



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112021176 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(21) 申请号 202010782794.7

(22) 申请日 2020.08.06

(71) 申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72) 发明人 曲存民 王瑞 殷家明 李加纳

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务所(普通合伙) 11308

代理人 黎昌莉

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

A01H 1/08 (2006.01)

A01H 1/02 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

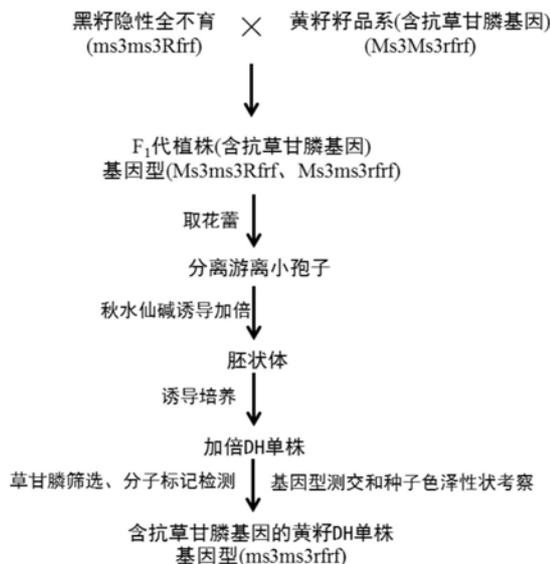
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法

(57) 摘要

本发明提供了一种甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法,包括:a)以黑籽隐性全不育品系为母本,包含抗草甘膦(cp4epsps)基因的优异转化体甘蓝型黄籽品系为父本进行杂交,获得F1代;b)采用甘蓝型油菜小孢子培养技术对F1代植株的游离小孢子诱导培养,获得DH株系;c)将DH株系与隐性纯合两型系中的不育株测交,后代鉴定选择得到含抗草甘膦基因的甘蓝型黄籽油菜隐性核不育临保系。本发明提供的方法能够快速获得性状纯合、遗传稳定的含抗草甘膦基因的甘蓝型黄籽油菜隐性核不育临保系,方法简单,原始材料容易获得。



1. 一种甘蓝型油菜小孢子的培养方法,其特征在于,所述培养方法包括以下步骤:

(1) 从甘蓝型油菜花序上取花蕾在小孢子分离培养基中研磨、过滤、离心后获得小孢子沉淀物a;

(2) 所述小孢子沉淀物a在含秋水仙碱的胚状体诱导培养基中培养获得培养物,将培养物离心得小孢子沉淀物b,将小孢子沉淀物b在不含秋水仙碱的胚状体诱导培养基中培养至可见胚状体,转到摇床继续培养至子叶期获得子叶期胚状体;

(3) 将所述子叶期胚状体转入胚状体成苗培养基中培养成苗;

步骤(1)中所述花蕾的长度为3.5-4.0mm。

2. 根据权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(1)中所述甘蓝型油菜花序为主花序或一次分枝花序,所述取花蕾的时期为初花期。

3. 根据权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(1)中所述小孢子分离培养基包括:2500mg/L的 KNO_3 、250mg/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、150mg/L的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、134mg/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、150mg/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.83mg/L的KI、3.0mg/L的 H_3BO_3 、10mg/L的 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2.0mg/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25mg/L的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、100mg/L的肌醇、1.0mg/L的烟酸、1.0mg/L的盐酸吡哆醇、10mg/L的盐酸硫铵、13.2mg/L的FeNaEDTA和130g/L的蔗糖。

4. 根据权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(2)中所述胚状体诱导培养基包括:125mg/L的 KNO_3 、125mg/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、500mg/L的 $\text{Ca}_4\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、125mg/L的 KH_2PO_4 、26.4mg/L的FeNaEDTA、22.3mg/L的 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6.2mg/L的 H_3BO_3 、8.6mg/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.25mg/L的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100mg/L的肌醇、5mg/L的烟酸、0.5mg/L的盐酸吡哆醇、0.5mg/L的盐酸硫胺素、2mg/L的甘氨酸、0.5mg/L的叶酸、0.05mg/L的生物素、30mg/L的谷胱甘肽、800mg/L的L-谷氨酰胺、100mg/L的L-丝氨酸和130000mg/L的蔗糖。

5. 根据权利要求4所述的培养方法,其特征在于,所述含秋水仙碱的胚状体诱导培养液中秋水仙碱的浓度为10-50mg/L。

6. 根据权利要求5所述的培养方法,其特征在于,所述小孢子沉淀物a在含秋水仙碱的胚状体诱导培养基中密封,30-32℃暗培养1-2天。

7. 根据权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(3)中所述胚状体成苗培养基包括:2500mg/L的 KNO_3 、250mg/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、150mg/L的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、134mg/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、150mg/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.75mg/L的KI、3.0mg/L的 H_3BO_3 、10mg/L的 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2.0mg/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25mg/L的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、37.3mg/L的Na₂-EDTA、27.8mg/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mg/L的肌醇、1.0mg/L的烟酸、1.0mg/L的盐酸吡哆醇、10mg/L的盐酸硫铵、0.1mg/L的赤霉素、0.1mg/L的6-苄氨基腺嘌呤、2%的蔗糖和8g/L的琼脂。

8. 根据权利要求1-7任一所述的培养方法,其特征在于,步骤(1)所述甘蓝型油菜花序是以黑籽隐性全不育品系为母本,含抗草甘膦(cp4 epsps)基因的甘蓝型黄籽品系为父本进行杂交获得的F1代的花序;步骤(3)所述的苗进行草甘膦抗性鉴定和分子标记筛选获得抗草甘膦油菜幼苗。

9. 一种甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法,其特征在于,所述培

育方法包括以下步骤:

(1) 基于权利要求8所述的培养方法培养得抗草甘膦油菜幼苗,生长至花期获得抗草甘膦DH植株;

(2) 将所述抗草甘膦DH植株自交,并与隐性纯合两型品系中的不育株测交,通过草甘膦抗性鉴定、分子标记筛选、基因型和种子性状分析得到甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系。

10. 根据权利要求9所述的选育方法,其特征在于,步骤(2)所述隐性纯合两型品系为SL1AB。

甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法

技术领域

[0001] 本发明涉及农作物选育技术领域,尤其涉及一种甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法。

背景技术

[0002] 油菜是我国重要的油料作物,近年来,菜籽油约占中国食用植物油消费量的23%,是我国重要的食用植物油来源之一。据预测,到2020年,我国油菜籽的年需求量将在2000万吨左右,是2001年全国总产量的2倍。而2001年,我国实际菜籽进口量已达300万吨左右。可见,我国油菜生产发展空间极大。甘蓝型黄籽油菜种皮较薄、种子含油量高、油清澈透明、饼粕蛋白质含量高、纤维素和多酚含量低、饲料利用价值高,极大地改善了菜籽油和饼粕的商品价值,培育甘蓝型黄籽油菜已成为油菜育种的重要目标之一。瑞典教授Olsson(1960)从人工合成的甘蓝型油菜中首次找到了黄籽资源。此后,西德Robbelen(1981)、Jonsson(1983)、加拿大Stefansson(1986)也发现了甘蓝型黄籽油菜资源。1975年,华中农大刘后利教授从甘蓝型种间杂种后代中首次在中国发现了甘蓝型黄籽油菜。此后,国内其它单位如陕西省农垦中心(1980)、贵州农学院(1982)、江苏省农科院(1984)、中国农科院油料所(1985)等都对甘蓝型黄籽油菜开展了大量的应用和基础研究工作。然而,油菜地杂草危害导致油菜生产效率低、成本高,是制约油菜生产发展的另一重要因素。我国油菜,特别是稻田油菜因杂草危害一般田块产量损失在10%以上,严重田块则达50%以上。采用人工除草,劳动强度大,效果差;采用化学除草,只能施用选择性除草剂,除草不彻底,同时选择性类除草剂因分解慢,残留多,有时危害下季作物。而现有的灭生性除草剂如草甘膦、草丁膦(PPT)等虽然除草效果好、成本低、分解快、无残留,但由于无选择性,无法在普通油菜上施用。获得稳定的高产优质、抗灭生性除草剂草丁膦的基因工程油菜杂交品种(系),若能应用于生产,较好地解决我国油菜生产的草害问题,节约成本,促进我国油菜生产的迅速发展。

[0003] 与传统育种比较,小孢子培养技术可以缩短育种年限,提高育种效率。过去采用杂交育种法育成一个遗传性稳定的品种,需要很多年的时间。育种专家必须通过广泛的杂交、回交,然后进行自交,以保证新品种的同质性。现用小孢子培养方法,可以利用F₁代产生的小孢子进行培养,获得单倍体植株,再经秋水仙碱使染色体加倍获得DH,育种时间可以缩短几年,特别适用于难以稳定性状的纯合,如甘蓝型油菜黄籽性状的纯合。同时育种家利用DH系在一个较小的群体中进行选择,可以大大提高常规育种的效率。例如在油菜低芥酸育种中,由于低芥酸油菜含双隐性基因,它在双单倍体中出现的频率是1/4,而在通常F₂代中出现的频率是1/16。

[0004] 黑籽隐性全不育系WSL1A是西南大学2013年选育定型的不育系,并于2013年4月通过重庆市品种审定委员会的鉴定。该品系的选育过程是从2006年引进皖油23杂种和德国NPZ公司MSL不育系材料开始,2007年对皖油23后代分离出的不育株与可育株成对兄妹交,皖油23后代和NPZ公司MSL不育系相互杂交,2008年根据育性分离和恢保关系鉴别隐性纯合两用系SL1A×SL1B,2009年互换可育株测交确定临时保持系WSL1B。2010-2012年连续临时

保持系WSL1B与隐性纯合两用系不育株SL1A杂交,验证杂交后代为全不育系,进而定型为WSL1A。该不育系花朵呈鲜黄色,花瓣小、雌蕊正常、雄蕊退化为褐色枯死状。甘蓝型黄籽恢复系SWU-05R来源于甘蓝型油菜多品系复合杂交后代经测交和定向选育获得的双低品系,SWU-05R于2013年4月通过重庆市品种审定委员会的鉴定。利用隐性全不育和恢复系可以生产杂交种,该不育系统选育的杂交种“渝油27”于2012年通过重庆市审定,已在生产上大面积推广。

[0005] 选育甘蓝型黄籽油菜隐性全不育系是黄籽油菜杂交授粉系统的一个重要途径,获得黄籽临保系是先决条件。但是由于目前的临保系WSL1B为黑籽,临保系受2对以上隐性基因控制,需要广泛大量的测交。常规育种方法选育出的甘蓝型黄籽油菜都为WSL1A的恢复系,通过常规育种方法转育黄籽临保系,分离群体大,测交工作量和测交种后代育性鉴定工作量大,田间实施难度大。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明目的在于提供一种甘蓝型油菜小孢子的培养方法。

[0007] 所述培养方法包括以下步骤:

[0008] (1)从甘蓝型油菜花序上取花蕾在小孢子分离培养基中研磨、过滤、离心后获得小孢子沉淀物a;

[0009] (2)所述小孢子沉淀物a在含秋水仙碱的胚状体诱导培养基中培养获得培养物,将培养物离心得小孢子沉淀物b,将小孢子沉淀物b在不含秋水仙碱的胚状体诱导培养基中培养至可见胚状体,转到摇床继续培养至子叶期获得子叶期胚状体;

[0010] (3)将所述子叶期胚状体转入胚状体成苗培养基中培养成苗;

[0011] 步骤(1)中所述花蕾的长度为3.5-4.0mm。

[0012] 进一步,步骤(1)中所述过滤采用300目滤网;所述离心的转速为1000rpm,时间为3min;

[0013] 进一步,步骤(1)中所述甘蓝型油菜花序为主花序或一次分枝花序。

[0014] 具体地,在小孢子分离培养基中研磨之前,首先对花蕾进行消毒和无菌水清洗,具体操作如下:将花蕾用75%的酒精浸泡0.5-1min,无菌水冲洗3次;再用0.1%的HgCl₂浸泡12min,无菌水冲洗3次,每次大约5min。将花蕾在小孢子分离培养基中进行研磨,具体操作为:将消毒后的花蕾转入无菌小烧杯中,加入小孢子分离培养基,用玻璃注射器内筒挤压花蕾。

[0015] 进一步,步骤(1)中所述过滤采用300目滤网;所述离心的转速为1000rpm,时间为3min;

[0016] 所述离心具体为:将滤液转入带刻度的容积为10ml的离心管中,1000rpm离心3min,离心后倒掉上清液,重新加入小孢子分离培养基,离心3次,获得小孢子沉淀物a。

[0017] 进一步,所述小孢子分离培养基包括:B5大量元素、B5微量元素、B5有机添加物、FeNaEDTA 13.2mg·L⁻¹和蔗糖130g·L⁻¹。具体为:2500mg/L的KNO₃、250mg/L的MgSO₄·7H₂O、150mg/L的CaCl₂·2H₂O、134mg/L的(NH₄)₂SO₄、150mg/L的NaH₂PO₄·H₂O、0.83mg/L的KI、3.0mg/L的H₃BO₃、10mg/L的MnSO₄·4H₂O、2.0mg/L的ZnSO₄·7H₂O、0.25mg/L的Na₂MoO₄·2H₂O、0.025mg/L的CoCl₂·6H₂O、0.025mg/L的CuSO₄·5H₂O、100mg/L的肌醇、1.0mg/L的烟酸、

1.0mg/L的盐酸吡哆醇、10mg/L的盐酸硫酸铵、13.2mg/L的FeNaEDTA和130g/L的蔗糖。

[0018] 进一步,所述小孢子分离培养基的pH值为6.0。

[0019] 进一步,所述胚状体诱导培养基包括:125mg/L的 KNO_3 、125mg/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、500mg/L的 $\text{Ca}_4\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、125mg/L的 KH_2PO_4 、26.4mg/L的FeNaEDTA、22.3mg/L的 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6.2mg/L的 H_3BO_3 、8.6mg/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.25mg/L的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100mg/L的肌醇、5mg/L的烟酸、0.5mg/L的盐酸吡哆醇、0.5mg/L的盐酸硫酸胺素、2mg/L的甘氨酸、0.5mg/L的叶酸、0.05mg/L的生物素、30mg/L的谷胱甘肽、800mg/L的L-谷氨酰胺、100mg/L的L-丝氨酸和130000mg/L的蔗糖。

[0020] 进一步,所述含秋水仙碱的胚状体诱导培养液中秋水仙碱的浓度为10-50mg/L。

[0021] 进一步,步骤(2)中所述小孢子沉淀物a在含秋水仙碱的胚状体诱导培养基中密封,30-35℃暗培养1-2天,优选为32℃

[0022] 进一步,小孢子在所述含秋水仙碱的胚状体诱导培养液中的密度约为5万个/mL。

[0023] 进一步,步骤(2)中离心得到的小孢子沉淀物b在不含秋水仙碱的胚状体培养液中、密封、25℃暗培养至可见胚状体;

[0024] 进一步,步骤(2)中所述摇床所述摇床培养的温度为25℃,转速为60rpm。

[0025] 进一步,步骤(3)中所述胚状体成苗培养基包括:2500mg/L的 KNO_3 、250mg/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、150mg/L的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、134mg/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、150mg/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.75mg/L的KI、3.0mg/L的 H_3BO_3 、10mg/L的 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2.0mg/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25mg/L的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、37.3mg/L的 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 、27.8mg/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mg/L的肌醇、1.0mg/L的烟酸、1.0mg/L的盐酸吡哆醇、10mg/L的盐酸硫酸铵、0.1mg/L的赤霉素、0.1mg/L的6-苄氨基腺嘌呤、2%的蔗糖和8g/L的琼脂。

[0026] 进一步,所述胚状体成苗培养基的pH值为5.8;所述培养的温度为25℃。

[0027] 具体地,胚状体成苗培养基中进行培养至成苗,形成的小植株可移栽到土中,也可转到新鲜的相同培养基中继代培养。没有成苗的胚状体可转到B5培养基继续培养,直至发育成完整的小植株。在立冬后把小苗移栽到田间。

[0028] 在培养至成苗过程中,可以根据情况选择在快繁培养基和/或生根培养基中进行培养,以便得到苗。在本发明中,所述快繁培养基包括:MS、6-BA $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和琼脂 $7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH=5.8)。所述生根培养基包括:1/2MS、IBA $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和琼脂 $7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH=5.8)。

[0029] 进一步,步骤(1)所述甘蓝型油菜花序是以黑籽隐性全不育品系为母本,含抗草甘膦(cp4epsps)基因的甘蓝型黄籽品系为父本进行杂交获得的F1代的花序;步骤(3)所述的苗进行草甘膦抗性鉴定和分子标记筛选获得抗草甘膦油菜幼苗。

[0030] 本发明目的在于还提供一种甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法。

[0031] 所述培育方法包括以下步骤:

[0032] (1) 基于权利要求8或9所述的培养方法培养得抗草甘膦油菜幼苗,生长至花期获得抗草甘膦DH植株;

[0033] (2) 将所述抗草甘膦DH植株自交,并与隐性纯合两型品系中的不育株测交,通过草甘膦抗性鉴定、分子标记筛选、基因型和种子性状分析得到甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性

核不育临保系。

[0034] 进一步,所述黑籽隐性全不育品系为WSL1A。系西南大学王瑞副研究员选育而成,并于2013年4月通过重庆市品种委员会的鉴定。该不育系含油量40.09%、芥酸为0.02%、硫苷29.8 $\mu\text{mol/g}$,抗倒性强,农艺性状较为优良

[0035] 进一步,所述含抗草甘膦基因的甘蓝型黄籽品系为SWUWY-35。系西南大学王瑞副研究员选育而成,于2013年4月通过重庆市品种审定委员会的鉴定。该黄籽品系含油量41.44%、芥酸0%、硫苷含量26.3 $\mu\text{mol/g}$,农艺性状优良。

[0036] 进一步,步骤(2)所述隐性纯合两型品系为SL1AB。

[0037] 进一步,步骤(2)所述种子性状为种子色泽。

[0038] 进一步,在考虑育性时,优选同时考虑种子颜色,选育含抗草甘膦基因的黄籽隐性核不育临保系,具体方法如下:将该可育二倍体株系套袋自交,并与隐性纯合两型品系中的不育株测交。将获得的测交种在花期时进行育性和抗草甘膦鉴定,记录测交种的育性和草甘膦的抗性表现。种子成熟时,再考察二倍体DH株系的种子色泽。若测交种为100%不育且抗草甘膦,对应的父本DH株系为含cp4epsps基因的黄籽,则此黄籽DH株系即为本发明的含抗草甘膦基因的黄籽隐性核不育临保系。

[0039] 本发明某些实施例中,以黑籽隐性不育(基因型为ms3ms3Rfrf)为母本,含抗草甘膦基因的黄籽品系(基因型为Ms3Ms3rfrf)为父本进行杂交,获得的F1代基因型为Ms3ms3Rfrf和Ms3ms3rfrf。取F1代植株的花蕾,分离游离小孢子后在含有秋水仙碱的培养基中培养诱导其加倍得到胚状体,然后在不含秋水仙碱的培养基中培养扩大其数量,并进行草甘膦抗性和分子标记筛选,最终获得加倍的二倍体可育抗草甘膦的DH植株。最后以隐性纯合两型品系中的不育株与含抗草甘膦基因的DH株系测交,根据其育性、草甘膦抗性并结合种子色泽,获得含抗草甘膦基因的甘蓝型黄籽油菜核不育临保系,其基因型为ms3ms3rfrf。

[0040] 本发明的有益效果在于:

[0041] 本发明提供的甘蓝型油菜小孢子的培养方法诱导出胚情况良好,操作简单易行。

[0042] 本发明提供的甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法,测交工作量和测交种后代育性鉴定工作量较小,田间实施难度较小。

[0043] 本发明提供的甘蓝型黄籽油菜抗草甘膦隐性核不育临保系的选育方法能得到性状纯合、遗传稳定的含抗草甘膦基因的甘蓝型黄籽油菜隐性核不育临保系,方法简单,且原始材料容易获得。

附图说明

[0044] 图1为本发明实施例提供的选育方法的流程示意图。

具体实施方式

[0045] 所举实施例是为了更好地对本发明进行说明,但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0046] 本发明实施例用到的WAL1A为甘蓝型黑籽隐性全不育,其基因型为ms3ms3Rfrf,系

西南大学王瑞副研究员选育而成,并于2013年4月通过重庆市品种委员会的鉴定。

[0047] 本发明实施例用到的SWUWY-35为含抗草甘膦基因的甘蓝型黄籽纯系,其基因型为Ms3Ms3rfrf,系西南大学王瑞副研究员选育而成。

[0048] 实施例1

[0049] 本发明实施例用到的培养基如下:

[0050] (1) 小孢子分离培养基(B5-13)

[0051] B5大量元素+B5微量元素+B5有机添加物+FeNaEDTA $13.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $130\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH=6.0)

[0052] (2) 胚状体诱导培养基NLN-13,其中,NLN-13培养基的成分如下:

[0053] 大量元素: KNO_3 $125\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $125\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ca}_4\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $125\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

[0054] 铁盐:FeNaEDTA $26.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

[0055] 微量元素: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $22.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 H_3BO_3 $6.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $8.6\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0.025\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.025\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

[0056] 有机添加物:肌醇 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、烟酸 $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸吡哆醇 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸硫胺素 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、甘氨酸 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、叶酸 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、生物素 $0.05\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、谷胱甘肽 $30\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、L-谷酰胺 $800\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、L-丝氨酸 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $130000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[0057] (3) 胚状体成苗培养基

[0058] B5+GA3 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖2%+琼脂 $8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH=5.8);

[0059] (4) 快繁培养基

[0060] MS+6-BA $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂 $7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH=5.8);

[0061] (5) 生根培养基

[0062] $1/2\text{MS}$ +IBA $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂 $7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH=5.8)。

[0063] 实施例2

[0064] 2018年3月油菜花期以WAL1A为母本与父本SWUWY-35杂交,获得F1代种子。

[0065] 在2018年3月油菜花期,对F1进行小孢子培养,共获得200个胚状体,经诱导培养获得160个单株,2018年10月栽入大田,2019年3月鉴定加倍植株为88个,再通过草甘膦和分子标记鉴定获得抗草甘膦的植株60个。具体过程如下:

[0066] (1) 从生长健壮的植株F1上,摘取主花序或一次分枝花序顶端部分3.5~4mm的花蕾,用75%的酒精浸泡0.5-1min,无菌水冲洗3次,再用0.1%的 HgCl_2 浸泡12min,无菌水冲洗3次,每次大约5min;

[0067] (2) 将消毒后的花蕾转入无菌小烧杯中,加入小孢子分离培养基,用玻璃注射器内筒挤压花蕾,再经300目的滤网过滤,将滤液转入带刻度的容积为10ml的离心管中,1000rpm离心3min,离心后倒掉上清液,重新加入小孢子分离培养基,离心3次,最后获得小孢子沉淀物。将含有秋水仙碱的胚状体诱导培养液加到小孢子沉淀物中,使小孢子密度约5万个/ml。然后把含有小孢子的培养基分装到培养皿中密封,并放在32℃的培养箱中暗培养1-2d之后,进行离心去掉含秋水仙碱的胚状体诱导培养液,并在培养皿中加入没有秋水仙碱的胚状体诱导培养液,随后把培养皿密封放到25℃的培养箱暗培养。当培养皿中出现肉眼可见的球形胚时,再把培养皿放到摇床震荡培养(60rpm,25℃)。

[0068] (3) 当震荡培养的胚状体发育到子叶期时,将其转入胚状体成苗培养基中,并置于25℃进行培养,形成的小植株可移栽到土中,也可转到新鲜的相同培养基中继代培养。没有成苗的胚状体可转到B5培养基继续培养,直至发育成完整的小植株。在立冬后把小苗移栽到田间,同时进行草甘膦和分子标记鉴定。成苗之后,继代、保存用1/2MS培养基(即快繁培养基),生根时用生根培养基,生根是在移栽前20~30天开始,因此在此之前的苗需要继代保存。

[0069] 2019年3月对这60个加倍植株套袋自交同时与纯合两型系SL1AB中的不育株测交。2019年5月考察60个DH株系自交种的种子色泽。2020年3月调查测交种的育性和草甘膦抗性表现,结合DH株系自交种子色泽,发现有两个黄籽DH株系与SL1AB中的不育株测交种表现为隐性全不育和抗草甘膦,其基因型为ms3ms3rfrf。其中一个黄籽DH株系种子色泽纯黄,长势正常,命名为WSLB-1,即为本发明所描述的含cp4epsps基因的甘蓝型黄籽油菜隐性核不育临保系。

[0070] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

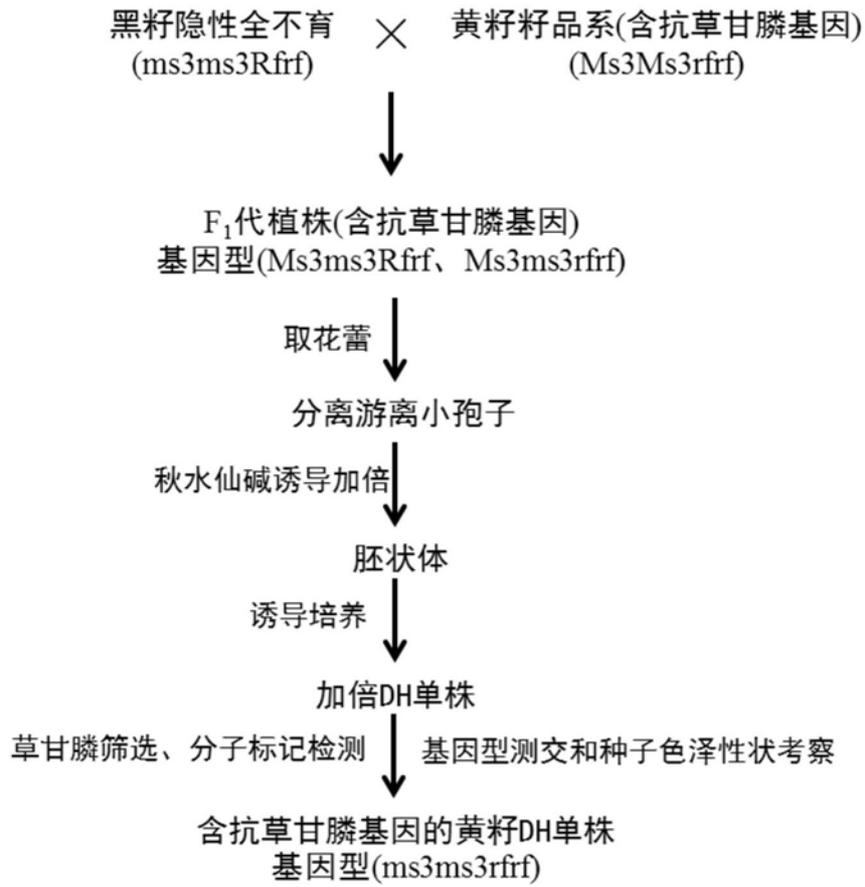


图1