PCR扩增的产物经凝胶电泳后,如果出现750bp的条带同时缺少900bp条带,表明所扩增的材料是纯合的T2VS.2DL易位系;若同时出现750bp与900bp条带,表明是杂合的T2VS.2DL易位系;若只出现900bp的特异条带,表明无T2VS.2DL易位染色体。

[0014] 滚动回交可以有效聚合不同丰产品种的优良性状,分离早代根据显性形态标记Bgr-V1辅助选择,可以保留较多遗传重组单株,有利于获得综合农艺性状优良的单株。

## 附图说明

[0015] 图1为T2VS·2DL易位系NAU422的根尖细胞有丝分裂中期染色体基因组原位杂交(a),花粉母细胞减数分裂中期I染色体基因组原位杂交(b),T2VS·2DL易位系NAU422的根尖细胞依次GISH(c)和FISH(d)鉴定。a、b和c中发出绿色荧光信号的为簇毛麦2VS染色体臂,d中发出红色荧光信号为重复序列pAs1的信号。

[0016] 图2为共显性标记Xcinau2VS-1在T2VS·2DL易位系NAU422、亲本和中国春第2群缺体-四体系的扩增及染色体定位。从左到右依次为,泳道1:DNA Marker,DL2000;2:中国春;3:簇毛麦;4:硬粒小麦286;5:硬粒小麦-簇毛麦双二倍体(AABBVV);6:簇毛麦2V异附加系DA2V;7:簇毛麦2V与普通小麦2D异代换系DS2V(2D);8:T2VS·2DL易位系NAU422;9:中国春2A缺体-四体(N2AT2D);10:中国春2B缺体-四体(N2BT2D);11:中国春2D缺体-四体(N2DT2B)。

[0017] 图3为中国春、簇毛麦和T2VS·2DL易位系NAU422的穗型,a图为中国春穗型,b图为簇毛麦穗型,c图为NAU422穗型。箭头所示为来自簇毛麦的颖脊毛形态标记Bgr-V1。

[0018] 生物保藏

[0019] NAU422,分类命名为普通小麦Triticum aestivum,种子保存于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为湖北省武汉市武汉大学,保藏日期为2015.1.6,保藏编号为CCTCC P201501。

### 具体实施方式

[0020] 实施例1

[0021] (1)根据已定位于普通小麦第二部分同源群EST序列设计引物,筛选鉴定T2VS·2DL易位染色体的共显性分子标记

[0022] 利用小麦的EST序列([http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map\\_locus.cgi](http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi))设计PCR引物,从中筛选出1个共显性标记Xcinau2VS-1,(XCINAU2VS-1F:AGAAACTGGTGCTCAACCTA(SEQ ID NO.1),XCINAU2VS-1R:AACTTTTGCTTCTCATCTCG(SEQ ID NO.2));T2VS·2DL易位系NAU422可以扩增出2VS 750bp的特异条带,而缺少小麦2DS 900bp的特异条带(表1,图2)。

[0023] 表1鉴定普通小麦-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422的共显性分子标记

引物编号	EST	小麦位 点数	簇毛 麦位 点数	退火温度(°C)
[0024] XCINAU2VS-1F	BE490521	3	1	57
XCINAU2VS-1R				

[0025] (2)普通小麦-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422的农艺性状分析

[0026] 为了了解该易位染色体对主要农艺性状的效应,揭示该易位系的利用价值,本专利对中国春,T2VS·2DL易位系NAU422的的主要农艺性状比较发现,易位染色体对株高、千粒重没有显著影响,但显著增加了穗长、小穗数和穗粒数(表2),可以作为小麦产量改良的新种质;同时该易位系的颖壳有来自簇毛麦的颖脊毛(图3),易于观察,可以作为形态标记辅助选择T2VS·2DL易位染色体,从而获得高产品系。

[0027] 表2普通小麦-簇毛麦T2VS·2DL易位系NAU422与其背景亲本中国春农艺性状比较

[0028]

Lines	2012-2013					2013-2014				
	PH (cm)	SL (cm)	SS	GS	TKW (g)	PH (cm)	SL (cm)	SS	GS	TKW (g)
中国春	155.3a	8.3b	23.4b	50.0b	34.1a	152.7a	7.9b	24.5b	49.0b	38.5a
NAU422	152.7a	11.8a	27.1a	62.0a	36.1a	152.7a	11.7a	28.7a	68.7a	37.9a

[0029] 表中不同字母表示差异达5%显著水平

[0030] PH株高,SL穗长,SS每穗小穗数,GS穗粒数,TKW千粒重

[0031] (3)利用滚动回交改良小麦产量

[0032] 以NAU422为亲本之一(父本或母本),选取同一生态区内的丰产品种扬麦15和南农0686;扬麦15由江苏省扬州市里下河地区农科所选育,于2005年通过江苏省品种审定委员会审定;南农0686由南京农业大学细胞遗传所选育,于2010年通过国家品种审定委员会审

定;二者的适宜种植区均为长江中下游麦区,可通过种子市场购买或向育种单位索取这两个品种资源。扬麦15株高较矮,抗倒伏能力强,但不抗赤霉病;南农0686植株较高,抗倒伏能力差,但赤霉病抗性好。二者优缺点互补性较好,且均为高产品种。首先NAU422与扬麦15杂交,F1代再与南农0686杂交,获得BC1F1种子1000粒左右,分单株种植BC1F1,在籽粒灌浆期,根据颖壳脊部是否有颖脊毛Bgr-V1对BC1F1植株进行选择,保留Bgr-V1的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F2种子;分单株种植BC1F2,每个单株种植5行,每行40株,分别在籽粒灌浆期、落黄期,根据Bgr-V1对BC1F2植株进行选择,选取颖壳脊部有刚毛、籽粒灌浆饱满且落黄正常的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F3种子;分单株种植BC1F3,每个单株种植5行,每行40株,每隔10个BC1F3株系种植对照亲本扬麦15和南农0686,在籽粒灌浆期先选择赤霉病抗性优于对照扬麦15同时株高低于对照南农0686的株系,再在株系内选择有Bgr-V1的植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F4种子;分单株种植BC1F4,每个单株种植5行,每行40株,每隔10个BC1F4株系种植对照扬麦15和南农0686,在籽粒灌浆期先选择赤霉病抗性优于对照扬麦15同时株高低于对照南农0686的株系,再在株系内选择有Bgr-V1植株,并分单株收获其籽粒,获得BC1F5种子;分单株种植BC1F5,每个单株种植5行,每行40株,每隔10个BC1F5株系种植对照扬麦15和南农0686,在拔节期分别取BC1F5株系内5个单株的叶片混合提取叶片DNA,利用共显性分子标记Xcinau2VS-1进行PCR扩增,保留扩增出2VS 750bp的特异条带,而缺少小麦2DS 900bp的特异条带的株系,并混收其籽粒,获得BC1F6种子;分小区种植BC1F6种子,小区面积6.7m<sup>2</sup>,三次重复,并同时种植对照亲本扬麦15和南农0686,混收各小区种子,晒干后称量重量。经过两年品比试验,NAU-202、NAU-231和NAU-255三个品系的穗长、小穗数、穗粒数及小区产量性状均显著高于对照亲本扬麦15和南农0686(表3)。

[0033] 表3NAU-202、NAU-231和NAU-255三个T2VS.2DL新品系与其亲本产量性状比较  
[0034]

Lines	2012-2013						2013-2014					
	PH (cm)	SL (cm)	SS	GS	TKW (g)	Yield (kg)	PH (cm)	SL (cm)	SS	GS	TKW (g)	Yield (kg)
扬麦 15	85.3c	7.3c	19.4c	45.0c	44.1a	4.2d	83.6c	6.9c	19.84c	44.6c	45.2a	4.5d
NAU-202	86.7bc	10.0a	26.1a	56.0b	41.8c	4.8b	85.8c	9.8.0a	25.7a	55.0b	42.3c	4.9b
NAU-231	88.3b	10.3a	26.7a	60.8a	43.5b	5.0a	87.5b	10.1a	25.5a	58.4a	44.0b	5.1a
NAU-255	85.7c	11.8a	27.1a	62.0a	42.1b	4.7b	84.9c	10.9a	26.3a	59.0a	42.9c	4.8bc
南农 0686	92.9a	8.2b	22.4b	47.3c	41.3c	4.5c	91.8a	8.4b	23.1b	46.7c	40.8d	4.7c

[0035] 表中不同字母表示差异达5%显著水平

[0036] PH:株高,SL:穗长,SS:每穗小穗数,GS:穗粒数,TKW:千粒重,Yield:小区产量。

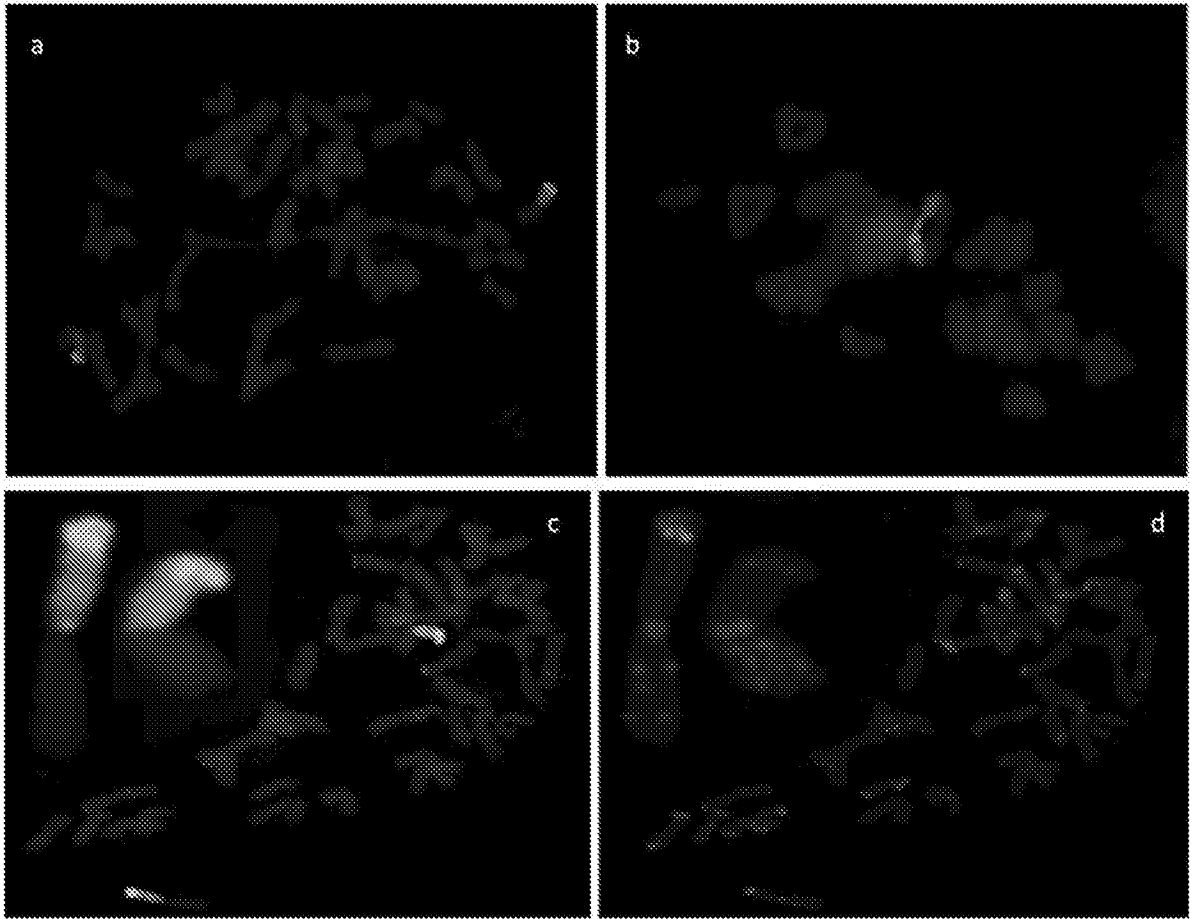


图1

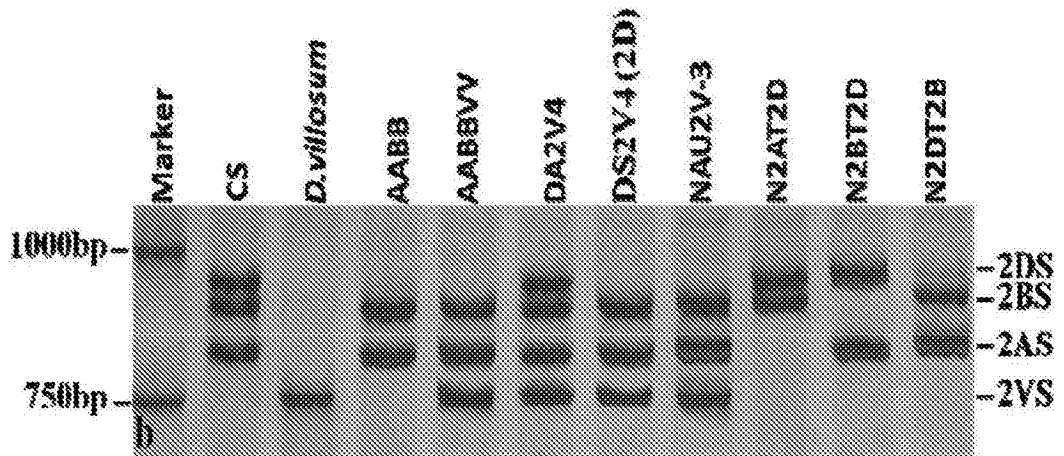


图2

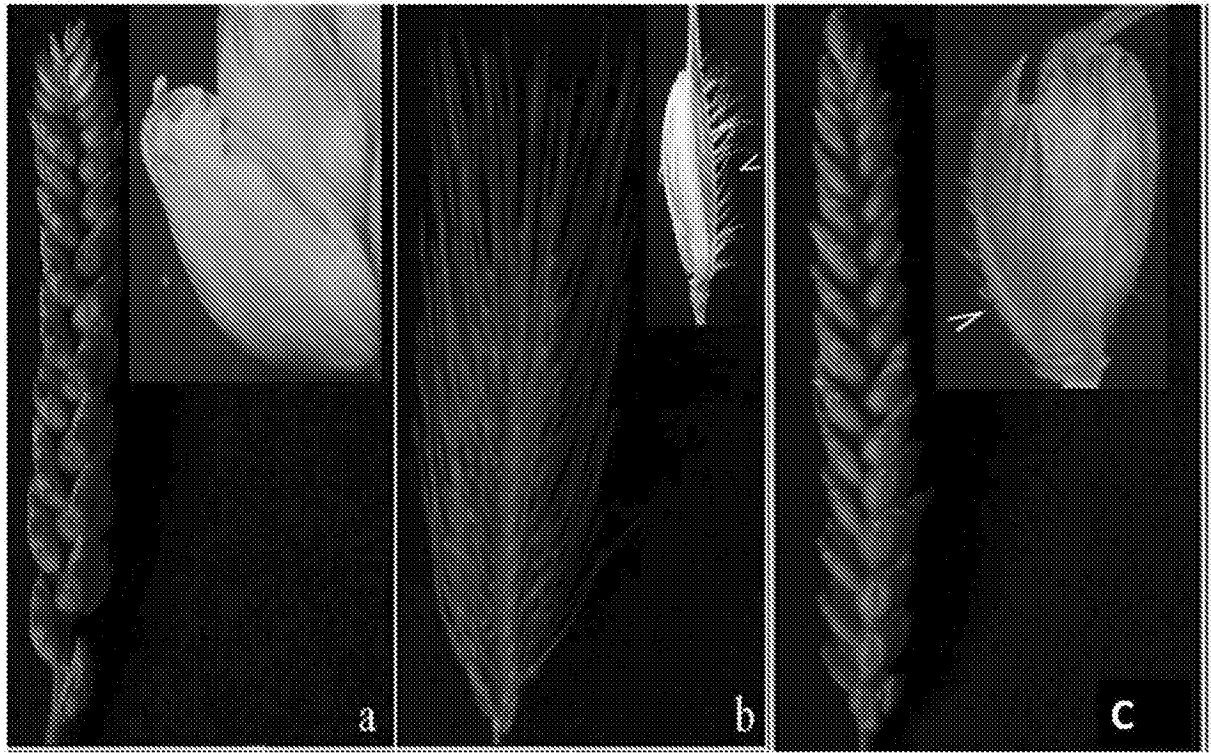


图3